

Etablierung molekularer Endpunkte zur Weiterentwicklung des Embryonalen Stammzelltests (EST) mit embryonalen Stammzellen der Maus (Zelllinie D3)

Andrea Seiler, Anke Visan, Ingeborg Pohl, Elke Genschow, Roland Buesen und Horst Spielmann
Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

Zusammenfassung

Der embryonale Stammzelltest (EST), der in den letzten Jahren bei ZEBET entwickelt wurde, basiert auf der Fähigkeit embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) der Maus, *in vitro* in rhythmisch kontrahierende Herzmuskelzellen zu differenzieren, die mikroskopisch detektiert werden können. Im Vergleich zu anderen *in vitro* Säugetier-Modellen kann somit auf den Einsatz trächtiger Tiere zur Gewinnung embryonaler Gewebe vollkommen verzichtet werden. Mit dem EST wird der Einfluss von teratogenen und embryotoxischen Testchemikalien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in kontrahierende Herzmuskelzellen untersucht. Diese Ergebnisse werden in Relation zum zytotoxischen Effekt der Substanzen auf ES-Zellen und auf differenzierte Zellen (3T3 Maus-Fibroblasten) bewertet. Anhand von Konzentrations-Wirkungskurven werden Halbhemmkonzentrationen (ID_{50} , IC_{50}) bestimmt, die die Klassifizierung der Testsubstanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen „nicht, schwach oder stark“ embryotoxisch gestatten. Die Klassifizierung erfolgt mit einem biostatistischen Prädiktionsmodell. Ziel unserer gegenwärtigen Arbeiten in Kooperation mit Firmen der deutschen Arzneimittel-Industrie ist die Weiterentwicklung des EST. Neben der Herzzelldifferenzierung sollen neue relevante Endpunkte auf molekularer Ebene durch FACS-Analysen, TaqMan-PCR und der Microarray-Technik erfasst werden. Die Weiterentwicklung soll außerdem die Entwicklung der ES-Zellen in weitere Gewebe, wie z.B. neuronale Differenzierung, Angiogenese/Vaskulogenese und Knorpel- und Knochendifferenzierung einschließen. Erste Ergebnisse zur Erfassung der Herzzelldifferenzierung durch spezifische Anfärbung von gewebespezifischen Markerproteinen und dem semi-quantitativen Nachweis mittels der FACS-Analyse weisen darauf hin, dass die neuen molekularen Endpunkte zu einer Verbesserung der Embryotoxizitätsprüfung mit Stammzellen der Maus im EST führen werden.

Summary: Improving the embryonic stem cell test (EST) by establishing molecular endpoints of tissue specific development using murine embryonic stem cells (D3 cells).

Blastocyst-derived pluripotent embryonic stem (ES) cells of the mouse can be induced to differentiate *in vitro* into a variety of cell types, including cardiac muscle cells. In the embryonic stem cell test (EST) the capacity of ES cells of the mouse cell line D3 to differentiate into contracting cardiomyocytes is used to assess the embryotoxic potential of test compounds and in addition, the effects on the viability of ES cells and differentiated mouse fibroblasts (cell line 3T3) are compared. The three endpoints are used to classify the embryotoxic potential of chemicals after 10 days of exposure: (i) the inhibition of differentiation of ES cells into cardiomyocytes (ID_{50}) and (ii) the decrease of viability of 3T3 cells ($IC_{50}3T3$) and (iii) ES cells ($IC_{50}D3$) in a MTT cytotoxicity test. Applying linear analysis of discriminance, a biostatistical prediction model (PM) was developed to assign test chemicals to three classes of embryotoxicity. In an international validation study funded by ECVAM it could be demonstrated that the EST can predict the embryotoxic potential of a test compound as good as frequently used mammalian systems based on pregnant animals. In a joint project with major German pharmaceutical companies we are attempting to improve the EST by establishing molecular endpoints of differentiation (e.g. cardiac, neuronal, chondrogenic) in cultured ES cells. We have studied the expression of tissue specific proteins in ES cell cultures in the presence of embryotoxic chemicals by immunofluorescent antibody techniques, e.g. FACS analysis. The other groups are focusing on endogenous gene expression in early development by RT-PCR methods or the DNA microarray technique. The results obtained recently using molecular markers specific for cardiac differentiation and employing intracellular flow cytometry for quantification will be presented. Molecular endpoints will allow improvement of the EST by measuring gene expression patterns in a small number of murine ES cells.

Keywords: embryonic stem (ES) cells, embryotoxicity, embryonic stem cell test, mouse, D3 cells, intracellular flow cytometry

1 Einleitung

Zur Vorhersage der toxischen Wirkung von Chemikalien oder Wirkstoffen auf den komplexen Reproduktionszyklus kommen bis heute vorwiegend Tierversuche zum Einsatz, die zum einen sehr zeitaufwendig und kostenintensiv und zum anderen häufig stark belastend für die Tiere sind. In den letzten Jahren gehen die Bemühungen immer mehr dazu über, Alternativmethoden zu entwickeln, um die Versuchstierzahlen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie zu verringern. Darüber hinaus ist es bei der Arzneimittelentwicklung wünschenswert, ein Testsystem zu besitzen, das frühzeitig das teratogene Potential eines Arzneimittelkandidaten anzeigt.

Die ersten Ansätze zur Entwicklung von Alternativmethoden in der Reproduktionstoxikologie wurden bereits Mitte der 70er Jahre entwickelt, zunächst um Mechanismen normaler und anormaler Entwicklung zu studieren (Ebert and Marois, 1975), später aber auch als *Screening*-Methode für teratogene Substanzen (Wilson, 1978; Kimmel et al., 1982). *In vitro* Modelle können in der Reproduktionstoxikologie jedoch nur Teilaspekte des Reproduktionszyklus erfassen. Vor allem im Bereich der Teratogenität und Embryotoxizität, also für permanente funktionelle und/oder strukturelle Störungen des sich entwickelnden Embryos, wurde eine Reihe von Alternativmethoden vorgeschlagen, die jedoch mit Nachteilen behaftet sind. Tests mit Hühner-, Frosch- und Fischembryonen sowie mit Embryonen der Fruchtfliege haben den Nachteil, dass es sich nicht um Säugetier-Systeme handelt. Ansätze, die mit etablierten Zelllinien, wie z.B. ovariellen Tumorzellen der Maus (Braun et al., 1982) oder menschlichen Zellen des Gaumenplattenmesenchyms (Pratt et al., 1982) arbeiten, konnten sich wegen unzureichender Prädiktivität nicht durchsetzen (ECETOC, 1989).

