

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

BIOLOGIE

"Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 315522D gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".

Forschungsvorhaben: Verbundprojekt: Entwicklung prädiktiver in vitro Tests zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität – Phase II, Teilprojekt 4

Förderkennzeichen: 315522D

Zuwendungsempfänger: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Postfach 711180, 30545 Hannover

Ausführende Stelle: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover – Physiologisches Institut, Zellbiologie, Bischofsholer Damm 15/102, 30173 Hannover

Projektleitung: Herr Prof. Dr. G. Bicker

Laufzeit: 01.07.2009 bis 30.06.2011

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht	
3. Titel Entwicklung prädiktiver <i>in vitro</i> Tests zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität, Phase II, Teilprojekt 4		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Bicker, Gerd Stern, Michael	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.06.2011	
	6. Veröffentlichungsdatum	
	7. Form der Publikation Bericht	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Physiologisches Institut, Abt. Zellbiologie Prof. Dr. G. Bicker Bischofsholer Damm 15/102 30173 Hannover	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -/-	
	10. Förderkennzeichen 0315522D	
	11. Seitenzahl 34	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 19	
	14. Tabellen 3	
	15. Abbildungen 15	
16. Zusätzliche Angaben -/-		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -/-		
18. Kurzfassung <p>Aufgrund der zunehmenden Sensibilisierung für die Schädlichkeit von in die Umwelt freigesetzten Stoffen für die Entwicklung des menschlichen Embryos ist mit einer starken Zunahme von Tests zur Entwicklungsneurotoxizität zu rechnen. Aus ethischen und wirtschaftlichen Gründen besteht daher in diesem Bereich dringender Bedarf an schnellen, kostengünstigen, und Tierversuchsfreien <i>in vitro</i> Testsystemen.</p> <p>Im Teilprojekt 4 wurden zellbasierte <i>in vitro</i> Tests an der humanen Teratocarcinoma-Zelllinie NT2, die sich zu postmitotischen humanen Neuronen differenzieren lässt, entwickelt und optimiert.</p> <p>Es wurden entwicklungsneurotoxikologische Endpunkte für die entwicklungsbiologischen Schlüssel-Prozesse Proliferation, neuronale Differenzierung und Migration definiert. Anhand eines Modellsatzes aus bekanntermaßen entwicklungsneurotoxischen und toxischen, aber nicht entwicklungsneurotoxischen Substanzen wurden Dosis-Wirkungskurven für die definierten Endpunkte aufgenommen und in Beziehung zur mit Viabilitätsassays bestimmten allgemeinen Zytotoxizität gesetzt.</p> <p>Die erarbeiteten Assays für neuronale Differenzierung und Vorläuferzell-Migration wurden für <i>High Throughput</i>-Messverfahren optimiert und können als Bausteine für eine in einer Prävalidierungsstudie zu analysierende <i>in vitro</i>-Teststrategie empfohlen werden.</p>		
19. Schlagwörter		
20. Verlag -/-	21. Preis -/-	

1. Kurzdarstellung

1.1. Aufgabenstellung

Hauptziel des Verbundprojekts war und ist die Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf entwicklungsbedingte Neurotoxizität. Von einigen entwicklungsneurotoxischen Substanzen ist bekannt, dass sie einen Einfluss auf die Gehirnentwicklung nur in einem relativ eng begrenztem Zeitraum zeigen. Daher ist es wichtig, mit einem *in vitro* Testsystem möglichst verschiedene Phasen der Gehirnentwicklung zu erfassen und für diese entwicklungsneurotoxikologische Endpunkte festzulegen. Die Projektpartner haben sich auf folgende vier Schlüssel-Prozesse der neuronalen Entwicklung geeinigt, für die entwicklungstoxikologische Endpunkte etabliert werden sollten: **1. Proliferation, 2. Differenzierung, 3. Migration** und **4. elektische Aktivität und Netzbildung**. Auf Wunsch des Projektträgers wurde in der Projektphase 1 zunächst ein *proof of concept* erbracht, das gezeigt hat, dass die Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur Entwicklungsneurotoxizität prinzipiell möglich ist. In diesem Teilprojekt wurde eine humane Teratocarcinoma-Zelllinie (Ntera-2, NT2) eingesetzt, die sich in postmitotische Neuronen differenzieren lässt. Ziel der Phase II war es, für dieses *in vitro* System systematisch optimale Belastungsschemata unter Einsatz der in der 1. Förderphase etablierten prädiktiven Endpunkte anhand des Trainingssets zu erarbeiten. Behandlungsschema sollten dahingehend optimiert werden, dass sie den entwicklungsneurotoxischen Effekt deutlich vom allgemeinen zytotoxischen Effekt einer Substanz trennen und eine gute Trennung zwischen positiven und negativen Testsubstanzen erzielen. Weiterhin wurde eine weitestgehende Reduktion der Endpunkte und innerhalb dieser eine Reduktion der unterschiedlichen Messungen auf das unerlässliche Mindestmaß angestrebt. Als Abschluss von Phase II sollte die Entwicklung der Modelle inklusive der Teststrategie so weit abgeschlossen sein, dass eine Entscheidung, inwieweit eine Prävalidierung angegangen werden sollte, getroffen werden kann.

1.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die toxikologische Untersuchung von Alt- und Neustoffen ist im sicherheitstoxikologischen Prüfrichtlinienprogramm der OECD und der EU geregelt. Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass einige Stoffe eine besondere Gefahr für Kinder darstellen, und die besondere Anfälligkeit des sich entwickelnden menschlichen Gehirns rückte immer mehr in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit. Inzwischen wird für chemische Substanzen mit bekannten neurotoxischen oder teratogenen (insbesondere neuroteratogenen) Effekten ebenfalls eine Untersuchung zur Entwicklungsneurotoxizität empfohlen. Darüber hinaus fordert die U.S. EPA die Untersuchung der Entwicklungsneurotoxizität von Pestiziden. Im REACH Programm der Europäischen Union, bei dem ca. 140.000 Substanzen hinsichtlich ihres toxischen Potentials bewertet werden müssen, werden Tests zur entwicklungsbedingten Neurotoxizität empfohlen wenn sich Hinweise darauf aus anderen *in vivo* Studien ergeben haben (ECHA, 2009)

Entwicklungsneurotoxizität beschreibt die potentiellen funktionellen und morphologischen Effekte auf das sich entwickelnde Nervensystem der Nachkommen, die durch die Exposition während der Schwangerschaft und der frühen postnatalen Entwicklung auftreten können. Zur Untersuchung der Entwicklungsneurotoxizität von chemischen Stoffen stehen eine Prüfrichtlinie der U.S. EPA (Test Guideline 870.6300) und der OECD Richtlinie 426 (OECD, 2005) zur Verfügung. Diese Richtlinien beinhalten die Untersuchung der Morphologie des Gehirns der Versuchstiere (in der Regel Ratten), eine Reihe von Verhaltenstests, die Beurteilung der Entwicklung der Jungtiere (bis zum adulten Stadium) und die Untersuchung von Biomarkern. Ein solcher Test zur Entwicklungsneurotoxizität benötigt eine immens große Zahl an Versuchstieren, etwa 140 Muttertiere und 1000 Jungtiere, und erstreckt sich über etwa drei Monate. Die Untersuchung der oben beschriebenen Parameter erfordert einen enormen technischen und logistischen Aufwand und daraus resultierend eine entsprechende personelle Ausstattung. Aus diesen Gründen sind *in vivo* Tests zur Entwicklungsneurotoxizität extrem arbeitsaufwändig, komplex und kostenintensiv. Ein weiterer, häufig geäußerter Kritikpunkt ist die fehlende Festlegung der Methoden zur Endpunkterfassung.

Aus diesem Grund gewinnt die Entwicklung von aussagekräftigen und zeitsparenden Screening-Tests, die auf Zellkulturverfahren beschränkt sind und als Alternative zum

stark belastenden Tierversuch eingesetzt werden können, zunehmend an Bedeutung. In diesem Zusammenhang ist auch der in den USA vom National Research Council (NRC), propagierte neue Trend bei der Risikobewertung von Chemikalien erwähnenswert, der einen konsequenten Wechsel von der in vivo Studie hin zum Target-spezifischen in vitro Assay im automatisierten high-throughput screening (HTS) vorsieht (Collins et al., 2008).

Derzeit stehen zur Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität keine standardisierten und validierten Ersatzmethoden zur Verfügung. Es existieren jedoch einige vielversprechende Modelle, die auf der Differenzierung von kultivierten, proliferierenden Zellen und Zelllinien zu Neuronen und Gliazellen beruhen und daher geeignet sind die Prozesse des sich entwickelnden Nervensystems abzubilden. Gesamtziel des Projektes ist die Entwicklung eines in vitro Testsystems zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf entwicklungsbedingte Neurotoxizität.

1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Teilaufgaben	Monat der Projektlaufzeit Phase II							
	3	6	9	12	15	18	21	24
		-31.12.09		-31.6.10		-31.12.10		-31.6.11
Optimierung des Trainingsets	M1							
Etablierung von Endpunkt-spezifischen Kontrollen								
Optimierung und Standardisierung der Substanzbehandlungsschemata anhand von Substanztestungen mit dem Trainingset			M2					
Erfassung der entwicklungsneurotoxischen Potentiale von Chemikalien einer überarbeiteten Substanzliste zu den optimierten Zeitpunkten							M3	
Biometrische Analysen (Bestimmung der Intra-Laborvarianz, Identifizierung prädiktiver Endpunkte, Entwicklung von Prädiktionsmodellen)								M4
Entwicklung einer <i>in vitro</i> Teststrategie zur Prävalidierung								M5

Tab. 1 Arbeitsplan Teilprojekt 4

Meilensteine	Monat
M1 Auswahl eines Modellsubstanzzsets	2
M2 SOPs für die Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Profilen und für die Endpunkterfassung unter Verwendung der optimierten Substanzbehandlungsschemata, Konzentrations-Wirkungs-Profile für alle Testsubstanzen	9
M3 Etablierung der Endpunkt-spezifischen Kontrollen für die einzelnen <i>in vitro</i> Zellsysteme*	21
M4 Biometrische Analyse	24
M5 Erarbeitung einer <i>in vitro</i> Teststrategie zur Prävalidierung	24

Tab. 2: Meilensteine

1.3.1 Überarbeiten eines Modellsubstanzzsets

In Phase I des Projektes ist in Zusammenarbeit aller Partner ein Set von Modellsubstanzen erstellt werden, die für die Darstellung des *proof of concept* geeignet schienen. Die Erfahrungen aus Phase I führten dazu, dass eine Überarbeitung des Modellsubstanzzsets notwendig wurde. Bleiacetat fiel aufgrund von Löslichkeitsproblemen als positive (entwicklungsneurotoxische) Substanz aus. Als Ersatz einigten sich die Verbundpartner auf Natriumarsenit als Positivsubstanz. Parathion, als Negativsubstanz in Phase I im Programm, hatte sich im Verlauf von Phase I in einigen Assays als entwicklungsneurotoxisch herausgestellt. Die Projektpartner einigten sich darauf, Parathion als Positivsubstanz weiterhin zu testen. Für die nun fehlende dritte Negativsubstanz einigten sich die Verbundpartner auf Penicillin G als Ersatz.

