

**Normale Humane Neurale Progenitorzellen als *in vitro*
Modellsystem für entwicklungsneurotoxikologische
Untersuchungen:
Molekulare und zellbiologische Charakterisierung**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michaela Moors

aus Mönchengladbach

Mai 2007

Angefertigt am Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Josef Abel
Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich
Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2007

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Entwicklungsneurotoxizität	1
1.2 Sensitivität des sich entwickelnden Gehirns gegenüber toxischen Einflüssen	2
1.3 Modellsysteme für ENT-Testungen	4
1.3.1 Tiermodelle	4
1.3.2 Alternative Testmethoden	5
1.3.2.1 <i>In vivo</i> Modelle	5
1.3.2.2 <i>In Vitro</i> Modelle	6
1.3.2.2.1 Embryonaler Stammzelltest (EST)	8
1.3.2.2.2 Neurale Stammzellen	8
1.3.2.2.3 Nabelschnurblut	9
1.3.2.2.4 Primäre neurale Progenitorzellen	9
1.4 Entwicklungsneurotoxische Chemikalien	11
1.5 Aufgabenstellung	13

2 Material und Methoden

2.1 Material	15
2.2 Methoden	17
2.2.1 Kultivierung von NHNP Neurosphären	17
2.2.1.1 Proliferationskultur	18
2.2.1.2 Passagieren der Neurosphären	18
2.2.1.3 Differenzierung	19
2.2.2 Exposition mit Chemikalien	19
2.2.2.1 Proliferierende Bedingungen	19
2.2.2.2 Synchronisierung von NHNP Zellen	20
2.2.2.3 Exposition differenzierender NHNP Zellen	20
2.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen	20
2.2.3.1 RNA-Isolation	20
2.2.3.2 Reverse Transkription	21
2.2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22

2.2.3.4 Affymetrix GeneChip Arrays	24
2.2.3.5 siRNA Transfektion	29
2.2.4 Proteinanalytik	30
2.2.4.1 Immunzytochemie	30
2.2.4.2 Western Blot Analysen	32
2.2.5 Zytotoxizitätsbestimmung	35
2.2.5.1 Viabilitätstest	35
2.2.5.2 Trypanblautest	36
2.2.6 Apoptosemessungen	36
2.2.6.1 Caspase Aktivitätstests	36
2.2.6.2 DAPI-Exclusionstest	37
2.2.7 Migrationsmessungen	37
2.2.8 Differenzierungsanalysen	37
2.2.9 Statistik	38

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von NHNP Zellen	40
3.1.1 Kultivierung von NHNP Zellen	40
3.1.2 Expression neurospezifischer Gene in NHNP Zellen	41
3.1.3 Expressionsanalyse von proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen	43
3.1.4 Reifung von NHNP Zellen	45
3.2 Spezifische Endpunkte zur Untersuchung von ENT	48
3.2.1 Zellviabilitätsmessung	48
3.2.2 Apoptose	49
3.2.3 Wirkung von entwicklungstoxischen Stoffen auf spezifische Endpunkte für ENT	51
3.2.3.1 Einfluss von Retinolsäure, cAMP und Quecksilber auf die Differenzierung von NHNP Zellen	51
3.2.3.2 Störung der Oligodendrozytendifferenzierung durch Blei	54
3.3 Migration	55
3.3.1 Einfluss von cAMP, Quecksilber, Blei und Ethanol auf die NHNP Zellmigration	56
3.3.2 Analyse an der NHNP Zellmigration beteiligter Signalwege	59

3.3.2.1 Rolle von ERK1/2	59
3.3.2.2 Bedeutung der Interaktion der PKC und der ERK1/2-Aktivierung in der NHNP Zellmigration	62
3.3.2.3 EGF-R und SFKs kontrollieren die NHNP Zellmigration	63
3.4 Interindividuelle Unterschiede verschiedener NHNP Zellisolate	68
4 Diskussion	
4.1 Charakterisierung von NHNP Zellen	71
4.1.1 Expressionsanalyse von proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen	73
4.1.2 Reifung von NHNP Zellen	77
4.2 Endpunkte zur Untersuchung von ENT	79
4.2.1 Retinolsäure, cAMP, Quecksilber und Blei modulieren die NHNP Zelldifferenzierung	80
4.2.2 Quecksilber und Ethanol inhibieren die NHNP Zellmigration	82
4.3 Molekulare Mechanismen der NHNP Zellmigration	83
4.3.1 Die Bedeutung von ERK1/2 in der NHNP Zellmigration	83
4.3.2 Regulation der ERK1/2-Aktivierung	85
4.4 Bewertung von NHNP Zellen als <i>in vitro</i> Modellsystem für ENT	90
4.5 Ausblick	92
5 Zusammenfassung	94
6 Literaturverzeichnis	96
7 Abkürzungsverzeichnis	108
8 Anhang	111

Für neurologische Störungen bei Kleinkindern werden multiple Ursachen verantwortlich gemacht. Neben genetischen Faktoren werden zunehmend Expositionen gegenüber exogenen Noxen diskutiert. Neurologische Defizite, die sich als Verminderung des IQs, Lernschwäche oder Aufmerksamkeitsdefizienzsyndrom äußern können, sind gesellschaftspolitisch von außerordentlicher Bedeutung, da sie im allgemeinen mit hohen Kosten für eine individuelle Förderung, Medikation und verminderter individueller Leistungsfähigkeit einhergehen. Um nachfolgende Generationen vor negativen Einflüssen von Chemikalien zu schützen, ist eine Risikobewertung von expositionsrelevanten Noxen notwendig. Es sind schätzungsweise 100.000 Altstoffe im Umlauf, die keiner toxikologischen Testung unterzogen wurden. Im REACH Programm der Europäischen Union sollen von diesen ca. 30.000 Substanzen mit einer jährlichen Produktion über 1Tonne hinsichtlich ihres toxischen Potentials bewertet werden, wobei entwicklungsneurotoxische Untersuchungen für Substanzen mit teratogenen und neurotoxischen Eigenschaften empfohlen werden (Goldman *et al.*, 2000; Kaufmann, 2003). Bis heute existiert neben aufwendigen Tierversuchen jedoch kein geeignetes Modellsystem zur Durchführung solcher Studien. Demnach ist die Etablierung von alternativen Testmodellen zur Bewertung des entwicklungsneurotoxischen Potentials diverser Chemikalien erstrebenswert.

1.1 Entwicklungsneurotoxizität

„Entwicklungsneurotoxizität“ (ENT) beschreibt funktionelle und morphologische Effekte exogener Substanzen auf das sich entwickelnde Nervensystem, die durch eine Exposition während der Schwangerschaft oder der Neugeborenenperiode zu pathologischen Gehirnveränderungen führen.

Die Bedeutung neurologischer Erkrankungen bei Kindern rückt durch die hohe Anzahl Betroffener immer mehr in den Vordergrund. In den USA weisen ungefähr 17% aller Kinder unter 18 Jahren neurologische Defizite auf, die neben genetischen und sozialen Ursachen auch auf eine Exposition gegenüber umweltrelevanten Noxen zurückzuführen sind (Schettler, 2001). Für diese Störungen wurden Substanzen wie Pestizide und endokrin wirksame Verbindungen verantwortlich gemacht, die durch die Nahrung und das Trinkwasser aufgenommen werden können. Da die Risikoabschätzung für die Chemikalienzulassung immer bedeutender wird, werden entsprechende Informationen zur ENT vom Gesetzgeber von der Industrie gefordert,

um eine Risikobewertung zum Schutz der Ungeborenen vor Alt- und Neuchemikalien zu ermöglichen.

Zur Untersuchung von ENT stehen zurzeit eine Richtlinie der U.S. EPA und ein Entwurf der OECD Richtlinie 426 zur Verfügung. In diesen Richtlinien werden morphologische Gehirnuntersuchungen der Versuchstiere, Verhaltenstests und die Untersuchung von Biomarkergenen für Gliosis und Zytotoxizität aus *in vivo* Studien gefordert. Solche Tierversuchsstudien sind jedoch sehr kostenaufwendig und zeitintensiv. Allein die Anzahl benötigter Tiere liegt bei etwa 140 Muttertieren und 1000 Jungtieren, was die Durchführung von Tierversuchsstudien für die Chemikaliertestung und Registrierung von mehreren tausend Chemikalien im Rahmen von REACH unmöglich macht. Deshalb gewinnt die Entwicklung von Alternativmodellen, die ein Screenen der zu testenden Chemikalien ermöglichen, zunehmend an Bedeutung.

1.2 Sensitivität des sich entwickelnden Gehirns gegenüber toxischen Einflüssen

Das sich entwickelnde Gehirn weist eine hohe Sensitivität gegenüber toxischen Schädigungen auf, die auf die Komplexität und die lange Zeitspanne der neuronalen Entwicklung zurückzuführen ist (Andersen, 2003; Claudio *et al.*, 2000; Rice and Barone, 2000; Rodier, 1995).

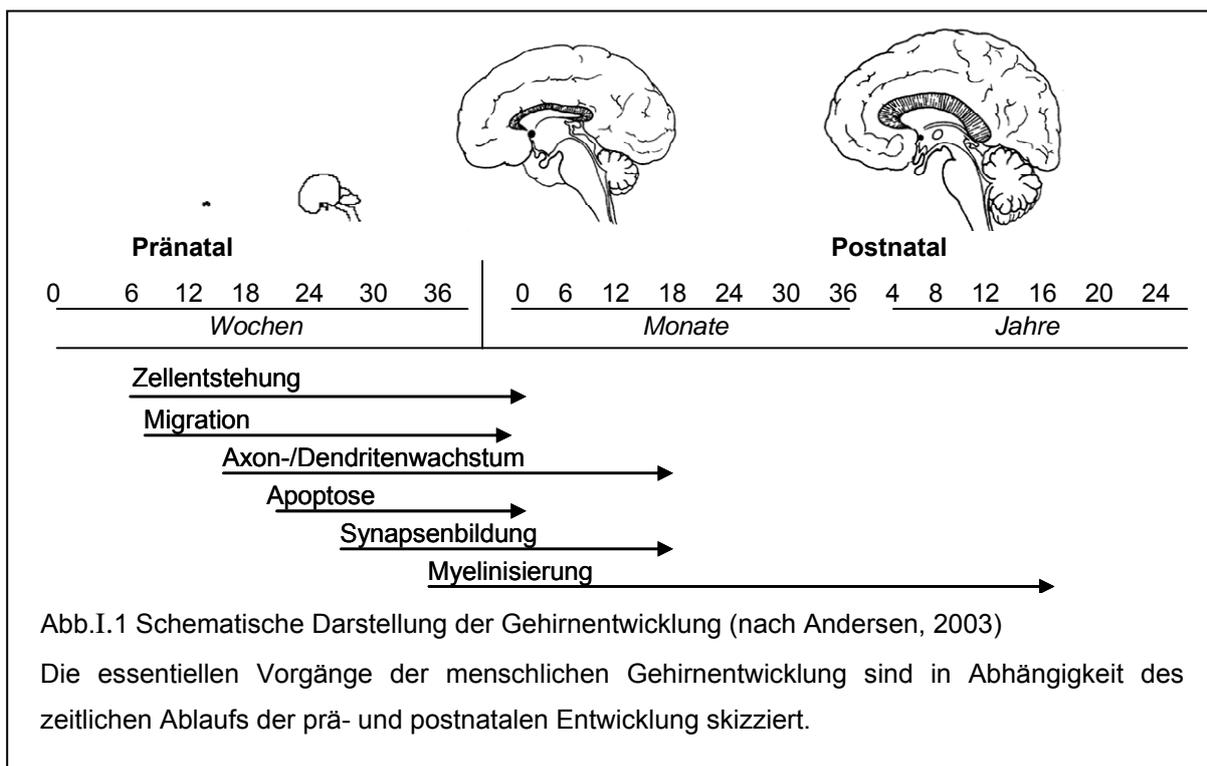
Die Komplexität der Gehirnentwicklung wird an der Vielzahl zellbiologischer Prozesse deutlich, die für eine normale Entwicklung des Gehirns essentiell sind und Angriffspunkte für Störungen der Gehirnentwicklung darstellen (Abb.1).

Zu diesen Prozessen gehören zellzahlregulierende Vorgänge wie Proliferation und Apoptose neuraler Stamm- und Progenitorzellen. Auch die kontrollierte Differenzierung der Progenitorzellen in die neuronalen Subpopulationen ist ein grundlegender Schritt der Neurogenese. Damit die neuronalen Zellen an ihren Bestimmungsort gelangen, ist die Zellmigration essentiell. Für die Reifung neuronaler Zellen ist der Prozess der Synaptogenese, die Ausbildung der Axone und Dendriten sowie die Myelinisierung von Bedeutung. Um eine funktionelle, elektrophysiologische Funktion des Gehirns zu gewährleisten, müssen die korrekten Verbindungen zwischen Neuronen geknüpft werden (Andersen, 2003; Rice and Barone, 2000; Rodier, 1995).

1 Einleitung

Wie in Abbildung I.1 dargestellt, finden die einzelnen Prozesse der Gehirnentwicklung über mehrere Wochen bis Jahre statt. Im Gegensatz zur Zellentstehung, die bereits ab der 6. Gestationswoche beginnt und nach der Geburt beendet ist, findet die Migration zusätzlich zur neuronalen Reifung prä- und auch postnatal statt. Die Myelinisierung dagegen beginnt kurz vor der Geburt und wird erst im Alter von 16 Jahren vollendet. Durch den zeitlichen Ablauf der Gehirnentwicklung bleibt die Empfindlichkeit des sich entwickelnden Gehirns in Abhängigkeit des betreffenden Prozesses über sehr lange Zeitspannen bestehen, so dass sich ENT nicht nur auf die embryonale und fetale Entwicklung bezieht, sondern die ersten Jahre nach der Geburt miteinbezieht.

Da die einzelnen Prozesse zu konkreten Zeitpunkten und somit zu spezifischen Entwicklungsstadien stattfinden, weist das sich entwickelnde Gehirn kritische Perioden der Sensitivität auf, in denen die Gehirnentwicklung durch verschiedene Noxen beeinflusst werden kann. Zusätzlich ist die Entstehung verschiedener Gehirnbereiche zeitlich gestaffelt, was die Spezifität toxischer Einflüsse auf bestimmte Areale des Gehirns zu speziellen Entwicklungsperioden erklärt (Rice and Barone, 2000). So gehören der Kortex, der Hippokampus und das Zerebellum zu den spät entstehenden Gehirnstrukturen (Andersen, 2003), wohingegen die Areale des Pros-, Mes- und Rhombencephalons bereits 28 Tage nach der Gestation zu erkennen sind.



Die pränatale Sensitivität wird zudem durch eine noch nicht vollständig ausgebildete Blut-Hirn-Schranke erhöht, so dass auch Ionen und hydrophile Noxen in das fetale Gehirn gelangen, die das adulte Gehirn nur schwer erreichen (Claudio *et al.*, 2000). Hier sind vor allem Metalle wie Quecksilber und Blei zu nennen, von denen eine höhere Akkumulation im fetalen als im adulten Gehirn nachweisbar ist (Bondy and Campbell, 2005).

Zusätzlich sind Metabolisierungen und Ausscheidungen exogener Substanzen im Fetus nur bedingt möglich, da die detoxifizierende Kapazität der Leber und auch die Fähigkeit zur renalen Exkretion im Fetus noch nicht vollständig ausgebildet sind (Bondy and Campbell, 2005).

1.3 Modellsysteme für ENT-Testungen

1.3.1 Tiermodelle

Im Bereich von ENT sind Tierversuchstudien zur Risikoabschätzung von Chemikalien vorgeschrieben, in denen verhaltensbiologische und pathologische Daten erfasst werden sollen. Nach der OECD Richtlinie 426 müssen motorische und sensorische Fähigkeiten neben der Lernfähigkeit und Gedächtnisleistung der Versuchstiere bewertet werden (Sobotka *et al.*, 1996). Für neuropathologische Untersuchungen werden Veränderungen in der Größe und Form des Gehirns zusätzlich zur relativen Größe der einzelnen Gehirnstrukturen erfasst. Auf zellulärer Ebene sind Vakuolisierungen und Zelldegenerationen ein Anzeichen für neurotoxische Effekte. Auch Nekrosen, Gliosen oder Hyperplasien innerhalb des neuralen Gewebes sind Kennzeichen für toxische Veränderungen nach der OECD Richtlinie 426 (Claudio *et al.*, 2000).

Ein Expositionsschema für Nagetierstudien ist in der Richtlinie der U.S. EPA (OPPTS 8706300) vorgeschlagen, in denen die Versuchstiere ab dem 6. Gestationstag bis zum 10. Tag nach der Geburt (PND) gegenüber drei unterschiedlichen Stoffkonzentrationen der Testsubstanz exponiert werden. Dieses Expositionsschema weist jedoch Defizite auf, weil die Exposition der Tiere nicht während allen kritischen Perioden der Gehirnentwicklung stattfindet. Da die Schädigung der Gehirnentwicklung jedoch aufgrund der Komplexität und der zeitlichen Staffelung der Entwicklung einzelner Gehirnareale direkt mit dem Expositionszeitraum korreliert ist, ermöglicht das vorgeschlagene Expositionsschema eine nur eingeschränkte

Risikoabschätzung (Claudio *et al.*, 2000). Dies wird an den folgenden Befunden der Exposition gegenüber Pestiziden deutlich: DDT zeigt nur dann eine toxische Wirkung in Mäusen, wenn eine Exposition ab PND 10 erfolgt (Eriksson *et al.*, 1992). Auch für Nikotin wurde eine kritische Periode zwischen PND10-16 identifiziert, während der adverse Effekte auf das sich entwickelnde Nervensystem beobachtet wurden (Nordberg *et al.*, 1991). Eine Exposition gegenüber Chlorpyrifos zeigt ebenfalls unterschiedliche neurotoxische Effekte in Abhängigkeit des Expositionszeitraums (Campbell *et al.*, 1997).

1.3.2 Alternative Testmethoden

1.3.2.1 *In vivo* Modelle

Eine Anwendung alternativer Testmethoden ist in der sicherheitstoxikologischen Prüfung möglich, da fundamentale Prozesse der Neurogenese über unterschiedliche Spezies konserviert sind (Lein *et al.*, 2007). Als zum Nagetier alternative *in vivo* Modelle zur Untersuchung von ENT stehen Vertebraten wie der Zebrafisch, der Medakafisch und der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) im Vordergrund. Diese Alternativmodelle ermöglichen die Untersuchung toxischer Effekte *in vivo* und erhalten somit die Komplexität der Physiologie des Gesamtorganismus. Gegenüber Nagetierstudien weisen diese Modelle diverse Vorteile auf. Sie haben eine geringe Größe, eine kurze Generations-, Embryonal- und Lebenszeit. Diese Aspekte ermöglichen schnell durchzuführende Generationsstudien und eine Kultivierung der Organismen in 96-well-Platten, so dass auch Hoch-Durchsatzuntersuchungen möglich sind. Zudem bietet die morphologische Transparenz der Embryos die Möglichkeit, Veränderungen in der Entwicklung neuraler Organe leicht und routinemäßig zu untersuchen (Coecke *et al.*, 2007).

Zu generellen Endpunkten von ENT zählen Zellproliferationsmessungen, Differenzierungsanalysen, Migrationstests und eine Bewertung der neuronalen Reifung. Wie aus Tabelle I.1 hervorgeht, bieten diese Alternativmodelle die Möglichkeit, Veränderungen in den besagten Endpunkten zu untersuchen. Auch stereotypische Verhaltensweisen sind von diesen Organismen bekannt, so dass zusätzlich Verhaltensstudien möglich sind (Orger *et al.*, 2004). Kritische Endpunkte, die nicht in allen vorgeschlagenen Modellsystemen untersucht werden können, sind jedoch die Myelinisierung, Synapsenbildung und die neuronale Konnektivität.

Tab.I.1 Gegenüberstellung von *in vivo* Alternativmodellen

In der Tabelle sind die zur Zeit diskutierten Vertebratenmodelle mit einer Bewertung genereller Endpunkte für ENT aufgeführt (Coecke *et al.*, 2007).

Endpunkt	Zebrafisch	Medaka	C. elegans
Proliferation	++	++	++
Neurale Differenzierung	++	++	++
Myelinisierung	+	-	-
Migration	++	++	++
Neuronale Reifung			
Axon-, Dendritenverlängerung	++	++	++
Synapsenbildung	++	-	++
Neuronale Konnektivität	++	-	++
Apoptose	++	++	++

Bei den vorgestellten Alternativmodellen besteht jedoch ebenso wie bei Nagetierstudien das Problem interspeziärer Unterschiede, die eine nur schwer einzuschätzende Extrapolation auf den Menschen erfordert.

Um solche Speziesdifferenzen zu umgehen, ist es notwendig, zusätzliche, auf menschlichen Zellsystemen basierte Alternativmethoden zu etablieren.

1.3.2.2 *In Vitro* Modelle

Grundlegende Prozesse der Gehirnentwicklung können zu einem gewissen Teil in *in vitro* Systemen nachgestellt werden. So können Prozesse wie Proliferation, neurale Differenzierung, neuronale Reifung und Apoptose in verschiedenen Zellsystemen beobachtet werden. Als potentielle *in vitro* Modelle stehen Stammzellen, immortalisierte Zelllinien und auch Gehirnaggregate verschiedener Spezies zur Diskussion. Auch primäre Zell- und Organkulturen scheinen vielversprechend zu sein, wobei Organkulturen den Vorteil aufweisen, dass die dreidimensionale *in vivo* Struktur bestehen bleibt (Coecke *et al.*, 2007). Tabelle I.2 zeigt eine Aufstellung der verschiedenen, zur Verfügung stehenden Modellsysteme, in der die möglichen Endpunkte zur Bewertung von ENT aufgeführt sind.

Während sich alle Modellsysteme eignen, Einflüsse auf die Zellproliferation (mit Ausnahme von Organkulturen) und die Apoptose zu untersuchen, treten bei der

Bestimmung der weiteren Endpunkte Differenzen zwischen den unterschiedlichen Modellsystemen auf. So sind Stammzellen sehr gut für eine Untersuchung der Zelldifferenzierung geeignet, während die Prozesse der Myelinisierung und der neuronalen Reifung eher in primären Kulturen und Organschnitten zu untersuchen sind. Eine Bewertung der immortalisierten Zelllinien zeigt zwar, dass auch in diesen Modellsystemen die diskutierten Endpunkte mit Ausnahme der neuronalen Reifung etabliert sind. Da es sich jedoch um entartete Zellen handelt, kann nicht von einer direkten Übertragbarkeit der Daten auf normale Zellen ausgegangen werden.

Ein Vergleich der verschiedenen *in vitro* Modellsysteme zeigt, dass sich die einzelnen Modelle je nach Endpunkt in ihrer Anwendbarkeit unterscheiden. Um eine möglichst umfassende Risikoabschätzung zum Schutz der Ungeborenen zu ermöglichen, ist es daher sinnvoll, verschiedene *in vitro* Modellsysteme in Hinblick auf ENT zu validieren und so eine Testbatterie verschiedener *in vitro* Systeme zu generieren. Im Folgenden werden die vielversprechendsten, zurzeit verfügbaren *in vitro* Systeme zur Testung von ENT vorgestellt.

Tab.I.2 Aufstellung potentieller *in vitro* Systeme zur ENT-Testung

Die Tabelle zeigt eine Zusammenstellung zur Verfügung stehender *in vitro* Modellsysteme, wobei eine Bewertung der generellen Endpunkte für ENT dargestellt ist (modifiziert nach Coecke *et al.*, 2007).

Endpunkt	Stammzellen	Primäre, dissoziierte Zellen	Organkulturen	Immortalisierte Zelllinien
Proliferation	++	++	-	++
Neurale Differenzierung	++	+/-	+	++
Myelinisierung	+	++	++	++
Migration	+/-	++	++	+/-
Neuronale Reifung				
Axon-, Dendritenverlängerung	+	++	++	+
Synapsenbildung	+	++	++	-
Neuronale Konnektivität	+	++	++	-
Apoptose	++	++	++	++

1.3.2 2.1 Embryonaler Stammzelltest (EST)

Der embryonale Stammzelltest (EST) ist die einzige *in vitro* Alternativmethode, die bereits zur Testung entwicklungstoxischer Substanzen erfolgreich validiert wurde (Genschow *et al.*, 2002). Da die verwendete Stammzelllinie auch in Neurone und Astrozyten differenzieren kann, eignet sich dieses Modell nicht nur zur Abwägung von Embryotoxizität, sondern auch zur Untersuchung von ENT (Buesen *et al.*, 2004). Wie mit allen nicht-menschlichen Zellen und Organismen besteht jedoch auch bei diesem Testsystem die Problematik der Extrapolation auf den Menschen, da der EST auf der Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen basiert (Seiler *et al.*, 2002). Humane neurale Stammzellen könnten ein menschliches Korrelat zu dem EST darstellen, da auch sie das Potential aufweisen, in neurale Zellpopulationen zu differenzieren. Zurzeit ist der Einsatz humaner embryonaler Stammzellen in Toxizitätstestungen in Deutschland jedoch nach dem Embryonenschutzgesetz nicht gestattet.

1.3.2.2 Neurale Stammzellen

Ebenso wie bei embryonalen Stammzellen, weisen auch neurale Stammzellen (NSC) das Potential der Selbsterneuerung und einer unbeschränkten Lebenszeit auf. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist das Differenzierungspotential von NSC jedoch auf die Differenzierung in die dominanten Zellpopulationen des Gehirns, Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone, beschränkt (Kennea *et al.*, 2002). NSC können als CD133⁺, CD34⁻, CD45⁻-Zellen aus verschiedenen Arealen des fetalen und adulten Gehirns und auch aus Nabelschnurblut isoliert werden (Buzanska *et al.*, 2002; Kennea and Mehmet, 2002; Kogler *et al.*, 2004). Diese unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus. Es konnten zwei Klassen neuraler Stammzellen identifiziert werden, die unterschiedliche Wachstumsfaktoren benötigen. Eine Gruppe von Stamm-/Progenitorzellen zeigt hauptsächlich eine Abhängigkeit des epidermalen Wachstumsfaktors EGF, während die zweite Klasse von FGF abhängig ist. Obwohl beide Populationen das Potential aufweisen, in die drei neuralen Zellpopulationen zu differenzieren (Kennea and Mehmet, 2002), scheint EGF die Differenzierung in Gliazellen und FGF die Bildung neuronaler Zellpopulationen zu promovieren (Kuhn *et al.*, 1997).

NSC können in Form von Einzelzellsuspensionen und auch in dreidimensionalen Zellaggregaten, sogenannten Neurosphären, kultiviert werden.

1.3.2.2.3 Nabelschnurblut

Aus den aus Nabelschnurblut isolierten NSCs konnte eine klonale, nicht-immortalisierte NSC-Zelllinie (HUB-NSC) generiert werden, die den neuronalen Stammzellmarker Nestin und GFAP exprimieren. Diese Zellen differenzieren zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Buzanska *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2005). Die neurale Differenzierung konnte durch den Zusatz von Retinolsäure oder BDNF moduliert werden, was für die Plastizität von HUB-NSC spricht (Buzanska *et al.*, 2002).

Weitergehende Charakterisierungen dieser Zelllinie ergaben, dass HUB-NSCs Kaliumströme aufweisen, die auf eine Erregung der Neuronenzellmembran hinweisen. Die Messung spezifischer Aktionspotentiale nach NMDA-Stimulation gelang jedoch nicht. Somit entspricht die elektrophysiologische Aktivität der HUB-NSC der von unreifen neuronalen Zellen (Buzanska *et al.*, 2006).

All diese Eigenschaften der HUB-NSC zeigen, dass diese Stammzelllinie eine vielversprechende Alternative zu Tierversuchen ist, da sie eine ethisch leicht vertretbare Nutzung von menschlichen Zellisolaten aus Nabelschnurblut darstellen und über einen nahezu unbegrenzten Zeitraum passagiert und verwendet werden können.

Kritisch ist zu bewerten, dass dies die Zelllinie eines Spenders ist und die Generierung von HUB-NSC bisher nicht reproduziert werden konnte. Des Weiteren ist nicht bekannt, ob das Alter der Zelllinie die Ergebnisse der Testungen beeinflussen könnte.

1.3.2.2.4. Primäre neurale Progenitorzellen

Bei der Auswahl primärer Zellen als *in vitro* Modell zur ENT-Testung sollten möglichst physiologische Bedingungen innerhalb der Modellsysteme erhalten bleiben, um eine grobe Authentizität zu gewährleisten. Demnach scheinen dreidimensionale Zellkulturen, die interzelluläre Strukturen ähnlich der *in vivo* Organisation ausbilden, am besten für solche Fragestellungen geeignet. Auch die Koexistenz verschiedener, repräsentativer Zellpopulationen des sich entwickelnden Gehirns sind für ein solches *in vitro* Modell positiv, da Zell-Zell-Interaktionen die terminale Differenzierung und die Sensitivität der einzelnen Zellpopulation beeinflussen können.

