

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: 0313925D

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: 01.05.2007 – 30.06.2009

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -/-	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Entwicklung prädiktiver in vitro Tests zur sicherheitstoxikologischen Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität, Teilprojekt 4	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Bicker, Gerd Stern, Michael	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.6.2009
	6. Veröffentlichungsdatum 18.12.2009
	7. Form der Publikation Bericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Physiologisches Institut, Abt. Zellbiologie Bischofsholer Damm 15/102 30173 Hannover	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -/-
	10. Förderkennzeichen 0313925D
	11. Seitenzahl 22
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 15
	14. Tabellen 2
	15. Abbildungen 9
16. Zusätzliche Angaben -/-	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -/-	
18. Kurzfassung 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 in vitro Testsystemen. Im Teilprojekt 4 wurden zellbasierte in vitro Tests an der humanen Teratocarcinoma-Zelllinie NT2, die sich zu postmitotischen humanen Neuronen differenzieren lässt, entwickelt. 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. Die geförderte Studie erbrachte den proof of concept für zellbasierte in vitro Tests an NT2-Zellen.	
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 entwicklungsstoxikologische Endpunkte etabliert werden sollten: **1. Proliferation, 2. Differenzierung, 3. Migration** und **4. elektische Aktivität und Netzbildung**. Auf Wunsch des Projektträgers war das Ziel in der Projektphase 1 noch nicht die Entwicklung einer ausgearbeiteten *in vitro* Teststrategie, sondern zunächst die Erbringung eines *proof of concept*, das zeigen sollte, dass die Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur Entwicklungsneurotoxizität möglich ist. In diesem Teilprojekt wurde eine humane Teratocarcinoma-Zelllinie (Ntera-2, NT2) eingesetzt, die sich in postmitotische Neuronen differenzieren lässt.

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	1. Jahr				2. Jahr			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Erstellen eines Modellsubstanzsets								
Optimierung des Differenzierungsprotokolls für NT-2 Zellen								
Etablierung der Differenzierung von NT-2 Zellen auf Neurosensorchips/ Unterstüzen der Uni Rostock								
Etablierung von prädiktiven toxikologischen Endpunkten								
Substanztestungen mit ausgewählten Modellsubstanzen								
Analyse der Prädiktivität (biometrische Auswertung)								

Tab. 1: Arbeitsplan Teilprojekt 4

1.3.1 Erstellung eines Modellsubstanzsets

Zu Beginn des Projektes sollte in Zusammenarbeit aller Partner ein Set von Modellsubstanzen erstellt werden, die für die Darstellung des *proof of concept* geeignet sind. Es sollten 4-6 entwicklungsneurotoxische Modellsubstanzen, für die gesicherte in vivo Daten vorliegen, und zwei Substanzen ohne Effekt ausgewählt werden, darunter Substanzen aus unterschiedlichen Stoffklassen und mit unterschiedlichem Wirkmechanismus.

1.3.2 Etablierung und Standardisierung der Differenzierung

Das bisher für die maximale Neuronengewinnung optimierte Differenzierungsprotokoll für die NT2-Zellen sollte so angepasst werden, dass optimal geeignetes Ausgangsmaterial für die Endpunkte Proliferation, Migration und Differenzierung vorlagen. Ein sollte versucht werden, ein Differenzierungsprotokoll zur Generierung von Gliazellen zu erstellen. Gleichzeitig sollte die Differenzierung der NT2-Neuronen auf Neurochips etabliert werden.

1.3.3 Festlegung und Etablierung von prädiktiven Endpunkten

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 ein zellbasierter Viabilitätsassay als Proliferationsassay etabliert werden.

Differenzierung: Als molekulare Endpunkte zur Beurteilung der Differenzierung kommen spezifisch exprimierte Markerproteine in Frage, z.B. β III-Tubulin als Neuronenmarker, MAP-2 als Dendritenmarker (Neuronen), Tau als axonaler Marker (Neuronen), GFAP als Astrozytenmarker (Gliazellen) und O4 oder CNPase als Oligodendrozytenmarker (Gliazellen).

Migration: In Anlehnung an die Methode unseres Projektpartners AG Dr. Fritsche, IUF Düsseldorf sollte ein Migrationsassay an sphärischen NT2-Aggregaten aufgebaut werden.

