

Aus dem Institut für Toxikologie
Der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Direktorin: Frau Prof. Dr. Regine Kahl

**Untersuchungen
zum
Embryonalen Stammzell Test (EST)**

**Entwicklung neuer Endpunkte
in der
Embryotoxizitätsmessung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Leilani Ruf

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich Heine Universität Düsseldorf

gez.: Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Nürnberg

Dekan

Referentin: Frau Prof. Dr. R. Kahl

Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Haas

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 DER EMBRYONALE STAMMZELL TEST (EST) UND SEINE BEDEUTUNG	7
1.2 EMBRYONALE STAMMZELLEN	11
1.3 EMBRYOTOXIZITÄT DER TESTSUBSTANZEN (BASISDATEN)	14
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELE	23
3 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 GERÄTE	28
3.2 LABOR UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	28
3.3 ZELLINIEN	29
3.4 TESTSUBSTANZEN	29
3.5 ZELLKULTUR	30
3.6 EMBRYONALER STAMMZELL TEST, (EST)	31
3.6.1 Differenzierungsversuch	31
3.6.2 Zytotoxizitätsbestimmung	32
3.6.3 Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen mit Hilfe des Prädiktionsmodells	35
3.7 IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG	37
3.8 ZELL-ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	38
3.9 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN (FACS)	39
3.10 QUANTITATIVE ´REAL TIME` RT PCR	41
3.10.1 Isolation von Gesamt RNA	42
3.10.2 Quantifizierung der RNA	43
3.10.3 cDNA- Synthese	43
3.10.4 Quantitative ´Real Time´ PCR	43
4 ERGEBNISSE	41
4.1 INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG DER KARDIOMYOZYTEN IN EMBRYOID BODIES (EB)	41
4.1.1 FITC und PE Färbung gegen ´ α Sarcomeric Aktin´	42
4.1.2 FITC-Färbung gegen ´Myosin heavy Chain´	43
4.1.3 FITC-Färbung der Embryoid Bodies gegen ´ α Sarcomeric Aktin´	43
4.2 BESTIMMUNG DES EMBRYOTOXISCHEN POTENTIALS DER TESTSUBSTANZEN MIT DEM EMBRYONALEN STAMMZELL TEST (EST)	45
4.3 Erweiterte ANALYSE DER EMBRYOTOXIZITÄT DER TESTSUBSTANZEN MIT HILFE DES ZELL-ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	64
4.4 ERWEITERTE ANALYSE DER EMBRYOTOXIZITÄT DER TESTSUBSTANZEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE/ FACS (FLUORESCENT ACTIVATED CELL SORTER)	67

4.5	Erweiterte ANALYSE DER EMBRYOTOXIZITÄT DER TESTSUBSTANZEN MIT HILFE VON QUANTITATIVER „REAL-TIME PCR“	73
5	DISKUSSION	82
5.1	VALIDIERUNG DER TESTSUBSTANZEN NACH DEM MODELL DES EMBRYONALEN STAMMZELL TESTS (EST). VERGLEICH MIT <i>IN VIVO</i> BEKANNTEN DATEN.	83
5.2	ETABLIERUNG NEUER ENDPUNKTE IN DER EMBRYOTOXIZITÄTSMESSUNG	91
5.2.1	Endpunkt 1: Analyse substanzbehandelter Embryoid Bodies durch Zell-ELISA an Tag 10 der Differenzierung	92
5.2.3	Endpunkt 2: Durchflusszytometrische Untersuchung der substanz-behandelten ‘Embryoid Bodies’ an Tag 10 der Differenzierung	94
5.2.3	Endpunkt 3: Analyse der β MHC Expression in ‘Embryoid Bodies’ mittels quantitativer real time PCR an Tag 8 der Differenzierung	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	101
7	LITERATURVERZEICHNIS	102

Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	(zyklisches) Adenosin Monophosphat
CTP	Cytidintriphosphate
DNA	engl. "Desoxyribonucleid acid"
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPH	Diphenylhydantoin
DTT	Dithiothreitol
EB	engl. "Embryoid Body"
ECVAM	engl. "European Center for the Validation of Alternativ Methods"
EDTA	engl. "Ethylenediamine-Tetraacetic Acid"
ELISA	engl. "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
EMB	Ethambutol
ES	Embryonale Stammzelle
EschG	Embryonen Schutz Gesetz
EST	Embryonaler Stammzell Test
FACS	engl. "Fluorescent Activated Cell Sorter"
FCS	engl. "Fetal Calf Serum"
FH2	Dihydrofolsäure
FITC	Fluoreszein-Isotiocyanat
5-FU	5-Fluorouracil
GTP	Guanosintriphosphat
IC50	engl. "Inhibition of growth; Cytotoxicity"
ID50	engl. "Inhibition of Determination"
Ig	Immunglobulin
INH	engl. "Isonicotinic Acid Hydracide" Isoniazid
LIF	engl. "Leukemia Inhibiting Factor"
MEM	engl. "Modified Eagles Medium"
MHC	engl. "Myosin Heavy Chain"
MM	engl. "Micromass Assay"
MTT	3-(4,5-dimethylthiazid-2yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
MTX	Methotrexat
N	Negativkontrolle
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NoEC	engl. "No Effect Concentration"
NTD	engl. "Neural Tube Defect"
P	Phosphat
p.A.	pro Analysis
PBS	engl. "Phosphate Buffered Saline"
PCR	engl. "Polymerase Chain Reaction"
PE	Phycoerythrin
PM	Prädiktionsmodell
RNA	engl. "Ribonucleic Acid"
RT	Reverse Transkription
SDS	engl. "Sodiumdodecylsulfate"
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA
UMP	Uridinmonophosphat
UV	Ultraviolett
WEC	engl. "Rat Whole Embryo Culture Assay"
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
ZNS	Zentral Nerven System

1. Einleitung

Der Embryonale Stammzell Test (EST) und seine Bedeutung

Anfang der sechziger Jahre ereignete sich eine der größten Arzneimittelkatastrophen weltweit. Als das Medikament Contergan am 01. Oktober 1957 auf den Markt kam, wurde es als wahres Wundermittel gepriesen: Ruhe und erholsamen Schlaf sollte das neue Medikament schenken. Die vom Wirtschaftswunder gestresste Bevölkerung war begeistert und Contergan der Kassenschlager der kleinen deutschen Firma Grünenthal. Jeden Monat wurden über 20 Millionen Tabletten mit dem Wirkstoff Thalidomid produziert. Das neue Medikament wurde nicht nur bei Schlaflosigkeit, sondern auch gegen Übelkeit in der Schwangerschaft eingesetzt. Zuvor hatte sich im Tierversuch keine nennenswerte Toxizität gezeigt, und thalidomidhaltige Präparate wurden als unbedenklich eingestuft. Kurze Zeit später wurden Kinder mit hypoplastischen Gliedmaßen (genannt Phokomelie nach *phokos* griech. Robbe), Schädigungen des Gehörs und innerer Organe geboren. In Deutschland häuften sich die Fälle. Nach vier Jahren entdeckte als Erster der Kinderarzt Dr. Lenz den Zusammenhang mit dem Schlafmittel Contergan. Er warnte die Herstellerfirma und machte seine Vermutungen in der Öffentlichkeit bekannt. Die Verantwortlichen glaubten ihm nicht. Erst 1961 nachdem am 26. November ein Artikel in der „Welt am Sonntag“ über die Lenz'schen Entdeckungen berichtete, wurde das Medikament am nächsten Tag zurückgezogen. In den vier Jahren sind durch die Einnahme von thalidomidhaltigen Präparaten in Deutschland 2700 Kinder mit verstümmelten Gliedmaßen zur Welt gekommen. Ungefähr weitere 3000 Kinder überlebten die ersten Monate nicht, da Contergan auch die Entwicklung innerer Organe schädigte. Weltweit wurden über 10000 Kinder mit Conterganschäden geboren. Thalidomidhaltige Präparate waren in Verkehr gebracht worden, ohne dass es ein öffentlich-rechtliches Zulassungsverfahren durchlaufen hatte. Ein Zulassungs- und Monitorwesen existierte einfach nicht- es galt das Prinzip der Selbstüberwachung. Im Grunde herrschte immer noch preußisches Gewerberecht, das aber nicht konzipiert war für das gesteigerte Risikopotential völlig neu synthetisierter Stoffe, wie sie seit den 30er Jahren verfügbar wurden. Gelernt werden konnte in Deutschland beinahe nur aus Erfahrung an Patienten bzw. Konsumenten. (Luhmann, 2000) Nach der Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Medikamenteneinnahme und Fruchtschädigung wuchs der Druck auf die

Einleitung

pharmazeutischen Unternehmen und die Gesetzgebung. Der Umgang mit Medikamenten wurde kritischer, die Erfahrungen schlugen sich im Arzneimittelgesetz von 1976 nieder. Nach einem langwierigen und umfangreichen Gesetzgebungsverfahren wurde im Juni 1976 das zweite Arzneimittelgesetz verabschiedet. Es trat am 1. Januar 1978 in Kraft. Die wichtigsten Änderungen zum Arzneimittelgesetz von 1961 waren:

- Einführung einer Zulassungspflicht für alle Fertigarzneimittel, die an die Vorlage von Nachweisen für die vom Hersteller behauptete therapeutische Wirksamkeit, für die toxikologische Unbedenklichkeit und für die Qualität gebunden war.
- Einführung einer Offenlegungspflicht, die die Beschriftung von Behältnissen und der Packungsbeilagen der Arzneimittel regelt.
- Einführung detaillierter Regelungen über die klinische Erprobung von Arzneimitteln.
- Automatische Verschreibungspflicht für Arzneimittel, die Stoffe enthalten, deren Wirkungen und Zubereitungen in der medizinischen Wissenschaft nicht allgemein bekannt sind.
- Einführung eines Systems von Beobachtungen, Sammlung und Auswertung von Arzneimittelrisiken.
- Bestimmungen über die Prüfung von Arzneimitteln.
- Spezielle Haftungsregelungen für Arzneimittelschäden.

(Marinero, 1982).

Nach diesem heute in der 12. Fassung vorliegenden Gesetz und dem 1982 in Kraft getretenen Chemikalienrecht der Europäischen Union gibt es zwar ausreichende Informationen zu neuen Stoffen, aber praktisch keine zu den 100 000 Altstoffen, die in Mengen von weniger als 5 Tonnen pro Jahr oder weniger als 5 Tonnen insgesamt produziert werden. Zur Modernisierung des EU-Chemikalienrechts wurde 2003 ein Vorschlag für eine neue EU Verordnung für Chemikalien vorgelegt, der jedoch frühestens 2007 in Kraft treten wird. Nach dieser geplanten REACH Verordnung (**R**egistration, **E**valuation and **A**uthorisation of **C**hemicals - Registrierung, Bewertung und Zulassung chemischer Stoffe) sollen Unternehmen, die einen chemischen Stoff in Mengen von mehr als einer Tonne pro Jahr herstellen oder importieren, diesen

Einleitung

Stoff in einer zentralen Datenbank registrieren lassen, die mit der Verwendung verbundenen Risiken bewerten und Maßnahmen zur Beherrschung der Risiken treffen. Hierdurch erhält die Industrie mehr Verantwortung für die von Chemikalien ausgehenden Risiken und die Bereitstellung von Informationen zu deren sicheren Umgang.

Besondere Zulassungsbestimmungen gelten für sogenannte CMR-Substanzen (krebserzeugend, erbgutschädigend und fortpflanzungsgefährdend). Leitlinien zur Bestimmung der Reproduktionstoxizität der CMR Substanzen wurden durch die ICH („International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use“) herausgegeben. Die Fortpflanzung wird hier in konsekutive Phasen (Segmente) aufgeteilt: Segment 1 umfasst die Prüfung auf Störung der weiblichen und männlichen Fertilität, Segment 2 ist der klassische Teratogenitäts- und Embryotoxizitätstest an Ratten oder Kaninchen, Segment 3 beinhaltet die Prüfung auf peri- und postnatale Toxizität.

Besonders Segment 2 betreffend wurden und werden alternative Testmethoden zum Tierversuch entwickelt und in Voruntersuchungen und Sekundärtestungen eingesetzt. (ICH Harmonised Tripartite Guideline, S5, Step 4 Version)

Diese Abkehr von Sicherheits- und umwelttoxikologischen Tierversuchen hin zu tierversuchsfreien *in vitro* Methoden ist nicht nur aus wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Sicht zu begrüßen, sondern auch unter Umwelt- und ethischen Aspekten.

In bezug auf die Embryotoxizitätstestung werden aktuell 3 *in vitro*-Tests als Alternativmethoden als wissenschaftlich validiert anerkannt:

1. der Micromass (MM) Embryotoxizitätstest
2. der `Whole Embryo Culture Test` (WEC)
3. der Embryonale Stammzell Test (EST)

(Spielmann, 2002)

Im Gegensatz zu Tierversuchen sind diese *in vitro* Zellkulturmodelle durch geringen Aufwand, kurze Zeitdauer und geringen Substanzbedarf charakterisiert. In einer von ECVAM geleiteten internationalen Validierungsstudie bestehend aus 3 Phasen zeigte sich, dass die Reproduzierbarkeit der 3 Testverfahren akzeptabel war. Speziell für den Embryonalen Stammzell Test (EST) zeigte sich, dass nach Anwendung des Prädiktionsmodells, eines biostatistischen Analyseverfahrens, 78% der Testsubstanzen (MM70%, WEC 80%) im Vergleich zu *in vivo* bekannten Daten

Einleitung

bezüglich des embryotoxischen Potentials korrekt eingestuft wurden. Eine exzellente Vorhersagbarkeit von 100% wurde bei den stark embryotoxischen Substanzen erreicht. (Genschow et al, 2002)

Der Vorteil des EST gegenüber dem `Micromass Assay` und dem `Whole Embryo Culture Test` ist, dass es sich bei den Embryonalen Stammzellen um eine permanente Zelllinie handelt. Es ist daher für den EST nicht notwendig, embryonale Zellen oder Gewebe trächtigen Tieren zu entnehmen.

Im EST werden zwei Zelllinien verwendet, einerseits die ES-Zellen zur Repräsentation des embryonalen Gewebes, andererseits 3T3 Fibroblasten zur Repräsentation adulten Gewebes.

Die Entwicklung eines solchen Testverfahrens wurde vereinfacht, nachdem bekannt geworden war, dass die Embryonalen Stammzellen in der Anwesenheit von `Cytokine Leukemia Inhibiting Factor` (LIF), ein Mitglied der Interleukin 6 Familie der Zytokine, in undifferenziertem Zustand kultiviert werden können. (Williams et al, 1988; Bader et al, 2000) Aufwändigere Möglichkeiten die ES Zellen in undifferenziertem Zustand zu kultivieren, sind die Kulturen auf sogenannten embryonalen Fibroblasten der Maus (Wobus et al, 1984) oder auf sogenannten `Buffalo rat liver cells` (BRL) (Smith et al, 1987). Nachteilig bei dieser Methode ist die Schwierigkeit der Standardisierung des Testverfahrens, da ES Zellen und Feederzellen nicht ohne Weiteres getrennt werden können.

In Abwesenheit eines Differenzierungsinhibitors formen die Zellen unter definierten Kulturbedingungen sogenannte `Embryoid Bodies` und differenzieren zu Herzmuskelzellen, deren Kontraktionen im Mikroskop beurteilt werden können. Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen wird im EST verglichen mit dem zytotoxischen Effekt der Substanz, einerseits auf die Stammzellen (ES;D3), andererseits auf differenzierte, `adulte` Fibroblasten der Maus (3T3 A31).

Als Bewertungskriterien werden im EST 3 Endpunkte zur Bestimmung der Embryotoxizität und zur Einteilung in die drei Klassen **nicht**, **schwach** und **stark** embryotoxisch gewählt:

1. Differenzierungshemmung der Embryonalen Stammzellen, beurteilt durch das Vorhandensein kontrahierender Areale im Mikroskop
2. Wachstumshemmung der Embryonalen Stammzellen, quantifiziert durch einen Zytotoxizitätstest (MTT-Test)

Einleitung

3. Wachstumshemmung der 3T3 Fibroblasten, ebenfalls quantifiziert durch einen Zytotoxizitätstest (MTT-Test)

Beruhend auf den beiden wichtigsten Mechanismen der Entstehung von embryotoxischem Potential, Zytotoxizität und Differenzierungshemmung, wurde der EST als Screening Methode etabliert.

Embryonale Stammzellen

Unter einer Stammzelle versteht man jede undifferenzierte Zelle eines Organismus, die sich selbst vermehren und reifere Tochterzellen bilden kann. Bei den Embryonalen Stammzellen handelt es sich um eine sehr frühe Form, welche aus der inneren Zellmasse der sogenannten Blastozyste, einem Stadium des Maus Embryos an Tag 3.5/4 der Entwicklung, gewonnen wird.

Während die Zygote durch den Eileiter uteruswärts wandert, macht sie eine Reihe rasch aufeinanderfolgender Zellteilungen durch. Dieser Prozess wird als Furchung bezeichnet. Dabei kommt es zu einer Vermehrung der Zellzahl, wobei jedoch die Menge des Zytoplasmas insgesamt gleich bleibt. Die 1. Teilung der Zygote in zwei Tochterzellen, die man als Blastomeren bezeichnet, erfolgt einige Stunden nach der Befruchtung. Bei den anschließenden Teilungen, die rasch aufeinanderfolgen, bilden sich immer kleinere Blastomeren aus. Nach einiger Zeit ist eine Kugel aus etwa 16 Blastomeren entstanden, die als Morula bezeichnet wird.

Später bildet sich in der Morula Flüssigkeit, welche die Blastomeren auseinander drängt, so dass sich jetzt zwei Zellbereiche abgrenzen lassen:

1. eine äußere Zelllage, der sogenannte Trophoblast, der sich später zur Plazenta umbildet,
und
2. eine Gruppe zentralliegender Zellen, die man als innere Zellmasse oder Embryoblast bezeichnet, da aus ihr der Embryonalkörper hervorgeht.

Die Zeitspanne des embryonalen Stammzellstadiums in der Blastozyste beträgt nur wenige Tage. Im Anschluss erfahren die Zellen des Embryos bereits eine Prägung, welche ihr Differenzierungsspektrum einschränkt. (Moore et al, 1996)

Embryonale Stammzellen, ES-D3, eine permanente Zelllinie, wurden aus der inneren Zellmasse 4 Tage alter Blastozysten der Maus (Linie 129/Sv+C/+9) entnommen (Doetschman et al., 1985). Die Zellen sind pluripotent und werden z.B. mit Hilfe von LIF (Murine Leukemia Inhibiting Factor, ESGRO) in undifferenziertem Zustand

gehalten. Unter passenden Bedingungen können die Embryonalen Stammzellen sogenannte 'Embryoid Bodies' bilden, die Zellen des Nervensystems, hämatopoetische Zelltypen, Kardiomyozyten, glatte- und Skelettmuskelzellen, Chondrozyten, Endothelzellen und Keratinozyten enthalten.

Diese Fähigkeit der Embryonalen Stammzellen stellt einige vielversprechende und weitgefächerte Möglichkeiten in Aussicht. Im wesentlichen gibt es 3 Anwendungsgebiete für den Einsatz der Embryonalen Stammzellen zu Forschungszwecken.

1. Untersuchung von Entwicklungsprozessen der frühen Embryonalentwicklung, die *in vivo* nur schwer zugänglich sind
2. Organersatz durch Stammzelltherapie
3. Einsatz für pharmakologische und toxikologische Versuche wie zum Beispiel der Embryonale Stammzelltest (EST)

Änderung des Embryonenschutzgesetzes vom 23.Oktober 2001

Was bedeuten die im EST gewonnenen Ergebnisse für den Menschen und die pharmakologische Forschung?

Ob die Testsubstanzen auf gleiche Weise und in gleichem Ausmaß die humane Entwicklung beeinflussen, kann nicht sicher gesagt werden. Einen Hinweis zu dieser Frage könnten Versuche an humanen Embryonalen Stammzellen geben. Nach Änderung des Embryonenschutzgesetzes am 23. Oktober 2001 ist die Forschung an menschlichen Embryonalen Stammzellen in begrenztem Umfang möglich. Nach dem Beschluss des Bundestages dürfen bestehende embryonale Stammzelllinien importiert und zu Forschungszwecken benutzt, jedoch keine weiteren Embryonen zu diesem Zweck getötet werden. Nach dem Beschluss dürfen nur menschliche ES Zellen eingeführt werden, die vor dem 1. Januar 2002 gewonnen wurden. Forschungsprojekte mit diesen Zellen müssen von der zentralen Ethikkommission genehmigt werden. Es gibt in Deutschland aktuell 4 Forschungsgruppen, die mit Embryonalen Stammzellen arbeiten.

Die Forschung mit den Stammzellen der Maus liefert dennoch einen wichtigen Beitrag für eine Forschung die auch für den Menschen relevant ist. In mehreren Studien konnte belegt werden, dass die Herzentwicklung der Maus ähnlich wie die des Menschen abläuft. Wesentliche Punkte der Herzentwicklung konnten auch bei

Einleitung

der Differenzierung im Embryoid Body entdeckt werden. Es kann aus diesem Grund davon ausgegangen werden, dass Veränderungen, die während der Differenzierung im EST auftreten, prinzipiell in dieser Weise auch in der frühen Kardiogenese des menschlichen Feten auftreten.

Während der fetalen und embryonalen Entwicklung der Maus findet die Kardiogenese vor anderen Organentwicklungen statt. Morphologische Studien über die embryonale Entwicklung der Maus haben gezeigt, dass der Herzkomplex in ähnlicher Weise entsteht wie bei anderen Vertebraten.

Generell findet die Kardiogenese früh während der Gestation statt und betrifft ein paariges Areal des lateralen Mesoderms, nahe dem vorderen Ende des Embryo. Diese Herzanlage umfasst zunächst zwei Herzschräuche.

Nach 7½ Tagen treten bei der Maus zum ersten mal die beiden zellulären Stränge des lateralen Mesoderms, die an der Bildung des HerZRudimentes beteiligt sind, in Erscheinung. Am 8. Tag resultiert die Verdickung der mesodermalen Zellen in der Bildung des Epimyokards. Bisher ruhende mesenchymale Zellen zwischen dem verdickten Mesoderm und dem endodermalen Grund beginnen, sich in zwei bilateral gegenüberstehende endokardiale Schräuche zu differenzieren. Diese erhalten bald ein Lumen und werden so zu den primitiven Herzschräuchen. Im Zuge der Abfaltung vom Dottersack wandern die beiden Endokardschräuche aufeinander zu und verschmelzen schließlich in der Medianebene zu einem einheitlichen Herzschräuch. Gleichzeitig verdickt sich das angrenzende Mesoderm und wird zum myoepikardialen Mantel.

In diesem Entwicklungsstadium stellt das Herz lediglich einen dünnwandigen Schlauch dar, der von einem zweiten Schlauch, dem myoepikardialen Mantel, durch ein lockeres, gallertiges Bindegewebe getrennt ist (Herzgallerte). Aus dem endokardialen Rohr entsteht das Endokard, aus dem myokardialen Mantel die Herzmuskulatur (Myokard).

Die Verschmelzung der beiden paarigen Herzschräuche beginnt kranial und setzt sich rasch kaudalwärts fort. Mit der Ausbildung der vorderen Grenzrinne bei der Abfaltung der Keimscheibe vom Dottersack werden dann Herzschräuch und Perikardhöhle nach ventral, und zwar unter die entodermale Darmbucht, verlagert, d.h., sie liegen dann kaudal der Rachenmembran. In diesem Stadium können spontane, wenn auch unregelmäßige Kontraktionen beobachtet werden. An Tag 9

Einleitung

tritt bei der Maus ein gerichteter Blutstrom durch den Herzschlauch auf. (Kaufmann et al 1981)

Beim Menschen tritt die erste Anlage des Herzens im Bereich der kardiogenen Zone bei 18 bis 19 Tage alten Embryonen als Verdickung der Splanchnopleura in Erscheinung. Aus der Splanchnopleura schwärmen Mesenchymzellen aus, die sich beiderseits der Mittellinie zu längsorientierten Zellsträngen verdichten. Am 22. Tag hat sich bereits ein einheitlicher Herzschlauch gebildet. Die Kardiogenese findet beim Menschen im Vergleich zur Maus mit einer Zeitverschiebung von ca. 11 Tagen in sehr ähnlicher Weise statt. (Moore et al, 1996)

Auf biochemischer Ebene konnten einzelne Aspekte dieser Entwicklungsmechanismen auch *in vitro* bei der Differenzierung der Embryonalen Stammzellen beobachtet werden.

Die 'Embryoid Bodies' exprimieren analog die von Entwicklungsstadien abhängigen herz- und muskelspezifischen ‚Myosin Heavy Chain‘ (MHC) Transkripte. (Robbins et al.,1990) Ähnliche Resultate konnten auch für alpha-Tropomyosin beobachtet werden (Wieczoreck et al.,1990). Lindenbaum und Grosevelt (1990) zeigten, dass die Embryoid Bodies fähig sind das komplette Globin Muster der embryonalen Kardiogenese in korrekter zeitlicher Abfolge zu exprimieren.

Im Embryoid Body kommt es natürlich nicht zur vollständigen Herzentwicklung, wichtige Differenzierungsschritte auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene konnten jedoch nachvollzogen werden.

Embryotoxizität der Testsubstanzen (Basisdaten)

Am Beispiel Thalidomid kann gezeigt werden, dass die Gefahr embryotoxischer Chemikalien darin besteht, dass sie in Konzentrationen eingesetzt werden, die für den Erwachsenen nicht toxisch sein müssen.

Die Manifestation einer abnormen Entwicklung wird mit steigender Dosierung der Substanz zunehmend schwerwiegender und reicht von der Unschädlichkeit über Missbildungen bis zur Letalität. Es wird allgemein angenommen, dass eine abnorme Entwicklung nur dann einsetzt, wenn die Dosierung einen gewissen Schwellenwert überschritten hat, und dass Werte darunter nicht toxisch wirken. Die Schwellenwert-Dosis ist jene, unterhalb derer die Häufigkeit von Anomalien, eines

Einleitung

Wachstumsrückstandes und eines Absterbens des Feten nicht größer ist als in den Kontrollen. Außerdem muss eine gewisse kritische Anzahl von Zellen zerstört werden, damit der Embryo nicht mehr fähig ist, einen Schaden durch Zellvermehrung zu kompensieren. Es ist zu betonen, dass unter entsprechenden Laboratoriumsbedingungen die meisten Medikamente und Chemikalien in hohen Konzentrationen toxisch sind. Es folgt daraus nicht, dass alle Substanzen schädlich sind, wenn sie in therapeutischen Mengen angewandt werden. Deshalb ist es wichtig, während der Schwangerschaft ein sorgfältiges Gleichgewicht zwischen dem Risiko und einem möglichen Vorteil herzustellen. (Spielmann et al,1992)

Die Testsubstanzen für die Embryotoxizitätsexperimente wurden von Spielmann et al. (1997) übernommen. Ihre embryotoxische Wirkung *in vivo* ist bekannt und soll im Einzelnen näher erläutert werden. Darüberhinaus wurden die bisher im EST noch nicht getestete Substanz Thalidomid eingesetzt. Auch hier liegen *in vivo* Daten vor.

Saccharin

Saccharin ist der älteste synthetische Süßstoff und wurde 1878 von den Chemikern Fahlberg und Ira Remsen an der John Hopkins Universität entdeckt. Seit 1902 ist Saccharin in Deutschland zugelassen. Saccharin wird für die Herstellung diätetischer Lebensmittel, in Light-Produkten und als Geschmacksverstärker eingesetzt.

Hinweise für teratogene Effekte sind weder im Tierversuch noch beim Menschen belegt. (Kroes et al 1977, London, 1988) Saccharin wird in vielen Embryotoxizitätsversuchen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, als Kontrollsubstanz eingesetzt.

Isoniazid (INH)

Isoniazid wird medizinisch in die Gruppe der Tuberkulostatika eingeordnet.

Isoniazid wird bei aerobem Stoffwechsel zu Isonicotinsäure oxidiert und anstelle von Nikotinsäure in NAD eingebaut. NAD-Blockierung und die durch Flavinenzyme kompensatorisch gesteigerte Oxidation des Substratwasserstoffes zu H₂O₂ lassen reaktive Sauerstoffmetabolite im Überfluss entstehen. Diese schädigen die DNA, die Enzyme und durch Lipidperoxidation Membranfunktionen sowie den Zellwandaufbau (Verlust der Säurefestigkeit und Virulenz). Isoniazid ist gegen beide Tuberkuloseerreger, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* sehr aktiv. (Aktories et al, 2005)

Einleitung

Für den Menschen gilt, dass während der Schwangerschaft Isoniazid neben Ethambutol (EMB) als sicherstes Präparat aus der Gruppe der Tuberkulostatika angesehen wird. Es konnte keine embryotoxische Wirkung nachgewiesen werden. (Snider et al, 1980)

Im Tierversuch fand sich ebenfalls kein Hinweis für embryotoxische Effekte. (Holdiness et al, 1987)

Penicillin G

Das Antibiotikum Penicillin G besitzt in seinem Molekül den β -Laktam-Ring als antibakteriell aktives Zentrum. Dieser blockiert durch seine Strukturverwandtheit mit der N-Acetylmuraminsäure die Transpeptidasen, die für den Aufbau und die Stabilität der murinhaltigen Bakterienwand verantwortlich sind. (Mutschler et al, 2001)

Penicilline gehen auf den Embryo/Feten über und lassen sich in der Amnionflüssigkeit nachweisen. (Spielmann et al, 1992)

Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass die Therapie mit Penicillinen in der Schwangerschaft pränataltoxische Effekte hat. Dies wird durch eine ausführliche Studie an 50000 Schwangerschaften unterstrichen. (Heinonen et al.,1977)

Im Tierversuch konnte ebenfalls durch eine Injektion von hochdosiertem Penicillin während verschiedener Abschnitte der Tragezeiten kein negativer Effekt auf den Fetus beobachtet werden. (Korzhova et al, 1976)

Acetylsalicylsäure

Die Acetylsalicylsäure, auch bekannt unter dem Handelsnamen Aspirin, greift in die Prostaglandinsynthese ein. Sie hemmt in therapeutischer Dosierung die Cyclooxygenase (syn. Prostaglandin-H-Synthase), die Arachidonsäure in cyclische Endoperoxide (die Vorstufen der Prostaglandine sowie von Thromboxan A₂ und Prostacyclin) überführt. Prostaglandine sind an der Entstehung von Schmerz und Fieber, sowie an entzündlichen Reaktionen wesentlich beteiligt. Saure Verbindungen, die die Synthese der Prostaglandine blockieren, wirken gleichzeitig analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch. (Mutschler et al, 2001)

Salicylate sind lipophil, sie gelangen daher leicht über die Plazenta zum Embryo. Zusätzlich weisen sie jedoch eine hohe Bindung an die Plasmaproteine der Mutter auf und erreichen deshalb im embryonalen Blut nicht so hohe Konzentrationen wie im mütterlichen. Die Elimination erfolgt beim Feten, wegen der geringen Aktivität der

Einleitung

fremdstoffmetabolisierenden Enzyme und der geringen glomerulären Filtrationsrate der Niere, nur langsam. (Spielmann et al, 1992)

Es konnte gezeigt werden, dass Acetylsalicylsäure im Tierversuch Wachstumsretardierung und Malformationen verursacht. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass ASS und ihre Derivate, in sehr viel höheren Konzentrationen als beim Menschen angewandt, teratogen auf Ratten, Mäuse, Katzen und Hunde wirken. Konzentrationsabhängig konnten vermehrt Dismorphien des Kopfes, Nonokklusion des Neuralrohres, anomale Schwanz-Torsionen und Fehlen von Extremitätenknospen verzeichnet werden. (Yokoyama et al, 1984, Robertson et al, 1979) Die Relevanz dieser Beobachtungen für die Exposition humaner Embryonen ist unklar. Bei 5000 Schwangerschaften, in denen Mütter während der ersten 4 Monaten Aspirin über längere Zeit eingenommen hatten, konnte keine Erhöhung des Missbildungsrisikos gefunden werden. (Slone et al, 1976) Im dritten Trimenon jedoch kann Acetylsalicylsäure einen vorzeitigen Schluss des Ductus Arteriosus botalli bewirken.

Es zeigte sich, dass durch die Konjugation von ASS mit freien Radikalen die als Teratogen bekannten Moleküle 2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure entstehen. (Coudray et al., 1995; O'Connell and Webster, 1990) Aus diesem Grund ist die Frage der gefahrlosen Gabe von ASS während der Schwangerschaft noch nicht endgültig geklärt. (Karabulut et al., 2000)

Ascorbinsäure (Vitamin C)

Die biologische Wirkung der Ascorbinsäure beruht auf dem Wirkmechanismus als Elektronendonator bzw.- akzeptor. Sie steht dabei in einem Redoxgleichgewicht mit der radikalischen L-Semidehydroascorbinsäure. L-Ascorbinsäure wirkt als ein Elektronendonator. Eine wichtige Rolle spielt Vitamin C bei der Hydroxylierung von Nebennierenrindenhormonen, biogenen Aminen und Aminosäuren. Darüberhinaus ist die Ascorbinsäure beteiligt an dem Abbau von cyclischen Aminosäuren, der Umwandlung von Folsäure in Tetrahydrofolsäure, der Abdichtung von Kapillaren (Antihyaluronidaseeffekt) und der Aktivierung von Thrombin (Gerinnungsbeschleunigung). Ferner steigert es Immunitätsvorgänge, wahrscheinlich durch Hemmung der oxidativen Selbstzerstörung der Phagozyten durch reaktive Sauerstoffspezies (Antioxidanswirkung) und fördert die Eisenresorption. (Mutschler et al, 2001)

Einleitung

Die Vitamin C-Konzentrationen im embryonalen/fetalen Blut liegen dreimal so hoch wie im mütterlichen, da es nach dem plazentaren Übergang von Dehydroascorbinsäure zur Anreicherung im Embryo/Feten kommt (Malone 1975). Es ist noch nicht eindeutig bekannt, wie zusätzliche Gaben von Ascorbinsäure die bereits erhöhte Konzentrationen dieses Vitamins im Embryo/Feten und seine Oxidationssysteme beeinflussen. (Spielmann et al, 1984)

Embryotoxische Auswirkungen sind jedoch weder beim Menschen noch im Tierversuch dokumentiert.

Coffein

Coffein wird medizinisch in die Gruppe der Psychostimulantien eingeordnet. Coffein ist die pharmakologisch wirksame Komponente einer Reihe von nicht-alkoholischen Getränken wie Kaffee, Tee, Kakao und Cola-Getränken. Coffein ist außerdem Bestandteil vieler frei verkäuflicher Medikamente, z.B. in Schmerz- und Erkältungsmitteln.

In den üblichen Dosierungen von 50-200mg wirkt Coffein vorwiegend auf die Grosshirnrinde. Beim Ermüdeten werden durch die Blockade von Adenosin-Rezeptoren die Ermüdungserscheinungen aufgehoben und die geistigen Leistungen gesteigert. In höheren Dosierungen werden das Vasomotoren- und das Atemzentrum durch Coffein erregt. Trotzdem steigt der Blutdruck nicht an, weil gleichzeitig Haut, Nieren- und Koronargefäße durch peripheren Angriff erweitert werden. Coffein besitzt außerdem Stoffwechseleffekte, indem es die Glykogenolyse und Lipolyse fördert. (Mutschler et al, 2001)

Während der Schwangerschaft passiert Coffein die Plazenta. Einige seiner Metabolite (Theophyllin, Theobromin, Paraxanthin) reichern sich im fetalen Gehirn an. (Chernoff et al, 1987)

Darüber hinaus konnte in *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden, dass Coffein einige metabolische Pfade, die auch für die neuronale Entwicklung eine wesentliche Rolle spielen, beeinflusst. Dies wären: Hemmung der Cholesterol-Synthese, Steigerung der Synthese extrazellulärer Matrix und Antagonismus zu Adenosin. (Spielmann et al., 1992)

Tatsächlich wurden in hochdosiert mit Coffein behandelten Embryonen der Maus drei Typen von Neurulationsstörungen beobachtet. Dazu gehörten Verdickung des

Einleitung

Neuroepithels, vorzeitige Ausstülpung des ventralen prosenzephalen Neuroepithels und Nonokklusion des Neuralrohres. (Marret et al, 1997)

Basierend auf Literatur-Studien gibt es jedoch keinen signifikanten Beweis, dass der mütterliche Koffein-Konsum während der Schwangerschaft zu Missbildungen beim menschlichen Feten führt. (Hinds et al, 1996) Schwerer Koffeinkonsum während der Schwangerschaft kann nicht definitiv als ein Grund für nachteilige Effekte auf das Neugeborene angesehen werden, da dieser mit anderen sozioökonomischen Einflüssen wie Alkoholkonsum, Nikotinabusus und der Einnahme anderer Drogen verbunden ist. (Martin et al, 1987)

Indomethazin

Indomethazin, ein Essigsäure-Derivat, entfaltet seine Wirkung über die Hemmung der Prostaglandin H 1 und 2 Synthase (Cyclooxygenase). Medizinisch findet die Testsubstanz Anwendung als Analgetikum, Antirheumatikum und Antiphlogistikum. (Mutschler et al, 2001)

Während des 3. Trimenons eingenommen, führt Indomethazin zu vorzeitigem Verschluss des Ductus arteriosus Botalli, was die Ausbildung des Lungenkreislaufes behindert und bei Neugeborenen zur Hypertonie im pulmonalen Kreislauf führt.

