



Entwicklung eines *in vitro*-Herzzell-Modells für embryotoxikologische und pharmakologische Studien

Anna M. Wobus und Jürgen Hescheler*

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung,
Corrensstr. 3, O-4325 Gatersleben, Deutschland

*Institut für Pharmakologie der FU Berlin,
Thielallee 69/72, W-1000 Berlin 33, FRG

Zusammenfassung

Aus frühen Embryonalstadien der Maus – Blastomeren von 8-Zell-Embryonen oder Blastozysten – können permanente Zelllinien pluripotenter embryonaler Stammzellen (ESC) etabliert werden. Wir entwickelten ein *in vitro*-Differenzierungssystem, das eine optimale Differenzierung von ESC zu spontan pulsierenden Herzmuskelzellen ermöglicht.

Die differenzierten Herzmuskelzellen reagierten mit typischen chronotropen Antworten und Veränderungen der Aktionspotentiale auf herzaktive Verbindungen. Die β -Adrenozeptor-Agonisten (-)Isoprenalin und Clenbuterol, die Mediatoren des cAMP-Stoffwechsels Forskolin und Isobutylmethylxanthin und der α_1 -Adrenozeptor-Agonist (-)Phenylephrin führten zu positiv chronotropen Reaktionen. Der Cholinozeptor-Agonist Carbachol und die L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker Nisoldipin, Diltiazem und Gallopamil induzierten negativ chronotrope Effekte.

In teilweise differenzierten Herzmuskelzellen sind β_1 -, α_1 -Adrenozeptoren und Ca^{2+} -Kanäle, aber keine β_2 -Adrenozeptoren an der chronotropen Reaktion beteiligt. Terminal differenzierte Herzmuskelzellen exprimierten auch β_2 -Adrenozeptoren und zeigten chronotrope Reaktionen gegenüber Digitoxin.

Die Kontraktionen der spontan pulsierenden Herzmuskelzellen waren synchron zu rhythmischen Aktionspotentialen. Die Aktionspotentiale zeigten die charakteristische Form von embryonalen Herzmuskel- und Sinusknotenzellen.

Das vorgestellte ESC-Differenzierungssystem ist ein geeignetes *in vitro*-Zellmodell zum Studium von Differenzierung und «Commitment» und darüberhinaus ein alternatives *in vitro*-System für pharmakologische und reproduktionstoxikologische Untersuchungen, die eine Verminderung des Tierversuchs erlauben.

Summary: Development of an in vitro cardiomyocytes cell model for embryotoxicological and pharmacological studies

Permanent cell lines of pluripotent embryonic stem cells (ESC) are established from early embryonic stages (blastomeres of 8-cell embryos or blastocysts) of the mouse.

We developed an *in vitro* system for differentiation which allowed the optimal development of ESC into spontaneously pulsating cardiomyocytes.

The ESC-derived cardiomyocytes responded to cardioactive substances with heart-specific chronotropic reactions and modifications of the action potentials. The β -adrenoceptor agonists (-)isoprenaline and clenbuterol, the mediators of the cAMP pathway forskolin and isobutylmethylxanthine as well as the α_1 -adrenoceptor agonist (-)phenylephrine caused positive chronotropic reactions. The muscarinic cholinergic agonist carbachol and the L-type Ca^{2+} channel blockers nisoldipine, diltiazem and gallopamil induced negative chronotropic effects.

β_1 -, α_1 -adrenoceptors and Ca^{2+} channels, but no β_2 -adrenoceptors are involved in the chronotropic reaction of early developmental states of cardiomyocytes. Terminally differentiated cardiomyocytes expressed β_2 -adrenoceptors and displayed a positive chronotropic response to digitoxin.

The contractions of spontaneously pulsating cardiomyocytes were concomitant with rhythmic action potentials characteristic to those described for embryonic cardiomyocytes and sinusnode cells.

The presented ESC-differentiation system may be useful for *in vitro* studies of cell differentiation and commitment. Furthermore, it may provide an alternative model for pharmacological investigations and for reproductive toxicology thus reducing animal use.

Einleitung

Zum Studium der Differenzierung von Säugerzellen *in vitro* stehen verschiedenste Zellmodelle zur Verfügung, die – meist ausgehend von Stammzellen – Untersuchungen z.B. der Gliazelldifferenzierung (0-2A Vorläuferzellen), der Skelettmuskeldifferenzierung (10 T 1/2-Zellen) oder der Hämatopoese (Friend Erythroleukämie-Zellen, HL-60-Zellen) erlauben (16). Darüberhinaus werden Entwicklungsstudien auch an *in vitro* differenzierenden Organsystemen durchgeführt, wie z.B. an den Extremitätenknospen von Laborsäugetieren, den «limb buds» (12). Alle diese *in vitro*-Zellsysteme gehen allerdings nicht von undifferenzierten, noch nicht determinierten («uncommitted») embryonalen Zellen aus, sondern werden mit bereits determinierten Stammzellpopulationen durchgeführt, die während der *in vitro*-Kultur eine terminale Differenzierung durchlaufen.