Elektrische Aktivität und Netzwerkbildung: Zur Erfassung der elektrischen Aktivität und Netzwerkbildung sollte die Kultur von NT2-Neuronen auf Neurosensorchips etabliert und die Signale bei der AG Prof. Gimsa, Uni Rostock gemessen werden.

1.3.4 Substanztestungen mit ausgewählten Modellsubstanzen

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

1.3.5 Biometrische Auswertung

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

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 nichtadhärenten Bedingungen konnte die benötigte Zeit zur Gewinnung reiner Neurone in unserem Labor auf unter einen Monat verringert werden (Paquet-Durand

et al., 2003, Abb. 1). Die gewonnenen postmitotischen Neuronen können auf geeignetem Untergrund in Kultur genommen werden und bieten so eine regelmäßig verfügbare Quelle menschlicher Neuronen. Diese 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).

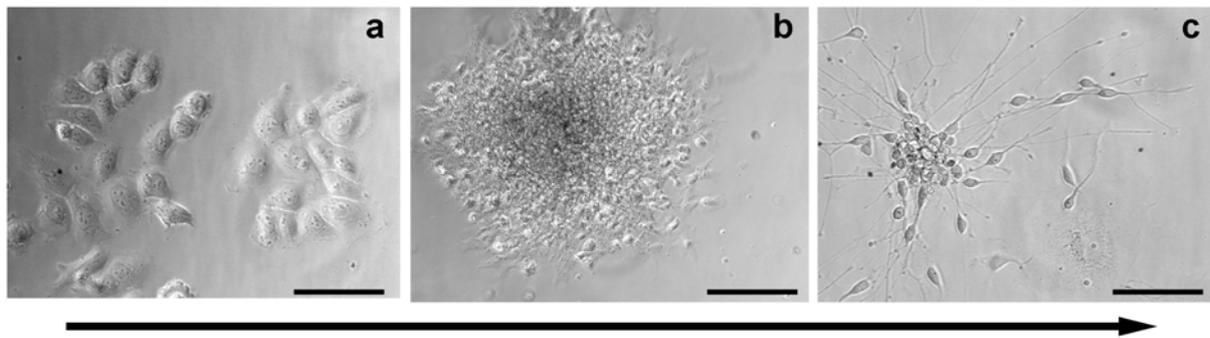


Abb. 1 Differenzierung von NT2-Zellen zu Neuronen: (a) NT2-Vorläuferzellen in adhärenter Kultur (Proliferation), (b) Zellaggregat, nach einer Woche in nichtadhärenter Kultur unter 10 µM Retinsäure auf adhärente Oberfläche gebracht (Proliferation, Differenzierung, Migration), (c) reife, aufgereinigte 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, Uni Rostock 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 erzieltes Ergebnis im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

2.1.1 Erstellung eines Modellsatzes

Die Verbundpartner einigten sich auf dem ersten aus Projektmitteln finanzierten Verbundtreffen auf drei sukzessiv in den Versuchsreihen einzusetzende Modellsatzes (Tab. 2).

Testset 1:	Methylquecksilberchlorid (MeHgCl)
	Methylazoxymethanol (MAM)
	Natriumvalproat (NaVPA)
Testset 2:	Bleiacetat (PbAc)
	Paracetamol (nicht entwicklungsneurotoxisch)
	Glutamat (nicht entwicklungsneurotoxisch)
Testset 3:	Chlorpyrifos
	Parathion (nicht entwicklungsneurotoxisch)

Tab. 2 Modellsubstanzsets zur Etablierung entwicklungsneurotoxikologischer Endpunkte. Die Liste umfasst 5 nachgewiesenermassen entwicklungsneurotoxische Substanzen, und 3 in bestimmten Konzentrationen toxische, aber bei diesen Konzentrationen nicht entwicklungsneurotoxische Substanzen

2.1.2 Etablierung und Standardisierung der Differenzierung

Für einen Proliferationsassay mit undifferenzierten NT2-Zellen wurde im 96-well-Maßstab mit 500 Zellen/well die günstigste Zellzahl bestimmt, die unter Kontrollbedingungen nach 10 Tagen in Kultur gerade noch nicht-konfluente Kulturen ergab. Für den Migrationsassay wurde das Differenzierungsprotokoll optimiert, mit dem Ergebnis auf Matrigel-beschichtete 12 mm Deckgläschen 5-10 Sphären, die sich unter Retinsäure in 7 Tagen nicht adhärenter Kultur gebildet hatte, auszusäen. Für die neuronale Differenzierung im 96-well-Maßstab erwies sich eine Aussaat von 5-10 7 Tage alten Sphären/well bei anschließender 5-tägiger Kultur unter Testsubstanzapplikation als vorteilhaft. Die angestrebte Differenzierung zu Gliazellen gelang nicht. Ein Beschichtungsschema für die von der AG Gimsa, Uni Rostock zur Verfügung gestellten Neurosensorchips wurde für die NT2-Neuronen angepasst und Neuronen (20.000 bzw. 50.000 Zellen/Chip) erfolgreich für 3 Wochen darauf kultiviert.