1.3.2 Etablierung von Endpunktspezifischen Kontrollen

Für die zu etablierten entwicklungsneurotoxikologischen Endpunkte sollten spezifische Kontrollsubstanzen und deren optimale Konzentrationen etabliert werden, deren Wirkmechanismus auf den jeweiligen Endpunkt bekannt ist.

1.3.3 Optimierung und Standardisierung der Substanzbehandlungsschemata anhand von Substanztestungen mit dem Trainingset

Zur Beurteilung der neuralen Entwicklung sollen eine Reihe von molekularen und funktionellen Endpunkten herangezogen werden (1. Proliferation, 2. Differenzierung, 3. Migration und 4. elektische Aktivität und Netzwerkbildung).

Proliferation: Im Bereich Proliferation sollte der zellbasierte Viabilitätsassay aus Phase I als Proliferationsassay weiterentwickelt werden. Parallel dazu sollte getestet werden, ob neben den Viabilitätsassays noch andere Methoden in Frage kämen, die Proliferation auf direktem Wege messen können, z.B. der Einbau von BrdU.

Differenzierung: Als molekulare Endpunkte zur Beurteilung der Differenzierung kommen nach den Ergebnissen aus Phase I nur neuronale Marker in Frage, z.B. β III-Tubulin.

Migration: Die in Phase I in Anlehnung an die Methode unseres Projektpartners AG Dr. Fritsche, IUF Düsseldorf verwendeten Migrationsassays an sphärischen NT2-Aggregaten sollten durch eine alternative Messmethode im 96-well-Maßstab ersetzt werden, die für *high throughput*-Anwendungen geeignet ist.

Elektrische Aktivität und Netzwerkbildung: In diesem Bereich hat mit dem Übergang in Phase II ein Wechsel des Projektpartners stattgefunden. Zur Erfassung der elektrischen Aktivität und Netzwerkbildung auf Multielektrodenassays Deshalb war eine erneute Anpassung der Kulturbedingungen im Labor des neuen Projektpartners notwendig, und die Kultur auf den neuen Multielektrodenarrays musste in Zusammenarbeit mit den Partnern in Freiburg optimiert werden, bevor die ersten Messungen beginnen konnten.

1.3.4 Erfassung der entwicklungsneurotoxischen Potentiale von Chemikalien einer überarbeiteten Substanzliste zu den optimierten Zeitpunkten

Nach Etablierung der prädiktiven Endpunkte sollten für das ausgewählte Modellsubstanz-Set Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen in IC50-Werte bestimmt werden.

1.3.5 Biometrische Analysen (Bestimmung der Intra-Laborvarianz, Identifizierung prädiktiver Endpunkte, Entwicklung von Prädiktionsmodellen)

Die gewonnenen Daten sollten zur biometrischen Auswertung an den Projektpartner ZEBET übermittelt werden, der auch den biometrischen Gesamtbericht erstellt.

1.3.6 Entwicklung einer *in vitro* Teststrategie zur Prävalidierung

Dieser Punkt kann erst nach der biometrischen Auswertung durch den Projektpartner ZEBET abgearbeitet werden (voraussichtlich März 2012).

1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Zelllinie Ntera-2 ist eine neuronale Vorläuferzelllinie, die aus einem menschlichen Teratocarcinom hervorgegangen ist. Durch Behandlung mit dem Morphogen Retinsäure können NT2-Zellen zu postmitotischen Nervenzellen differenziert werden (Andrews, 1984; Pleasure et al., 1992). Ein Nachteil bei der Generierung reiner postmitotischer Neurone aus NT2-Zellen war bisher die lange dafür benötigte Zeit (ca. 2 Monate). Unter Verwendung einer Kulturmethode als sphärische Zellaggregate unter nicht adhärennten Bedingungen konnte die benötigte Zeit zur Gewinnung reiner Neurone in unserem Labor auf unter einen Monat verringert werden (Paquet-Durand et al., 2003; Podrygajlo et al., 2009, Abb. 1). Die gewonnenen postmitotischen Neuronen können auf geeignetem Untergrund in Kultur genommen werden und bieten so eine regelmäßig verfügbare Quelle menschlicher Neuronen. Wie wir zeigen konnten, exprimieren diese Neuronen eine Vielfalt von Neurotransmittern und synaptischen Markern, wie dies auch im Gehirn der Fall ist (Podrygajlo et al., 2009). NT2-Neuronen sind bereits in unserem Labor erfolgreich zur Untersuchung neuroprotektiver Substanzen bei simulierter Ischämie eingesetzt worden (Paquet-Durand und Bicker, 2004; Paquet-Durand et al., 2006). In der vom BMBF geförderten Phase I des Projekts konnte bereits der "*Proof of concept*" erbracht werden, in dem die prinzipielle Eignung der sich zu Neuronen entwickelnden NT2-Zellen für die Etablierung entwicklungsneurotoxikologischer *in vitro* Assays gezeigt wurde.

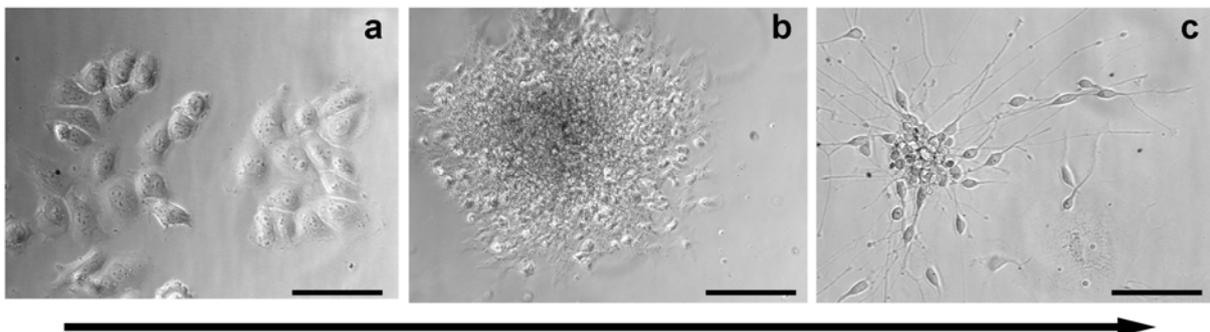


Abb. 1 Differenzierung von NT2-Zellen zu Neuronen: (a) NT2-Vorläuferzellen in adhärenter Kultur (Proliferation), (b) Zellaggregat, nach einer Woche in nicht adhärenter Kultur unter 10 µM Retinsäure auf adhärennte Oberfläche gebracht (Proliferation, Differenzierung, Migration), (c) reife, aufgereinigte NT2-Neuronen (elektrische Aktivität, Netzwerkbildung). Skalierung (a) 20 µm, (b,c) 100 µm

1.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeiten erfolgten in enger Abstimmung mit den Verbundpartnern im Projekt (ZEBET BfR Berlin, IUF Düsseldorf, Proteosys Mainz, Institut für Mikrosystemtechnik, Uni Freiburg und BASF Ludwigshafen). Dazu wurden halbjährlich Sitzungen beim Verbundprojektkoordinator ZEBET abgehalten, auf denen die erzielten Ergebnisse diskutiert und die Strategien für das weitere Vorgehen besprochen wurden.

2. Eingehende Darstellung

2.1. Verwendung der Zuwendung und erzielttes Ergebnis im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

2.1.1 Überarbeitung des Modellsbstanzsets

Positiv (entwicklungsneurotoxisch)	Methylquecksilberchlorid (MeHgCl)
	Natriumarsenit (As)
	Methylazoxymethanol (MAM)
	Natriumvalproat (VPA)
	Chlorpyrifos (Clp)
	Parathion (E 605)
Negativ (nicht entwicklungsneurotoxisch)	Paracetamol (Acetaminophen, AAP)
	Glutamat (Glu)
	Penicillin G (PG)

Tab. 3 Überarbeitetes Modellsbstanzset zur Etablierung entwicklungsneurotoxikologischer Endpunkte. Die Liste umfasst 6 nachgewiesenermaßen entwicklungsneurotoxische Substanzen, und 3 in bestimmten Konzentrationen toxische, aber bei diesen Konzentrationen nicht entwicklungsneurotoxische Substanzen.

In Phase I des Projektes war in Zusammenarbeit aller Partner ein Set von Modellsbstanzset erstellt werden, die für die Darstellung des *proof of concept*

geeignet schienen. Die Erfahrungen aus Phase I führten dazu, dass eine Überarbeitung des Modellsubstanzsets notwendig wurde. Bleiacetat fiel aufgrund von Löslichkeitsproblemen als positive (entwicklungsneurotoxische) Substanz aus. Als Ersatz einigten sich die Projektpartner beim Verbundtreffen am 23.4.2010 auf Natriumarsenit (CAS-Nr. 7784-46-5). Parathion, als Negativsubstanz in Phase I im Programm, hatte sich im Verlauf von Phase I in einigen Assays als entwicklungsneurotoxisch herausgestellt, was auch durch aktuelle Literatur (Slotkin et.al. Neurotoxicol Teratol (2009) 31:11-17) bestätigt wurde. Die Projektpartner einigten sich darauf, Parathion als Positivsubstanz weiterhin zu testen. Durch den Ausfall von Parathion als Negativsubstanz war nun eine weitere Negativsubstanz als Ersatz vonnöten. In der Verbund Sitzung am 28.10.2011 einigten sich die Projektpartner daher auf Penicillin G (CAS-Nr. 69-57-8) als neunte Testsubstanz (siehe Tab.3).