Es konnten keine Hinweise auf erhöhte Missbildungsrate in Folge der Einnahme und Therapie mit Indomethazin gefunden werden.

Phenytoin

Phenytoin wird in der Medizin seit Jahren prophylaktisch als Antiepileptikum zur Reduktion von Grand Mal Anfällen eingesetzt. Die Wirkung erfolgt über die Stabilisierung erregbarer Membranen z.B. an Neuronen und Myokardzellen, wahrscheinlich durch Effekte an Natrium-, Kalium-, und Calcium-Kanälen. (Mutschler et al, 2001)

Phenytoin geht ungehindert auf den Feten/Embryo über. Nach Phenytoin-Gabe wurde sowohl beim Menschen als auch beim Versuchstier ein spezifisches Phenytoin-Syndrom beschrieben, das durch prä- und postnatalen Wachstumsrückstand, Mikrozephalie, geistige Retardierung und Gesichtsdysmorphien gekennzeichnet ist. Außerdem gehören zu diesem Syndrom verkleinerte Nägel und verkürzte Endglieder von Fingern und Zehen, ein fingerähnlicher Daumen sowie Lippen- und Gaumenspalten. (Hanson, 1976)

Dexamethason

Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung über intrazelluläre Rezeptoren und greifen so in die Proteinsynthese ein. Zur antiphlogistischen Wirkung trägt die Hemmung der Prostaglandin –Synthese durch Blockade der COX-2-Induktion bei. Ursache des immunsuppressiven Effekts ist die Interferenz mit der Interleukin-2 Synthese in T-Lymphozyten. Darüber hinaus wird die Synthese anderer Zytokine (z.B. Interferon, Tumornekrosefaktor-alpha) und die von Adhäsionsproteinen durch Glukokortikoide gehemmt. (Mutschler et al, 2001)

Glukokortikoide können die menschliche Plazenta passieren. (Romero und Lockwood,1988). Obwohl die Plazenta Enzyme besitzt, die einige Glukokortikoide inaktivieren können, zeigte sich, dass die Konzentration von Dexamethason im embryonalen/fetalen Blut fast genauso hoch war wie in mütterlichem. (Spielmann et al, 1992)

Malformationen nach Dexamethasoneinnahme betreffen in erster Linie den Schädelknochen. Es handelt sich hierbei um Malformationen, die von Cranium bifidum und Aplasia cutis congenita zu schweren Defekten wie Enzephalozele bis Meningozele reichen. (Jerome et al, 1988)

Busulfan

Busulfan ist ein bifunktioneller, alkylierender Sulfonsäureester und wird als Chemotherapeutikum eingesetzt. (Mutschler et al, 2001) Als ursächlich für die Teratogenität der Substanz gilt die Hemmung der Dihydrofolatreduktase. Dieses Enzym reduziert Folsäure zu Tetrahydrofolsäure als wichtigen Teil des Einkohlenstoff Metabolismus, welcher für die normale embryonale de novo DNA Synthese notwendig ist. (DeSesso et al, 1992)

Ergebnisse aus Tierversuchen haben gezeigt, dass Busulfan ein potent wirksames Teratogen ist. Sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen zeigte sich, dass Busulfan verschiedenste Skelett- und Extremitätendefekte induzierte. (Machado, 1967) Darüber hinaus kann Busulfan, appliziert während einer kritischen Phase der embryonalen Entwicklung, durch selektive Wirkung auf Stammzellen Sterilität des Neugeborenen bewirken. (Krause 1973)

Es gibt einzelne Fallberichte über die Exposition von Busulfan kurz vor oder während der Schwangerschaft beim Menschen. In 12 Schwangerschaften, bei denen aufgrund

Einleitung

einer Leukämie kurz vor der Konzeption oder im ersten Trimester der Schwangerschaft mit Busulfan (Dosis nicht genannt) behandelt worden war, wurden keinerlei fetale Schäden beschrieben. In einem Fall eines Aborts in der 6. Woche p.c. konnte bei dem Fetus eine Myeloschisis beobachtet werden. (Abramovic et al, 1978)

Diphenhydramin

Das Antihistaminikum Diphenhydramin besitzt neben seinen den Histamin 1-Rezeptor hemmenden Eigenschaften auch anticholinerge und antiserotoninerge Wirkungen. Die Substanz wird daher auch als Sedativum/Hypnotikum und besonders in der Schwangerschaft als Antiemetikum eingesetzt. (Mutschler et al, 2001)

Im Tierversuch an trächtigen Mäusen wurde Diphenhydramin in den Konzentrationen 20mg/kg/Tag, 100mg/kg/Tag und 200mg/kg/Tag über das Trinkwasser appliziert. Es konnte kein toxischer Effekt auf die Tragetiere beobachtet werden. In höheren Konzentrationen traten jedoch Entwicklungsstörungen wie verkürzte Tragezeiten, vermindertes fetales Gewicht und gesteigerte neonatale Mortalität auf. (Naranjo und deNaranjo 1968) In Tierversuchen mit Ratten und Kaninchen fand sich hingegen kein Hinweis für die erhöhte Inzidenz von Anomalien. (Schardein et al 1971)

Die Einnahme dieses Antiemetikums während des ersten Trimenons der Schwangerschaft soll beim Menschen zu einer erhöhten Inzidenz von Gaumenspalten führen (Richards et al., 1972), jedoch wurde dies von anderen Autoren nicht betätigt. (Spielmann et al, 1992)

Hydroxyharnstoff

Hydroxharnstoff, ein Antimetabolit, der zur Therapie verschiedener hämatologischer Erkrankungen eingesetzt wird, wurde von zahlreichen Teratologen untersucht. (Rodgers et al, 1990) Hydroxharnstoff hemmt die Ribonukleosiddiphosphat-reduktase, das Enzym, welches Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide überführt und damit einen geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der DNA-Synthese kontrolliert. Hydroxharnstoff arretiert dadurch Zellen beim Übergang von der G1 in die S-Phase. (Mutschler et al, 2001)

Hydroxurea hat sich als starkes Teratogen in allen bislang getesteten Spezies erwiesen. (Schardein, 1993) Hydroxharnstoff induzierte bei Ratten Defekte des zentralen Nervensystems, des Gaumens und des Skelettes nach Injektion von 185 – 1000mg/kg an Gestationstag 9,10,11 oder 12. (Chaube et al, 1966).

Einleitung

Neuralrohrdefekte und Fehlentwicklungen des Herzens wurden bei Hamstern nach intravenöser Gabe von 50mg an Gestationstag 9,10, oder 11 dokumentiert. (Ferm, 1966) Eine kumulative Dosis von 500mg/kg zwischen Gestationstag 21 und 44 verursachte multiple skeletale, urogenitale, kardiale und okkulare Anomalien beim Rhesusaffen (Wilson et al, 1975). Eine Literaturrecherche zum Thema Hydroxharnstoff und Schwangerschaft beim Menschen offenbarte 15 Fälle von Frauen, die während der Schwangerschaft mit Hydroxharnstoff therapiert worden waren. Es gibt keine Fallberichte über Teratogenese oder Mutagenese beim Menschen. (Diav-Citrin et al, 1999)

Methotrexat

Methotrexat selbst, bzw. die mittels des Enzyms Folylpolyglutamat-Synthetase gebildeten Polyglutamate, die intrazellulär zurückgehalten werden, hemmen die Dihydrofolsäurereduktase. Auf diese Weise wird die Übertragung von Einkohlenstoff-Fragmenten auf Nukleinsäurebausteine gehemmt. Die Folge ist eine gestörte Nukleinsäuresynthese. (Mutschler et al, 2001)

Methotrexat wird bei verschiedenen malignen Erkrankungen als Chemotherapeutikum eingesetzt.

Folsäure-Antagonisten gelten als eine der Hauptursachen für Neuralrohrdefekte (NTD). Es ist sicher, dass diese Substanz für den Menschen teratogen wirkt:

Eine Methotrexatexposition von mehr als 10mg/Woche kurz vor bzw. während des ersten Trimesters der Schwangerschaft führte beim Menschen zur Entwicklung von Neuralrohrdefekten und Dysmorphien des Aminopterin-Syndromes. Dazu gehören Minderwuchs, schwere Ossifikationsstörungen des Kalvariums, hypoplastische Augenbrauen, kleine, tiefsitzende Ohren, abnorm kleiner Oberkiefer und Extremitätenanomalien. Darüber hinaus kommt es zu mentaler Retardierung. (Del Campo et al 1999). Als kritischer Expositionszeitraum wird die 6.-8. Woche post conceptionem und als kritische Dosis 10 mg/Woche angesehen. (Feldkamp and Carey 1993)

Im Tierversuch wirkte Methotrexat während der Embryonalentwicklung teratogen oder letal auf alle getesteten Spezies. Überlebende Feten wiesen multiple Malformationen des Kopfes, der Extremitäten und des Stammes auf. (DeSesso et al 1991)

5-Fluorouracil

5-Fluorouracil ist ebenfalls ein Antimetabolit. Auch diese Substanz wird in der Tumorbehandlung eingesetzt. Die Affinität von 5-Fluorouracil nach Umwandlung in 5-FdUMP zur Thymidilatsynthetase ist 250-400 mal höher als die von dUMP, das mit Hilfe dieses Enzyms zu Thymidilat methyliert wird. Zunächst gebildetes 5-FUMP wird auch in RNA eingebaut. Deshalb wird neben der DNA- auch die RNA-Synthese gestört. (Mutschler et al, 2001)

Die Letalität der Embryos war im Tierversuch unabhängig von der 5-Fluorouracil Dosis, die während der Entwicklung appliziert worden war, nur gering. Die Teratogenität dieser Substanz in mehreren Tierspezies ist jedoch gut bekannt. Shuey et al (1994) zeigten, dass bei steigender Substanzkonzentration zunächst ein reduziertes fetales Gewicht und generelle Minderossifikationen beobachtet werden können. Bei hohen Konzentrationen kam es zu zahlreichen Malformationen wie Lippen-Kiefer Gaumenspalte und Defekten der Hinterläufe.

Es gibt wenig Erfahrung mit 5-FU Exposition während der Schwangerschaft beim Menschen. Nach einzelnen Fallberichten gab es keine Hinweise auf schädliche Wirkungen ab dem 2. Trimenon. (Gwyn et al, 2000)

Cytosinarabinosid (Cytarabin; AraC)

Cytosinarabinosid wird zunächst in das Nukleosidtriphosphat Ara-CTP umgewandelt und hemmt einerseits kompetitiv die DNA Polymerase, andererseits wird es bereits in niedrigen Konzentrationen in die DNA eingebaut und bewirkt in der S-Phase eine Unterbrechung der DNA Synthese. (Mutschler et al, 2001)

In bezug auf Teratogenität konnten in *in vivo* Versuchen an Mäusen Hüftgelenksanomalien und Fehlbildungen der hinteren Extremität beobachtet werden. Hier wurde trächtigen Mäusen an Tag 8, 9.5, oder 11 der Gestation, intraperitoneal einmalig eine Dosis von 5.0 oder 7.5 mg/kg Cytosinarabinosid injiziert. Mit einer Inzidenz von 30% wurden in der Gruppe der Mäuse, die an Tag 9.5 die Dosis von 7.5 mg/kg erhalten hatten, Hüftgelenksanomalien in Form von Femurschaftdysplasie, Pseudarthrose des Femur, Femurkopfdysplasie, Acetabulumdysplasie, Fusion zwischen Femurkopf und Acetabulum und Pseudarthrose des Hüftknochens beobachtet. Bei Neugeborenen, die keine Hüftanomalien entwickelt hatten, trat gehäuft Oligodaktylie auf, wohingegen in der Gruppe der Mäuse mit Hüftanomalien dieses Problem nicht beobachtet wurde.

Einleitung

(Chiba et al., 1996) Auch bei Ortega et al (1991) wurde ähnliches dokumentiert. Hier wurde neben der skeletalen Entwicklung auch die Organogenese beurteilt. Betroffen waren insbesondere Nieren und ableitende Harnwege. Bei Percy et al (1975) wurden zusätzlich retinale Dysplasien sowie segmentale zerebelläre Hypoplasien dokumentiert.

In der Literatur sind mehr als 20 Fälle beschrieben, bei denen es beim Menschen zu Cytarabineinnahme während der Frühschwangerschaft kam. (Manoharan et al, 1979; Tobias et al, 1980) In drei der Fälle wurde Cytarabin im Zeitraum der Empfängnis gegeben, in zweien in der Phase der Organentwicklung des Embryos. (Maurer et al 1971; Necomb et al, 1978) Es wurde in keinem der Fälle von kongenitalen Abnormalitäten bei den lebendgeborenen Kindern berichtet. Allerdings wurde in 5 Schwangerschaften ein therapeutischer Schwangerschaftsabbruch vorgenommen.

Retinolsäure

Retinoide greifen an intrazellulären Rezeptoren an. Nach Bindung der Liganden an einen der Rezeptoren bilden sich Homo- oder Heterodimere, die als Transkriptionsfaktoren in die Genexpression eingreifen. Auf diese Weise senken Retinoide eine erhöhte Zellproliferation durch Blockade von Aktivatorprotein 1 und interferieren mit der Bildung von Zytokinen. (Mutschler et al, 2001)

Vitamin A wird ähnlich wie Vitamin C im Embryo angereichert und kann beim Menschen in Konzentrationen über 10000 I.E. pro Tag zu Missbildungen wie Neuralrohrdefekten führen.

Zu den darüber hinaus möglichen Missbildungen gehören Hydrozephalie, Ohrdefekte wie Mikrotie, verschiedene Herzmissbildungen sowie Thymusaplasie. Auch spontane Fehlgeburten können eintreten. (Spielmann et al., 1992). Chazaud et al (1999) zeigten, dass Retinolsäure für die Determination der Rechts- Links- Asymmetrie viszeraler Organe benötigt wird. Eine exzessive Zufuhr führt zu einer symmetrischen Expression der Gene, die normalerweise spezifisch für die linke Seite exprimiert werden. Die Folge ist eine Fehlentwicklung der inneren Organe insbesondere des Herzens. In einer Arbeit von Shum et al. (1999) wurde darüber hinaus gezeigt, dass Retinolsäure zu einer Herabregulation des *wnt-3* Genes führt, was in einer gestörten Entwicklung der Schwanzknospe resultiert. Es kommt zur Induktion einer extensiven Apoptose der mesenchymalen Zellen mit anschließender Ausbildung ektoper

Einleitung

Neurotubuli. Bei den verbleibenden Zellen wurde durch die Retinolsäure eine Differenzierung in neuroektodermale Zellen bewirkt.

Thalidomid (Contergan)

Thalidomid (α -[N-Phthalimido]-glutarimid) wurde 1954 unter dem Namen Contergan vermarktet und weltweit in 46 anderen Staaten lizenziert. Viele Pharmafirmen stellten Thalidomid in verschiedenen Konzentrationen unter mehreren Handelsnamen her.

Medizinische Anwendung fand das Präparat in der Behandlung von Angststörungen, Schlaflosigkeit, Gastritis und emotionalen Spannungszuständen. Es wurde als gefahrlos bei der Anwendung in der Schwangerschaft angesehen, und häufig als potentes Antiemetikum eingesetzt. Routine Screening Tests bescheinigten Thalidomid, nicht toxisch im Nagetier zu sein, und deshalb wurde seine hochteratogene Potenz im Menschen nicht erwartet.

In den frühen 60er Jahren wurden eine Reihe von Kindern mit hypoplastischen Gliedmaßen defekten geboren, und erstmals von Lenz (1963) und McBride (1963), unabhängig voneinander, eine Korrelation des Auftretens der Anomalien mit der Einnahme des Medikamentes Contergan vermutet. Einige Monate später wurde Contergan zunächst in Deutschland, später auch in den anderen Staaten aus dem Verkauf zurückgezogen.

Es wurde herausgefunden, dass insbesondere die Einnahme des Präparates in einem Zeitraum zwischen dem 20. und 34. Tag nach der Fertilisation teratogen wirkte. Die sensible Phase für die Extremitätenentwicklung liegt beim Menschen zwischen dem 29. und 46. Tag der Schwangerschaft. (Miller et al, 1999)

Die Einnahme während dieser Zeit resultierte beim Feten letztendlich in einem Symptomenkomplex, der auch als Thalidomid–Embryopathie bezeichnet wurde. Ein auffallendes Charakteristikum ist das doppelseitige Fehlen von Gliedmaßenabschnitten; dies ist besonders typisch im Fall der Phokomelie, bei der die Hände von der Schulter entspringen. Diese Dymelien finden sich insbesondere im Bereich der oberen Extremitäten in unterschiedlicher Lokalisation und Ausprägung, von isolierten minimalen Hypoplasien bis zur Amelie reichend. Ferner gehörten dazu Fehlbildungen im Kopfbereich, wie Dysotie bis Anotie (häufig mit Taubheit), Mikroophthalmie, Kolobom, multiple Hirnnervenstörungen (III.,IV.,VI.,VII.), Naevus flammeus im Mittelgesicht und darüber hinaus Fehlbildungen innerer Organe, wie z.B. die Fallot'sche Tetralogie des Herzens.

Einleitung

Im Tierversuch wurden die teratogenen Effekte von Thalidomid und seinem Derivat EM12 unter anderem am Krallenaffen erforscht.

Es wurde gezeigt, dass das S(-)-Enantiomer von EM12 die typischen schweren Extremitätenanomalien, wie Amelie, Phokomelie und Radiusaplasie verursacht. Im Gegensatz dazu wurde nach Applikation des R(+)-Enantiomers nur wenige und weniger schwere Skelettdefekte beobachtet. (Heger et al., 1994)

Stephen und Fillmore (2000) vermuten, dass Thalidomid den folgenden Signalweg und damit die Extremitätenentwicklung beeinträchtigt: die Wachstumsfaktoren FGF-2 und IGF-1 wirken an Rezeptoren mesenchymaler Zellen der Extremitätenknospen, und setzen ein second-messenger System in Gang, welches letztendlich für die Angiogenese in den Extremitätenknospen verantwortlich ist. Verschiedene Schritte dieses Signalweges hängen von der Aktivierung von Genen mit hauptsächlich GGGCGG Promotoren (Regulationselemente) ab. Thalidomid, oder ein metabolisches Produkt von Thalidomid, bindet spezifisch an GC Promotoren und hemmt ihre Transkription. Die Hemmung dieser Gene interferiert also mit der normalen Angiogenese und resultiert letztendlich in der Amputation der Extremitätenknospen. (Stephen and Fillmore, 2000)

Bei der Abklärung durch Experimente wurden Artunterschiede gefunden: Manche Primaten und die Kaninchen sind stärker empfindlich, wogegen Mäuse und Ratten im allgemeinen von der Störung nicht betroffen sind.

2 Fragestellung und Ziele

Die Grundlage für die vorliegende Arbeit bildet die Validierung des Embryonalen Stammzelltestes, wie er zuvor von Spielmann et al (1997) beschrieben wurde.

Eingesetzt wurden 16 Testsubstanzen (mit in vivo bekanntem teratogenem Potential), die der Empfehlung der ‚US Teratology Society For In Vitro Embryotoxicity Test‘ (Smith, et al 1983) entstammen und bereits zuvor im EST eingesetzt worden waren. Zusätzlich wurde erstmals Thalidomid, welches für teratogene Wirkungen bekannt ist, eingesetzt, um die Aussagefähigkeit des Embryonalen Stammzelltest zu prüfen. Aufgrund des großen Interesses das in der Vergangenheit und auch aktuell durch Thalidomid hervorgerufen wurde, liegen eine Vielzahl von in vivo und in vitro Daten zu dieser Testsubstanz vor, so dass Vergleichsmöglichkeiten vorhanden sind und eine sinnvolle Beurteilung des EST ermöglicht wird.

Darüberhinaus sollten Methoden getestet werden, die eine Möglichkeit darstellten den wichtigsten Endpunkt des Embryonalen Stammzelltest, die Hemmung der Differenzierung zu kontrahierenden Kardiomyozytenarealen, der bisher nur mikroskopisch bewertet wurde, genauer zu quantifizieren. An dieser Stelle lag bislang eine Fehlergefahr innerhalb des Tests vor, da diese Areale unterhalb einer bestimmten Größe und unterhalb einer bestimmten Kontraktionsfrequenz mikroskopisch nur schwierig auszumachen waren und darüber hinaus ihre Größe nicht in die Bewertung mit aufgenommen werden konnte.

Aus diesem Grund wurde zur Quantifizierung der Kardiomyozyten innerhalb der Embryoid Bodies am Ende der Differenzierung die Konzentration kardiomyozyten-spezifischer Antigene sowie die Expression eines kardiomyozytenspezifischen Genes gemessen. Ausgewählte Methoden hierfür waren Zell-ELISA, Durchflusszytometrie und quantitative RT PCR.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Flüssigstickstoff (Cryoson BSR-260)

Wärmeplatte (Heidolph MR 2002)

Begasungsbrutschrank (Heraeus 6000)

Zentrifuge (GPKR Beckmann)

Zellzählgerät (Casy 1, Cell Counter, Schärfe System)

Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA)

ABI Prism ® 7700 Sequence Detector (PE Biosystems)

Fluoreszenzmikroskop mit Fotokamera (Leitz, Wetzlar)

FACS Calibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg)

Spektro-Photometer (Spectra FLUOR Plus, TECAN)

Lichtmikroskop (Fluovert, FS, Leitz)

CytoFluor II Fluorescence Multi Well Plate Reader (PerSeptive Biosystems, Freiburg)

Pipetten (Varipette 4710 einstellbar zwischen 0,5µl und 1000µl, Eppendorf, Hamburg)

Mehrkanalpipette (Dunn Labortechnik)

3.2 Labor und Verbrauchsmaterialien

Kulturflaschen 75 cm² (Primaria™ Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg)

96 well Gewebekulturplatten (Primaria Falcon)

24 well Gewebe Kulturplatten (Primaria Falcon)

Zentrifugenröhrchen (10, 50ml; Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg)

Petrischalen (60, 100mm Primaria Falcon)

Sterilfilter (40µm Cell Strainer, BD Falcon)

Micro Amp Optical Plates and Caps (PE, Applied Biosystems)

RNeasy Kit MIDI (Quiagen, Hilden)

Die für die verschiedenen Versuche verwendeten Versuchskemikalien, Lösungen, Puffer und Antikörper werden bei der jeweiligen Versuchsbeschreibung aufgelistet.

3.3 Zelllinien

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche werden 2 permanente Zelllinien eingesetzt:

Balb/c3T3,Klon A31 (ATCC;Cat.no.CCL-163)

ES-D3 (ATCC;Cat.no.CRL-1934)

Die Zellen werden durch American Type Cultur Collection geliefert und wie unten beschrieben in Kultur gehalten.

3.4 Testsubstanzen

Vor jedem Versuchsansatz werden die Testsubstanzen in geeignetem Lösungsmittel gelöst und für den weiteren Verbrauch in Portionen bei -20 °C eingefroren.

- | | |
|------------------------------------|---|
| 1. Ascorbinsäure (Sigma 59H83001) | 10. Hydroxyharnstoff (Sigma H8627) |
| 2. Salicylsäure (Sigma S3007) | 11. Indomethazin (Sigma I 17378) |
| 3. Busulfan (Sigma B2635) | 12. Isoniazid (Sigma I 3377) |
| 4. Coffein (Sigma A 5376) | 13. Methotrexat (Sigma A 6770) |
| 5. Cytosinarabinosid (Sigma C6645) | 14. Penicillin G (Sigma PEN NA) |
| 6. Dexamethason (Sigma D1756) | 15. Retinolsäure (Sigma R2625) |
| 7. Diphenhydramin (Sigma D3630) | 16. Saccharin (Sigma S1002) |
| 8. Phenytoin (Sigma D4505) | 17. Thalidomid (Research Biochemicals International MF-11-48) |
| 9. 5-Fluorouracil (Sigma F6627) | |

3.5 Zellkultur

<u>Routinekultur</u>	ES-D3	Dulbecco`s MEM + Glutamax-I, + Natriumpyruvat + 1000mg/ml Glucose, +Pyridoxin (Gibco) 17% Fetales Rinderserum (Sigma), 1% Nicht Essentielle Aminosäuren (Gibco), 1% Sigma Penicillin Streptomycin Solution (Sigma), 1000 U/ml LIF (ESGRO), 0,1 mM β -Mercaptoethanol (Sigma)
	3T3 A31	Dulbecco`s MEM + Glutamax-I, + Natriumpyruvat+ 1000mg/l Glucose, Pyridoxin (Sigma) 4,5% Fetales Kälber Serum (Sigma), 4,5% Normales Kälber Serum (Sigma), 0,9% Penicillin Streptomycin Solution (Sigma), 0,9% Glutamin (Sigma)
<u>Versuchskultur</u>	ES-D3	s.o. ohne LIF Zusatz
	3T3 A31	s.o.

Tabelle 3.5-1: Zusammenstellung der für den ‚Embryonalen Stammzelltest‘ verwendeten Zellkulturmedien

Die Zellen werden nach Lieferung bis Passage 5 kultiviert und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert. Vor dem Auftauvorgang wird zunächst eine Kulturflasche mit Gelatine beschichtet: Mit sterilem Aqua bidest wird die Gelatine auf 10mg/ml verdünnt und auf der Wärmeplatte gelöst. Pro 10cm² Bodenfläche wird 1ml der Lösung in die Kulturflasche gegeben und 30min bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Danach wird die Lösung sofort abgesaugt, die Fläche 1x mit PBS gewaschen und die Kulturflasche sofort verwendet. Innerhalb kürzester Zeit werden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 5ml PBS überführt. Nach 10min. Zentrifugation (4°C/1200 Upm) wird das Pellet in Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät.

Am darauffolgenden Tag wird der Zellrasen 1x mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Die Zellen werden alle 2 Tage umgesetzt und nur von Passage 6-18 für Versuche verwendet. Vor dem Ablösen des Zellrasens wird das Medium verworfen und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend werden 5ml 0,25% Trypsin-EDTA in jede Flasche gegeben, für ca. 30 sec vorsichtig geschwenkt, überstehendes Trypsin verworfen, und zuletzt für ca. 1 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden vorsichtig abgeklopft und die Zellsuspension über einen Sterilfilter in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation wird das Zellpellet mit 2ml frischem Medium resuspendiert und mit Hilfe eines Zellzählgerätes die Zellzahl bestimmt. Pro 75cm² Falcon-Zellkulturflasche werden 1-2x 10⁶ Zellen ausgesät.

3.6 Embryonaler Stammzell Test (EST)

3.6.1 Differenzierungsversuch

Die sogenannte `hanging drop` Zellkulturtechnik, die ermöglicht, dass embryonale Stammzellen der Maus in spontan kontrahierende Kardiomyozyten differenzieren, wurde von Wobus et al (1991) entwickelt und 1994 von Heuer et al für die ES-D3 Zelllinie adaptiert.

Tag 0: Induktion von ES-Zell Aggregaten:

Die auszutestenden Substanzen werden in Medium ohne LIF-Zusatz in 5 Konzentrationen verdünnt. Zuletzt werden 3.75×10^4 Zellen/ml hinzugefügt. Die Zellen werden 1/10 in Trypan-Blau Lösung (Sigma) verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Dadurch kann gleichzeitig die Anzahl toter Zellen bestimmt werden. Nur bei einem Anteil von mind. 90% lebender Zellen werden die Zellsuspensionen verwendet.

Je Testkonzentration wird eine 100mm Zellkultur Petrischale mit 5ml PBS gefüllt. Auf die Innenseite des Deckels der Schale werden maximal 50 Tropfen pipettiert. Jeder dieser Tropfen enthält 20µl des jeweiligen Verdünnungsansatzes mit 750 Zellen. Der Deckel der Schale wird vorsichtig auf die Petrischale aufgesetzt. Diese `hängenden Tropfen` werden 3 Tage im Begasungsbrutschrank inkubiert.

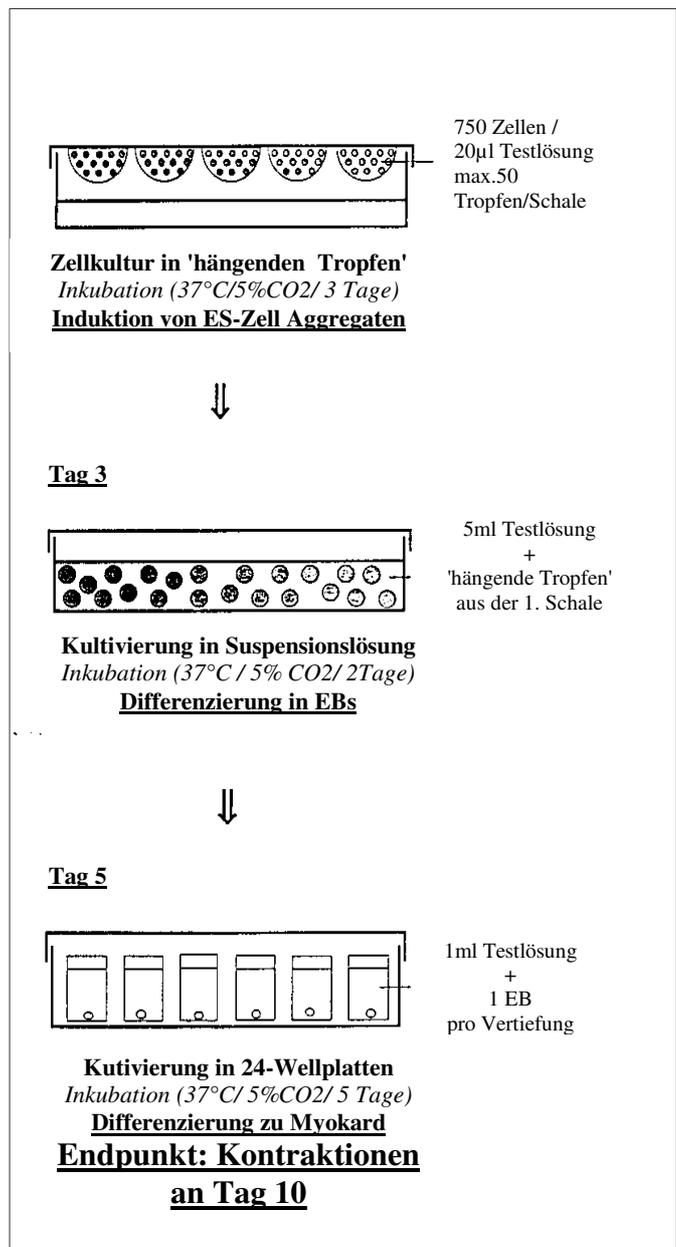


Abbildung 3.6-1: Schematische Darstellung des Differenzierungsversuches

Tag 3: Differenzierung zu 'Embryoid Bodies' :

Es werden die gleichen Verdünnungsreihen wie an Tag 0 hergestellt.

Mit jeweils 5ml Substanzlösung werden die hängenden Tropfen vorsichtig aus dem Deckel der Petrischale gewaschen. Um die Embryoid Bodys (EBs) nicht zu beschädigen wird die Suspension mit einer 5ml Pipette in eine 60mm Petrischale überführt.

Diese Embryoid Body-Suspensionen werden 2 Tage im Begasungsbrutschrank inkubiert.

Tag 5: Differenzierung zu Myokardzellen

Es werden die gleichen Verdünnungsreihen wie an Tag 0 hergestellt.

Je Konzentration werden 2 Platten mit 24 Wells verwendet. In jede Vertiefung wird 1ml der entsprechenden Lösung pipettiert. Anschließend wird jeweils 1 Embryoid Body (EB) mit 20µl Suspensionslösung in jede Vertiefung pipettiert.

Die 'Embryoid Bodies' werden 5 Tage im Begasungsbrutschrank inkubiert.

Tag 10: Auswertung

An Tag 10 des Versuches wird die Differenzierung der Embryonalen Stammzellen in kontrahierende Myokardzellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops untersucht. Jeder Embryoid Body (EB) wird einzeln auf Vorhandensein dieser Areale untersucht und entsprechend dokumentiert. Der Versuch wird nur akzeptiert, wenn in den Kontrollplatten mindestens 21 von 24 Embryoid Bodies (EBs) spontan kontrahierende Myokardzellen entwickelt hatten.

3.6.2 Zytotoxizitätsbestimmung

Parallel zum Differenzierungsversuch werden die Substanzen bezüglich ihrer Zytotoxizität untersucht. Es werden einerseits Embryonale Stammzellen (D3), andererseits 3T3 Zellen als adulte Zelllinie verwendet.

Tag 0

Die Zellen werden mit einer Mehrkanalpipette in Gewebekulturplatten mit 96 Wells pipettiert. Pro Vertiefung werden 500 Zellen in 100µl Zellkulturmedium ausgesät. Anschließend werden die Zellen für 2 Stunden im Begasungsbrutschrank inkubiert.

Material und Methoden

Die auszutestenden Substanzen werden in Medium ohne LIF-Zusatz in 5 zuvor festgelegte Konzentrationen verdünnt und nach folgendem Schema auf die Zellen pipettiert:

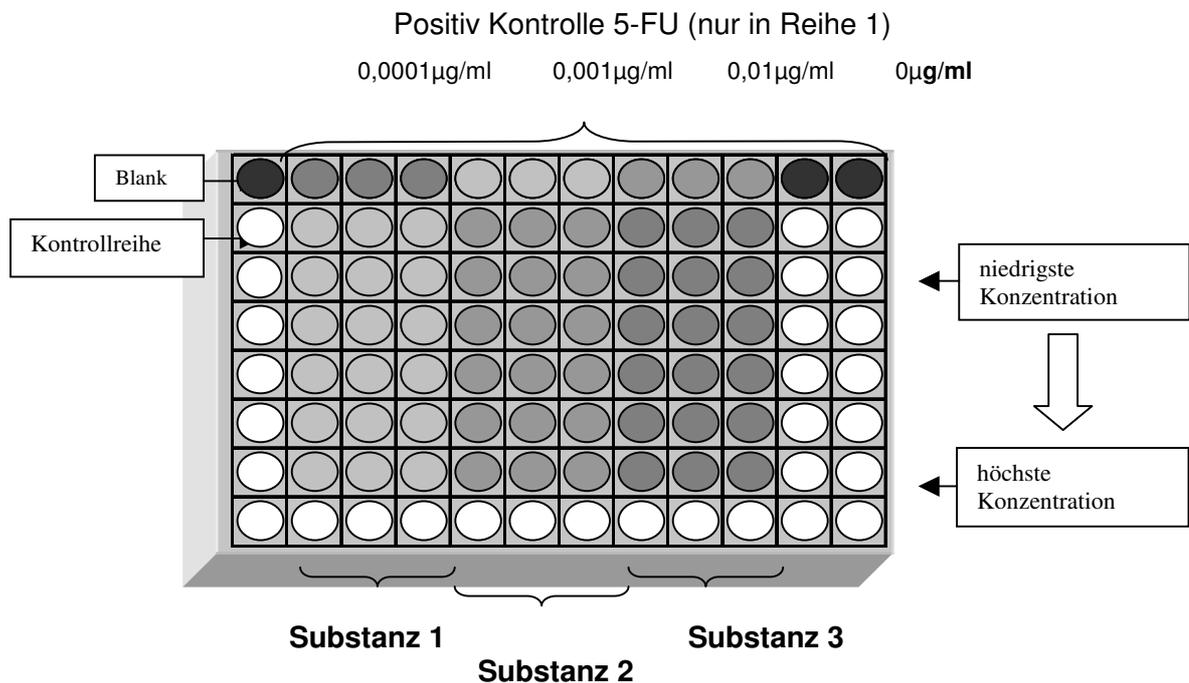


Abbildung 3.6.2-1: Schematische Darstellung der Plattenbelegung für den Zytotoxizitätsversuch

Die Zellen werden 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Tag 3

Es werden die gleichen Verdünnungsreihen wie an Tag 0 hergestellt.