In vitro-Untersuchungen der embryonalen Differenzierung, der Differenzierungskapazität und der Differenzierungsrichtung embryonaler Zellen in eine spezifische «Zelllinie» («cell lineage») sind mit solchen bereits determinierten Zellsystemen nicht, bzw. nur eingeschränkt möglich. Aus diesem Grund ist man für toxikologische Untersuchungen bisher noch auf Studien an Zellen aus neugeborenen Tieren angewiesen.



Seit langem bestehen deshalb Forderungen nach der Entwicklung neuer *in vitro*-Zellmodelle für Untersuchungen der frühen Säugerembryogenese, insbesondere für die Reproduktionstoxikologie (11).

Eine Alternative zur Verwendung von neugeborenen Ratten oder Mäusen können *in vitro*-Untersuchungen an den beiden pluripotenten embryonalen Zellsystemen, den embryonalen Karzinomzellen (ECC) und den embryonalen Stammzellen (ESC) der Maus sein.

Eigenschaften der embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen, ESC) sind permanente Linien, die aus den undifferenzierten pluripotenten embryonalen Zellen des Maus-embryos kultiviert werden (2, 3, 6, 18–20). Sowohl einzelne Blastomeren von 8-Zell-Embryonen, als auch Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste werden *in vitro* auf «feeder-layer» embryonaler Maus-Fibroblasten (18–20) oder in Anwesenheit spezifischer Differenzierungs-Hemmfaktoren (17, 20) vermehrt und als permanente Zelllinien kultiviert (Abb. 1). Diese ES-Zellen besitzen auch nach Kultivierung die Fähigkeit, in Derivate aller drei Keimblätter, die entodermale, ektodermale und mesodermale «Linie» («lineage») zu differenzieren. So können aus embryonalen Stammzellen nach *in vitro*-Differenzierung Entoderm (Magen-Darmtrakt, Leber und Pankreas), neuronale und epitheliale Zellen (Ektoderm), Fibroblasten, Blutzellen, Herz- und Skelettmuskelzellen (Mesoderm) differenzieren. Diese differenzierten Zelltypen werden mit Hilfe monoklonaler Antikörper, über den Nachweis der Expression gewebespezifischer Gene, oder durch pharmakologische Reaktionen charakterisiert (z.B. 8, 9, 20).

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen können embryonale Karzinomzellen (EC-Zellen, ECC), die Stammzellen von Teratokarzinomen (Abb. 1), in der Regel nur nach Induktion mit spezifischen Differenzierungsfaktoren *in vitro* differenzieren (z.B. P19-Linie), zeigen aber wie die ESC, nach Differenzierung in die entodermale, ektodermale und mesodermale «lineage» die Ausprägung zellspezifischer Merkmale (8). Embryonale Stammzellen bilden nach subkutaner Injektion in syngene Mäuse (mit identischem Erbmateriale) Tumoren, Teratome oder Teratokarzinome. Während erstere gutartig sind, bilden letztere auf Grund der Anwesenheit von undifferenzierten Stammzellen bösartige und transplantable Tumoren. Werden ECC oder ESC in nicht-adhäsiven Kulturschalen kultiviert, differenzieren