Neurosphären bilden eine solche dreidimensionale Struktur (Reynolds *et al.*, 1992), die aus Einzelzellpopulationen neuraler Stamm- oder Progenitorzellen aus dem fetalen Gehirn entstehen. Hierzu wird das Gehirngewebe zunächst enzymatisch in Einzelzellen dissoziiert, welche anschließend dreidimensionale Zellaggregate bilden (Pacey *et al.*, 2006). Neurosphären repräsentieren eine heterogene Zellpopulation, die Marker neuraler Stammzellen und früher Progenitorzellen exprimieren (Brannen *et al.*, 2000; Messina *et al.*, 2003; Piper *et al.*, 2000; Piper *et al.*, 2001). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass neurale Progenitorzellen aus Neurosphären *in vitro* und *in vivo* in Glia- und neuronale Zellpopulationen differenzieren, die zudem die Fähigkeit aufweisen, *in vivo* zu migrieren (Brannen and Sugaya, 2000; Flanagan *et al.*, 2006; Piao *et al.*, 2006; Piper *et al.*, 2001; Schettler, 2001; Svendsen *et al.*, 1997).

Ein Vergleich von fetalen Gehirnen und Neurosphären ergab zusätzlich, dass Stamm- und Progenitorzellen aus Neurosphären entsprechenden *in vivo* Korrelaten hinsichtlich der proliferativen Kapazität und der Modulation der Differenzierung nach Zugabe exogener Noxen ähneln. Zusätzlich bleibt die spezifische Expression vieler entwicklungsrelevanter Gene in Neurosphären erhalten (Jensen *et al.*, 2006), was die Nähe zu physiologischen Bedingungen verdeutlicht.

In Vorarbeiten dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass normale humane neurale Progenitorzellen (NHNP Zellen), die als Neurosphären kultiviert werden, zur Untersuchung der endokrinen Disruption des Schilddrüsenhormonssystems geeignet sind: Eine Exposition von NHNP Zellen gegenüber dem Schilddrüsenhormon (T3) führte ebenso wie die Exposition mit einem nicht-koplanaren PCB-Kongener (PCB118) zu einer T3-Rezeptor-abhängigen Oligodendrozytendifferenzierung (Fritsche *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu neuralen Stammzellen aus Nabelschnurblut ist das korrespondierende Alter der Progenitorzellen aus fetalen Gehirnen bekannt. Zusätzlich können Neurosphären auch aus bestimmten Hirnarealen isoliert werden, so dass toxische Effekte auf verschiedene Gehirnareale unterschieden werden können.

1.4 Entwicklungsneurotoxische Chemikalien

Eine pränatale Exposition gegenüber Metallen, Lösungsmitteln oder Pestiziden kann zu Entwicklungsstörungen des Gehirns führen.

Durch verschiedene akzidentielle Kontaminationen von Lebensmitteln in Japan, Irak, Neuseeland und den Faröer Inseln wurden zahlreiche *in vivo* Daten zu den Auswirkungen einer Quecksilbervergiftung erhoben. Es wurde gezeigt, dass organisches Quecksilber im fetalen Gehirn akkumuliert. Die beschriebenen Konzentrationen entsprachen der 5-7 fachen Menge des Quecksilbergehalts im maternalen Blut (Cernichiari *et al.*, 1995). Epidemiologische und neurophysiologische Studien haben gezeigt, dass eine pränatale Quecksilberexposition zu Schädigungen des sich entwickelnden Gehirns führt. Neben psychomotorischen Retardierungen fanden sich verminderte IQs sowie reduzierte Sprachfähigkeit und Gedächtnisleistung (Schettler, 2001). Histologisch wurde eine Desorganisation des cerebralen Cortex beobachtet, die vermutlich auf einer neuralen Degeneration (Castoldi *et al.*, 2001) und einer gestörten Migration basieren (Sanfeliu *et al.*, 2003). Gehirnautopsien von Menschen haben zusätzlich gezeigt, dass eine Belastung mit Quecksilber Störungen der neuralen Zellteilung und Migration hervorruft (Clarkson, 2002; Nordberg *et al.*, 1985).

Neben Quecksilber gehört auch Blei zu entwicklungsrelevanten Toxinen, die die Hirnentwicklung stören. Eine pränatale Bleiexposition resultiert in abnormalem neurologischen Verhalten wie Hyperaktivität und Aggressivität. Auf zellbiologischer Ebene finden sich Hypomyelinisierungen (Verity, 1990), die auf eine Interferenz von Blei mit der Oligodendrozytenentwicklung hindeuten. Dies konnte in Oligodendrozytenvorläuferzellen der Ratte bestätigt werden, wo eine Bleiexposition zu einer verzögerten Oligodendrozytenreifeung führte (Deng *et al.*, 2001a).

Neben Metallen zeigen auch Lösungsmittel toxische Einflüsse auf die Gehirnentwicklung. Eine pränatale Exposition gegenüber Ethanol (EtOH) kann zur Ausbildung des fetalen Alkoholsyndroms (FAS) führen, das durch mentale Retardierungen und Lernstörungen gekennzeichnet ist. Neben Störungen der Proliferation und Differenzierung findet sich nach EtOH-Exposition auch eine gestörte Zellmigration während der neuralen Entwicklung (Guerri, 1998; Jones, 1975). Zusätzlich sind auch pharmakologische Produkte bekannt, die mit einer normalen Gehirnentwicklung interferieren. Besonders Anaesthetika und Antiepileptika, wie Phenobarbital und auch Valproinsäure, gehören zu medizinischen Präparaten, von

denen entwicklungsneurotoxische Effekte bekannt sind, die bei einer prä- und postnatalen Einnahme zu pathologischen Veränderung des sich entwickelnden Gehirns führen. So ist die Einnahme von Valproinsäure mit der Spina Bifida korreliert (Olney *et al.*, 2000).

Auch Vitamin A und sein Metabolit Retinolsäure (RA) können zu teratogenen Effekten führen, die einen negativen Einfluss auf die Gehirnentwicklung des Ungeborenen ausüben (McCaffery *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). RA hat als Prohormon bedeutende regulatorische Funktionen während der embryonalen Entwicklung (Morriss-Kay *et al.*, 1996), die sich auch auf die Neurogenese beziehen. Während eine Depletion an RA mit einer fehlerhaften Ausbildung des Rhombencephalons und einer gestörten Neuritenverlängerung assoziiert ist, führt eine exzessive Einnahme von RA zu einer verminderten mentalen Leistungsfähigkeit und einer verzögerten Entwicklung motorischer und sensorischer Fähigkeiten (Maden *et al.*, 1996; McCaffery *et al.*, 2003).

Von persistierenden Umweltchemikalien, wie halogenierten Biphenylen und Dioxinen, ist ebenfalls bekannt, dass sie entwicklungsneurotoxische Störungen hervorrufen können (Aoki, 2001; Fritsche *et al.*, 2005; Kakeyama *et al.*, 2003; Widholm *et al.*, 2001). Dies geht vermutlich auf verschiedene Mechanismen zurück. Verschiedene PCB-Kongenere können mit dem Arylhydrokarbonrezeptor interagieren oder als endokrine Disruptoren die Gehirnentwicklung beeinflussen (Schettler, 2001). Auch Pestizide, die als Neurotoxine eingesetzt werden und in der Nahrungskette akkumulieren, interferieren mit der prä- und postnatalen Gehirnentwicklung (Eriksson, 1997; Evangelista de Duffard *et al.*, 1996). Organophosphate oder Pyrethroide beeinträchtigen das cholinerge System. Neben einer Wechselwirkung mit der Acetylcholinesterase können sie auch zu einer reprimierten Expression cholinergischer Rezeptoren führen. Auf neurophysiologischer Ebene konnten adverse Effekte auf motorische Fähigkeiten und die Gedächtnisleistung gezeigt werden (Schettler, 2001).

1.5 Aufgabenstellung

Zahlreiche Studien belegen, dass sicherheitstoxikologische Testungen in der Chemikalienzulassung auch im Bereich von ENT zum Schutz der Ungeborenen essentiell sind. Um die vorgesehenen Chemikaliertestungen im Rahmen von REACH unter Berücksichtigung der 3R's (*Reduce, Refine, Replace*) zu ermöglichen, besteht ein weltweites Bestreben, die kosten- und zeitaufwendigen Tierversuche durch Alternativmethoden zu reduzieren (Coecke *et al.*, 2007; Lein *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit sollte ein *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung von ENT etabliert werden. Aus dem Pool der verfügbaren Modellsysteme wurden Neurosphären aus normalen humanen neuronalen Progenitorzellen (NHNP) als das vielversprechendste Modellsystem gewählt. Der Vorteil dieses *in vitro* Systems liegt in der zellulären Zusammensetzung von NHNP Zellen/Neurosphären. Diese bestehen aus menschlichen Zellen, so dass interspezies Unterschiede zwischen Testmodell und Zielspezies ausgeschlossen werden können. Zusätzlich stellen Neurosphären eine heterogene, dreidimensionale Struktur dar, in der *in vivo*-ähnliche interzelluläre Interaktionen vorhanden sind, so dass sich die Zellen in einem physiologisch relevanten Milieu befinden. Da Gliazellen die Differenzierung und Reifung neuronaler Zellpopulationen beeinflussen, ist die zelluläre Heterogenität der Sphären ein entscheidender Vorteil gegenüber neuronalen Reinkulturen, wenn die Effekte verschiedener Substanzen auf die neurale Differenzierung untersucht werden sollen.

Ziele dieser Arbeit waren wie folgt definiert:

1. Zunächst sollte eine molekulare Charakterisierung von NHNP Zellen durchgeführt werden, um das Potential dieses Modellsystems zur Neurotoxizitätstestung abschätzen zu können. Hierzu sollten verschiedene molekulare Analysen einen Einblick in die zelluläre Zusammensetzung der NHNP Neurosphären auf RNA- und Proteinebene geben. Auch das Differenzierungspotential von NHNP Zellen sollte durch Gen- und Proteinexpressionsanalysen untersucht werden.

2. Die Etablierung verschiedener Endpunkte zur Untersuchung von ENT in NHNP Neurosphären war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe dieser Endpunkte sollte anschließend der Effekt von klassischen Neurotoxinen, wie Metallen und Lösungsmitteln, auf NHNP Neurosphären festgestellt und mit

gewonnenen *in vivo* Daten verglichen werden. Diese Daten sollten einer Bewertung von NHNP Neurosphären als *in vitro* Modell zur ENT-Testung dienen.

3. Zusätzlich sollten molekulare Mechanismen, die der NHNP Zellmigration unterliegen, näher charakterisiert werden, um so potentielle Angriffspunkte verschiedener Noxen identifizieren zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Zellkultur

NHNP Zellen	Lonza
8-Kammerobjektträger, beschichtet	Becton&Dickinson
4-Kammerobjektträger, unbeschichtet	Falcon
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma

Medienzusätze

NPMM Basalmedium	Lonza
DMEM	Gibco, Invitrogen
Nut Mix F12	Gibco, Invitrogen
N2 Supplement	Gibco, Invitrogen
B27 Supplement	Gibco, Invitrogen
EGF	Biosource
rhFGF-basic	R&D Systems
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen

Chemikalien (die Konzentrationen der Stammlösungen sind angegeben)

N6-2' O Dibutyryladenosine zyklisches AMP (100mM in H ₂ O)	Sigma
all trans Retinolsäure (10mM in DMSO)	Sigma
Bleiacetat (10mM in H ₂ O)	Merck
Quecksilberchlorid (1mM in DFN)	Sigma
Methylquecksilberchlorid (10mM, 10%EtOH, DMSO)	Riedel-de-Haën
PMA (1µg/µl in DMSO)	Sigma
Ethanol	Roth
TCHQ (100mM in DMSO)	Chem. Service
Staurosporin (1mM in DMSO)	Sigma

Inhibitoren

PD98059 (10-50mM in DMSO)	Cell signaling
PP2 (10mM in DMSO)	Calbiochem
SU6656 (10mM in DMSO)	Calbiochem
Bisindolylmaleimid I (5mM in DMSO)	Calbiochem

Tyrphostin AG1478 (10mM in DMSO)	Calbiochem
RGD-Peptid (100mM in H ₂ O)	Calbiochem
RGD-Kontrollpeptid (50mM in 5% Essigsäure)	Calbiochem

Transfektion

siRNA	Qiagen
HiPerFect	Qiagen
QuantiTect Primer Assay	Qiagen

Genexpressionsanalysen

RT-PCR

DEPC*H ₂ O	Roth
dNTP-Mix	Peqlab
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen
p(dT) ₁₅ Primer	Roche
Prime RNase Inhibitor	Eppendorf
DTT	Invitrogen
First Strand Buffer	Invitrogen
Taq Polymerase	Qiagen
Primer	MWG
SYBR green	Qiagen

MicroArrays

GeneChip HG Focus	Affymetrix
Absolutely RNA Microprep Kit	Stratagene
Message Amp TM aRNA Amplification Kit	Ambion
SuperScript TM Double-Stranded cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
GeneChip IVT Labeling Kit	Affymetrix
Sample Cleanup Kit	Affymetrix

Proteinanalytik

Western Blot

Magermilchpulver	TSI GmbH&Co.KG
Precision Plus Protein Standard	BioRad
PVDF-Membran	Amersham

TEMED	Sigma
APS	Sigma
ECL plus Detection system	Amersham
Röntgenfilme	Amersham
Entwickler-/ Fixierungslösung	Kodak
Immunzytochemie	
Paraformaldehyd	Sigma
Vectashield Mounting Medium	Linaris
Antikörper	
α -GFAP	Sigma
α - β (III)-Tubulin	Sigma
α -O4	Chemicon
α -Synapsin I	Synaptic Systems
α -Nestin	BD Bioscience
α -Dopa-Decarboxylase	Chemicon
α -ERK 1/2	Cell signalling
α -P-ERK 1/2	Biosource
α -GAPDH	abcam
DAPI	Sigma
Hoechst 33342	Sigma
Alexa-Fluor 488 α -Maus IgG	MoBiTec
Rhodamin Red- α -Kaninchen IgG	Dianova
Rhodamin Red- α -Maus IgM	Dianova

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von NHNP Neurosphären

NHNP Zellen wurden als proliferierende oder als differenzierende Neurosphären kultiviert, wobei der Unterschied auf der Verwendung unterschiedlicher Medien und Oberflächenbeschichtungen basierte. Zur Differenzierung wurden NHNP Zellen auf eine Matrix aus Poly-D-Lysin/Laminin ausplattiert.

2.2.1.1 Proliferationskultur

NHNP Neurosphären konnten unter proliferativen Bedingungen bis zu 4 Monate in Suspension kultiviert werden. Hierzu wurden die Sphären in einem Volumen von 20ml Medium pro Petrischale (100x20mm) kultiviert. Alle zwei Tage wurde ein halber Mediumwechsel vollzogen. Da der Verbrauch an Wachstumsfaktoren von der Größe und dem Alter der Neurosphären abhängt, wurde keine konkrete Anzahl an Neurosphären pro Petrischale gehalten.

Proliferationsmedium:

Zu Beginn der Arbeit wurden NHNP Neurosphären in NPMM Medium der Firma Lonza (ehemals Cambrex) kultiviert.

NPMM:

- 200ml NPBM
- 10ml NSF-1(Zusammensetzung unbekannt)
- 0,4ml EGF (Konzentration unbekannt)
- 0,4ml FGF (Konzentration unbekannt)
- 0,4ml Gentamicin

Im Verlauf der Arbeit wurde „B27“ als ein alternatives Zellkulturmedium etabliert:

B27

Als Basismedium wurden DMEM und F12 im Verhältnis 3:1 gemischt. Als Zusätze wurden die folgenden Substanzen zugefügt:

- 20ng/ml EGF
- 20ng/ml FGF
- 1xB27 (Stock:50x)
- Penicillin/Streptomycin (1:100 v/v)

2.2.1.2 Passagieren der Neurosphären

Da NHNP Zellen in Form von dreidimensionalen Sphären kultiviert werden, führt die Proliferation der in einer Sphäre enthaltenen Zellen zu einer Vergrößerung der Neurosphären, was an einer Zunahme des Durchmessers detektiert werden kann. Zur Passagierung wurden Neurosphären ab einem Durchmesser von 0,7mm mit

einem *McIlwain Tissue Chopper* zerteilt. Hierbei wurden Neurosphären auf einen Durchmesser von 0,25-0,3mm gehoppt. Eine Trypsinierung der NHNP Neurosphären wurde nicht durchgeführt, da sich unter den gewählten Kultivierungsbedingungen keine neuen Sphären aus vereinzelt Zellen gebildet hatten.

2.2.1.3 Differenzierung

Die Differenzierungsinitiation von NHNP Zellen erfolgte durch Wachstumsfaktorentzug auf Poly-D-Lysin/Laminin beschichteten Oberflächen. Hierzu wurden Neurosphären in 500µl vorgelegtes Medium in 8-Kammerobjektträgern ausplattiert, wobei die Sphären in einem Volumen von 10µl überführt wurden. Die Anzahl ausplattierter Sphären wurde in Abhängigkeit des Versuchsdesigns gewählt. Die Differenzierung der Neurosphären erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ für 2-28 Tage.

DFN-Medium

DMEM/F12 (3:1)

N2 (1:100, v/v)

Penicillin/Streptomycin (1:100, v/v)

2.2.2 Exposition mit Chemikalien

Die Exposition von NHNP Zellen erfolgte in proliferierenden, synchronisierten oder differenzierenden NHNP Zellen.

2.2.2.1 Proliferierende Bedingungen

Für eine Belastung unter proliferierenden Bedingungen wurden Neurosphären in NPMM, bzw. B27 Medium mit den entsprechenden Substanzen bis zu einer Woche exponiert. Je nach Anwendung wurden die Neurosphären in unbeschichteten 4-Kammerobjektträgern oder 48-well-Platten mit je 1ml Volumen kultiviert, wobei alle zwei Tage ein halber Mediumwechsel mit Belastungsmedium erfolgte. In Versuchsansätzen, wo ein Verschmelzen der Neurosphären kritisch für die Auswertung der Versuche war (immunzytochemische Analysen) erfolgte die Exposition in 48-well-Platten, wobei eine Sphäre pro well kultiviert wurde, um ein Verschmelzen der Sphären zu verhindern.

2.2.2.2 Synchronisierung von NHNP Zellen

Für die Untersuchung zur ERK1/2-Aktivierung wurden Neurosphären zunächst synchronisiert. Hierzu wurde die benötigte Anzahl an Sphären für 18 Stunden in 1ml DFN in unbeschichteten 4-Kammerobjektträgern kultiviert. Die folgende Exposition erfolgte in DFN-Medium. Die entsprechenden Inkubationszeiten sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen aufgeführt.

2.2.2.3 Exposition differenzierender NHNP Zellen

Eine Exposition von Neurosphären unter differenzierenden Bedingungen erfolgte auf Poly-D-Lysin/Laminin beschichteten Objektträgern in DFN-Medium. Die benötigte Anzahl an Sphären wurde in insgesamt 10µl Medium überführt. Die Differenzierung erfolgte je nach Anwendung für 2-28 Tage. Bei einer Differenzierungszeit von mehr als zwei Tagen wurde alle zwei Tage ein halber Mediumwechsel vollzogen, wobei dem Medium erneut die zu untersuchende Noxe zugefügt wurde.

2.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA von NHNP Neurosphären wurde mit dem *Absolutely RNA Microprep Kit* (Stratagene) nach Angaben des Herstellers isoliert.

A) RNA-Isolation proliferierender Neurosphären

Die gewünschte Anzahl an Neurosphären wurde für 10 Minuten bei 4°C und 2000rpm pelletiert. Nach Zugabe von 100µl Lysispuffer wurden die Sphären durch Resuspendieren aufgebrochen und die Zellen lysiert. Nach Zugabe von 100µl EtOH (70%) wurde das Lysat auf die Aufreinigungssäule gegeben.

Die RNA-Isolation wurde gemäß den Angaben des Herstellers fortgeführt, wobei der DNase-Verdau für 30 Minuten bei 37°C erfolgte.

B) RNA-Isolation differenzierender Neurosphären

Die Zelllyse differenzierender NHNP Zellen erfolgte auf den Objektträgern. Hierzu wurde das Medium vollständig abgenommen und durch 100µl Lysispuffer ersetzt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges resuspendieren lysiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl 70% EtOH, bevor das Lysat auf eine Aufreinigungssäule gegeben wurde. Die Isolation der RNA wurde anschließend gemäß den Angaben des

Herstellers durchgeführt. Der DNase-Verdau wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.3.2 Reverse Transkription (RT)

Im Anschluss an die RNA Isolation erfolgte eine RT-Reaktion, um ausgehend von der mRNA komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren, die anschließend in PCR-Reaktionen zur Expressionsanalyse eingesetzt werden konnte.

Aufgrund des geringen RNA-Gehalts primärer Zellen wurde auf eine spektrometrische Konzentrationsbestimmung verzichtet. Stattdessen wurde ein konstantes Volumen RNA-Isolat in die RT-Reaktion eingesetzt. Ein Abgleich auf den ursprünglichen RNA-Gehalt erfolgte durch eine Normierung auf konstant exprimierte *housekeeping* Gene.

RT-Primer Annealing

10µl	RNA-Isolat
6µM (c _{end})	p(dT) ₁₅ Primer

Die Primerhybridisierung erfolgte für 5 Minuten bei 65°C. Die Zugabe des RT-Mixes erfolgte bei 4°C.

RT-Reaktion:

0,5mM	dNTPs
15u	RNase Inhibitor
1x	RT-Puffer
0,01M	DTT
200u	M-MLV

Das Endvolumen entsprach einem Volumen von 20µl.

Die RT-Reaktion erfolgte bei 37°C für 52 Minuten. Anschließend wurde der RT-Ansatz für 15 Minuten bei 70°C inkubiert, um die enthaltenen Enzyme zu deaktivieren.

Die so synthetisierte cDNA wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur qualitativen Expressionsanalyse wurden konventionelle PCR-Reaktionen in einem Robocycler (Stratagene) durchgeführt, während Expressionsunterschiede anhand von Real Time PCR-Reaktionen in einem Light Cycler (Roche) quantitativ untersucht wurden.

A) Konventionelle PCR

PCR-Ansatz:

1x	PCR-Reaktionspuffer
200µM	dNTPs
200nM	Primer
0,05u	Taq Polymerase
2µl	cDNA

ad 20µl mit DEPC*H₂O

PCR-Bedingungen:

1. Zyklus	Denaturierung	4min	95°C	1x
2. Zyklus	Denaturierung	30sec	95°C	
	Annealing	30sec		
	Elongation	30sec	72°C	40x
3. Zyklus	Elongation	4min	72°C	1x
4. Zyklus	Kühlung	10min	6°C	1x

Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der verwendeten Primerpaare gewählt. Die entsprechenden Bedingungen sind unten aufgeführt.

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss an die PCR-Reaktion anhand von Agarose-TBE-Gelen analysiert. In Abhängigkeit der Amplikongröße wurden 1-2% (w/v) Agarose-Gele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V.

B) Real Time PCR

PCR-Ansatz:

1x	SYBR Green Mix
500nM	Primer
2µl	cDNA

ad 20µl mit DEPC*H₂O

2 Material und Methoden

PCR-Bedingungen:

1. Zyklus	Denaturierung	15min 95°C	1x
2. Zyklus	Denaturierung	15sec 95°C	
	Annealing	25sec	
	Elongation	30sec 72°C	
	Fluoreszenzdetektion	2 sec 72°C	40x
3. Zyklus	Kühlung	10min 6°C	1x

Die Analyse der Amplikons erfolgte anhand der aufgenommenen Schmelzkurven oder durch Agarose-TBE-Gelelektrophoresen.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind zusammen mit den optimierten Hybridisierungstemperaturen angegeben.

Gen	Sequenz	Produktlänge	Hybridisierungstemperatur(°C)
GFAP	GATCAACTCACCGCCAACAGC CTCCTCCTCCAGCGACTCAATCT	206	60
hairless	ATGGAGAGTACGCCAGC GCCTCCTTCCAGCGCAGT	305	60
βAktin	CCCCAGGCACCAGGGCGTGAT GGTCATCTTCTCGCGTTGGCCTTGGGGT	263	60
NSE	CCCCTGATCCTTCCGATACAT CCGATCTGGTTGACCTTGAGCA	254	60
PLP/dm20	CCATGCCTTCCAGTATGTCATC GTGGTCCAGGTGTTGAAGTAAATGT	PLP: 354 Dm20: 249	58
OLIG 1	CATTTGAACTTCCAGTCC GCCTCCTTTGATAGGACCTG	431	57
OLIG 2	TGCGCAAGCTTTCCAAGAT CAGCGAGTTGGTGAGCATGA	70	61
RARalpha FW	ACCCCTCTACCCGCATCTACAAG CATGCCCACTTCAAAGCACTTCTGC	226	60
RARbeta FW	ATTCCAGTGCTGACCATCGAGTCC CCTGTTTCTGTGCATCCATTTC	349	56
RARgamma	TACCACTATGGGGTCAGC CCGGTCATTTGCACAGCT	195	52
RXRalpha	TTCGCTAAGCTCTTGCTC ATAAGGAAGGTGTCAATGGG	113	50
RXRbeta	GAAGCTCAGGCAAACACTAC TGCAGTCTTTGTTGTCCC	111	50
RXRgamma	GCAGTTCAGAGGACATCAAGCC GCCTCACTCTCAGCTCGCTCTC	352	56
GAD	GTGAGTGCCTTCAGGGAGAG GGTGGAGCGATCAAATGTCT	219	60
ChAT	CCACTCCATTCCCCTGACT GAGACGGCGGAAATTAATGA	220	60

2 Material und Methoden

Dopa-Decarboxylase	ACAAGTTTGCCTGCGCTTT CCACAGACAGCTGAGTTCCA	227	60
Tyrosin Hydroxylase (TH)	TTGAAGCCAAAATCCACCAT TGGTGACCAGGTGATGACAC	228	60
Tryptophan Hydroxylase1 (TPH1)	AGCCCTTTGATCCCAAGATT TGGCACTGGTTATGCTCTTG	207	60
NMDA-R1	ATCAACGGCAAGAACGAGTC GCCATTGTAGATGCCCACTT	294	56
NMDA-R2A	GCCTTCATGATCCAAGAGGA TGACCAAGGCGTCCTCTACT	205	58
NMDA-R2B	TCTTCCTGGCCAGCTACACT CCTGTTTTTCAGGGAGAGCAA	250	56
NMDA-R2C	CCGCAGTAACTACCGTGACA CAGTGGGAGTCCTTCTGCAT	231	50
NMDA-R2D	GAGCCTGCAGACCCTATCAG GATCTTCTTTCCGTGCTTGC	216	50
NMDA-R3A	CATTCCAGTGATCAGCATCG GGGTAAGGAGGAGGAAGTCG	200	56
H2AFX	TATGTGGACAGCAAGAGTCG CCATCTAAAAC TCCCAATG	235	50
Hist1H4c	GGATAACATCCAGGGCATT AGGAGACCGGTATTCTTAG	263	50
SYPL	TGCAATTTGGATTTTCATGTT TAAGGCAACAGCAAGATGTG	251	50
SORL1	CAGATCTACGGATGTTGCTG GTGAGGAAAGCTCTTTCAGG	268	50

2.2.3.4 Affymetrix GeneChip Arrays

Die Expressionsprofile proliferierender und differenzierender NHNP Zellen wurden durch Microarray Analysen erstellt. Hierzu wurde der GeneChip Human Genome Focus Array (Affymetrix) verwendet, auf den 8500 Transkripte gespottet sind.

Für die RNA-Isolation wurden Sphären verwendet, die seit 4 Wochen kultiviert wurden. Die Anzahl der verwendeten Sphären variierte mit der Größe, wobei $1-2 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt wurden.

Zunächst wurde die RNA aus proliferierenden oder differenzierenden NHNP Zellen (Differenzierung für 6Std) isoliert (2.2.3.1). An die RNA-Isolation schloss sich aufgrund des geringen RNA-Gehalts zunächst eine Amplifikationsreaktion nach Eberwine an. Hierzu wurde eine doppelsträngige cDNA (dsDNA) unter der Verwendung von Oligo(dT) Primern, die einen T7 Promotor enthalten, synthetisiert. Durch die Integration des T7-Promotors war eine anschließende *in vitro* Transkription

mit der T7 RNA Polymerase möglich, die eine Synthese von mehreren hundert Kopien an *antisense* RNA (aRNA) von den ursprünglich vorhandenen RNA-Templates ermöglichte. Für die Amplifikation der RNA wurde das *MessageAmpTM aRNA Amplification Kit* (Ambion) verwendet.

Die aRNA wurde anschließend in eine erneute, doppelsträngige DNA-Synthese eingesetzt, um eine anschließende *in vitro* Transkription zur Biotinylierung der transkribierten RNA zu ermöglichen. Nach dem die biotinylierte RNA fragmentiert wurde, erfolgte die Hybridisierung auf den MicroArrays in der Affymetrix Core Lab Facility des BMFZ an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

1. Amplifikation der mRNA

A) *First Strand cDNA Synthese*

Primer Annealing:

10µl RNA

1µl T7 Oligo(dT) Primer

ad 12µl DEPC*H₂O

Die Hybridisierung erfolgte für 10 Minuten bei 70°C. Die Zugabe des RT-Mixes erfolgte auf Eis.

RT-Mix 1

2µl 10x Reaktionspuffer

1µl RNase Inhibitor

4µl dNTP Mix

1µl Reverse Transkriptase

Nach Zugabe des RT-Mixes wurden die Ansätze bei 42°C für 2 Stunden inkubiert.

B) *Second Strand cDNA Synthese*

Direkt im Anschluss an die *First Strand cDNA Synthese* schloss sich eine weitere cDNA Synthese zur Generierung der dsDNA an.