Mit einer Mehrkanalpipette (Dunn Labortechnik) wird das alte Medium vorsichtig entfernt und 200µl frische Substanz hinzugegeben.

Die Zellen werden 2 Tage im Begasungsbrutschrank inkubiert.

Tag 5

s. Tag 3

Inkubationsdauer: 5 Tage

Tag 10: Auswertung

Zunächst werden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und eventuelle Auffälligkeiten vermerkt.

MTT- Auswertung

Testprinzip: Messung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen unabhängig davon, ob sie momentan DNS synthetisieren oder nicht. Das Tetrazolium Salz MTT wird hierbei nur durch metabolisch aktive Zellen durch das „Succinat-Tetrazolium-Reduktase System“, das zur mitochondrialen Atmungskette gehört, zu einem blauen Formazan reduziert.

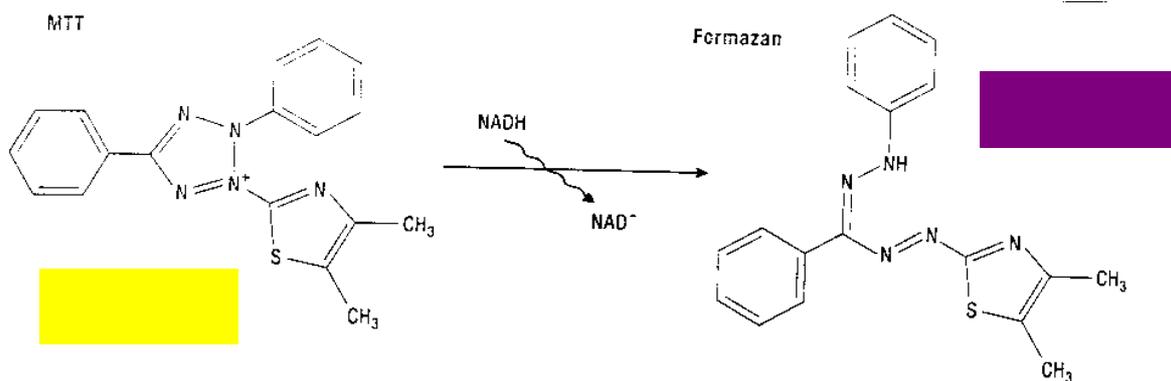


Abbildung 3.6.2-2: Schematische Darstellung der Farbreaktion im MTT-Versuch

Durchführung: Zu dem Medium werden 20µl MTT-Lösung pipettiert und die Platten kurz geschüttelt. Es folgt eine Inkubationszeit im Begasungsbrutschrank für 2 Stunden, bzw. 4 Stunden für ES-Zellen. Anschließend wird der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen werden mit 20µl 3% SDS Lösung lysiert und mit 100µl Isopropanol 0.04 N HCl extrahiert. Die Platten werden 15 min geschüttelt und nach weiteren 15 min erfolgt die Messung.

Die Lichtabsorption wird im Photometer bei 570nm und 630 nm (Referenz) gemessen.

3.6.3 Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen mit Hilfe des Prädiktionsmodells

Um das embryotoxische Potential einer Substanz zu bestimmen wird das von ZEBET für den EST entwickelte 'Prädiktionsmodell' (PM), basierend auf linearer Diskriminanzanalyse, verwendet. (Scholz et al, 1999) Als Grundlage diente die Prävalidierungsstudie durchgeführt von ZEBET/ BgVV mit 20 Testsubstanzen der Klassen **nicht**, **schwach** und **stark** embryotoxisch.

Als Endpunkte der 3 Testbestandteile, MTT-Versuch mit 3T3 Zellen, MTT-Versuch mit D3 Zellen und Differenzierungsversuch, werden die folgenden Werte aus den im EST gewonnenen Dosis-Wirkungskurven berechnet:

- **IC₅₀ 3T3** (Substanzkonzentration, bei welcher noch 50% der 3T3-Zellen leben)
- **IC₅₀ D3** (Substanzkonzentration, bei welcher noch 50% der D3-Zellen leben)
- **ID₅₀ D3** (Substanzkonzentration, bei welcher noch 50% der Embryoid Bodies Kontraktionen aufweisen)

Die ermittelten Werte werden in die folgenden Formeln eingesetzt:

Lineare Diskriminanzfunktionen I,II,III

$$\begin{array}{l} \text{I: } 5.9157 \text{ Log}(\text{IC}_{50}3\text{T3})+3.500 \text{ Log}(\text{IC}_{50}\text{D3})-5.307 \\ \text{II: } 3.651 \text{ Log}(\text{IC}_{50}3\text{T3})+2.394 \text{ Log}(\text{IC}_{50}\text{D3})-2.033 \\ \text{III: } -0.125 \text{ Log}(\text{IC}_{50}3\text{T3})-1.917 \text{ Log}(\text{IC}_{50}\text{D3})+1.500 \end{array} \begin{array}{l} \frac{\text{IC}_{50}3\text{T3}-\text{ID}_{50}}{\text{IC}_{50}3\text{T3}} \\ \frac{\text{IC}_{50}3\text{T3}-\text{ID}_{50}}{\text{IC}_{50}3\text{T3}} \\ \frac{\text{IC}_{50}3\text{T3}-\text{ID}_{50}}{\text{IC}_{50}3\text{T3}} \end{array} \begin{array}{l} -15.72 \\ -6.85 \\ -2.67 \end{array}$$

Die Klassifizierung der Substanzen in die 3 Embryotoxizitätsgruppen **nicht**, **schwach** und **stark embryotoxisch** erfolgt mit Hilfe der dadurch ermittelten Werte für die Diskriminanzfunktionen I, II und III nach folgendem Prinzip:

Klasse 1 <i>nicht embryotoxisch</i>	wenn I > II und I > III
Klasse 2 <i>schwach embryotoxisch</i>	wenn II > I und II > III
Klasse 3 <i>stark embryotoxisch</i>	wenn III > I und III > II

Tabelle 3.6.3-1 Klassifizierungskriterien für die Embryotoxizität der Substanzen basierend auf ihrer Zytotoxizität und ihrer Wirkung auf die Differenzierung der Zellen zu Kardiomyzyten.

Eine Klassifizierungstabelle, erstellt mit Microsoft Excel (Version 5.0), die die oben beschriebenen Formeln und Werte zur Bestimmung des embryotoxischen Potentials einer Substanz enthält, wird zur Berechnung der Einteilung der Substanzen in die entsprechenden Gruppen verwendet.

Material und Methoden

3.7 Immunfluoreszenz-Färbung

Geeignete Antigene zur Antikörperfärbung von Kardiomyozyten sind die am Aufbau der Myofibrillen beteiligten Proteine Aktin, Myosin und alpha-Aktinin.

Fixierung	3,7% Formaldehyd/ 1% Methanol in PBS (beide Merck)
Blockierung	1%BSA (Sigma)/ 0,5% Saponin (Sigma)/ 0,02% NaN ₃ (Merck) in PBS
1.Antikörper	Monoklonal Anti α -Aktinin (Sarcomeric), IgG1 Isotyp, Klon EA53 (Sigma) Monoklonal Anti α -Sarcomeric Aktin, IgM Isotyp, Klon 5C5 (Sigma) Maus Anti-Myosin, Cardiac Heavy Chain α/β , Monoklonal Antibody, IgG1 Isotyp (Chemicon) jeweils gelöst in 1% BSA, 0,5% Saponin, 0,02% NaN ₃ in PBS
2. Antikörper	Ziege Anti-Maus IgG, F(ab') ₂ spezifisch, Fluoreszein konjugiert (Pierce) Ziege Anti-Maus IgM, F(ab') ₂ spezifisch, Fluoreszein konjugiert (Pierce) Anti-Maus IgG (Fc-spezifisch) Biotin konjugiert (Sigma) Streptavidin-R-Phycoerythrin konjugiert (Sigma) jeweils gelöst in 1% BSA, 0,5% Saponin, 0,02% NaN ₃ in PBS zusätzlich Hoechst 33258 1:1000

Tabelle 3.7-1: Darstellung der während der einzelnen Schritte der Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Puffer und Antikörper

Die 'Embryoid Bodies' werden an Tag 10 mit je 500 μ l der Fixierungslösung für 20min bei Raumtemperatur fixiert.

Unspezifische Bindungen werden mit Blockierungslösung für 30 min blockiert.

Für die Färbung werden die Antikörper in Saponin-Lösung verdünnt. Die Inkubationszeiten betragen für den ersten Antikörper mindestens 12 h (4°C) und für

Material und Methoden

den 2. Antikörper 2h (4°C). Nicht gebundene Antikörper werden jeweils nach Inkubation durch dreifaches Waschen entfernt. Der 2. Antikörperlösung wird zur Kernfärbung zusätzlich Höchst 33258 in einer Verdünnung von 1:1000 zugefügt. Die Färbung wird mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 450-490 nm (FITC) und 270-380 nm (Höchst 33258) Wellenlänge ausgewertet und fotografiert.

3.8 Zell-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Fixierung	Methanol (-20°C) (Merck)
Blockierung	0,1% Human-Albumin Lösung in PBS ohne Ca/Mg
Permeabilisierung	0,3% Triton (Merck) in PBS ohne Ca/Mg
Antikörper	1. Monoclonal Anti alpha-Sarcomeric Actin Klon 5C5 (SIGMA); Konzentration 1:100 2. Immuno Pure Goat-Anti-Mouse IgM Horseradish Peroxidase konjugiert. (PIERCE) jeweils gelöst in 0.1% Gelatine (BIO RAD) in PBS; Konzentration 1:500
ABTS-Puffer	Fertigpulver Boehringer Mannheim 60328501 gelöst in PBS ohne Ca/Mg
ABTS-Tabletten	50mg Boehringer Mannheim 600191 01 gelöst in PBS ohne Ca/Mg

Tabelle 3.8-1: Darstellung der während der einzelnen Schritte des Zell-ELISA-Versuches verwendeten Puffer und Antikörper

Die 'Embryoid Bodies' (EBs) werden gemäß der Vorschrift des Differenzierungsversuches kultiviert. Die Konzentrationen werden so gewählt, dass entsprechend der Differenzierungsversuche wichtige Punkte wie IC₅₀D3 und ID₅₀D3 (s.3.6.3 S31) erfasst werden. Es wird die höchste Konzentration von 1000µg/ml nicht überschritten. Am Tag 10 werden die Embryoid Bodies mit einem Lichtmikroskop auf vorhandene, kontrahierende Herzzellareale untersucht und entsprechend dokumentiert. Je Konzentrationsansatz müssen 21 der 24 Embryoid Bodies kontrahierende Areale aufweisen.

Am Tag 10 des Versuches wird der Mediumüberstand der einzelnen Embryoid Bodies abpipettiert und die Platten für 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend werden die Zellen 10 min bei -20°C mit Methanol fixiert, und können nach Entfernung der Fixierungslösung bei -20°C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen werden die Embryoid Bodies 3x mit PBS gewaschen. Zum Blockieren

Material und Methoden

unspezifischer Bindungen wird eine 0,1% Human-Albumin Lösung in PBS (ohne Ca^{++} und Mg^{++}) gewählt, mit der die Zellen für 2h bei Raumtemperatur behandelt werden. Die Zellmembranen werden mit einer 0,3% Triton-Lösung für 10 min bei 4 °C permeabilisiert und gewaschen.

Als Antigen wird für Herzmuskelzellen spezifisches Aktin gewählt. Der Antikörper wird in der Konzentration 1:100 verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Es folgt eine Inkubationszeit über Nacht (4 °C). Überschüssige Antikörper werden durch dreifaches Waschen mit PBS entfernt. Der mit MRP (Meerrettich-Peroxidase) konjugierte 2. Antikörper wird ebenfalls in 0,1% Gelatinepuffer verdünnt (Verdünnung 1:500) und für eine Stunde bei Raumtemperatur den Zellen zugegeben; die überschüssigen Zweit-Antikörper werden anschließend ebenfalls durch 3 faches Waschen entfernt. Nach Zugabe von ABTS-Puffer kommt es zur Umsetzung in ein farbiges Produkt, das mit Hilfe eines Photometers bestimmt wird.

Die Messung der Lichtabsorption wird mit einem Spektro-Photometer (Spectra FLUOR Plus, TECAN) bei 405 nm (Ref. 630 nm) durchgeführt.

3.9 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)

Versuchsprinzip: Die Durchflusszytometrie, d.h. die automatisierte Analyse der optischen Eigenschaften einzelner Zellen im Durchfluss, stellt gewissermaßen eine Weiterentwicklung und Automatisierung des Prinzips der Fluoreszenzmikroskopie dar.

Ein Flüssigkeitssystem führt die zu analysierende Zelle aus dem Probenröhrchen (Sample) durch den Laserstrahl. Dazu wird der Probenstrahl von einem Hüllstrom zu einem sehr dünnen Flüssigkeitsfaden auseinandergezogen. Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird vom FSC-Detektor (Forward Scatter), das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) und verschiedene Fluoreszenzfarben rechtwinklig zum Laserstrahl aufgenommen und durch ein Objektivsystem, verschiedene Farbfilter und Teilerspiegel auf die verschiedenen Detektoren gelenkt. Die Signale der Photomultiplier werden verstärkt und können im Computer ausgewertet und dargestellt werden

Jede der aufgezeichneten optischen Eigenschaften steht für eine bestimmte Charakteristik der gemessenen Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC), d.h. das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht, korreliert überwiegend mit der

Material und Methoden

Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (in rechtem Winkel zum Laserstrahl gestreutes Licht) mit der internen Struktur der Zelle.

Zellernte	0,25 % Trypsin EDTA/ 0,25% Kollagenase; 20%BSA in PBS (alle Sigma)
Fixierung	3,7% Formaldehyd;1% Methanol in PBS (alle Merck)
Blockierung	1% Humanalbumin (Sigma) ;0,02 %NaN ₃ (Merck) in PBS
Permeabilisierung	0,5%Saponin (Sigma); 1% Humanalbumin (Sigma); 0,02% NaN ₃ (Merck) in PBS
Antikörperverdünnung	0,5%Saponin;1%Humanalbumin; 0,02%NaN ₃ in PBS
Antikörper	1.Monoklonal Anti- α -Aktinin (Sarcomeric) (Maus IgG1 Isotyp) Clone EA-53 (Sigma) 2.Anti-Maus IgG (Fc-spezifisch) Biotin konjugiert (Sigma) 3. Streptavidin-R-Phycoerythrin konjugiert (Sigma)
Messung	FACS-Flow (Becton Dickinson, Heidelberg)

Tabelle 3.9-1: Darstellung der während der einzelnen Schritte des FACS-Versuches verwendeten Puffer und Antikörper

Versuchsdurchführung

Jeweils 24 'Embryoid Bodies' werden zunächst mit Trypsin für 30 min und anschließend zusätzlich mit Kollagenaselösung für 20 min inkubiert, dadurch abgelöst und anschließend resuspendiert. Die Reaktion wird mit 3ml ES-Zell-Medium gestoppt. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert (10min/1200rpm 4°C) und in PBS⁺⁺/1mM EDTA aufgenommen. Mittels eines Zellzählgerätes werden die Zellzahlen bestimmt und die Proben individuell auf jeweils 2×10^6 pro Versuchsansatz verdünnt. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Fixierungslösung für 20 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen werden unspezifische Bindungen über Nacht bei

Material und Methoden

4°C blockiert. Nach Zentrifugation werden die Zellen mit Saponinlösung für 10 min vorinkubiert und dadurch permeabilisiert. Der 1. Antikörper wird in Saponin-Puffer s.o. verdünnt und jeweils 100µl zu den Proben pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 min auf Eis im Dunkeln.

Anschließend werden die Zellen für 30 min. in 1ml Saponin-Puffer gewaschen. Der 2. Antikörper wird ebenfalls in Saponin-Puffer verdünnt und wie oben beschrieben für 30 min inkubiert. Zuletzt werden die Zellen in PBS/BSA/NaN₃ gewaschen und nach Zentrifugation in 500µl FACS-Flow resuspendiert.

Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt in einem FACScan bzw. FACSCalibur Durchflusszytometer. Es werden jeweils 10000 Embryonale Stammzellen analysiert. Die Auswertung nach Größe, Granularität, und Fluoreszenzintensität erfolgt mittels CellQuest Analysis and Acquisition Software, Version 1.2.

Die Ermittlung der prozentualen Verteilung Aktinin-positiver Zellen erfolgt in bezug auf ungefärbte (d.h. Färbung ohne 1. Antikörper) und unbehandelte Kontrollgruppen.

3.10 Quantitative 'real time' RT PCR

Die quantitative real time RT PCR ist eine genaue, einfache Methode, die einen hohen Durchlauf ermöglicht. Der sonst in Handarbeit durchzuführende Prozess einer relativen RT PCR wird durch Quantifizierung der Reaktionsprodukte jeder Probe während jedes Amplifikationszyklus automatisiert. Bei den TaqMan Proben handelt es sich um Oligonukleotide, die einen Fluoreszenzanteil enthalten, welcher typischerweise an der 5'Base lokalisiert ist, und einen Suppressoranteil, der an der 3'Base lokalisiert ist. Bei Anregung wird Energie vom Fluoreszenzanteil zum Suppressoranteil transferiert. Daraus resultiert ein nichtfluoreszierendes Substrat. Bei Hybridisierung an die interne Region eines PCR Produktes wird durch die 5' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase die Probe gespalten. Dadurch wird der Fluoreszenzteil vom Suppressorteil gespalten und es resultiert ein Anstieg der Fluoreszenzintensität während jedes Amplifikationszyklus. Mittels dieses Verfahrens wird die Genexpression von β Myosin Heavy Chain in Embryoid Bodies analysiert. Zuvor war in Vorarbeiten von Zur Nieden et al 2000 an unbehandelten Embryoid Bodies in einer Zeitreihe von Tag 5-30 der Differenzierung der 8. Tag als Optimum der Expression des β MHC Genes bestimmt worden.

3.10.1 Isolation von Gesamt RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt mit dem RNeasy MIDI Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers. Das Verfahren basiert auf selektiver Reinigung von RNA durch Anionen Austausch auf einer Qiagen Säule.

Für jeden Isolationsansatz werden 24 Embryoid Bodies (EB) eingesetzt, die gemäß des Differenzierungsversuches, wie oben beschrieben, hergestellt werden.

Die Embryoid Bodies werden bereits an Tag 8 mit Hilfe von Trypsin und Kollagenase abgelöst und anschließend die Zellzahlen der Proben bestimmt.

Nach Pelletierung werden die Proben mit jeweils 2ml Lyse Puffer (+ β -Mercaptoethanol) lysiert. Der stark lysierende Zell-Lyse Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, wodurch freie RNasen inhibiert werden und die Isolierung intakter RNA gewährleistet wird. Dieser Zellextrakt ist bei -80°C über längere Zeit verwahrbar.

Entsprechend der Vorschrift werden die Lysate mit je 2ml Ethanol verdünnt und anschließend auf die RNeasy Säulen geladen.

Total-RNA wird an die Silica Gel Membran der Säule gebunden und Kontaminationen durch mehrfaches Waschen der Säule entfernt.

Die Elution der RNA erfolgt mit $150\ \mu\text{l}$ RNase freiem Wasser.

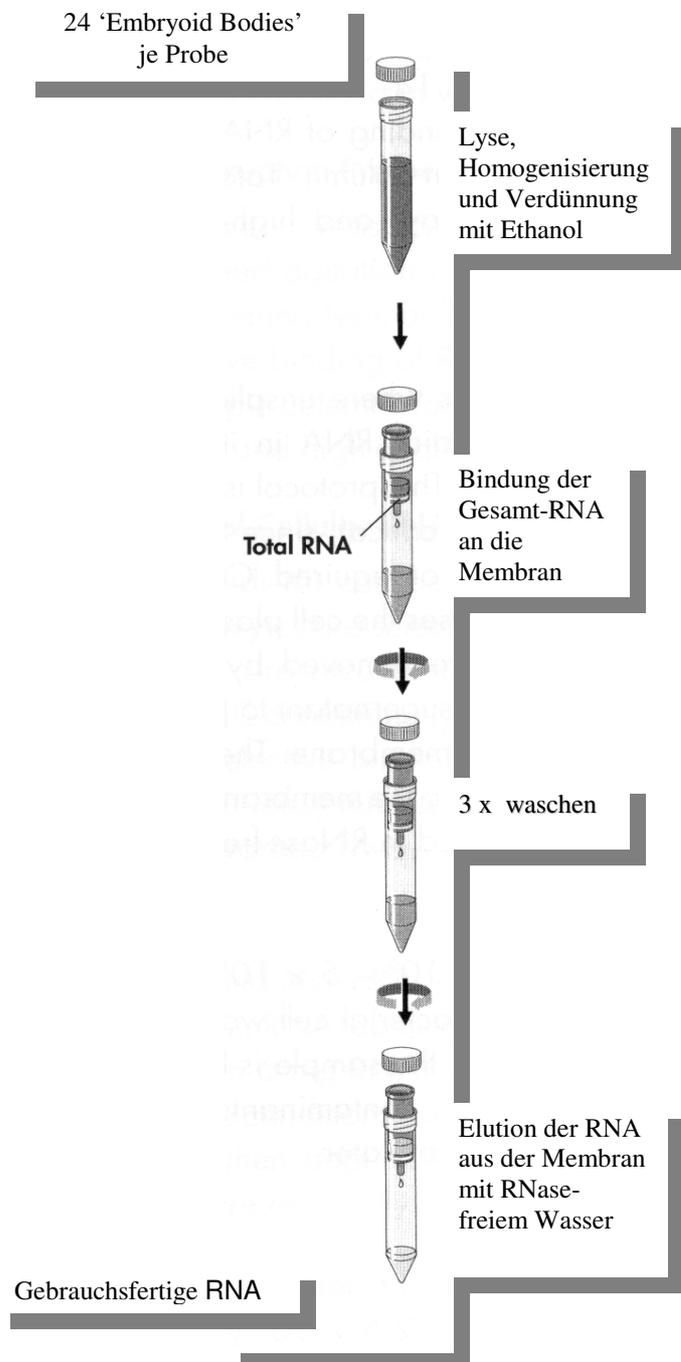


Abbildung 3.10.1-1: Schematische Darstellung der Isolation von Gesamt-RNA

3.10.2 Quantifizierung der RNA

Der RNA-Gehalt der Proben wird mittels RiboGreen™ RNA Quantitation Reagent (Molecular Probes Inc., Leiden, The Netherlands) fluoro-metrisch quantifiziert.

Aliquots jeder Probe werden in serieller Verdünnung 1:400 in 1 x TE-Puffer (MoBiTec) verdünnt und in einer 96-Well-Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit 100µl des 1: 200 (in TE-Puffer) verdünnten RiboGreen Reagent gemischt.

Bei jeder Messung wird ein RNA-Standard in einer seriell verdünnten Konzentrationsreihe (1µg/ml; 0,5µg/ml; 0,1µg/ml; 0,02µg/ml in 1x TE-Puffer) mitgeführt. Die Fluoreszenzemission wird in einem CytoFluor II Fluorescence Multi-Well-Plate Reader (PerSeptive Biosystems, Freiburg) gemessen (Anregungswellenlänge: 480 nm; Emissionswellenlänge: 520 nm).

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit CycloCalc Software, Version 3.2 (PerSeptive Biosystems).

3.10.3 cDNA- Synthese

Für die reverse Transkription (RT) wird pro zu transkribierender Probe 275 ng der Gesamt-RNA verwandt. 5µl der jeweiligen Probe wird nach individueller Vorverdünnung mit 200 U Superscript II, 50 ng Random Hexameren, 2.5mM MgCl₂, 10mM DTT (alle Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) und 0,5mM dNTP (Geneo) in Reaktionspuffer (Gibco BRL) angesetzt, so dass ein Gesamtvolumen von 25µl entsteht. Die cDNA Synthese wird in einem Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) vollzogen.

Anheftung	der 25°C	15 min
Hexamere		
Erststrangsynthese	42°C	50 min
Reaktionsbeendigung	70°C	15 min

Tabelle 3.10.3-1: Programmeinstellung während der cDNA-Synthese

3.10.4 Quantitative ‚Real Time‘ PCR

Spezifische Primer für β Myosin Heavy Chain (β-MHC) (5′-ACCTGTCCAAGTTCC GCAAG-3′ und 5′-CTTGTTGACCTGGGACTCGG-3′) waren zuvor mit Hilfe herkömmlicher RT PCR ausgetestet worden.

Material und Methoden

Es wird in einer Dreifachbestimmung 24.2 ng der cDNA je Probe in einem Gesamtreaktionsvolumen von 22.2µl in einer 2-Schritt-PCR über 40 Zyklen amplifiziert. Das Reaktionsgemisch enthält hierbei neben der cDNA und den Primern, dNTP (0.2mM dATP,dCTP,dGTP,0,4mM dUTP), 3mM MgCl₂, 1.25 U AmpliTaq Gold und 0.5 U AmpErase in SYBR PCR Puffer.

Die PCR Reaktionszyklen werden je mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 30 sec begonnen und mit Annealing und Elongationsschritt bei 42 °C für 2 min beendet. Für die Quantifizierung wird eine Standardkurve verwendet, deren Verdünnungen ausgehend von 50 ng adulter Maus-Herz cDNA 1:10 in 3 seriellen Verdünnungsschritten verdünnt und als Dreifachbestimmung im gleichen PCR-Lauf wie die zu quantifizierenden Proben amplifiziert werden. Die Auswertung erfolgt mit ABI PRISM Sequence detection Software, Version 1.6.3 (PE Applied Biosystems).

4 Ergebnisse

Der ‚Embryonale Stammzell Test‘ (EST) beruht auf der Fähigkeit embryonaler Stammzellen *in vitro* unter definierten Kulturbedingungen in spontan kontrahierende Herzmuskelzellen zu differenzieren. Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen wird, wie im Methodenteil beschrieben, mit dem zytotoxischen Effekt der Substanz einerseits auf die Stammzellen (ES;D3), andererseits auf differenzierte, ‚adulte‘ Fibroblasten der Maus (3T3 A31) verglichen. (teratogen versus embryotoxisch)

Als Endpunkt des Differenzierungsassays diene zunächst das Vorhandensein von Kontraktionen, die bei mikroskopischer Auswertung registriert wurden.

Die Zytotoxizität der Substanzen auf die beiden Zelllinien wurde durch den MTT-Test ermittelt.

Die Halbhemmkonzentrationen (IC50) für den zytotoxischen Effekt auf 3T3-Fibroblasten und ES-Zellen und die Halbhemmkonzentration (ID50) für die Differenzierung von ES Zellen, die jeweils aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelt wurden, dienten zur Klassifizierung der Testsubstanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen: **nicht**, **schwach**, oder **stark** embryotoxisch in einem logarithmischen, auf Diskriminanzanalyse basierenden Prädiktionsmodell. (2.6.3.) (Laschinski et al.,1991; Spielmann et al.,1997, Scholz et al., 1999)

4.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Kardiomyozyten in Embryoid Bodies (EB)

Die hier beschriebenen Versuche dienten dem Ziel differenzierte Kardiomyozyten eines Embryoid Bodies darzustellen. Darüberhinaus sollte die Spezifität der in nachfolgenden Versuchen verwendeten Antikörper geprüft werden.

Als Erstantikörper wurden monoklonale Antikörper gegen ‚ α -sarcomeric-Aktinin‘, ‚ β Myosin Heavy Chain (MHC)‘ und Anti α -Sarcomeric Aktin, IgM Isotyp verwendet. Als Zweitantikörper wurden Anti Maus IgM FITC konjugiert‘ und ‚Anti Maus IgG FITC konjugiert‘ eingesetzt.

Alle ‚Embryoid Bodies‘, die hier durch Antikörper gefärbt werden konnten, wiesen in der mikroskopischen Beurteilung vor der Fixation spontan kontrahierende Areale auf.

Ergebnisse

Die ausdifferenzierten 'Embryoid Bodies' wurden am 10.Tag mikroskopisch auf Kontraktionen untersucht und nur solche, die Kontraktionen aufwiesen, für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Unspezifische Bindungen des 2. Antikörpers wurden durch Analysen von Negativkontrollen ohne 1. AK ausgeschlossen (nicht dargestellt). Unter Verwendung der oben genannten Antikörper traten keine unspezifischen Bindungen auf.

4.1.1 FITC und PE Färbung gegen α Sarcomeric Aktin'

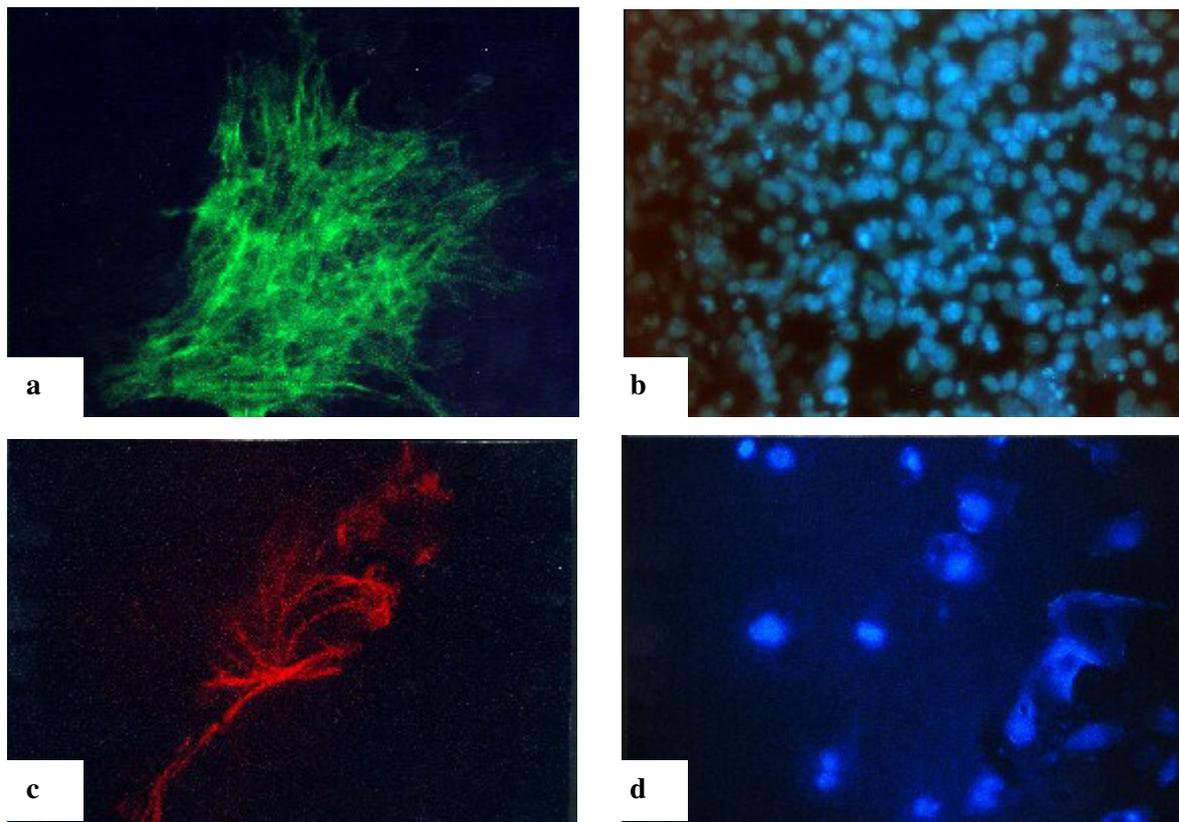


Abbildung. 4.1-1 a. Aus Embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten, dargestellt durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen α -sarcomeric-Aktinin (1:800) und Anti Maus IgG FITC- konjugiert (1:50) Vergrößerung: 180x

b. Kernfärbung des selben Ausschnittes an Tag 10 der Differenzierung mit Hoechst 33258 (Verdünnung 1:10000) Vergrößerung: 180 x

c. Aus Embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten, dargestellt nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung gegen α -sarcomeric-Aktinin (1:800) über ,Anti Maus IgG Biotin- konjugiert (1:1600) und Streptavidin-konjugiertes-Phycoerythrin (1:500); Vergrößerung: 320x

d Kernfärbung desselben Ausschnittes an Tag 10 der Differenzierung mit Hoechst 33258 (Verdünnung 1:10000) Vergrößerung: 320x

Ergebnisse

4.1.2 FITC-Färbung gegen ‚Myosin Heavy Chain‘

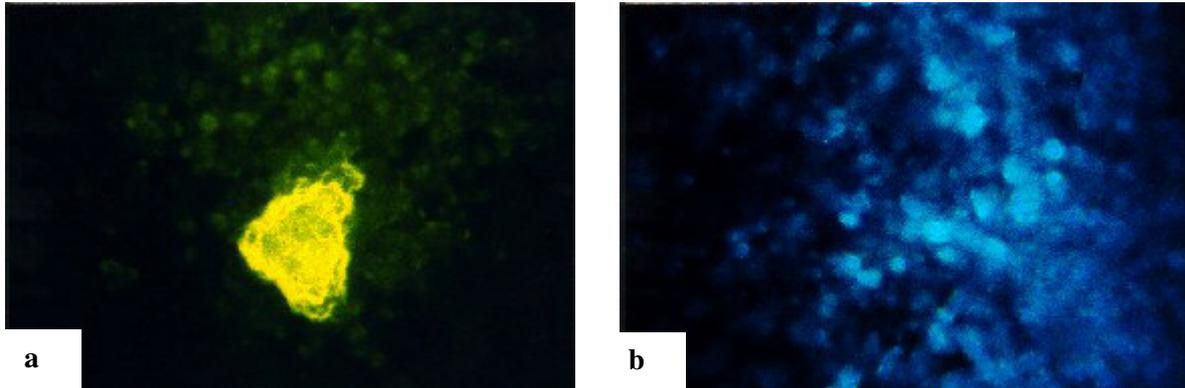


Abbildung. 4.1-2 a. Aus Embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten, dargestellt nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung von ‚Myosin Heavy Chain‘ (1:100) über Anti Maus IgG FITC-konjugiert (1:75) Vergrößerung: 180x
b. Kernfärbung desselben Ausschnittes eines EBs an Tag 10 der Differenzierung mit Hoechst 33258 Vergrößerung: 180x

4.1.3 FITC-Färbung der Embryoid Bodies gegen ‚ α Sarcomeric Actin‘

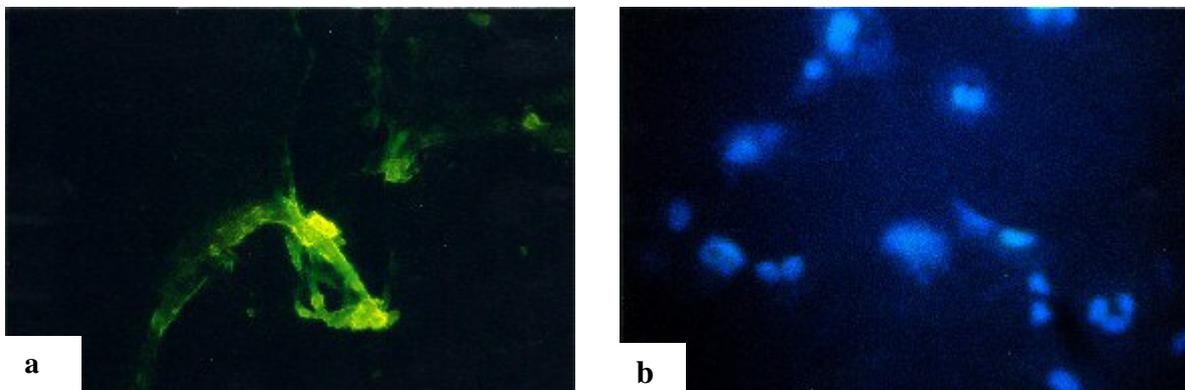


Abbildung 4.1-3. a. Aus Embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten, dargestellt nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung von α -sarcomeric-Aktin (1:500) über Anti Maus IgG FITC-konjugiert (1:50) Vergrößerung: 320x
b. Kernfärbung desselben Ausschnittes an Tag 10 der Differenzierung mit Hoechst 33258 (Verdünnung 1:10000) Vergrößerung: 320x

4.2 Bestimmung des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen mit dem Embryonalen Stammzell Test (EST)

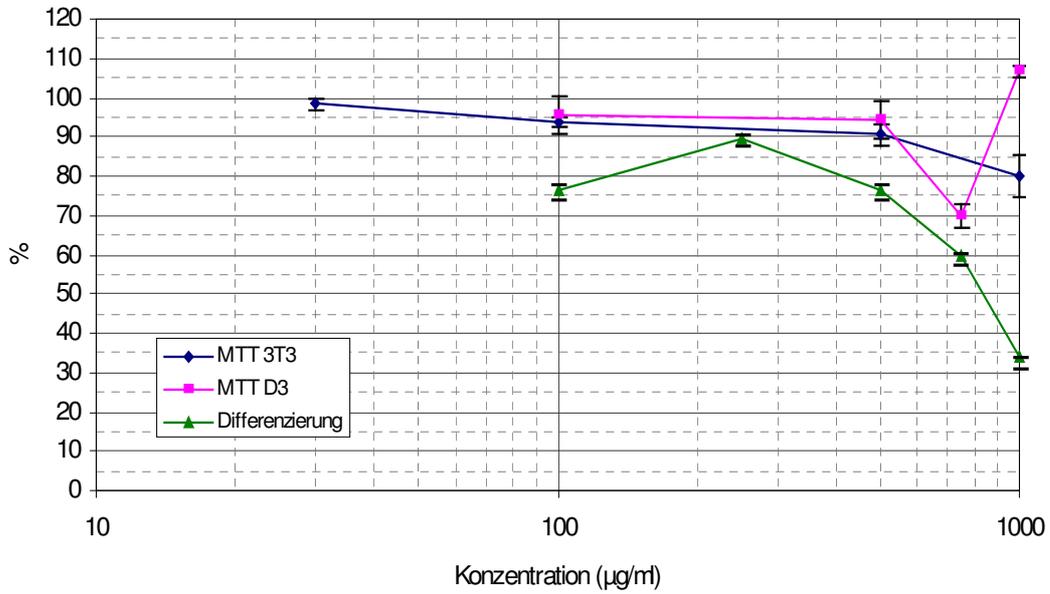
In den folgenden Abbildungen werden jeweils die im EST gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Es erfolgt zuerst die Darstellung im Diagramm: bezogen auf eine Gruppe von Kontrollzellen, d.h. Zellen die ohne Zugabe von Testsubstanz auf die gleiche Weise und mit den gleichen Nährmedien kultiviert wurden, werden die Ergebnisse in Prozent lebender Zellen (MTT –Versuche für 3T3- und D3-Zellen), bzw. Prozentzahl ‚Embryoid Bodies‘ mit kontrahierenden Arealen (Differenzierungsversuch mit D3-Zellen) dargestellt. Aus den Kurven werden für die MTT-Versuche die IC50 Werte, d.h. diejenigen Werte, bei denen noch 50 Prozent der Zellen lebten, und für die Differenzierungsversuche die ID50 Werte, d.h. diejenigen Werte, bei denen noch 50 Prozent der ‚Embryoid Bodies‘ kontrahierende Areale aufweisen, abgelesen und in die zugehörigen Tabellen eingesetzt.