2.1.3 Festlegung und Etablierung von prädiktiven Endpunkten



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 wurde mit dem Alamar Blue Viabilitätsassay (Abb. 2) die Zellzahl über einen Zeitraum von 10 Tagen zu vier festgelegten Zeitpunkten gemessen (nach 3, 5, 7 und 10 Tagen in Kultur), und die akute Zytotoxizität nach 3 Tagen (ca. 1 Zellzyklus) mit der nach 10 Tagen verglichen. Hierzu wurde der aus den Projektmitteln angeschaffte Fluoreszenzplattenleser Tecan Infinite M200 erfolgreich verwendet.

Für den Endpunkt Differenzierung wurden ausgesäte NT2-Zellen nach 4 Tage 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. 3). 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.

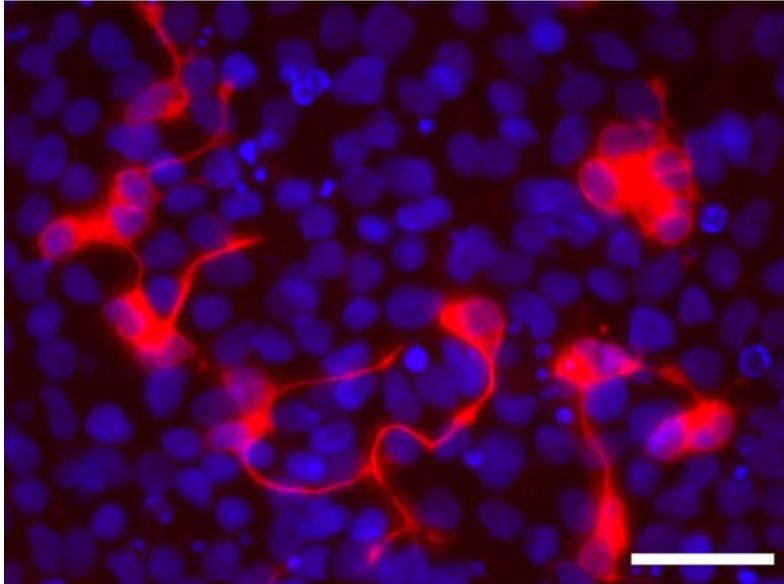


Abb. 3: NT2-Zellen nach 9 Tagen in Kultur unter differenzierenden Bedingungen. rot: neuronal differenzierte Zellen mit auswachsenden Neuriten (β tubIII), blau: Zellkerne (DAPI), Maßstab 50 μ m.

Für den Endpunkt Migration konnte das bei unseren Projektpartnern am IUF Düsseldorf etablierte Protokoll (Moors et al. 2007) nach einigen Anpassungen erfolgreich auf sphärische NT2-Aggregate übertragen werden. Dazu wurde die Migrationsdistanz der Zellen bestimmt, die aus auf Matrigel ausgebrachten Aggregaten nach 24 h, bzw. 48 h ausgewandert waren (Abb. 4). Gleichzeitig wurden zur bestimmung der allgemeinen Zytotoxizität Alamar Blue Assays durchgeführt.