In vitro Säugetier-Systeme mit Kulturen ganzer Rattenembryonen (*Rat Postimplantation Whole Embryo Culture*, Piersma et al., 1996) und die sog. *Micromass* Kultur von Zellen der Extremitätenknospen von Rattenembryonen (*Micromass Culture*, Flint and Orton, 1984; Kistler, 1987) sind in den Labora-

torien der chemischen und pharmazeutischen Industrie zwar teilweise zum *Screening* bei der Substanzentwicklung etabliert (Kistler, 1987; Cicurel and Schmid, 1988), haben jedoch den Nachteil, dass trächtige Tiere getötet werden müssen, um Embryonen oder embryonale Gewebe zu gewinnen. Eine Alternative dazu bietet der Embryonale Stammzelltest (EST), der in den letzten Jahren bei ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) entwickelt wurde (Spielmann et al., 1997). Er basiert auf einer permanenten embryonalen Stammzelllinie der Maus, so dass auf den Einsatz trächtiger Tiere vollkommen verzichtet werden kann. Der EST wurde gerade zusammen mit dem *Whole Embryo Culture Test* und dem *Micromass Test* im Rahmen einer internationalen ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) Studie erfolgreich validiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der EST im Vergleich zu den anderen beiden beteiligten *in vitro* Säugetiermodellen keinesfalls eine geringere Voraussagekraft für den Menschen besitzt. Im Gegenteil, der EST erzielte im Vergleich zum *Micromass Test* sogar noch bessere Resultate in Hinblick auf das Klassifizierungsergebnis. Mit dem EST wurden für 78% der Experimente das richtige embryotoxische Potential vorhergesagt, während der *Micromass Test* nur 69% richtige Klassifizierungen erreichte (Genschow et al., 2002).

Pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen), isoliert aus der inneren Zellmasse der Blastozyste der Maus (Doetschmann et al., 1985), können in Zellkultur mit Hilfe des *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) im undifferenzierten Stadium gehalten werden (Williams et al., 1988). Unter definierten Kulturbedingungen und ohne Einwirkung von LIF können ES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter Endoderm, Ectoderm und Mesoderm differenzieren, und zwar in vielerlei Hinsicht ganz analog zur frühen Embryonalentwicklung *in vivo*. So differenziert ein nicht geringer Teil der Stammzellen *in vitro* spontan zu kontrahierenden Herzmuskelzellen, die mikroskopisch detektiert werden können. Der EST nutzt diese Fähigkeit zur Vorhersage des embryoto-

xischen Potentials einer Prüfsubstanz. Mit dem EST wird der Einfluss von teratogenen und embryotoxischen Testchemikalien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in kontrahierende Herzmuskelzellen untersucht. Diese Ergebnisse werden in Relation zum zytotoxischen Effekt der Substanzen auf ES-Zellen und auf differenzierte Zellen (3T3 Maus-Fibroblasten) bewertet (Abb. 1). Anhand von Konzentrations-Wirkungskurven werden Halbhemmkonzentrationen (ID₅₀, IC₅₀) bestimmt, die die Klassifizierung der Testsubstanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen „nicht, schwach oder stark“ embryotoxisch gestatten. Die Klassifizierung erfolgt mit einem etablierten und validierten biostatistischen Prädiktionsmodell (Genschow et al., 2000, 2002; Rohwedel et al., 2002).

Trotz der erfolgreich verlaufenden ECVAM Validierungsstudie (Genschow et al., 2002) weist der EST einige Nachteile auf. Die Testdauer ist mit 10 Tagen verhältnismäßig lang, die mikroskopische Auswertung der Kontraktion der sich entwickelnden Herzmuskelzellen zeitaufwendig und die Erfassung kaum automatisierbar. Darüber hinaus wird nur die Differenzierung in Herzmuskelzellen (mesodermal) erfasst. Ziel unserer gegenwärtigen Arbeiten in Kooperation mit Firmen der deutschen Arzneimittel-Industrie ist die Weiterentwicklung des EST. Neben der Herzzelldifferenzierung sollen neue relevante Differenzierungsendpunkte (z.B. neuronale Differenzierung, Angiogenese/Vaskulogenese sowie Knorpel- und Knochendifferenzierung) auf molekularer Ebene durch FACS-Analysen, *TaqMan-PCR* und der *Microarray*-Technik erfasst werden. Darüber hinaus soll die Testdauer verkürzt und die Methode für den Einsatz im *High Throughput Screening* (HTS) optimiert werden. Ein anderer Ansatz, der im ECVAM Labor verfolgt wurde, ist der Einsatz von *Reporter Gene Assays* unter Verwendung transfizierter, embryonaler ES-Zellen, die GFP (*Green Fluorescence Protein*) unter Kontrolle eines herzspezifischen Promotors (alpha-Actin) exprimieren (Bremer et al., 1999, 2001).

Im ZEBET Labor wurde ein standardisiertes Testprotokoll (SOP, *standard operating procedure*) zur Erfassung der Herzzelldifferenzierung mit Hilfe der

FACS- (*fluorescence-activated cell sorter*) Analyse erarbeitet. Dabei standen Untersuchungen zur Auswahl geeigneter monoklonaler Antikörper gegen herzzell-spezifische intrazelluläre Antigene und die Optimierung der Testdauer im Vordergrund.

Die FACS-Analyse bietet die Möglichkeit, die Expression bestimmter Gene anhand des exprimierten Proteins quantitativ und schnell zu bestimmen. Dazu werden die Zellen mittels spezifischer Antikörper gegen intrazelluläre Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und einzeln an einem Lichtstrahl vorbeigeleitet. Die Zellen senden, da sie Fluoreszenz-markiert sind, charakteristische Lichtsignale aus. Mit Hilfe von Photodetektoren werden die Lichtstreuung und die Fluoreszenzintensität der Zellen quantifiziert.