Wie unter 3.6.2 beschrieben werden anhand dieser Werte die Funktionen I, II, III ermittelt und zueinander in Relation gesetzt. Dadurch wird die Klassifikation der Testsubstanz in die Gruppe **nicht**, **schwach** oder **stark embryotoxisch** berechnet.

Nicht embryotoxische Testsubstanzen

1.

Saccharin

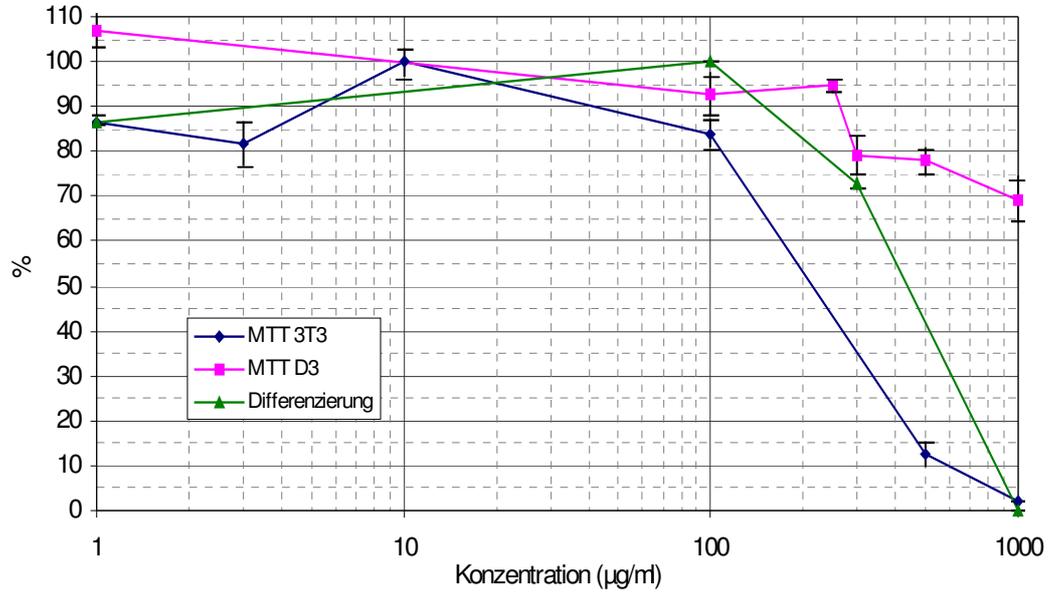


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
>1000	>1000	820	11,5718	10,9191	-8,5260	1 <u>nicht embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-1 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Saccharin und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

2.

Isoniazid

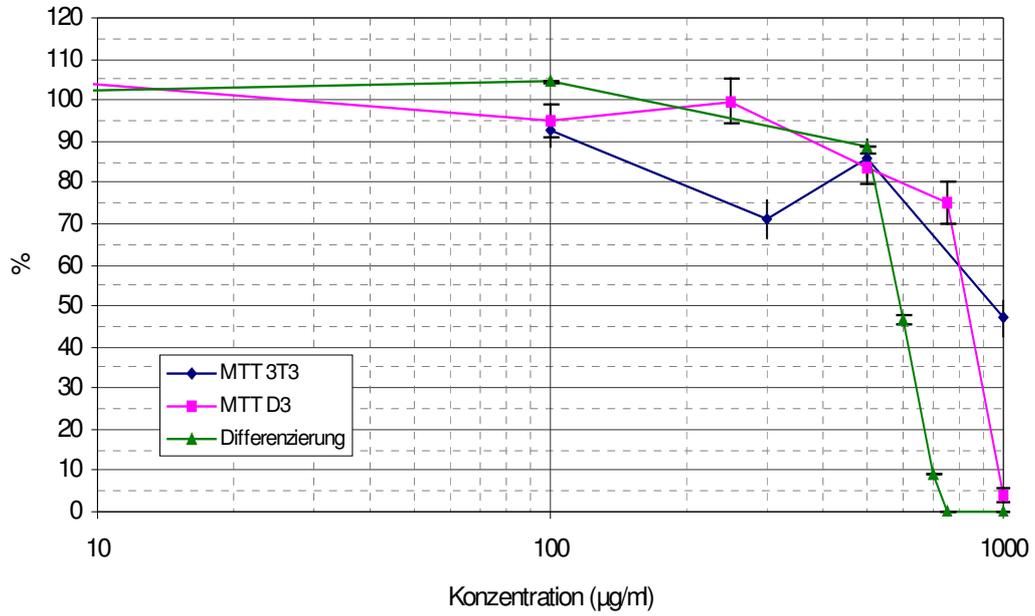


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
1000	210	430	14,0773	10,9402	-10,2827	1 <u>nicht embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-2 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Isoniazid und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

3.

Penicillin G

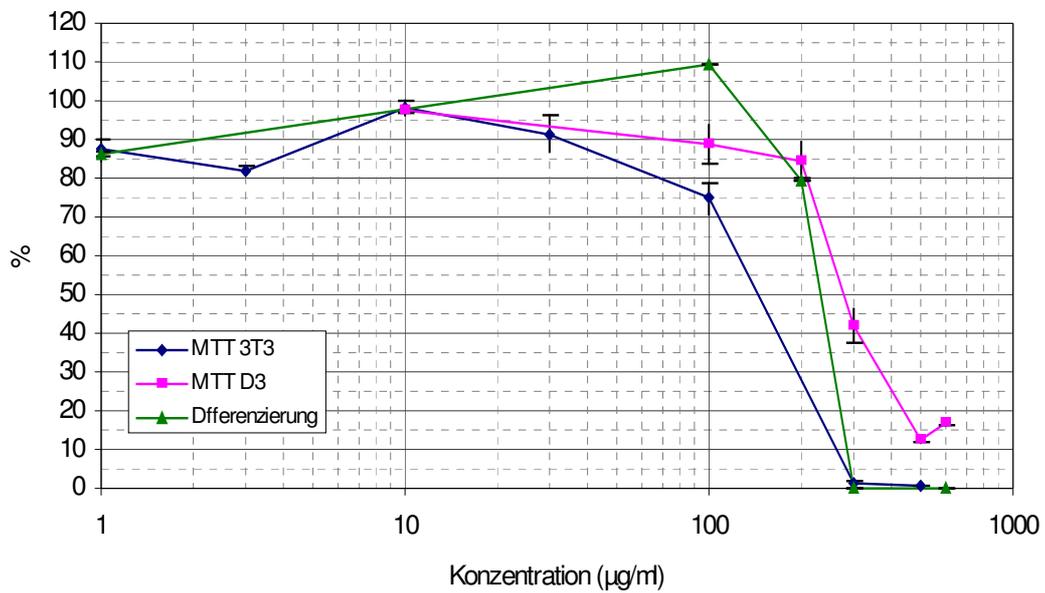


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
810	940	600	10,0718	10,2108	-8,0587	1 schwach embryotoxisch

Abbildung 4.2-3 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz PenicillinG und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

4.

ASS

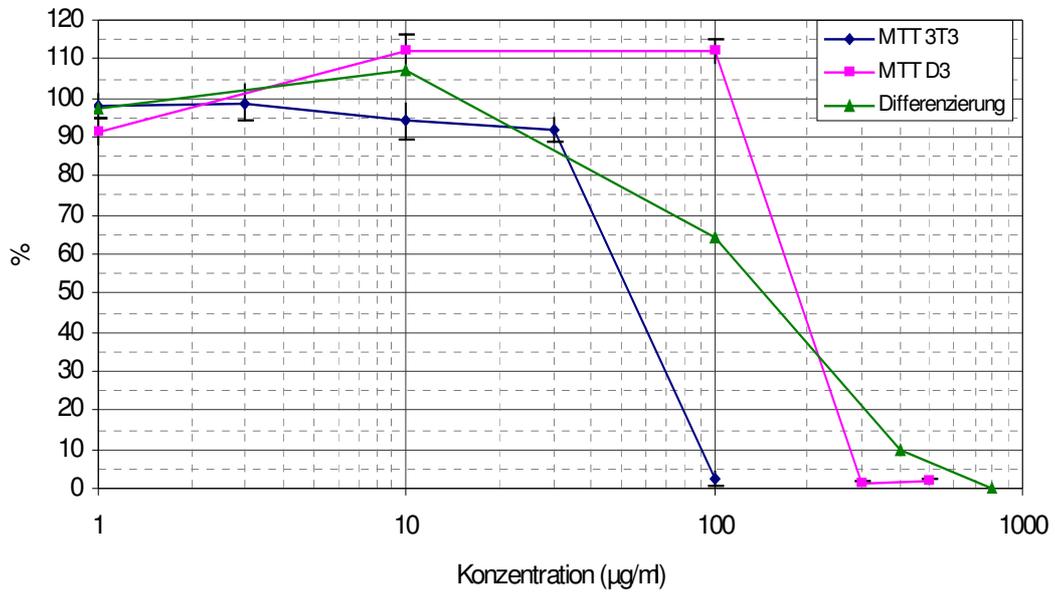


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
280	150	240	8,9024	8,1732	-8,5332	1 <u>nicht embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-4 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz ASS und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

5.

Ascorbinsäure



MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
180	52	150	12,3265	8,6457	-10,0348	1 <u>nicht embryotoxisch</u>

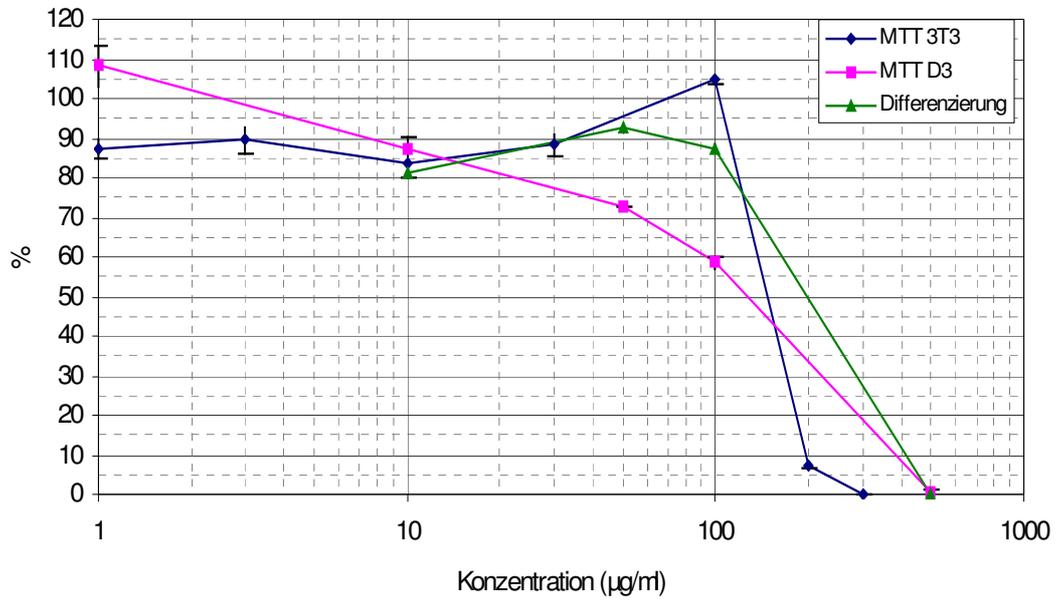
Abbildung 4.2-5 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Ascorbinsäure und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

Ergebnisse

Schwach embryotoxische Testsubstanzen

6.

Coffein

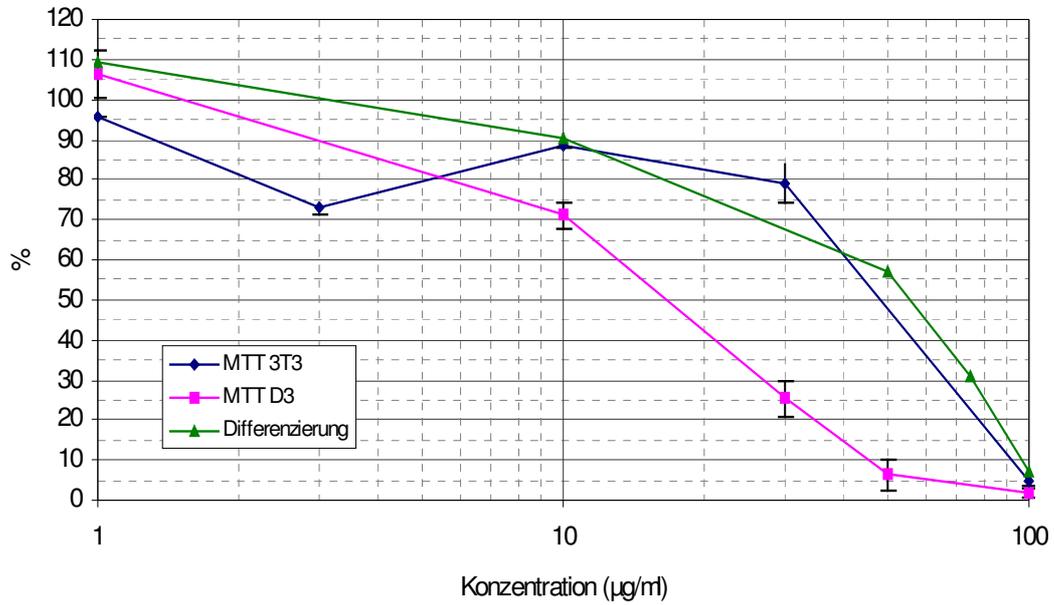


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
130	150	200	6,3209	6,8334	-7,4944	2 <u>schwach embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-6 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanzen Coffein und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

7.

Indomethazin

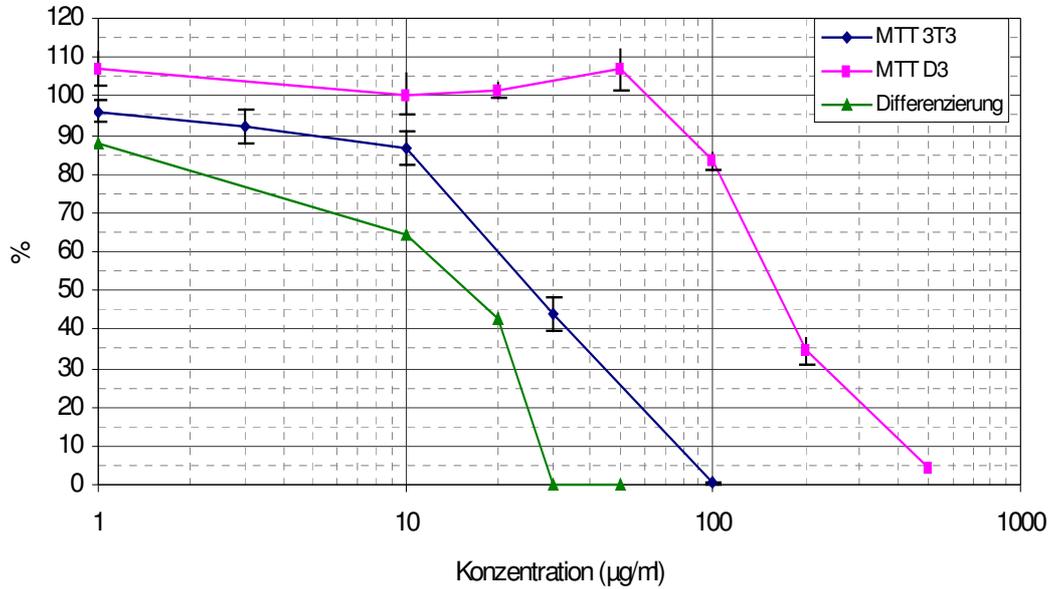


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
16	48	56	-0,6754	2,5097	-5,4385	2 <u>schwach embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-7 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Indomethazin und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

8.

Diphenylhydantoin

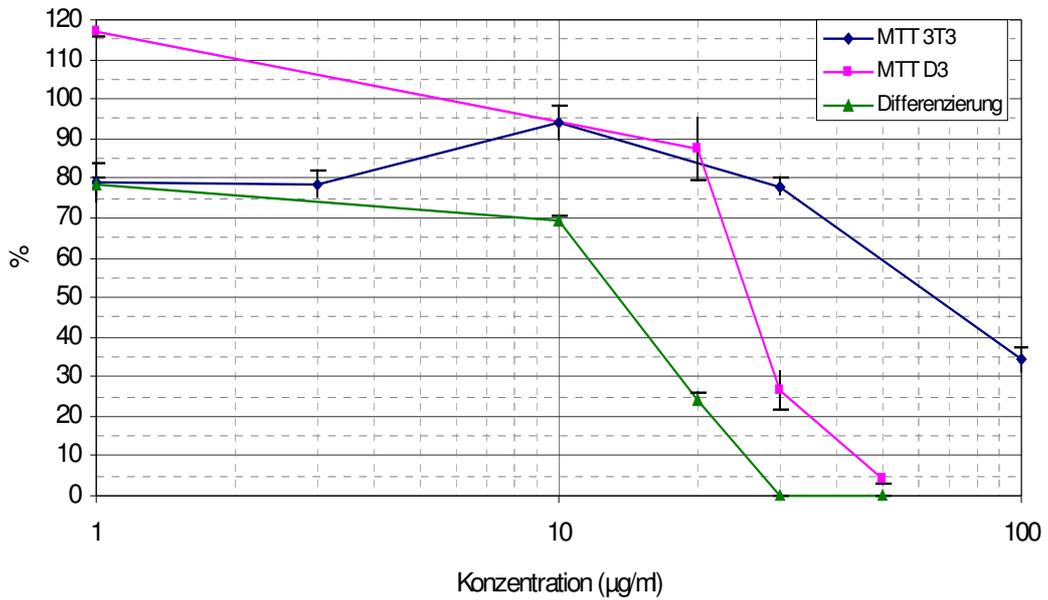


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
160	25	16	-1,6463	2,7987	-6,5300	2 <u>schwach embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-8 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Phenytoin und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

9.

Dexamethason

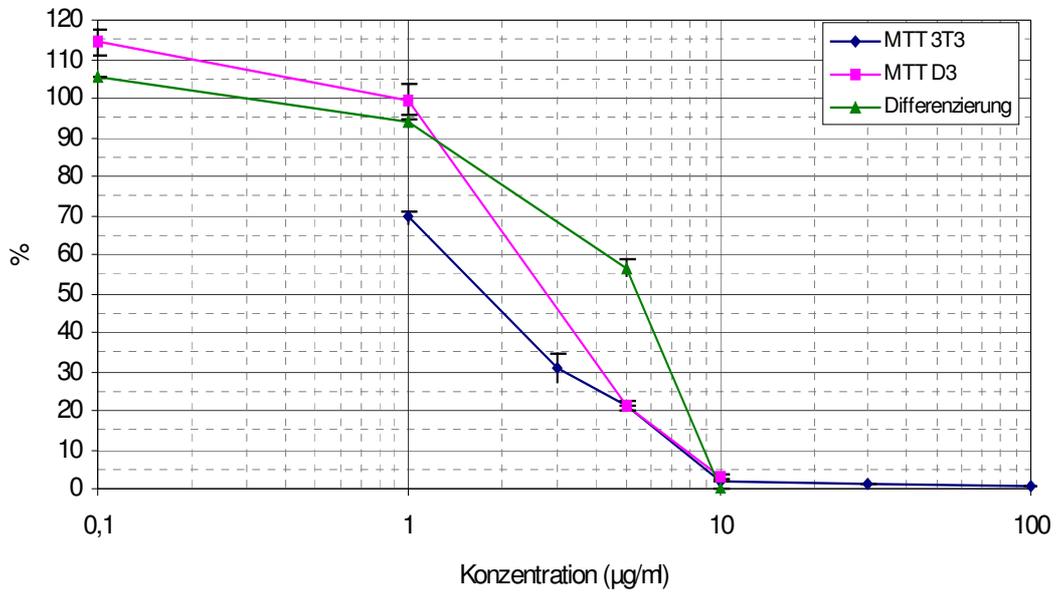


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
25	64	14	-4,2885	1,5028	-4,4037	2 schwach embryotoxisch

Abbildung 4.2-9 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Dexamethason und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

10.

Busulfan

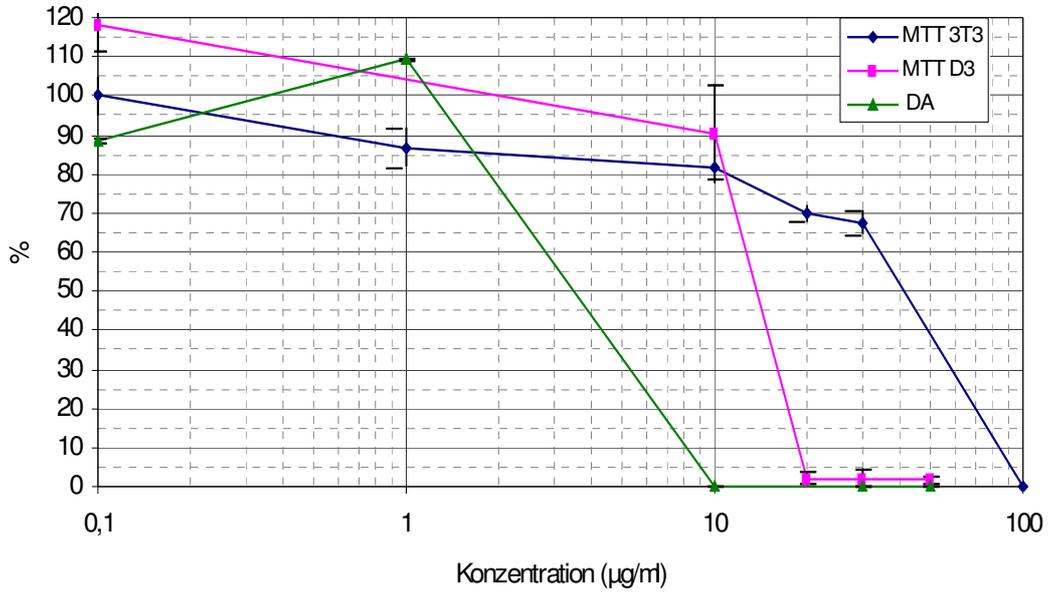


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
2,5	1,75	5,3	-2,1238	-0,8859	-6,5061	2 <u>schwach embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-10 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Busulfan und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

11.

Diphenhydramin



MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
14	40	3,4	-7,0872	-0,1172	-3,6949	2 <u>schwach embryotoxisch</u>

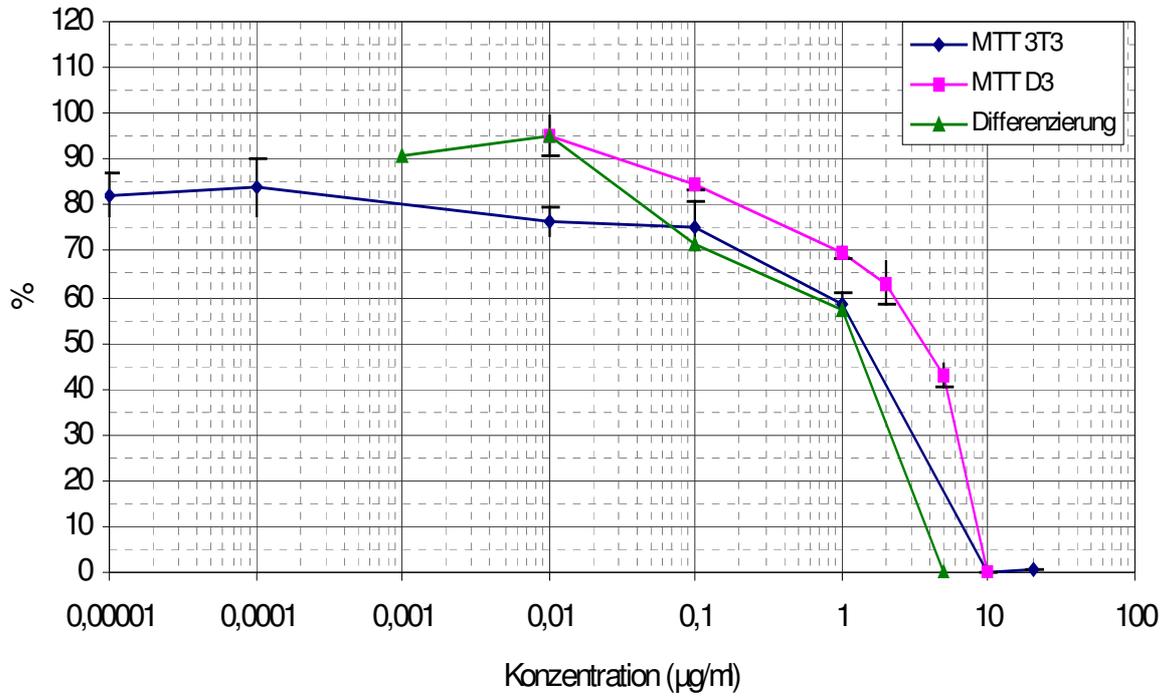
Abbildung 4.2-11 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Diphenhydramin und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

Ergebnisse

Stark embryotoxische Testsubstanzen

12.

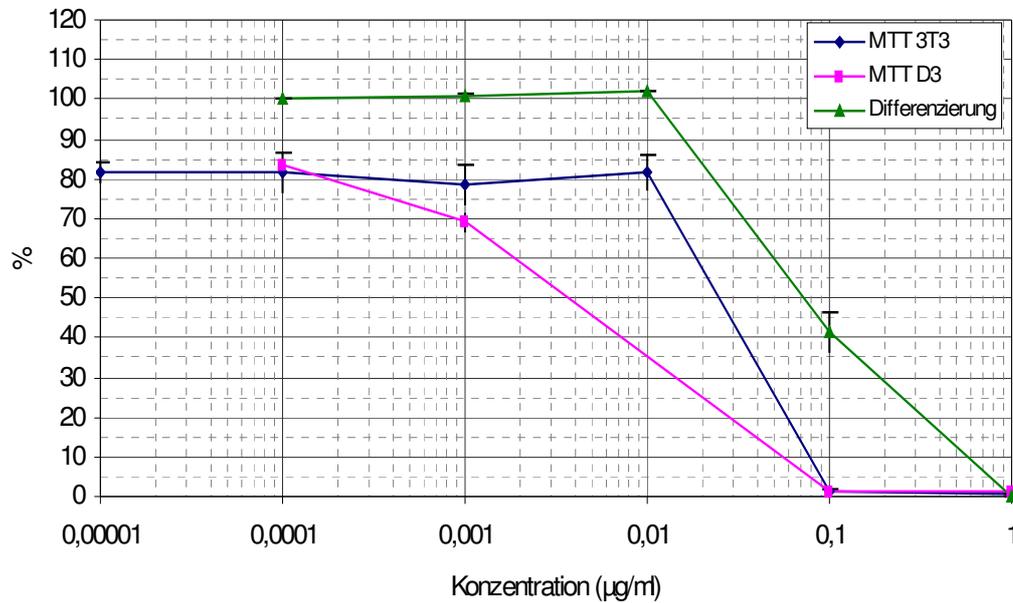
Hydroxyurea



MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
3,4	1,4	1,2	-13,7535	-5,3346	-3,4928	3 <u>stark embryotoxisch</u>

13.

Methotrexat

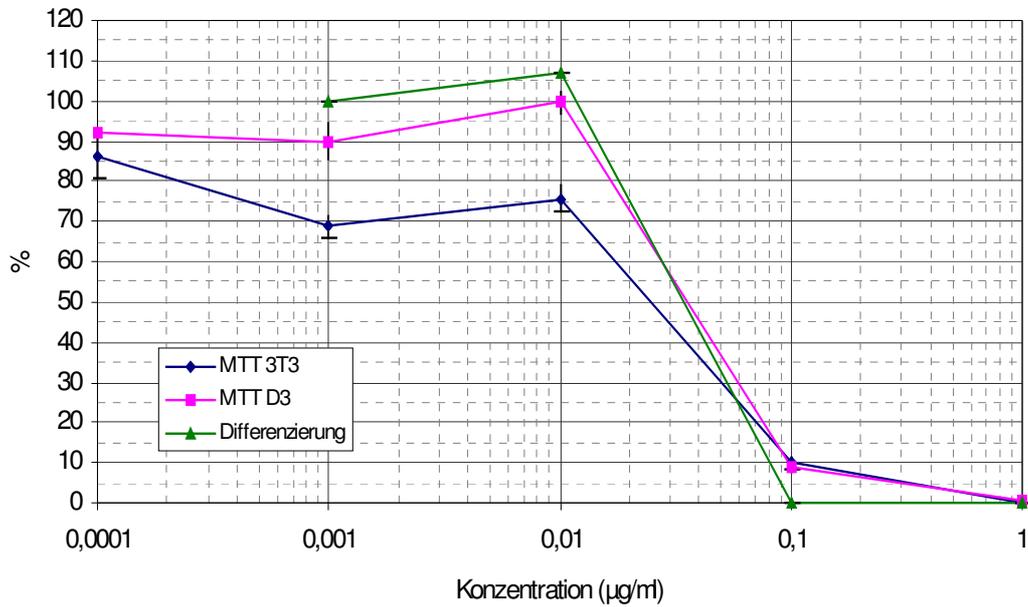


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
0,0035	0,025	0,071	-24,0282	-14,8379	-0,5217	3 stark embryotoxisch

Abbildung 4.2-13 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Methotrexat und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

14.

5-Fluorouracil

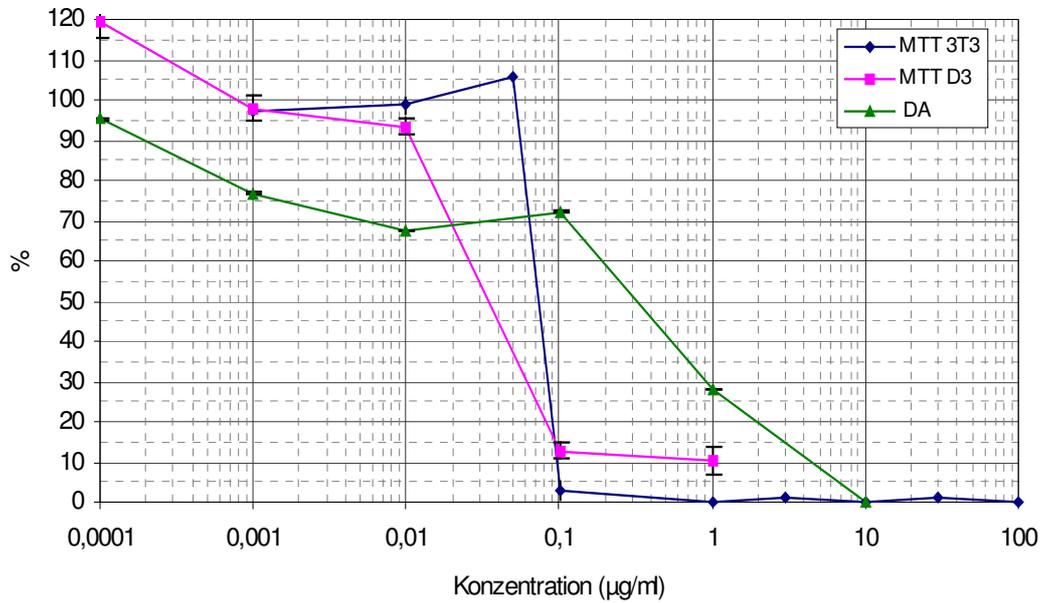


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
0,035	0,025	0,035	-28,1703	-15,3714	-0,2787	3 stark embryotoxisch

Abbildung 4.2-14 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz 5-Fluorouracil und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

15.

Cytosin arabinosid

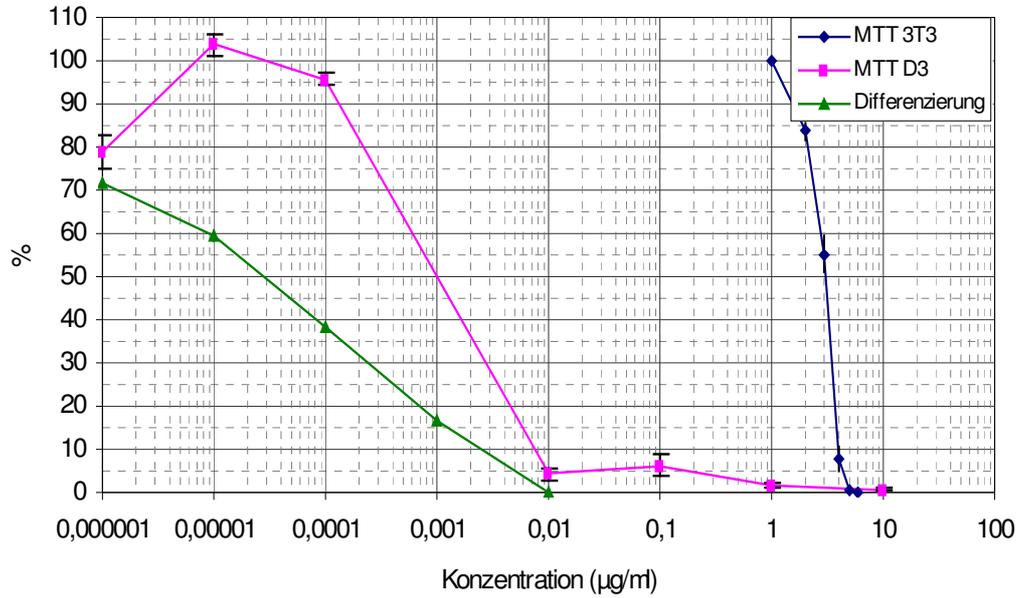


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
0,035	0,075	0,3	-11,5496	-8,3437	-4,2384	3 <u>stark embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-15 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Cytosinarabinosid und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

16.