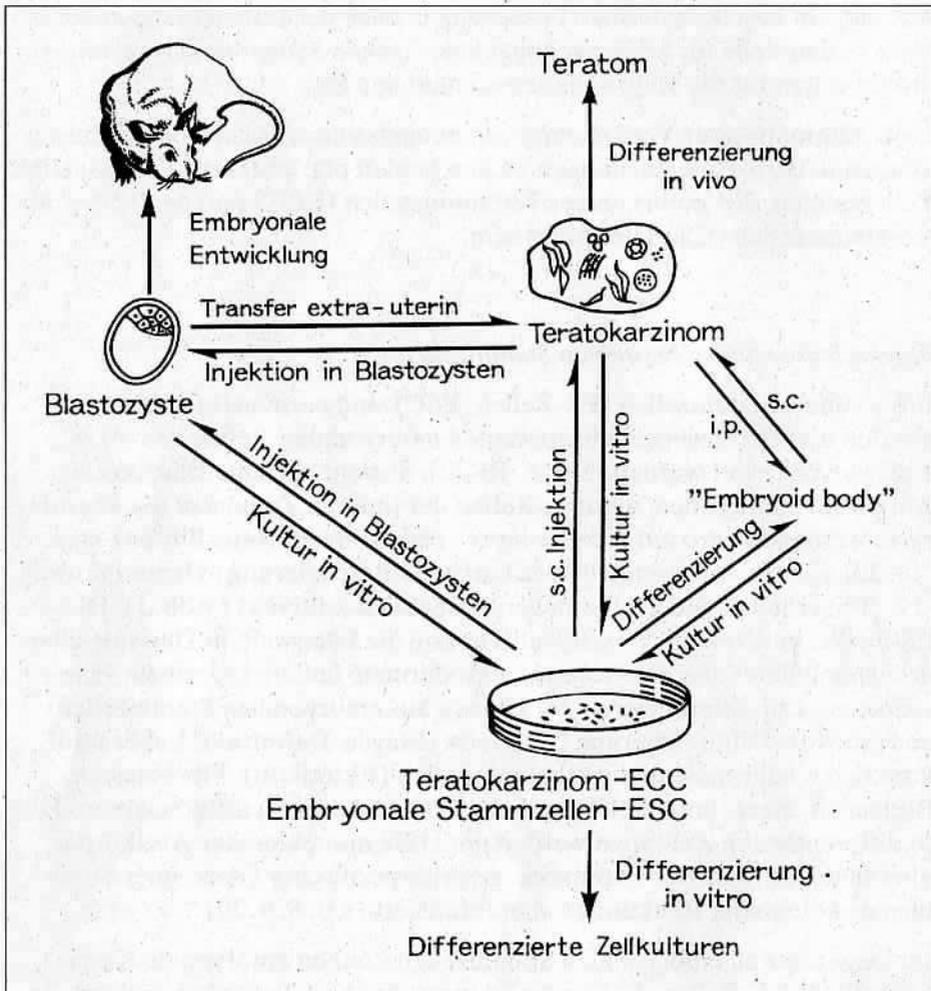


Abb. 1: Induktion und Gewinnung embryonaler Stammzellen (ESC) und embryonaler Karzinomzellen (ECC) aus Blastozysten der Maus, ihre Beziehungen zu frühen Embryonalstadien, sowie ihre Differenzierung *in vivo* und *in vitro*.

sie in Embryo-ähnliche Zellaggregate, die sogenannten «embryoid bodies» (Abb. 1, zur Morphologie siehe Abb. 3).

Nach Rückführung der embryonalen Stammzellen in frühe Embryonalstadien, z.B. nach Injektion in Blastozysten, können die totipotenten ESC

an der nachfolgenden embryonalen und fötalen Entwicklung teilnehmen und Gewebe und Organsysteme des Embryos bilden (1). Wenn totipotente ESC in diesen Chimären neben somatischen Geweben auch die Keimzellen bilden, ermöglicht dies die Übertragung der genetischen Information der ESC auf die Nachkommen. Die Totipotenz der ESC erlaubt damit Strategien des Gentransfers in Säuger, wie z.B die Übertragung von Genen, bzw. die Ausschaltung («knock out») von Genfunktionen über «homologe Rekombination» in ES-Zellen und deren nachfolgende Übertragung in Blastozysten. Für grundlegende Untersuchungen der Säugerembryogenese sind ES-Zellen deshalb seit einigen Jahren unverzichtbares Versuchsobjekt (13). Wir haben uns in unseren Arbeiten auf die Differenzierungskapazität der ES-Zellen *in vitro* konzentriert und insbesondere die Herzzelldifferenzierung untersucht.

In vitro-Differenzierung embryonaler Stammzellen in Herzmuskelzellen

Solange ES-Zellen auf «feeder-layer»-Zellen kultiviert werden, vermehren sie sich im undifferenzierten Zustand ohne zu reifen. Eine Differenzierung