2.1.2 Etablierung von Endpunktspezifischen Kontrollen

Für die zu etablierten entwicklungsneurotoxikologischen Endpunkte wurden spezifische Kontrollsubstanzen und deren optimale Konzentrationen ermittelt, deren Wirkmechanismus auf den jeweiligen Endpunkt bekannt ist.

Für den Endpunkt Proliferation ist dies Aphidicolin, ein Inhibitor der DNA-Synthese (Spadari et al., 1985), der die Proliferation durch Arretierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus inhibiert (Abb. 3). Als optimale Konzentration ergab sich 100 nM, bei welcher die DNA-Synthese zu 50% inhibiert ist, aber noch keine akut zytotoxische Wirkung zu erkennen ist (Abb. 3E).

Für den Endpunkt Migration wurde als spezifische Kontrollsubstanz Cytochalasin D eingesetzt, welches die Actin-Polymerisation inhibiert (Pollard, 1981), und somit sämtliche Actin-vermittelten Zellbewegungen unterbindet. Auch hier ergab sich als günstigste Konzentration 100 nM, bei welcher die Zellmigration komplett inhibiert war, ohne dass ein zytotoxischer Effekt nachzuweisen war.

Für den Endpunkt Differenzierung wurden verschiedene Substanzen getestet, unter anderem die Gap-junction-Blocker Glycyrrhetic acid und Carbenoxolone, für welche eine spezifische Inhibition der neuronalen Differenzierung bei NT2-Zellen aus der Literatur bekannt war (Bani-Yaghoub et al., 1999). In unserem Differenzierungsassay ließ sich allerdings die spezifische Inhibition der Expression von β tubIII nicht vom allgemeinen zytotoxischen Effekt abgrenzen. Das in Phase I als Kontrollsubstanz

eingesetzte 5-Fluoro-Uracil ist als Endpunkt-spezifische Kontrolle nicht geeignet, da die Substanz diverse, nicht Differenzierungs-spezifische toxische Wirkungen in Zellen entfaltet. Als spezifisch Differenzierungs-inhibitorische Substanz griffen wir schließlich auf Natrium-Valproat zurück. Dessen spezifischer inhibitorischer Effekt auf die neuronale Differenzierung von NT2-Zellen ist auch aus der Literatur bekannt (Hill et al., 2008). Zwar gehört Natriumvalproat zum Set der Testsubstanzen (Tab.2), aber die Etablierung der endpunktspezifischen Kontrollen sollte ja nicht nur für diese Testphase erfolgen, sondern für die weitere Verwendung des Assays mit unbekanntem Testsubstanzen. Eine Konzentration von 333 μM Natriumvalproat wurde als am besten geeignet befunden und wurde im weiteren Verlauf der Substanztestungen als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

2.1.3 Optimierung und Standardisierung der Substanzbehandlungsschemata anhand von Substanztestungen mit dem Trainingset

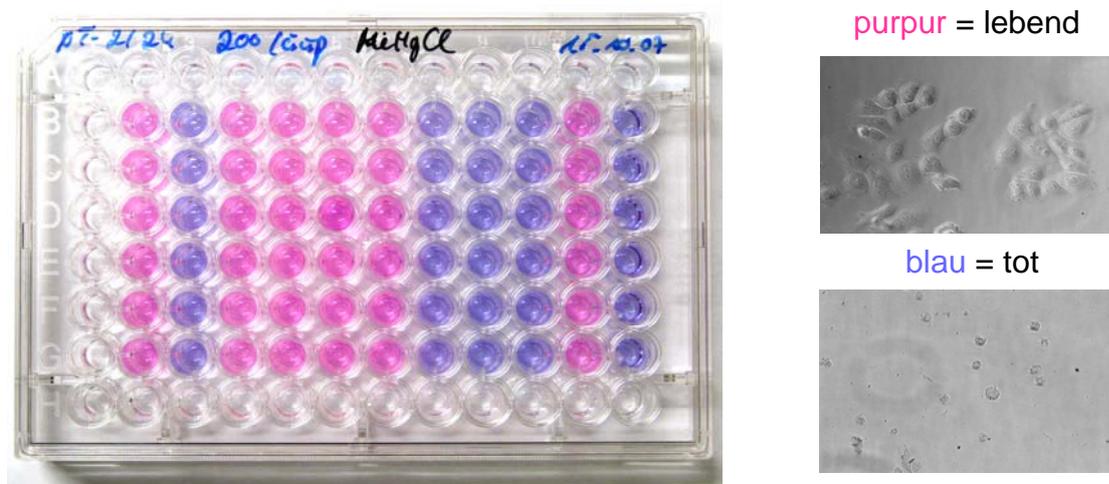


Abb. 2 Alamar Blue Assay zur Proliferationsbestimmung. NT2-Zellen nach 7 Tagen in Kultur mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz Methylquecksilber. Lebende Zellen verfärben den Assay purpurn, bei toten Zellen bleibt der Farbstoff blau.

Für den Endpunkt Proliferation war in Phase I mit dem Alamar Blue Assay ein zellbasierter Viabilitätsassay (Abb. 2) etabliert worden, bei dem die Zellzahl über einen Zeitraum von 10 Tagen zu vier festgelegten Zeitpunkten gemessen wurde (nach 3, 5, 7 und 10 Tagen in Kultur). In Phase II wurde dieser Ansatz weiter verfolgt, und dahingehend optimiert, dass nur noch die akute Zytotoxizität nach 3 Tagen (ca. 1 Zellzyklus) mit der nach 10 Tagen verglichen wurde. Hierzu wurde der aus den

Projektmitteln (Phase I) angeschaffte Fluoreszenzplattenleser Tecan Infinite M200 erfolgreich verwendet.

Die so gewonnenen Messwerte beschreiben aber nicht nur reine Proliferation, sondern beinhalten auch die Auswirkungen von substanzbedingtem Zelltod. Dies muss nicht unbedingt ein Nachteil sein, denn die Prozesse der Proliferationsinhibition und tödlicher Zellschädigung lassen sich auch in

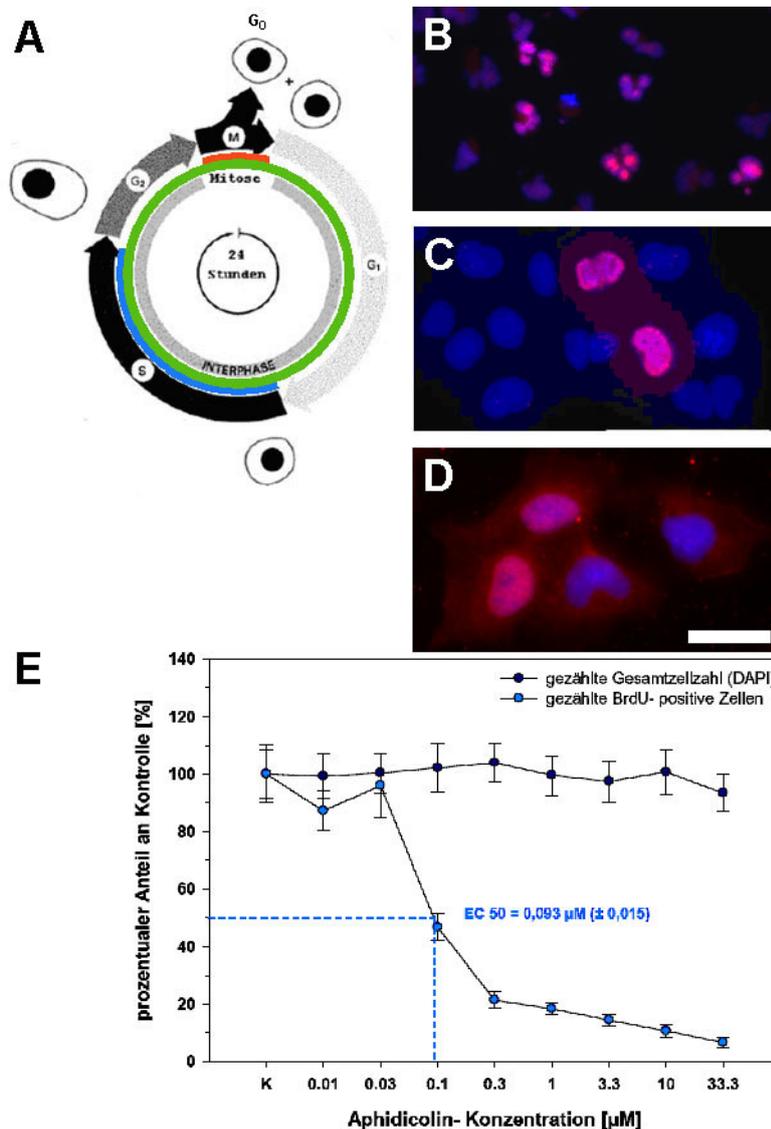


Abb. 3: A Zellzyklus mit Proliferationsmarkern. Ki67 (grün) färbt proliferierende Zellen während des gesamten Zellzyklus, nicht aber Zellen, die den Zellzyklus verlassen haben (G_0). BrdU (blau) markiert die S-Phase, phospho-H3 (rot) die M-Phase des Zellzyklus. B rot: ki-67-Färbung. C rot: phospho-H3-Färbung. D rot: BrdU-Färbung nach 4 Stunden Inkorporation. B-D: blau: Zellkernfärbung mit DAPI, Maßstab 40 μm (B), 20 μm (C, D) E BrdU-Assay (blau) und Alamar Blue-Viabilitätsassay (schwarz) nach 6 Stunden Inkubation mit Aphidicolin.