Die Anwendbarkeit der neuen Methode wurde anhand positiver und negativer Kontrollsubstanzen aus der ECVAM Validierungsstudie überprüft und die erzielten Ergebnisse mit der herkömmlichen mikroskopischen Auswertung verglichen. Im Folgenden berichten wir über erste Ergebnisse, die mit dem neuen Endpunkt - Erfassung der Herzzell-diffe-

renzung auf molekularer Ebene – erzielt wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Murine embryonale Stammzellen der Linie D3 (Rolf Kemler, Max-Planck-Institut, D-Freiburg) wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM; Gibco, D-Karlsruhe) mit 15% fötalem Kälberserum (HyClone; B-Erembodegem-Aalst), Glutamin (2 mM; Gibco), Penicillin (50 U/ml; Gibco), Streptomycin (50 µg/ml; Gibco), nicht-essentiellen Aminosäuren (1%; Gibco), β-Mercaptoethanol (0,1 mM; Sigma, D-Deisenhofen) und mLIF (*murine leukemia inhibitory factor*, 1000 U/ml; Chemicon, D-Hofheim) kultiviert. Die Zugabe von mLIF diente als wesentliche Voraussetzung, die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) in einem undifferenzierten Zustand zu halten und somit eine Vermehrung und eine Subkultivierung zu ermöglichen. Diese erfolgte im Abstand von 2 bis 3 Tagen. Für die Differenzierung der ES-Zellen zu myokardialen Zellen wurde Medium in derselben

Zusammensetzung ohne mLIF verwendet. Die Maus-Fibroblastenzelllinie 3T3 (Klon A31) wurde von der Firma ICN-Flow (D-Eschwege) bezogen und in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum, Glutamin (4 mM), Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert und im Abstand von 2 bis 3 Tagen passagiert.

2.2 Testchemikalien

Als positive Kontrollsubstanzen mit einem hohen embryotoxischen Potential kamen 5-Fluorouracil (CAS Nr. 51-21-8, Sigma) und all-*trans*-Retinsäure (CAS Nr. 302-79-4, Sigma) zum Einsatz. Penicillin G (CAS Nr. 69-57-8, Sigma), wurde als negative Kontrollsubstanz verwendet. Von allen drei Substanzen wurden Verdünnungsreihen angefertigt, welche im Differenzierungsassay (siehe Abschnitt 2.3) als auch im Zytotoxizitätstest (siehe Abschnitt 2.4) eingesetzt wurden, um die Anwendbarkeit des neuen Testendpunktes, der FACS-Analyse, zu überprüfen. Nach Auswertung der Assays wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und mit den Ergebnissen der konventionellen mikroskopischen Auswertung verglichen.

2.3 Differenzierungs-Assay

Die Zellkulturtechnik zur Differenzierung der ES D3-Zellen in kontrahierende Herzmuskelzellen wurden im ZEBET Labor, basierend auf den Methoden von Rudnicki and McBurney (1987) sowie Wobus et al. (1991) etabliert. 60 bis 80 Tropfen (20 µl) einer ES-Zellsuspension ($3,75 \times 10^4$ Zellen/ml) wurden auf die Innenseite des Deckels einer Petri-Schale als hängende Tropfen kultiviert (Tag 0). In den einzelnen Tropfen kam es während dieser Phase der Kultivierung zur Zellaggregatbildung (*embryoid bodies*, EBs). Nach 3 Tagen wurden diese heruntergespült und für weitere 2 Tage in bakterielle Petri-Schalen überführt. Die Beschaffenheit dieser Kulturgefäße verhinderte eine Anheftung der ES-Zellen. Am Tag 5 wurden die einzelnen EBs in Mikrotiterplatten (24-well) überführt. In diesem letzten Kultivierungsschritt kam es zur Anheftung der EBs und zur Ausdifferenzierung der ES-Zellen in Herzmuskelzellen. Am Tag 7 und Tag 10 der Differen-

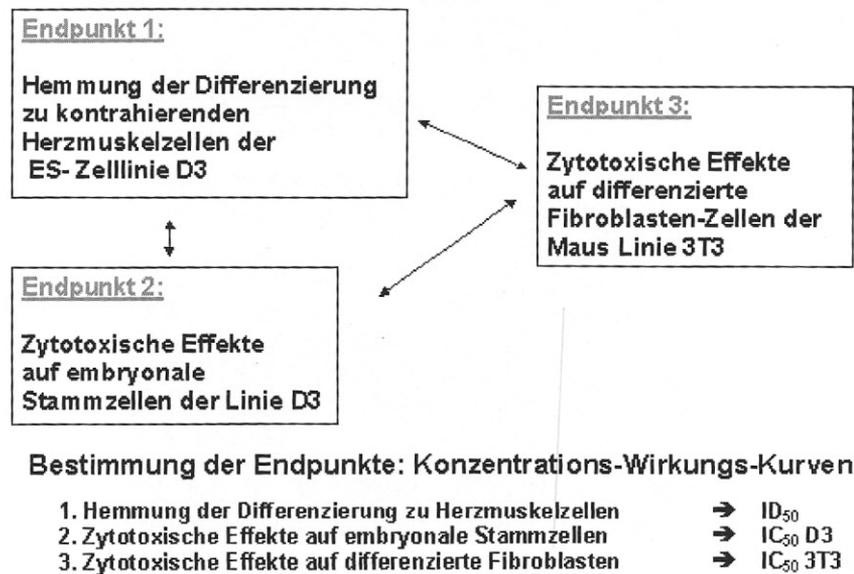


Abb. 1: Der Embryonale Stammzelltest (EST). Schematische Darstellung des Test-Prinzips und der im Test zu bestimmenden Endpunkte.

zierung erfolgte dann die mikroskopische Erfassung der schlagenden Herzmuskelzellen und eine quantitative Erfassung mittels der FACS-Analyse (siehe Abschnitt 2.6). Zur Beurteilung der inhibitorischen Wirkung der Testsubstanz auf die Differenzierung wurde dem Kulturmedium die Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen während der Differenzierung zugesetzt. Anhand der angefertigten Konzentrationsreihen konnte eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und der ID_{50} -Wert (halbmaximale Inhibierung der Differenzierung) als Endpunkt des Tests ermittelt werden. Zur Auswertung wurden die Messwerte für die unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz auf die Kontrollwerte (100%) normiert.

2.4 Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität der ausgewählten Testchemikalien wurde anhand der 3T3-Fibroblasten und der ES-Zellen untersucht. Dabei wurde die Wirkung der Substanzen auf das exponentielle Wachstum der beiden Zelllinien über einen Inkubationszeitraum von 7 und 10 Tagen mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitätstests (Mosman, 1983) überprüft. ES-Zellen und Fibroblasten wurden auf Mikrotiterplatten (96-well) plattiert (5×10^2 Zellen/Vertiefung) und 2 h zur Anheftung im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) vorinkubiert. Danach wurden die Platten mit 150 µl Kulturmedium, das die Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt, beschickt und weiter inkubiert. Am Tag 3 und 5 der Kultivierung erfolgte je ein Mediumwechsel. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium mit entsprechenden Substanz- bzw. Lösungsmittelkonzentrationen ersetzt. Am Tag 7 und Tag 10 der Kultivierung erfolgte dann die Bestimmung des zytotoxischen Wirkungsgrades der Testsubstanz für beide Zelllinien (3T3 und D3) mittels des MTT-Tests. Dazu wurden 20 µl einer MTT-Lösung (5 mg 3-[4,5-dimethyldiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid auf 1 ml PBS; Sigma) in die Vertiefungen gegeben. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank. Während dieser Zeit wird MTT durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase in einen blauen