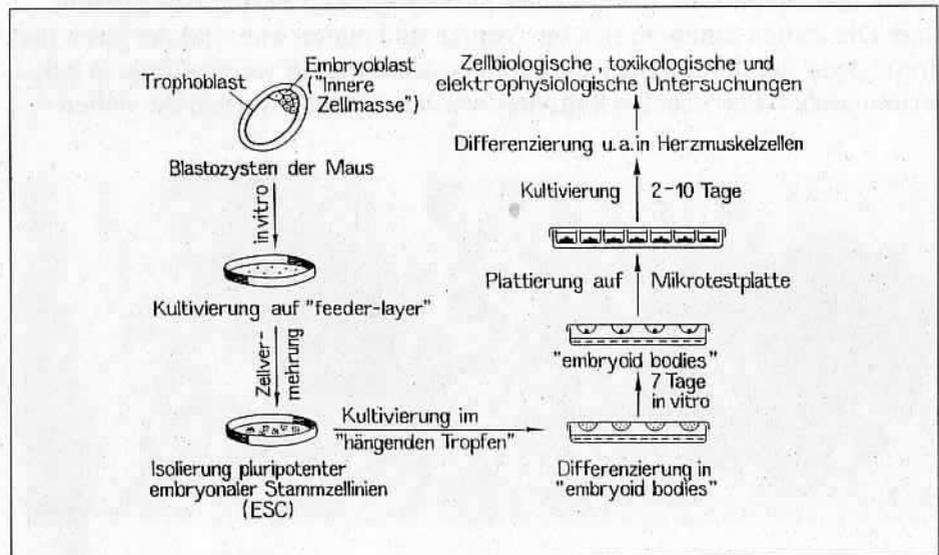


Abb. 2: Methode der *in vitro*-Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESC) zu Herzmuskelzellen.

der ES-Zellen wird erst ausgelöst, wenn diese ohne «feeder-layer», in geringer Zelldichte, oder in der Form von Zellaggregaten, den sogenannten «embryoid bodies», kultiviert werden (Abb. 2, 3). Für unsere Betrachtungen kommt vor allem der Kultivierung von ES-Zellen in «embryoid bodies» eine besondere Bedeutung zu, da diese Form der *in vitro*-Kultur die Verhältnisse am lebenden Embryo am besten widerspiegelt: ein vier bis fünf Tage kultivierter «embryoid body» entspricht in seinem prinzipiellen zellulären Aufbau einer Blastozyste zum Zeitpunkt der Implantation (undifferenzierte Stammzellen sind von einer Schicht entodermaler Zellen umgeben), während ein sieben bis acht Tage alter «embryoid body» etwa einem Embryo des Eizylinder-Stadiums entspricht (neben entodermalen Zellen haben sich auch ektodermale und mesodermale Zellen entwickelt).

Wir konnten nun feststellen, dass die Differenzierungskapazität der embryonalen Stammzellen in Herzmuskelzellen vor allem von der Grösse des Aggregates, d.h., von der Zahl der ES-Zellen im «embryoid body», abhängt (20). Aus diesem Grund nutzten wir ein Kultivierungssystem (8, 15, 20), das eine Differenzierung der ES-Zellen in «embryoid bodies» definierter Grösse ermöglicht, die Kultur im «hängenden Tropfen» (Abb. 2). Eine Zellsuspension, die etwa 400 Zellen in 20 µl enthält, wird auf die Deckel von Petrischalen pipettiert, die mit einer physiologischen Pufferlösung gefüllt sind. Die Zellen sammeln sich im Tropfen und bilden während der zwei- bis dreitägigen Inkubation die «embryoid bodies», die für weitere Tage in bakteriologischen Petrischalen kultiviert werden. Danach werden die sieben

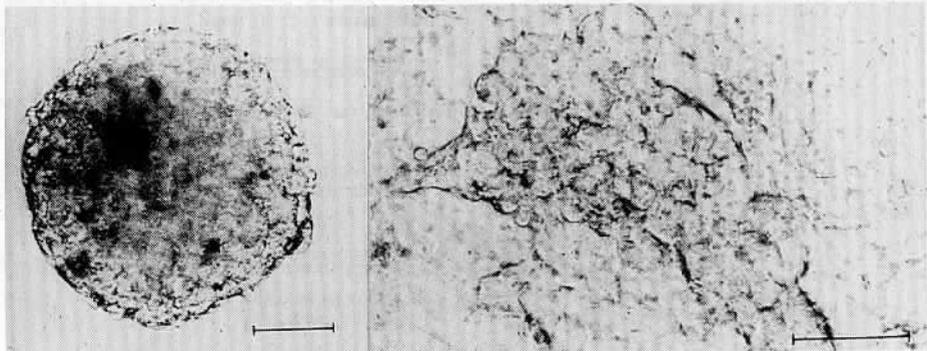


Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahme eines vier Tage alten «embryoid body» (links) und eines Areals differenzierter spontan pulsierender Herzmuskelzellen (rechts). Phasenkontrast, Balken = 100 µm.

Tage alten «embryoid bodies» auf Mikrotest-Gewebekulturschalen übertragen, wo sie auf dem Gelatine-beschichteten Substrat anhaften. Während der darauffolgenden Kultivierung wachsen verschiedene Zelltypen aus, und bereits nach ein bis zwei Tagen sind die ersten spontan pulsierenden Herzmuskelzellen innerhalb der differenzierenden Zellpopulation zu beobachten (Abb. 3).