Tierversuchen nicht ohne weiteres von einander abgrenzen, für die die hier zu entwickelnden *in vitro* Assays Ersatz oder Ergänzung sein sollen. Trotzdem sollten spezifische Proliferationsmarker auf eine eventuelle Eignung als Testsystem geprüft werden. Für diesen Zweck kamen drei unterschiedliche Proliferationsmarker in Frage: ki67, Phospho-Histon H3 und BrdU (Abb. 3). Die Phospho-H3-Färbung markiert allerdings nur während der M-Phase des Zellzyklus, die nur ca. 1 Stunde andauert. Dies führt dazu, dass nur sehr wenige Zellen angefärbt werden, was eine quantitative Auswertung erschwert, und, eine automatisierte Messung für High Throughput-Anwendungen ausschließt. Die ki67-Immunmarkierung reagiert nur sehr langsam auf das Verlassen des Zellzyklus, da das Antigen offenbar auch nach dem Ausstieg aus dem Zellzyklus noch eine Weile präsent bleibt. Zusätzlich kommt bei dieser Immunfärbung ein ungünstiges Signal/Hintergrund-Verhältnis hinzu, welches wiederum eine automatische Messung im High Throughput-Verfahren erschwert.

BrdU (5-Brom-2-desoxy-Uridin) ist ein Analogon des Nukleosids Thymidin und wird, wenn im Zellkulturmedium zugegeben, anstelle dessen in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Dort lässt es sich mit monoklonalen Antikörpern nachweisen (Abb. 3D). BrdU markiert Zellen während der S-Phase des Zellzyklus. Über die Inkubationsdauer mit BrdU lässt sich die Anzahl der markierten Zellen einstellen. Es lassen sich sehr gut positive von negativen Zellen unterscheiden und auszählen. Anhand des DNA-Synthase-Inhibitors Aphidicolin ließ sich zeigen, dass innerhalb eines kurzen Zeitraumes (6 Stunden) eine Proliferations-Inhibition nachweisbar und klar von allgemeiner Zytotoxizität abgrenzbar ist (Abb. 3E). Daher schien der BrdU-Assay zur Ergänzung und Überprüfung der Proliferationsmessung mit dem Alamar Blue-Viabilitätsassay am besten geeignet.

Tatsächlich lässt sich im BrdU-Assay eine spezifische Inhibition der Proliferation zum Beispiel für die Retinsäure zeigen, die als Morphogen eine neuronale Differenzierung der Vorläuferzellen bewirkt, die damit den Zellzyklus verlassen und nicht mehr proliferieren (Abb.4). Bei keiner der Substanzen aus dem Testset war dies der Fall (Abb.5). In manchen Fällen ergab sich sogar ein niedrigerer EC50-Wert für die allgemeine Zytotoxizität als für die BrdU-Inkorporation, z.B. bei Natriumvalproat (Abb.4, 5).

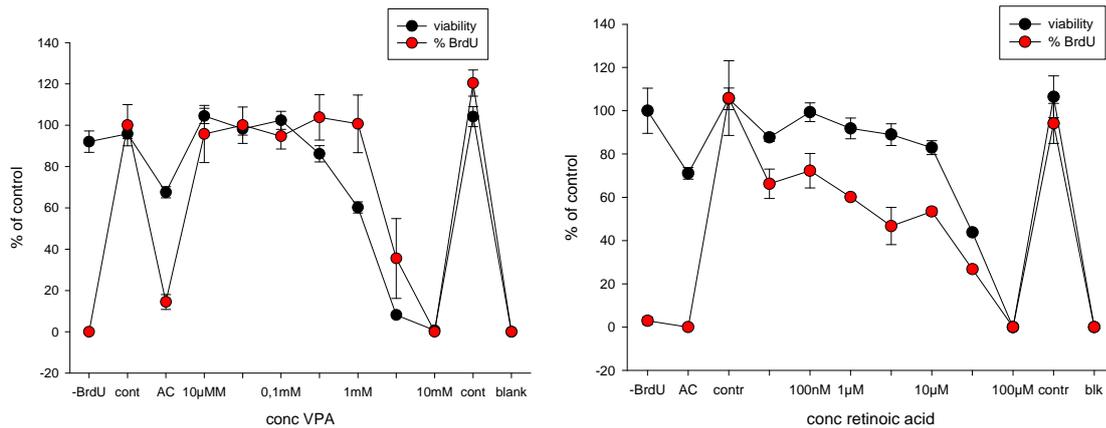


Abb. 4: Dosis-Wirkungs-Kurven von Natriumvalproat (links) und Retinsäure (rechts) im BrdU-Proliferations-Assay nach 48h Substanzexposition und 4h BrdU-Inkorporation. Schwarz: Viabilität, gemessen mit dem Alamar Blue Assay, rot: Prozentsatz der BrdU-positiven Zellen, jeweils Mittelwerte mit S:E:M: aus 6 wells pro Konzentration, normiert auf die Kontrolle (cont). AC: endpunktspezifische Kontrolle (100 nM Aphidicolin).

Es ist daher davon auszugehen, dass keine der Testsubstanzen direkt den Prozentsatz der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus reduziert. Ein möglicher antiproliferativer Effekt beruht somit auf anderen Mechanismen, die nicht von allgemeiner Zytotoxizität abzugrenzen sind. Als prädiktiver entwicklungsneurotoxischer Endpunkt ist die BrdU-Inkorporation in diesem Zellkultursystem deshalb ungeeignet und wurde nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde auf die in Phase I entwickelte Methode (Viabilitätsmessungen derselben Zellkultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Testsubstanzeexposition) zurückgegriffen. Die neu hinzugekommenen Testsubstanzen Natriumarsenit und Penicillin G wurden in diesem Assay während der restlichen Projektlaufzeit getestet (siehe 2.1.4).

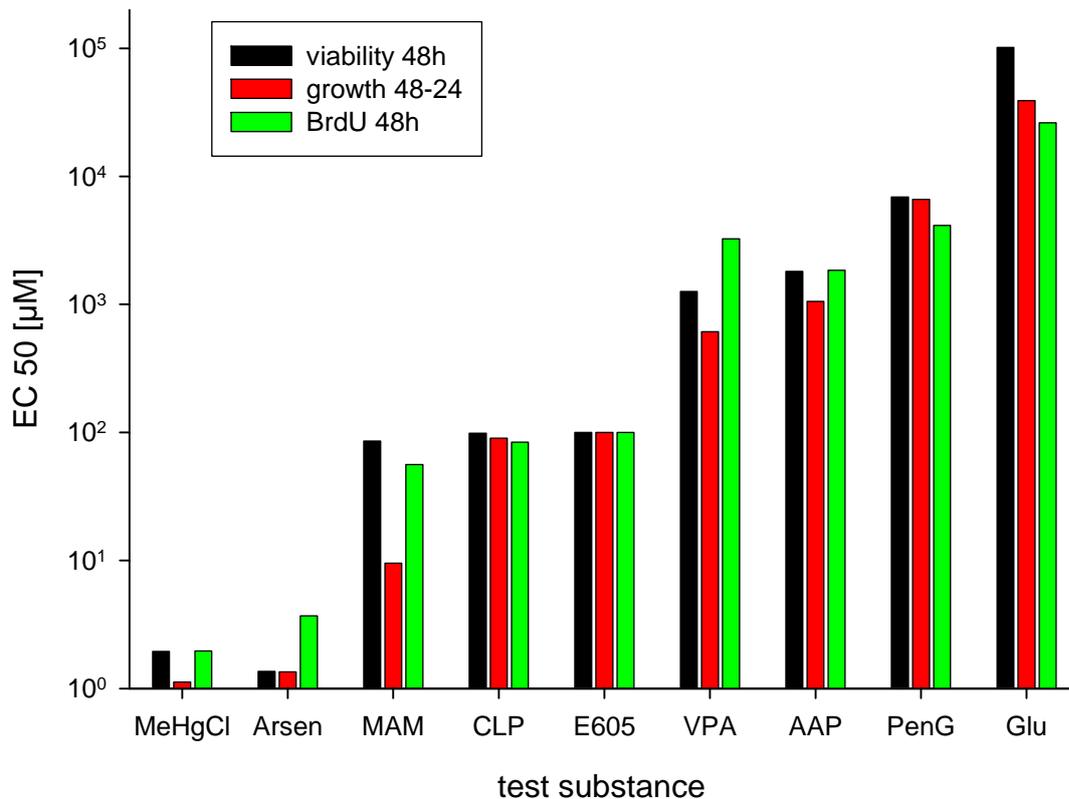


Abb. 5: EC₅₀-Werte für alle 9 Testsubstanzen ermittelt aus Dosis-Wirkungs-Kurven wie in Abb. 3. Grün: BrdU-Proliferations-Assay nach 48h, schwarz: Viabilitätsassay nach 48h, rot: Wachstum der Zellkultur, ermittelt aus den Differenzen der Viabilität nach 24h und 48h.

Für den Endpunkt Differenzierung wurden ausgesäte NT2-Zellen nach 4 Tagen Kultur ohne und weiteren 5 Tagen Kultur mit Testsubstanzexposition fixiert und gegen den spezifischen neuronalen Marker β tubIII Immunfluoreszenz-gefärbt, nukleäre Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (Abb. 6). Bei bestimmten Antikörperkonzentrationen lassen sich beide Fluoreszenzfärbungen im aus den Projektmitteln angeschafften Plattenlesegerät im 96-well-Format automatisch auslesen. Zusätzlich wurden β tubIII-positive Zellen von Hand gezählt und die Gesamt-Zellzahl mit Hilfe des Alamar Blue Assays bestimmt.