Retinolsäure

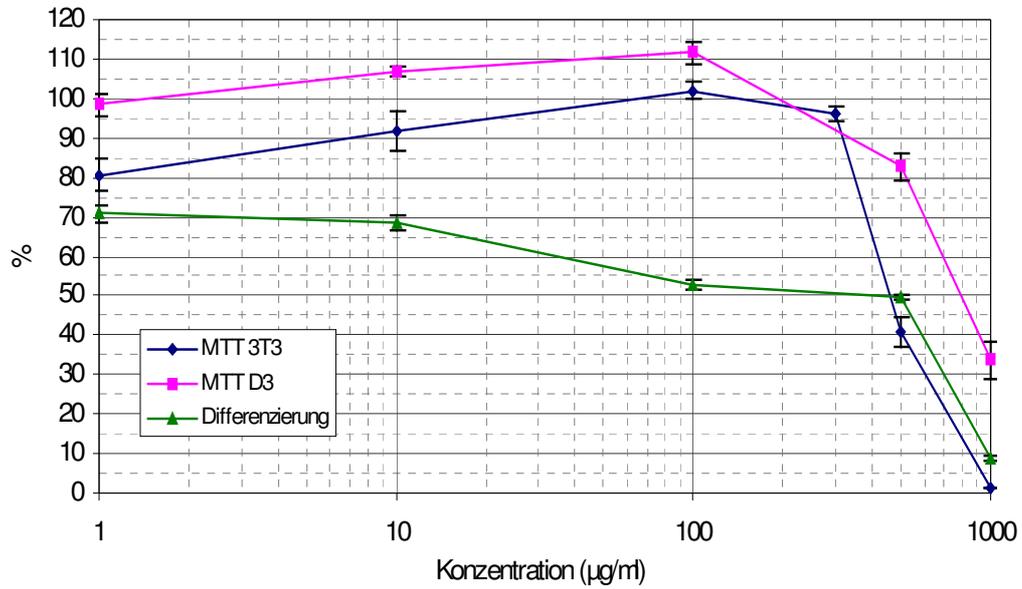


MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
0,001	1,2	0,000026	-31,0585	-15,7759	4,5711	3 <u>stark embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-16 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Retinolsäure und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

Untersuchung der bisher nicht klassifizierten Testsubstanz Thalidomid

Thalidomid



MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Funktion I	Funktion II	Funktion III	Klassifikation im Prädiktionsmodell
810	450	500	10,7450	10,0257	-8,7439	1 <u>nicht embryotoxisch</u>

Abbildung 4.2-17 Darstellung der im EST gewonnenen Ergebnisse mit der Testsubstanz Thalidomid und ihre Klassifikation im Prädiktionsmodell

Ergebnisse

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass Embryonale Stammzellen während der Differenzierung gegenüber embryotoxischen Substanzen empfindlicher sind als ‚erwachsene‘ oder bereits differenzierte Zellen. Damit ist mit dem EST eine Unterscheidung zwischen zytotoxischen und embryotoxischen Substanzen möglich. (Scholz et al.,1998). Unter Einbeziehung der toxischen Wirkung wurden 11 der 16 Substanzen als schwach oder stark embryotoxisch eingestuft. Die 5 Substanzen Saccharin, Penicillin G, Isoniazid, ASS und Ascorbinsäure wurden als nicht embryotoxisch gewertet.

Bei allen 16 Substanzen wurde vor dem Einsatz der höchsten Dosis von 1000µg/ml bereits die ID50 erreicht. Es zeigten sich also *in vitro* bei allen Substanzen (auch bei den *in vivo* nicht embryotoxischen Substanzen Saccharin, Penicillin G und Isoniazid) Einschränkungen in der Entwicklung kontrahierender Areale. Bei Gegenüberstellung der Zytotoxizität und Differenzierungshemmung gegen Embryonale Stammzellen (MTT D3 und Differenzierung D3) kann bei den schwach und stark embryotoxischen Substanzen zwischen embryotoxischen und teratogenen Effekten unterschieden werden. In diesem Vergleich werden die Substanzen, deren ID50 Wert niedriger war als der IC50 Wert der Embryonalen Stammzellen, d.h. deren Zahl kontrahierender Areale sich stärker verringerte als die Zahl lebender Zellen, als teratogen angesehen. Zu dieser Gruppe gehören die Substanzen Phenytoin, Dexamethason, Diphenhydramin, Hydroxyharnstoff und Retinolsäure. Formal auch Saccharin, und Penicillin!

Diejenigen Substanzen, deren Werte in allen 3 Versuchsteilen annähernd übereinstimmen, werden in ihrer Wirkung als embryotoxisch angesehen. Hier ist davon auszugehen, dass die Verringerung der kontrahierenden Areale nicht auf teratogenen, sondern eher auf embryotoxischen Effekten beruht. In diese Gruppe gehören die Substanzen Indomethazin, Methotrexat, 5-Fluorouracil und Cytosinarabinosid.

4.3 Erweiterte Analyse der Embryotoxizität der Testsubstanzen mit Hilfe des Zell-ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Im Rahmen der Analyse der kontrahierenden Areale der Embryoid Bodies mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass die Aktin-Expression bei steigender Substanzkonzentration abnahm.

Dadurch soll die bisher routinemäßig angewendete Auswertung des EST mittels mikroskopischer Auswertung objektiviert werden. Nachteil der mikroskopischen Auswertung war, dass nur die Tatsache, dass ein Embryoid Body Kontraktionen aufwies, bewertet wurde. Die hier beschriebenen Versuche haben zum Ziel durch quantitative Analyse der Aktinexpression die Differenzierung der Embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten genauer zu bestimmen.

Wie unter 4.1.1 beschrieben, wurde parallel durch Immunfluoreszenztests gezeigt, dass Aktin in umschriebenen Arealen des Embryoid Bodies exprimiert wird.

Zuerst wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von 2 Substanzen auf die Aktin Expression in Embryoid Bodies untersucht. Als Substanzen wurden die zuvor beschriebene nicht embryotoxische Substanz Penicillin G und die ebenfalls zuvor beschriebene stark embryotoxische Testsubstanz 5-Fluorouracil ausgewählt. Es wurde davon ausgegangen, dass die mit ABTS-Puffer ausgelöste Farbreaktion abhängig von der Menge des im 'Embryoid Body' vorhandenen Aktins war. Dieses Protein ist Bestandteil kontraktile Filamente, wie sie in Muskelzellen vorkommen. Substrateinwirkungszeiten von 30min, 45min, 60min und 120min wurden ausgetestet, wobei sich zeigte, dass nach 60min keine Veränderung des Ergebnisses mehr auftrat.

Je Konzentrationsansatz wurden 24 Embryoid Bodies ausgewertet. Werte, die außerhalb der Standardabweichung von 0.06 lagen, flossen nicht in die Wertung ein. Es wurde darauf geachtet, dass je Konzentrationsansatz nicht mehr als 3/24 Embryoid Bodies ausgeschlossen werden mussten. Anderenfalls wurden die Embryoid Bodies nicht für die Versuche verwendet.

Die Konzentrationsreihen waren so gewählt worden, dass entsprechend der Vorversuche wichtige Punkte wie Halbhemmkonzentrationen bezüglich Zytotoxizität und Differenzierungshemmung (IC_{50} und ID_{50}) miterfasst werden konnten. Allerdings wurde auch hier die Höchstdosis von 1000 μ g/ml nicht überschritten.

Ergebnisse

Nach Auslösung der Farbreaktion wurden also folgende Parameter gemessen:

- Höhe des Aktin Gehaltes in unbehandelten 'Embryoid Bodies'
- Abhängigkeit des Aktin Gehaltes in substanzbehandelten 'Embryoid Bodies' von der Konzentration der Testsubstanz
- Antigenunabhängige Farbreaktion in der Negativkontrolle

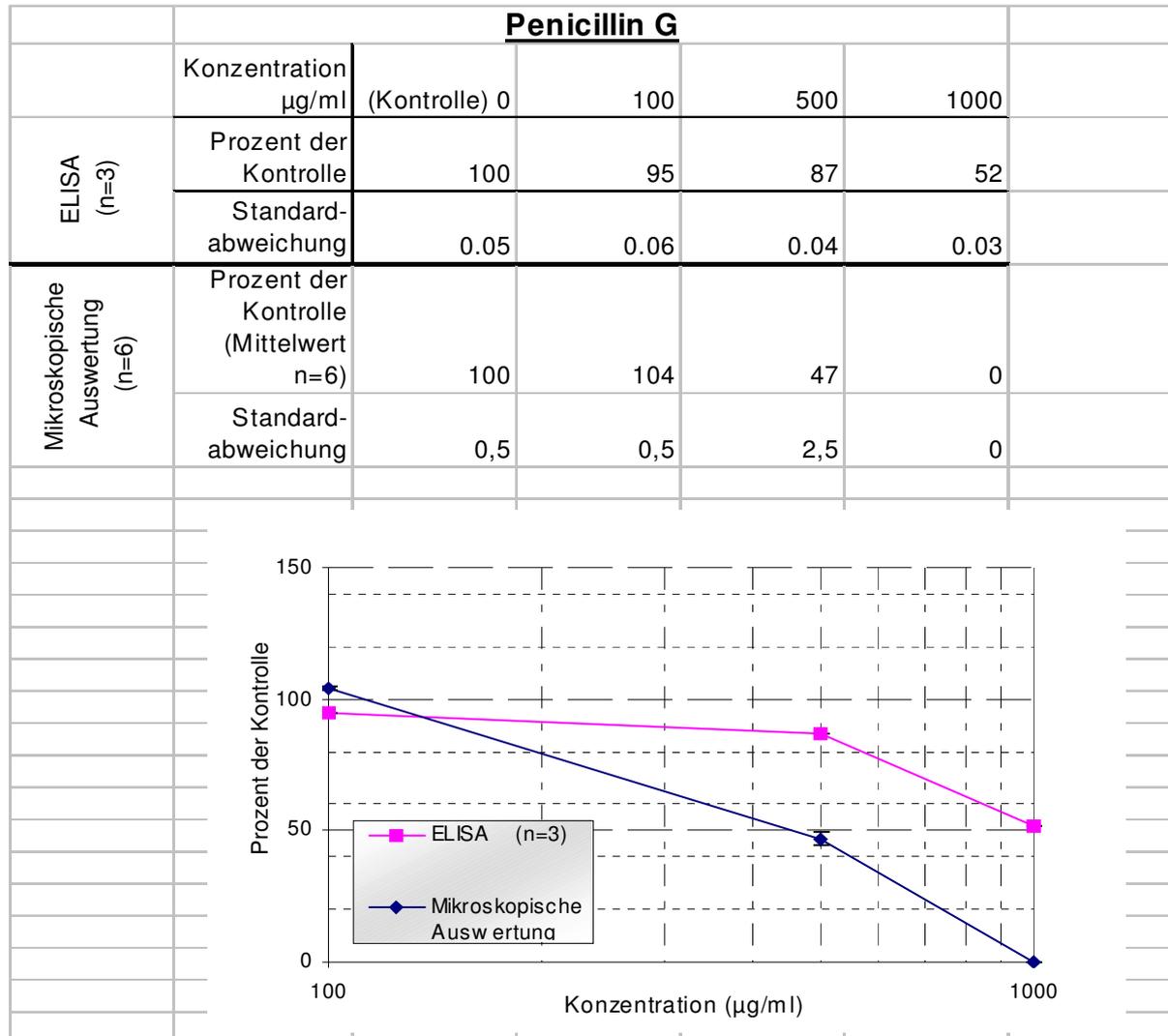


Abbildung 4.3-1 Graphische Darstellung der Messergebnisse des Zell-ELISA Versuches mit der Testsubstanz Penicillin G im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung

Penicillin G wurde in den Konzentrationen 100µg/ml bis 1000µg/ml appliziert.

Ergebnisse

In der höchsten eingesetzten Konzentration war die Aktin-Konzentration in den 'Embryoid Bodies' immerhin noch bei 52% in bezug auf die Kontrolle. Die ID50 lag außerhalb des verwendeten Konzentrationsspektrums.

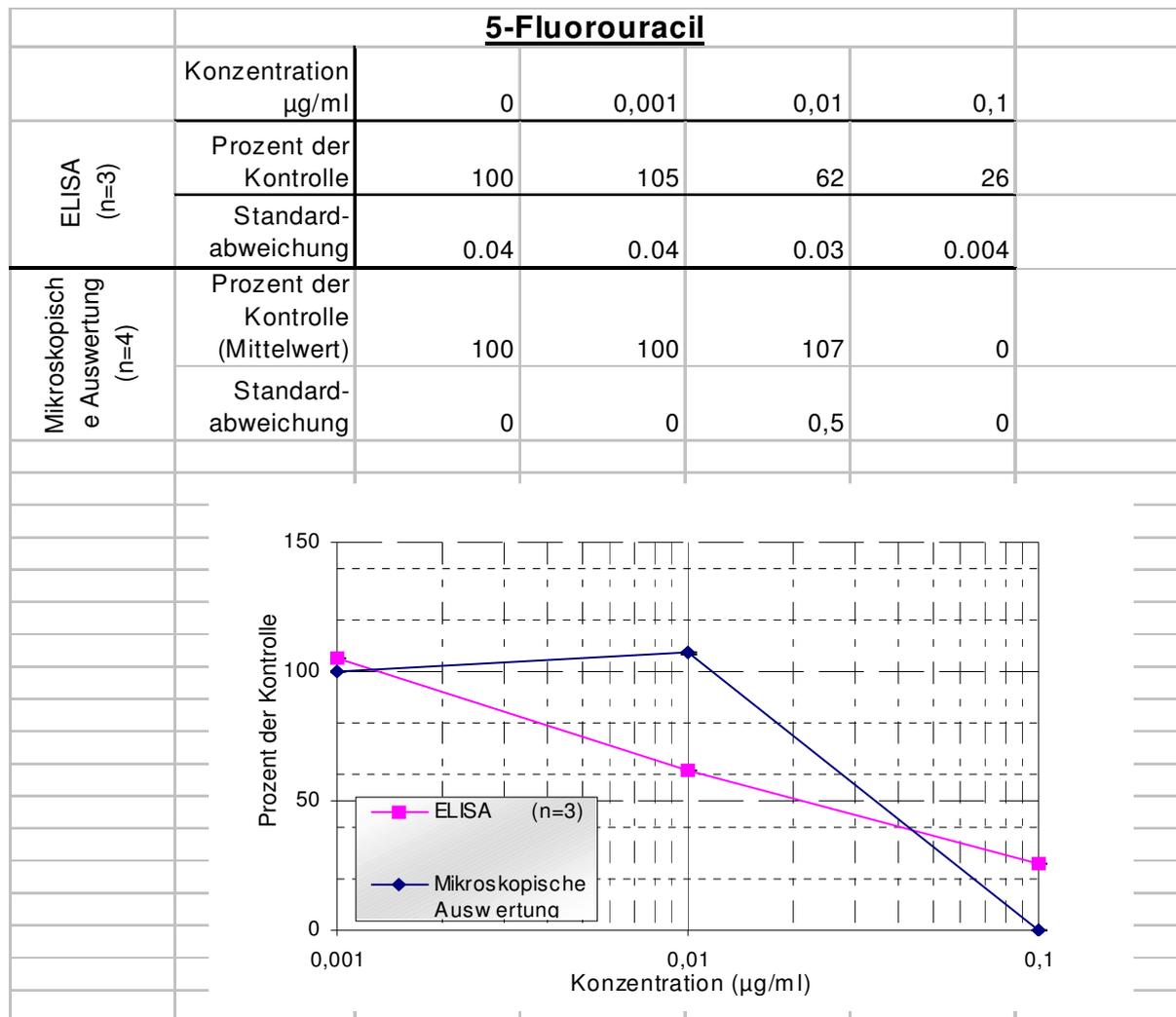


Abbildung 4.3-2 Graphische Darstellung der Messergebnisse des Zell-ELISA Versuches mit der Testsubstanz 5-Fluorouracil im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung

5-Fluorouracil wurde in den Konzentrationen 0.001µg/ml bis und 0,1µg/ml appliziert. Die ID50 betrug 0.021µg/ml.

In der höchsten eingesetzten Konzentration betrug die Aktin-Expression in den 'Embryoid Bodies' immerhin noch 26% in bezug auf die Kontrolle.

Mit den hier beschriebenen Versuchen konnte die konzentrationsabhängige Abnahme der Aktin Konzentration im 'Embryoid Body' dargestellt werden.

4.4 Erweiterte Analyse der Embryotoxizität der Testsubstanzen mittels Durchflußzytometrie/FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter)

In den in 4.3 beschriebenen Versuchen konnte die Aktin-Expression der jeweiligen Embryoid Bodies pro well bestimmt werden, nicht jedoch die Zellzahl der gebildeten Kardiomyozyten, wie es in der Analyse mit dem Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS) möglich ist.

Mit den hier beschriebenen Versuchen wurde untersucht, welche Veränderungen in der Zahl Aktinin-positiver Zellen im 'Embryoid Body' nach Substanzbehandlung auftraten. Diese Dosis-Wirkungsbeziehung wurde mit der aus den in 4.2 beschriebenen Versuchen verglichen.

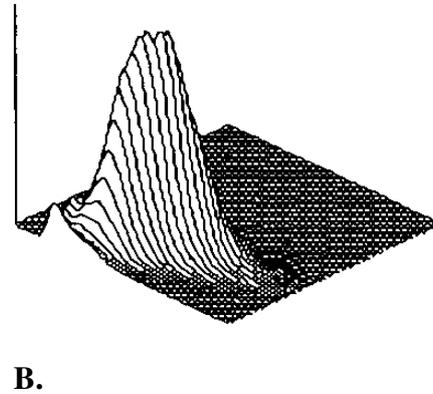
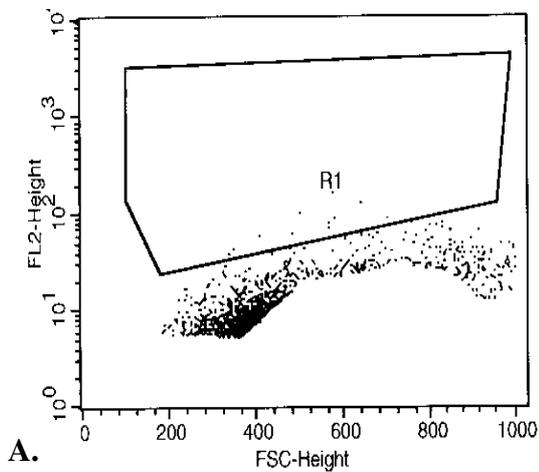
Es wurden Penicillin G, eine nicht-embryotoxische Substanz, und 5-Fluorouracil, eine stark embryotoxische Substanz, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen getestet. Die 'Embryoid Bodies' wurden wie im Differenzierungsversuch beschrieben hergestellt und mit Penicillin G, bzw. 5-Fluorouracil in steigender Konzentration behandelt.

An Tag 10 wurden die Embryoid Bodies mikroskopisch ausgewertet und für die durchflusszytometrische Analyse fixiert und gefärbt.

Als Antigen wurde das herzzellspezifische intrazytoplasmatisches Antigen α -Aktinin (sarcomeric) gewählt. Als zweiter Antikörper wurde Ziege Anti-Maus IgG spezifisch, an Biotin konjugiert, eingesetzt. An Streptavidin konjugiertes Pykoerythrin wurde als Fluoreszenzfarbstoff gewählt. Streptavidin stellte hierbei die Bindung zu dem Zweitantikörper (Biotin-Teil) her. Je Probe wurden 24 identisch behandelte Embryoid Bodies aus den Kulturplatten gelöst und in einer Probe gefärbt. Je Probe wurden 10000 Zellen im FACS analysiert. Die Versuche wurden jeweils mindestens 3 mal wiederholt.

Messungen der Kontrollgruppen ergaben, dass 17% der Zellen eines 'Embryoid Body' Aktinin-positiv waren. Daraus kann geschlossen werden, dass an Tag 10 der Entwicklung 17% der Zellen eines Embryoid Body sich zu Kardiomyozyten entwickelt hatten.

Negativkontrolle



Kontrolle

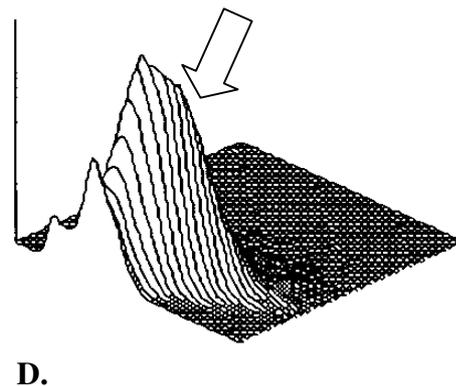
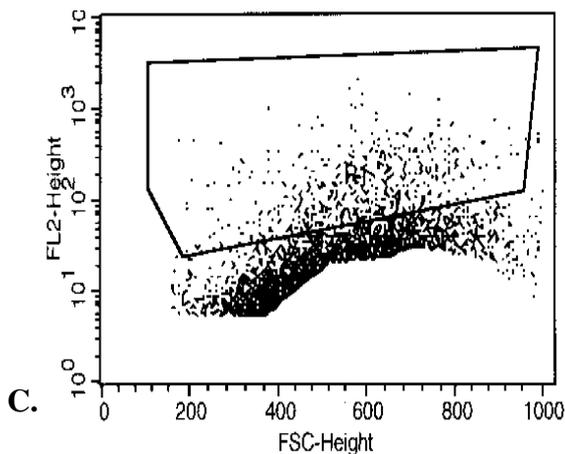


Abbildung 4.4-1 A-D. FACS-Analyse von 'Embryoid Bodies' ohne Substanzzugabe während der Differenzierung. Die Zellen wurden nach der Kultur im Differenzierungsversuch an Tag 10 von den Kulturplatten gelöst, jeweils 24 identisch behandelte EBs in eine Probe gegeben, und wie unter 3.9 beschrieben gefärbt. Je Probe wurden 10 000 Zellen im FACS analysiert. Die Darstellung erfolgt zunächst in der 2-dimensionalen Ansicht (Aktinin Konzentration vs. Zellgröße). Zur Verdeutlichung wird bei B und D auch die 3-dimensionale Grafik präsentiert; bei der zusätzlichen Dimension handelt es sich um die Zellgranularität gemessen im Sidescatter.

R1 Gate = Messbereich, in dem Aktinin positive Zellen gezählt werden

A und B. Negativkontrolle: Im Gegensatz zu den anderen Proben wurde die Negativkontrolle ohne 1. Antikörper gefärbt. Es wurden dadurch unspezifische Bindungen des 2. Antikörpers ausgeschlossen.

C und D Kontrolle: Die EBs wurden ohne Testsubstanz im Differenzierungsversuch kultiviert. Es wurde die Anzahl von Kardiomyozyten in unbehandelten EBs bestimmt. Dieser Wert galt als Ausgangswert für die in den nachfolgend dargestellten Versuchen ermittelten Ergebnisse. In Abbildung D wird auf diejenigen Areale hingewiesen (Pfeil), die eine Zunahme der Fluoreszenzsignale zeigen.

Penicillin G

Die Behandlung mit Penicillin resultierte in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Aktinin-positiven Zellen.

In der Kontrollprobe waren 17% der Zellen Aktinin positiv, bei 100µg/ml noch 13%, bei 500µg/ml 7% und bei 800µg/ml nur noch 1.7%.

Bei der Bestimmung der Zellzahl vor der Antikörperfärbung konnte keine Reduktion der Zellzahl verzeichnet werden. In den mit der Testsubstanz Penicillin G durchgeführten Versuchsreihen konnte wiederholt festgestellt werden, dass die Gesamtzellzahl der 'Embryoid Bodies' im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe sogar häufig etwas angestiegen war. Die beschriebene Abnahme der Kardiomyozytenzahl kann also nicht auf zelltoxische Wirkung der Substanz zurückgeführt werden.

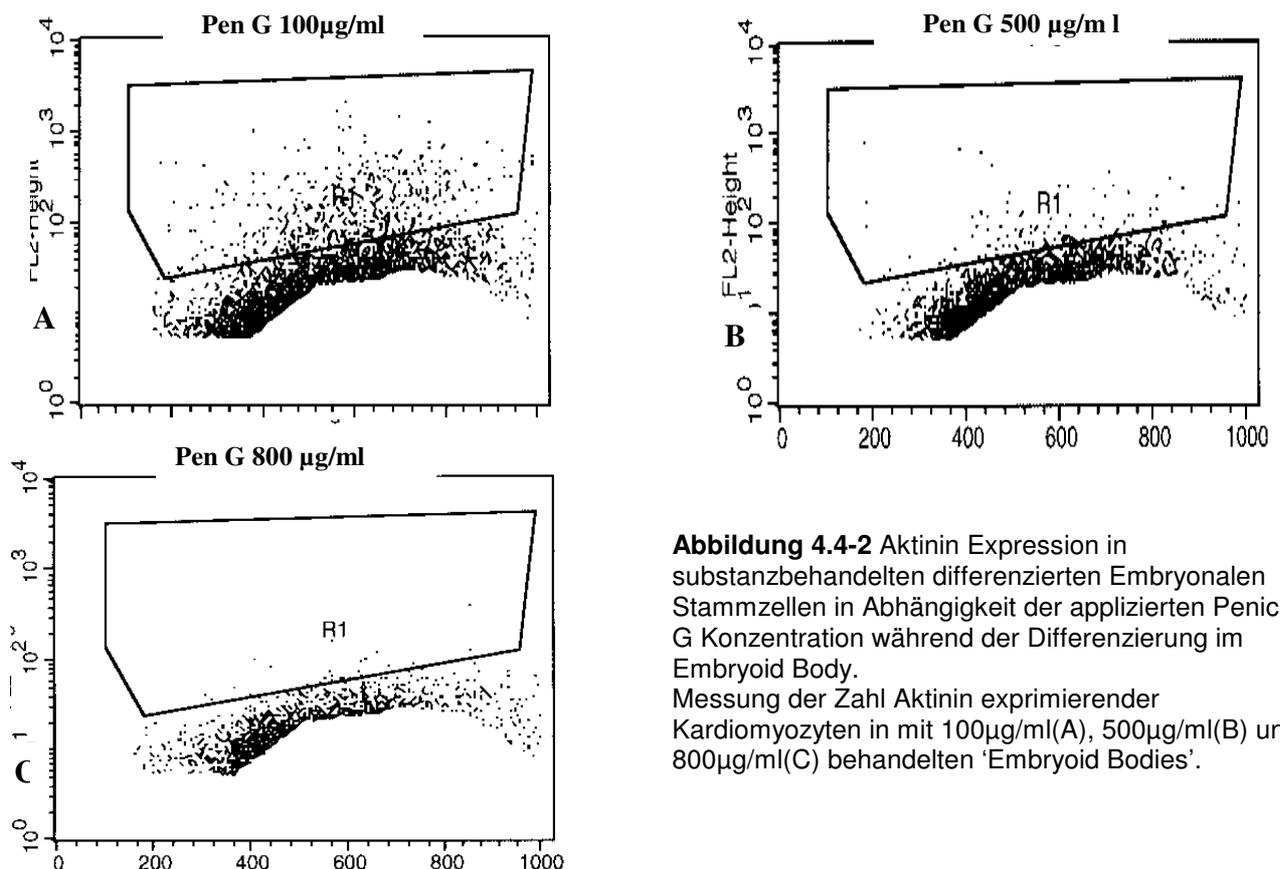


Abbildung 4.4-2 Aktinin Expression in substanzbehandelten differenzierten Embryonalen Stammzellen in Abhängigkeit der applizierten Penicillin G Konzentration während der Differenzierung im Embryoid Body.

Messung der Zahl Aktinin exprimierender Kardiomyozyten in mit 100µg/ml(A), 500µg/ml(B) und 800µg/ml(C) behandelten 'Embryoid Bodies'.

Ergebnisse

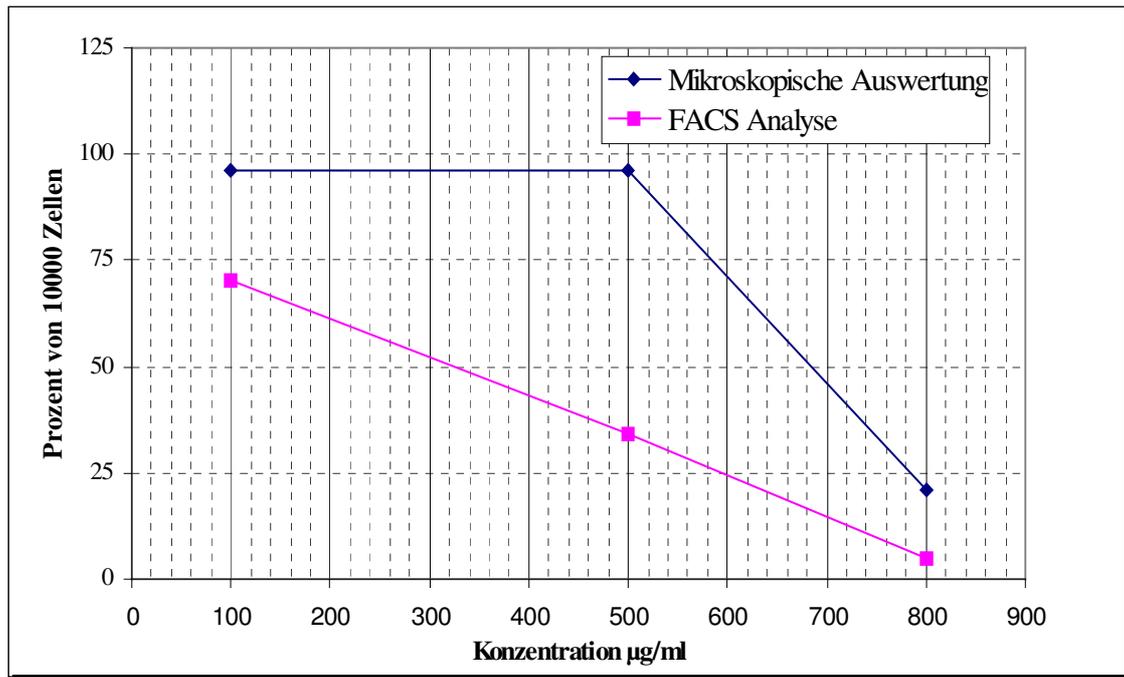


Abbildung 4.4-3 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der FACS Analyse (Aktinin positive Zellen) mit der mikroskopischen Auswertung (kontrahierende EBs) nach Behandlung mit der Testsubstanz **Penicillin G**

Während sich durch mikroskopische Auswertung bis 500 $\mu\text{g/ml}$ kein Effekt auf die Anzahl kontrahierender Embryoid Bodies zeigte, nahm nach durchflusszytometrischer Auswertung die Anzahl der Kardiomyozyten in der kleinsten Dosis von 100 $\mu\text{g/ml}$ schon auf 74% ab. Die ID50 lag bei 320 $\mu\text{g/ml}$. In der höchsten eingesetzten Konzentration waren weniger als 1% Kardiomyozyten nachweisbar.

Penicillin G induziert eine stetige Abnahme der Kardiomyozytenzahl in einem Embryoid Body. Diese Abnahme wird mikroskopisch erst ab 600 $\mu\text{g/ml}$ sichtbar (s.Abb. 4.2-3). In dieser Konzentration hatte sich die Zahl der Aktinin positiver Kardiomyozyten allerdings schon auf 8% reduziert.

Ergebnisse

5-Fluorouracil

Die Anzahl Aktinin positiver Zellen betrug in der Kontrolle 18%, bei 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 20%, bei 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 19.7% und bei 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 8%.