Hierzu wurden die folgenden Komponenten zugegeben:

RT-Mix 2

63µl DEPC*H₂O

10µl Reaktionspuffer

4µl dNTP Mix

2µl DNA Polymerase

1µl RNase H

Anschließend wurde für 2 Stunden bei 16°C inkubiert.

Zum Schluss wurde die dsDNA durch eine Säulenaufreinigung (s. Ambionprotokoll) aufkonzentriert. Das Eluat wurde zu einem Volumen von 16µl mit DEPC*H₂O aufgefüllt und in die anschließende *in vitro* Transkription eingesetzt.

C. *In vitro* Transkription

Die Amplifikationsreaktion basiert auf einer *in vitro* Transkription der synthetisierten dsDNA. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz für 14 Stunden bei 37°C inkubiert:

16µl dsDNA

4µl T7 ATP Solution

4µl T7 CTP Solution

4µl T7 GTP Solution

4µl T7 UTP Solution

4µl T7 Reaktionspuffer

4µl T7 Enzymmix

Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2µl DNase I bei 37°C für 30 Minuten verdaut. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 60µl Elutionspuffer, um ein Gesamtvolumen von 100µl zu erhalten. Die folgende Aufreinigung der aRNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss wurde die Konzentration der aRNA spektrometrisch bestimmt (1:50 Verdünnung). Die Qualität der aRNA wurde über ein Agarosegel kontrolliert. Hierzu wurden 0,5-1µg aRNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 2 Stunden bei 110 Volt, um eine optimale Auftrennung der aRNA zu erhalten. Die Größenverteilung der aRNA sollte ein Intensitätsmaximum bei 1200 – 500 Nukleotiden zeigen, um Degradationen auszuschließen.

2. cDNA Synthese

Die aRNA wurde anschließend in doppelsträngige DNA transkribiert. Hierzu wurde das *SuperScriptTM Double-Stranded cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen) verwendet.

Wenn möglich, wurden 200ng aRNA in die cDNA Synthese eingesetzt. Ansonsten wurde das größtmögliche Volumen an aRNA zugegeben.

A) *First Strand Synthesis*

Primer Annealing

200ng	aRNA
2µl	Oligo(dT) Primer (MessageAmp™ aRNA Amplification Kit)
1µl	Second round Primer (Ambion)

ad 11µl mit DEPC*H₂O

Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, um eine Hybridisierung der Primer an die aRNA zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Reaktionsmixes auf Eis.

Reaktionsmix

1x	Reaktionspuffer
10mM	DTT
0,5mM	dNTP Mix

ad 9µl mit DEPC*H₂O

Nach Zugabe des Reaktionsmixes erfolgte eine 2 minütige Inkubation bei 45°C. Anschließend wurde je 1µl SuperScript zugegeben, bevor die Reaktion für eine Stunde bei 45°C erfolgte.

B) *Second Strand cDNA Synthesis*

Auf den Reaktionsansatz der *First Strand cDNA Synthese* wurde folgender Reaktionsmix auf Eis zugegeben:

20µl	Reaktionsansatz
1x	Reaktionspuffer
0,2mM	dNTP
10u	DNA Ligase
40u	DNA Polymerase
2u	RNase H

ad 150µl mit DEPC*H₂Odest

Die Synthese erfolgte bei 16°C für 2 Stunden. Nach der Zugabe von 10u T4 DNA Polymerase wurde erneut für 5 Minuten bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10µl 0,5M EDTA-Lösung beendet. Die dsDNA wurde über eine Säulenaufreinigung nach dem *Affymetrix Clean Up Kit* (s. Protokoll) aufkonzentriert.

3. *In vitro* Transkription zur Biotinylierung der RNA

Die aufgereinigte dsDNA aus der cDNA Synthese wurde komplett in die *in vitro* Transkription zur Synthese biotinylierter RNA eingesetzt.

In vitro Transkription

dsDNA	12µl
4µl	IVT Labeling Buffer
12µl	dNTP Mix
4µl	IVT Enzymmix

ad 40µl mit DEPC*H₂O

Die *in vitro* Transkription wurde für 16 Stunden bei 37°C durchgeführt.

Im Anschluss an die *in vitro* Transkription wurde die biotinylierte RNA mit dem *Affymetrix Sample Clean Up Kit* nach Angaben des Herstellers (Affymetrix) aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der RNA bestimmt und die Qualität der RNA überprüft. Hierzu wurden 800ng RNA auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Da auch die zweite cDNA Synthese ausgehend vom 3'-Ende der aRNA erfolgt, sollte die Größenverteilung der RNA ein Intensitätsmaximum zwischen 400-700 Basenpaaren zeigen.

4. Fragmentierung

Um unspezifische Hybridisierungen auf den MicroArrays zu minimieren, wurde die biotinylierte RNA vor der Hybridisierungsreaktion fragmentiert. Hierzu sollte der Fragmentierungsansatz eine endgültige Konzentration von 1µg/µl RNA enthalten.

Fragmentierungsansatz:

10µg	biotinylierte RNA
2µl	Fragmentierungspuffer

ad 10µl mit DEPC*H₂O

Die Fragmentierung erfolgte für 35 Minuten bei 94°C.

5. Hybridisierung

Die Hybridisierung der fragmentierten RNA auf die MicroArrays wurde in der *Affymetrix Core Lab Facility* durchgeführt.

6. Expressionsanalysen

Die Auswertung der Rohdaten wurde unter der Verwendung der statistischen Analysesprache *R2.1* mit der *R1XA Software* und dem *bioconductor affy package* durchgeführt. Für die Clusteranalysen wurde das *BRR Array Tool V3.2* verwendet.

2.2.3.5 siRNA Transfektion

Durch eine Transfektion mit sequenzspezifischen *small interfering RNAs* (siRNA) sollte die Expression verschiedener Tyrosinkinasen reduziert werden, um die Daten der Inhibierungsstudien zur Regulation der NHNP Zellmigration zu validieren. Hierzu wurden publizierte siRNAs der Firma Qiagen verwendet.

Die Transfektion wurde mit frisch gehoppten Neurosphären durchgeführt, um die Transfektionseffizienz durch die größere Oberfläche der noch nicht abgerundeten Sphären zu erhöhen.

Als Transfektionsreagenz wurde HiPerFect gewählt, da dieses Reagenz im Gegensatz zu Elektroporationsversuchen keinen störenden Einfluss auf die Integrität und die Migration von frisch gehoppten NHNP Zellen zeigte.

A)Transfektionsmix:

1µM	siRNA
64µl	DFN-Medium
6µl	HiPerFect

Bei einer Kotransfektion von siRNAs gegen eine Expression von ERK1/2 wurden je 500nM der betreffenden siRNA eingesetzt, so dass insgesamt 1µM siRNA in den Ansätzen enthalten war. Als Kontrollen wurden eine Nullkontrolle (Transfektionsmix enthielt nur das Transfektionsreagenz), und eine *non-silencing* Kontrolle (Transfektion einer fluoreszenzmarkierten siRNA) mitgeführt.

Der Transfektionsmix wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die Anzahl benötigter Neurosphären auf einen Durchmesser von 0,15 mm gechoppt und in einem geeigneten Volumen aufgenommen (pro Versuchsansatz wurden je 2 Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,6-0,7 mm Durchmesser eingesetzt). Je 50µl Zelllösung wurden in 450µl vorgelegtes DFN-Medium in 24-well-Platten überführt und gut verteilt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Transfektions-Mixes. Die Transfektionsansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 4 bis 5 Stunden später wurden 2ml DFN-Medium zugegeben. Nach 48 bzw. 72 Stunden wurde ein Teil der Neurosphären für Migrationsanalysen ausplattiert, die übrigen Sphären wurden für anschließende RT-PCR Analysen (s. 2.2.3.3 B) lysiert.

2.2.4 Proteinanalytik

2.2.4.1 Immunzytochemie

Anhand immunzytochemischer Antikörperfärbungen gegen spezifische Markerproteine von Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten wurde die Differenzierung von NHNP Zellen in die verschiedenen neuronalen Zellpopulationen nachgewiesen und analysiert. Zusätzlich wurde die Aktivierung von ERK1/2 in migrierten NHNP Zellen anhand von immunzytochemischen Untersuchungen detektiert.

1. Fixierung der Zellen

Für die Immunzytochemie wurden differenzierende NHNP Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. Hierzu wurde Medium durch 4%iges (w/v) Paraformaldehyd ersetzt. Da differenzierende NHNP Zellen semiadhärente Zellen darstellen, wurde das Medium nicht komplett abgenommen. So wurde ein Ablösen der Zellen verhindert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Paraformaldehyd vollständig abgenommen. Zur weiteren Lagerung wurden die Kammern mit je 700µl PBS gefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

Für die Färbung wurden die Kammern des Objektträgers entfernt. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS (100ml) gewaschen.

PBS-Waschpuffer, 5x

80mM	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
20mM	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
100mM	NaCl

Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt.

2. Immunzytochemische Färbung

Unmittelbar nach dem Waschen wurden 40µl der Erstantikörperlösung (s. unten) auf je ein Feld gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit den Zweitantikörperlösungen für 30 Minuten bei 37°C erfolgte. Schließlich wurde erneut in PBS gewaschen (3 mal für 15 Minuten). Beim letzten Waschschrift wurden 0,1µg/ml Hoechst 33342 für eine Zellkernfärbung zugegeben.

Um Salzreste zu entfernen, wurde der Objektträger in H₂O_{dest} gedippt. Nach dem Trocknen wurde der Objektträger in Vectashield eingedeckelt, um ein Ausbleichen des Präparats zu verzögern.

Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Flureszenzmikroskop (Olympus, Hamburg), wobei die Aufnahmen mit einer ColorViewXS Digitalkamera aufgenommen wurden.

Färbung	Erst-Antikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
Neurone	β(III) Tubulin	1:100 in PBS-T	Anti-Maus IgG Alexa	1:500 in PBS-T
Astrozyten	GFAP	1:1000 in PBS-T	Anti-Kaninchen IgG Rhodamin	1:50 in PBS-T
Oligodendrozyten	O4	1:15 in PBS mit 10% (v/v) Ziegenserum	Anti-Maus IgM Rhodamin	1:50 in PBS
ERK1/2	ERK1/2	1:100 in PBS-T	Anti-Kaninchen IgG Rhodamin	1:50 in PBS-T
P-ERK1/2	P-ERK1/2	1:100 in PBS-T	Anti-Kaninchen IgG Rhodamin	1:50 in PBS-T

2.2.4.2 Western Blot Analysen

Aufgrund des geringen Proteingehalts wurde auf eine Konzentrationsbestimmung verzichtet. Stattdessen wurden Neurosphären in Lysis-/Auftragspuffer lysiert, so dass Komplettllysate der Proben auf ein Tris-SDS-Acrylamidgel aufgetragen werden konnten. Der Abgleich des Proteingehalts der einzelnen Proben erfolgte durch eine Normierung auf den Gehalt an GAPDH.

Eine Zellzahl von $1-2 \cdot 10^5$ Zellen pro Versuchsansatz erwies sich als geeignet, um eine Sättigung des GAPDH-Gehalts zu verhindern. Durch die Korrelation des Durchmessers und der Zellzahl von Neurosphären konnte die benötigte Anzahl an Neurosphären eines bestimmten Durchmessers bestimmt werden.

1. Proteinisolation

A) Proliferierende NHNP Zellen

Zur Proteinisolation proliferierender Neurosphären wurde die entsprechende Anzahl an Sphären für 10 Minuten bei 4°C und 2000rpm pelletiert, um eine vollständige Mediumabnahme zu ermöglichen. Anschließend wurden die Neurosphären in 20µl Lysis-/Auftragspuffer aufgenommen. Zu Resuspendierung wurde anschließend für 10 Sekunden gevortext. Die Zellyse wurde durch eine 5 minütige Inkubation bei 90°C und anschließender Aufbewahrung bei -80°C für mindestens 1 Stunde begünstigt.

B. Differenzierende NHNP Neurosphären

Bei Proteinisolationen von NHNP Neurosphären, die für kurze Zeitspannen (bis zu 24 Stunden) differenzierten, wurden die Sphärenkerne inklusive der differenzierenden Zellen vom Objektträger abgenommen und wie oben beschrieben zentrifugiert und anschließend lysiert.

Bei einer Differenzierung über eine längere Zeit wurden die Zellen auf dem Objektträger lysiert, da ein Ablösen aller migrierten Zellen nicht möglich war. Hierzu wurde das Medium vollständig abgenommen und durch 50µl Lysis/Auftragspuffer ersetzt. Durch Resuspendieren wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 90°C für 5 Minuten erhitzt. Anschließend wurden auch diese Proben für mindestens eine Stunde bei -80°C weggefroren.

Lysis-/Auftragspuffer:

- 125 mM TRIS
- 4 % (w/v) SDS
- 20 % (v/v) Glycerin
- 100 mM DTT
- 0.2 % (w/v) Bromophenolblau

2. Gelelektrophorese

Vor Beladen des Gels wurden die Proben erneut bei 90°C für 5 Minuten denaturiert und auf Eis aufbewahrt, um die Ausbildung thermodynamisch stabiler Strukturen und eine Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern. Die Bedingungen der Gelelektrophorese wurden in Abhängigkeit der Gelprozentigkeit und somit von den zu untersuchenden Proteinen gewählt (s. unten).

Sammelgel

- 100mM Tris-HCl, pH 6,8
- 5% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Vernetzungsgrad 29:1, 40%)
- 0,1% (v/v) SDS
- 0,1% (v/v) APS
- 0,04% (v/v) TEMED

Trenngel

- 390mM Tris-HCl, pH 8,8
- 0,1% (v/v) SDS
- 0,1% (v/v) APS
- 0,04% (v/v) TEMED

Die Menge Acrylamid wurde gemäß der gewünschten Prozentigkeit zugegeben.

Tris-Glycin-Laufpuffer, 10x

- 0,2M Tris
- 2M Glycin
- 1% (w/v) SDS

3. Transfer

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Um die nicht-kovalente Bindung der Proteine an die Membran zu ermöglichen, musste diese zunächst für 10 sec in Methanol und anschließend für 10 Minuten in Transferpuffer quellen. Auch die benötigten *Whatmanpapiere* und das Gel wurden für 10 Minuten vor Transferbeginn in Transferpuffer inkubiert.

Für den Transfer wurden zunächst drei *Whatmanpapiere*, gefolgt von der Membran auf den Boden der Transferkammer gelegt. Anschließend wurde das Gel auf die Membran gegeben und von 3 weiteren *Whatmanpapieren* bedeckt.

Der Transfer der Proteine wurde bei 125mA durchgeführt, wobei die Zeit des Transfers in Abhängigkeit der zu untersuchenden Proteine gewählt wurde (s. unten).

4. Antikörperfärbung

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran für eine Stunde in Blocklösung bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen des Erst- und Zweitantikörpers zu verhindern. Die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper erfolgte o.n. bei 4°C unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde die Membran 3x mit TBS-T für 10 Minuten gewaschen.

Als Zweitantikörper wurden Meerrettichperoxidase-gekoppelte Antikörper verwendet, die in einer 1:5000 Verdünnung in 1% Magermilch/TBS-T eingesetzt wurden. Nach einer Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut 3x für 15 Minuten in TBS-T gewaschen.

Antikörper	Prozentigkeit des Trenngels	Elektrophorese	Transfer	Verdünnung des Erstantikörpers
P-ERK1/2, 42/44 kDa	11%	1Std 30 Minuten bei 150V	90 Minuten bei 125 mA	1:1000 in 5% Magermilch/TBS-T
Nestin 260 kDa	5% oder 3-8%	1 Std bei 150V	120 Minuten bei 125 mA	1:500 in 5% Magermilch/TBS-T
GAPDH 30-40 kDa	Da GAPDH zum Proteinabgleich verwendet wurde, wurden die Laufbedingungen gemäß der zu untersuchenden Proteine gewählt.			1:200000 in 5% Magermilch/TBS-T
Synapsin 1 78 kDa	5% oder 3-8%	1Std bei 150V	120 Minuten bei 125 mA	1:1000 in 5% Magermilch/TBS-T
Dopa- Decarboxylase 50 kDa	5% oder 3-8%	1Std bei 150V	120 Minuten bei 125 mA	1:200 in 5% Magermilch/TBS-T

Transferpuffer, 10x

50mM	Tris-HCl, pH 8,5
380mM	Glyzin
20%	Methanol

TBS-T, 10x

0,1M	Tris-HCl
1,5M	NaCl
1% (v/v)	Tween

Der pH-Wert wurde auf pH 7,5 eingestellt.

Blocklösung

5% (w/v)	Magermilchpulver in TBS-T
----------	---------------------------

4. Detektion

Die Detektion der entsprechenden Proteine erfolgte über einen Chemilumineszenznachweis. Hierzu wurde die Membran für 5 min bei Raumtemperatur mit ECL (Amersham) inkubiert, bevor ein Röntgenfilm exponiert wurde. Zur Quantifizierung der Signalintensitäten wurden die Banden eingescannt und mit dem Programm QuantityOne (BioRad, Munich, Germany) ausgewertet.

Die Membran wurde anschließend in TBS-T Puffer gewaschen, um die ECL-Lösung zu entfernen und eine weitere Antikörperfärbung zu ermöglichen.

2.2.5 Zytotoxizitätsbestimmung

2.2.5.1 Viabilitätstest

Anhand von Zellviabilitätstests wurde untersucht, ob eine Exposition gegenüber den verwendeten Noxen zu einer Verringerung der Zellviabilität und somit zu toxischen Effekten führte.

Die Messung der Zellviabilität von NHNP Neurosphären erfolgte mit dem *CellTiterBlue Assay* von Promega, welcher die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin bestimmt und somit dem Alamar Blue Assay entspricht.

Der Viabilitätstest wurde in 96-well-Platten durchgeführt, wobei je eine Neurosphäre pro Vertiefung in 100µl Belastungsmedium ausplattiert wurde. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden 20µl CellTiter Blue-Reagenz hinzugegeben und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität (Excitation: 560nm, Emission: 590nm) in einem Fluorimeter (Fluoroscans Ascent, Biorad, Deisenhofen) gemessen.

Um die Effekte in proliferierenden Neurosphären bestimmen zu können, wurde Proliferationsmedium (NPMM oder B27) mit der entsprechenden Noxe versetzt, während die Effekte auf differenzierende Zellen in DFN-Medium untersucht wurden. Zusätzlich erfolgte das Ausplattieren der Neurosphären für Untersuchungen unter differenzierenden Bedingungen in Poly-D-Lysin beschichteten Vertiefungen, um ein Auswandern der Zellen aus der Sphäre zu ermöglichen.

Genauere Angaben zur Inkubationsdauer in den Belastungsmedien sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

2.2.5.2 Trypanblautest

Als Alternative zum Viabilitätstest wurden auch Trypanblaufärbungen durchgeführt, um die Anzahl geschädigter Zellen bestimmen zu können. Hierzu wurde das benötigte Volumen einer 0,1%igen Trypanblaulösung (1:50; v/v) in das Zellkulturmedium gegeben. Die Trypanblaufärbung erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd fixiert (s. 2.2.4.1) und die Anzahl Trypanblau markierter Zellen gezählt.

2.2.6 Apoptosemessungen

2.2.6.1 Caspase-Aktivitätstests

Die Apoptoseuntersuchungen basierten auf Aktivitätsmessungen der Effektorcaspasen -3 und -7. Hierzu wurde das *Apo-One Kit* von Promega verwendet. Eine Exposition von Neurosphären erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie unter 2.2.4 beschrieben.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des äquivalenten Volumens an *Apo-One Caspase 3/7-Reagenz* zum Mediumvolumen gestartet. Nach einer Inkubation von einer Stunde wurde die Fluoreszenzintensität im Fluorimeter gemessen (Excitation: 485nm, Emission: 527nm).

Der Apoptosetest konnte direkt im Anschluss an die Viabilitätsmessungen durchgeführt werden, indem 120µl Apo-One Caspase 3/7-Reagenz pro Vertiefung zugegeben wurden.

2.2.6.2 DAPI-Exclusionstest

Apoptotische und auch nekrotische Zellen können durch eine Inkubation mit dem nicht-interkalierenden DNA-Farbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) markiert werden. Der DAPI-Exclusionstest wurde in differenzierenden NHNP Zellen durchgeführt. Hierzu wurde das Zellkulturmedium komplett abgenommen und durch 100µl DAPI-Lösung (1:50000) ersetzt. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DAPI-Lösung abgenommen und die Zellen in 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend war eine immunzytochemische Färbung (s. 2.2.4.1) möglich. Die Auswertung des DAPI-Exclusionstests erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg), wo die Aufnahmen mit einer ColorViewXS Digitalkamera gemacht wurden.

2.2.7 Migrationsmessungen

Migrationsmessungen stellen einen spezifischen Endpunkt für Entwicklungsneurotoxizität dar, indem sie den Nachweis einer veränderten Zellmigration nach Exposition gegenüber Noxen ermöglichen.

In den durchgeführten Migrationsanalysen wurde die Strecke zwischen den am weitesten ausgewanderten Zellen und dem Rand der Sphäre an vier unterschiedlichen Positionen pro Neurosphäre vermessen, wobei mindestens 5 Neurosphären pro Versuchsansatz eingesetzt wurden. Die vier Messwerte einer Sphäre wurden zu einem Messwert gemittelt, um die Abweichung innerhalb einer Neurosphäre zu berücksichtigen.

Die Migrationsanalysen erfolgten in nicht-fixierten Zellen an einem inversen Mikroskop unter der Verwendung eines Objektmikrometers.

2.2.8 Differenzierungsanalysen

In den Differenzierungsanalysen wurde untersucht, ob sich die NHNP Zelldifferenzierung in die verschiedenen Zellpopulationen unter der Einwirkung verschiedener Noxen verändert. Die Exposition der Neurosphären erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben.

A) Oligodendrozytendifferenzierung

Für eine Untersuchung der Oligodendrozytendifferenzierung erfolgte eine Differenzierung der NHNP Neurosphären für 2 Tage. Anschließend wurden O4⁺-Oligodendrozyten immunzytochemisch (s. 2.2.4.1) nachgewiesen und an einem Fluoreszenzmikroskop gezählt.

Aufgrund der Schwankungen in der Anzahl an Oligodendrozyten pro Neurosphäre wurden mindestens 8 Sphären pro Versuchsansatz eingesetzt. Da die Zellzahl von der Sphärengröße abhängig ist, wurden Neurosphären einer Größe verwendet. Es hat sich gezeigt, dass Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3-0,4mm für Differenzierungsanalysen auf Oligodendrozytenebene geeignet sind.

B) Astrozyten/Neuronendifferenzierung

Da die Migrationsfläche differenzierender NHNP Zellen eine Kokultur aus Astrozyten und Neuronen darstellt, wurde die Differenzierung zu diesen Zellpopulationen durch eine Bestimmung des Verhältnisses an Astrozyten zu Neuronen untersucht. Ein Vergleich der absoluten Anzahl an Neuronen bzw. Astrozyten erwies sich als ungeeignet, da die Zellzahl in den verschiedenen Gesichtsfeldern variierte.

Für die Differenzierungsanalysen wurde die Anzahl an Astrozyten und Neuronen in je drei Bildausschnitten pro Neurosphäre ausgezählt. Hierzu wurden differenzierende NHNP Neurosphären zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und gegen GFAP/ β (III)-Tubulin gefärbt (s. 2.2.4.1). Pro Versuchsansatz wurden je 5 Neurosphären eingesetzt. Die benötigten Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (400fache Vergrößerung) mit einer ColorViewXS Digitalkamera aufgenommen.

Für die statistische Auswertung wurde das Astrozyten/Neuronen-Verhältnis innerhalb einer Versuchsreihe oder die prozentuelle Änderungen einer Zellpopulation aus mehreren Versuchen verglichen.

2.2.9 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit einem studentischen tTest durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt wurde. Statistische Analysen erfolgten innerhalb einer Versuchsreihe oder unter der Verwendung der Mittelwerte

unabhängig durchgeführter Versuche. Dies ist jedoch in den jeweiligen Abbildungslegenden vermerkt.

3 Ergebnisse

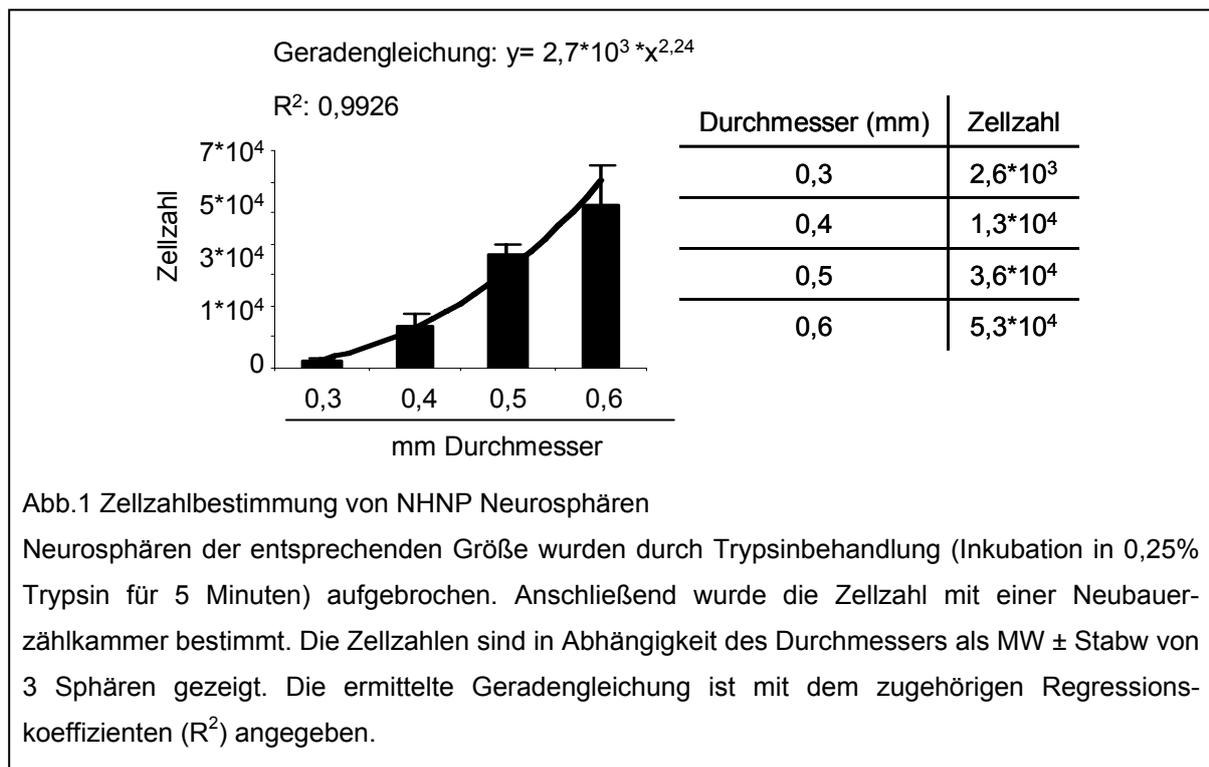
Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *in vitro* Modellsystems zur Untersuchung von ENT beim Menschen. Als vielversprechendes Modell wurden NHNP Zellen verwendet. Nach einer Charakterisierung dieses Zellmodells sollten entwicklungsneurotoxisch relevante Endpunkte wie Viabilität, Apoptose, Differenzierung und Zellmigration in NHNP Zellen etabliert werden.

3.1 Charakterisierung von NHNP Zellen

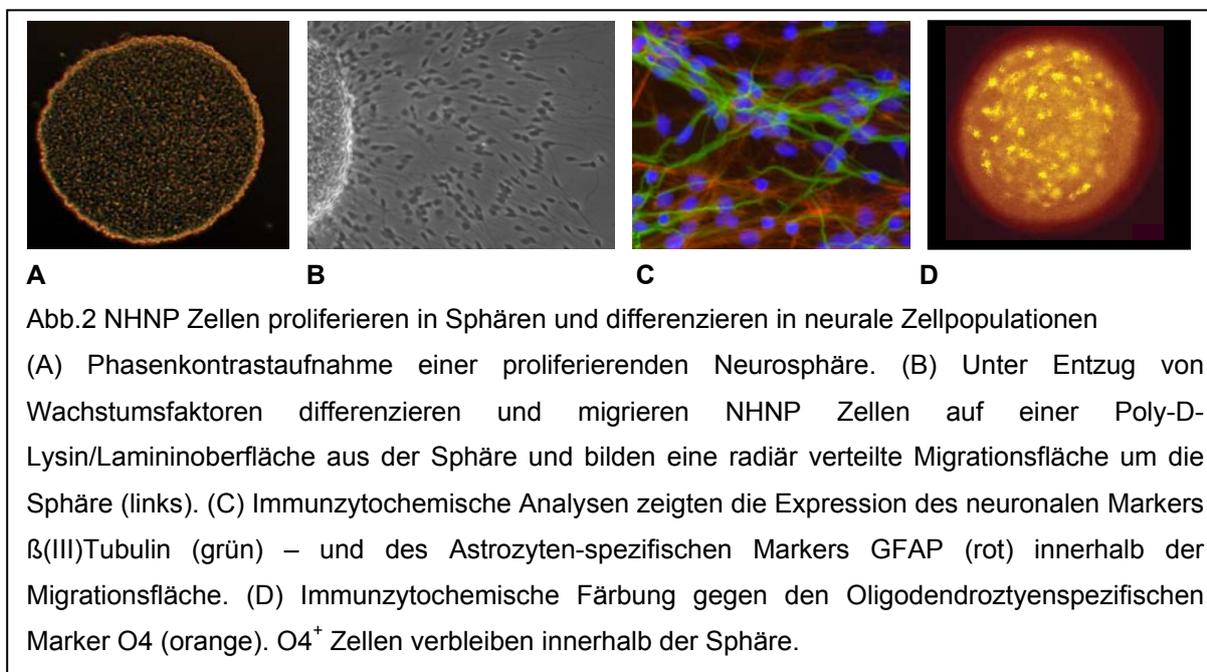
3.1.1 Kultivierung von NHNP Zellen

NHNP Zellen sind menschliche Primärzellen, die aus einem Homogenat des Kompletthirns menschlicher Föten gewonnen und als Neurosphären kultiviert wurden (Abb.2A). In Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und FGF verblieben NHNP Zellen in einem proliferativen Status, so dass sie über einen Zeitraum von bis zu 4 Monaten kultiviert werden konnten. Durch ein Zerteilen der Sphären mit einem Gewebeschopper konnten NHNP Zellen zudem passagiert werden.