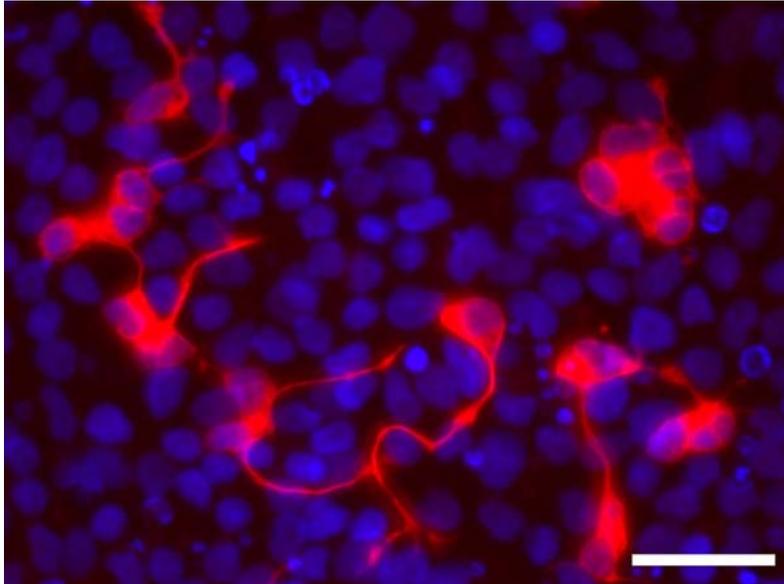


Abb. 6: NT2-Zellen nach 9 Tagen in Kultur unter differenzierenden Bedingungen. rot: neuronal differenzierte Zellen mit auswachsenden Neuriten (β tubIII), blau: Zellkerne (DAPI), Maßstab 50 μ m.

Dabei sollten die Messungen der Zellzahl über DAPI-Fluoreszenz und mit Hilfe des Alamar Blue Viabilitätsassays redundant sein und dieselben EC50-Werte liefern. Dies sollte auch für die Messungen der neuronalen Differenzierung mit mikroskopischer Bestimmung des Anteils gefärbter Neuronen und der quantitativen Immunfluoreszenz im Plattenleser der Fall sein. Wie in Abb. 7 illustriert, war dies tatsächlich der Fall. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Messmethoden. Daher kann in Zukunft von der jeweils aufwändigeren Methode abgesehen werden und die Messung der DAPI-Fluoreszenz kombiniert mit der β tubIII-Immunfluoreszenz wird ausreichen, um spezifische Effekte auf die neuronale Differenzierung zuverlässig quantitativ zu bestimmen.

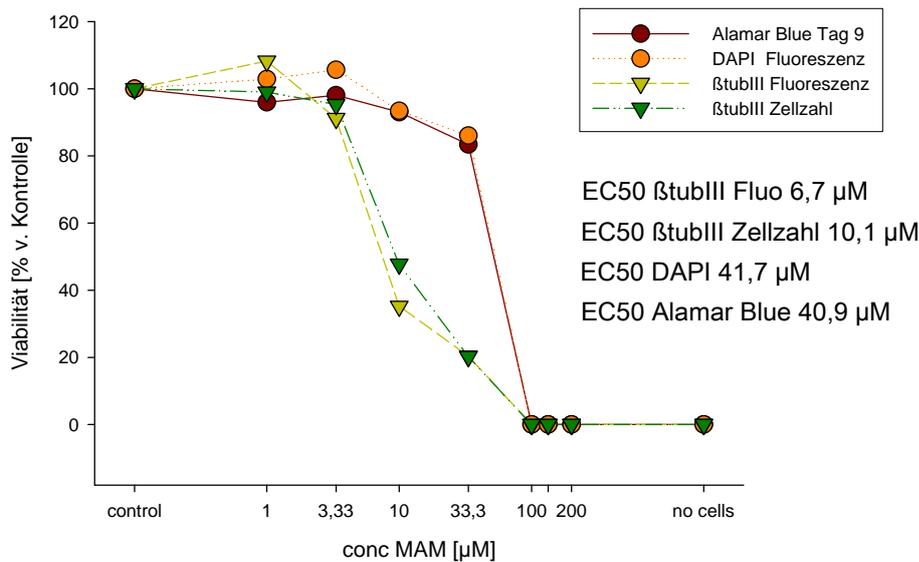


Abb. 7: Dosis-Wirkungskurven für Methylazoxymethanol (MAM) auf differenzierende NT2-Zellen. Sowohl die Gesamtzellzahl (zytotoxischer Effekt, Kreise) als auch die Zahl neuronal differenzierter Zellen (entwicklungsneurotoxischer Effekt, Dreiecke) wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden jeweils sehr gut übereinstimmend bestimmt. Spezifische Entwicklungsneurotoxizität lässt sich hier eindeutig von allgemeiner Zytotoxizität abgrenzen.

Für den Endpunkt Migration hatten wir schon in Phase I den bei unseren Kooperationspartnern in Düsseldorf entwickelten Migrationsassay auf das NT-2 System übertragen und angepasst. Dazu wurde die Migrationsdistanz der Zellen bestimmt, die aus auf Matrigel ausgebrachten Aggregaten ausgewandert waren (Abb. 8).

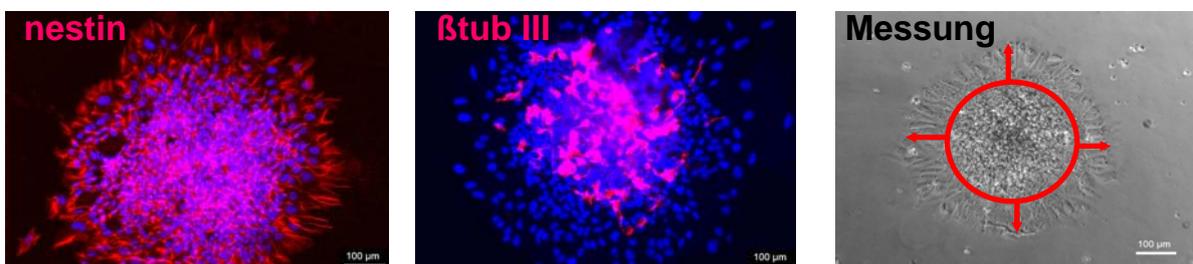


Abb. 8: NT2-Zellen nach 8 Tagen in Kultur unter differenzierenden Bedingungen, davon 48 h in adhärenter Kultur. Nur Nestin-exprimierende Vorläufer, nicht aber βtubIII-positive Neuronen Migrieren. blau: Zellkerne (DAPI). Gemessen wird die Migrationsdistanz in 4 Richtungen.

Bei den auswandernden Zellen handelt es sich zu diesem Zeitpunkt um Nestin-positive Vorläuferzellen, nicht um schon neuronal differenzierte β-Tubulin III-positive

Zellen (Abb.8). Nach jeweils 24h bzw. 48h Testsubstanz-Exposition wurde die Migrationsstrecke unter Verwendung der aus Projektmitteln beschafften Metamorph-Software gemessen (Abb.8). Gleichzeitig wurde zur Beurteilung der allgemeinen Zytotoxizität ein Alamar Blue Viabilitätsassay durchgeführt. In Phase I war schon die prinzipielle Aussagekraft des Assays belegt worden. Es zeigte sich aber nun, dass die Methode in Hinblick auf die Entwicklung einer modularen Teststrategie für *High-Throughput-Screening* nur bedingt geeignet sein würde. Zum Einen ist die Arbeit mit den sphärischen Aggregaten zeitaufwändig und fehleranfällig, zum Anderen beruht die Auswertung der Migrationsstrecken auf der subjektiven Festlegung der Sphäregrenze, welche gerade bei kleineren Sphären nach 48 h manchmal schwer zu erkennen ist. Das führte dazu, dass unterschiedliche Bearbeiter zu unterschiedlichen Messwerten kamen (Differenz der EC50-Werte um den Faktor 2, in Einzelfällen bis um den Faktor 5). Auch die softwaregesteuerte Automatisierung der Messverfahren mit Metamorph erbrachte hier keine grundsätzliche Verbesserung.

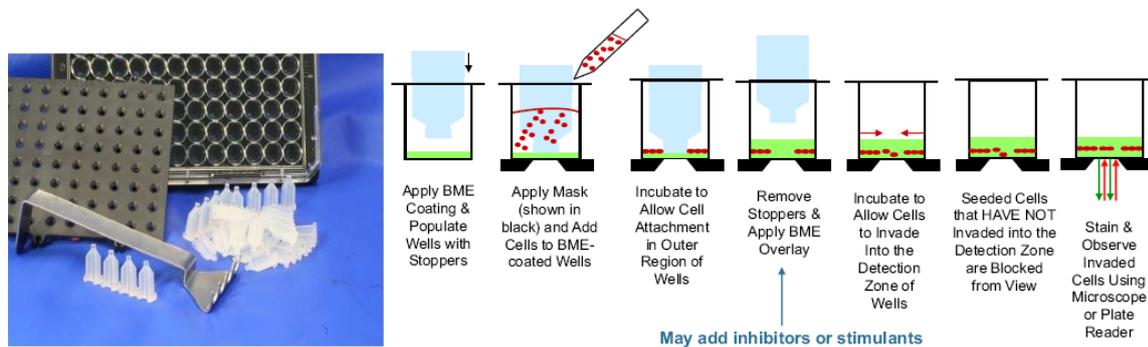


Abb.9: Oris Cell Migration Assay.

Aus diesem Grunde haben wir nach alternativen Messverfahren für die NT2-Vorläufer-Migration gesucht. Dabei hat sich der ORIS Cell Migration Assay von der Firma Amsbio (Abb.9) als Erfolg versprechend herausgestellt. Es werden NT2-Vorläuferzellen in Laminin-beschichteten 96-well-Platten ausgesät, in die zuvor Silikonstopfen eingebracht wurden. Diese bedecken in jedem well einen Kreis von 2 mm Durchmesser, in welchem sich keine Zellen befinden. Nach dem Anheften der Zellen werden die Stopfen entfernt und Zellen können in den freigewordenen Kreis hinein migrieren. Nach 44-48 h Expositionsdauer werden die Zellen fixiert und eine Zellkernfärbung mit DAPI wird durchgeführt. Zur exakten Festlegung der Kreisgrenze wird bei der Mikroskopie der Zellen unter die 96-well-Platte eine schwarze Lochmaske montiert, deren kreisförmige Löcher exakt der Größe und Position der Silikonstopfen entsprechen. Der Startpunkt der Messung ist mit dem Rand der

Lochmaske eindeutig festgelegt, und bei ausreichender Zelldichte ist auch die Migrationsstrecke objektiv messbar (Abb. 9, 10).