Dieses Kultursystem kann mit verschiedenen Differenzierungszeiten prinzipiell auch für andere Differenzierungen, wie z.B. der Hämatopoese (9), der Angiogenese und Vaskulogenese (7), sowie der Skelettmuskeldifferenzierung (19) eingesetzt werden.

Ergebnisse

In vitro differenzierte Herzmuskelzellen pulsieren spontan

ES-Zellen zweier permanenter Linien (D3- und BL17 Zelllinie), die sieben Tage als «embryoid body» kultiviert und nach Auswachsen auf Gewebekulturschalen differenzierten, entwickeln zeitabhängig spontan pulsierende Herzmuskelzellen (3,20): zwei bis zehn Tage nach Ausplattierung der «embryoid bodies» enthalten etwa 80 bis 90 % der ausgewachsenen «embryoid body»-Kolonien spontan und synchron pulsierende Herzmuskelzellen. Während der Kultivierungszeit variiert auch die basale Pulsationsrate. Maximale Schlagfrequenzen von etwa 115 Pulsationen/ min werden sechs bis neun Tage nach Ausplattierung der «embryoid bodies» ermittelt. Elektrophysiologische Untersuchungen zur Messung der Membranpotentiale ergaben, daß die spontan pulsierenden Herzmuskelzellen rhythmische Aktionspotentiale ausbilden, die den typischen Verlauf von embryonalen Kardiomyozyten und Sinusknotenzellen (5, 14) zeigen. Während der Diastole zeigt das Membranpotential eine Depolarisation von etwa -55 mV auf -40 mV. Von dieser Schwelle aus werden langsame (Steigung während der Aufstrichphase ca. 1,4 V/s) Aktionspotentiale ausgelöst. Die maximale Gesamtamplitude der Aktionspotentiale beträgt etwa 70 mV, die mittlere Dauer etwa 100 ms (Abb. 5 A, obere Reihe). Zusammenfassend ergab die elektrophysiologische Charakterisierung der aus ESC differenzierten Herzmuskelzellen, daß kein signifikanter Unterschied zu den im lebenden Organismus entwickelten Herzmuskelzellen besteht (10).

In vitro differenzierte Herzmuskelzellen zeigen herzzell-spezifische pharmakologische Eigenschaften

Wir untersuchten die funktionelle Expression herzzellspezifischer Rezep-

toren und Signaltransduktions-Mechanismen, sowie die Wirkung kardiotroper Pharmaka an den aus ESC der Linien D3 und BL17 differenzierten Herzmuskelzellen. Desweiteren interessierte uns die Frage, ob das Zellsystem eine differenzierungsabhängige Charakterisierung dieser Parameter erlaubt. Folgende Substanzen wurden getestet (15, 20):

Substanz	Wirkung
(-)Isoprenalin	β -Adrenozeptor-Agonist
Forskolin	Aktivator der Adenylatzyklase
Isobutylmethylxanthin	Inhibitor der cAMP-abbauenden Phosphodiesterase
(-)Phenylephrin	α_1 -Adrenozeptor-Agonist
Clenbuterol	β_2 -Adrenozeptor-Agonist
Carbachol	Muskariner Cholinozeptor-Agonist
Digitoxin	Herzglykosid
Nisoldipin, Isradipin	Ca ²⁺ -Kanal-Blocker: 1,4-Dihydropyridin-Typ
Gallopamil	Ca ²⁺ -Kanal-Blocker: Phenylalkyl-Typ
Diltiazem	Ca ²⁺ -Kanal-Blocker: 1,5-Benzothiazepin-Typ
BayK 8644	Ca ²⁺ -Kanal-Öffner: 1,4-Dihydropyridin-Typ

Wir konnten nachweisen, daß die *in vitro* aus ESC differenzierten Herzmuskelzellen Adrenozeptoren und muskarine Cholinozeptoren sowie Calcium-Kanäle des L-Typs entwickelten und eine chronotrope Reaktion gegenüber Digitoxin zeigten (20): (-)Isoprenalin, Forskolin, Isobutylmethylxanthin, (-) Phenylephrin, Clenbuterol und Digitoxin führten zu positiv chronotropen Effekten; Carbachol, Nisoldipin, Gallopamil und Diltiazem resultierten in negativ chronotropen Effekten an den *in vitro* differenzierten Herzmuskelzellen. Als Beispiel sind in Abb. 4 Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt, die den positiv chronotropen Effekt von (-)Isoprenalin (A) zeigen, der durch den β_1 -Adrenozeptor-Antagonist Bisoprolol, aber nicht durch den β_2 -Adrenozeptor-Antagonist ICI 118.551 aufgehoben wird. Der negativ chronotrope Effekt von Carbachol (B) wird durch den muskarinen Cholinozeptor-Antagonist Atropin gehemmt.