Zunächst wurde die Anzahl an Zellen einer Neurosphäre in Abhängigkeit des Sphärendurchmessers bestimmt. Wie Abbildung 1 zeigt, nimmt die Zellzahl einer Neurosphäre potenziell mit dem Durchmesser zu.



Nach Entzug der Wachstumsfaktoren begannen NHNP Zellen auf einer Poly-D-Lysin/Laminin-Matrix zu differenzieren und aus der Sphäre zu migrieren, wobei eine radiäre Migrationsfläche differenzierender Zellen um die Sphäre herum sichtbar wurde (Abb.2B). Immunocytochemische Färbungen ergaben, dass NHNP Zellen in β (III)-Tubulin⁺, GFAP⁺ und O4⁺- Zellen differenzierten, was zeigt, dass NHNP Zellen das Potenzial aufweisen, in Neuronen-, Astrozyten- und Oligodendrozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren. Neurone und Astrozyten scheinen vorwiegend aus der Sphäre zu migrieren und so eine Kokultur zu bilden (Abb.2C). Nach einer Differenzierungszeit von zwei Tagen entsprach das Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen 90:10%. Im Gegensatz hierzu waren Oligodendrozyten hauptsächlich im Inneren der Sphäre zu finden (Abb.2D).



3.1.2 Expression neurospezifischer Gene in NHNP Zellen

NHNP Zellen stellen Zellaggregate von mehr als tausend Einzelzellen dar, die aus Kompletthirnhomogenaten gewonnen werden. Um die enthaltenen Zellpopulationen näher bestimmen zu können, wurden Neurosphären durch RNA-Microarrays, RT-PCR und Western Blot Analysen auf die Expression spezieller Markergene und verschiedener Proteine untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

3 Ergebnisse

Tab.1 Expression verschiedener Markergene in Neurosphären

Die Expression verschiedener Markergene wurde anhand von Microarray- (MA), Western Blot- (WB) und RT-PCR-Analysen (RT-PCR) untersucht. Die Tabelle zeigt die entsprechenden Zellpopulationen (Spalte 1), für welche die Expression der aufgeführten Markergene spezifisch ist (Spalte 2). Zusätzlich sind die verwendeten Nachweismethoden vermerkt. Die *Gene Accession IDs* sind im Anhang angegeben.

Population	Marker	Technik
Unreife neurale Progenitorzellen	Nestin	WB
Transkriptionsfaktoren	SOX3, -4, -9, -11,-12	MA
	MASH-1	
	HES 1	
	BMP 7	
	BMP-Rezeptor IA	
	NOTCH 2, -3	
	Olig1, Olig2	
Gliazellen	GFAP	MA, RT-PCR, IC
	O4	IC
	PLP/ DM20	MA, RT-PCR
Neuronen	β (III)-Tubulin	IC
	NSE	RT-PCR
	ENO2 (neural enolase2)	MA
	Synapsin 1	WB
	Dopa-Decarboxylase	WB, RT-PCR
	GAD	RT-PCR
	ChAT	RT-PCR
	TPH-1	RT-PCR
	GABA-A $R\alpha$ 2, GABA-A $R\beta$ 1, Rho1, GABA-B R1	MA
	Nikotinerger Cholinrezeptor 6 Nikotinerger Cholinrezeptor 10	MA
Dopamin Rezeptor D5	MA	
Oberflächenrezeptoren	NCAM 1, -2, PDGF-R α , Igf-1R, Igf-2R	MA
	Integrin α 5, Integrin α 6, Integrin α 7, Integrin α 10, Integrin α E, Integrin β 5	MA

Tabelle 1 zeigt, dass NHNP Zellen Marker für unreife Progenitorzellen und für reife neurale Zellpopulationen, wie Gliazellen und neuronale Zellpopulationen, exprimierten. Dies zeigte sich an der Koexpression von Nestin, einem Marker für

unreife Progenitorzellen, und GFAP oder NSE, die in reifenden Gliazellen, bzw. Neuronen, exprimiert werden. Dies zeigt, dass Neurosphären eine heterogene Kultur mit unterschiedlichen Differenzierungsstadien repräsentieren.

Auch verschiedene Marker für neuronale Subpopulationen wurden in NHNP Zellen exprimiert, was an der Expression verschiedener neuronaler Marker, wie der Cholinacetyltransferase (ChAT), der Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) und der Dopa-Decarboxylase deutlich wurde. Die Expression der verschiedenen Rezeptoren zeigte zusätzlich, dass NHNP Zellen GABA-, acetylcholin- und dopaminerge Neurone enthalten.

3.1.3 Expressionsanalyse von proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen

NHNP Zellen proliferieren in Gegenwart von EGF und FGF. Sobald ihnen diese jedoch entzogen werden, beginnen sie auf geeigneter Oberfläche zu differenzieren und aus der Neurosphäre zu migrieren. Der Entzug von Wachstumsfaktoren bewirkt demnach ein Umschalten der intrazellulären Signalkaskaden von Proliferation zur Differenzierung. Dieses Ausscheiden aus dem Zellzyklus sollte unter anderem durch eine Änderung des Transkriptom hervorgerufen sein bzw. dieses zur Folge haben. Daher wurden zur Charakterisierung der frühen Expressionsänderungen vergleichende MA-Analysen von proliferierenden und differenzierenden Neurosphären durchgeführt.

Nach einer Differenzierungszeit von 6 Stunden konnte eine differentielle Regulation von insgesamt 109 Genen festgestellt werden, wobei 66 Transkripte transkriptionsvermindert und 43 Gene erhöht waren (Tab.2). Grob lassen sich die Transkripte in folgende zellbiologische Prozesse einteilen:

1. Transkription/Translation

Zu den differentiell regulierten Genen dieser Gruppe zählten die Transkriptionsfaktoren MASH-1, PBX3 und POU3F2, die die Transkription entwicklungsrelevanter Proteine regulieren. Auch Translationsinitiationsfaktoren, wie EIF1AY und EIF4G1, zeigten eine Transkriptionsänderung. Zu differentiell exprimierten ribosomalen Proteinen gehörten RPL24 und RPL36A. Zusätzlich traten auch Expressionsunterschiede in chromatinassoziierten Proteinen auf (HDAC9, Histon1H4C und Histon 1H2AC).

2. Zellzyklus

In dieser funktionellen Gruppe zeigte sich, dass eine Expressionsänderung in Genen auftrat, die für Mitogene (VEGF) oder zellzyklusregulierende Gene codieren (GADD45G, CLK1, BTG2). Dies zeigt, dass die proliferative Kapazität von NHNP Zellen unmittelbar nach der Differenzierungsinitiation verändert wird.

3. Zelladhäsion - Extrazelluläre Matrix - Migration

Auch Gene, die für Proteine codieren, die in der Zelladhäsion, der Migration und der Bildung einer extrazellulären Matrix involviert sind, zeigten eine differentielle Transkriptionsregulation nach Differenzierungsinitiation. Während Integrine, Matrilin, Laminin und N-Cadherin eine Transkriptionsrepression zeigten, wurden VCAM, PPAP2B und CORO1C induziert. Die Repression von ECM-Molekülen und Integrinen mit einer parallelen Induktion von Oberflächenmolekülen, die in der Zellmigration involviert sind, deutet daraufhin, dass das Herauslösen einzelner Zellen aus dem Zellverband begünstigt wurde, um die Migration differenzierender Zellen aus der Sphäre heraus zu ermöglichen. Auch die Transkriptionsinduktion von PDGFD, welches zu Veränderungen der Zellmotilität führen kann (Heldin *et al.*, 1999), spricht für eine Stimulation der Zellmigration.

4. Neurogenese/Differenzierung

Zusätzlich zu zellzyklusregulierten Genen wurde auch die Expression von Transkripten reguliert, die die neurale Differenzierung kontrollieren. So konnte eine Transkriptionsinitiation der Gene FRZB, POU3F2 und auch MASH-1 detektiert werden, die alle an der Neurogenese beteiligt sind.

5. Neurale Marker

Als letzte Gruppe sind Gene zu nennen, die für neurale Marker codieren. Im Gegensatz zu den Oligodendrozytenmarkern (OMG, PMP2), zeigten neuronale Marker (NEF3, ENO2) und auch GFAP eine reprimierte Transkription in differenzierenden NHNP Zellen.

3 Ergebnisse

Tab.2 Expressionsänderungen während der Differenzierung

Zur Detektion differentiell regulierter Gene während der NHNP Zelldifferenzierung wurden Expressionsprofile von proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen verglichen (Differenzierung für 6 Stunden). Für eine differentiell regulierte Genexpression wurde eine mindestens zweifache Transkriptänderung mit $p \leq 0,01$ gewertet. Die regulierten Transkripte sind nach ihrer Funktion gruppiert, wobei die Richtung der Expressionsänderung angegeben ist (▼= Transkripterniedrigung, ▲= Transkripterhöhung in differenzierenden NHNP Zellen). Kursiv geschriebene Gene sind in zwei funktionellen Gruppen aufgeführt. Transkripte, die in der Diskussion näher erläutert werden, sind hervorgehoben. Die verwendeten Expressionsprofile wurden für ein Nebenprojekt erstellt, welches im Anhang näher erläutert wird. Die zugehörigen *Gene Accession IDs* sind im Anhang aufgeführt.

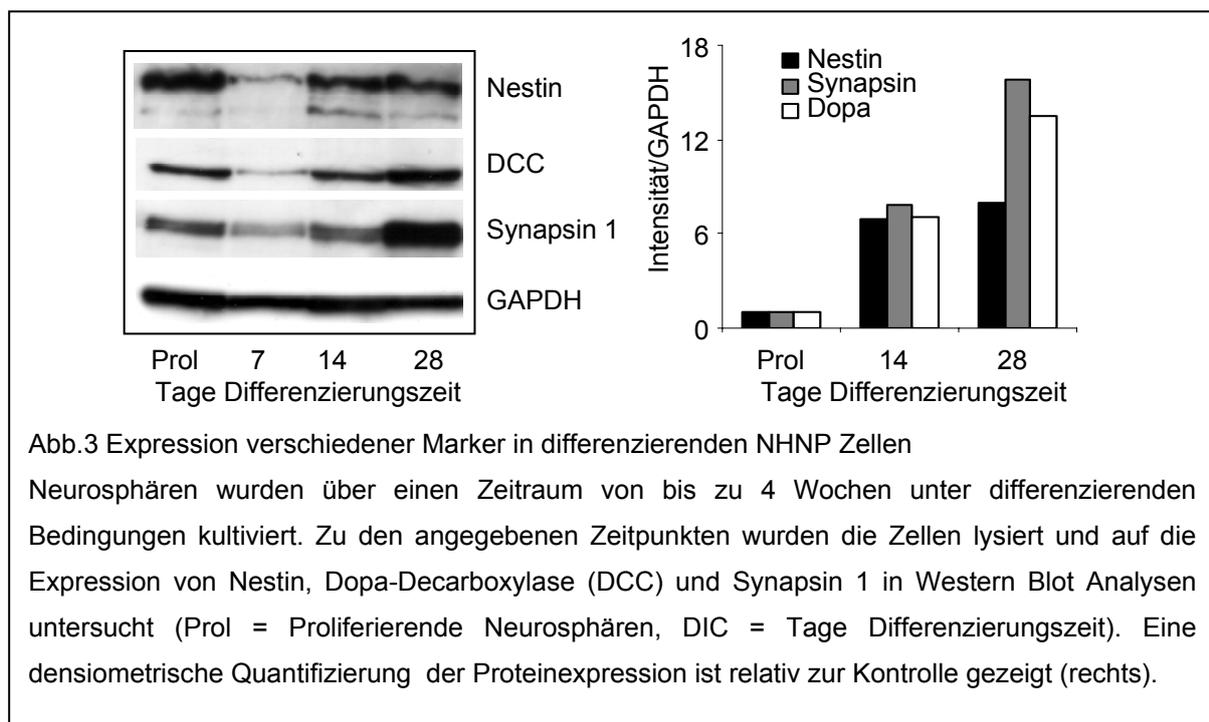
	Gen	Regulationsrichtung
Transkription/Translation	SNRPD1, EIF1AY, NOL5A, RPL24, SFRS3, RPA3, SSBP1, <i>RPL36A</i>	▼
	TCF7L1, TLE1, PBX3, <i>POU3F2</i> , HDAC9, EIF4G1, PLU-1, DACH1, TPR, ANKRD11, SRRM2, Hist1H2AC, Hist1H4C, <i>MASH-1</i>	▲
Zellzyklus	<i>VEGF</i> , <i>CDKN3</i> , CKLF, PCID1, <i>RPL36A</i> , ARHGAP29, <i>ASNS</i> , <i>ADAM19</i>	▼
	<i>BTG2</i> , MYCN, MXI1, <i>CLK1</i> , <i>GADD45G</i>	▲
Zelladhäsion	<i>ADAM19</i> , Integrinβ5, LPL, Integrinβ1binding protein1, CD9, EMP3, <i>Cadherin2</i> ,	▼
	<i>PPAP2B</i> , <i>VCAM1</i> , <i>CORO1C</i> ,	▲
ECM	<i>MATN2</i> , PLOD1, <i>LAMA4</i>	▼
Migration/ Cytoskelettorganisation	<i>CDKN3</i> , SSPN, UAP1RGS20, PTPRF, NTRK3, LYN, VAV3,	▼
	<i>VCAM1</i> , TSPAN5, TJP2, <i>CALD1</i> , <i>PDGFD</i>	▲
Neurogenese/ Differenzierung	SG5, ADORA2B,	▼
	<i>POU3F2</i> , <i>FRZB</i> , DLX2, <i>MASH-1</i> ,	▲
Neurale Marker	<i>ENO2</i> , SCG5, <i>NEF3</i> , <i>GFAP</i> ,	▼
	<i>OMG</i> , <i>PMP2</i> , AMPA3	▲
Nichtfunktionell gegliederte Gene	SC65, HOMER1, ITPR2, KCNJ16, LMO2, SYNGR3, PER2, CLDN10, TPM2, CLI1C	▼
	MAP3K4, LOC653483, BAZ2B, TRIM23, ZFAND5, PELI2, LIPG, SNCAIP, FALZ, MPDZ, KIF1A	▲

3.1.4 Reifung von NHNP Zellen

Um zu untersuchen, ob sich die Expression von Markern für unreife und reifende neurale Zellen mit einer zunehmenden Differenzierungszeit verändert, wurden NHNP Zellen über einen Zeitraum von 4 Wochen unter Differenzierungsbedingungen kultiviert und auf die Expression verschiedener Proteine untersucht. Als Marker für neurale Stammzellen wurde Nestin gewählt, während die Dopa-Decarboxylase und Synapsin als Kennzeichen für reifende Neurone verwendet wurden.

3 Ergebnisse

Western Blot Analysen zeigten, dass Nestin auch noch nach einer Differenzierungszeit von 4 Wochen detektierbar ist. Eine Quantifizierung der Bandenintensitäten ergab eine Zunahme an Nestin über die Differenzierungszeit, was auf eine Proliferation der neuralen Stammzellen hindeutet. Auch Dopa und Synapsin zeigten mit zunehmender Differenzierungszeit eine erhöhte Expression. Dies spricht für eine zunehmende Reifung neuronaler Zellen. Es ist jedoch zu beachten, dass beide Marker auch in proliferierenden Neurosphären detektierbar waren (Abb.3). Somit bestätigt sich die Heterogenität von NHNP Zellen auch auf Proteinebene.



Zusätzlich zu Western Blot Analysen wurden immunzytochemische Untersuchungen zur Reifung von NHNP Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Neurosphären über einen Zeitraum von 2 Tagen bis zu 4 Wochen differenziert und anschließend gegen neuronale (β (III)-Tubulin) und astrozytäre (GFAP) Markerproteine gefärbt. Die immunzytochemischen Analysen (Abb.4) zeigten, dass:

- Die Sphäre blieb über einen Zeitraum von 4 Wochen bestehen. Also waren nicht alle NHNP Zellen in der Lage, aus der Sphäre auszuwandern und zu differenzieren.
- Differenzierende Zellen bildeten bis zu einem Zeitraum von 2 Wochen eine gleichmäßig verteilte radiäre Migrationsfläche um den Sphärenkern. Ab einem

3 Ergebnisse

Differenzierungszeitraum von 2 Wochen bildeten sich strangartige Auswüchse migrierender Zellen (s. Pfeil, schwarz). Dies zeigt, dass die aus der Sphäre migrierten Zellen auch noch nach 3 oder 4 Wochen von der Sphäre weg migrierten und sich somit immer weiter von der Sphäre entfernten, während die Anzahl neu migrierender Zellen vermutlich über die Zeit abnahm.

- Des Weiteren wird anhand der β (III)Tubulin-Färbung deutlich, dass sich mit der zunehmenden Differenzierungszeit ein immer dichter werdendes neuronales Netzwerk ausbildete, was auf eine Zunahme von β (III)Tubulin⁺-Zellen zurückgeht. Ebenso ist erkennbar, dass Neurone bereits nach einer Differenzierung von zwei Tagen vereinzelt Kontakt zu anderen Neuronen suchten (s. Pfeil, weiß). Diese Verknüpfungen nahmen über die Zeit zu, so dass nach 3 oder 4 Wochen Differenzierungszeit ein neuronales Netzwerk erkennbar war.

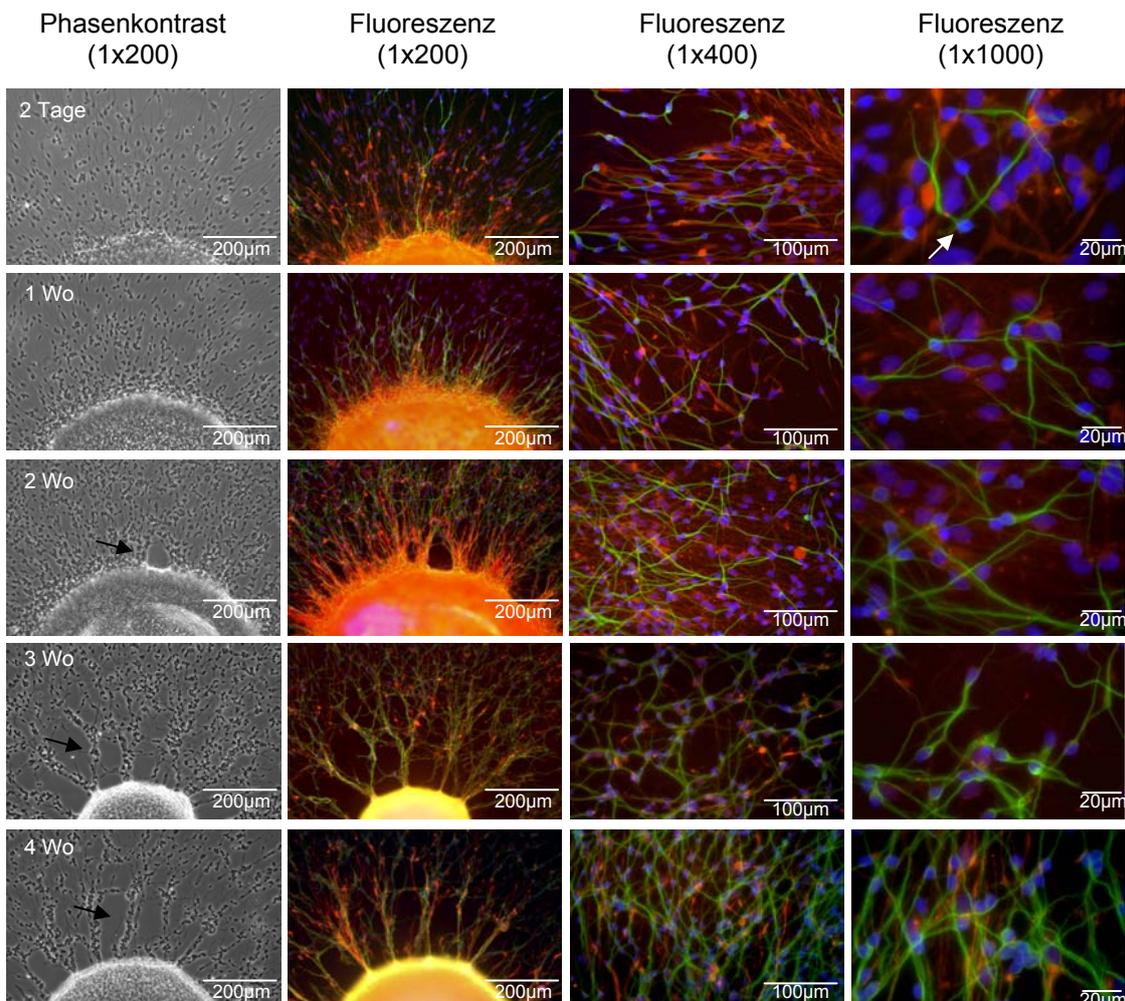


Abb.4 Differenzierungskinetik von NHNP Zellen

Neurosphären wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen bis zu 4 Wochen (Wo) unter differenzierenden Bedingungen kultiviert und anschließend immunzytochemisch gegen β (III)-Tubulin (grün, Neurone), GFAP (rot, Astrozyten) und Hoechst 33342 (Zellkerne, blau) gefärbt. Repräsentative Bildausschnitte sind gezeigt.

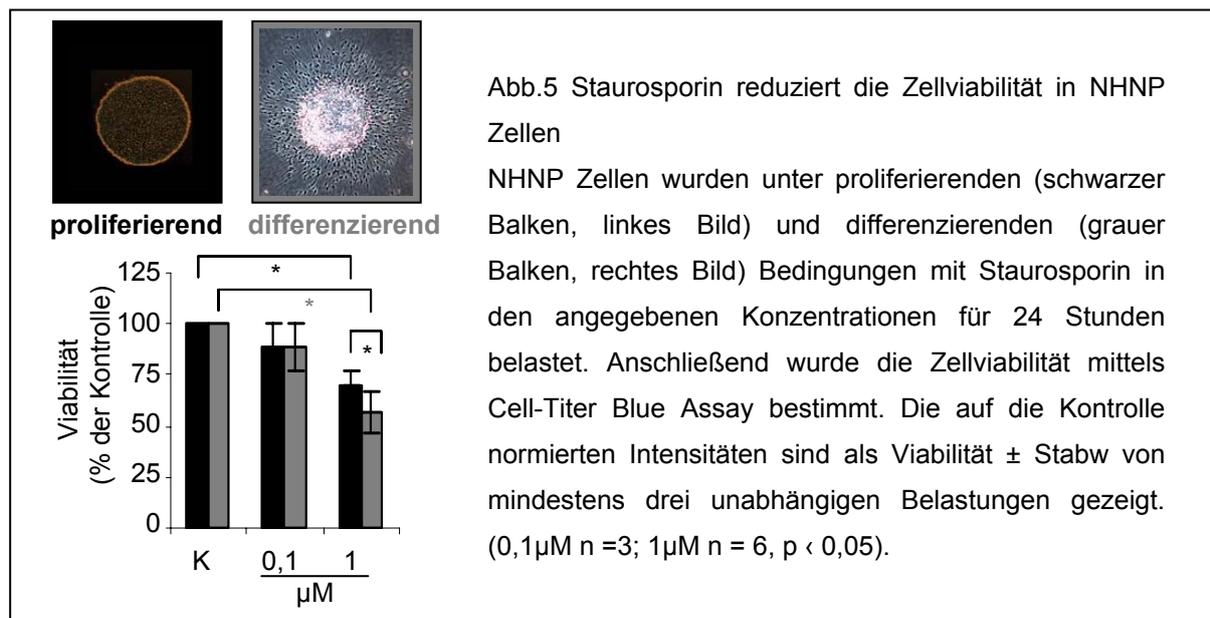
3.2 Spezifische Endpunkte zur Untersuchung von ENT

3.2.1 Zellviabilitätsmessung

Zur Etablierung spezifischer Endpunkte für die Untersuchung von ENT wurden Modellsubstanzen in subtoxischen Konzentrationen eingesetzt. So konnte sichergestellt werden, dass ein spezifischer Effekt auf die Reifung von NHNP Zellen vorlag, der nicht durch eine allgemeine Toxizität hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Viabilitätstest etabliert, um nichttoxische Konzentrationsbereiche zu determinieren.

Für die Viabilitätsmessungen wurde die Kultivierung von Neurosphären in 96er Lochplatten unter proliferativen und differenzierenden Bedingungen etabliert. Als Modellsubstanz wurde Staurosporin verwendet, welches eine Apoptose-Induktion durch Cytochrom C- Freisetzung aus den Mitochondrien induziert.

Abb.5 zeigt, dass eine 24-stündige Belastung mit Staurosporin (0,1-1 μ M) die Viabilität konzentrationsabhängig in proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen reduzierte. Eine signifikante Erniedrigung der Viabilität trat unter beiden Kulturbedingungen bei einer Exposition mit 1 μ M Staurosporin auf. Wie in Abb.5 gezeigt, reagierten differenzierende NHNP Zellen sensibler als proliferierende Zellen [69,9 \pm 7% (proliferierend) versus 56 \pm 10% (differenzierend)].

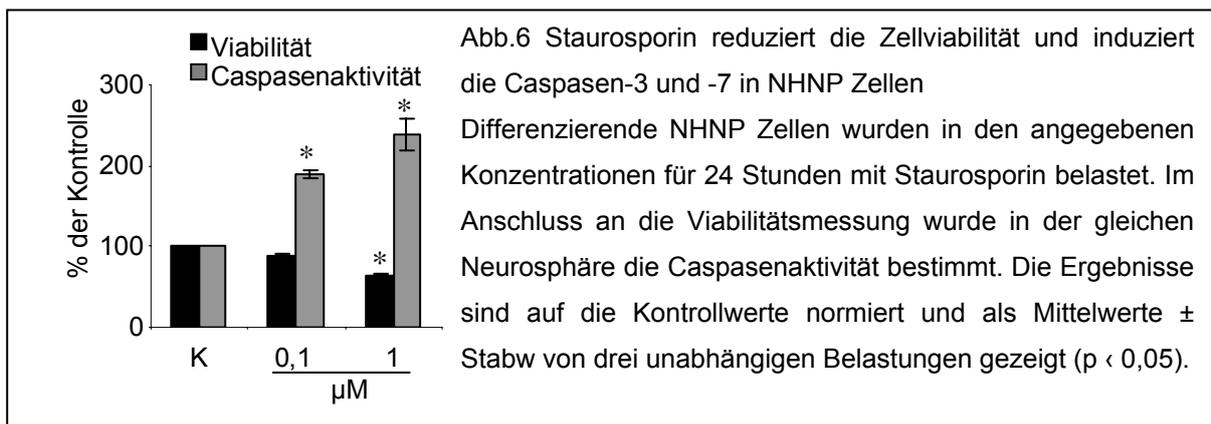


3.2.2 Apoptose

Apoptose ist ein essentieller Prozess der Hirnentwicklung. Deshalb wurde zusätzlich zu dem Viabilitätstest eine Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3 und 7 etabliert, welche in Kombination mit dem Viabilitätstest durchgeführt werden kann.

Zur Etablierung des Apoptosetests wurden NHNP Zellen mit Staurosporin behandelt. Ab einer Konzentration von 100nM Staurosporin war nach 24 Stunden eine Induktion der Caspasenaktivität messbar, bei der die Zellviabilität noch nicht reduziert wurde. Eine Exposition mit 1µM Staurosporin dagegen resultierte in einer erhöhten Caspasenaktivität, die mit einer Erniedrigung der Zellvitalität einherging (Abb.6).

Diese Daten zeigen, dass es möglich ist, Viabilität und Apoptose in einem well in einer Neurosphäre zu messen und dass die mitochondrial-gesteuerte Apoptose in NHNP Zellen durch Staurosporin induziert werden kann.



Als weitere Modellsubstanz zur Induktion von Apoptose wurde Tetrachlorhydrochinon (TCHQ) verwendet, welches über oxidativen Stress zu einer Kaskadenaktivierung der Caspasen führen soll.