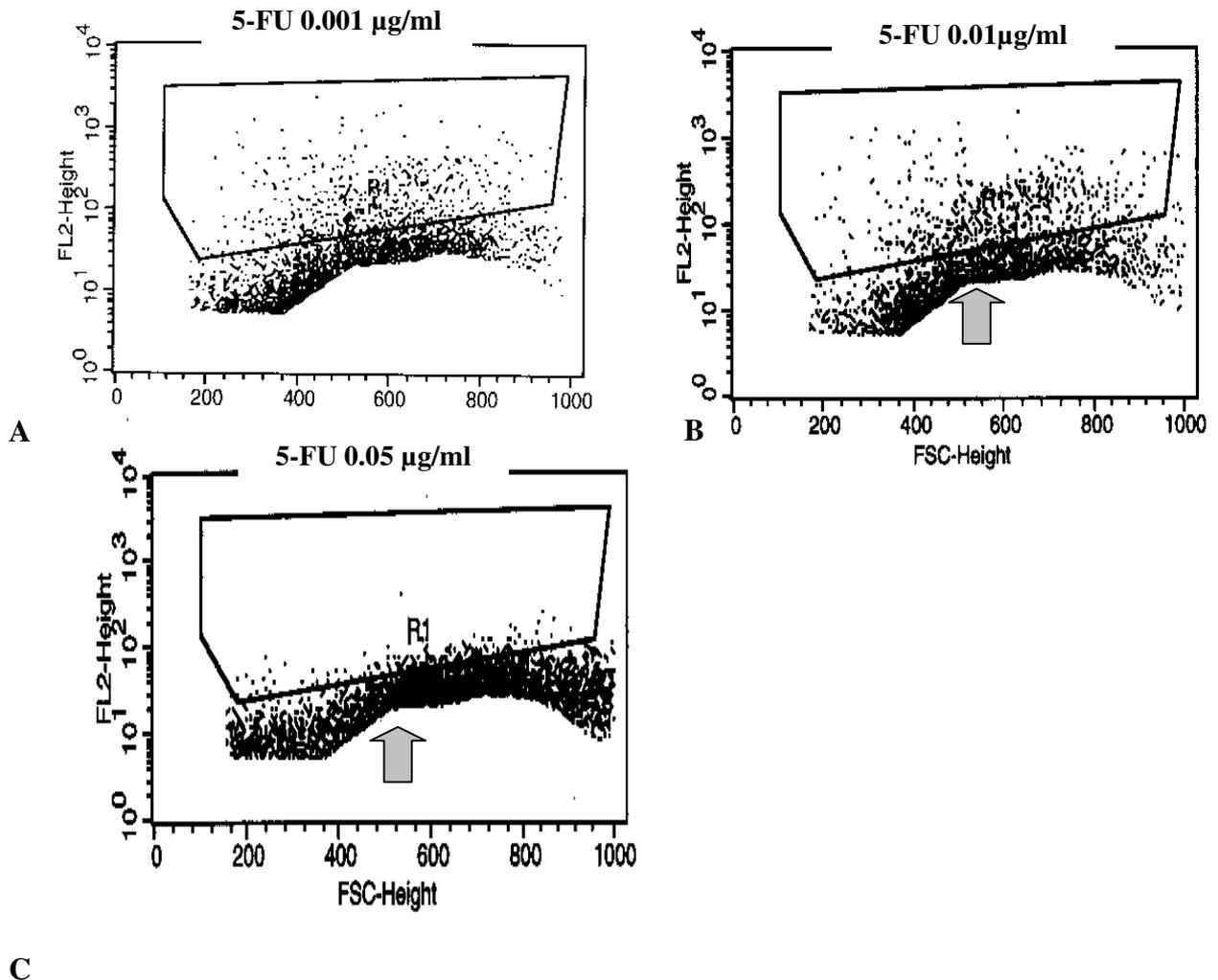


Abbildung 4.4-4 Aktinin Expression in substanzbehandelten differenzierten Embryonalen Stammzellen in Abhängigkeit der applizierten 5-Fluorouracil Konzentration während der Differenzierung im Embryoid Body. Die Zahl Aktinin exprimierender Kardiomyozyten wurde in mit 0.001 $\mu\text{g/ml}$ (A), 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (B) und 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (C) behandelten 'Embryoid Bodies' gemessen. Die im Text beschriebene Verschiebung der Gesamtpopulation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen wurde mit Pfeilen markiert

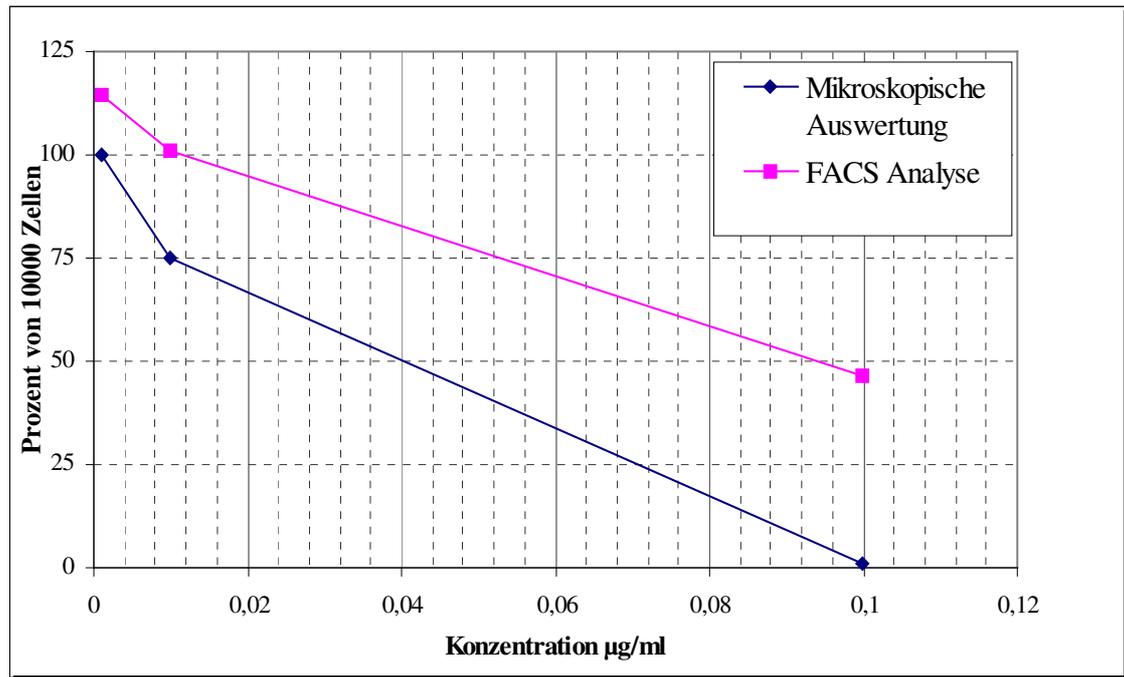


Abbildung 4.4-5 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der FACS Analyse (Aktinin positive Zellen) mit der mikroskopischen Auswertung (kontrahierende EBs) nach Behandlung mit der Testsubstanz **5-Fluorouracil**

Problematisch bei der durchflusszytometrischen Auswertung war, dass die Testsubstanz scheinbar eine Verschiebung der gesamten Zellpopulation, im Hinblick auf Zellgröße und Granularität, innerhalb des in der Kontrolle festgelegten Messbereiches bewirkt. Dieses Phänomen schien mit steigender Dosis zuzunehmen. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass durch diese Verschiebung die Werte falsch berechnet werden. Dies könnte die Erklärung dafür sein, dass die Werte für die hohen Fluorouracil Konzentrationen im Vergleich zu den mikroskopisch erhobenen Ergebnissen viel höher sind.

4.5 Erweiterte Analyse der Embryotoxizität mit Hilfe von Quantitativer „Real-Time PCR“

Mit Hilfe dieses Versuches sollte die Dosis-Wirkungsbeziehung der Genexpression des β -Myosin Heavy Chain (MHC) Genes in Abhängigkeit von der Substanzapplikation in verschiedenen Konzentrationen auf die 'Embryoid Bodies' beschrieben werden. Darüber hinaus sollte mit dieser Methode ein neuer und einfach zu quantifizierender Endpunkt im Embryonalen Stammzell Test ausgetestet werden. Bei ZurNieden et al. 2001 konnte mit Hilfe von RT-PCR Analyse gezeigt werden, dass das gewählte β -MHC Gen spezifisch in Herzgewebe exprimiert wurde und dass die Primer für die Amplifikation von β MHC spezifisch die Transkriptionsprodukte der MHC Gene im Herz der Maus markierten. Der Höhepunkt dieser Expression wurde an Tag 8 und 9 des Differenzierungsversuches festgestellt.

Aus diesem Grund wurde die dosisabhängige Modifikation der β -MHC Genexpression an Tag 8./9 untersucht. (Zur Nieden et al.,2001)

Mit Hilfe von zuvor angefertigten Standardkurven mit seriell verdünnter cDNA adulter Herzzellen der Maus konnte die Menge der Amplifikationsprodukte der β -MHC cDNA in den Proben quantifiziert werden. (Zur Nieden et al.,2001)

Je Probe wurden 24 identisch kultivierte Embryoid Bodies für die RNA-Elution zusammengeführt. Jeder Versuch wurde mindestens 3 mal wiederholt.

Nachdem die Embryoid Bodies von den Kulturplatten gelöst wurden, wurde vor der Lyse die Zellzahl bestimmt. Es wurde davon ausgegangen, dass diejenigen Embryoid Bodies, die aufgrund hoher Substanzkonzentration während der Differenzierung geringere Zellzahlen aufwiesen, auch geringere GesamtRNA Konzentrationen beinhalteten. Dies hat sich während der Quantifizierung der Nukleinsäuren bestätigt. Da für die Reverse Transkription aber immer 275ng/Probe Gesamt RNA verwandt wurde, wurde das Endergebnis um den Faktor, der aus Zellzahl der Probe / Zellzahl der Kontrolle gebildet wurde, korrigiert.

Als Testsubstanzen wurden aus jeder Embryotoxizitätsklasse je 2 Vertreter gewählt. Darüber hinaus wurde die als teratogen bekannte Substanz Thalidomid getestet.

Nicht embryotoxische Testsubstanzen

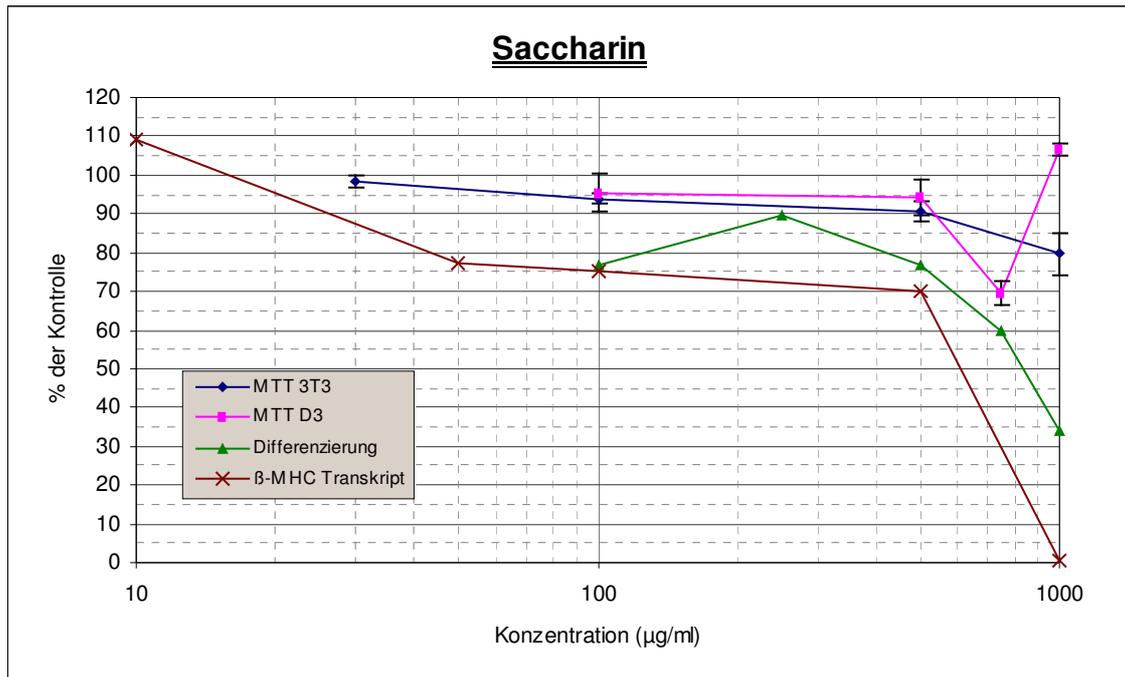


Abbildung 4.5-1: Darstellung der Wirkung von Saccharin auf D3- und 3T3-Zellen während 10- bzw. 8-tägiger Behandlung. Differenzierungshemmung (Kardiomyozytenkontraktion), Zytotoxizität und βMHC-Transkript werden im Vergleich dargestellt.

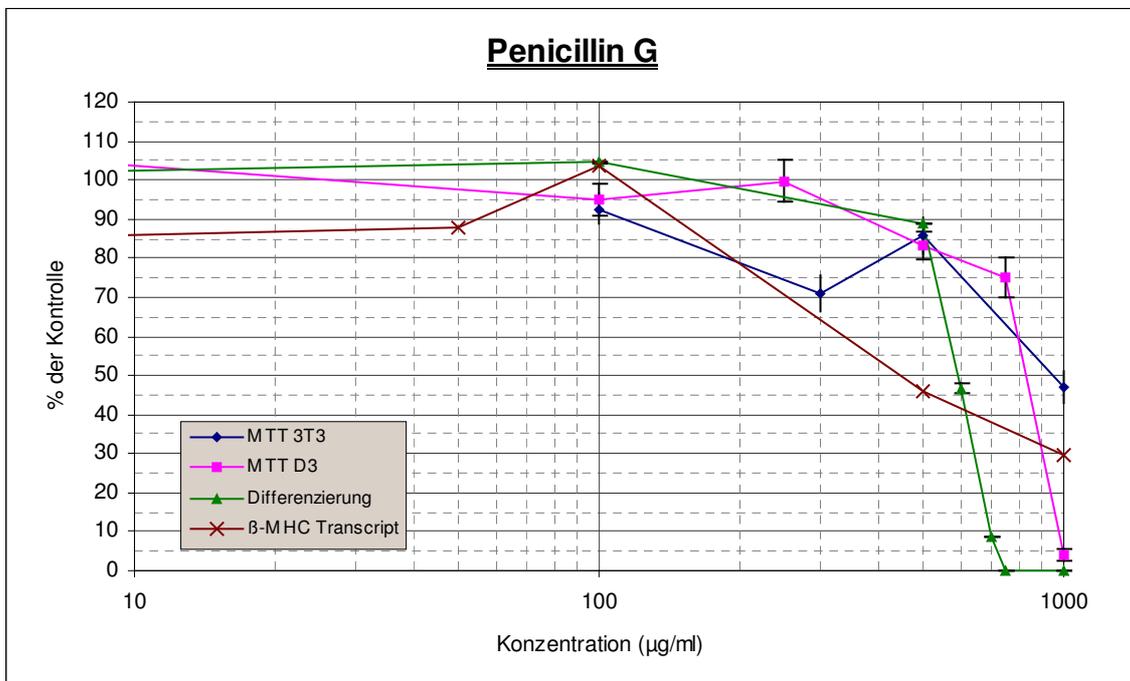


Abbildung 4.5-2: Darstellung der Wirkung von Penicillin G auf D3- und 3T3-Zellen während 10- bzw. 8-tägiger Behandlung. Differenzierungshemmung (Kardiomyozytenkontraktion), Zytotoxizität und βMHC-Transkript werden im Vergleich dargestellt.

Schwach embryotoxische Testsubstanzen

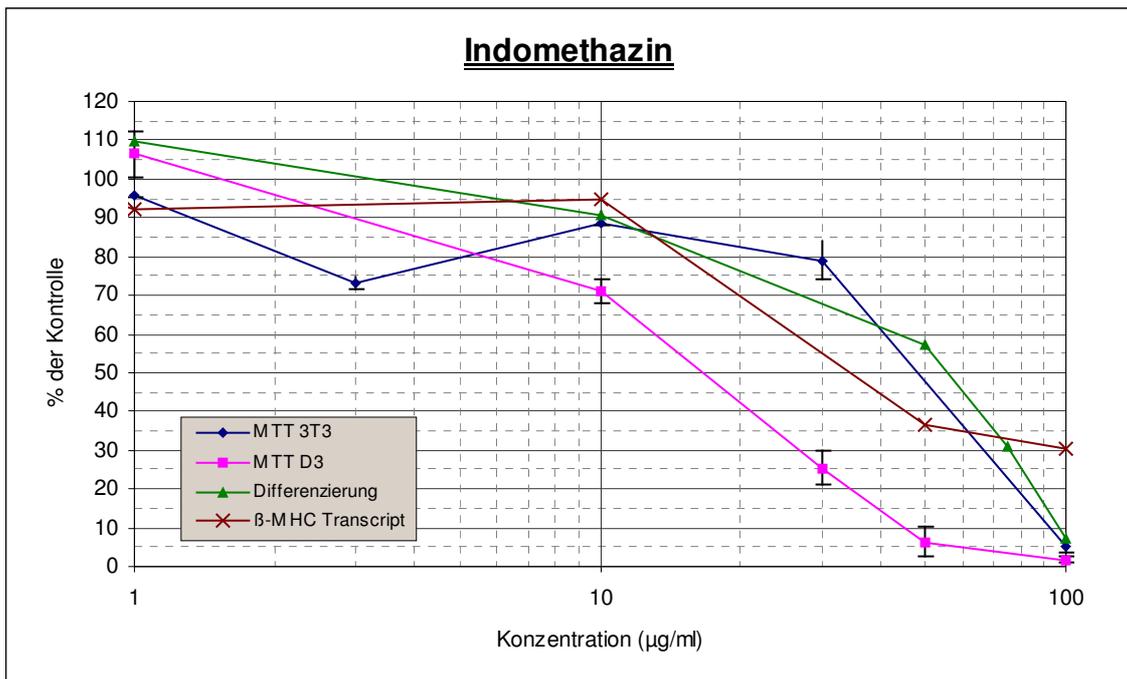


Abbildung 4.5-3: Darstellung der Wirkung von Indomethazin auf D3- und 3T3-Zellen während 10- bzw. 8-tägiger Behandlung. Differenzierungshemmung (Kardiomyozytenkontraktion), Zytotoxizität und βMHC-Transkript werden im Vergleich dargestellt.

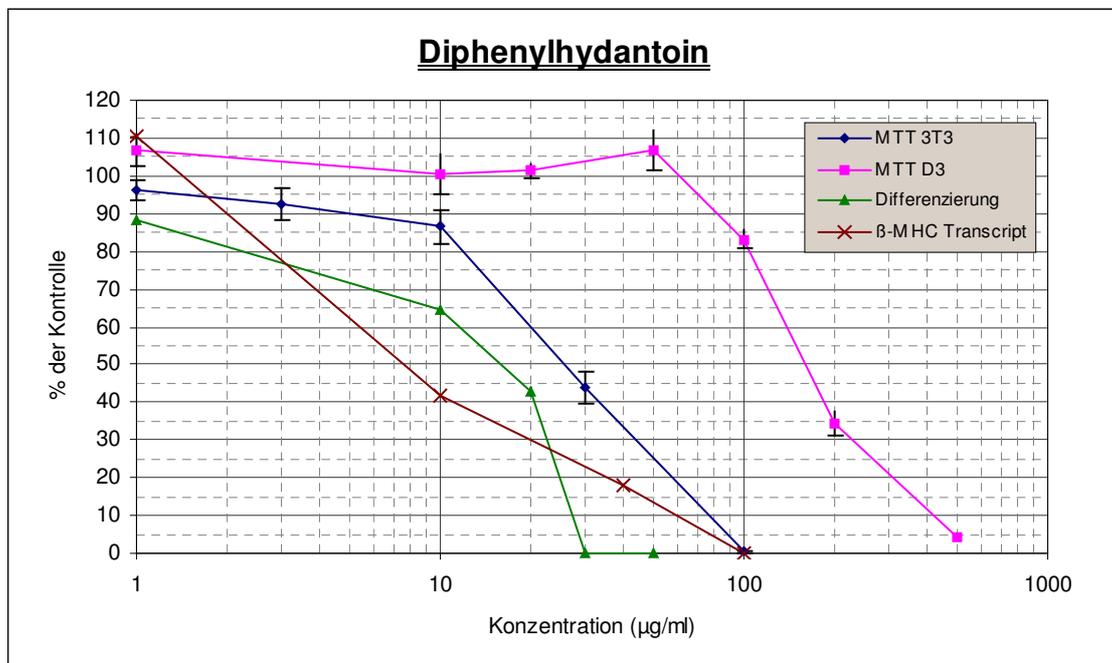


Abbildung 4.5-4: Darstellung der Wirkung von Phenytoin auf D3- und 3T3-Zellen während 10- bzw. 8-tägiger Behandlung. Differenzierungshemmung (Kardiomyozytenkontraktion), Zytotoxizität und βMHC-Transkript werden im Vergleich dargestellt.

Stark embryotoxische Testsubstanzen

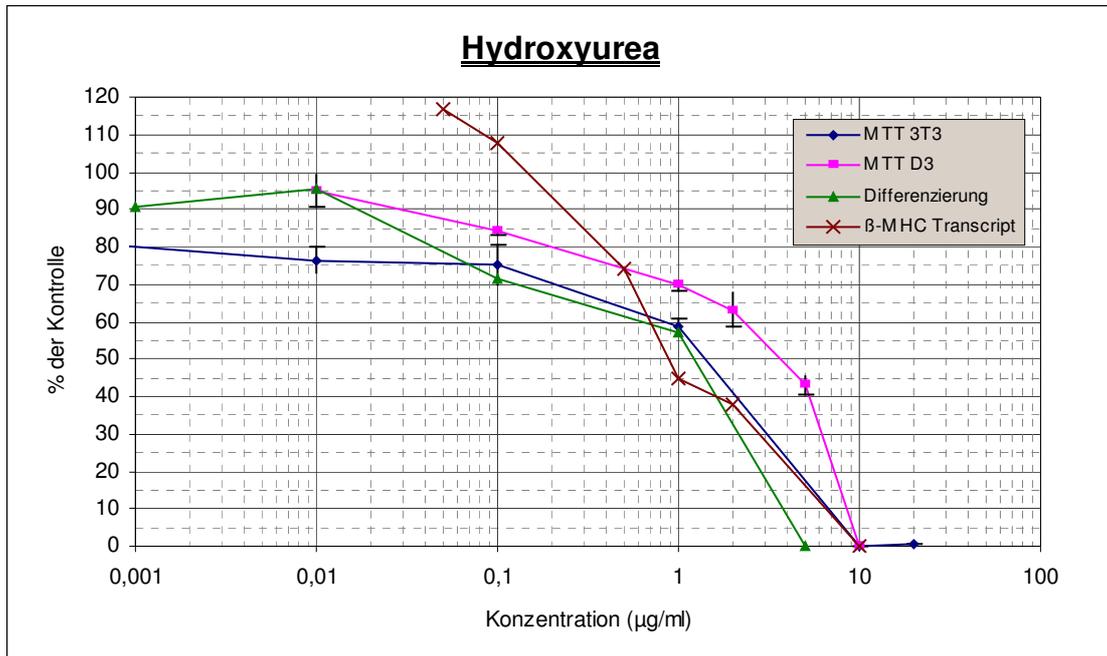


Abbildung 4.5-5: Darstellung der Wirkung von Hydroxharnstoff auf D3- und 3T3-Zellen während 10- bzw. 8-tägiger Behandlung. Differenzierungshemmung (Kardiomyozytenkontraktion), Zytotoxizität und β MHC-Transcript werden im Vergleich dargestellt

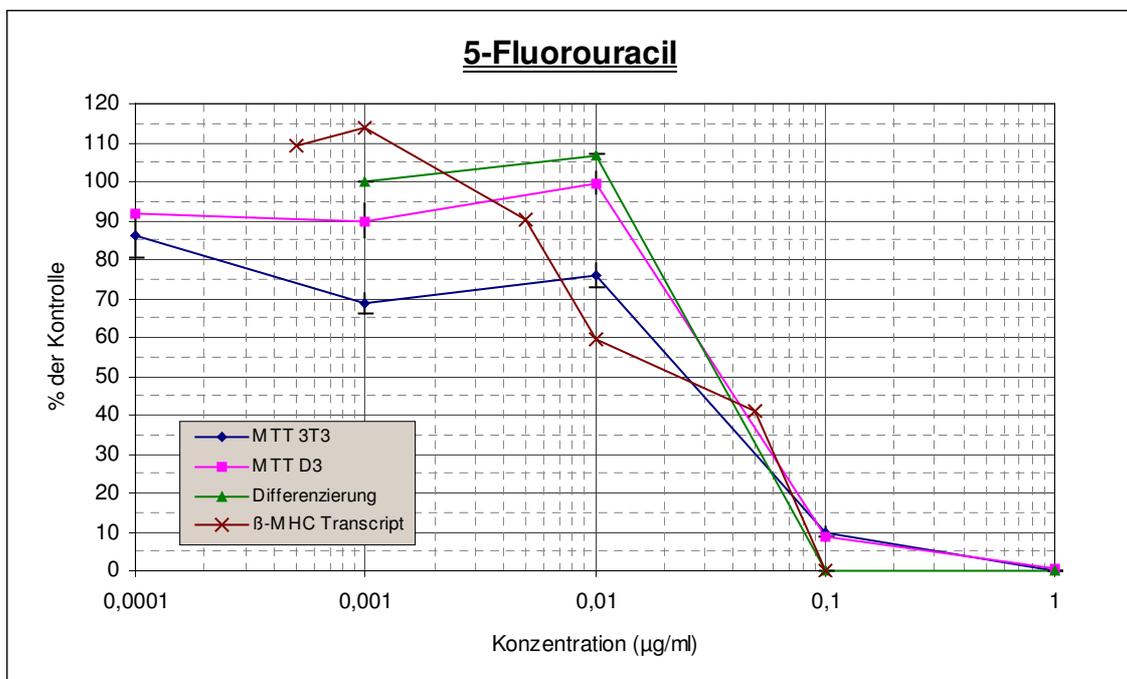


Abbildung 4.5-6: Darstellung der Wirkung von 5-Fluorouracil auf D3- und 3T3- Zellen während 10- bzw. 8-tägiger Behandlung. Differenzierungshemmung (Kardiomyozytenkontraktion), Zytotoxizität und β MHC-Transcript werden im Vergleich dargestellt.

Thalidomid

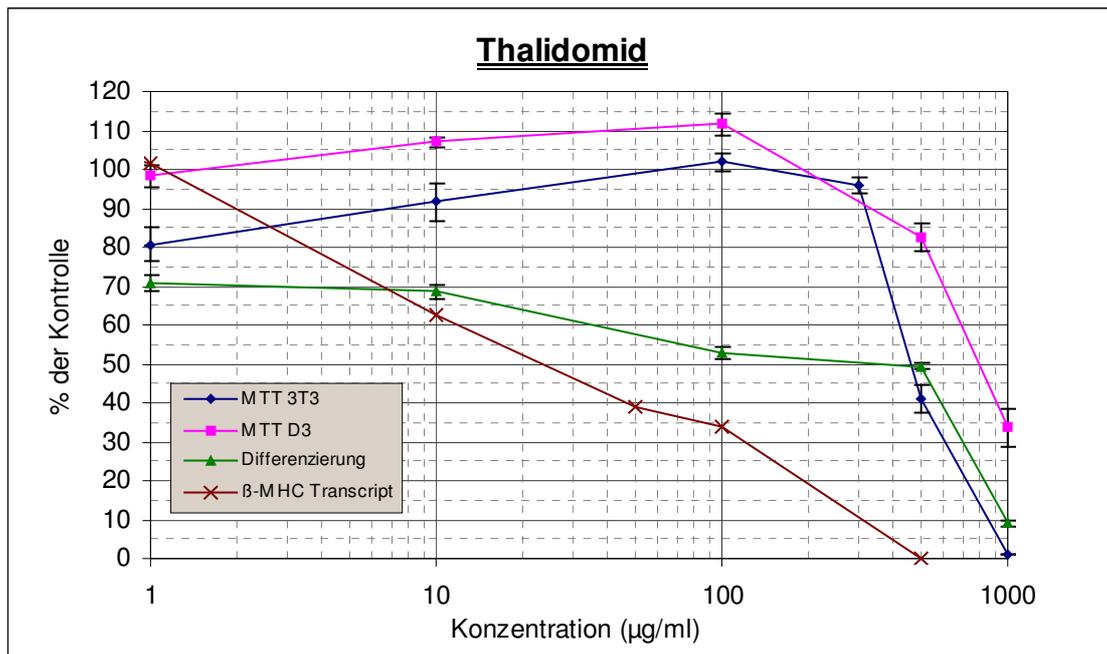


Abbildung 4.5-7: Darstellung der Wirkung von Thalidomid auf D3- und 3T3-Zellen während 10- bzw. 8-tägiger Behandlung. Differenzierungshemmung (Kardiomyozytenkontraktion), Zytotoxizität und β MHC-Transkript werden im Vergleich dargestellt.

Die Behandlung mit Thalidomid induzierte eine starke Abnahme der β -MHC Expression der kardialen Zellen eines 'Embryoid Bodies'. Die ID50 lag hier bei 25 μ g/ml im Vergleich zu 500 μ g/ml in der mikroskopischen Auswertung.

Thalidomid erwies sich bei der Messung des β -MHC Transkriptes als wesentlich stärker teratogen, als nur bei mikroskopischer Auswertung der Kontraktionen.

Bei diesem Versuch können deutliche Parallelen zu *in vivo* bekannte Daten erhoben werden: Thalidomid gilt einerseits als Medikament mit sehr geringen toxischen Nebenwirkungen beim Erwachsenen, andererseits war Thalidomid als eines der stärksten teratogenen Medikamente bekannt geworden. Zu den verursachten Missbildungen gehört unter anderem auch eine gestörte Entwicklung der Herzstruktur, die Fallot'sche Tetralogie mit Pulmonalstenose, Rechtsherzhypertrophie, Ventrikelseptumdefekt und ,reitender' Aorta.

Diese Beeinflussung der Embryoid Body Entwicklung konnte bei der rein mikroskopischen Bewertung der 'Embryoid Bodies' nicht beobachtet werden.

Wie in Abbildung 18 bis 24 dargestellt wurde, haben 6 von 7 Testsubstanzen die Expression von β MHC bereits in niedrigerer Konzentration beeinträchtigt, als sie in

Ergebnisse

vergleichbarem Ausmaß Zytotoxizität im MTT-Test verursachten. In Anbetracht der Tatsache, dass im MTT- Versuch allgemeine Toxizität gemessen wird, wohingegen in der Real-Time PCR spezifische Toxizität quantifiziert wird, war dies zu erwarten. Im Differenzierungsversuch wird wie in der Real-Time PCR spezifische Toxizität gemessen. Bei der mikroskopischen Bewertung wird allerdings nicht zwischen Embryoid Bodies mit großen schlagenden Kardiomyozytenarealen und Embryoid Bodies mit nur vereinzelt schlagenden Kardiomyozyten unterschieden. Dahingegen wird in der Real-Time PCR Analyse auf molekularer Ebene cDNA quantitativ gemessen.

Die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven zu den niedrigeren Konzentrationen zeigt, dass die Analyse der MHC Expression generell deutlich sensitiver war als die Analyse der Differenzierung unter dem Mikroskop.

Embryotoxizität <i>in vivo</i>	Testsubstanz	Zytotoxizität IC50 D3	Zytotoxizität IC50 3T3	β-MHC Expression IC50	Klassifizierung anhand MHC Expression
Nicht	Saccharin	1000	1000	600	1
	Penicillin G	820	950	450	1
Schwach	Indomethazin	16	48	55	2
	Phenytoin	150	25	7,5	2
	Thalidomid	800	450	25	2
Stark	Hydroxharnstoff	3,5	1,5	0,9	3
	5-Fluorouracil	0,035	0,026	0,025	3

Tabelle 5-1 Ergebnisse der getesteten Substanzen. Die vorläufige Klassifizierung anhand der MHC Expression erfolgte durch Anwendung des Prädiktionsmodells welches 1997 von Spielmann et al. für den EST entwickelt wurde, es muss jedoch betont werden, dass das Prädiktionsmodell adaptiert werden muss.

5 Diskussion

Zahlreiche *in vitro*, *ex vivo* und short-term *in vivo* Systeme sind immer wieder Gegenstand ausgedehnter reproduktionstoxikologischer Untersuchungen. Einige dieser Verfahren werden einerseits verwendet um Mechanismen der Teratogenese, andererseits um Alternativen zu Standard- Embryotoxizitätsversuchen an trächtigen Tieren zu erforschen. Der Nutzen dieser alternativen Versuche hängt in erster Linie von adäquaten Validierungsstufen ab. Der Hauptvorteil dieser Systeme ist, dass sie präzise Kontrolle der experimentellen Bedingungen erlauben und dass sie oft mechanistische Informationen liefern können, die durch *in vivo*-Studien nicht geboten werden könnten.

Ein neuer und vielversprechender Ansatz für ein *in vitro* Verfahren ist die Verwendung von pluripotenten Embryonalen Stammzellen als *in vitro* Modellsystem für die Embryonalentwicklung *in vivo*. Mit ihrer hohen Teilungsrate und Differenzierungsfähigkeit in eine Vielzahl von Zelltypen der 3 Keimblätter Ektoderm, Entoderm und Mesoderm ahmen sie wesentliche Schritte der frühen Embryonalentwicklung nach. Ähnlich wie bei der Embryonalentwicklung *in vivo* kann bei den hier durchgeführten Versuchen als erste Muskelentwicklung die Differenzierung zu spontan rhythmisch pulsierenden Herzmuskelzellen beobachtet werden.

Vorteilhaft ist, dass Embryonale Stammzellen als permanente Zelllinie erhältlich sind. Diese Zellen können also vermehrt oder nach Bedarf eingefroren werden. Weiterer Vorteil ist, dass sie ein weitgehend uniformes Differenzierungsstadium liefern und in diesem Differenzierungsstadium durch spezifische Kulturmethoden gehalten werden können.

Aus diesem Grund kann der EST einerseits zur Erforschung zellulärer Prozesse der frühen Embryogenese, andererseits zur pharmakologischen Forschung – beispielsweise zur Einstufung neuer Testsubstanzen in bezug auf ihr embryotoxisches Potential - verwendet werden.

5.1 Validierung der Testsubstanzen nach dem Modell des Embryonalen Stammzell Tests (EST). Vergleich mit *in vivo* bekannten Daten.

Vor dem Hintergrund bestehender Prävalidierungsversuche von ZEBET/BgVV wurde der Embryonale Stammzelltest etabliert.

Versuche mit den Embryonalen Stammzellen D3 zeigten, dass die Anzahl der jeweiligen Passage entscheidenden Einfluss auf die spätere Differenzierung hatte.

Die Zellen wurden nur von Passage 6 bis 18 für die Differenzierungsversuche eingesetzt. Danach reduzierte sich die Entwicklungsfähigkeit und es reduzierten sich die kontrahierenden Areale in den Kontrollversuchen. Generell zeigte sich, dass die Differenzierungsfähigkeit der Zellen hoch empfindlich für äußere Einflüsse war. Eine zu hohe Passagenzahl oder große Temperatur- oder CO₂-Schwankungen resultierten in verminderter Wahrscheinlichkeit der Ausdifferenzierung zu kontrahierenden Kardiomyozyten. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass 14 von 16 Testsubstanzen in die gleiche Embryotoxizitätsklasse eingeordnet wurden wie in den Prävalidierungsversuchen. (tab.5.1-1)

Der EST zeigte kein embryotoxisches Potential für die Testsubstanzen Saccharin, Penicillin G, Isoniazid und Ascorbinsäure. Auch *in vivo* sind für diese Testsubstanzen weder beim Menschen noch im Tierversuch embryotoxische Auswirkungen bekannt. Zusätzlich eingeteilt in die Gruppe der nicht embryotoxischen Testsubstanzen wurde - anders als bei Spielmann et al (1997) – die Testsubstanz Acetylsalicylsäure. *In vivo* zeigte sich, dass Acetylsalicylsäure in hoher Konzentration bei Ratten, Mäusen, Katzen und Hunden zu Wachstumsstörungen im Sinne von Kopfdysmorphien, Nonokklusion des Neuralrohres sowie Fehlen von Extremitätenknospen führt. Beim Menschen ist nach Einnahme während der Schwangerschaft nur ein gehäuftes Auftreten eines vorzeitig verschlossenen Ductus arteriosus Botalli dokumentiert (s.S.13). Bei Betrachtung der Dosis-Wirkungskurven des EST (s.S.49) zeigt sich auch hier ein Rückgang der Kardiomyozytenareale in den hohen Substanzkonzentrationen. Dieser Abfall ist jedoch nicht so ausgeprägt, dass nach Eingabe der Endpunkte im Prädiktionsmodell eine Einteilung in die schwach embryotoxische Gruppe der Testsubstanzen erfolgt. Es liegt demnach ein falsch negatives Ergebnis für diese Testsubstanz vor.

In der Gruppe der schwach embryotoxischen Testsubstanzen wurden Coffein, welches *in vivo* hochdosiert zu Störungen in der Ausbildung des Nervensystems führt

Diskussion

(s.S.14), Indomethazin, das ähnlich wie Acetylsalicylsäure einen vorzeitigen Verschluss des Ductus arteriosus Botalli bewirken kann (s.S.15), und Phenytoin welches beim Neugeborenen zu dem spezifischen Phenytoin-Syndrom (s.S.15) führt, korrekt eingeteilt. Ebenso korrekt bewertet wurden Dexamethason, welches gelegentlich zu Malformationen des Schädels führen kann (s.S.16), und Diphenhydramin, das in hohen Konzentrationen im Tierversuch (nicht jedoch beim Menschen) zu Entwicklungsstörungen führte (s.S.17). Falsch negativ wurde zusätzlich in diese Gruppe die Testsubstanz Busulfan, bei der es sich um ein *in vivo* bekanntes potentes Teratogen handelt, eingeteilt. Im Tierversuch hatte sich bereits in niedriger Konzentration gezeigt, dass Busulfan Wachstumsstörungen im Sinne von Skelett und Extremitätdefekten induzierte. Für den Menschen liegen aufgrund der nur akzidentellen Einnahme von Busulfan während der Schwangerschaft außer Einzelfallberichten keine verwertbaren Daten vor. Gleiches gilt auch für die *in vivo* nur aus Tierversuchen bekannten hoch embryotoxischen Testsubstanzen Hydroxyharnstoff, Methotrexat, 5-Fluoruracil, Cytosinarabinosid und Retinolsäure. Neben den letalen Auswirkungen zeigten diese Substanzen ein weites Spektrum von Missbildungen in der neuronalen und skeletalen Entwicklung und bewirken darüber hinaus Schädigungen der inneren Organe (s.S.17-21). Diese Testsubstanzen, deren hohes embryotoxisches und teratogenes Potential aus Tierversuchen bekannt ist, wurden im EST korrekt klassifiziert.

Am Beispiel der Retinolsäure kann demonstriert werden, dass mit Hilfe des EST eine Unterscheidung zwischen teratogenen und embryotoxischen Effekten möglich ist. Teratogene Substanzen zeigen im Vergleich der **Zytotoxizität** (gemessen durch MTT Versuch) und der **Differenzierungshemmung** (gemessen im Differenzierungsversuch) niedrigere Werte für den Endpunkt Differenzierungshemmung als für die Zytotoxizität. Dies trifft am deutlichsten für die Testsubstanz Retinolsäure, aber auch für die Testsubstanzen Hydroxyurea, Phenytoin und Diphenhydramin zu. Hier ist davon auszugehen, dass die Reduktion der kontrahierenden Areale auf spezifischen teratogenen Effekten beruht und nicht durch die allgemeine Toxizität verursacht wurde. (s.Abb. 5.1-1)

Schwach embryotoxische Testsubstanzen wie Coffein und Dexamethason jedoch weisen ähnliche Werte für allgemeine Zytotoxizität (MTT-Test) und Differenzierungshemmung (Differenzierungsversuch) auf. In diesen Fällen ist es wahrscheinlich, dass

Diskussion

die Reduktion kontrahierender Areale in den höchsten Konzentrationen durch die allgemeine Toxizität hervorgerufen wurde.