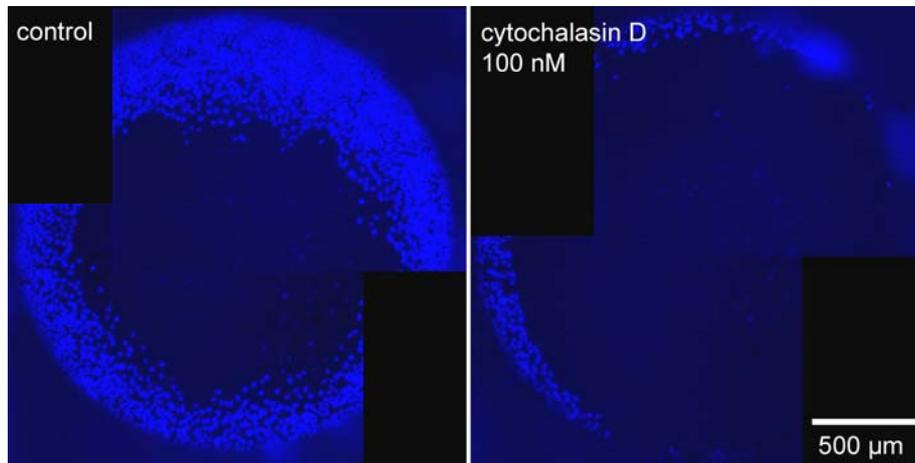


Abb. 10 Fluoreszenzaufnahmen von NT2-Zellen (Zellkerne mit DAPI gefärbt), nach 48h Migration im ORIS Cell Migration Assay.

Weiterhin bietet sich die Möglichkeit, mit Hilfe des Fluoreszenzplattenlesers die Zelldichte im Migrationskreis zu quantifizieren, wodurch das Messverfahren außerordentlich beschleunigt wird und eine Anwendbarkeit auch im *High-Throughput-Screening* möglich ist. Um dies zu erreichen, wurden im Berichtszeitraum verschiedene Parameter optimiert, unter anderem die Expositionsdauer (optimal: 44-48h), die Zelldichte (60.000 Zellen/well), die Zellpassage (zwischen 24 und 28), die Beschichtung der Zellkulturplatten (PDL, 100 µg/ml und anschließend Laminin, 100 µg/ml), die Konzentration von DAPI (0,1-0,5 µg/ml). Für die automatische Ausmessung der Migration über die DAPI-Fluoreszenz erwies es sich als essentiell, sämtliche nicht-sterile Lösungen zu filtern, da auch geringfügige Kontaminationen (z.B. mit Staub) die Messungen stark verfälschen. Unter diesen optimierten Bedingungen ergeben visuell am Fluoreszenzmikroskop durchgeführte und automatisch mit dem Fluoreszenzplattenleser getätigte Messungen übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 11). Bei spezifisch entwicklungstoxischen Substanzen lässt sich die Hemmwirkung auf die Migration eindeutig von einem vor der Migrationsmessung ermittelten allgemein zytotoxischen Effekt abgrenzen (Abb. 11).

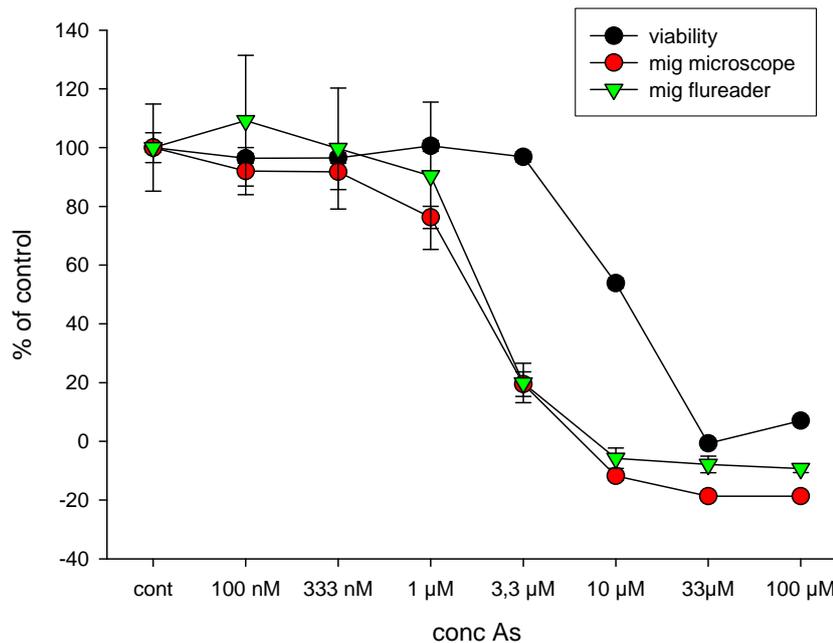


Abb. 11 Dosis-Wirkungs-Kurven für Natriumarsenit nach 48h Migration im ORIS Cell Migration Assay. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der visuell bestimmten Migrationsstrecken (rot) mit den im Flureszenzreader durch die Lochmaske gemessenen DAPI-Zellkernfluoreszenzen (grün). Die allgemeine Zytotoxizität, gemessen mit dem Alamar Blue Viabilitätsassay (schwarz) ließ sich davon sehr gut abgrenzen. Die Viabilität wurde erst bei einer dreifach höheren Arsenkonzentration beeinträchtigt als die Migration.

Zur Etablierung des letzten Endpunkts, die Ausbildung synaptischer Netzwerke und elektrischer Aktivität auf Multielektrodenarrays konnten wir beitragen, indem wir erstens dem für diese Aufgabe verantwortlichen Projektpartner in Freiburg sowohl fertig differenzierte NT2-Neuronen als auch NT2-Vorläuferzellen schickten, und zweitens vom 22.9.-24.9.2010 vor Ort in Freiburg bei der Etablierung der Zellkultur im Labor von Prof. Egert halfen. Kurz darauf konnten die Verbundpartner die ersten erfolgreichen Ableitungen elektrischer Aktivität von NT2-Neuronen-Kulturen melden. Somit kann als gesichert gelten, dass unter unseren Kulturbedingungen gewonnene NT2-Neuronen elektrisch aktiv sind. Details zu den Versuchen mit NT2-Neuronen auf Multielektrodenarrays finden sich im Bericht des Verbundpartners (Teilaufgabe 5).

2.1.4 Erfassung der entwicklungsneurotoxischen Potentiale von Chemikalien einer überarbeiteten Substanzliste zu den optimierten Zeitpunkten

Nach Etablierung der prädiktiven Endpunkte sollten für das ausgewählte Modellsubstanz-Set Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen und IC50-Werte bestimmt werden.

Dies wurde für alle drei etablierten entwicklungsneurotoxikologischen Endpunkte in mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Substanz und Endpunkt durchgeführt. (exemplarisch für den Endpunkt Differenzierung dargestellt in Abb. 13). Die Halbhemmkonzentrationen (EC50) wurden sowohl graphisch als auch mathematisch aus einer nichtlinearen Regression nach $y = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{\text{Hillslope}})$ ermittelt.

Zum Vergleich wurden die Mittelwerte der EC50-Bestimmungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt und für jeden Endpunkt Rankings aufgestellt (Abb. 12,14,15).

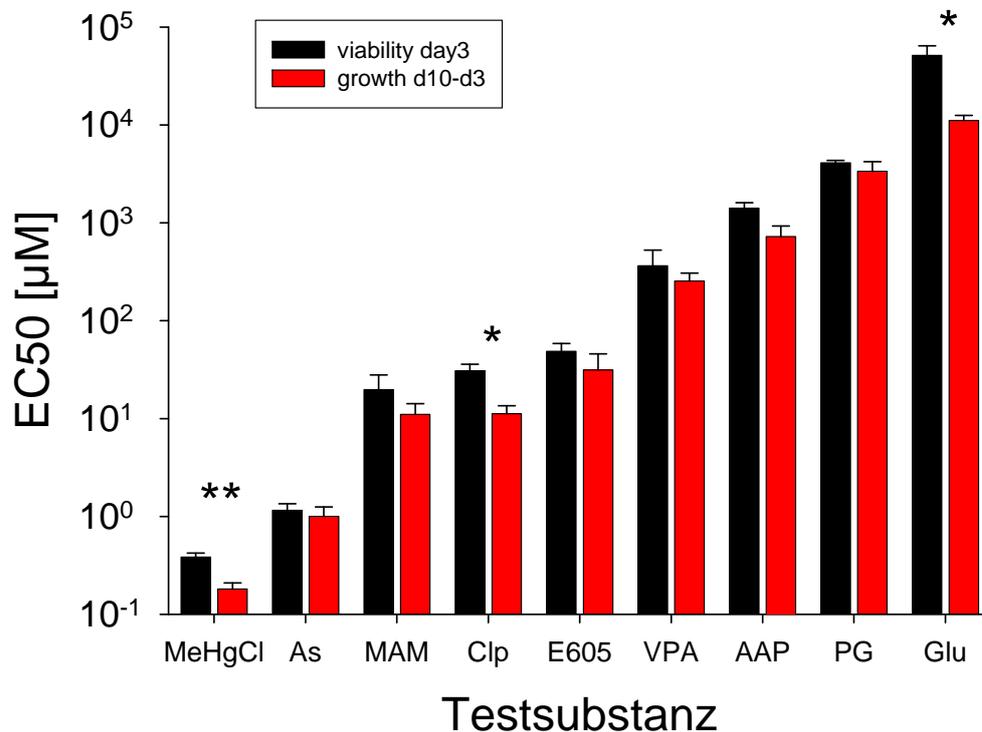


Abb. 12: Endpunkt Proliferation: Mittlere EC50-Werte für unmittelbare Toxizität (schwarz) und für Proliferation (rot). Entwicklungsneurotoxische Effekte lassen sich von allgemeiner Zytotoxizität bei den Substanzen MeHgCl und CLP abgrenzen. Die Werte für Glutamat liegen im unphysiologischen Bereich.