Die negativ chronotropen Effekte der Ca²⁺-Kanal-Blocker sind in Abb. 5 B dargestellt. Der Befund, daß aus ESC differenzierte Herzmuskelzellen ähnliche pharmakologische Reaktionen wie neonatale Herzmuskelzellen (21) zeigten, wurde durch elektrophysiologische Messungen der Membranpotentiale bestätigt. Abb. 5 A demonstriert den Einfluß des Ca²⁺-Kanal-Blockers Isradipin und des Ca²⁺-Kanal-Aktivators BayK 8644 auf die Ak-

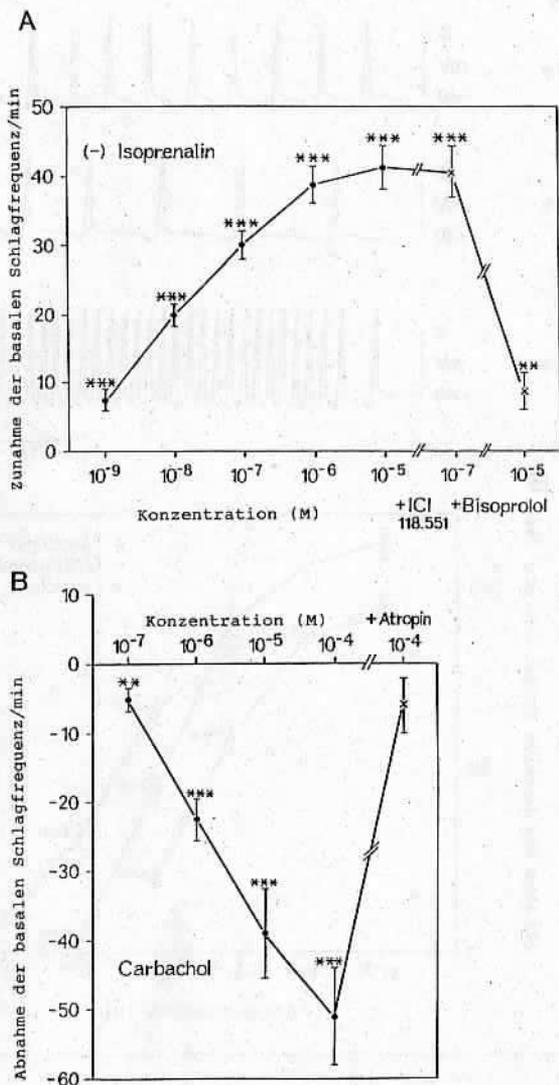


Abb. 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des chronotropen Effektes von (-)-Isoprenalin (A) und Carbachol (B) an Herzmuskelzellen aus zwei Tage differenzierten «embryoid bodies».