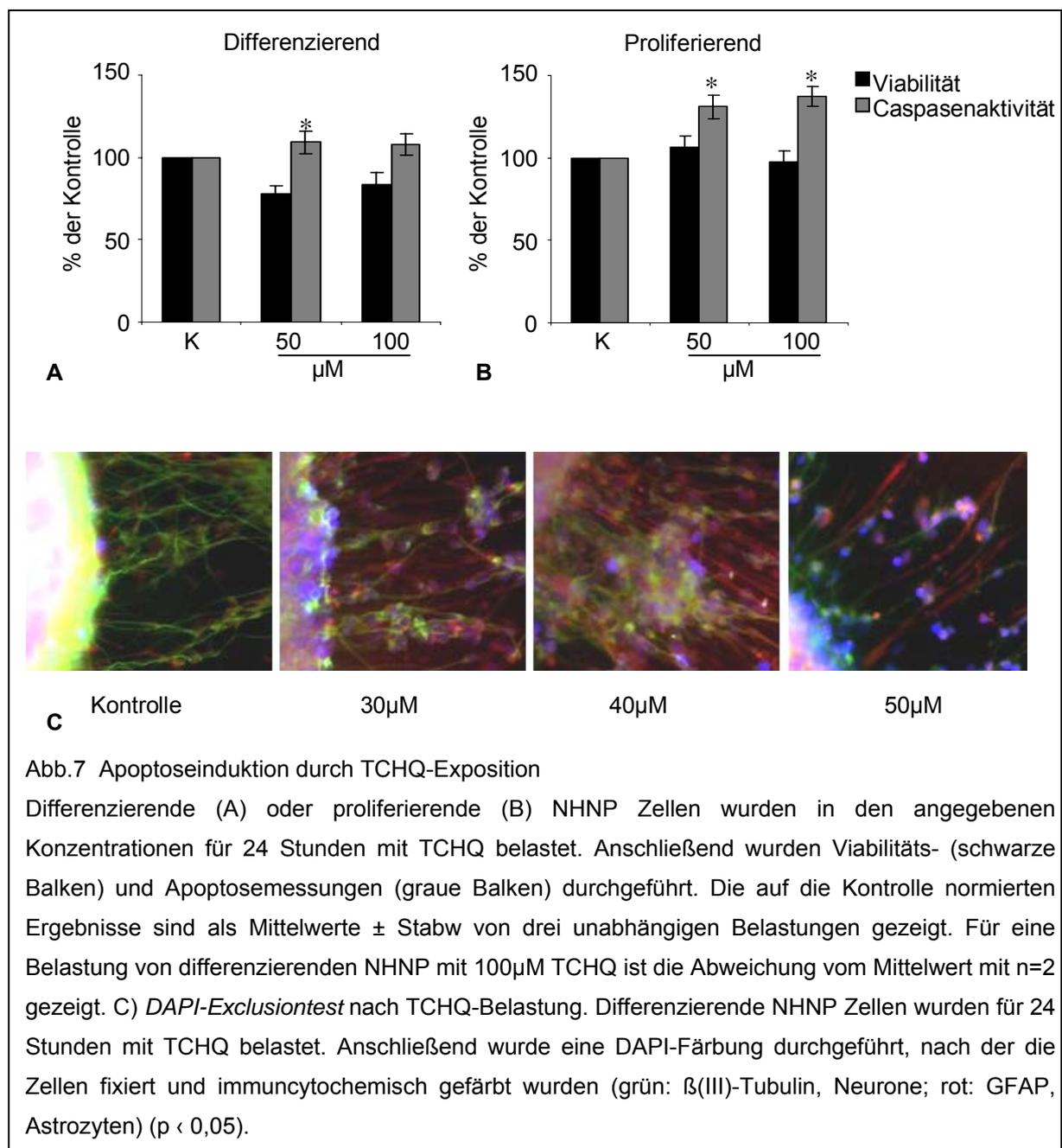
Im Gegensatz zu Staurosporin resultierte eine Exposition mit 50µM oder 100µM TCHQ nicht in einer Caspasenaktivierung in differenzierenden NHNP Zellen (Abb.7A). Da die Zellviabilität jedoch reduziert wurde, ist davon auszugehen, dass die gewählte TCHQ-Belastung zu nekrotischem Zelltod führte. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse des DAPI-Exclusionstests, welcher nekrotische oder spät-apoptotische Zellen aufgrund der permeabilisierten Zellmembran markiert, bestätigt: nach einer Exposition mit 30µM TCHQ zeigten Neurosphären DAPI-markierte Zellen, die mit steigender TCHQ-Konzentration zunahm (Abb.7B). Dies zeigt, dass TCHQ

3 Ergebnisse

zu einer Zellschädigung in differenzierenden NHNP Zellen führte, die jedoch nicht mit einer Caspasenaktivierung einherging.

Im Gegensatz hierzu führte eine TCHQ-Belastung proliferierender Zellen zu einer signifikanten Induktion der Caspasenaktivität (50 μ M: 131 \pm 7,1%; 100 μ M: 137 \pm 6,1%), die nicht mit einer reduzierten Viabilität zu dem gemessenen Zeitpunkt korreliert war (Abb.7C). TCHQ scheint demnach Apoptose in differenzierenden NHNP Zellen zu induzieren, jedoch in geringerem Maße als Staurosporin.

Ein Vergleich der Viabilitätsuntersuchungen in proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen zeigte (s. Abb.5), dass differenzierende Zellen empfindlicher auf diese Noxe reagierten als undifferenziertere, proliferierende Zellen (Abb.5;7).



3.2.3 Wirkung von entwicklungstoxischen Stoffen auf spezifische Endpunkte für ENT

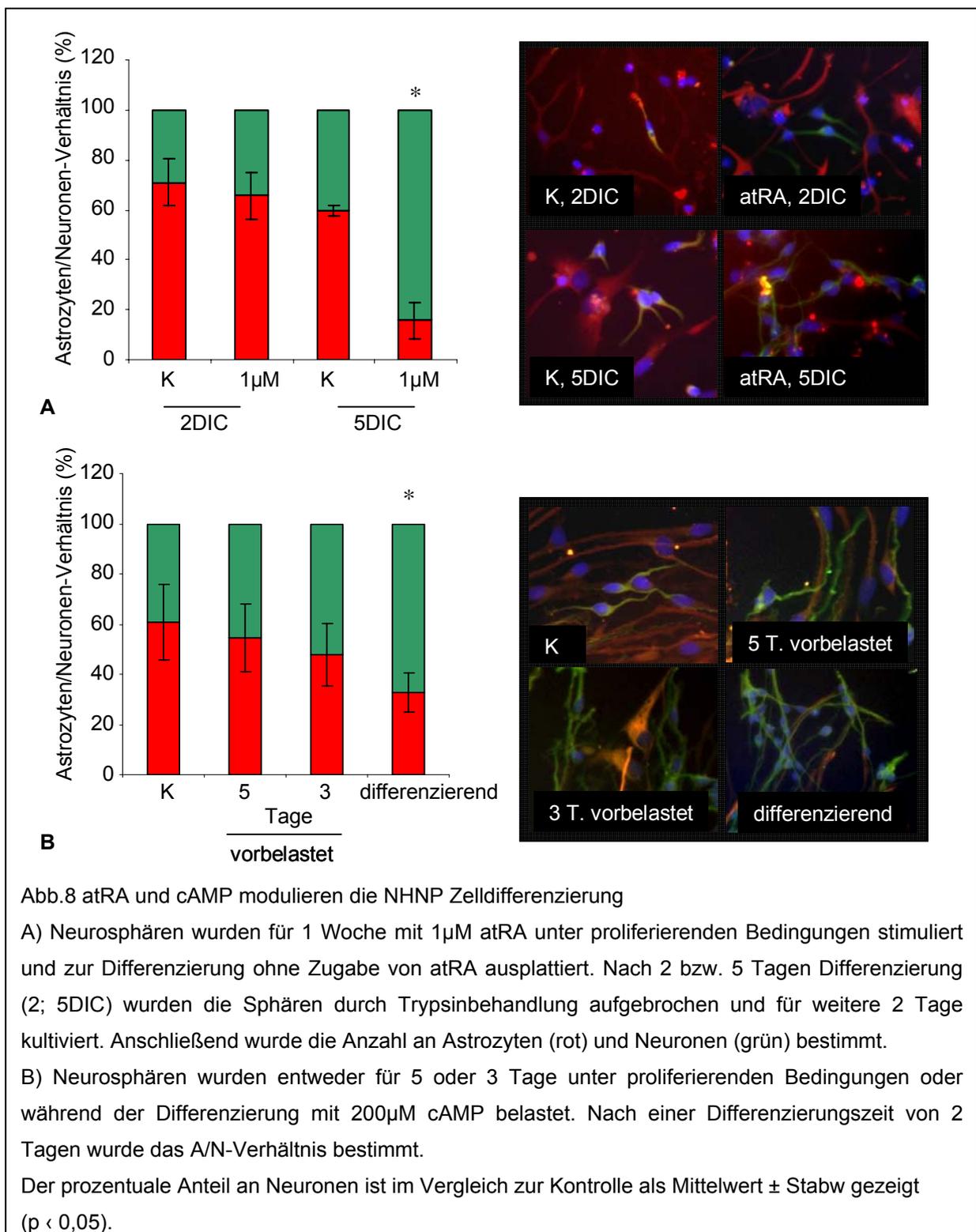
Neben zellzahlregulierenden Prozessen, wie Apoptose oder auch Proliferation, spielt auch die Differenzierung neuraler Progenitorzellen eine essentielle Rolle, um einen normalen Aufbau und somit eine normale Funktion des Gehirns zu gewährleisten. Substanzen, die zu einer Veränderung der Differenzierung führen, beeinträchtigen die Entwicklung des Gehirns daher negativ. So kann eine Verschiebung der Neuronenanzahl zu einer Einschränkung der neuronalen Konnektivität und somit zu einem Verlust der Gehirnleistung führen. Aus diesem Grund ist die Etablierung von Methoden wünschenswert, die es erlauben, Noxen zu identifizieren, die neurale Differenzierungsstörungen hervorrufen.

3.2.3.1 Einfluss von Retinolsäure, cAMP, und Quecksilber auf die Differenzierung von NHNP Zellen

Zunächst wurde getestet, ob die Differenzierung von NHNP Zellen in Astrozyten und Neurone beeinflusst werden kann. Hierzu wurde die Differenzierung von Neurosphären unter dem Einfluss von cAMP oder all-trans Retinolsäure (atRA) untersucht. Von diesen Substanzen ist bekannt, dass sie die Entwicklung von Neuronen *in vivo* und *in vitro* fördern (Chen *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2001b). Nach einer Exposition von proliferierenden NHNP Zellen gegenüber 1µM atRA war die Anzahl von differenzierenden Neuronen nach einer Differenzierungszeit von 5 Tagen signifikant erhöht (Abb.8A).

Im Gegensatz dazu führte cAMP nur bei einer Behandlung während der Differenzierung zu einer signifikanten Zunahme der Neuronenzahl (Abb.8B).

3 Ergebnisse



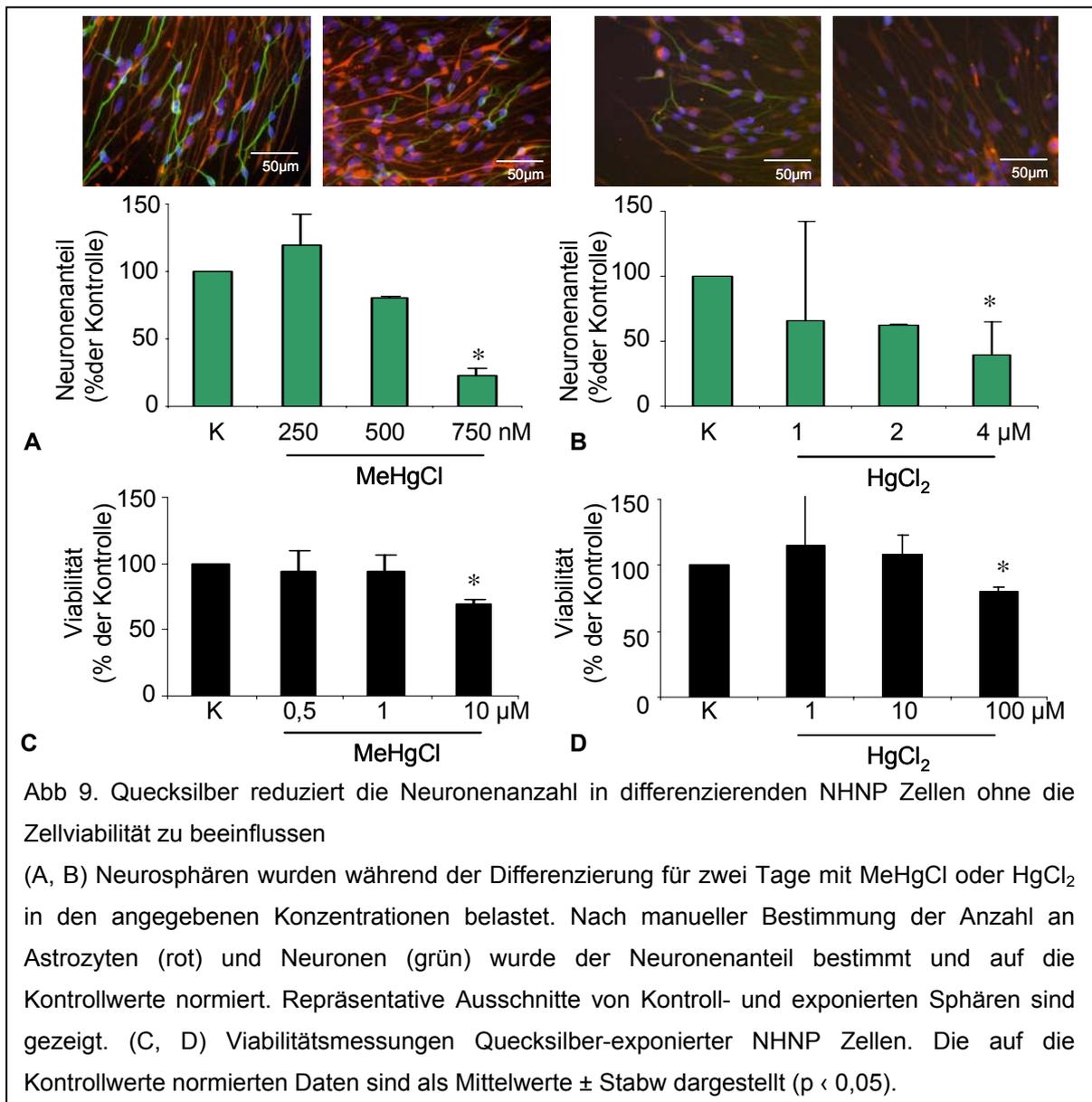
Anorganische und organische Quecksilberverbindungen sind dafür bekannt, dass sie entwicklungsneurotoxisches Potential besitzen (Clarkson, 2002). Deshalb wurden NHNP Zellen mit Quecksilberchlorid (HgCl_2) und Methylquecksilberchlorid (MeHgCl) belastet.

3 Ergebnisse

Differenzierungsanalysen zeigten, dass eine Quecksilberbelastung von NHNP Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Verschiebung des A/N-Verhältnisses führte. 750nM MeHgCl resultierten in einer signifikanten Änderung des Neuronenanteils auf $23 \pm 6\%$ der Kontrolle (Abb.9A). Dies entspricht einer Reduktion des Neuronenanteils von 8% auf 2%.

Eine Exposition von NHNP Zellen gegenüber HgCl_2 führte ebenfalls zu einer Verschiebung des A/N-Verhältnisses. Wurden differenzierende NHNP Zellen mit einer subzytotoxischen Konzentration von $4\mu\text{M}$ HgCl_2 belastet, so wurde die Anzahl an Neuronen auf $39 \pm 25\%$ der Kontrolle verringert. Das entsprach einer Reduktion des Neuronenanteils von 9% auf 4%.

Beide Verbindungen haben erst in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte in NHNP Zellen gezeigt (Abb.9).

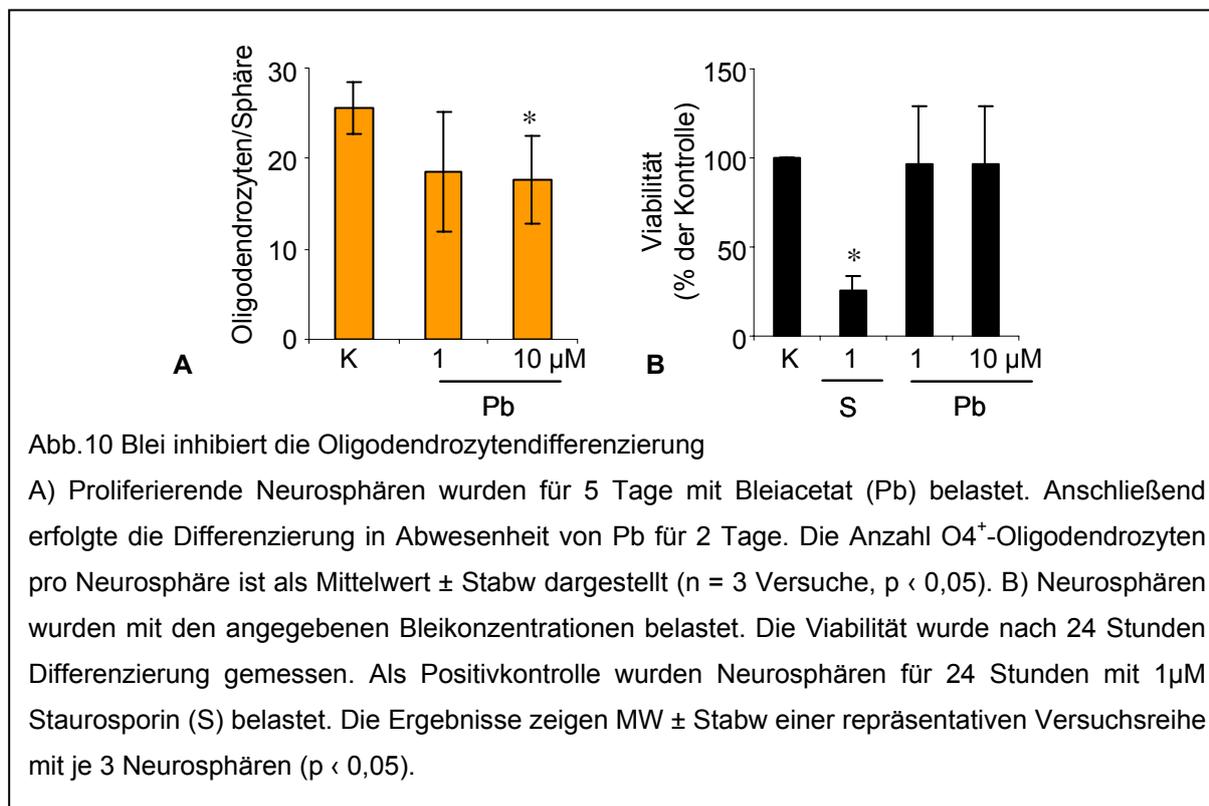


Die Ergebnisse der Exposition von NHNP Zellen gegenüber atRA, cAMP und Quecksilber zeigen, dass die Zelldifferenzierung sowohl zugunsten der Astrozyten als auch der Neurone verschoben werden konnte.

3.2.3.2 Störung der Oligodendrozytendifferenzierung durch Blei

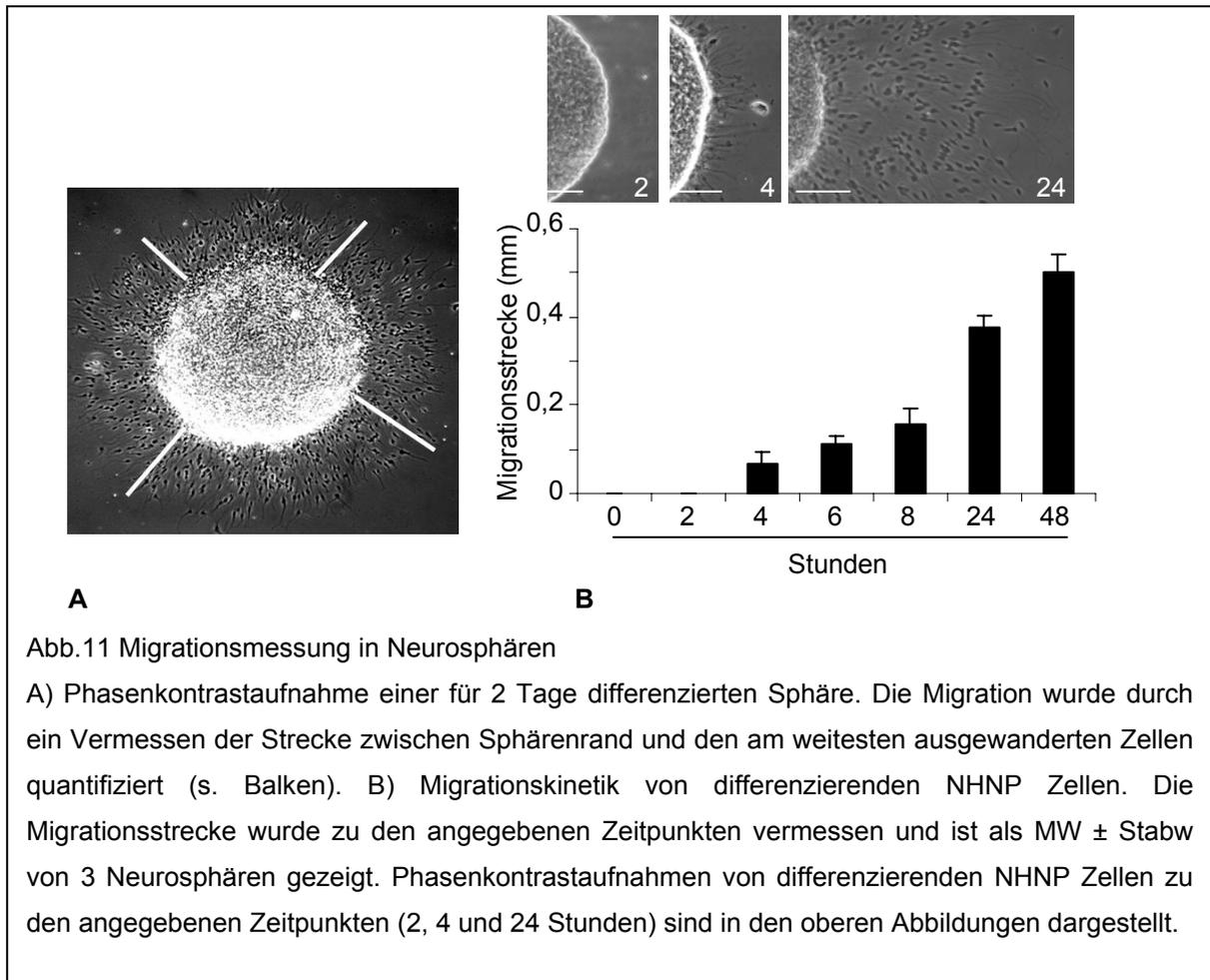
Der dritte detektierbare Zelltyp in NHNP Zellen sind Oligodendrozyten. Aus der Literatur ist bekannt, dass Blei mit Prozessen der Oligodendrozytenreifung interferiert (Deng *et al.*, 2001a).

Um einen Einfluss von Blei auf die Oligodendrozytenreifung in NHNP Zellen zu untersuchen, wurden proliferierende NHNP Zellen für 5 Tage mit 1µM oder 10µM Blei vorbelastet. Anschließend erfolgte eine Differenzierung über zwei Tage ohne Bleizugabe. Nach immunzytochemischer Färbung gegen den Oligodendrozytenmarker O4 wurde die Anzahl an Oligodendrozyten/Neurosphäre bestimmt. Eine Exposition von NHNP Zellen mit 10µM Bleiacetat führte zu einer signifikanten Reduktion differenzierter Oligodendrozyten (Abb.10A). Entsprechende Viabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die gewählten Blei-Konzentrationen nicht zu einer veränderten Zellviabilität geführt haben (Abb.10B).



3.3 Migration

Ein weiterer bedeutender Prozess bei der Gehirnentwicklung ist die Migration, bei der neurale Zellen mehrere Zentimeter weit wandern, um ihre korrekte Position zu erreichen und ein neuronales Netzwerk auszubilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Test entwickelt, bei dem die Migration differenzierender NHNP Zellen aus der Sphäre quantifiziert werden kann. Hierzu wurde die Strecke zwischen Sphärenrand und den am weitesten ausgewanderten Zellen vermessen, wie es in Abb.11A durch die weißen Balken gezeigt wird.

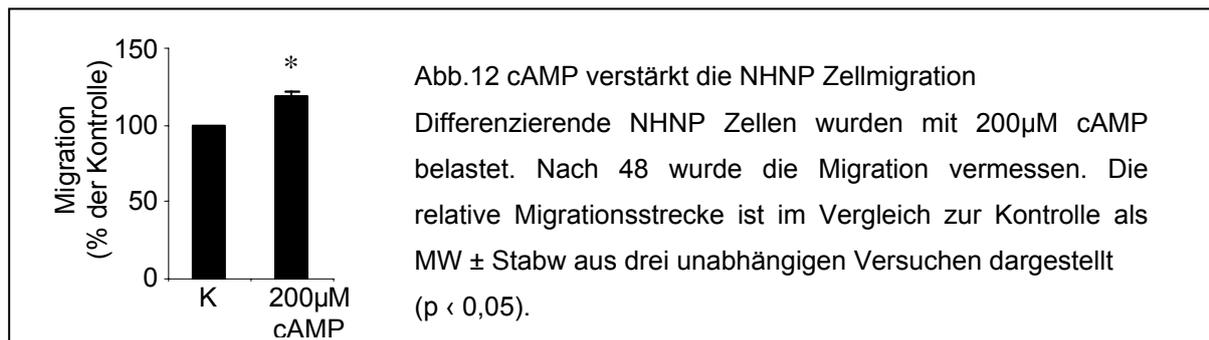


Eine Messung der NHNP-Zellmigration über die Zeit zeigte, dass es sich bei der Migration um einen sehr schnell beginnenden und kontinuierlich fortlaufenden Prozess handelt. Bereits 2 – 4 Stunden nach Differenzierungsbeginn waren NHNP Zellen am Rand der Neurosphäre zu erkennen, deren Zellkörper bereits $0,07 \pm 0,02$ mm aus der Sphäre migriert waren. Nach 48 Stunden migrierten die Zellen über eine Distanz von $0,5 \pm 0,04$ mm (Abb.11B).

3.3.1 Einfluss von cAMP, Quecksilber, Blei und Ethanol auf die NHNP Zellmigration

Die Etablierung des Migrationstests als Endpunkt für ENT erfolgte anhand der ausgewählten Modellsubstanzen cAMP, Hg, Blei und Ethanol.

Eine Belastung differenzierender NHNP Zellen mit 200 μ M cAMP verlängerte die Migrationsstrecke um 18 ± 4 % (Abb.12).

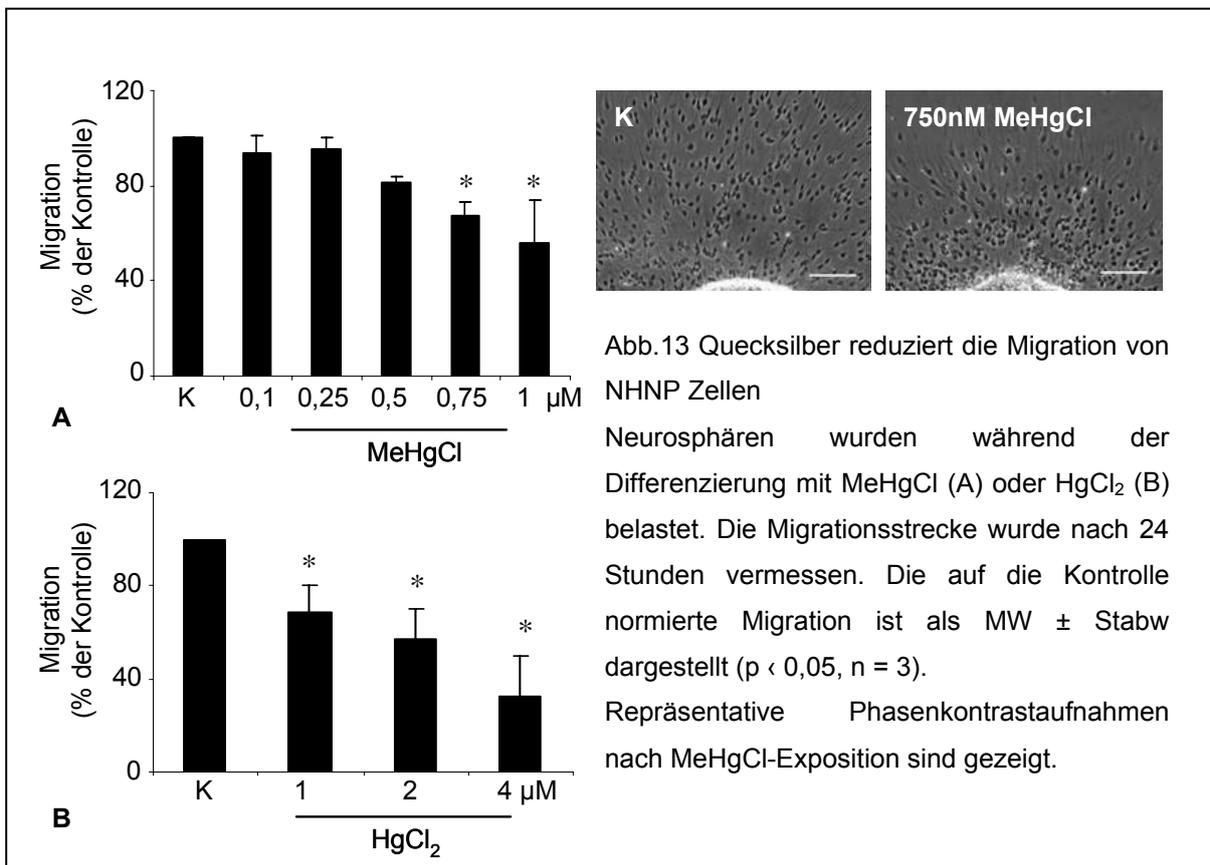


Quecksilberverbindungen hingegen hemmten die Migration. Eine Exposition gegenüber MeHgCl führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Migrationsstrecke, wobei eine Exposition mit 750nM MeHgCl zu einer signifikant verkürzten Migrationsstrecke auf 67 ± 6 % der Kontrolle führte (Abb.13A). Die gleiche Konzentration führte zu einer signifikanten Inhibierung der neuronalen Differenzierung (Abb.9). Die Endpunkte Differenzierung und Migration wurden demnach in gleichen Konzentrationsbereichen durch MeHgCl gestört.