Der Endpunkt Proliferation ließ sich mit den NT2-Zellen nicht in gewünschter Weise optimieren. Es lassen sich nur bei wenigen Positiv-Substanzen spezifische von unspezifischen Effekten abgrenzen (Abb. 12), und auch eine Negativsubstanz (Glutamat) weist einen signifikanten Effekt auf (wenn auch im unphysiologischen Bereich). Daher können wir den Proliferationsassay mit NT2-Zellen als Test auf Entwicklungsneurotoxizität nur bedingt empfehlen.

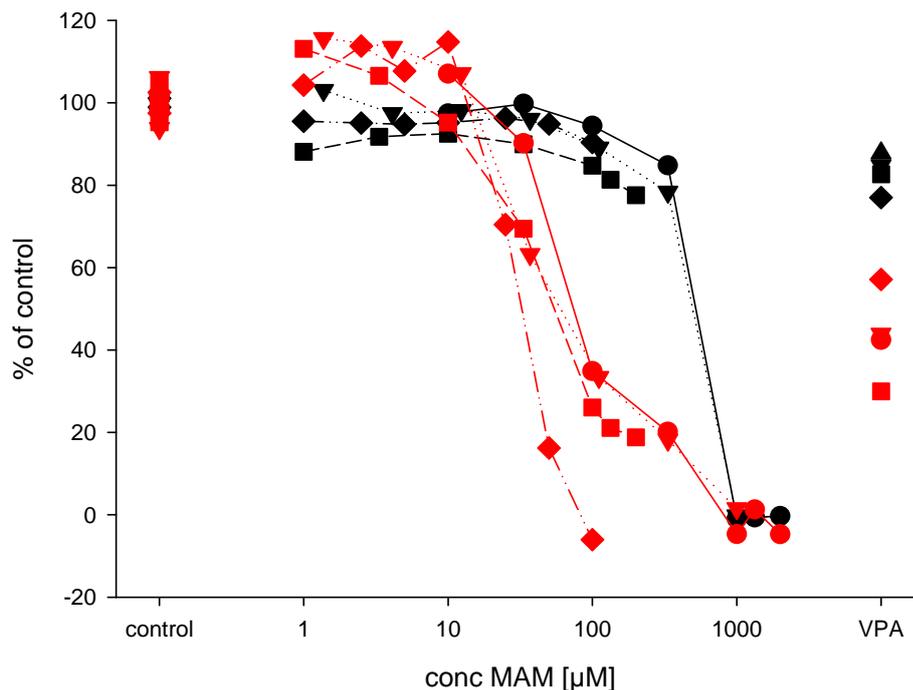


Abb. 13: Endpunkt Differenzierung: Dosis-Wirkungs-Kurven für MAM aus vier unabhängigen Messungen. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus 6 technischen Replikaten normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Rot: Differenzierung, gemessen als β tubIII-Fluoreszenz, schwarz: Zellzahl (Viabilität) gemessen als DAPI-Fluoreszenz. VPA: Endpunktspezifische Kontrolle (333 μ M Natriumvalproat). Die Kurven für die spezifisch entwicklungsneurotoxische Wirkung (rot) unterscheiden sich deutlich von den Kurven für allgemeine Zytotoxizität (schwarz).

Der Differenzierungsassay kann hingegen als etabliert und optimiert gelten. Bei allen Positivsubstanzen lässt sich der spezifische vom unspezifischen Effekt signifikant abgrenzen (Abb. 13, 14). Die während der Projektphase durchgeführten redundanten Messungen desselben Phänomens (allg. Zytotoxizität über Alamar Blue Viabilitätsassay und über DAPI-Fluoreszenz und Inhibition der neuronalen Differenzierung über mikroskopische Auszählung und über β tubIII-Immunfluoreszenz) bestätigten, die Validität der Messungen. Um für die Zukunft eine

Reduktion der nötigen Messungen zu erreichen, können wir vorschlagen, nur das jeweils am wenigsten aufwändige Messverfahren durchzuführen, d.h. Zytotoxizität über quantitative DAPI-Fluoreszenz und neuronale Differenzierung über quantitative β tubIII-Immunfluoreszenz zu messen.

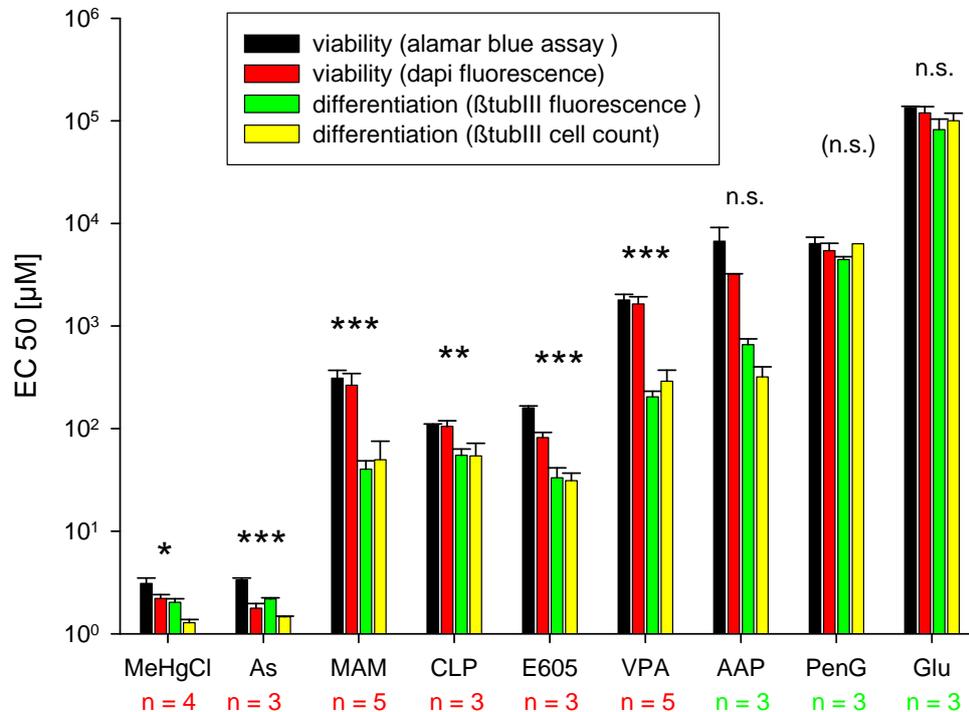


Abb. 14: Endpunkt Differenzierung Mittlere EC50-Werte für allgemeine Zytotoxizität (schwarz und rot) und für neuronale Differenzierung (grün und gelb). Entwicklungsneurotoxische Effekte lassen sich von allgemeiner Zytotoxizität bei den Entwicklungsneurotoxischen Substanzen (rot) abgrenzen. Die Negativsubstanzen (grün) weisen keine signifikant abgrenzbaren EC50-Werte auf..

Auch beim Endpunkt Migration konnten wir in der kurzen zur Verfügung stehenden Zeit trotz der notwendigen Umstellung auf ein völlig neues Messverfahren einen für *high throughput*-Messungen im 96-well-Maßstab geeigneten Assay etablieren und optimieren. Bei fast allen Positivsubstanzen lässt sich wiederum der spezifische Effekt (hier auf die Migration) von einem unspezifischen zytotoxischen Effekt abgrenzen (Abb.15). Die durch automatische Fluoreszenzmessungen gewonnenen Werte stimmen dabei sehr gut mit den mikroskopisch ermittelten Werten überein, so dass auch hier für die Zukunft eine Reduktion der Messungen möglich wird, und die aufwändige Methode des mikroskopischen Ausmessens durch die automatische Fluoreszenzmessung ersetzt werden kann.