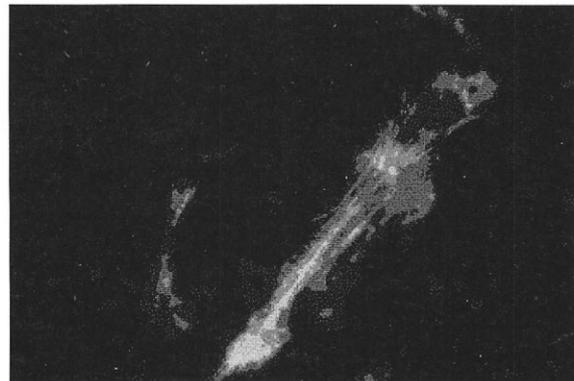
Farbstoff umgesetzt, der anschließend mit 130 µl *MTT-desorb-solution* (3,49% SDS [20%ig] und 96,51% Isopropanol) extrahiert wird. Die optische Dichte wurde mit einem *ELISA-Reader* (Dynatech, D-Denkendorf) bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Anhand der angefertigten Konzentrationsreihen konnten wiederum Dosis-Wirkungskurven erstellt und somit die IC_{50} -Werte (halbmaximale Hemmung des Zellwachstums) für die D3- als auch die 3T3-Zellen als weitere Testendpunkte ermittelt werden.

2.5 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Die ES-Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben kultiviert. Am Tag 5 des Differenzierungsprotokolls wurden die einzelnen EBs auf Gelatinebeschichtete Deckgläser überführt und

für weitere 2 Tage kultiviert. Zur Markierung intrazellulärer, herzzellspezifischer Antigene mittels monoklonaler Antikörper (mABs) wurden die Zellen am Tag 7 der Differenzierung fixiert (20 min, 4% Paraformaldehyd), mit Saponin (0,15%) permeabilisiert und mit den primären mABs *anti- α -Aktinin* (EA-53; Chemicon, D-Hofheim; Verdünnung: 1:1600) und *anti-Sarcomeric Myosin Heavy Chain* (*anti-MHC*, MF20; Hybridoma Bank, USA; Verdünnung: 1:200) für eine Stunde inkubiert. Danach wurde ein zweiter, Fluorochrom-konjugierter Antikörper (Indocarbocyanin, Cy3; Dianova, D-Hamburg; Verdünnung: 1:1200) eingesetzt. Die spezifisch angefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 51) ausgewertet und entsprechend den Vorschriften des Herstellers mit einem hochempfindlichen Film (3200 ASA) fotografiert.

2a



2b

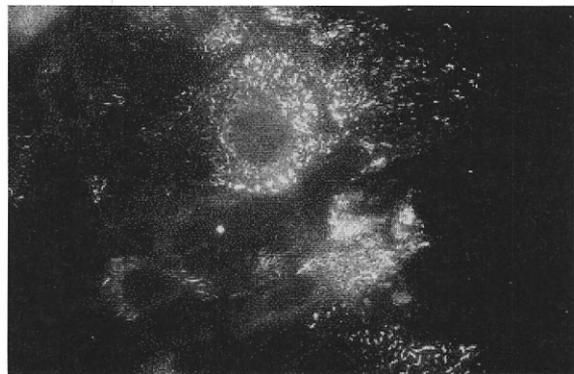


Abb. 2a, 2b: Immunfluoreszenz-Mikroskopische Darstellung spezifisch markierter Herzmuskelzellen. Die Färbung erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen die muskulären Strukturproteine α -Aktinin (EA-53), Vergrößerung: 125-fach, Tag 10 der Differenzierung (A) und *Sarcomeric Myosin Heavy Chain* (*anti-MHC*, MF20), Vergrößerung 4500-fach, Tag 7 der Differenzierung (B).

2.6 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Zellen wurden durch eine 30-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA (Gibco) und DNase 1 (Sigma) vereinzelt und mit Paraformaldehyd (2%; Sigma) fixiert. Die Schritte zur Permeabilisierung und spezifischen Anfärbung der differenzierten Herzmuskelzellen erfolgten wie zuvor in Abschnitt 2.5 beschrieben. Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu prüfen, wurden als negativ Kontrolle isotypische Kontrollen in derselben Konzentration wie der Testantikörper eingesetzt bzw. Verdünnungspuffer ohne Antikörper verwendet. Die indirekte Anfärbung erfolgte über einen zweiten biotinylierten Antikörper (Dianova, D-Hamburg; Verdünnung 1:1000) und Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin (Dianova, D-Hamburg), welches eine sehr hohe Affinität zu Biotin aufweist. Die FACS-Analysen wurden bei 570 nm unter Verwendung eines FACSCalibur® Gerätes der Firma Becton Dickinson (D-Heidelberg) durchgeführt und die Daten mit Hilfe der Cell Quest®-Software analysiert.

3 Ergebnisse

Zur Etablierung des neuen Endpunktes – quantitative Erfassung der Herzzell-differenzierung mit Hilfe der FACS-Analyse – mussten zunächst geeignete monoklonale Antikörper gegen herzzell-spezifische intrazelluläre Antigene ausgewählt werden. Diese wurden dann zur Überprüfung der Zelltypspezifität in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt und in der FACS-Analyse auf ihre Eignung ausgetestet. Dabei standen die Reproduzierbarkeit und die Einfachheit der Messung (quantitativ standardisierbares Signal) im Vordergrund. Die Anwendbarkeit des neuen Endpunktes wurde anhand der Testung von positiven (Retinsäure, 5-Fluorouracil) und negativen (Penicillin G) Standard-Testsubstanzen überprüft. Bei Retinsäure handelt es sich um einen teratogenen Stoff, der im Tiermodell Effekte auf die Herzdifferenzierung zeigt (Lammer et al., 1985), während 5-Fluorouracil vorwiegend Missbildungen an Extremitäten und zahlreiche viscerale Defekte auslöst (Stephens et al., 1980).