Eine Exposition der NHNP Zellen gegenüber anorganischem Quecksilber führte ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Migrationsreduktion. 1 μ M HgCl₂ führte zu einer Reduktion der Migrationsstrecke auf 68 ± 12 %. Dieser Effekt konnte durch eine Erhöhung der Quecksilberkonzentration auf 10 μ M auf 33 ± 17 % verstärkt werden (Abb.13B).

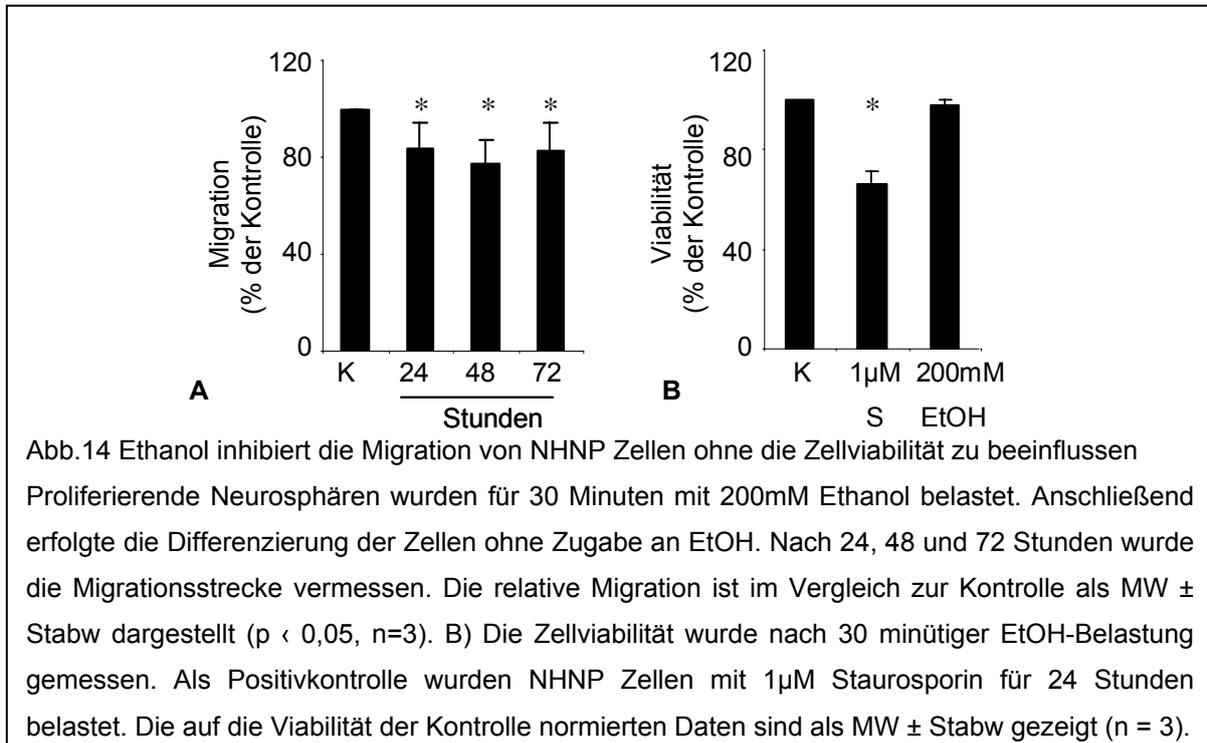
Bei den gewählten Quecksilberkonzentrationen war die Zellviabilität nicht berücksichtigt (Abb. 9C,D).

3 Ergebnisse



Auch eine Exposition des Fetus gegenüber EtOH kann zu einer Störung der Gehirnentwicklung durch eine Interferenz mit der Zellmigration führen (Guerra, 1998; Jones, 1975). Deshalb wurden proliferierende NHNP Zellen für 30 Minuten mit 200mM Ethanol belastet. Anschließend wurde die Migration über 72 Stunden verfolgt. Die Befunde dieser Untersuchungen sind in Abb.14 dargestellt. Über den beobachteten Zeitraum war die Migrationsstrecke signifikant vermindert. Die verwendete EtOH-Konzentration hatte in dem angewendeten Belastungsschema keinen Einfluss auf die Zellviabilität (Abb.14B).

3 Ergebnisse



In Tab. 3 sind die Ergebnisse der Untersuchung von Blei auf die NHNP Zellmigration dargestellt. Aus der Tabelle geht hervor, dass Blei keinen signifikanten Einfluss auf die Migration ausübte.

Tab.3 Blei-Exposition führt nicht zu einer veränderten Zellmigration

Neurosphären wurden für 5 Tage mit Bleiacetat exponiert. Anschließend wurden die Sphären ohne Zugabe von Bleiacetat ausplattiert. Nach 48 Stunden wurde die Migration vermessen. Die auf die Kontrolle normierte Migration ist als MW ± Stabw gezeigt ($p < 0,05$, $n = 3$).

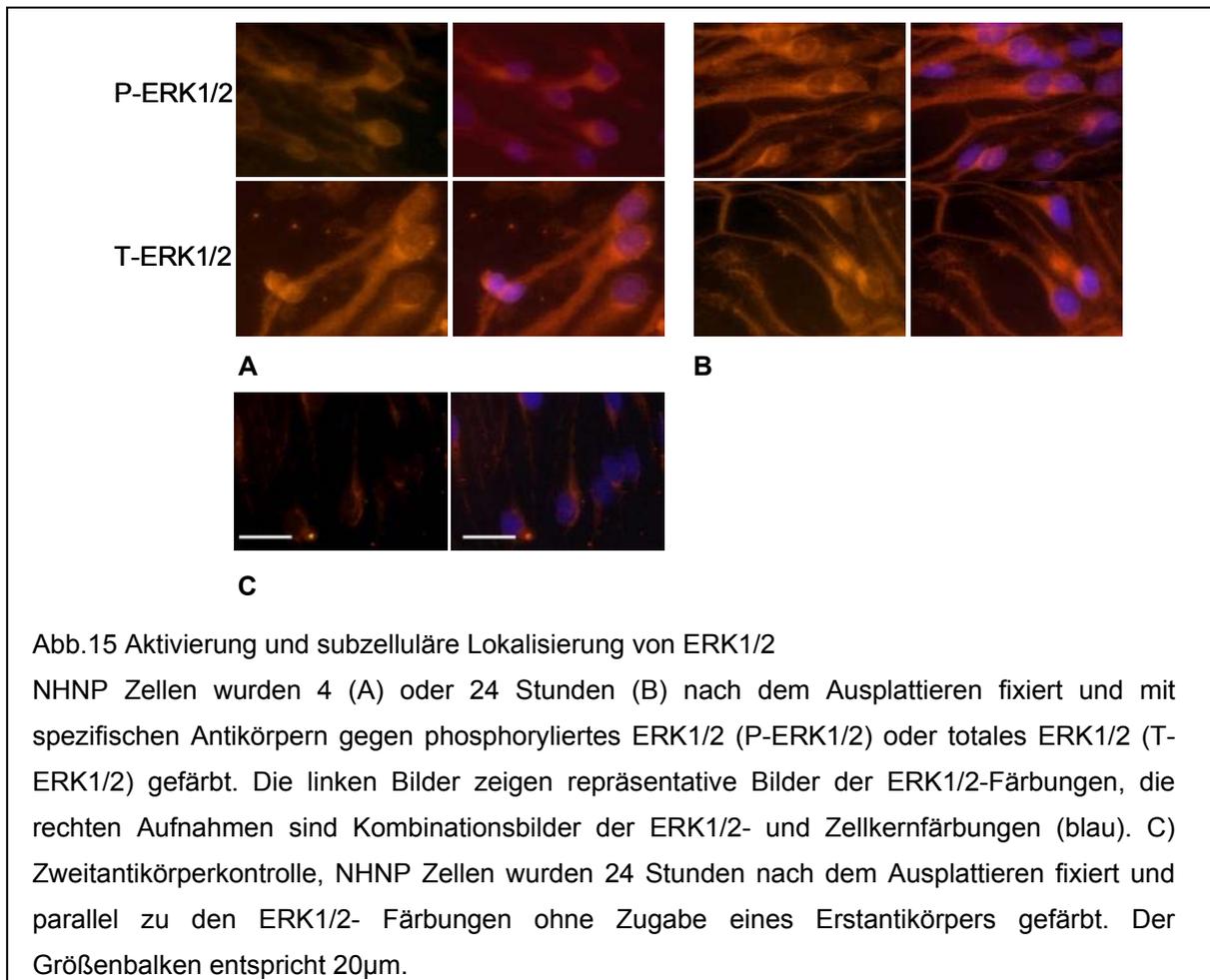
	Kontrolle	1µM Pb	10µM Pb
MW ± Stabw	100 %	94,7 ± 7,2 %	104,1 ± 10 %

Die vorgestellten Daten zur NHNP Zellmigration nach Exposition mit den Modellsubstanzen cAMP, Quecksilber, Ethanol und auch Blei zeigen, dass die Migration von NHNP Zellen sowohl stimuliert als auch inhibiert werden kann.

3.3.2 Analyse an der NHNP Zellmigration beteiligter Signalwege

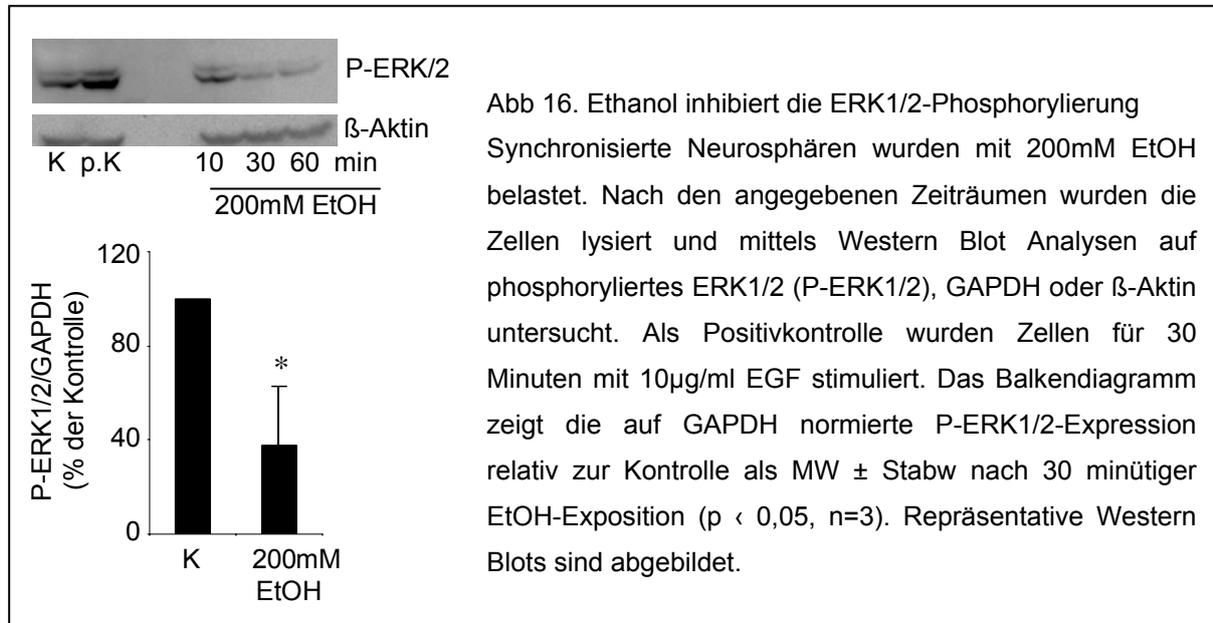
3.3.2.1 Rolle von ERK1/2

Aus der Literatur ist bekannt, dass die MAP Kinasen ERK1/2 die Mobilität verschiedener Zelllinien kontrollieren (Huang *et al.*, 2004), deswegen haben wir zunächst untersucht, ob ERK1/2 an der Migration von NHNP Zellen beteiligt ist. Zum Nachweis wurden immunzytochemische Analysen mit einem Antikörper gegen P-ERK1/2 sowie Total-ERK1/2 in migrierten NHNP Zellen nach 4 und 24 Stunden durchgeführt. Bereits nach einer Migrationszeit von 4 Stunden war phosphoryliertes ERK1/2 nachweisbar, dass auch nach 25 Stunden noch detektierbar war. P-ERK1/2 und Total-ERK1/2 waren hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb.15).



3 Ergebnisse

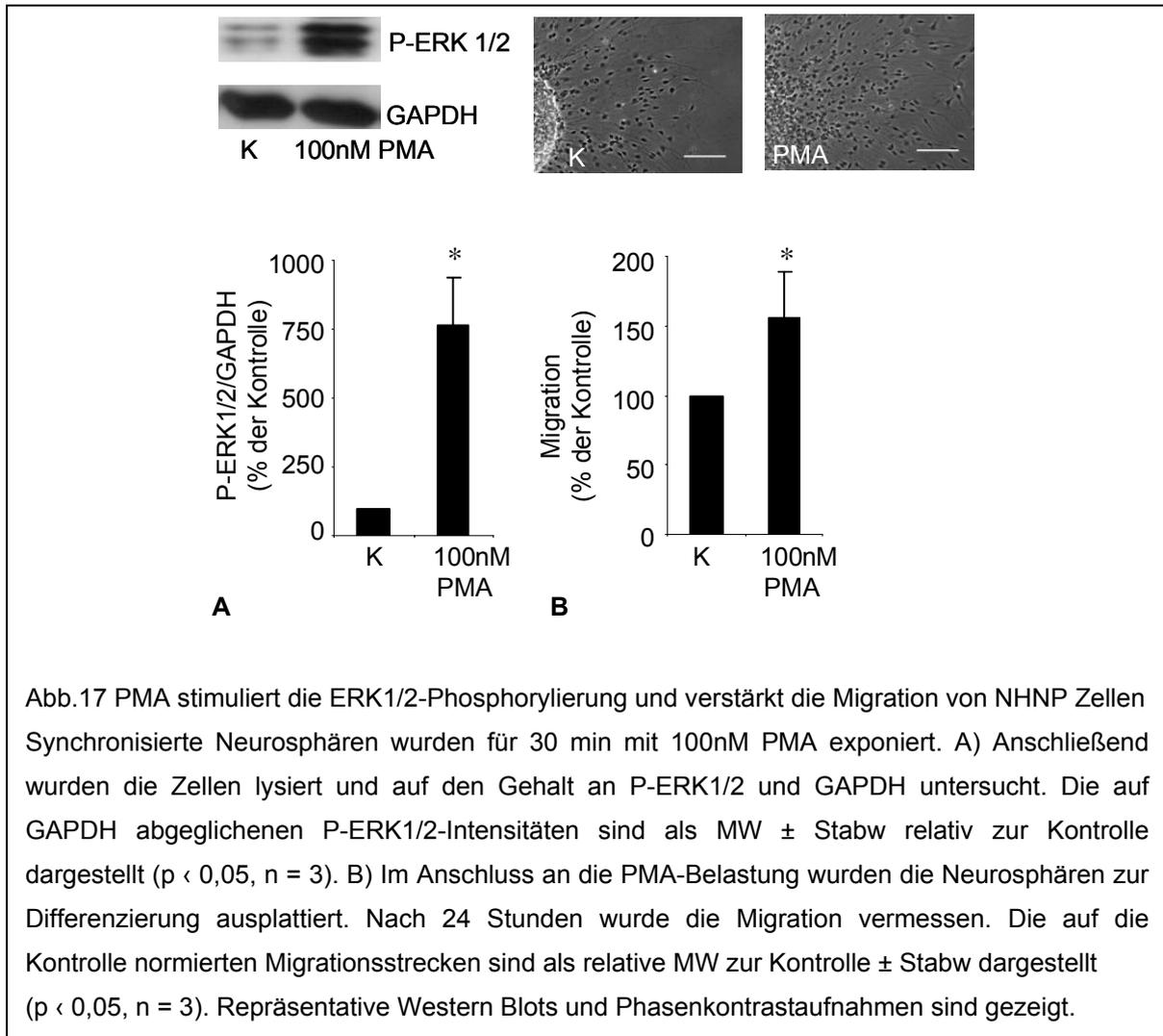
Um zu testen, ob eine Hemmung der Migration mit einer veränderten ERK1/2-Phosphorylierung einhergeht, wurden die Zellen über eine Zeit von 60 Minuten mit EtOH belastet. Anschließend wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Abb.16 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Bereits nach einer Belastungszeit von 30 Minuten war P-ERK1/2 um mehr als 50% reduziert.



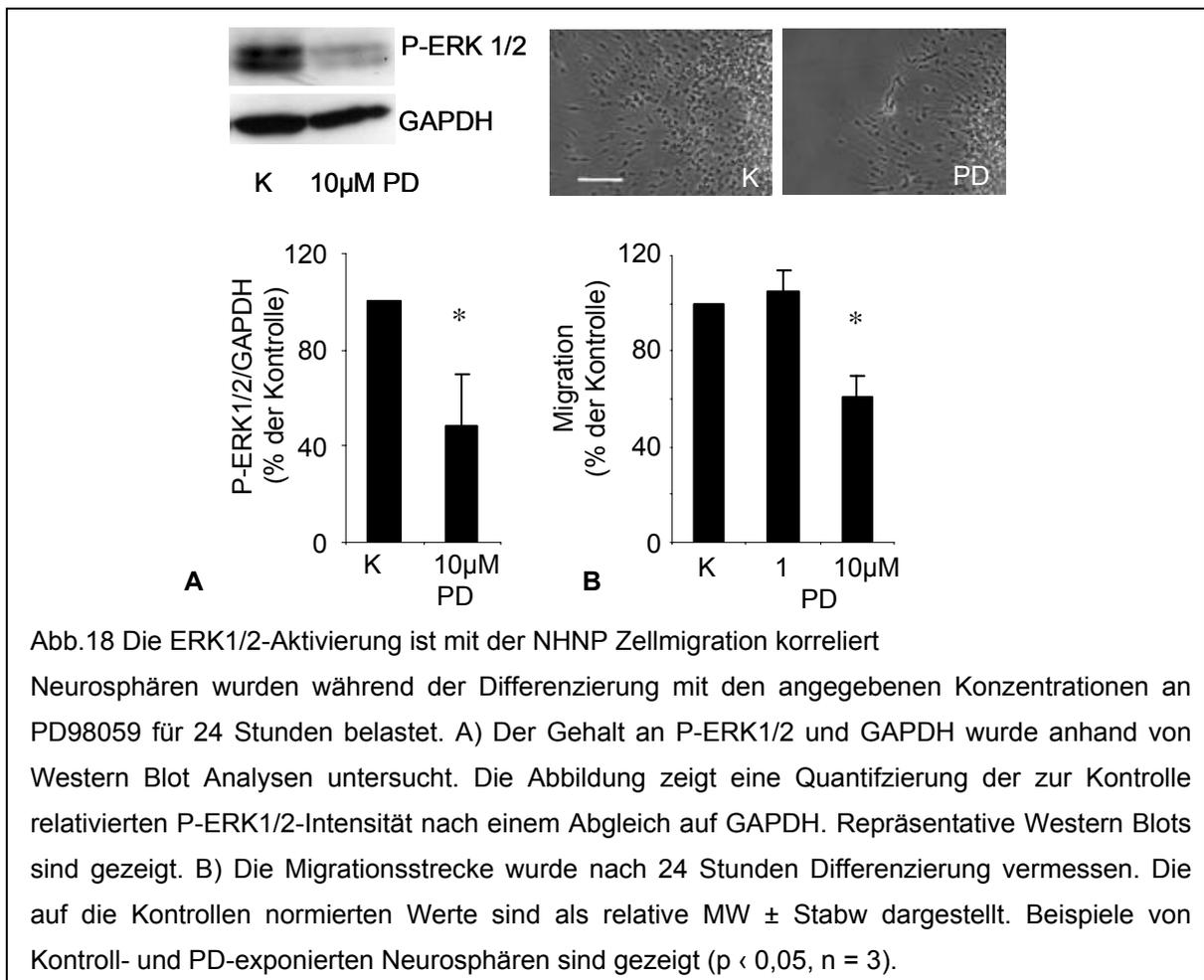
In einem weiteren Ansatz wurde überprüft, ob eine Stimulation der ERK1/2-Phosphorylierung mit einer gesteigerten Migration assoziiert ist. Dazu wurden undifferenzierte Sphären für 30 Minuten mit dem Phorbol ester PMA inkubiert und anschließend die Migration verfolgt. Wie Abb.17 zeigt, steigerte PMA die Migration um 56% gegenüber den Kontrollen. In Western Blot Analysen (Abb.17A) war eine signifikante Zunahme von P-ERK1/2 detektierbar. PMA erhöhte den Anteil an P-ERK1/2 auf das 7-fache der Kontrollzellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine verringerte Migration mit einer reduzierten ERK1/2-Phosphorylierung einherging, während eine verstärkte Migration mit einer Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung assoziiert war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die NHNP Zellmigration mit dem Aktivierungsstatus von ERK1/2 korreliert ist.

3 Ergebnisse



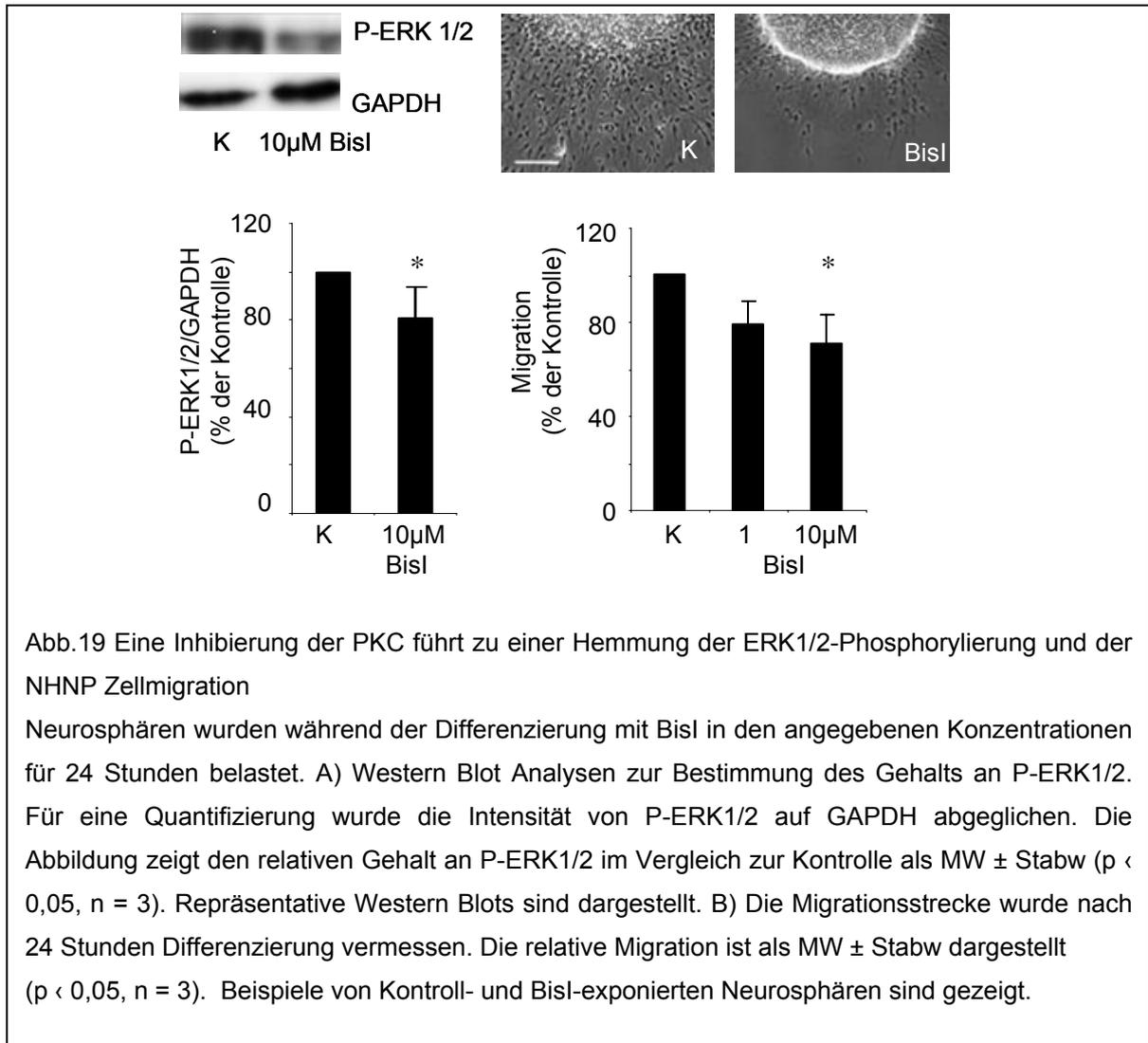
Um diese Hypothese zu beweisen, wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 durch den Einsatz eines MEK-Inhibitors (PD98059) gehemmt. Abb.18 zeigt, dass die Exposition mit PD98059 in nicht-toxischen Konzentrationen (s. Anhang) wie erwartet zu einer Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung auf $48 \pm 22\%$ und zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Migration führte. Diese Ergebnisse belegen, dass die Migration von NHNP Zellen unter anderem von der ERK1/2 – Aktivierung abhängt.



3.3.2.2 Bedeutung der Interaktion der PKC und der ERK1/2-Aktivierung in der NHNP Zellmigration

Zur weiteren Analyse der NHNP Zellmigration wurde die Bedeutung der PKC analysiert, von der bekannt ist, dass sie über eine Aktivierung der RAS-RAF-MEK-Kaskade eine ERK1/2-Aktivierung induzieren kann.

Eine Exposition von differenzierenden NHNP Zellen gegenüber dem pharmakologischen PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BisI) führte zu einer Reduktion von P-ERK1/2 auf $81 \pm 13\%$ und der Migrationsstrecke auf $71 \pm 12\%$ (Abb.19), ohne die Zellviabilität zu verändern (s. Anhang). Dies zeigt, dass die PKC an der Regulation der Migration differenzierender NHNP Zellen durch eine ERK-Aktivierung beteiligt ist.



3.3.2.3 EGF-R und SFKs kontrollieren die NHNP Zellmigration

Auch eine Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGF-R) stimuliert die Phosphorylierung von ERK1/2 (Segar *et al.*, 1995) und mehrere Studien zeigten, dass die Expression des EGF-R mit der Zellmotilität korreliert ist (Aguirre *et al.*, 2005; Caric *et al.*, 2001). Deshalb haben wir untersucht, ob der EGF-R auch in der NHNP Zellmigration bedeutend ist.

Hierzu wurden Inhibierungsstudien mit dem EGF-R Inhibitor Tyrphostin AG1478 durchgeführt, welcher die Kinaseaktivität des EGF-R hemmt. Dadurch inhibiert Tyrphostin die EGF-R-abhängige Signaltransduktion. Abbildung 20 zeigt, dass eine Differenzierung in Gegenwart von 1µM Tyrphostin AG1478 zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung führte. Die Daten der

3 Ergebnisse

Migrationsanalysen zeigten, dass die fast vollständige Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung die Migrationsstrecke lediglich auf $66 \pm 8\%$ reduzierte. Eine Erhöhung der Tyrphostin Konzentration auf $10\mu\text{M}$ verstärkte den Effekt auf die Migration nicht (Abb.20). Die Exposition mit den genannten Konzentrationen zeigte keine Änderung der Zellviabilität (s. Anhang).

Diese Daten weisen darauf hin, dass der EGF-R die NHNP Zellmigration über eine Aktivierung von ERK1/2 reguliert und dass neben ERK1/2-abhängigen auch ERK1/2-unabhängige Signalwege die Migration steuern.