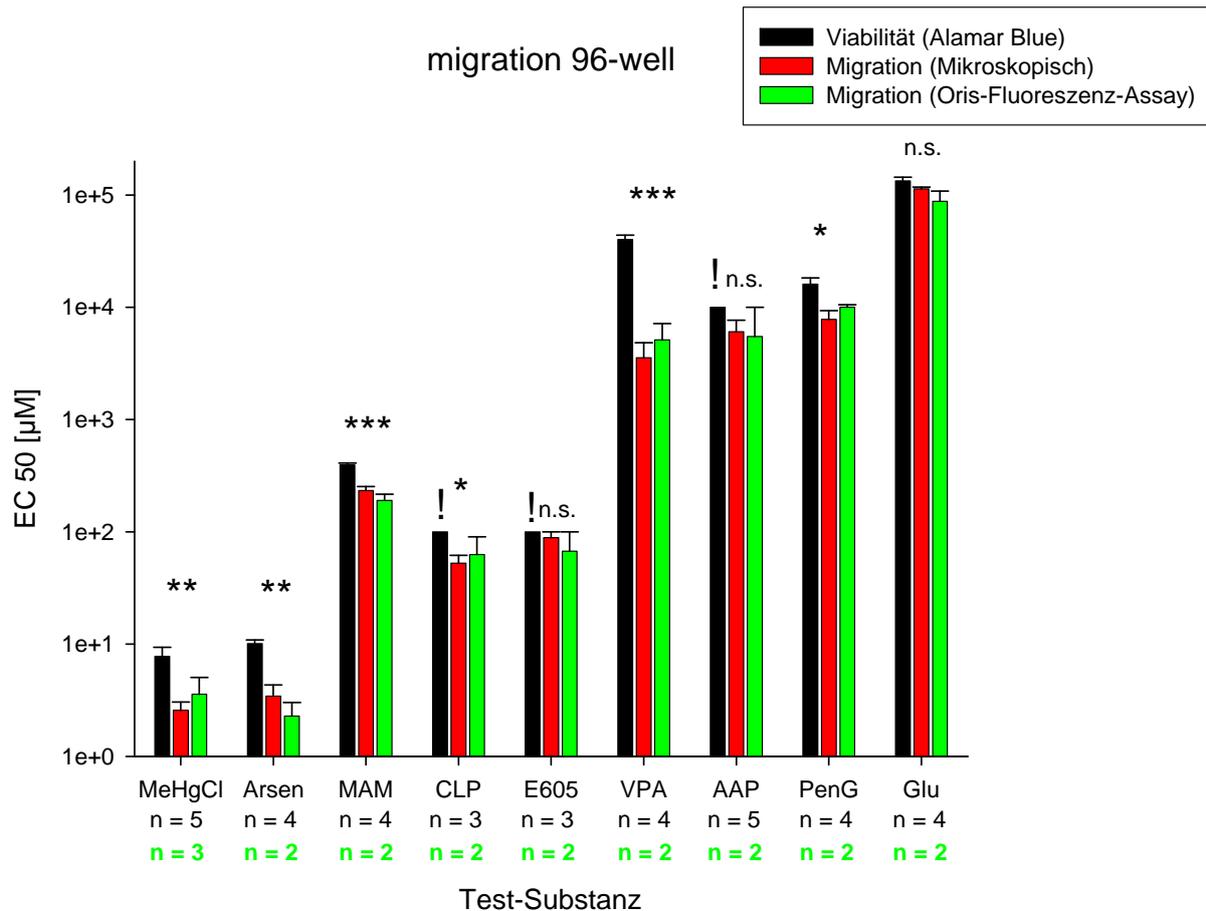


Abb. 15: Endpunkt Migration: Mittlere EC50-Werte für allgemeine Zytotoxizität (schwarz) und für Migration (rot und grün). Entwicklungsneurotoxische Effekte lassen sich von allgemeiner Zytotoxizität bei den Entwicklungsneurotoxischen Substanzen MeHgCl, Arsen, MAM, Chlorpyrifos und Natriumvalproat abgrenzen. Die Negativsubstanzen Acetaminophen und Glutamat weisen keine signifikant abgrenzbaren EC50-Werte auf. Interessanterweise scheint Penicillin G die Migration zu beeinträchtigen, allerdings bei unphysiologischen Konzentrationen (ca. 10mM). Dass Parathion (E605) keinen signifikanten Effekt zeigt, liegt möglicherweise daran, dass die Substanz nicht in höherer Konzentration als 100 µM löslich war. Sterne geben den Signifikanzgrad der Unterschiede zwischen zytotoxischem (schwarz) und Migrations-Effekt (rot) an. (!: EC50>höchste einsetzbare Konzentration).

Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die entwicklungsneurotoxikologischen Endpunkte Differenzierung und Migration Assays etabliert und optimiert werden konnten, die eine Quantifizierbarkeit mit einfachen Auswertverfahren anhand ausgewählter Testsubstanzen gewährleisten. Die meisten positiven (bekanntermaßen entwicklungsneurotoxischen) Substanzen zeigten in diesen Assays einen gut abgrenzbaren spezifischen Effekt. Wir können daher die Differenzierungs- und Migrationsassays mit NT2-Zellen aus unserer Sicht

uneingeschränkt für den Aufbau einer modularen Teststrategie in einer anschließenden Prävalidierungsphase empfehlen.

2.1.5 Biometrische Auswertung

Die gemessenen Originaldaten wurden fristgemäß an unseren Projektpartner (ZEBET) übermittelt, der den biometrischen Gesamtbericht erstellen wird.

2.1.6 Entwicklung einer *in vitro* Teststrategie zur Prävalidierung

Dieser Punkt kann erst nach der biometrischen Auswertung durch den Projektpartner ZEBET abgearbeitet werden (voraussichtlich März 2012).

2.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalkosten: Der aus den Projektmitteln eingestellte Wissenschaftler (Dr. M. Stern) koordinierte die Versuche, führte die Vorversuche und Messungen zur Proliferation, Differenzierung und Migration durch. Er wertete Versuche aus, dokumentierte sie, schrieb die anstehenden Berichte und präsentierte die Ergebnisse auf den Verbundtreffen und auf internationalen Fachtagungen.

MetaMorph-Software: Die aus Projektmitteln angeschaffte Software ermöglichte die mikroskopische Aufnahme und quantitative Auswertung der Differenzierungs- und Migrationsdaten.

2.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wie die erfolgreiche Etablierung der Assays gezeigt hat, waren alle geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen.

2.4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Nachdem Phase I dieses Projekts einen *proof of concept* für die generelle Eignung von in vitro Assays auf Entwicklungsneurotoxizität erbracht hatte, war die Zielsetzung von Phase II die Entwicklung und Optimierung standardisierter Tests, die sich für *High-Throughput*-Messungen eignen. Dies ist uns für zwei der drei entwicklungsneurotoxikologischen Endpunkte, nämlich neuronale Differenzierung und Migration, gelungen. Die biometrische Auswertung durch unseren Projektpartner ZEBET wird ergeben, wie prädiktiv unsere Assays im Vergleich mit denen der anderen Projektpartner sind und welche in eine modulare Teststrategie einfließen können, die im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans für eine Prävalidierungs-Studie vorgeschlagen werden soll.

2.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

keine

2.6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Teilergebnisse des Projektes wurden bereits veröffentlicht:

Podrygajlo G, Tegenge MA, Gierse A, Paquet-Durand F, Tan S, **Bicker G, Stern M** (2009) Cellular phenotypes of human model neurons (NT2) after differentiation in aggregate culture. *Cell Tissue Res.* 336:439-452

Tegenge MA, **Stern M, Bicker G** (2009) Nitric oxide and cyclic nucleotide signal transduction modulates synaptic vesicle turnover in human model neurons. *J Neurochem* 111:1434-1446

Podrygajlo G, Song Y, Schlesinger F, Krampfl K, **Bicker G** (2010) Synaptic currents and transmitter responses in human NT2 neurons differentiated in aggregate culture. *Neurosci Lett.* 468:207-210.

Tegenge MA, Rockel TD, Fritsche E, **Bicker G** (2011) Nitric oxide stimulates human neural progenitor cell migration via cGMP-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 12: 2089-2099

Außerdem wurden die vorläufigen Ergebnisse dieser Studie auf dem 7th Forum of European Neuroscience, Amsterdam, 3.7.-7.7.2010, sowie beim Ninth Meeting of the German Neuroscience Society in Göttingen 23.3.2011-27.3.2011 vorgestellt:

Stern M, Gierse A, Roloff F, Tan S, **Bicker G** (2010) Human Ntera-2 cells as a predictive *in vitro* test system for developmental neurotoxicity. *FENS Abstr.*, vol.5, 164.49, 2010

Stern M, Gierse A, Tan S, **Bicker G** (2011) *In vitro* tests for developmental neurotoxicity using a human neuronal precursor cell line. *Göttingen Neurobiology Report* 2011, T1-5B.

Die Ergebnisse der Substanztestungen sollen im folgenden Jahr veröffentlicht werden:

Stern M, Gierse A, Tan S, **Bicker G** (2012) Human Ntera-2 cells as a predictive *in vitro* test system for developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology* in prep.

Außerdem sollen Teilergebnisse auf internationalen Tagungen präsentiert werden.

4. Literatur

Andrews PW (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* 103:285-293

Bani-Yaghoub M, Bechberger JF, Underhill TM, Naus CCG (1999) The effects of gap junction blockage on neuronal differentiation of human NTera2/Clone D1 cells. *Exp Neurol* 156:16-32

Collins FS, Gray GM, Bucher JR (2008). Transforming environmental health protection. *Science* 319:906-907

ECHA (2009) ECHA general report 2008, ECHA-09-A-01-EN.

Hill EJ, Woehrling EK, Prince M, Coleman MD (2008) Differentiating human NT2/D1 neurospheres as a versatile in vitro 3D model system for developmental neurotoxicity testing. *Toxicology* 249:243-250

Lein P; Silbergeld E, Locke P, Goldberg AM (2005) In vitro and other alternative approaches to developmental neurotoxicity testing (DNT). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19:735-744

Moors M, Cline JE, Abel J, Fritsche E (2007) Human neural cell migration is controlled by Erk 1/2-dependent and -independent signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221:57-67.

OECD (2003). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Proposal for a New Guideline 426: Developmental Neurotoxicity Study.
http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

Pleasure SJ, Page CP, Lee VM (1992) Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* 12:1802-1815

- Paquet-Durand F, Tan S, Bicker G (2003) Turning teratocarcinoma cells into neurons: rapid differentiation of NT-2 cells in floating spheres. *Brain Res Dev Brain Res* 142:161-167
- Paquet-Durand F, Bicker G (2004) Hypoxic/ischaemic cell damage in cultured human NT-2 neurons. *Brain Res* 1011:33-47
- Paquet-Durand F, Gierse A, Bicker G (2006) Diltiazem protects human NT-2 neurons against excitotoxic damage in model of simulated ischaemia. *Brain Res* 1124, 45-54
- Podrygajlo G, Tegenge MA, Gierse A, Paquet-Durand F, Tan S, Bicker G, Stern M (2009a) Cellular phenotypes of human model neurons (NT2) after differentiation in aggregate culture. *Cell Tissue Res.* 336:439-452
- Podrygajlo G, Song Y, Schlesinger F, Krampfl K, Bicker G (2009b) Synaptic currents and transmitter responses in human NT2 neurons differentiated in aggregate culture. *Neurosci Lett.* 468:207-210
- Pollard TD (1981) Cytoplasmatic contractile proteins. *J Cell Biol* 19: 156-165.
- Russel WMS, Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. London: Methuen
- Slotkin TA, Levin ED, Seidler FJ (2009) Developmental neurotoxicity of parathion: progressive effects on serotonergic systems in adolescence and adulthood. *Neurotoxicol Teratol.* 31:11-17.
- Spadari S, Focher F, Sala F, Ciarrocchi G, Koch G, Falaschi A, Pedrali-Noy G (1985) Control of cell division by aphidicolin without adverse effects upon resting cells. *Arzneimittelforschung* 35:1108-1116.

Tegenge MA, Stern M, Bicker G (2009) Nitric oxide and cyclic nucleotide signal transduction modulates synaptic vesicle turnover in human model neurons. J Neurochem 111:1434-1446