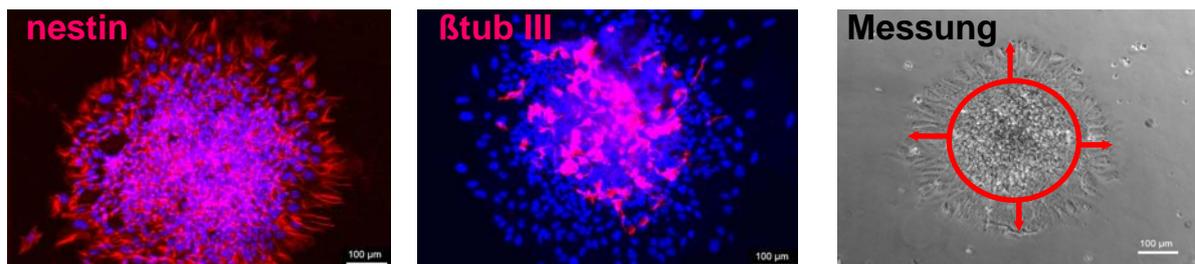


Abb. 4: NT2-Zellen nach 8 Tagen in Kultur unter differenzierenden Bedingungen, davon 48 h in adhärenter Kultur. Nur Nestin-exprimierende Vorläufer, nicht aber β tubIII-positive Neuronen Migrieren. blau: Zellkerne (DAPI). Gemessen wird die Migrationsdistanz in 4 Richtungen.

Für die Ausbildung synaptischer Netzwerke und elektrischer Aktivität auf Neurosensorchips ließ sich in während der Projektlaufzeit kein Endpunkt etablieren. In zwei Ansätzen wurden ausdifferenzierte NT2-Neuronen auf Silicium-Multielektroden-Array-Chips in Zusammenarbeit mit der AG Gimsa, Universität Rostock, kultiviert. In beiden Fällen gelang es eine Kultur zu etablieren, und für mehr

als 3 Wochen aufrechtzuerhalten (Abb. 5). Mit denselben Zellen parallel auf Glas durchgeführte Kontrollkulturen zeigten nach dieser Zeit ein differenziert ausgebildetes neuronales Netzwerk (β -Tubulin III-Färbung) und Anzeichen für die Etablierung synaptischer Strukturen (Synapsin-Färbung, Abb. 5).

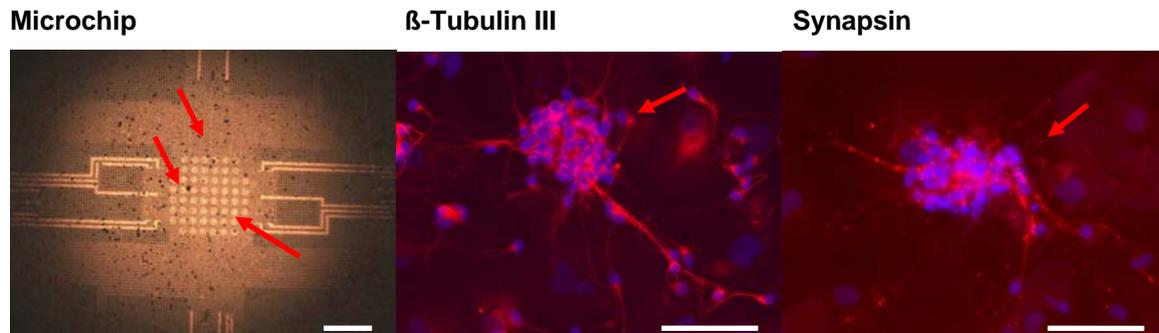


Abb. 5 Langzeit-Kultur (28 Tage) von NT-2 Neuronen auf Multielektroden-Array (links) und zur Kontrolle auf Glas-Deckgläschen (mitte und rechts, gefärbt gegen den neuronalen Marker β -Tubulin III und den synaptischen Marker Synapsin). Rote Pfeile zeigen auf Neuronencluster. Maßstab links 1 mm, Mitte und rechts 100 μ m.

Leider konnte bei zwei aus Projektmitteln finanzierten Aufenthalten in Rostock in keiner der Kulturen elektrische Aktivität gemessen werden, da sämtliche Elektroden auf allen Microchips auch bei Applikation eines Testsignals keine Funktion zeigten. Im zweiten Testlauf wurden alle eingesetzten Mikroelektrodenarrays daher einzeln vor dem Beginn der Zellkultur auf Funktionalität überprüft. Doch auch hier war eine Messung nach erfolgter Zellkultur unmöglich, da sämtliche Chips ihre Funktionalität verloren hatten.

Alternative Möglichkeiten, Indizien für synaptische Netzwerkbildung nachzuweisen wurden in unserem Labor erfolgreich erkundet und sind mittlerweile publiziert (Tegenge et al., 2009; Podrygajlo et al., 2009a, 2009b). Somit steht die grundsätzliche Eignung des NT2-Systems zur Messung der neuronalen Netzwerkbildung nicht in Frage, aber es bedarf eines anderen technischen Systems zur Messung.