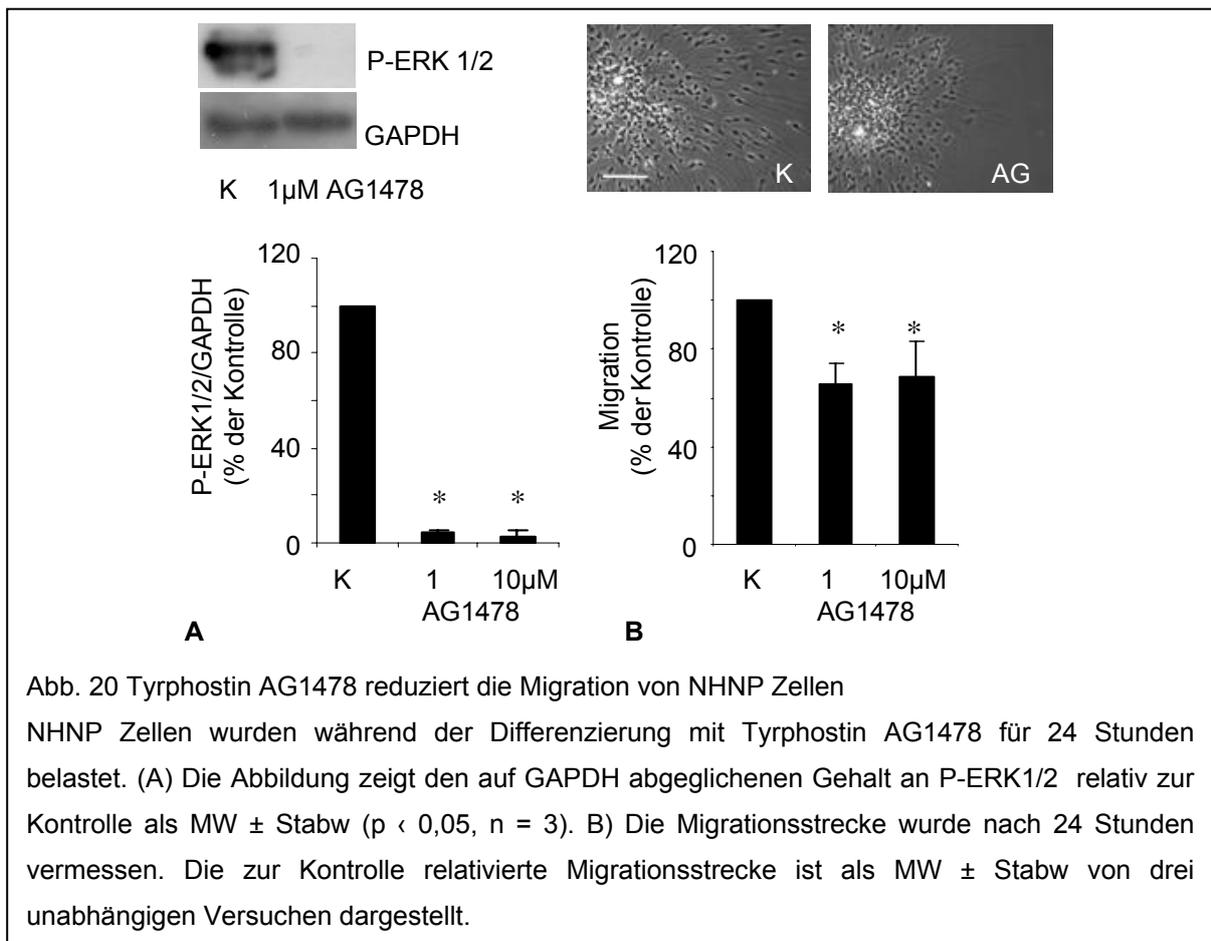


Abb. 20 Tyrphostin AG1478 reduziert die Migration von NHNP Zellen

NHNP Zellen wurden während der Differenzierung mit Tyrphostin AG1478 für 24 Stunden belastet. (A) Die Abbildung zeigt den auf GAPDH abgeglichenen Gehalt an P-ERK1/2 relativ zur Kontrolle als MW \pm Stabw ($p < 0,05$, $n = 3$). B) Die Migrationsstrecke wurde nach 24 Stunden vermessen. Die zur Kontrolle relativierte Migrationsstrecke ist als MW \pm Stabw von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Eine solche Familie von Tyrosinkinase, welche ERK1/2-unabhängige Signale medieren kann, sind die SFKs. Da von dieser auch eine Involvement in die Zellmotilität beschrieben wurde (Altun-Gultekin *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2006), habe ich untersucht, ob diese Familie auch an der Migration von NHNP Zellen beteiligt ist.

Dazu wurden Inhibierungsstudien mit den pharmakologischen Inhibitoren PP2 und SU6656 untersucht. Im Gegensatz zur Inhibierung der PKC oder des EGF-R führte eine Exposition mit $5\mu\text{M}$ PP2 oder $10\mu\text{M}$ SU6656 bei einer Reduktion der Migration

3 Ergebnisse

auf $44 \pm 24\%$ (PP2, 5 μ M), bzw. $58 \pm 19\%$ (SU6656) nicht zu einer Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung (Abb.21). Nur nach einer Belastung mit 10 μ M PP2 wurde eine Verminderung der ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet, die jedoch wahrscheinlich auf zytotoxische Effekte des Inhibitors zurück zu führen ist (Abb. 21C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass SFKs die Migration von differenzierenden NHNP Zellen regulieren ohne einen Einfluss auf die ERK1/2-Aktivierung auszuüben.

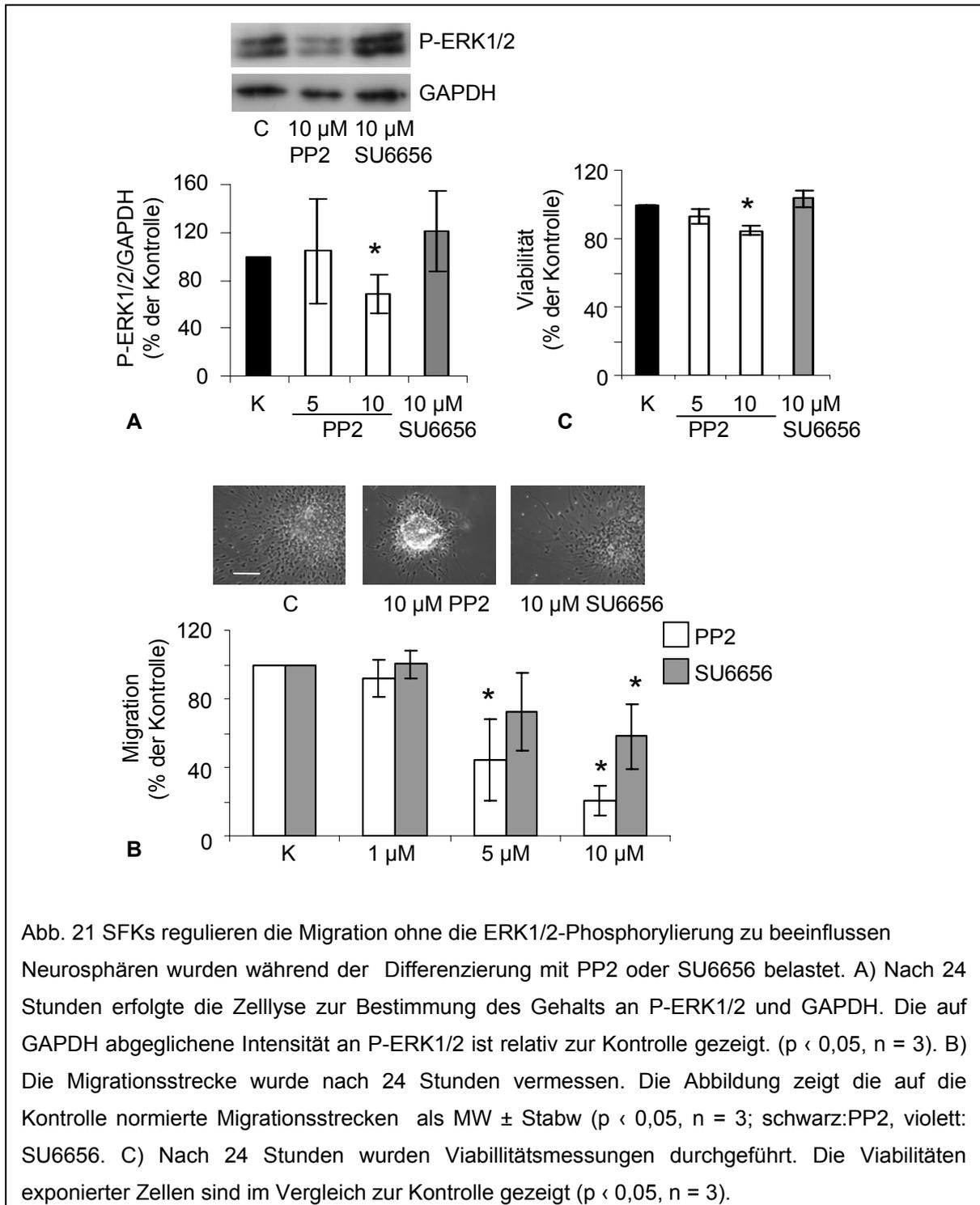
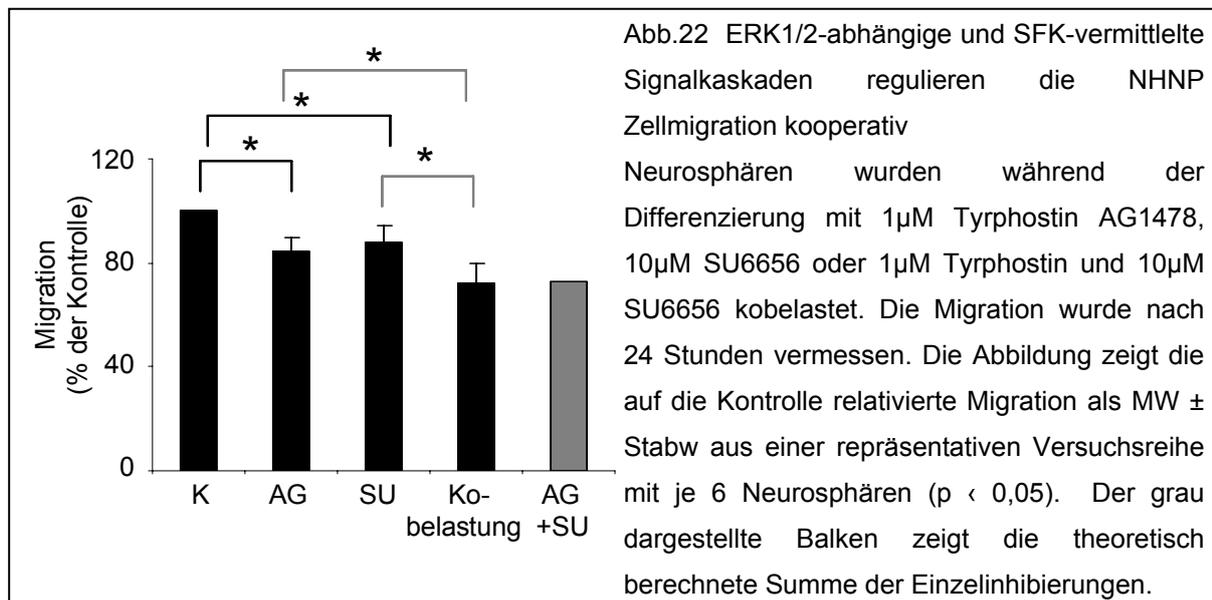


Abb. 21 SFKs regulieren die Migration ohne die ERK1/2-Phosphorylierung zu beeinflussen
Neurosphären wurden während der Differenzierung mit PP2 oder SU6656 belastet. A) Nach 24 Stunden erfolgte die Zellyse zur Bestimmung des Gehalts an P-ERK1/2 und GAPDH. Die auf GAPDH abgeglichene Intensität an P-ERK1/2 ist relativ zur Kontrolle gezeigt. ($p < 0,05$, $n = 3$). B) Die Migrationsstrecke wurde nach 24 Stunden vermessen. Die Abbildung zeigt die auf die Kontrolle normierte Migrationsstrecken als $MW \pm$ Stabw ($p < 0,05$, $n = 3$; schwarz:PP2, violett: SU6656. C) Nach 24 Stunden wurden Viabilitätsmessungen durchgeführt. Die Viabilitäten exponierter Zellen sind im Vergleich zur Kontrolle gezeigt ($p < 0,05$, $n = 3$).

Zur weiteren Charakterisierung der Bedeutung der analysierten Signalkaskaden für die NHNP Zellmigration wurden Kobelastungen mit Tyrphostin AG1478 und SU6656 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Eine Kobelastung mit beiden Inhibitoren reduzierte die Migration um $28 \pm 7\%$, was der Summe der Einzelbelastungen entsprach (28% versus 27%). Eine Kobelastung führte zu einer signifikant erhöhten Migrationsinhibierung im Vergleich zu den Einzelbelastungen, so dass ERK1/2-unabhängige und ERK1/2-abhängige Signalkaskaden kooperativ interagieren.

Es ist zu beachten, dass die Reduktion der Migrationsstrecke in den Versuchen zur Kobelastung nach Tyrphostin AG1478- oder SU6656-Exposition (Abb.22) schwächer waren als die vorher gezeigten Ergebnisse (Abb.20, 21). Dies liegt vermutlich an der Verwendung von NHNP Zellisolaten aus einem anderen Individuum jüngeren Alters (Zellisolation aus der 12.GW im Gegensatz zur 18.GW). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Einflüsse von Chemikalien auf die Migration humaner Progenitorzellen altersunabhängig sind.



Um die beteiligten Signalwege der NHNP Zellmigration durch eine unabhängige Methode zu validieren, wurde versucht, die Zellen mit spezifischen siRNAs zu transfizieren. Dazu wurden siRNAs gegen die Genprodukte für die MAP Kinasen (ERK1 und 2) und die SFKs (YES, FYN, CSK) eingesetzt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt. Lediglich für die Gene

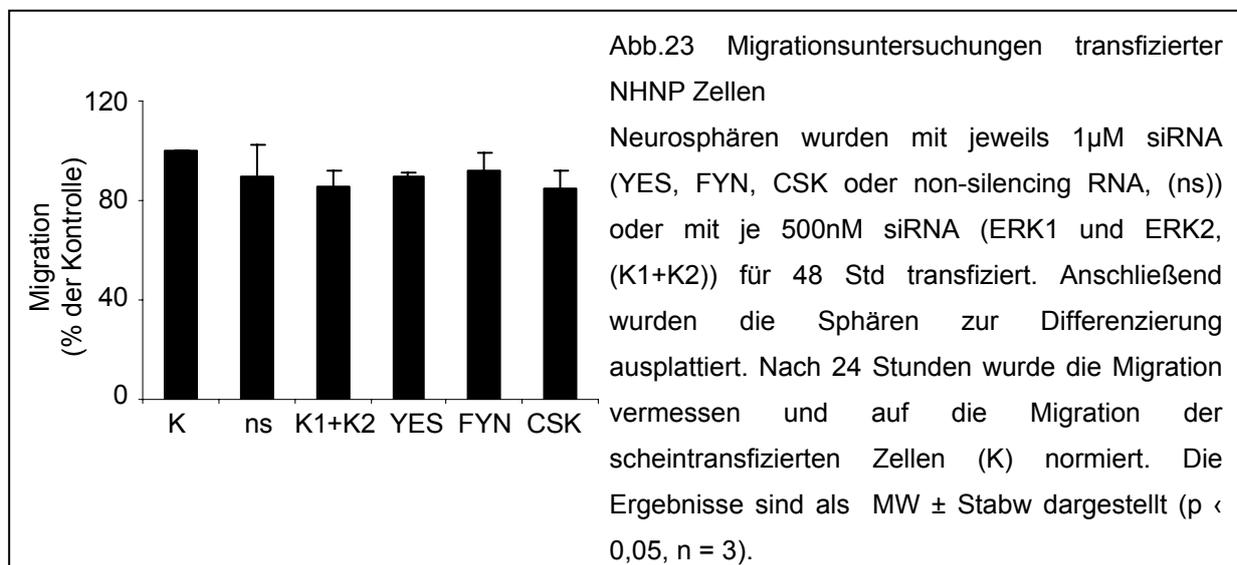
3 Ergebnisse

ERK1/2 und YES konnte in RT-PCR Analysen eine Reduktion der Transkriptmenge im Vergleich zur *non-silencing* behandelten Probe gefunden werden. Ein Einfluss auf die Migration konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb.23). Die negativen Befunde dürften eher methodisch begründet sein aufgrund mangelnder Transfektionseffizienz in einer dreidimensionalen Zellkultur.

Tab.4 Knock-down-Effizienz nach siRNA-Transfektion

Neurosphären wurden mit jeweils 1µM siRNA über 48 Std transfiziert. Für eine Repression der ERK1/2-Expression wurden NHNP Zellen mit je 500nM siRNA kotransfiziert. Anhand von Real Time PCR-Analysen wurde die Absolutmenge an Transkripten ermittelt und auf die Schein-Kontrolle (Behandlung mit Transfektionsreagenz) normiert. Die obere Zeile gibt die Transkriptmenge nach Transfektion mit einer *non-silencing* RNA an. Zeile 2 zeigt den Gehalt an Transkripten nach siRNA-Transfektion. Die Werte sind als MW ± SEM aus zwei Versuchen gezeigt.

	ERK1	ERK2	YES	FYN	CSK
<i>non-silencing</i> RNA	101,5 ± 9%	91 ± 9%	103 ± 28%	95 ± 4%	87 ± 2%
siRNA	71 ± 15%	58 ± 18%	48 ± 9%	151 ± 21%	87 ± 21%



Als nächstes wurde untersucht, ob die die Migration regulierenden Kinasen auch die Differenzierung von NHNP Zellen beeinflussen. Dazu wurden die Zellen mit den Substanzen belastet, die als migrationsmodulierend identifiziert wurden. Anschließend wurde das Astrozyten/Neuronenverhältnis immunzytochemisch

bestimmt. Keiner der untersuchten Stoffe (PD98059, Tyrphostin, Bisl, EtOH, PMA oder PP2 und SU6656) veränderte die NHNP Zelldifferenzierung (Tab.5).

Tab.5 Die Differenzierung von Astrozyten und Neuronen wird durch migrationsmodulierende Substanzen nicht beeinflusst.

Neurosphären wurden während der Differenzierung mit PD98059, Tyrphostin AG1478 oder den SFK-Inhibitoren PP2 und SU6656 in den angegebenen Konzentrationen exponiert. Für eine Belastung mit EtOH oder PMA wurden NHNP Zellen zunächst synchronisiert. Nach 30 minütiger Exposition wurden die Sphären ausplattiert. Das Verhältnis von Astrozyten und Neuronen wurde nach 48 Stunden Differenzierungszeit bestimmt. Die Tabelle gibt den Anteil an Astrozyten und Neuronen im Vergleich zur Kontrolle als MW ± Stabw von drei unabhängigen Versuchen an.

	PD98059 10µM	Tyrphostin 10µM	EtOH 200mM	PMA 100nM	PP2 5µM	SU6656 10µM
Astrozyten (% der Kontrolle)	96±5	97±2	97±9	105±3	98±2	96±7
Neurone (% der Kontrolle)	133±41	128±20	111±37	76±15	131±33	139±72

3.4 Interindividuelle Unterschiede verschiedener NHNP Zellisolate

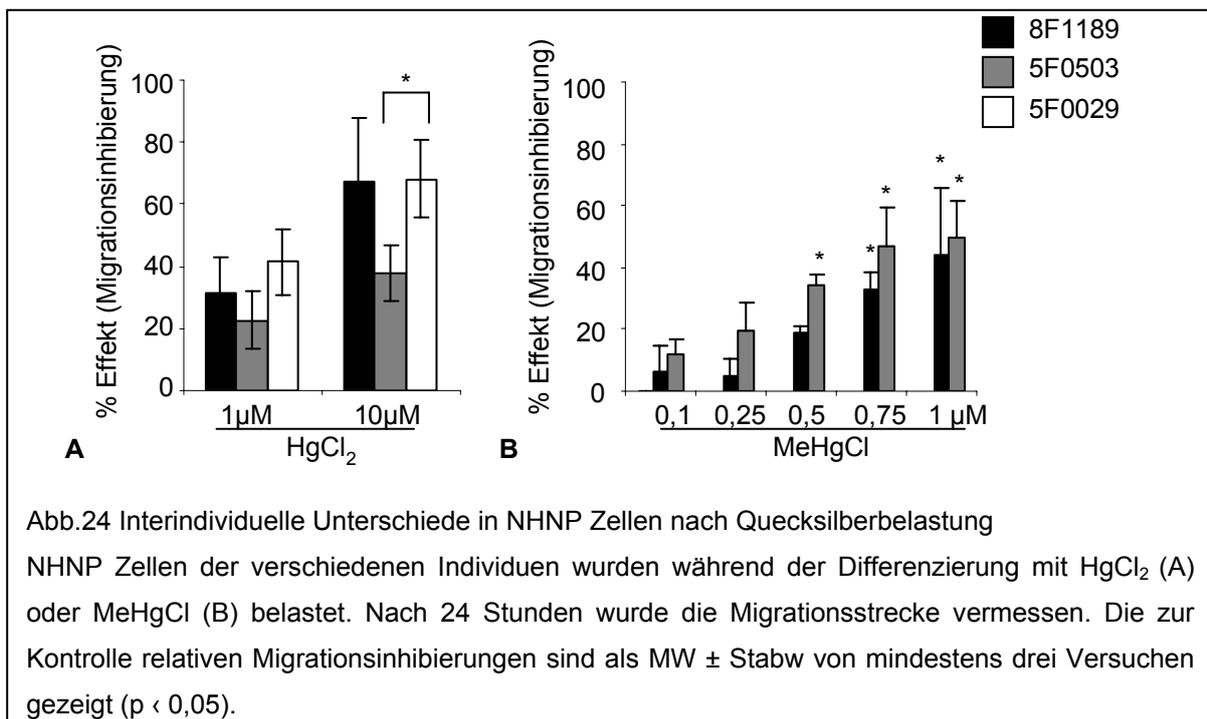
Alle bisherigen Daten wurden – wenn nicht anders vermerkt – mit NHNP Zellen eines Individuums (Individuum 8F1189) gewonnen. Um mögliche Variationen zwischen unterschiedlichen Isolaten und Individuen zu testen, wurden ausgewählte Versuche mit Zellen anderer Individuen wiederholt. Tab.6 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen Zellisolate, in der Alters- und Geschlechtsangaben zuzüglich zu Migrations- und Differenzierungseigenschaften aufgelistet sind. Für die Untersuchungen zu interindividuellen Unterschieden wurden NHNP Zellen von drei Individuen verwendet, die sich sowohl im Alter als auch im Geschlecht unterschieden.

3 Ergebnisse

Tab.6 Zusammenstellung verwendeter NHNP Zellen

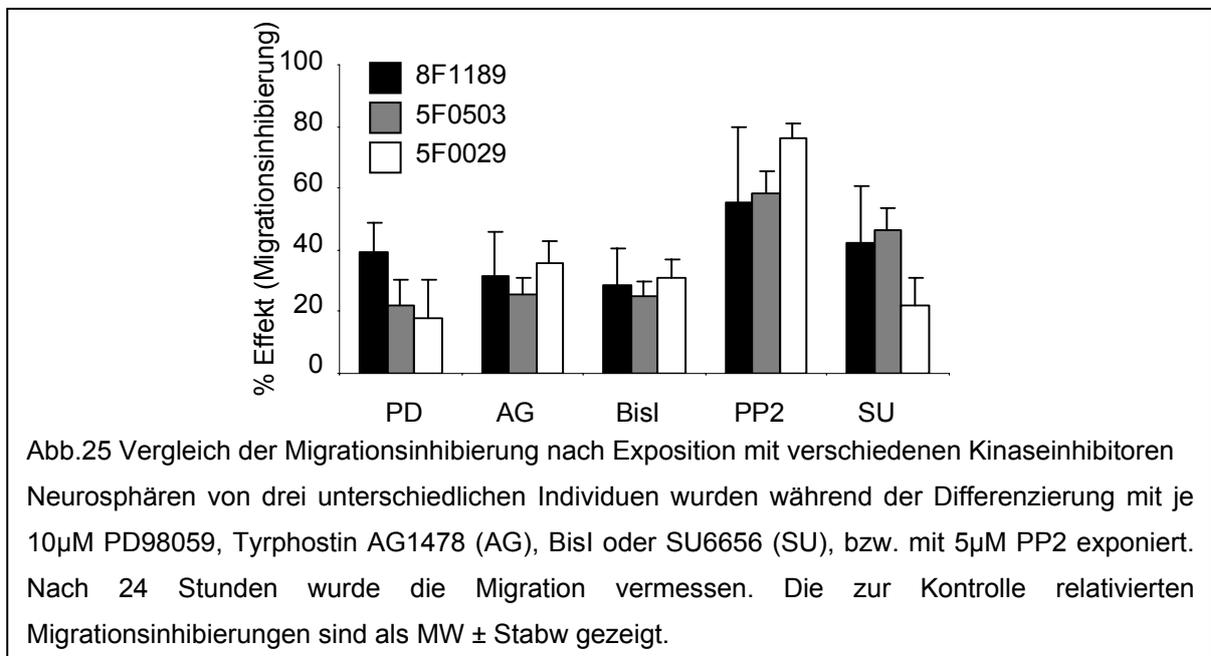
	8F1189	5F0503	5F0029
Alter	19.GW	16.GW	16.GW
Geschlecht	Männlich	Männlich	Weiblich
Durchschnittliche Migrationsstrecke nach 24 Stunden	0,49 ± 0,02mm	0,5 ± 0,09mm	0,42 ± 0,12mm
Durchschnittliches Astrozyten/Neuronenverhältnis	14 ± 6 %	10 ± 4%	20 ± 10%

Zunächst wurden die NHNP Zellen unterschiedlicher Donatoren gegenüber anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen exponiert. Bei HgCl_2 trat nur nach Belastung mit $10\mu\text{M}$ HgCl_2 ein signifikanter Unterschied in der Effektstärke zwischen den unterschiedlichen Donatoren auf (Abb.24A).



Eine Exposition gegenüber MeHgCl zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Migrationsreduktion. Zellen des jüngeren Individuums zeigten jedoch bereits ab einer Konzentration von 500nM MeHgCl eine signifikante Migrationsstörung, die bei Zellen des älteren Individuums erst bei 750nM MeHgCl auftrat (Abb.24B).

Zum Schluss wurden NHNP Zellen der unterschiedlichen Individuen mit den migrationsmodulierenden Inhibitoren belastet, um die Validität der gefundenen Regulationsmechanismen der NHNP Zellmigration zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Inhibitorversuche zeigten in allen NHNP-Zellisolaten ähnliche Effektstärken auf die Migration, die daraufhin deuten, dass in allen Individuen ähnliche Signalkaskaden an der Migrationsregulation unabhängig vom Alter beteiligt sind. Dies belegt die Validität der gewonnenen Daten und unterstreicht die Anwendung von NHNP Zellen als *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung von ENT.



4 Diskussion

Während der prä- und postnatalen Entwicklung bildet sich das Gehirn durch ein komplexes Zusammenspiel diverser Prozesse. Eine Störung solcher Prozesse kann zu pathologischen Veränderungen des sich entwickelnden Gehirns führen, die nachhaltig die Funktion des Nervensystems beeinflussen. Heute sind viele umweltrelevante Noxen bekannt, die mit fundamentalen Prozessen der Gehirnentwicklung interferieren und so die neurale Entwicklung stören. Um nachfolgende Generationen vor solchen Einflüssen zu schützen, werden im Rahmen der europäischen Chemikalienverordnung REACH ENT-Studien für Chemikalien mit teratogenen oder endokrinen Eigenschaften empfohlen. Bis heute existieren jedoch keine validierten *in vitro* Testsysteme, die eine Durchführung solcher Studien ermöglichen. Aus diesem Grund besteht ein weltweites Bestreben, alternative Modellsysteme zu kosten- und zeitaufwendigen Tierversuchen zu finden.

In dieser Arbeit wurden NHNP Zellen als *in vitro* Modellsystem etabliert und auf ihre Anwendung als alternatives Testmodell für ENT überprüft. Dazu wurde auf die folgenden Themen eingegangen:

1. Charakterisierung von NHNP Zellen als Modell zur Untersuchung von ENT
2. Etablierung entwicklungsneurotoxisch relevanter Endpunkte in NHNP Zellen
3. Analyse von Signalkaskaden, die an der NHNP Zellmigration beteiligt sind

Die gewonnenen Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Brauchbarkeit von NHNP Zellen als entwicklungsneurotoxikologisches Modellsystem abzuschätzen.

4.1 Charakterisierung von NHNP Zellen

Zunächst wurde untersucht, inwieweit NHNP Zellen in ihrer Komposition Neurosphären bzw. dem sich entwickelnden Gehirn entsprechen. Dazu wurden RT-PCR-, MA- und Western Blot Analysen durchgeführt.

Diese haben gezeigt, dass neurale Marker, wie GFAP, β (III)Tubulin oder Synapsin 1, parallel zu Nestin, einem charakteristischen Filamentprotein neuraler Stammzellen,

exprimiert werden (Tab. 1, Abb.3), was die Heterogenität von Neurosphären bestätigt (Piao *et al.*, 2006; Piper *et al.*, 2001). Dass Neurosphären nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell heterogene Aggregate darstellen, konnte bereits für humane Sphären aus einem jüngeren Fetus (12. Gestationswoche) beschrieben werden (Bez *et al.*, 2003). Die Koexpression von Markern für Gliazellen und neuronale Subpopulationen konnte auch in anderen Isolaten humaner fetaler neuraler Zellen gezeigt werden, die nicht in Form von Neurosphären kultiviert wurden (Piper *et al.*, 2000; Svendsen *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass die Heterogenität der NHNP Neurosphären nicht auf Präparationsartefakte zurückgeht, sondern auf der Heterogenität des sich entwickelnden Gehirns basiert.