Dies trifft auch auf die embryotoxischen Substanzen Methotrexat, 5- Fluoruracil, und Cytosinarabinosid zu.(s.Abb.5.1-1)

Nur bei Indomethazin war der IC 50 Wert für D3 Zellen niedriger als der ID50 Wert. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass fetotoxische Effekte von Indomethazin *in vivo* erst bei Applikation im 2. oder 3. Trimester der Schwangerschaft entstehen. Indomethazin hat keinen Einfluss auf die frühe Embryonalentwicklung, wie sie im EST repräsentiert wird. Darüberhinaus bewirkt Indomethazin im Tierversuch eher Defekte in der Skelettentwicklung und zeigt keine Effekte auf die Entwicklung des Herz-Kreislaufsystems.

Es ist also mit dem EST möglich, zwischen teratogenem und embryotoxischem Effekt der Testsubstanzen zu unterscheiden. Diese Unterscheidung kann allerdings nur bei direktem Vergleich der Dosis-Wirkungskurven der jeweiligen Testsubstanzen getroffen werden. Bei der Berechnung im Prädiktionsmodell erfolgt dann nur noch eine Einteilung in die drei Embryotoxizitätsklassen, eine Unterscheidung zwischen primär toxischem und primär teratogenem Potential der Testsubstanzen wird hier nicht mehr durchgeführt.

Bei Einsatz als Routinescreeningverfahren ist davon auszugehen, dass gelegentlich Testsubstanzen in die falsche Embryotoxizitätsgruppe eingeordnet werden. Bei falsch negativen Ergebnissen, d.h. bei Testsubstanzen deren embryotoxisches Potential falsch zu hoch eingeschätzt wurde, hätte dies zur Folge, dass möglicherweise vielversprechende Substanzen nicht weiterentwickelt werden und für eine mögliche Anwendung verloren gehen. Der Schaden liegt hierbei in der Industrie. Die Möglichkeit von falsch positiven Ergebnissen, d.h. Testsubstanzen deren embryotoxisches Potential im EST nicht erkannt oder zu niedrig eingestuft wurde, legt die Notwendigkeit einer weiteren Testung der vielversprechenden Substanzen im Tierversuch nahe. Nur so kann die Sicherheit für die therapeutische Anwendung erhöht werden und Schaden für Menschen und Tiere vermieden werden. An dieser Stelle wird deutlich, dass der EST zwar geeignet ist die Zahl von Tierversuchen zu reduzieren, diese jedoch nicht vollständig ersetzen kann.

Testsubstanz	Eigene Ergebnisse				Ergebnisse ZEBET/ BgVV				
	MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Klassifikation im Prädiktionsmodell	MTT D3 IC50 (µg/ml)	MTT 3T3 IC50 (µg/ml)	ID50 (µg/ml)	Klassifikation im Prädiktionsmodell	
Saccharin	1000	1000	820	1	3489	300	2000	1	
Penicillin G	810	940	600	1	2950	1586	3450	1	
Isoniazid	1000	210	430	1	750	375	360	1	
ASS	280	150	240	1	220	230	248	2	
Ascorbinsäure	180	52	150	1	138	25,5	408	1	
Coffein	130	150	200	2	165	155	185	2	
Indomethazin	16	48	56	2	29	27	66	2	
Phenytoin	160	25	16	2	27,3	35	20	2	
Dexamethason	25	64	14	2	23	26	18,3	2	
Busulfan	2,5	1,75	5,3	2	2,1	4,8	4,6	3	
Diphenhydramin	14	40	3,4	2	29,5	30	6,7	2	
Hydroxyharnstoff	3,4	1,4	1,2	3	2	7,2	1,7	3	
Methotrexat	0,0035	0,025	0,071	3	0,074	0,015	0,02	3	
5-Fluoruracil	0,035	0,025	0,035	3	0,103	0,17	0,0289	3	
Cytosinarabinosid	0,035	0,075	0,3	3	0,024	0,033	0,029	3	
Retinolsäure	0,001	1,2	0,000026	3	0,005	1	0,000105	3	

Tabelle 5.1-1 Vergleich der Ergebnisse von Zebet/BgVV mit eigenen Ergebnissen. Bei den dargestellten Werten (µg/ml) handelt es sich um Mittelwerte (n ≥ 3)

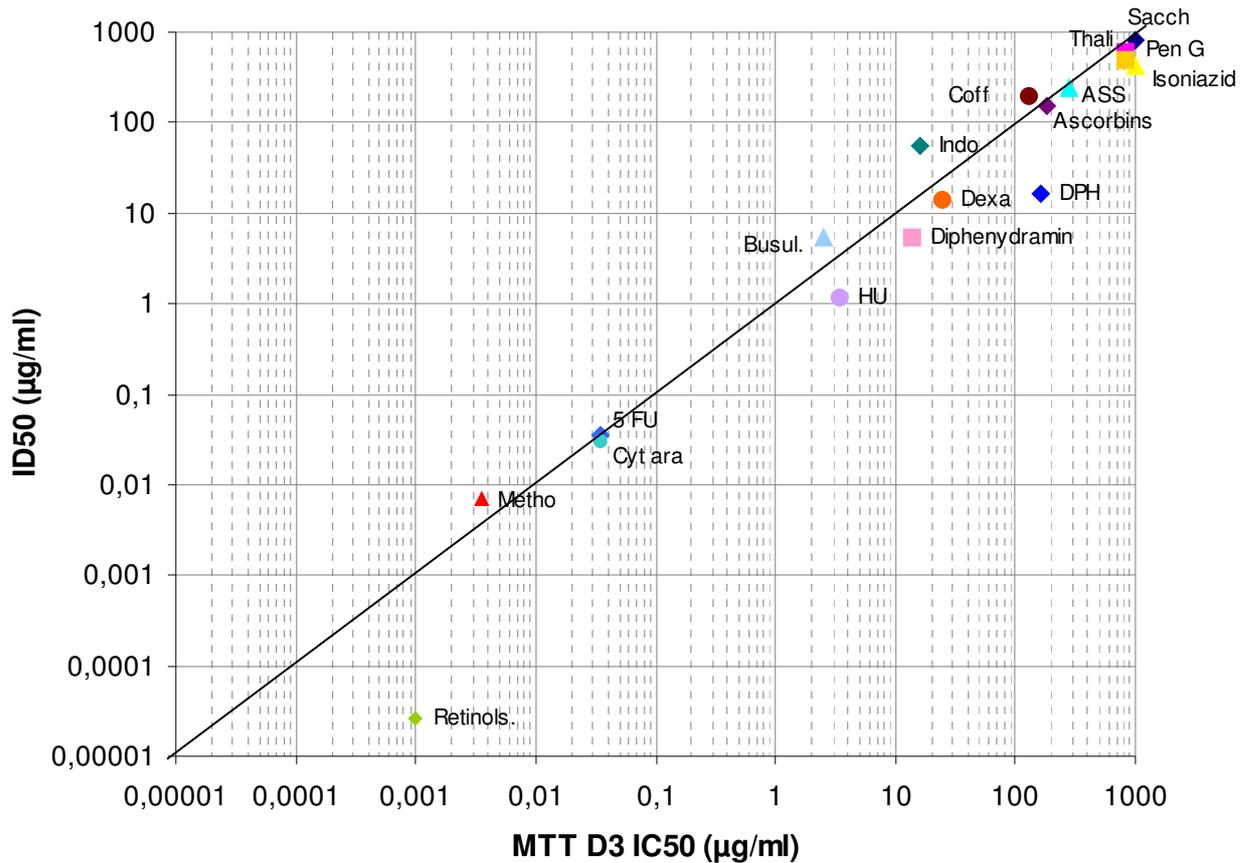


Abbildung 5.1-1 Relation zwischen IC 50 Werten der Embryonalen Stammzellen, gemessen durch MTT-Versuch, und ID 50 Werten (Differenzierungshemmung), ermittelt durch mikroskopische Auswertung. Bei Testsubstanzen, die auf oder in unmittelbarer Nähe der Geraden liegen, wird die Hemmung der Ausbildung von Kardiomyozyten eher durch zytotoxische Wirkung verursacht. ($IC_{50} D3 \approx ID_{50}$) Beispiel: 5-Fluorouracil
 Testsubstanzen, die unterhalb der Geraden liegen, wie z.B. Retinolsäure verursachen die verminderte Ausbildung kontrahierender Kardiomyozyten eher durch teratogene Wirkung. ($IC_{50} D3 \geq ID_{50}$)

Thalidomid

Während sich die bisherigen Versuche einzig auf die Validierung von Substanzen, deren teratogenes Potential *in vitro* vorher bekannt war, bezog, sollte im Folgenden auch das embryotoxische Potential einer nicht schon in Prävalidierungsstudien getesteten Substanz untersucht werden. Hierzu wurde die *in vivo* als teratogen bekannte Substanz Thalidomid gewählt.

Thalidomid wirkte auf ausdifferenzierte Fibroblasten und auf die embryonalen Zellen nur gering toxisch. Auch *in vivo* sind nach Einnahme des Medikamentes beim Erwachsenen kaum toxische Nebenwirkungen aufgetreten. Insofern wird das Verhalten der Substanz *in vitro* hier richtig wiedergegeben.

Diskussion

Das embryotoxische Potential entspricht nach Testung im Embryonalen Stammzell Test den Werten der nicht embryotoxischen Testsubstanzen, wie beispielsweise Isoniazid. Auch *in vivo* konnten an Mäuseembryonen keine embryotoxischen Effekte beobachtet werden. Auch in diesem Fall wird im Vergleich mit den *in vivo* Daten das embryotoxische Potential der Substanz korrekt wiedergegeben.

Die teratogene Auswirkungen von Thalidomid konnten nur an einigen höheren Vertebraten beobachtet werden. Dies wird im Screening der Substanz durch den ursprünglichen EST zunächst **nicht** deutlich. Erst die Messung des β -MHC Transkriptes mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR zeigte die Teratogenität der Substanz

Grenzen des EST

Ein Nachteil des Embryonalen Stammzell Test bestand darin, dass der Metabolismus dem die Substanzen *in vivo* unterliegen, hier keinen Einfluss auf die Testsubstanzen hat. Einmal abgesehen vom Arzneimittelstoffwechsel der Mutter wird auch der Stoffwechsel der Plazenta und des Embryos bzw. des Feten nicht berücksichtigt.

Es ist bekannt, dass fast alle chemischen Stoffe bzw. ihre Metabolite den fetalen Kreislauf erreichen. Bei vielen Medikamenten wurden Konzentrationen im Feten gemessen, die zwischen 20%-80% der mütterlichen Konzentration betragen. Dieser Konzentrationsabfall ist nicht auf die Plazentaschranke zurückzuführen, sondern auf den Arzneimittelstoffwechsel in der Plazenta und eventuell auch im Feten (Szeto,1982; Juchau,1989). Die für die Oxidation körperfremder Substanzen wichtigen Enzymsysteme (z.B. Cytochrom P-450) sind in Leber (Yaffe et al.,1970) und Plazenta (Meigs und Ryan, 1968) menschlicher Feten nachweisbar, wenngleich ihre Aktivität im Vergleich zur mütterlichen Leber geringer ist. (Spielmann et al., 1992) Arzneimittel und andere Fremdstoffe können in der Plazenta die Synthese von Hormonen und anderen für die Entwicklung des Embryo wichtigen Stoffen beeinträchtigen. Da die Enzyme der fetoplazentaren Einheit auch die Synthese toxischer Stoffwechselprodukte katalysieren und da die meisten polaren -d.h. wasserlöslichen- Metabolite die Membranen der Plazenta auch in fetomaternaler Richtung nur schwer passieren, kann die Aktivität dieser Enzyme zu einer Kumulation toxischer Metabolite im Feten führen. Darüberhinaus werden Arzneimittel, die in den fetalen Urin gelangen, in der Amnionflüssigkeit angereichert. Diese Stoffe können durch erneutes Schlucken von Fruchtwasser in den Kreislauf

Diskussion

des Feten gelangen und auf diese Weise ebenfalls zu einer Akkumulation führen. (Spielmann, 1992)

Von besonderer Bedeutung für die Charakterisierung des embryotoxischen Potentials einer Testsubstanz ist darüber hinaus das Entwicklungsstadium, das zum Zeitpunkt der Einwirkung erreicht worden ist. Die Sensibilität ist dann am größten, wenn die Organisation am raschesten fortschreitet, sie nimmt ab, wenn die Reifungsprozesse einzusetzen beginnen. Deshalb betreffen die empfindlichen Perioden im allgemeinen die eigentliche Embryonalentwicklung, sie können aber auch viel spätere Zeitabschnitte umfassen.

Bevor eine Differenzierung einsetzt, ist der Embryo wahrscheinlich gegen manche schädigenden Einwirkungen unempfindlich, hingegen kann eine genügend hohe Dosis zum Absterben des Keimes führen. Nachdem die Organogenese begonnen hat, können leicht Missbildungen spezifischer Organe und Systeme auftreten; sie reflektieren die speziellen Empfindlichkeiten und Bedürfnisse der sich rasch differenzierenden und wachsenden Gewebe. Mit dem Fortgang der Organentwicklung nimmt die Sensibilität wieder ab. In der Fetalperiode, in der Wachstum, Histogenese und funktionelle Reifung wichtig sind, können als Störungen Wachstumsrückstand, strukturelle Defekte in den Geweben oder Störungen funktioneller Art auftreten.

Diese Aspekte werden im Embryonalen Stammzelltest **nicht** repräsentiert.

Es ist nicht möglich, zeitliche Faktoren, die für die Beurteilung und Beschreibung der embryotoxischen Potenz der Substanzen eine nicht unerhebliche Rolle spielen, hier in die Bewertung mit einfließen zu lassen.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der berücksichtigt werden muss, ist die Tatsache, dass im EST bisher nur die Entwicklung der Stammzellen zu Kardiomyozyten bewertet wird, und auch nur ein sehr früher Abschnitt der Embryonalentwicklung in Ansätzen dargestellt wird. Auch wenn es sich bei früheren Abschnitten der Entwicklung im Allgemeinen um die empfindlicheren handelt, gibt es auch Testsubstanzen, die erst während späterer Entwicklungsabschnitte ihr fruchtschädigendes Potential entfalten. (z.B. Indomethazin)

Vor dem Hintergrund dieser Problematik wird die eingeschränkte Aussagekraft des Embryonalen Stammzell Tests deutlich. Es ist jedoch nicht von der Hand zu weisen, dass eindeutige Übereinstimmungen mit den hier *in vitro* gefundenen Ergebnissen und aus der Literatur beschriebenen *in vivo* Ergebnissen dargestellt werden konnten.

Diskussion

Es können durch den EST selbstverständlich keine endgültigen Aussagen über pränataltoxische Effekte neuer Substanzen sicher getroffen werden, d.h. die Aussagefähigkeit trifft aus den oben genannten Gründen rasch auf Grenzen.

Im Rahmen einer Vorselektierung kann und sollte der EST als *in vitro* Screeningmethode im Ersatz für *in vivo* Versuche an trächtigen Tieren eingesetzt werden. Substanzen, die sich im EST als embryotoxisch erwiesen, können von weiterer Entwicklung ausgeschlossen werden. Dadurch können vielversprechende neue Substanzen frühzeitig selektiert werden, die dann zur weiteren Prüfung Tierversuchen unterzogen werden müssen.

5.2 Etablierung neuer Endpunkte in der Embryotoxizitätsmessung

Während der Auswertung des Differenzierungsversuches zeigten sich Nachteile durch die Beurteilung der kontrahierenden Areale allein durch mikroskopische Bewertung: Hierbei konnte nicht die Größe der kontrahierenden Areale bestimmt werden, es wurde nur festgestellt, ob ein Embryoid Body Kontraktionen aufwies oder nicht. Dabei wurde nicht bewertet, ob jeweils nur eine Zelle oder viele Zellen kontrahierten.

Im Hinblick auf diese Problematik sollten die folgenden Untersuchungen dazu dienen den EST weiterzuentwickeln und die Auswertung zu optimieren.

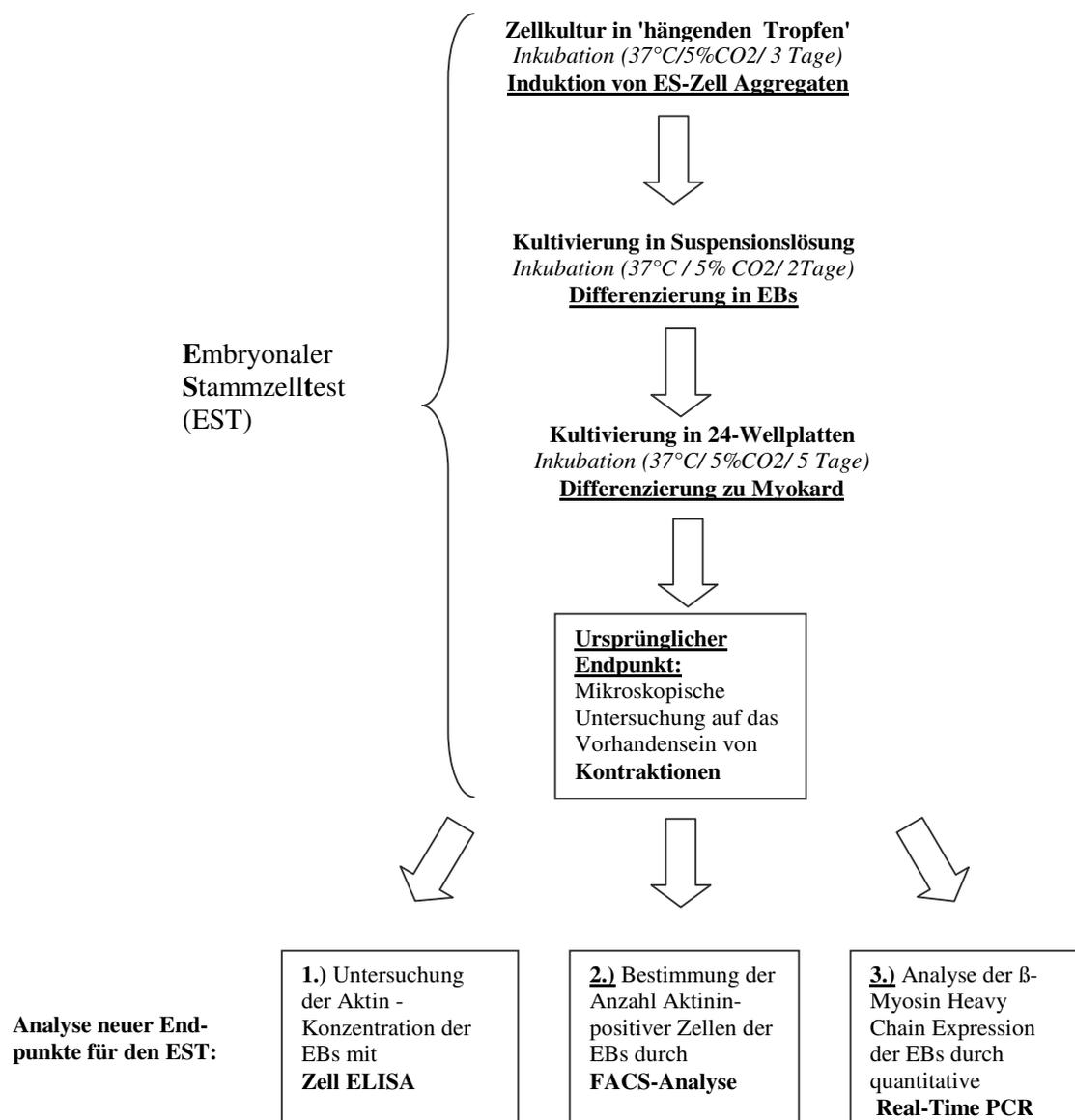


Abbildung 5.1-2: Schematische Darstellung des Differenzierungsversuches des Embryonalen Stammzelltests mit Alternativen für mögliche Endpunkte

5.2.1 Endpunkt 1: Analyse der `Embryoid Bodies` durch Zell-ELISA an Tag 10 der Differenzierung

In der Entwicklung der `Embryoid Bodies` ist alpha-Aktin der erste Marker der Herzzellentwicklung. (Gurdon et al., 1989) Die Analyse der α -Aktin Expression erfolgte in den vorliegenden Versuchen an Tag 10 der Differenzierung im Embryoid Body.

Die Messung der Aktin Expression im Embryoid Body zur Bestimmung des Einflusses der beiden Testsubstanzen Penicillin G und 5-Fluoruracil auf die Entwicklung erbrachte folgende Ergebnisse:

Es fand sich bei beiden Substanzen eine dosisabhängige Abnahme der Aktin Expression im Embryoid Body. In der höchsten eingesetzten Penicillin G Konzentration waren mikroskopisch nur noch in 10% der Embryoid Bodies Kontraktionen zu verzeichnen. Trotzdem lag die Aktin Konzentration noch bei über 50% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. (s.Abb.4.3-1) Ähnliches konnte auch bei der Testsubstanz 5-Fluorouracil beobachtet werden. (s.Abb.4.3-2) Hier wiesen in der höchsten eingesetzten Dosis von 0.1 μ g/ml keine der `Embryoid Bodies` kontrahierende Areale mehr auf. Hingegen lag die Aktinkonzentration noch bei 30% in bezug auf die Kontrolle, jedoch zeigte die mittlere Konzentration im ELISA im Gegensatz zur mikroskopischen Auswertung bereits eine Verminderung an.

Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist, dass einzelne, nur langsam oder minimal kontrahierende Zellen im Mikroskop nicht gesehen wurden.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit ist, dass sich im Embryoid Body zwar noch Kardiomyozyten ausbilden, in denen Aktin vorhanden ist, die aber aufgrund anderer schädigender Mechanismen die Fähigkeit zur Kontraktion verloren haben. In der Literatur beschrieben sind Untersuchungen über einzelne Defekte wie z.B. Tropomodulin 1-Defizienz (Fritz-Six et al., 2003) oder Defekte im Dystrophin Gen (Meng et al., 1996), die zwar die Ausbildung von kontraktile Filamenten nicht beeinträchtigen, aber eine normale Kontraktilität unmöglich machen. Ähnliches könnte auch hier vorliegen.

Nicht zu vergessen ist auch eine möglicherweise unspezifische Bindung des Antikörpers; d.h. die höheren Werte könnten nicht durch Anfärbung von Herzmuskelzellen, sondern durch Färbung skeletaler Muskelzellen bedingt sein.

Nachteilig bei den hier beschriebenen Versuchen waren in erster Linie die hohen Kosten, die durch hohen Antikörperverbrauch verursacht wurden. Bei einem Einsatz

Diskussion

als Screeningmethode mit hohem Durchsatz wäre dies ein bedeutender negativer Faktor. Zu erwähnen ist auch die nicht absolute Herzspezifität des Antikörpers. Prinzipiell wird hier nicht allein die Entwicklung von Herzmuskelzellen, sondern auch die Entwicklung skeletaler Muskeln quantifiziert. Da die Entwicklung von Herzmuskelzellen *in vivo* wie auch *in vitro* vor der Entwicklung der Skelettmuskulatur einsetzt und hier sehr frühe Entwicklungsstadien untersucht werden, ist eine Bindung an Skelettmuskelzellen jedoch unwahrscheinlich: *In vivo* wird **kardiales** Aktin bei Embryonen der Maus erstmals an Tag 7,5-7,8 in allen Somiten exprimiert. Genauere Untersuchungen zur Differenzierung **skeletaler** Muskelzellen im *Embryoid Body* wurden von Rhowedel et al (1994) beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass spezifische Gene für die Muskelentwicklung (*myf5*, *myogenin*, *myoD*, und *myf6*) in der gleichen zeitlichen Abfolge aktiviert werden wie *in vivo*. Alpha-skeletales Aktin, ein strukturelles muskelspezifisches Protein, werden zeitgleich mit ersten Myogenintranskripten gefunden. (Lyons et al., 1990) Bei der BLC6 Zelllinie, einer anderen Zelllinie aus Embryonalen Stammzellen, die ebenfalls aus der Blastozyste gewonnen werden, konnten die ersten Myogenin Transkripte im Embryoid Body an Tag 11 gefunden werden. Zu berücksichtigen bleibt aber, dass im Vergleich zu den hier eingesetzten D3 Zellen die BLC6 Zellen sich hauptsächlich in Nervenzellen und Muskelzellen differenzieren, aber keine Kardiomyozytenareale ausbilden. Die bei Rhowedel et al (1994) untersuchten Embryoid Bodies wurden, um eine möglichst hohe Zahl skeletaler Muskelzellen auszubilden, 5 Tage in Suspension gehalten (hier nur 2) und darüber hinaus mit DCC-FCS Mediumzusatz (van den Eijnden-van Raaij et al.1991) kultiviert. Im Kontext der Untersuchungsergebnisse bedeutet dies, dass erste skeletale Aktin-Transkripte an Tag 11 der Entwicklung im Embryoid Body erscheinen, die hier durchgeführten Messungen aber mit an Tag 10 fixierten Embryoid Bodies erfolgten.

Ein weiterer wesentlicher Nachteil bei diesem Versuch, der mit den adhärennten Embryoid Bodies durchgeführt wird, ist dass die Zellzahl nicht einberechnet werden kann. Bei vielen Testsubstanzen, insbesondere solchen mit einem hohen toxischen Potential wie 5-Fluorouracil, kam es zu einer Abnahme von Zellzahl und Größe im Embryoid Body. Diese Veränderungen müssen prinzipiell mit dem Endergebnis verrechnet werden. Da eine Zellzählung der adhärennten, in Haufen angeordneten Zellen jedoch nicht möglich ist, kann nicht differenziert werden, ob eine erniedrigte

Fluoreszenzintensität durch eine erniedrigten Gesamtzellzahl oder eine erniedrigte Anzahl von Aktin positiven Zellen bedingt ist.

5.2.2 Endpunkt 2: Durchflusszytometrische Untersuchung der 'Embryoid Bodies' an Tag 10 der Differenzierung

Durch die FACS Analyse ist es möglich die Zellzahl positiver gefärbter Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl zu bestimmen und gleichzeitig Informationen über das Expressionslevel in einzelnen Zellen zu bekommen, was beim Zell ELISA nicht möglich ist.

Während der Embryonalentwicklung erfolgt die Expression gewebespezifischer Gene und die Ausbildung typischer Strukturproteine und Rezeptoren in einem zeitlich abgestimmten Programm. Herzspezifische Proteine des Sarkomerapparates, d.h. der kontraktile Grundeinheit einer Muskelfaser wie α -sarcomeric Aktinin und Myosin, werden strukturell organisiert und physiologische Eigenschaften wie herzspezifische Aktionspotentiale und Ionenkanäle in einem charakteristischen zeitlichen Muster ausgeprägt. (Hescheler et al., 1997)

Für die hier vorliegenden Versuche wurde das muskelspezifische Protein α -sarcomeric Aktinin als Antigen gewählt. Es wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper, der ein reproduzierbares und quantitativ standardisierbares Signal in der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie ergab, identifiziert: Monoklonal Anti α -Actinin (Sarcomeric) Klon EA-53 (Goncharova et al., 1992)

Dieser Antikörper erkennt spezifisch α -Aktinin der Z-Bande in Skelett- und Herzmuskeln. Nicht sarkomere Muskelemente wie Bindegewebe, Epithel, Nerven oder glatte Muskulatur werden nicht erkannt. Da sich die Herzmuskelzellen im Verlauf der Differenzierung vor den Skelettmuskelzellen entwickeln (Guan et al., 1999, s.o.), und im Mikroskop zum Zeitpunkt, an dem die FACSanalyse durchgeführt wurde, die Kontraktionen der Herzmuskelzellen sichtbar waren, ist davon auszugehen, dass durch den Antikörper größtenteils Herzmuskelzellen angefärbt und analysiert wurden.

Als positive Testsubstanz mit einem hohen embryotoxischen Potential kam 5-Fluorouracil, welches während der Embryonalentwicklung vorwiegend Missbildungen

Diskussion

an Extremitäten und zahlreiche viszerale Defekte auslöst, zum Einsatz. Penicillin G wurde als negative Kontrollsubstanz verwendet.

Die Zellen differenzierten nach dem ursprünglichen standardisierten Testprotokoll für den Embryonalen Stammzelltest. Zur Weiterentwicklung des Verfahrens wurden verschiedene Versuchsprotokolle zur Färbung der Zellen ausgetestet. Die Methode, bei der keine unspezifischen Bindungen in der Negativkontrolle auftraten (s. 2.8), wurde zur Analyse des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen im FACS angewandt.

Die Analyse der unbehandelten Kontrollzellen mit Hilfe des Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS) ergab 17 % Aktinin positive Zellen pro 10000 gemessener Zellen. Die Analyse der mit Penicillin G, wie auch der mit 5-Fluorouracil behandelten Embryonalen Stammzellen ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion der Aktinin Expression.

Bei der Konzentration 500µg Penicillin/ml war auffällig, dass nach mikroskopischer Inspektion 24 von 24 der 'Embryoid Bodies' kontrahierende Felder aufwiesen, aber in der FACS Analyse nur 30% der Zellen in bezug auf die Kontrolle das kontraktile Filament Aktinin exprimierten. Hier wird deutlich, dass - auch wenn nur wenige der Zellen in einem Embryoid Body kontrahieren- dieser Embryoid Body als positiv bewertet wird; dennoch können die aktininpositiven Zellen bereits reduziert sein. Die Immunzytometrie ist somit empfindlicher als die mikroskopische Bewertung der Kontraktionen. Ähnlich wie im ELISA Versuch wurden bei der FACS Analyse höhere Werte für die Aktinin Expression unter 5-Fluorouracilbehandlung im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung gemessen. Erklärungen könnten sein, dass der Antikörper unspezifisch bindet (dies wurde zuvor weitgehend ausgeschlossen) oder dass auch bei hohen Konzentrationen der Substanz Aktinin exprimiert wird, die Zellen aber nicht mehr funktional sind, d.h. nicht mehr kontrahieren. Eine andere mögliche Erklärung ist aber auch die Verschiebung der Zellpopulationen innerhalb der durch die Negativkontrolle und durch die Kontrolle festgelegten Messbereiche (Gates). Die Population der mit 5-Fluorouracil behandelten Zellen verschiebt sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen in der Messung mittels Forward scatter und Side scatter in Richtung niedrigerer Werte. Dadurch verschob sich auch die Population der Aktinin positiven Zellen in den Messbereich der Kontrollzellen, was zu einer Verfälschung der Messergebnisse führte.

Für die hier untersuchten Zellen gibt es bislang keinen Antikörper gegen auf der Zelloberfläche befindlichen Antigene. Aus diesem Grund wird die wesentlich aufwändigere intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung erforderlich. Bei diesem Verfahren muss die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert werden, um den Durchtritt des Antikörpers in das Zytoplasma zu ermöglichen. Dies hat eine Erhöhung des Antikörperverbrauches, eine Verlängerung der Versuchsdauer sowie einen Verlust des ohnehin schon begrenzten Zellmaterials zur Folge. Es handelt sich hierbei um Faktoren, die im Rahmen von Routinescreeningtests mit einem hohen Durchsatz eine Steigerung von Aufwand und Kosten zur Folge haben.

Prinzipiell eignet sich die Durchflusszytometrie also nur bedingt zur Quantifizierung embryotoxischer Effekte neuer Testsubstanzen.

5.2.3 Endpunkt 3: Analyse der β MHC Expression in 'Embryoid Bodies' mittels quantitativer real time PCR an Tag 8 der Differenzierung

Da sich in einem Embryoid Body simultan neben den Kardiomyozyten natürlich noch viele andere Zelltypen entwickeln, mussten Gene ausgewählt werden, die spezifisch in Herzmuskelzellen exprimiert werden: Wobus and Guan (1998) wiesen nach, dass zunächst mesodermspezifische Gene, wie α und β MHC, später aber auch Gene, die im Vorhof (atrial natriuretic factor , ANF) und in der Herzkammer (myosin light chain-2v) exprimiert werden.

Bei der Maus, wie bei den meisten Säugetieren, ist das MHC Protein das quantitativ am Meisten vorkommende kontraktile Protein und wird im Genom als eine Einheit mehrerer Isoformen repräsentiert. Die Anzahl der Isoformen variiert von Spezies zu Spezies. Die verschiedenen Isoformen werden entwicklungsabhängig, gewebespezifisch sowie muskelspezifisch exprimiert. (Wobus et al., 1996)

Myosin ist ein sehr großes Protein, das aus zwei ineinander verdrillten Polypeptiden (schwere Kette) und vier kleineren Peptiden (leichte Kette) besteht. Es gibt drei Isoformen dieses Proteins: V_1 , ein Homodimer der α -Myosin Heavy Chain Isoform; V_2 , ein Heterodimer des α - und des β -Myosin Heavy Chain Proteins; V_3 , ein Homodimer der β -Myosin MHC Isoform. (Ng et al., 1991)

In Kammermyozyten findet während der Entwicklung eine Verschiebung in der Expression und Verteilung der MHC Isoform statt. Pränatal dominiert die β -Isoform,

Diskussion

die allerdings postnatal reduziert wird, wohingegen die Expression des α -MHC Genes verstärkt wird, so dass in der adulten Herzkammer diese Isoform dominant vertreten ist. (Ng et al,1991 und Metzger et al,1995)

Während der *in vitro* Differenzierung der Embryonalen Stammzellen konnte kardiale β -MHC mRNA zu einem Zeitpunkt vor Auftreten der ersten Kontraktionen an Tag 3 und 4 nachgewiesen werden. Zu Beginn der spontanen Kontraktionen wurde sowohl β - als auch α -MHC mRNA nachgewiesen (Metzger et al.,1995). Nur die Embryoid Bodies, die beide Isoformen exprimiert hatten, wiesen Kontraktionen auf. (Sanchez et al,1991) Nach längerer Kontraktion im Verlauf der Entwicklung dominiert das α -MHC Gen, mit einer Relation der α/β Konzentration von 16:1.

Angesichts dieser Erkenntnisse sollte die Messung des β MHC Transkriptes an Tag 8 der Differenzierung *in vitro* als möglicher neuer Endpunkt des EST untersucht werden. In Untersuchungen von Zur Nieden et al. (2001) konnte durch RT-PCR Analyse gezeigt werden, dass die gewählten Gene spezifisch in Herzgewebe exprimiert werden und dass die speziell zur Amplifikation des β -MHC Genes hergestellten Primer spezifisch an die Transkripte im Herzgewebe der Maus binden. Eine ebenfalls in Vorarbeiten von ZurNieden et al. 2001 durchgeführte kinetische Analyse des gesuchten Genes in den Kontrollgruppen ergab, dass in der Entwicklungsphase zwischen Tag 5 und Tag 30 der Embryoid Bodies die Expression an den Tagen 8 und 9 am höchsten war. Aus diesem Grund wurde die Expression nach Behandlung mit den Testsubstanzen an Tag 8 gemessen. Hierbei wurden im Vergleich mit der mikroskopischen Auswertung übereinstimmende Werte ermittelt.

Im Vergleich der Kurve der mikroskopischen Auswertung mit der Kurve der MHC Expression kam es bei den Substanzen Saccharin, Penicillin G, Phenytoin, 5-Fluorouracil und Thalidomid zu einer Verschiebung der Kurve zu den niedrigeren Substanzkonzentrat

ionen. Bei der Testsubstanz Hydroxyharnstoff lagen die beiden Kurven fast identisch, bei Indomethazin kam es zu einer leichten Verschiebung der Kurve nach rechts, zu den höheren Substanzkonzentrationen. Die im Mikroskop beobachtete Verkleinerung der Kardiomyozytenareale, die zuvor nicht in die Bewertung mit aufgenommen werden konnte, wird hier sensitiver dargestellt.