2.1.4 Substanztestungen mit ausgewählten Modellsubstanzen

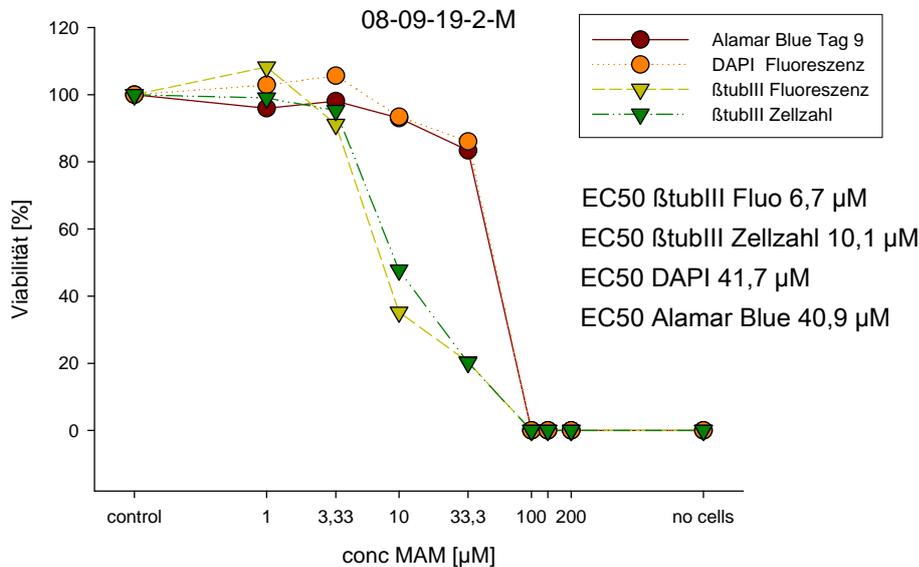


Abb. 6: Dosis-Wirkungskurven für Methylazoxymethanol (MAM) auf differenzierende NT2-Zellen. Sowohl die Gesamtzellzahl (zytotoxischer Effekt, Kreise) als auch die Zahl neuronal differenzierter Zellen (entwicklungsneurotoxischer Effekt, Dreiecke) wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden jeweils sehr gut übereinstimmend bestimmt. Spezifische Entwicklungsneurotoxizität lässt sich hier eindeutig von allgemeiner Zytotoxizität abgrenzen.

Für alle drei etablierten entwicklungsneurotoxikologischen Endpunkte wurden mit den ausgewählten Modellsubstanzen Dosis-Wirkungskurven aufgenommen (exemplarisch für den Endpunkt Differenzierung dargestellt in Abb. 5). 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 (bei Migration zwei) unabhängigen Messungen bestimmt und ein Ranking aufgestellt (Abb. 7-9).

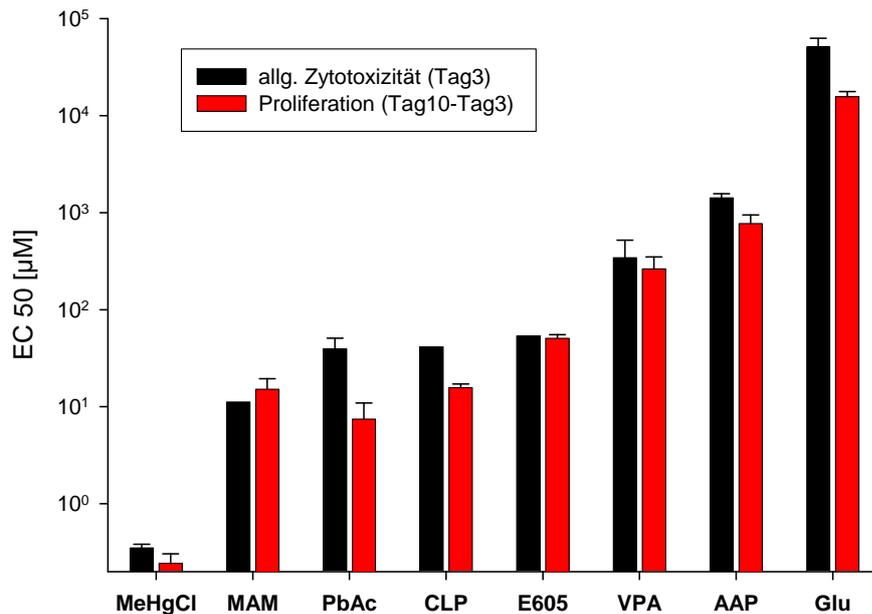


Abb. 7: Mittlere EC50-Werte für Proliferation. Entwicklungsneurotoxische Effekte lassen sich von allgemeiner Zytotoxizität bei den Substanzen MeHgCl, PbAc, CLP und AAP abgrenzen. Die Werte für Glutamat liegen im unphysiologischen Bereich.