3.1 Etablierung des neuen toxikologischen Endpunktes

ES-Zellen der Zelllinie D3 der Maus wurden nach einem Standardprotokoll zu Herzmuskelzellen differenziert und mit monoklonalen Antikörpern gegen die muskulären Strukturproteine α -Aktinin und das sarcomere Myosin Heavy Chain (MHC, MF20) angefärbt. Zur Beurteilung der Zellspezifität der ausgewählten Antikörper haben wir die Markierung der Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Beide Antikörper zeigten eine spezifische Färbung der Herzmuskelzellen am Tag 10 bzw. Tag 7 der Differenzierung. In Abb. 2a ist die Färbung mit dem Antikörper gegen α -Aktinin gezeigt. Aufgrund der stark angefärbten gestreiften Muskulatur ließen sich die Herzmuskelzellen von den restlichen Zellen einfach unterscheiden. Abb. 2b zeigt die Markierung mit dem Antikörper MF20. Hier ist die Färbung der Filamentproteine von einzelnen Zellen zu erkennen, wobei die markierten Proteine im Vergleich zur Anfärbung mit α -Aktinin nicht die geordnete quergestreifte Morphologie aufweisen. Die Quantifizierung

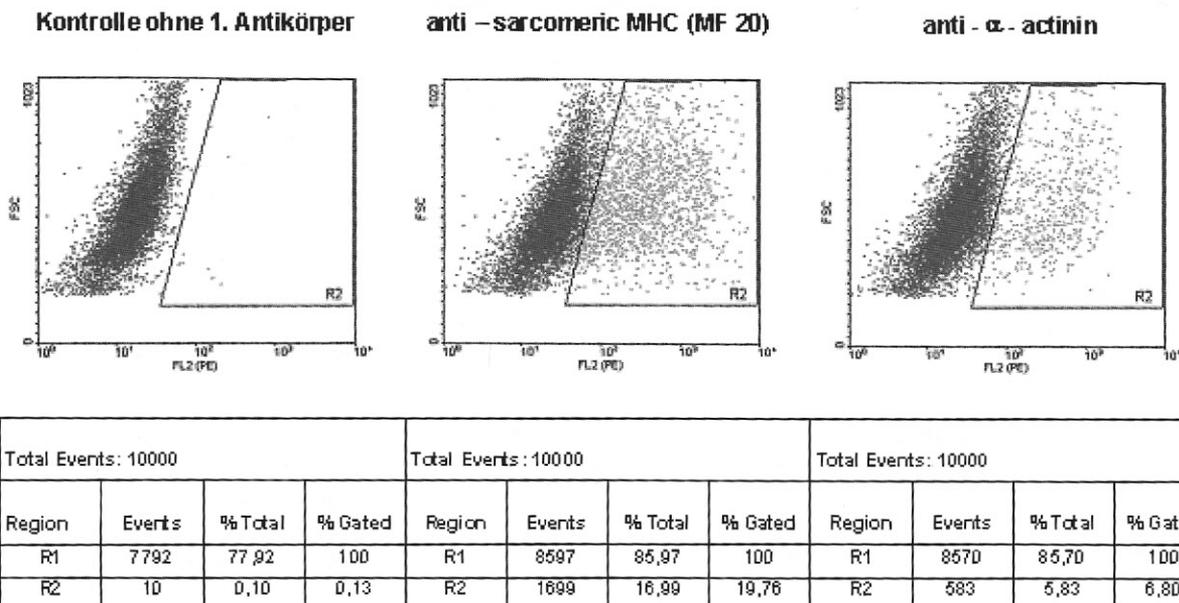


Abb. 3: Quantifizierung der Herzmuskelzellen mittels der FACS-Analyse, dargestellt im Dot Plot Verfahren am Tag 7 der Differenzierung. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität im Kanal FL-2 aufgetragen, auf der y-Achse die gemessenen

Ereignisse im Messkanal FSC. In der Tabelle ist die statistische Auswertung dargestellt. Verglichen wird das Ergebnis der Kontrolle ohne den 1. Antikörper mit den Ergebnissen der MF20 und anti alpha-Aktinin markierten Zellen.

der entsprechenden Signale mittels der FACS-Analyse ist in Abbildung 3 dargestellt. Beide Antikörper zeigten ein starkes, gut reproduzierbares Signal, das sich einfach vom unspezifischen Hintergrund trennen ließ.

Zur Optimierung der Testdauer haben wir den zeitlichen Verlauf der Herzmuskelzellendifferenzierung anhand der beiden Markerproteine α -Aktinin und Myosin Heavy Chain (MF20) über einen Zeitraum von insgesamt 12 Tagen mittels FACS-Analysen untersucht (Abb. 4). Das stärkste Signal für beide Markerproteine wurde am Tag 7 der Differenzierung beobachtet, wobei mit dem Antikörper MF20 im Durchschnitt 17% von 10.000 Zellen positiv waren und mit dem Antikörper gegen das α -Aktinin der Anteil positiver Ereignisse bei 4.5% lag.

3.2 Testung von Kontrollsubstanzen

Zur Standardisierung des neuen Endpunktes haben wir die Wirkung von standard-positiven (5-Fluorouracil, Retinsäure) und standard-negativen (Penicillin G) Testsubstanzen auf die Differenzierung der Herzmuskelzellen am Tag 7 und am Tag 10 der Differenzierung untersucht.

Die Effekte wurden sowohl mit der FACS-Analyse anhand der Markerproteine α -Aktinin und MHC quantifiziert als auch mit der konventionellen Methode (mikroskopische Auswertung) erfasst und miteinander verglichen. Die in Abbildung 5 dargestellten repräsentativen Konzentrations-Wirkungskurven für die drei getesteten Substanzen zeigen, dass beide Methoden (FACS / Mikroskop) zu sehr ähnlichen Kurvenverläufen führen. Dem zufolge wurden für beide Methoden fast identische Halbhemmkonzentrationen (ID_{50} -Werte) ermittelt, auch wenn die Testdauer um 3 Tage verkürzt wurde (Abb. 6). Bei den stark embryotoxischen Substanzen 5-Fluorouracil und Retinsäure lagen die ID_{50} -Werte im Vergleich zu der nicht-embryotoxischen Substanz Penicillin G deutlich niedriger. Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten Endpunkte wurden berechnet und in die drei linearen Diskriminanzfunktionen des Prädiktionsmodells eingesetzt. Das Klassifizierungsergebnis lag bei 100% korrekter Einstufungen der Einzelexperimente. Somit konnte für alle drei getesteten Prüfsubstanzen das embryotoxische Potential richtig vorher-

gesagt werden, und zwar für beide Methoden zur Bestimmung der ID_{50} -Werte (FACS/Mikroskop) und für die beiden gemessenen Zeitpunkte (Tag 7 und Tag 10 der Differenzierung).

Der unterschiedliche Verlauf der Zytotoxizitätskurven bei den 3T3 Zellen basiert darauf, dass einige stark embryotoxische Substanzen (z.B. 5-Fluorouracil), bei geringer Konzentration, neben dem stark embryotoxischen Potential ein hohes zytotoxisches Potential aufweisen (Abb. 5).