Setzt man die Werte der TaqMan PCR in das von ZEBET für den EST entwickelte Prädiktionsmodell ein, wird für die Testsubstanzen Penicillin G und Thalidomid eine andere Klassifikation errechnet als mit den Werten für den ursprünglichen EST. Für

Diskussion

beide Substanzen wurde nach Anwendung im ursprünglichen EST kein embryotoxisches Potential errechnet, mit den Ergebnissen der PCR wurden sie mit dem Prädiktionsmodell den schwach embryotoxischen Substanzen zugeordnet. *In vivo* ist für Penicillin kein embryotoxisches Potential bekannt; Thalidomid hingegen wurde zeitweise wegen der hohen Fehlbildungsrate nach Einnahme in der Frühschwangerschaft vom Markt genommen.

Es darf bei der Bewertung jedoch nicht vergessen werden, dass das Prädiktionsmodell der ZEBET für den EST mit mikroskopische Auswertung der Kontraktionen erstellt worden ist und somit in Frage steht, ob es auch auf die Ergebnisse der TaqMan PCR anwendbar ist.

Thalidomid

Besondere Betrachtung soll der Analyse der β -MHC Expression der 'Embryoid Bodies' gewidmet werden, die während der Differenzierung mit der Substanz Thalidomid behandelt worden waren.

Es zeigte sich, dass aus der Behandlung mit dieser Substanz ein starker Abfall der β -MHC Expression resultierte. Nach mikroskopischer Analyse wurde der ID50 Wert bei 500 μ g/ml erreicht. Die Bewertung der β -MHC Expression ergab jedoch einen ID50 Wert von nur 25 μ g/ml! Das Ergebnis wurde in erneuten Versuchsreihen bestätigt (n=3).

Thalidomid hat *in vivo* kaum zytotoxische Nebenwirkungen auf adultes Gewebe. Im Zytotoxizitätsversuch an ausdifferenzierten Maus-Fibroblasten konnte dieses Verhalten widerspiegelt werden. Das bekanntermaßen hochembryotoxische Potential dieser Substanz konnte im EST zunächst jedoch nicht gefunden werden. Erst nach Analyse der β -MHC Expression zeigte sich, dass die Differenzierungshemmung der Substanz ähnlich der des bekanntermaßen stark embryotoxisch wirksamen Chemotherapeutikums Hydroxyharnstoff war.

Erstaunlich bei diesen Ergebnissen ist jedoch, dass - obwohl die β MHC Expression auf ein extrem niedriges Niveau abgesunken war - im Mikroskop immer noch deutliche und große kontrahierende Areale beobachtet werden konnten. Als Erklärungsmöglichkeiten hierfür kommen in Frage:

1. Auch geringste Mengen des β MHC Proteins sind für die Ausbildung kontrahierender Kardiomyozytenareale ausreichend.

Diskussion

2. Thalidomid bewirkt eine zeitliche Verzögerung der β MHC Expression. Die PCR Analyse fand an Tag 8, die mikroskopische Analyse erst an Tag 10 statt.

3. Thalidomid bewirkt die Expression eines veränderten, aber dennoch funktionstüchtigen Myosin Proteins. Mutationen im β Myosin Heavy Chain Protein wurden seit 1992 (erstmalig von Perryman et al 1992) wiederholt beschrieben. Diese Patienten leiden überwiegend an einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie, was gehäuft kardiale Ereignisse, wie plötzlicher Herztod, zur Folge hat.

Zum Einsatz des neuentwickelten Endpunktes β MHC Genexpression bei der Embryotoxizitätstestung

Die veränderte Expression des MHC Genes unter dem Einfluss der Testsubstanzen kann einen neuen einfach zu quantifizierenden Endpunkt in der Embryotoxizitätsmessung liefern.

Diejenige Konzentration, bei welcher 50 % der MHC Expression im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe erreicht wurde, wird als Endpunkt des Differenzierungsversuches angesehen. Dieser Endpunkt ist im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung einfacher und genauer. Darüberhinaus wird die MHC Expression bereits an Tag 8 der Differenzierung bestimmt, wohingegen die mikroskopische Auswertung an Tag 10 stattfindet. Bei *in vitro* Versuchen ist es nicht zuletzt aus Kostengründen immer von Bedeutung die kürzest mögliche Zeitspanne zu wählen.

Die Endpunkte Zytotoxizität gemessen durch die MTT-Versuche mit Embryonalen Stammzellen und Fibroblasten bleiben unverändert erhalten. Die Konzentrationsdifferenz zwischen 50% Zytotoxizität im MTT-Versuch und 50 % Differenzierungshemmung ist ein relevanter Endpunkt in der Bestimmung des embryotoxischen Potentials einer Testsubstanz. Durch diese Differenz ist es im EST möglich, Substanzen mit stärkerem teratogenem Potential von solchen mit hauptsächlich zytotoxischer Wirkung zu unterscheiden.

Die Erweiterung des Embryonalen Stammzelltestes schafft die Voraussetzung dafür, den Test zu automatisieren und damit mit höherem Durchsatz zur Substanzauswahl einzusetzen. Dies ist insbesondere für die Etablierung und Anwendung des Stammzelltestes in der pharmazeutischen und chemischen Industrie als ein *in vitro* Screeningverfahren zur frühzeitigen Erfassung des embryotoxischen Potentials eines Arzneimittelkandidaten wichtig. Die Durchführung von aufwendigen Tierversuchen

Diskussion

mit hohen Versuchstierzahlen kann somit reduziert werden. Besonders die Ergebnisse der ECVAM Validierungsstudie zeigten, dass der EST sich als Screeningverfahren von stark embryotoxischen Substanzen eignet, da deren Potential zu 100% richtig vorhergesagt wurde, wobei jedoch in dieser Untersuchung die Substanz Thalidomid nicht getestet wurde. (Genschow et al., 2000,2002). Ein weiterer Vorteil ist, dass der EST die Analyse von Embryotoxizität an Embryo-ähnlichen Strukturen erlaubt, die in reinen Zellkultursystemen nicht imitiert werden können.

Nicht zu vernachlässigen ist auch die Tatsache, dass der EST einen wichtigen Beitrag zum Tierschutz leistet. Durch die Testung im EST wird vermieden, dass stark belastende Substanzen in den Tierversuch gelangen oder dass trächtige Tiere zur Gewinnung embryonaler Gewebe und Organe getötet werden müssen. Dies könnte insbesondere für die Umsetzung der Strategie für eine zukünftige Chemikalienpolitik der EU von Bedeutung sein, da Behörden und Industrie toxikologische Risikoabschätzungen grundsätzlich mit tierversuchsfreien Alternativmethoden durchführen sollen und die Durchführung von Tierversuchen nur in besonders begründeten Fällen gestattet wird. (Seiler et al., 2002)

6 Zusammenfassung

Bei dem Embryonalen Stammzelltest (EST) handelt es sich um einen *in vitro* Test zur Überprüfung des embryotoxischen Potentials von bekannten und neu entwickelten Substanzen. Eingesetzt werden zwei Zelllinien, einerseits eine embryonale Stammzelllinie zur Repräsentation embryonalen Gewebes, andererseits eine Fibroblastenzelllinie als adultes Referenzgewebe. In Abwesenheit eines Differenzierungsinhibitors formen die Embryonalen Stammzellen sogenannte Embryoid Bodies und differenzieren zu den verschiedenen Geweben von Ekto-, Meso-, und Entoderm. Der Einfluss der Substanzen auf die Differenzierung der pluripotenten Stammzellen zu Herzmuskelzellen wird im EST verglichen mit dem zytotoxischen Effekt der Substanz einerseits auf die Embryonalen Stammzellen andererseits auf adulte Fibroblasten gemessen mit dem MTT Zytotoxizitätstest.

Bei der Ermittlung der embryotoxischen Potenz der ausgewählten Testsubstanzen konnten mit aus Prävalidierungsversuchen bekannten Daten übereinstimmende Ergebnisse gemessen werden. Im Vergleich zu *in vivo* bekannten Daten wurde auch die bisher nicht im EST getestete Substanz Thalidomid bei Verwendung des neuen Endpunktes b MHC Expression in die korrekte Embryotoxizitätsgruppe eingeteilt.

Angesichts der Ungenauigkeit, die sich bei der allein mikroskopischen Auswertung der kontrahierenden Areale innerhalb der Embryoid Bodies ergab, wurden alternative Analysemethoden getestet. Neben der Analyse des Aktin Gehaltes durch Zell ELISA, und des Aktinin Gehaltes durch Durchflusszytometrie erwies sich insbesondere die Messung der β Myosin Expression durch quantitative Real-Time PCR als besonders vielversprechend. Die Messung der unter dem Einfluss der Testsubstanzen veränderten Expression des Myosin Gens liefert einen neuen, einfach zu quantifizierenden Endpunkt in der Embryotoxizitätsmessung.

Die Eignung des Embryonalen Stammzelltest (EST) zur frühen Vorselektion der Testsubstanzen konnte dargestellt werden. Ein vollständiger Verzicht auf Tierversuche kann der EST jedoch nicht gewährleisten. Substanzen, die im EST als unbedenklich eingestuft werden, müssen vor ihrem Einsatz an Mensch oder Tier noch in kontrollierten Versuchen an Vertebraten bezüglich ihrer Embryotoxizität getestet werden.

Literaturverzeichnis

- Abramovic A., Shaklai M., Pinkhas J. (1978): Myeloschisis in a Six Weeks Embryo of a Leukemic Woman treated by Busulfan. *Teratology* **18**: 241-246
- Aktories, K., Förstrmann, U., Hofmann, F., Starke, K. (2005): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9.Auflage, Urban Fischer Verlag
- Asano, Y., Okaniwa, A. (1987): In utero morphological effects of hydroxyurea on the fetal development in sprague–dawley rats. *Jikken Dobutsu* **36**: 143-9
- Bader, A., Al-Dubai, H., Weitzer, G. (2000) Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in Embryoid Bodies in opposite fashions. *Circ Res.* **86**: 787-794
- Bremer, S., van Dooren, M., Parparella, M., Kossolov, E., Fleischmann, B., Hescheler, J. (1999): Effects of embryotoxic chemicals on the *in vitro* differentiation of genetically engineerd embryonic stem cells into cardiac cells. *Toxicology in vitro* **13**: 645-650
- Brüstle, O., Wiestler, O. (2000): Zellersatz aus Embryonalen Stammzellen. *Deutsches Ärzteblatt* **97**: A-1666-1673
- Chaube s., Murphy ML. (1966): The effects of hydroxyurea and related compounds on the rat fetus. *Cancer research*; **26**:1448-1457
- Chazaud C, Chambon P, Dolle P. (1999): Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis. *Development.* Jun; **126**(12):2589-96.
- Chernoff N., Kavlock RJ., Beyer PE. (1987): Miller D. The potential relationship of maternal toxicity, general stress, and fetal outcome. *Teratogen Carcinogen Mutagen* **7**:241-253.
- Chiba, K., Ishikawa, H., Rahman, M., Endo, A. (1996): Neonatal mouse hip joint and hindlimb anomalies induced by prenatal exposure to Ara-C. *Reprod Toxicol* **10**: 215-219
- Coudray, C., Talla, M., Martin, S., Fatome, M., Favier, A. (1995): High-performance liquid chromatography-electrochemical determination of hydroxylation products as an *in vivo* marker of oxidative stress. *Anal Biochem* **227**:101-111
- Del Campo, M., Kosaki, K., Bennet, F., Jones, K. (1999): Developmental delay in fetal Aminoptrin/Methotrexate Syndrome. *Teratology* **60**:10-12

Literaturverzeichnis

- DeSesso JM, Goeringer GC. (1991): Amelioration by leucovorin of methotrexate developmental toxicity in rabbits. *Teratology*. Mar;**43**(3):201-15.
- Diav-Citrin O., Hunnisett L., Sher G., Koren G. (1999): Hydroxyurea use during pregnancy: A case report in sickle cell disease and Review of the literature. *American Journal of Hematology* **60**:148-150
- Doetschmann T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R., (1985)
The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell line: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium, *J Embryol Exp Morphol* **87**: 27-45
- Evan MJ., Kaufmann MH. (1981): Establishment in culture of pluripotential embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-165
- Feldkamp, M., Carey, JC. (1993): Clinical teratology counseling and consultation case report: low dose methotrexate exposure in the early weeks of pregnancy. *Teratology*.; **47**(6):533-9. Review.
- Ferm VH. (1966) Severe Developmental malformations: malformations induced by urethane and hydroxyurea in the hamster. *Arch Pathol*; **81**:174-177
- Friedman, J., Kimmel, C., 1993 Teratology Society (1998): Public affairs committee symposium: The new Thalidomide era: dealing with the risks *Teratology* **59**: 120-123
- Fritz-Six, KL., Cox, PR., Fischer, RS., Xu, B., Gregorio, CC., zoghbi, HY., Fowler, VM. (2003): Aberrant myofibril assembly in tropomodulin null mice leads to aborted heart development and embryonic lethality. *J.Cell Biol.* **163**(5):1033-44
- Grafton, T., Bazare; J. Jr., Hansen, D., Sheenan, D. (1987): The *in vitro* embryotoxicity of 5- Fluorouracil in rat embryos. *Teratology* **36**: 371-7
- Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K. (2002) 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.* Mar-Apr;**30**(2):151-76.
- Goncharova, EJ., Kam, Z., Geiger, B. (1992): The involvement of adherens junction components in myofibrillogenesis in cultured cardiac myocytes. *Development.* **114**(1):173-83

Literaturverzeichnis

- Gray, J., Grigoryan, G., Virley, D., Patel, S., Sinden, J., Hodges, H. (2000): Conditionally immortalized, multipotential and multifunctional neural stem cell lines as an approach to clinical transplantation. *Cell Transplant* **9**:153-68
- Griffith, M., Zile, M. (2000): Retinoic acid, midkine, and defects of secondary neurulation. *Teratology* **62**: 123-33
- Guan, K., Furst, DO., Wobus, AM. (1999): Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell derived cardiomyocyte differentiation. *Eur. J. Cell. Biol.*; **78(11)**:813-23
- Gurdon, Jb., Mohun, TJ., Sharpe, CR., Taylor, MV. (1989): Embryonic induction and muscle gene activation. *Trends Genet* **5(2)**: 51-6
- Gwyn KM, Theriault RL. (2000) Breast cancer during pregnancy. *Curr Treat Options Oncol.* Aug;**1(3)**:239-43. Review
- Hanson, J.W. (1976): Fetal hydantoin syndrome.-*Teratology* 13, 185-188
- Heger, W., Schmahl, HJ., Klug, S., Felies, A., Nau, H., Merker, HJ., Neubert, D. (1994): Embryotoxic effects of thalidomide derivatives in the non-human primate callithrix jacchus. IV. Teratogenicity of micrograms/kg doses of the EM12 enantiomers. *Teratog Carcinog Mutagen.*;**14(3)**:115-22.
- Heinonen, O.P., Slone, D., Shapiro, S. (1977): Birth defects and drugs in pregnancy. *Publishing Science Group, Littleton*
- Hescheler, J., Fleischmann, B., Lentini, S., Maltsev, V., Rohwedel, J., Wobus, A., Addicks, K.(1997): Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis.*Cardiovascular research* **36**:149-162
- Heuer, J., Graeber, I., Pohl, I., Spielmann, H., (1994): An *in vitro* Embryotoxicity Assay Using the Differentiation of Embryonic Mouse Stem Cells Into Haematopoietic Cells.*Toxicology in vitro* **8**:585-7
- Hinds, T., West, W., Knight, E., Harland, B. (1996): The effect of caffeine on pregnancy outcome variables. *Nutrition Reviews* **54**:203-7
- Holdiness, M., (1987): Teratology of the antituberculosis drugs. *Early Hum Dev.* **15**: 61-74
- Jerome CP, Hendrickx AG. (1988) Comparative teratogenicity of triamcinolone acetonide and dexamethasone in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol.*;**17(4)**:195-203.

Literaturverzeichnis

- Juchau, MR. (1989): Bioactivation in chemical teratogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*; **29**:165-87. Review.
- Kaufman MH, Navaratnam V. (1981) Early differentiation of the heart in mouse embryos. *J Anat. Sep*; **133**(Pt 2):235-46.
- Karabulut, A., Ülger, H., Pratten, M. (2000): Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against salicylate-induced embryonic malformations *in vitro*. *Toxicology in vitro* **14**:297-307
- Keller, G. (1995): *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Current opinion in cell biology* **7**:862-9
- Korzhova VV, Lisitsina NT, Smirnova EI, Kiseleva LA. (1976) Influence of antibiotics of the penicillin series on the fetal and newborn development of rats: *Biull Eksp Biol Med.*; **82**(7):864-6
- Krause, VW (1973) Zur teratogenen Wirkung von Busulfan auf die Hodenzellen der fetalen Ratte *Arzneimittel Vorschriften*, **23**:924-926
- Kroes, R., Peters, PW., Berkvens, JM., Verschuuren, HG., de Vries, T., van Esch, GJ. (1977): Long term toxicity and reproduction study (including a teratogenicity study) with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine. *Toxicology*. **8**(3):285-300
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT, et al. (1983) Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med.*; **313**(14):837-41.
- Laschinski, G., Vogel, R., Spielmann H. (1991): Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to *in vitro* teratogenesis screening. *Reprod Toxicol.*; **5**(1):57-64.
- Lee, S., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J., McKay, R. (2000): Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **18**:675-679
- Lenz, W., (1963): Studies on Contergan in the etiology of malformations. *Methods Inf Med*: **2**:49-51
- Lindenbaum MH, Grosveld F. (1990) An *in vitro* globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells. *Genes Dev.*; **4**(12A):2075-85
- Liu, S., Qu, Y., Stewart, T., Howard, M., Chakraborty, S., Holekamp, T., McDonald, J. (2000): Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and

Literaturverzeichnis

- myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**. 6126-31
- London, RS. (1988): Saccharin and aspartame. Are they safe to consume during pregnancy? *J Reprod Med.***33(1)**:17-21
- Luecke, R., Wosilait, W., Young, F.(1997): Mathematical analysis for teratogenic sensitivity. *Teratology* **55**:373-380
- Luhmann, H.J. (2000) *Umweltmed. Forsch. Prax.* **5** (5) 295-300
- Lyons, GE., Schiaffino, S., sassoon, D., Barton, P., Buckingham, M. (1990): Developmental regulation of myosin gene expression in mouse caediac muscle. *J.Cell Biol*; **111 (6 Pt1)**:2427-36
- Malone, J.M. (1975): Vitamin passage across the placenta. *Clin. Perinatol.* **2**:295-307
- Machado JP. (1967) Busulfan treatment during pregnancy. *JAMA.*; **201(4)**:272
- Maltsev, V., Rohwedel, J., Hescheler, J., Wobus, A.,(1993): Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types.*Mechanisms of Development* **44**:41-50
- Maltsev, V., Wobus, A., Rohwedel, J., Bader, M., Hescheler, J., (1994): Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from Embryonic Stem Cells developmentally express Cardiac-Specific Genes and Ionic Currents. *Circulation Research* **75**:233-244
- Manoharan A., Leyden MJ., (1979) Acute non lymphocytic leukaemia in the third trimester of pregnancy *Aust NZ J Med*; **9**:71-74
- Marinero, H.G.S.(1982): Arzneimittelhaftung in den USA und Deutschland. Frankfurt am Main 1982. S. 266 f
- Marret, S., Gressens, P., Van-Maele-Fabry, G., Picard, J., Evrard, P. (1997): Caffeine-induced disturbances of early neurogenesis in whole mouse embryo cultures. *Brain Research* **773**: 213-6
- Martin, TR., Bracken, MB. (1987): The association between low birth weight and caffeine consumption during pregnancy. *Am J Epidemiol.* **126(5)**:813-21.
- Maurer LH., Forcier RJ., MC Intyre OR., Benirschke K. (1971) Fetal group C trisomy after cytosin arabinoside and thioguanin. *Ann Intern. Med*; **75**: 809-10
- McBride, W.: (1961): Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* ii, 1358
- Meng, H., Leddy JJ., Frank, J., Holland, P., Tuana, BS. (1996): The association of cardiac dystrophin with myofibrills/z-disc regions in cardiac muscle suggests anovel role in the contractile apparatus. *J Biol. Chem.* **271 (21)**: 112364-71

Literaturverzeichnis

- Metzger JM, Lin WI, Johnston RA, Westfall MV, Samuelson LC. (1995) Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. *Circ Res.*; **76**(5):710-9.
- Meigs, R., Ryan, K. (1968): Cytochrome P-450 and steroid biosynthesis in the placenta. *Biochim. Biophys. Acta* **165**:476-483
- Miller, M., Strömland, K. (1999): Teratogen update: Thalidomide: A review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* **60**: 306-321
- Moore, KL., Persaud TVN. (1992): Embryologie, 4. Auflage, Schattauer Verlag
- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Schäfer-Korting M.: Mutschler Arzneimittelwirkungen, 8. Auflage (2001), wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart)
- Naranjo, P., deNaranjo, E. (1968): Embryotoxic effects of antihistamines. *Arzneimittel-forschung* **18**: 188-94
- Necomb M., Balducci L., Thigpen JT., Morrison FS. (1978) Acute Leukaemia in pregnancy: Successful delivery after cytarabin and doxorubicin *JAMA*; **239**:2691-92
- New, D. (1990): Whole embryo culture, teratogenesis, and the estimation of teratologic risk. *Teratology* **42**: 635-642
- Newall, D., Beedles, K. (1994): The Stem Cell Test – A novel *in vitro* assay for teratogenic potential . *Toxicology in vitro* **8** 697-701
- Newall, D., Beedles, K. (1996): The Stem-Cell Test.: An *in vitro* assay for Teratogenic Potential . Results of a Blind Trial with 25 Compounds. *Toxicology in vitro* **10**:229-240
- Ng, W., Grupp, I., Subramaniam, A., Robbins, J. (1991): Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res.* **69**: 1742-1750
- O'Connell, M., Webster, N. (1990): Hyperoxia and salicylate metabolism in rats. *J Pharm Pharmacol* **42**:205-206
- Ortega, A., Puig, M., Domingo, J. (1991): Maternal and Developmental Toxicity of low doses of Cytosin arabinoside in mice. *Teratology* **44**: 379-384
- Ornoy, A., Arnon, J. (1993): Clinical teratology. *West. J. Med.* **159**: 382-90
- Park, T., Han, J. (2000): Derivation and Characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Reprod. Dev.* **56**:475-482

Literaturverzeichnis

- Percy DH. (1975) Teratogenic effects of the pyrimidine analogues 5-iododeoxyuridine and cytosine arabinoside in late fetal mice and rats. *Teratology*; **11**(1):103-17.
- Perryman MB, Yu QT, Marian AJ, Mares A Jr, Czernuszewicz G, Ifegwu J, Hill R, Roberts R. (1992) Expression of a missense mutation in the messenger RNA for beta-myosin heavy chain in myocardial tissue in hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*; **90**(1):271-7.
- Richards ID. (1972) A retrospective enquiry into possible teratogenic effects of drugs in pregnancy. *Adv Exp Med Biol*; **27**:441-55.
- Rhamann, M., Ishikaya, H., Watanabe, Y., Endo, A. (1996): Carpal and tarsal bone development is highly sensitive to three antiproliferative teratogens in mice. *Reprod Toxicol*.**10**: 485-9
- Robbins J, Gulick J, Sanchez A, Howles P, Doetschman T. (1990) Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J Biol Chem*; **265**(20):11905-9
- Robertson RT, Allen HL, Bokelman DL. (1979) Aspirin: teratogenic evaluation in the dog. *Teratology*; **20**(2):313-20
- Rodgers GP, Dover GJ, Noguchi CT, Schechter AN, Nienhuis AW. (1990) Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N Engl J Med*; **322**(15):1037-45.
- Rohwedel, J., Kleppisch, T., Pich, U., Guan, K., Jin, S., Zuschmitter, W., Hopf, C., Hoch, W., Hescheler, J., Witzemann, V., Wobus, A. (1998): Formation of Postsynaptic-Like Membranes during Differentiation of Embryonic Stem cells *in vitro*. *Experimental Cell Research* **239**:214-225
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H., Hescheler, J., Wobus, A. (1994): Muscle Cell Differentiation of Embryonic Stem Cells Reflects Myogenesis in vivo: Developmentally Regulated Expression of Myogenic Determination Genes and Functional Expression of Ionic Currents. *Developmental Biology* **164**,87-101
- Romero, R., Lockwood, C. (1988): The use of antiasthmatic drugs in pregnancy. *In: Drug use in pregnancy, second edition*, ed. Niebyl. J.R.-Lea und Febiger, Philadelphia 1988.

Literaturverzeichnis

- Sahir, N., Bahi, N., Evrard, P., Gressens, P. (2000): Caffeine induces in vivo premature appearance of telencephalic vesicles. *Developmental Brain Research* **121**: 213-7
- Sanchez, A., Jones, K., Gulick, J., Doetschman, T., Robbins J.,(1991): Myosin Heavy Chain Gene Expression in mouse Embryoid Bodies. *J Biol Chem.* **266**: 22419-26
- Saxen, I. (1974): Letter: Cleft palate and maternal diphenhydramine intake. *Lancet* **1**:407-8
- Schardein JL, (1993) Chemically induced birth defects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker;
- Schardein JL, Hentz DL, Petrere JA, Kurtz SM. (1971) Teratogenesis studies with diphenhydramine HCl. *Toxicol Appl Pharmacol.*; **18**(4):971-6.
- Schleger, C., Krebsfaenger, N., Kalkuhl,A., Bader, R., Singer, T. (2000): Innovative Cell Culture Methods in Drug Development. *ALTEX* **18**:5-8
- Scholz, G., Genschow, E., Pohl, I., Bremer, S., Paparella, M., Raabe, H., Southee, J., Spielmann, H. (1999): Prevalidation of the embryonic stem cell test (EST)- a new *in vitro* embryotoxicity test. *Toxicology in vitro* **13**: 675-681
- Scholz, G., Pohl, I, Genschow, E., Klemm, M., Spielmann, H. (1999): Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: correlation to in vivo teratogenicity. *Cells Tissues Organs* **165**:203-211
- Scholz, G., Pohl, I., Seiler, A., Bremer, S., Brown, N., Piersma, A., Holzhutter, H., Spielmann, H. (1998): Results of the first phase of the ECVAM project „prevalidation and validation of three *in vitro* embryotoxicity tests“ *ALTEX* **15**:3-8
- Shuey DL, Lau C, Logsdon TR, Zucker RM, Elstein KH, Narotsky MG, Setzer RW, Kavlock RJ, Rogers JM. (1994) Biologically based dose-response modeling in developmental toxicology: biochemical and cellular sequelae of 5-fluorouracil exposure in the developing rat. *Toxicol Appl Pharmacol.*; **126**(1):129-44.
- Shum AS, Poon LL, Tang WW, Koide T, Chan BW, Leung YC, Shiroishi T, Copp AJ. (1999) Retinoic acid induces down-regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo. *Mech Dev.*; **84**(1-2):17-30.

Literaturverzeichnis

- Slone, D., Siskind, V., Heinonen, O.P., (1976) Aspirin and congenital malformations.- *Lancet i*, 1373-1375;
- Smith, MK., Kimmel, GL., Kochhar, DM., Shepard, TH., Spielberg, SP., Wilson, JG. (1983): A selection of candidate compounds for in vitro teratogenesis test validation. *Teratog Carcinog Mutagen.*; **3(6)**:461-80.
- Smith AG, Hooper ML. (1987) Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol.*; **121**(1):1-9.
- Snider, D. Jr, Layde, P., Johnson, M., Lyle, M. (1980): Treatment of tuberculosis during pregnancy. *Am Rev Dis.*, **122**: 65-79
- Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J., Martin, F. (2000): Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**: 157-62
- Spielmann H. (1984) Revision of the Animal Protection Act in West Germany: will a central registry of data on animal experiments provide better animal protection? *ATLA Abstr.*; **12**(2):99-100
- Spielmann H. (2002), Das Weißbuch über eine neue Chemikalienpolitik der EU: Bewertung der Chancen von *in vitro* Methoden aus der Sicht von ZEBET *ALTEX* 19, Suppl.1/02 p20-25
- Spielmann H, Liebsch M. (2001) Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicol In Vitro.*; **15**(4-5):585-90.
- Spielmann, H., Pohl, I., Döring, B., Liebsch, M., Moldenauer, F. (1997): The Embryonic Stem Cell Test, an *In Vitro* Embryotoxicity Test Using Two Permanent Mouse cell Lines: 3T3 Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *In Vitro Toxicology* Volume 10 (1) 119-127.
- Spielmann, H., Steinhoff, R., Schaefer, C., Bunjes, R.: (1992): Taschenbuch der Arzneimittelverordnung in Schwangerschaft und Stillperiode *Gustav Fischer Verlag*
- Steele, C.,(1991): Whole embryo culture and teratogenesis. *Human Reproduction* **6**: 144-7
- Stephens, T., Fillmore, B. (2000): Hypothesis: Thalidomide embryopathy- proposed mechanism of action. *Teratology* **61**: 189-195
- Swartz, W. (1980): Response of early chick embryos to busulfan. *Teratology* **21**: 1-8

Literaturverzeichnis

- Szeto, HH., Umans, JG., Rubinow, SI. (1982): The contribution of transplacental clearances and fetal clearance to drug disposition in the ovine maternal-fetal unit. *Drug Metab Dispos.*; **10(4)**:382-6.
- Tobias SS, Morgenstern G., Bloom HJG., Powles RI., (1980) Doxorubicin in pregnancy. *Lancet*; i:776
- Ungvary, G., Tatrai, E., Lorincz, M., Barcza, G. (1983): Combined embryotoxic action of toluene, a widely used industrial chemical, and acetylsalicylic acid. *Teratology* **27**: 261-9
- Van den Eijnden-van Raaij, AJ., van Achterberg, TA., van der Kruijssen, CM, Piersma, AH., Huylebroeck, D., de Laat, SW., Mummery, CL. (1991): Differentiation of aggregated murine P19 embryonal carcinoma cells is induced by a novel visceral endoderm specific FGF-like factor and inhibited by activin A. *Mech Dev.* **33(2)**:157-65.
- Ventura, C., Maioli, M., (2000): Opioid Peptide Gene Expression Primes Cardiogenesis in Embryonal Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research* **87**:189-194
- Wartenberg, M., Gunther, J., Hescheler, J., Sauer, H. (1998): The embryoid body as a novel *in vitro* assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest* **78**:1301-14
- Westfall, M., Pasyk, K., Yule, D., Samuelson, L., Metzger, J. (1997): Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **36**: 43-54
- Wiles, M.(1993): Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro*. *Methods in Enzymology* **225**:900-19
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Wilson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.*; **336(6200)**: 684-7
- Wilson JG, Scott WJ, Ritter EJ, Fradkin R. (1975) Comparative distribution and embryotoxicity of hydroxyurea in pregnant rats and rhesus monkeys. *Teratology*; **11**:169-178
- Wise, L., Clark, R., Rundell, J., Robertson, R. (1990): Examination of rodent limb bud micromass assay as a prescreen for developmental toxicity. *Teratology* **41**: 341-351

Literaturverzeichnis

- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res.*; **152**(1):212-9.
- Wobus AM, Rohwedel J, Maltsev V, Hescheler J. (1995) Development of cardiomyocytes expressing cardiac-specific genes, action potentials, and ionic channels during embryonic stem cell-derived cardiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.*; **752**:460-9.
- Yaffe, S., Rane, J., Sjöquist, F., Boreus, L., Orrenius, O. (1970): The presence of a monooxygenase system in human fetal liver microsomes. *Life Sci.* **9**:1189-1200
- Yokoyama A., Takakubo F., Eto K., Ueno K., Igarashi T., Satoh T., Kitagawa H. (1984) Teratogenicity of aspirin and its metabolite, salicylic acid, in cultured rat embryos. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.*; **46**(1):77-91
- zur Nieden, N., Ruf, L., Kempka, G., Hildebrand, H., Ahr, H. (2001): New Endpoints in Embryotoxicity- A molecular approach to further develop the Embryonic Stem Cell Test (EST) *Toxicology in vitro*; **15**,455-461

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel ‚Untersuchungen zum Embryonalen Stammzell Test (EST) - Entwicklung neuer Endpunkte in der Embryotoxizitätsmessung‘ selbständig angefertigt, und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe die vorliegende Arbeit weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Düsseldorf im September 2007

Mein Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. H.J. Ahr und Frau Dr. G. Wasinska-Kempka für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie für die Möglichkeit, diese Arbeit in Kooperation der Forschungstoxikologie der Bayer AG, Wuppertal, und dem Institut für Toxikologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchzuführen. Darüberhinaus bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Dr. N. Zur Nieden für die Zusammenarbeit sowie die zahlreichen, wertvollen Diskussionen und Anregungen und die produktive Arbeitsatmosphäre.

Frau Prof. Dr. R. Kahl danke ich für ihre Anregungen, ihre konstruktive Hilfe bei der Korrektur der Arbeit und ihre Unterstützung beim Abschluss des Promotionsverfahrens.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. H. Hildebrandt und Herrn PD Dr. H-W. Vohr sowie bei Frau W. D'Aquisto und bei Frau M. Wingenroth für die Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Leilani Jennifer Ruf
Geburtsdatum: 18.08.1977
Geburtsort: Honolulu/ Hawaii
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983-1984 Grundschule Gaiberg (bei Heidelberg)
1984-1987 Internationale Grundschule Heidelberg
1987-1989 Hölderlin-Gymnasium Heidelberg
1989-1996 Röntgen Gymnasium Remscheid-Lennep
Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1996-2003: Studium der Humanmedizin an der Heinrich Heine Universität,
Düsseldorf
Sommer 1998: Physikum
Sommer 1999: 1. Staatsexamen
Frühjahr 2002: 2. Staatsexamen
Frühjahr 2003: 3. Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit:

Seit 01.08.2003 Assistenzärztin der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den 03.09.2007

Zusammenfassung

Bei dem Embryonalen Stammzelltest (EST) handelt es sich um einen *in vitro* Test zur Überprüfung des embryotoxischen Potentials von bekannten und neu entwickelten Substanzen. Eingesetzt werden zwei Zelllinien, einerseits eine embryonale Stammzelllinie zur Repräsentation embryonalen Gewebes, andererseits eine Fibroblastenzelllinie als adultes Referenzgewebe. In Abwesenheit eines Differenzierungsinhibitors formen die Embryonalen Stammzellen sogenannte Embryoid Bodies und differenzieren zu den verschiedenen Geweben von Ekto-, Meso-, und Entoderm. Der Einfluss der Substanzen auf die Differenzierung der pluripotenten Stammzellen zu Herzmuskelzellen wird im EST verglichen mit dem zytotoxischen Effekt der Substanz einerseits auf die Embryonalen Stammzellen andererseits auf adulte Fibroblasten gemessen mit dem MTT Zytotoxizitätstest.

Bei der Ermittlung der embryotoxischen Potenz der ausgewählten Testsubstanzen konnten mit aus Prävalidierungsversuchen bekannten Daten übereinstimmende Ergebnisse gemessen werden. Im Vergleich zu *in vivo* bekannten Daten wurde auch die bisher nicht im EST getestete Substanz Thalidomid bei Verwendung des neuen Endpunktes b MHC Expression in die korrekte Embryotoxizitätsgruppe eingeteilt.

Angesichts der Ungenauigkeit, die sich bei der allein mikroskopischen Auswertung der kontrahierenden Areale innerhalb der Embryoid Bodies ergab, wurden alternative Analysemethoden getestet. Neben der Analyse des Aktin Gehaltes durch Zell ELISA, und des Aktinin Gehaltes durch Durchflusszytometrie erwies sich insbesondere die Messung der β Myosin Expression durch quantitative Real-Time PCR als besonders vielversprechend. Die Messung der unter dem Einfluss der Testsubstanzen veränderten Expression des Myosin Gens liefert einen neuen, einfach zu quantifizierenden Endpunkt in der Embryotoxizitätsmessung.

Die Eignung des Embryonalen Stammzelltest (EST) zur frühen Vorselektion der Testsubstanzen konnte dargestellt werden. Ein vollständiger Verzicht auf Tierversuche kann der EST jedoch nicht gewährleisten. Substanzen, die im EST als unbedenklich eingestuft werden, müssen vor ihrem Einsatz an Mensch oder Tier noch in kontrollierten Versuchen an Vertebraten bezüglich ihrer Embryotoxizität getestet werden.