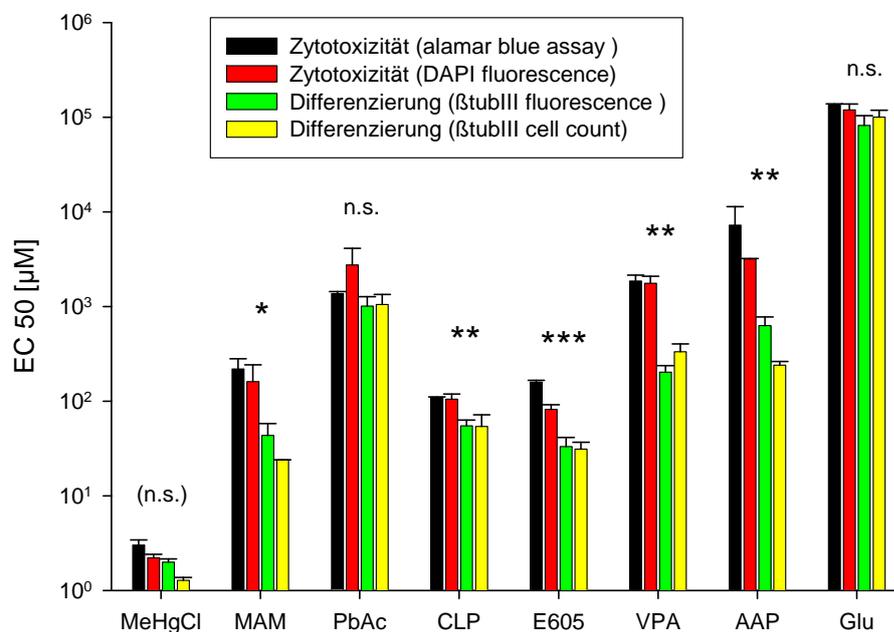


Abb. 8: Mittlere EC50-Werte für Differenzierung. Entwicklungsneurotoxische Effekte lassen sich von allgemeiner Zytotoxizität bei den Substanzen MAM, CLP, E605, VPA und AAP abgrenzen. Die Werte für Glutamat liegen im unphysiologischen Bereich.