4 Diskussion

Zur Weiterentwicklung des embryonalen Stammzelltestes haben wir ein standardisiertes Testprotokoll (SOP, *standard operating procedure*) zur Erfassung der Herzmuskelzellendifferenzierung auf molekularer Ebene mittels der FACS-Analyse entwickelt. Dabei standen Untersuchungen frühembryonaler Differenzierungsprozesse unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper gegen exprimierte Markerproteine im Vordergrund.

Während der Embryonalentwicklung erfolgt die Expression gewebespezifischer Gene und die Ausbildung typischer Strukturproteine und Rezeptoren in einem stark zeitlich regulierten Programm. So konnte auch für die Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Herzmuskelzellen gezeigt werden, dass zunächst Mesoderm-spezifische Gene exprimiert werden, u.a. die kardialen Strukturprotein-kodierenden Gene, wie α - und β -MHC (*myosin heavy chain*), später dann auch Gene, die im Vorhof (*atrial natriuretic factor, ANF*) und in der Herzkammer (*myosin light chain-2v, MLC-2v*) exprimiert werden (Wobus and Guan, 1998). Ebenso werden herzspezifische Proteine des Sarkomerapparates (u.a. α -Aktinin und Myosin) strukturell organisiert und physiologische Eigenschaften (herzspezifische Aktionspotentiale und Ionenkanäle) in einem charakteristischen zeitlichen Muster ausgeprägt (Guan et al., 1999a; Hescheler et al., 1997).

Als besonders gut geeignete Markerproteine für die Quantifizierung der Differenzierung zu Herzmuskelzellen mit-

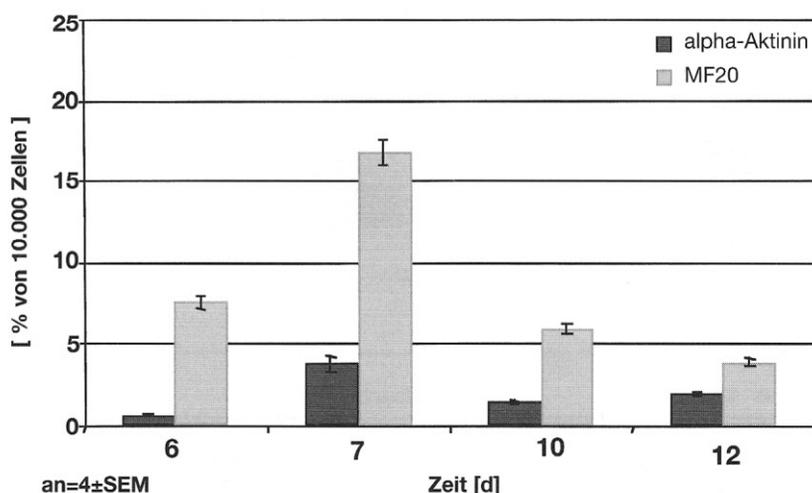


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Herzmuskelzellendifferenzierung, gemessen am Tag 6, 7, 10 und 12 der Differenzierung. 24 EBs wurden gepoolt, eine Einzelzellsuspension hergestellt und geteilt. Die Hälfte der Zellen wurde mit dem mAB *anti- α -Aktinin* (EA-53), die andere Hälfte der Zellen mit dem mAB *anti-Sarcomeric Myosin Heavy Chain* (*anti-MHC*, MF20) markiert und im FACS (Dot Plot Analyse) der prozentuale Anteil positiver Ereignisse quantifiziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