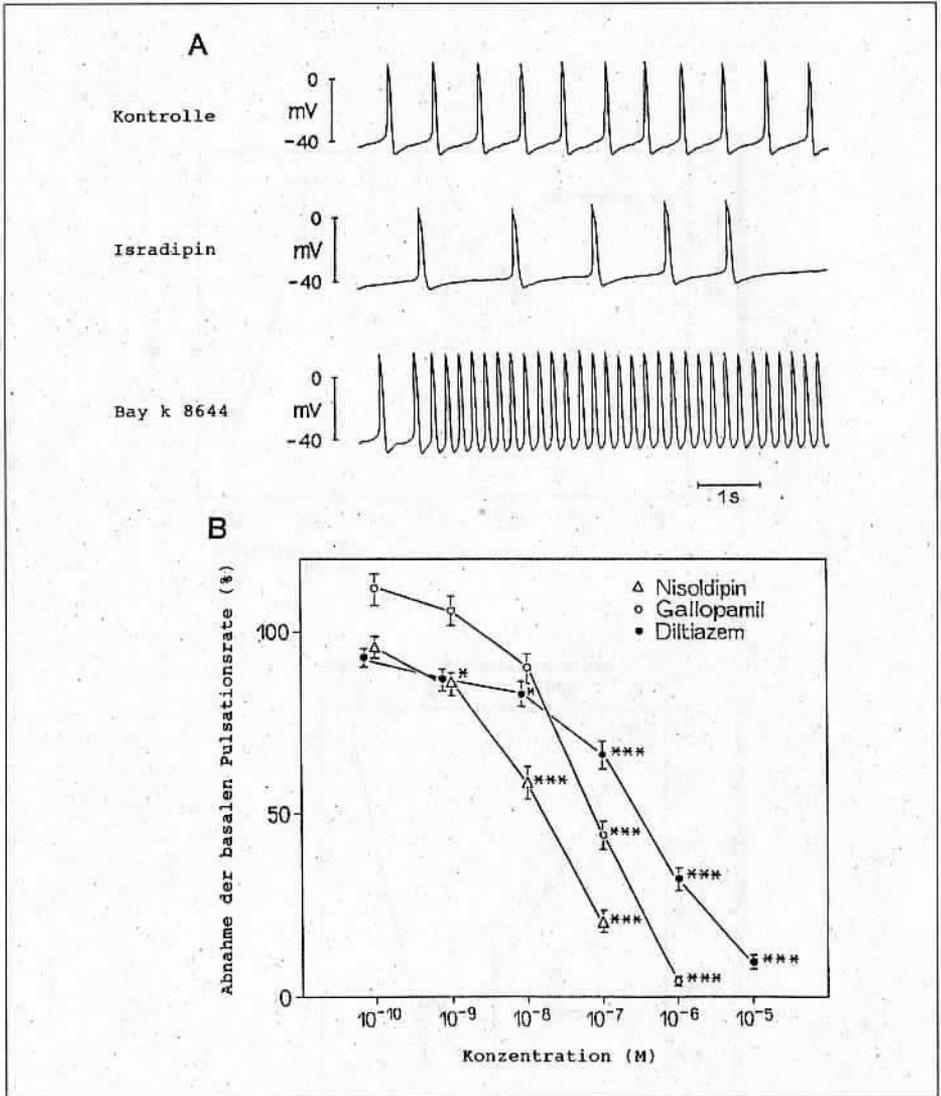


Abb. 5: Effekte eines Ca²⁺-Kanal-Blockers (Isradipin) und -Öffners (BayK 8644) auf differenzierte Herzmuskelzellen der ESC-Linie D3.

(A): Messungen von Aktionspotentialen von Kontrollzellen (obere Reihe), von Zellen nach Behandlung mit Isradipin (mittlere Reihe) und BayK 8644 (untere Reihe).

(B): Negativ chronotrope Effekte (B) der Ca²⁺-Kanal-Blocker Nisoldipin (△), Gallopamil (○) und Diltiazem (●).

tionspotentiale der *in vitro* differenzierten Herzmuskelzellen. Isradipin führte zu einer Verlangsamung der diastolischen Depolarisation (Abb. 5 A, mittlere Reihe), BayK 8644 zu einer Beschleunigung (Abb. 5 A, untere Reihe).

Funktionelle Expression von Rezeptoren in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium der Herzmuskelzellen

Während die β_1 -, α_1 -Adrenozeptoren und muskarinen Cholinozeptoren bereits in einem frühen Differenzierungszustand, nämlich bereits zwei Tage nach Ausplattierung der «embryoid bodies», funktionell aktiv waren, sind β_2 -Adrenozeptoren offenbar noch abwesend: Clenbuterol, ein selektiver β_2 -Agonist, führte an diesen früh differenzierten Herzmuskelzellen zu keiner pharmakologischen Reaktion. Erst vier bis fünf Tage nach Ausplattierung der «embryoid bodies» wurde ein positiv chronotroper Effekt von Clenbuterol nachgewiesen, der sich mit zunehmender Differenzierungsdauer erhöhte (20). Ebenso war das herzaktive Glykosid Digitoxin in frühen Entwicklungsstadien funktionell nicht aktiv, und erreichte signifikant positiv chronotrope Effekte erst nach etwa fünf Tagen der «embryoid body»-Differenzierung. Eine parallel durchgeführte Untersuchung an neonatalen Herzmuskelzellen (kultiviert nach Ref. 4) ergab übereinstimmende chronotrope Reaktionen der sechs Tage kultivierten neonatalen Herzmuskelzellen der Maus mit ESC-differenzierten Herzmuskelzellen, die nach sieben bis neun Tagen der «embryoid bodies» differenziert waren. Die Befunde sprechen dafür, daß während der *in vitro*-Differenzierung eine entwicklungsabhängige Kontrolle der funktionellen Expression spezifischer Rezeptoren erfolgt.

Ausblick

Ein optimaler Zeitpunkt für Untersuchungen über pharmakologische Reaktionen an *in vitro* differenzierten Herzmuskelzellen ist fünf Tage nach Ausplattierung sieben Tage alter «embryoid bodies» (20).

Da es bisher noch keine permanenten Zelllinien pulsierender Herzmuskelzellen gibt, könnten Untersuchungen an diesen differenzierten Herzmuskelzellen den Verbrauch von Säugerembryonen für Kardiotoxizitätsstudien weitgehend vermeiden.

Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, das ESC-Differenzierungssystem für Untersuchungen über kardiotope Effekte embryotoxischer Substanzen



im Rahmen von reproduktionstoxikologischen Studien einzusetzen. Die induktionsabhängige ECC-Linie (P19) gestattet weiterhin, die Auswirkung von Differenzierungsfaktoren und Pharmaka auf die Differenzierungskapazität in die myogene «lineage» zu studieren.

In gegenwärtigen Experimenten untersuchen wir den Einfluß von zu verschiedenen Zeiten während der *in vitro*-Differenzierung applizierten Pharmaka und embryotoxischen Verbindungen auf die Herzzelldifferenzierung.

Danksagung

Die Arbeiten wurden mit finanzieller Förderung der ZEBET, Bundesgesundheitsamt Berlin (Fo 2.1-1328-112) und Mitteln des Ministeriums für Wissenschaft und Forschung des Landes Sachsen-Anhalt durchgeführt. Wir danken insbesondere dem Leiter der ZEBET, Herrn Prof. Horst Spielmann, für fortwährende Unterstützung und Förderung.

Literatur

1. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H. and Robertson, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
2. Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential stem cells from mouse embryos. *Nature* 291:154-156
3. Doetschmann, T.C., Eistetter, H.R., Katz, M., Schmidt, W. and Kemler, R. (1985) The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 87:27-45.
4. Halle, W. and Wollenberger, A. (1971) Differentiation and behavior of isolated embryonic and neonatal heart cells in a chemically defined medium. *Am. J. Cardiol.* 25:292-299.
5. Irisawa, H. (1989) The action potentials of cardiomyocytes. In: *Isolated adult cardiomyocytes*. Piper, H.M. and Isenberg, G. (eds.) vol. 2. Electrophysiology and contractile function. Chapter 1, CRC Press, Boca Raton, pp.1-12.
6. Martin, G. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7634-7638.
7. Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.-G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R. and Doetschman, T. (1988) Vasculogenesis and angiogenesis in embryonicstemcell-derived embryoid bodies. *Development* 102:471-478.
8. Rudnicki, M.A. and McBurney, M.W. (1987) Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In: *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. Robertson, E.J. (ed.) IRL Press, Oxford, pp.19-49.

... UND WEGEN IHRER
IN-VITRO-METHODE HABEN BEI
UNS 500 RATTEN
JEDLICHEN LEBENSINN
VERLOREN!!

KSTENON





9. Schmitt, R.M., Bruyns, E. and Snodgrass, H.R. (1991) Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes and Development* 5: 728-740.
10. Sperelakis, N. and Pappano, A.J. (1983) Physiology and pharmacology of developing heart cells. *Pharmacol. Ther.* 22:1-39.
11. Spielmann, H. and Eibs, H.G. (1978) Recent progress in teratology: a survey of methods for the study of drug actions during preimplantation period. *Arzneim.Forsch./Drug Res.* 28:1733-1743.
12. Tabin, C.J. (1991) Retinoids, homeoboxes, and growth factors: Towards molecular models for limb development. *Cell* 66:199-217.
13. Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
14. Trautwein, W. and Hescheler, J. (1990) Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 52:257-274.
15. Wallukat, G. and Wobus, A.M. (1991) Use of spontaneously beating heart muscle cells differentiating from pluripotential embryonic stem cells for testing of chronotropic agents. *Recent Developments in Toxicology: Trends, Methods and Problems. Arch. Toxicol., Suppl.* 14, 136-138, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
16. Watt, F.M. (1991) Cell culture models of differentiation. *FASEB J.* 5:287-294.
17. Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Wilson, T.A., Stewart, C.I., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. and Gough, N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibiting factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684-687.
18. Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jäkel, P. and Schöneich, J. (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp. Cell Res.* 152:212-219.
19. Wobus, A.M., Grosse, R. and Schöneich, J. (1988) Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro. *Bio-med. Biochim. Acta* 47:965-973.
20. Wobus, A.M., Wallukat, G. and Hescheler, J. (1991) Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca^{2+} channel blockers. *Differentiation* 48:173-182.
21. Wollenberger, A. (1985) Isolated heart cells as a model of the myocardium. *Basic Res. Cardiol.* 80, Suppl. 2:9-14.

Die beiden Verfasser dieses Artikels, Anna M. Wobus und Jürgen Hescheler, wurden gegen grosse Konkurrenz mit dem Hildegard-Dorenkamp/Gerhard-Zbinden-Preis 1991 ausgezeichnet. Die Preisverleihung fand im April 1992 in Baltimore am «10th Anniversary Symposium CAAT» statt. Wir gratulieren herzlich und freuen uns, die international anerkannte Arbeit hier vorzustellen.

Die Redaktion