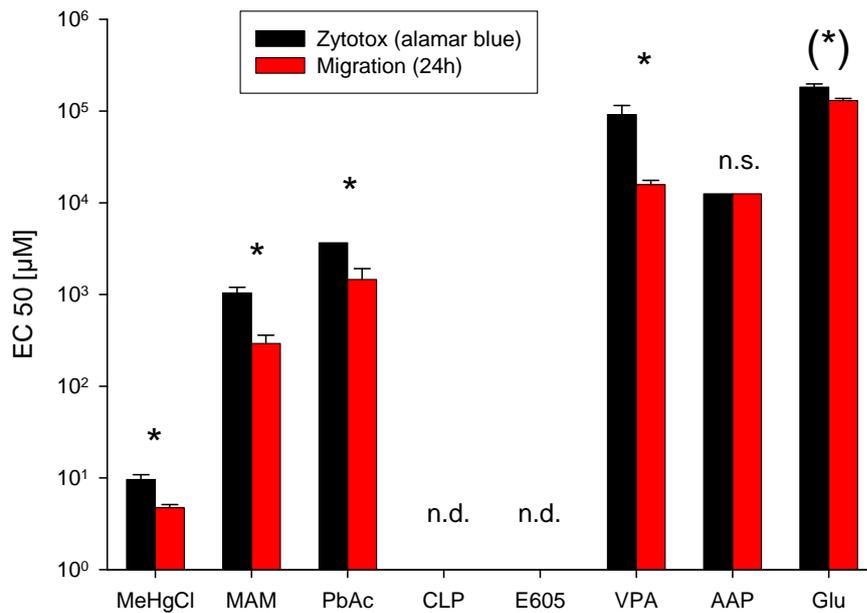


Abb. 9: Mittlere EC50-Werte für Migration. Entwicklungsneurotoxische Effekte (rot) lassen sich von allgemeiner Zytotoxizität (schwarz) bei den Substanzen MeHgCl, MAM, PbAc und VPA abgrenzen. Die Werte für Glutamat liegen im unphysiologischen Bereich. Die Werte für CLP und E605 konnten im Berichtszeitraum nicht ermittelt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass drei der vier angestrebten Endpunkte der neuronalen Entwicklung etabliert werden konnten und eine Quantifizierbarkeit mit einfachen Auswertverfahren anhand ausgewählter Testsubstanzen demonstriert wurde. Dabei ergibt sich ein differenziertes Bild hinsichtlich der entwicklungsneurotoxischen Wirkung der applizierten Substanzen. Die meisten positiven (bekanntermaßen entwicklungsneurotoxischen) Substanzen zeigten in den drei Assays einen abgrenzbaren spezifischen Effekt. Allerdings zeigten auch einige Negativ- (nicht entwicklungsstoxische) Substanzen unerwartete abgrenzbare Effekte, z.B. Parathion (E605) und AAP im Differenzierungsassay. Während die AAP Konzentrationen im oder nahe dem unphysiologischen Bereich von 10 mM waren, trat die Wirkung von Parathion im mikromolaren Bereich auf. Es gibt inzwischen Anzeichen für eine entwicklungsneurotoxische Wirkung von Parathion, die vor Beginn des Projektes nicht bekannt waren (Slotkin et al., 2009).

2.1.5 Biometrische Auswertung

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

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 und Differenzierung durch und leitete die Versuche zur Migration an. Er etablierte die Kultur auf Mikrochips und führte mit den Projektpartnern an der Uni Rostock die Messversuche auf Mikrochips durch. Er wertete Versuche aus, dokumentierte sie, schrieb die anstehenden Berichte und präsentierte die Ergebnisse auf den Verbundtreffen.

Fluoreszenz-Mikroplattenleser Tecan Infinite M200: Der Plattenleser wurde für die Proliferations- und Differenzierungsassays sowie für die routinemäßigen Viabilitätsassays eingesetzt, die als Kontrolle zur Abgrenzung der spezifischen Entwicklungsneurotoxizität von allgemeiner Zytotoxizität erfolgen mussten.

2.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Wie die erfolgreiche Demonstration des *proof of concept* gezeigt hat, waren alle geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen.

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

Die Zielsetzung der Phase 1 des Projekts war ausschließlich die Demonstration eines *proof of concept*, der die prinzipielle Möglichkeit der Entwicklung einer modularisierten *in vitro* Teststrategie zur Entwicklungsneurotoxizität zeigen sollte. Die eigentliche Entwicklung der Tests, auf die sich der Verwertungsplan bezieht, ist für die inzwischen angelaufenen Phase 2 geplant. Die im Förderungszeitraum gewonnenen Ergebnisse waren sehr hilfreich für die Planung von Phase 2, und bilden die notwendige Grundlage für eine Entwicklung von Tests die voraussichtlich bis zur Prävalidierungsfähigkeit im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans führen werden.

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

Neue Untersuchungen haben ergeben, dass eine als Negativ-Substanz eingesetzte Testsubstanz (Parathion) doch entwicklungsneurotoxische Eigenschaften haben kann (Slotkin et al., 2009), so dass für das Anschlussprojekt eine Änderung des Testsubstanzsets ins Auge gefasst werden muss.

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** (2009b) Synaptic currents and transmitter responses in human NT2 neurons differentiated in aggregate culture. Neurosci Lett. Epub ahead of print, doi:10.1016/j.neulet.2009.10.092

Die Ergebnisse der Substanztestungen sollen im folgenden Jahr veröffentlicht werden:

Stern M, Gierse A, Roloff F, **Bicker G** (2010) Human Ntera-2 cells as a predictive in vitro test system for developmental neurotoxicity. Neurotoxicology in prep.

Außerdem wurden Teilergebnisse auf internationalen Tagungen (8th Meeting of the German Neuroscience Society, 6th FENS Forum of European Neuroscience) präsentiert und sollen auch im nächsten Jahr auf entsprechenden 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

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.

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.* Epub ahead of print, doi:10.1016/j.neulet.2009.10.092
- 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.
- 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