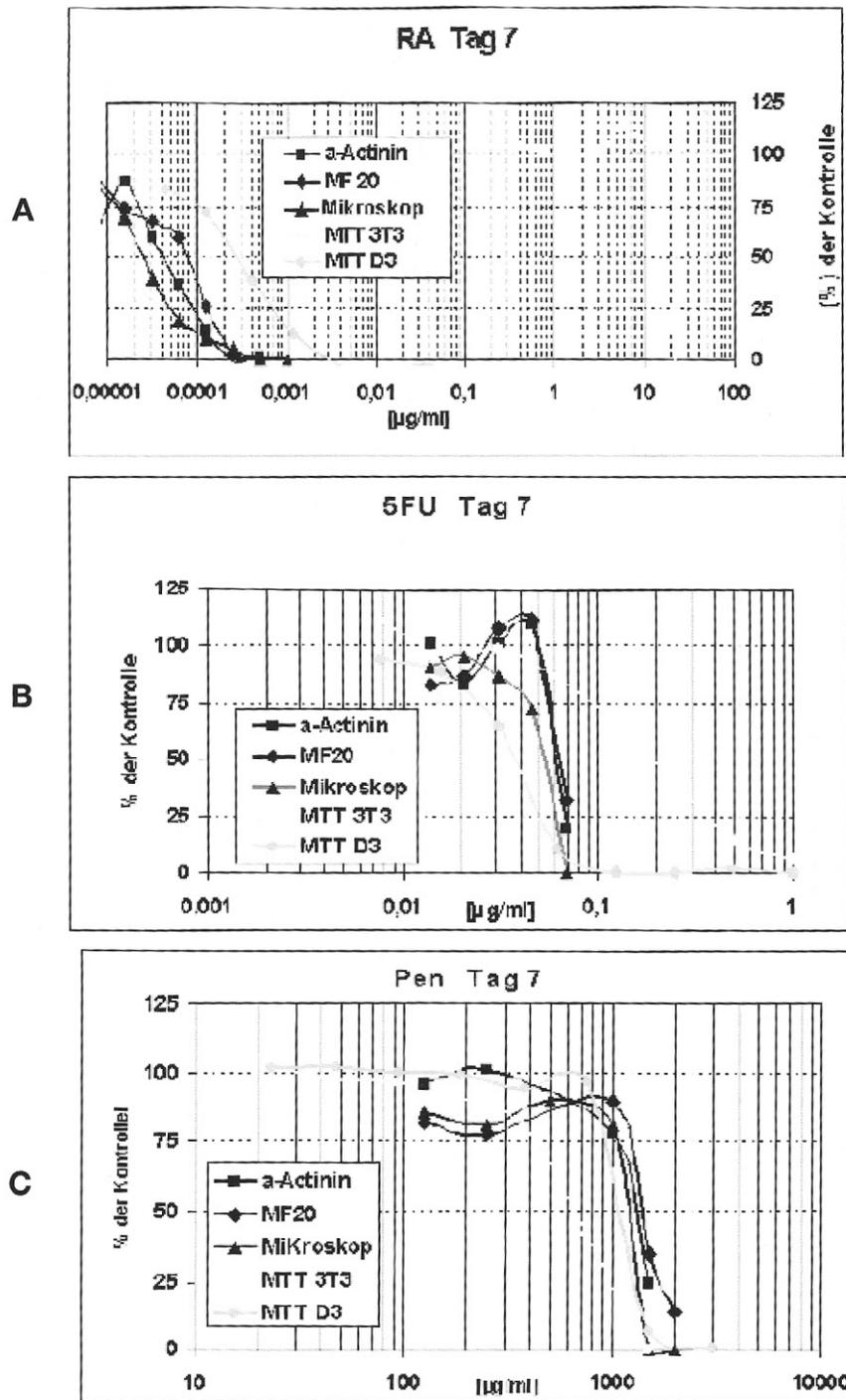


Abb. 5: Repräsentative Dosis-Wirkungskurven für die fünf ermittelten Endpunkte im EST. Inhibition der Differenzierung der D3 Zellen, gemessen mit der konventionellen Methode - mikroskopische Evaluierung - und im Vergleich mit der FACS-Analyse, und Zytotoxizität bei den embryonalen Stammzellen (D3) und den differenzierten Fibroblasten (3T3 Zellen) am Tag 7. Ähnliche Kurvenverläufe wurden für den Tag 10 der Differenzierung ermittelt (Daten nicht gezeigt). A: Positive Kontrollsubstanz Retinsäure, B: Positive Kontrollsubstanz 5-Fluorouracil, C: Negative Kontrollsubstanz Penicillin G.

tels der FACS-Analyse erwiesen sich die muskulären Strukturproteine des Sarkomerapparates Myosin und α -Aktinin. Spezifische monoklonale Antikörper, die ein reproduzierbares und quantitativ standardisierbares Signal in der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie ergaben, konnten für beide Markerproteine identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die monoklonalen Antikörper MF20 (Bader et al., 1982) bzw. EA-53 (Goncharova et al., 1992). MF20 ist ein gut charakterisierter Antikörper, der bereits häufig sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der angewandten Forschung zum Nachweis der Kardiogenese bzw. als myogener Marker bei einer Vielzahl von Studien sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eingesetzt wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass er eine starke Bindung an sarcomeres Myosin aller embryonalen Stadien *in vivo* aufweist und sowohl die nativen als auch denaturierte Formen erkennt. EA-53 erkennt spezifisch das sarcomere α -Aktinin der Z-Bande in Skelett- und Herzmuskeln. Nicht-sarcomere Muskelelemente (Bindegewebe, Epithelium, Nerven, glatte Muskulatur) werden nicht erkannt. Folgende Gründe sprechen jedoch dafür, dass in den Experimenten größtenteils Herzmuskelzellen analysiert wurden: Einerseits entwickeln sich die Herzmuskelzellen im Verlauf der Differenzierung vor den Skelettmuskelzellen (am Tag 7 der Differenzierung liegt der Anteil an Skelettmuskelzellen unter 5%, Guan et al., 1999b), zum anderen war mikroskopisch die Kontraktion der Herzmuskelzellen sichtbar.

Wie aus den Konzentrations-Wirkungskurven zu ersehen ist, eignete sich die Durchflusszytometrie durchaus zur Quantifizierung toxikologischer Effekte. Bemerkenswert ist, dass ein funktionaler Test, nämlich die mikroskopische Bewertung der schlagenden Herzmuskelzellen, und die Quantifizierung auf Proteinebene mittels der FACS-Analyse zu fast identischen Ergebnissen führten. Ein besonderer Vorteil des neuen Endpunktes ist jedoch, dass die Erfassung der Differenzierung zu Herzmuskelzellen reproduzierbar zu einem früheren Zeitpunkt, nämlich am Tag 7 der Differenzierung, erfolgen konnte. Diese Verkürzung der Testdauer ist mit der konventionellen

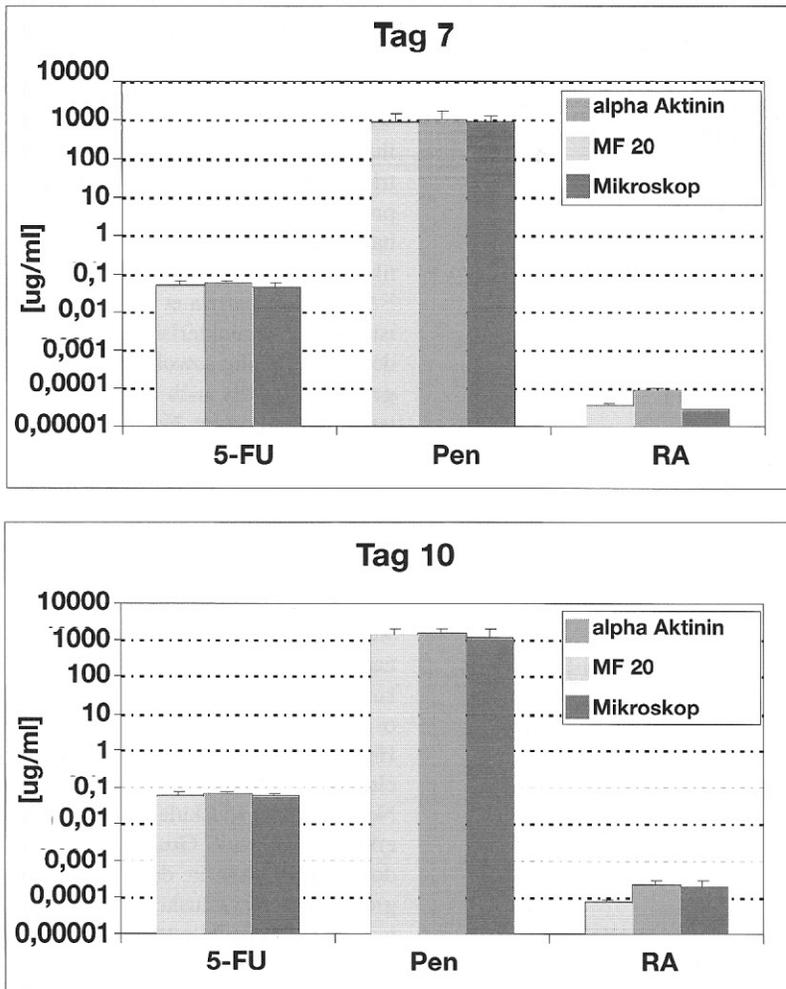


Abb. 6: Vergleichende Darstellung der ID₅₀-Werte, ermittelt mit der mikroskopischen Erfassung und der FACS-Analyse für alle drei getesteten Substanzen und die beiden gemessenen Zeitpunkte, Tag 7 und Tag 10 der Differenzierung. Die dargestellten ID₅₀-Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ± der Standardabweichung (SD).

Methode, der mikroskopischen Auswertung, nicht immer möglich, da schlagende Herzmuskelzellen zu diesem Zeitpunkt nicht zuverlässig detektierbar sind, und deshalb hierfür Tag 10 der Differenzierung gewählt werden muss.

Die Weiterentwicklung des embryonalen Stammzelltestes schafft die Voraussetzung dafür, den Test zu automatisieren und damit mit höherem Durchsatz zur Substanzauswahl (*High Throughput Screening*) einzusetzen. Dies ist insbesondere für die Etablierung und Anwendung des Stammzelltestes in der pharmazeutischen und chemischen Indu-

strie als ein *in vitro* Screeningverfahren zur frühzeitigen Erfassung des teratogenen Potentials eines Arzneimittelkandidaten wichtig. Die Durchführung von aufwendigen Tierversuchen mit hohen Versuchstierzahlen kann somit reduziert werden. Besonders die Ergebnisse der ECVAM Validierungsstudie zeigten, dass der EST sich als ein Screeningverfahren von stark embryotoxischen Substanzen eignet, da deren Potential zu 100% richtig vorhergesagt wurde (Genschow et al., 2000, 2002). Ein weiterer Vorteil ist, dass der EST die Analyse von teratogenen Toxizitätsparametern an Embryo-ähnli-

chen Strukturen erlaubt, die in reinen Zellkultursystemen nicht erfasst werden können.

Der EST leistet somit einen wichtigen Beitrag zum Tierschutz. Durch seinen Einsatz wird vermieden, dass stark belastende Substanzen in den Tierversuch gelangen oder dass trüchtige Tiere zur Gewinnung embryonaler Gewebe und Organe getötet werden müssen. Dies könnte insbesondere für die Umsetzung der „Strategie für eine zukünftige Chemikalienpolitik der EU“ wichtig 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.

Literatur

- Braun, A. G., Nicholson, B. B. and Horowicz, P. B. (1982). Inhibition of tumor cell attachment to concanavalin A-coated surfaces as an assay for teratogenic agents: approaches to validation. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 2, 343-354.
- Bremer, S., van Dooren, M., Paparella, M. et al. (1999). Establishing of an Embryotoxicity Assay with green fluorescence protein-expressing embryonic cell-derived cardiomyocytes. *ATLA* 27, 471-484.
- Bremer, S., Worth, A. P., Paparella, M. et al. (2001). Establishment of an in vitro reporter gene assay for development cardiac toxicity. *Toxicology in Vitro* 15, 215-223.
- Bader, D., Masaki, T. and Fischmann, D. A. (1982). Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *J. Cell. Biol.* 95, 763-770.
- Cicurel, L. and Schmid, B. P. (1988). Postimplantation culture for the assessment of the teratogenic potential and potency of compounds. *Experientia* 44, 833.
- Doetschmann, T., Eistetter, H. R., 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. Morphol.* 87, 27-45.
- Ebert, J. D. and Marois M. (1975). *Tests of teratogenicity in vitro*. Amsterdam: North-Holland Publishing.
- ECETOC (1989). Monograph No. 12. Alternative approaches for the assessment of reproductive toxicity.
- Flint, O. P. and Orton, T. C. (1984). An in vitro assay for teratogens with cultures of rat embryo mid-brain and limb cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76, 383-395.
- Genschow, E., Scholz, G., Brown, N. et al. (2000). Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests. *In Vitro and Molecular Toxicology* 13, 51-65.
- Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G. et al. (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. Results of the definitive phase and evaluation of prediction models. Submitted to *ATLA* 30, 151-176.
- Guan, K., Fürst, D. O. and Wobus, A. M. (1999a). Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 813-823.
- Guan, K., Rohwedel, J. and Wobus, A. (1999b). Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30, 211-226.
- Goncharova, E. J., Kam, Z. and Geiger, B. (1992). The involvement of adherens junction components in myofibrillogenesis in cultured cardiac myocytes. *Development* 114, 173-183.
- Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Lenti, S. et al. (1997). Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc. Res.* 36, 149-162.
- Kimmel, G. L., Smith, K., Kochhar, D. M. and Pratt, R. M. (1982). Overview of in vitro teratogenicity testing: aspects of validation and application to screening. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 2, 221.
- Kistler, A. (1987). Limb bud cell cultures for estimating the teratogenic potential of compounds. Validation of the test with retinoids. *Arch. Toxicol.* 60, 403.
- Lammer, E. J., Chen, D. T., Hoar, R. M. et al. (1985). Retinoic acid embryopathy. *New England Journal of Medicine* 313, 837-841.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 65, 55-63.
- Piersma, A. H., Bechter, R., Krafft, N. et al. (1996). An interlaboratory evaluation of five pairs of teratogens in postimplantation rat embryo culture. *ATLA* 24, 201-209.
- Pratt, R. M., Grove, R. I. and Willis, W. D. (1982). Prescreening for environmental teratogens using cultured mesenchymal cells from the human embryonic palate. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 2, 313-318.
- Rohwedel, J., Guan, K. and Wobus, A. M. (2001). Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicol. in Vitro* 15, 741-753.
- Rudnicki, M. A. and Mc Burney, M. W. (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In E. J. Robertson (ed), *Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* (pp. 19-49). Washington D.C: IRL Press.
- Spielmann, H., Pohl, I., Döring, B. et al. (1997). The embryonic stem cell test (EST), an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicol.* 10, 119-127.
- Stephens J. D., Golbus, M. S., Miller, T. R. et al. (1980). Multiple congenital anomalies in a fetus exposed to 5-fluorouracil during the first trimester. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 137, 747-448.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S. et al. (1988). Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wilson J. G. (1978). Review of in vitro systems with potential for use in teratogenicity screening. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2, 149.
- 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 Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48, 173-182.
- Wobus, A. M. and Guan K. (1998). Embryonic stem cell-derived cardiac differentiation: Modulation of differentiation and loss of function analysis in vitro. *Trends Cardiovasc. Med.* 8, 64-74.

Danksagung

Für die finanzielle Förderung des Vorhabens (Projekt Nr. 0312312) möchten wir dem Projektträger Biologie, Energie und Umwelt des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) danken.

Korrespondenzadresse

Dr. Andrea Seiler
 ZEBET im BgVV
 Diederdorfer Weg 1
 D-12277 Berlin
 Tel.: + 49-1-888 412 2278
 Fax: + 49-1-888 412 2958
 E-mail: seiler.zebet@bgvv.de