Da unreife Progenitorzellen die Zellpopulation darstellen, deren Differenzierung durch exogene Noxen beeinflusst werden kann, ist die Anwesenheit Nestin⁺-Zellen für die Etablierung von NHNP Zellen als *in vitro* Modell zur ENT-Testung besonders wichtig. Der Vorteil eines menschlichen *in vitro* Systems zur Risikobewertung wird durch einen Vergleich mit Rattenprogenitorzellen deutlich, in denen keine parallele Expression von Gliazellmarkern und Nestin gezeigt werden konnte (Kalyani *et al.*, 1998; Mayer-Proschel *et al.*, 1997), was interspeziäre Unterschiede zwischen Nagetier- und menschlichen Progenitorzellen hervorhebt.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NHNP Zellen eine Vielzahl an neurospezifischen Markern exprimieren: Es konnten neurotransmitter-synthetisierende Enzyme, wie die Cholinacetyltransferase (ChAT), die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD), die Dopa-Decarboxylase und auch die Tryptophanhydroxylase 1 (TPH-1) nachgewiesen werden, die auf eine Synthese der Neurotransmitter Acetylcholin, GABA, Dopamin und Serotonin hindeuten. Auch die Expression verschiedener neuronaler Rezeptoren konnte detektiert werden, die auf die Präsenz von NMDA-, GABA-, dopamin- und acetylcholinergem Neurone hindeuten (Tab.1). Eine Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen in unterschiedliche neuronale Subpopulationen konnte auch in diversen menschlichen und Rattenzellisolaten nachgewiesen werden (Horiguchi *et al.*, 2004; Kalyani *et al.* 1998; Piper *et al.* 2001; Sun *et al.*, 2005).

Da verschiedene Noxen spezifisch auf bestimmte Neuronenpopulationen wirken, ist die Existenz verschiedener Neuronenpopulationen in NHNP Zellen von besonderer Bedeutung für die Anwendung als entwicklungsneurotoxikologisches Modell. So wird das acetylcholinerge-System durch verschiedene Organophosphate gestört, indem

der Abbau des Transmitters durch die Cholinesterase gehemmt wird. Dies resultiert in einer ständigen Erregung cholinergischer Synapsen. Bekannte Beispiele solcher Noxen sind Insektizide, wie Parathion, aber auch chemische Kampfstoffe wie Sarin und Tabun.

Die gleichzeitige Expression von Nestin, GFAP, O4 und verschiedenen neuronalen Rezeptoren zeigt, dass NHNP Zellen eine Mischkultur aus unreifen Progenitor-, Glia- und neuronalen Zellen sind. Auch im sich entwickelnden Gehirn sind diese Zelltypen durch eine Überlappung der einzelnen Reifungsprozesse koexistent (Andersen, 2003; Rice and Barone, 2000), was die physiologische Nähe des NHNP Zellmodells zur *in vivo* Situation unterstreicht.

4.1.1 Expressionsanalyse von proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen

Um Prozesse der NHNP Zelldifferenzierung näher charakterisieren zu können, wurden Genexpressionsprofile proliferierender und differenzierender NHNP Zellen mittels Microarrayanalysen erstellt. Vergleichende Untersuchungen zeigten, dass nach Beginn der Differenzierung insgesamt 109 Gene differentiell exprimiert wurden. Diese beinhalten neben Genprodukten, die in der Zelladhäsion, Migration und Neurogenese involviert sind, auch Transkripte, die an der Regulation der Transkription, Translation und des Zellzyklusses beteiligt sind (Tab.2).

In der funktionellen Gruppe „Transkription/Translation“ fanden sich Expressionsänderungen von Genen, die für Transkriptionsfaktoren (POU3F2, MASH-1, PLU-1, PBX3,), ribosomale Proteine (RPL24, RPL36A), Translationsfaktoren (EIF1AY, EIF4G1,) und auch Chromatin-assoziierte Proteine (HDAC9, HIST1H2AC, HIST1H4C) kodieren. Die Regulation von Genen, die in die Transkriptionsmaschinerie involviert sind, war zu diesem frühen Zeitpunkt der Differenzierung zu erwarten, da sich das Programm der Zellen durch Wachstumsfaktorentzug und Angebot einer adäquaten extrazellulären Matrix zunächst von Proliferation auf Differenzierung umstellen musste. Auch in neuralen Progenitorzellen der Maus (PND 7), konnten zahlreiche Expressionsänderungen von Chromatin-assoziierten Komponenten und nukleären Faktoren während der Differenzierung beobachtet werden (Gurok *et al.*, 2004). 2D-Proteomanalysen

unterstützen die differentielle Expression von transkriptionsrelevanten Genen, da 5% der regulierten Proteine in diese Gruppe eingeordnet werden konnten (Hoffrogge *et al.*, 2006). Die *in vivo* Relevanz der differentiellen Genexpression transkriptionsrelevanter Gene konnte durch vergleichende Expressionsstudien von embryonalen (E17) mit postnatalen Maushirnen (P0) gezeigt werden. Etwa 10% der regulierten Gene wurden in die funktionelle Gruppe „Transkription“ eingeordnet (Matsuki *et al.*, 2005). Eine Übereinstimmung in den regulierten Genen dieser Studien fand sich jedoch nicht, was möglicherweise auf Spezies- und/oder Altersunterschiede der untersuchten Systeme zurückgehen kann. Nachfolgend werden nun einzelne differentiell exprimierte Genprodukte der verschiedenen Gruppen diskutiert.

Der Transkriptionsfaktor POU3F2 induziert die Transkription von Delta 1 (Castro *et al.*, 2006). Delta 1 ist ein Ligand des Oberflächenrezeptors NOTCH, der die neurale Entwicklung reguliert und für die Diversität neuraler Zellen im Gehirn verantwortlich ist (Cornell *et al.*, 2005). Eine Induktion von POU3F2 im NHNP Zelldifferenzierungsprozess deutet somit auf eine Aktivierung von NOTCH-Signalkasaden während der NHNP Zelldifferenzierung.

Auch die Expression des proneuralen bHLH-Transkriptionsfaktors MASH-1, der im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert wird, ist für die neuronale Differenzierung essentiell. Neuronale Vorläuferzellen aus MASH-1 defizienten Mäusen zeigten einen Differenzierungsarrest, so dass hauptsächlich eine Differenzierung in Gliazellen nachweisbar war. Darüber hinaus haben Expressionsanalysen gezeigt, dass die Expression neuronaler Gene, wie der Neuron-spezifischen Enolase (NSE), Peripherin und SCG10 MASH-1-abhängig ist (Lo *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1991; Sommer *et al.*, 1995).

Während der neuralen Entwicklung von Mausprogenitorzellen wurde die Expression Zellzyklus-assoziiertes Proteine differentiell reguliert (Gurok *et al.*, 2004; Matsuki *et al.*, 2005). Auch in NHNP Zellen wurde die Expression von Transkripten verändert, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind. So wurde die Expression des Wachstumsfaktors VEGF und der Asparaginsynthetase (ASNS) in differenzierenden Zellen reprimiert, was auf eine Proliferationshemmung hindeutet (Stagliano *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde die Expression der CLK1 (CDC-like Kinase) induziert und die des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors 3 (CDKN3, KAP) reprimiert. CDKN3 ist eine Phosphatase, die mit verschiedenen Cyclin-abhängigen Kinasen, wie der CDC2

oder der CDK2, interagiert (Hannon *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1993) und so an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist. Da Cyklin-abhängige Kinasen Schlüsselregulatoren in der Zellzykluskontrolle sind, deuten diese Expressionsänderungen auf eine veränderte Zellzyklusprogression differenzierender Zellen. Auch die Transkription von antiproliferativen Proteinen BTG2 (BTG family member 2) und GADD45G (growth arrest and DNA-damage-inducible) wurde verstärkt, was auf einen Wachstumsarrest differenzierender NHNP Zellen schließen lässt. Eine veränderte Expression von GADD45G konnte auch in Mausprogenitorzellen mit fortschreitendem Alter gezeigt werden (Matsuki *et al.*, 2005).

Um aus der Sphäre migrieren zu können, müssen sich die betreffenden Zellen zunächst aus dem Zellverband lösen. Deshalb wurde eine differentielle Regulation von Genen erwartet, die mit der Bildung der extrazellulären Matrix und der Zelladhäsion assoziiert sind. Die Expressionsanalysen haben ergeben, dass die Zelladhäsionsmoleküle ADAM19 und N-Cadherin (CDH2) zusätzlich zu den ECM-bildenden Proteinen Laminin α 4 und Matrilin reprimiert wurden. Dies könnte auf eine Lockerung des Zellverbands hindeuten. Auch die Expression der Oberflächenrezeptoren Integrin β 5 und CD9 wurde zusätzlich zu dem Integrin 1-bindenden Protein (IGTB1BP1) in differenzierenden Zellen reguliert, was für eine veränderte Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung spricht. PPAP2B (Phosphatidylsäurephosphatase 2) hingegen wurde in differenzierenden Zellen induziert, welches über eine RGD-Sequenz verfügt und die Zelladhäsion ebenso wie die Zellspreizung in Endothelzellen beeinflusst (Humtsoe *et al.*, 2003) und demnach ebenfalls einen Einfluss auf die Zelladhäsion und interzelluläre Verknüpfungen hat.

Auch Gene, die die Zellmigration regulieren, zeigten eine Transkriptionsänderung. So wurde die Expression von PTPRF (Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor F, LAR) reprimiert, welches in epithelialen Zellen ein Modulator der Zellmigration ist. Es konnte gezeigt werden, dass PTPRF mit Katenenin/Kadherin-Komplexen kolokalisiert und die Phosphorylierung von β -Katechin inhibiert, welches zu einer Migrationsinhibierung führt (Muller *et al.*, 1999). Prostatakrebszellen, die sich in ihrem Potential zur Metastasierung unterscheiden, zeigten ebenfalls eine unterschiedliche Expression an PTPRF, was auf eine Involvierung in der Metastasierung und somit in der Zellmotilität hindeutet (Trojan *et al.*, 2005). Im Gegensatz hierzu zeigten Tetraspanin 5 und Caldesmon 1, welche beide die Zellmigration induzieren (Manes *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2001), eine

Transkriptionserhöhung. Ebenso wurde ein Vertreter der PDGF- (Platelet-derived growth factor) Familie induziert, welche nicht nur als Mitogene agieren sondern auch zu Veränderungen der Zellmigration führen, indem sie Chemotaxis induzieren und so eine gerichtete Zellbewegung entlang eines PDGF-Gradienten stimulieren (Heldin and Westermark, 1999).

Für die Zellmigration ist die Reorganisation des Zytoskeletts essentiell (Yamazaki *et al.*, 2005), so dass die Regulation von Cytoskelett-assoziierten Proteinen wie dem Aktin-bindenden Protein Coronin1C erwartet wurde. Ein Vergleich der Expressionsdaten aus NHNP Zellen mit Maus Progenitorzellen hat gezeigt, dass Coronin1C nicht nur in NHNP Zellen, sondern auch in Progenitorzellen der Maus mit zunehmender Differenzierungszeit induziert wird (Gurok *et al.*, 2004). Auch die Vertreter der PDGF-Familie induzieren eine Reorganisation des Zytoskeletts (Heldin and Westermark, 1999).

Die Expressionsanalysen haben ebenfalls gezeigt, dass insgesamt sechs Transkripte differentiell reguliert wurden, die die Neurogenese regulieren. So wurden die bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren POU3F2 und MASH-1 zusätzlich zu FRZB (frizzled-related protein) induziert, welches als Antagonist der wingless (wnt)-Signalkaskaden einen Einfluss auf die neurale Entwicklung hat (Jones *et al.*, 2002). Da eine Aktivierung von wnt die Selbsterneuerung von Stammzellen induziert und wnt-Proteine als Wachstumsfaktoren agieren (Reya, 2003; Willert *et al.*, 2003), könnte die Sekretion von FRZB den Austritt aus dem Zellzyklus ermöglichen und demnach die Differenzierung induzieren. Auch in der humanen Stammzelllinie K048 wurde die Expression von FRZB mit zunehmender Differenzierung reguliert, wobei die Expression nach 4-5 Tagen Differenzierung anstieg (Cai *et al.*, 2006).

Die funktionelle Gliederung zeigte auch eine Expressionsänderung von neuronalen Markern: Während die Myelin-assoziierten Proteine OMG (oligodendrocyte myelin glycoprotein) und PMP2 (peripheral myelin protein 2) eine Transkriptionsinduktion zeigten, die auf eine Reifung der Oligodendrozytenprogenitorzellen hindeuten, zeigten die neuronalen Proteine ENO2 (neuronal enolase 2) und NEF3 (neurofilament 3), eine Transkriptionsrepression. Auch die Expression von GFAP zeigte eine verringerte Transkription in differenzierenden Zellen. Da die Expression dieser Gene bereits in proliferierenden NHNP Zellen detektierbar ist, ist es möglich, dass die Transkription im Rahmen der Umstellung von Proliferation auf Differenzierung zunächst eingestellt wird und erst zu späteren Zeitpunkten der

Differenzierung wieder ansteigt. Dies müsste im Rahmen einer Differenzierungskinetik überprüft werden. Ebenso ist es denkbar, dass die genannten Markergene zu Gunsten der Oligodendrozytenpopulation reprimiert werden.

Es traten keine Expressionsänderungen von Genen auf, die mit der Apoptose in Verbindung stehen. Dies entspricht altersgemäßen Stadien der Hirnentwicklung (18. Schwangerschaftswoche), in denen Apoptose wohl noch keine Rolle spielt (Andersen, 2003, Abb.I.1). Transkripte, die mit detoxifizierenden und protektiven Mechanismen gegen oxidativen Stress assoziiert sind, wurden jedoch differentiell exprimiert. Die Expression der Gluthation-S-Transferase $\Omega 1$ (GSTO1), Peroxiredoxin 4 und der Chinonreduktase 2 (NQO2) wurde durch den Differenzierungsstimulus verringert. Dies deutet daraufhin, dass differenzierende NHNP Zellen eine verringerte Detoxifizierungskapazität sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativen Stress aufweisen als proliferierende Zellen. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse nach Exposition gegenüber Staurosporin und TCHQ bestärkt, die eine erhöhte Zytotoxizität in differenzierenden Zellen belegen.

4.1.2 Reifung von NHNP Zellen

Die Reifung von NHNP Zellen wurde anhand von immunzytochemischen und Western Blot Analysen untersucht. Dazu wurden die Sphären über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen unter differenzierenden Bedingungen kultiviert.

Western Blot Analysen zeigten, dass die Expression von Synapsin 1 und der Dopa-Decarboxylase in differenzierenden Zellen über die Zeit von 4 Wochen zunahm (Abb.3). Dies kann auf einer zunehmenden Reifung neuronaler Zellen oder auf einer vermehrten Differenzierung von Progenitorzellen zu Neuronen basieren.

Auch eine Zunahme an Nestin konnte detektiert werden, was auf eine Proliferation der Progenitorzellen hindeutet. Die Stimulation der Proliferation könnte auf eine auto- oder parakrine Produktion stimulierender Faktoren, wie EGF oder PDGF zurückzuführen sein. MA-Analysen unterstützen diese Hypothese, da eine Expressionsinduktion von PDGFD in differenzierenden Zellen gefunden wurde (Tab.2). PDGFD kann sowohl als Mitogen als auch als Migrations-stimulierendes Protein agieren (Heldin and Westermark, 1999). Ob es die Proliferation oder die Zellmotilität stimuliert, hängt vermutlich vom Differenzierungsstatus der Zellen ab.

In den immunzytochemischen Analysen wurde die Reifung von NHNP Zellkulturen anhand der Sphärenmorphologie und der neuralen Zellpopulationen innerhalb der Migrationsfläche bewertet.

In den Analysen zeigte sich, dass der Sphärenkern auch nach 4 Wochen Differenzierung detektierbar ist (Abb.4). Dies bedeutet, dass nicht alle NHNP Zellen aus der Sphäre migrierten und differenzierten. Diese Beobachtung wird durch die Expression von Nestin in den Langzeitkulturen bestätigt (Abb.3).

Es ist möglich, dass manche Nestin⁺-Zellen nicht ohne die Zugabe von entwicklungsstimulierenden Substanzen differenzieren. *In vivo* werden unter anderem noggin, BMP oder chordin sezerniert, um die neurale Differenzierung zu induzieren (Kennea and Mehmet, 2002).

Ebenso ist es denkbar, dass nicht alle NHNP Zellen migrierten und differenzierten, da - aufgrund der dreidimensionalen Struktur einer Sphäre - nicht alle enthaltenen Zellen Kontakt zur extrazellulären Matrix hatten. Dass die extrazelluläre Matrix einen entscheidenden Faktor bei der Migration und Differenzierung von humanen neuralen Progenitorzellen darstellt, konnte durch entsprechende Analysen auf unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen gezeigt werden: Humane neurale Progenitorzellen zeigten keine Migration oder Differenzierung auf Fibronectin oder Poly-L-Ornithin beschichteten Flächen. Erst der Kontakt mit Laminin resultierte in einer detektierbaren Migration, was vermutlich auf einer Aktivierung von Oberflächenmolekülen durch die extrazelluläre Matrix (ECM) beruhte (Flanagan *et al.*, 2006). Bei Zellen, die keinen Kontakt zur ECM hatten, fehlte diese Aktivierung und führte so zu einem Ausbleiben der Differenzierung. Dieser Aspekt wird zusätzlich durch Ergebnisse mit dissoziierten humanen Progenitorzellen unterstützt, in welchen keine Nestinexpression mehr in immunzytochemischen Analysen nachgewiesen werden konnte nach einer Differenzierungszeit von nur 5 Tagen (Piper *et al.*, 2001).

Da die MA-Analysen eine Transkriptionsinduktion des Transkriptionsfaktors POU3F2 während der Differenzierung ergeben haben (Tab.2), der für die Expression von Delta 1 notwendig ist, könnte auch die Sezernierung dieses Proteins für eine Differenzierungsinhibierung benachbarter Zellen verantwortlich sein. Delta 1 wird von differenzierenden Zellen sezerniert und bindet an den Oberflächenrezeptor NOTCH benachbarter Zellen, was einen Differenzierungsarrest in diesen Zellen induzieren kann (Cornell and Eisen, 2005).

Obwohl der Nestin-Proteingehalt reifender Zellen über die Zeit zunahm (Abb.3), sprechen die folgenden Befunde für eine „Reifung“ des Zellsystems:

NHNP Zellen scheinen mit zunehmender Differenzierungszeit ein immer dichter werdendes neuronales Netzwerk auszubilden. Dies ist an der zunehmenden Zellzahl β (III)Tubulin⁺-Zellen über die Zeit zu erkennen, die Verknüpfungen untereinander zu bilden scheinen (Abb.4). Da eine Vernetzung der Neurone über die Ausbildung von Synapsen entsteht, spricht auch die zunehmende Synapsin 1 Expression (Abb.3) für die Entstehung eines neuronalen Netzwerks durch eine vermehrte Synapsenbildung.

4.2 Endpunkte zur Untersuchung von ENT

Um spezifische Endpunkte zur Detektion von ENT zu etablieren, wurden die Effekte bekannter Neurotoxine auf die Entwicklung von NHNP Zellen in subtoxischen Dosen untersucht.

Eine Exposition gegenüber den Modellsubstanzen Staurosporin oder TCHQ resultierte in einem Verlust der Zellviabilität, welcher in differenzierenden Zellen ausgeprägter war nach Staurosporin- und TCHQ-Belastung (Abb.5;7). Auch während der normalen Gehirnentwicklung gibt es zusätzlich zu regionalen Sensitivitätsunterschieden zeitlich abgegrenzte Perioden, die sich in der Empfindlichkeit gegenüber toxischen Einflüssen unterscheiden, da biologische Prozesse, wie Proliferation, Migration und Differenzierung zu unterschiedlichen Zeitfenstern in unterschiedlichen Arealen des Gehirns stattfinden (Rice and Barone, 2000). Die unterschiedliche Sensitivität von proliferierenden versus differenzierenden NHNP Zellen spiegelt diese Situation *in vitro* wieder.

Ein Unterschied zwischen proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen konnte auch in Bezug auf die Apoptoseinduktion nach TCHQ-Exposition festgestellt werden, wo nur in proliferierenden Neurosphären eine signifikante Induktion der Caspasenaktivität festgestellt werden konnte. Da der *DAPI-Exclusionstest* jedoch auch in differenzierenden Neurosphären geschädigte Zellen aufwies (Abb.7C), scheint TCHQ nach 24 stündiger Belastung zu nekrotischen Zellveränderungen in differenzierenden Zellen zu führen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Caspasenaktivierung nach TCHQ früher auftrat. Dafür spricht die Beobachtung in Jurkat Zellen, in denen eine TCHQ-Belastung bereits nach 10 Stunden Apoptose induziert (Wispriyono *et al.*, 2002).

Eine Belastung mit Staurosporin hingegen führte zu einer Caspasenaktivierung in differenzierenden NHNP Zellen (Abb.6). Dieser Unterschied geht vermutlich auf unterschiedliche Wirkmechanismen dieser beiden Modellsusstanzen zurück. Staurosporin inhibiert die Protein Kinase C (Tamaoki *et al.*, 1986) und führt durch die Freisetzung von Cytochrom C zu einer Aktivierung von APAF-1 und dadurch zu einer Aktivierung der Effektorcaspase 3 (Slee *et al.*, 2000). TCHQ hingegen erzeugt oxidativen Stress durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch Redoxreaktionen in der Zelle (Carstens *et al.*, 1990), was in verschiedenen Zelltypen, wie z. B. HepG2, zu einer Induktion der Apoptose führt (Wang *et al.*, 2001).

Mit den Substanzen Staurosporin und TCHQ konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Viabilitäts- und Apoptosemessungen in Kombination gemessen werden können (Abb.6,7). Dies ermöglicht die Aussage, ob ein zytotoxischer Effekt zur Apoptose oder Nekrose führt, was die Ergebnisse nach Staurosporin- und TCHQ-Exposition verdeutlichen: Während Staurosporin zu einer Caspasenaktivierung parallel zu einer reduzierten Zellviabilität führte, trat nach TCHQ-Belastung eine verringerte Viabilität ohne Caspasenaktivierung auf. Dies belegt, dass die Toxizität von Staurosporin auf eine Apoptoseinduktion zurück ging und die TCHQ-Toxizität mit nekrotischen Vorgängen korreliert war.

4.2.1 Retinolsäure, cAMP, Quecksilber und Blei modulieren die NHNP Zelldifferenzierung

Als spezifischen Endpunkt für ENT wurden Differenzierungsanalysen in NHNP Neurosphären etabliert, da die Differenzierung der Progenitorzellen in die neuronalen Populationen ein essentieller Prozess für eine normale Gehirnentwicklung ist.

Zunächst wurde die Plastizität von NHNP Zellen untersucht, indem diese mit folgenden Substanzen belastet wurden, die erwiesenermaßen zur Modulation der Differenzierung neuronaler Zellen führen:

Eine Exposition von NHNP Zellen gegenüber atRA verschob die Differenzierung von NHNP Zellen zugunsten der Neurone (Abb.8). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in embryonalen Stammzellen, PC12 oder Neuroblastomzellen gemacht, in denen atRA ebenfalls die Differenzierung in neuronale Zellen induziert (Guan *et al.*, 2001).

Auch eine Belastung von NHNP Zellen mit cAMP verschob das Neuronen/Astrozytenverhältnis zugunsten der Neuronenpopulation. Die

stimulierende Wirkung von cAMP konnte auch in menschlichen mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks gezeigt werden, in denen cAMP die neuronale Differenzierung stimuliert (Chen *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2001b).

Somit konnte die Differenzierung von NHNP Zellen in Astrozyten und Neurone durch die Zugabe exogener Substanzen beeinflusst werden, wobei die Ergebnisse Befunden aus anderen Zellsystemen entsprechen.

Wurden die Zellen mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen organischem oder anorganischem Quecksilber belastet, konnte ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden, da sich das Astrozyten/Neuronenverhältnis zugunsten der Astrozytenpopulation verschob (Abb.9A,B). Eine Gliose des Gehirns nach Quecksilberexposition wurde bereits in *in vivo* Befunden gezeigt (Castoldi *et al.*, 2001). Die zugrunde liegenden Mechanismen, die zu solchen Effekten führen, sind jedoch weitgehend unbekannt.

Zusätzlich fanden wir, dass MeHgCl bei niedrigeren Konzentrationen Effekte auf die NHNP-Zelldifferenzierung zeigte als HgCl₂. MeHgCl resultierte bereits ab einer Konzentration von 750nM MeHgCl in einer signifikanten Reduktion der Neuronenzahl auf 23%, während dies bei HgCl₂ erst ab einer Konzentration von 4µM HgCl₂ auftrat (Abb.9). Ähnliche Ergebnisse konnten in fetalen Zellaggregaten des Rattentelencephalons erzielt werden, wo MeHgCl eine höhere Toxizität in differenzierenden Zellaggregaten aufwies als HgCl₂ (Monnet-Tschudi *et al.*, 1996). Viabilitätstests haben zusätzlich gezeigt, dass MeHgCl eine höhere Toxizität aufweist als HgCl₂. Während die Viabilität von NHNP Zellen bei einer Konzentration von 10µM MeHgCl signifikant reduziert war, fanden sich zytotoxische Effekte von HgCl₂ erst ab einer Konzentration von 100µM (Abb.9C,D). Die höhere Toxizität der organischen Quecksilberverbindung könnte aufgrund der lipophilen Eigenschaft auf eine bessere Penetration durch die Zellmembran und somit auf eine erhöhte intrazelluläre Akkumulation zurückgehen.

Nach einer Exposition gegenüber Blei konnte eine verringerte Anzahl an O4⁺-Oligodendrozyten pro Sphäre detektiert werden (Abb.10). Auch in Tierversuchen rief Blei Störungen der Oligodendrozytenentwicklung hervor. Es wurden Reifungsstörungen in Oligodendrozytenvorläuferzellen der Ratte (Deng *et al.*, 2001a) und Hypomyelinisierungen beobachtet (Verity, 1990). Ob Blei auch in NHNP Zellen

die Entwicklung von Oligodendrozyten verlangsamt, könnte durch Expressionsanalysen spezifischer Marker von verschiedenen Oligodendrozytenvorläuferstadien, wie GD3, GALC und PLP genauer determiniert werden (Baumann *et al.*, 2001).

Da eine Wirkung bestimmter Noxen nur in bestimmten Perioden der Gehirnentwicklung auftritt, könnte der geringe Effekt von Blei auch auf das Alter des Fetus zurückzuführen sein (Rice and Barone, 2000).

4.2.2 Quecksilber und Ethanol inhibieren die NHNP Zellmigration

Neben der Differenzierung wurde die NHNP Zellmigration als weiterer entwicklungsneurotoxisch-spezifischer Endpunkt untersucht.

Eine Exposition gegenüber MeHgCl und HgCl₂ reduzierte die Zellmigration signifikant. Hierbei konnte mit den verwendeten NHNP Zellisolaten ein LOAEL von 750nM MeHgCl und 1µM HgCl₂ festgestellt werden (Abb.13). Die Migration scheint ein weitaus empfindlicher Endpunkt für Quecksilbertoxizität zu sein als die Zellviabilität, da für MeHgCl eine 13-fach und für HgCl₂ eine 25-fach höhere Konzentration eingesetzt werden musste, um adverse Effekte zu erzielen. Dass die entwicklungsneurotoxische Wirkung von Quecksilberverbindungen auch auf eine gestörte Zellmigration zurückzuführen ist, wurde bereits *in vivo* bei Nagetieren und Menschen gezeigt. In neuropathologischen Untersuchungen wurden Mikrozephalien und Desorganisationen im Cortex beobachtet, die neben einer gestörten Zellteilung und Zelldegenerationen auch auf Migrationsstörungen zurückgehen (Clarkson, 2002; Nordberg *et al.*, 1985; Sanfeliu *et al.*, 2003).

Eine weitere Noxe, die zumindest einen Teil ihres entwicklungsneurotoxischen Potentials durch eine Hemmung der Migration verursacht, ist Ethanol (Guerri, 1998; Jones, 1975). Eine Exposition von NHNP Zellen gegenüber EtOH führte ebenso wie Quecksilber zu einer signifikanten, aber nur marginalen Migrationsinhibierung (Abb.14). Dieser nur geringe Einfluss von Ethanol auf die NHNP Zellmigration könnte auf die ausgewählte Oberflächenbeschichtung zurückzuführen sein, da die Sensitivität von Zellen gegenüber EtOH hauptsächlich durch das Oberflächenmolekül L1 vermittelt wird (Bearer *et al.*, 1999; Ramanathan *et al.*, 1996). NHNP Zellen wurden jedoch auf einer PDL/Laminin-Beschichtung ausdifferenziert, was zu einer

Verminderung der Responsivität gegenüber EtOH geführt haben kann. Zusätzlich ist beschrieben, dass nicht alle Gehirnregionen die gleiche Empfindlichkeit gegenüber EtOH zeigen. So sind neurotoxische Effekte auf die Hirnareale des Neokortex, des Cerebellums und des Hippocampus mit neurophysiologischen Störungen assoziiert (Guerri, 2002). Da NHNP Neurosphären jedoch Aggregate aus Kompletthirnhomogenaten darstellen, könnte eine Mischpopulation aus Zellen verschiedener Hirnareale die erwartete Migrationsinhibierung abschwächen.

Die beschriebenen Einflüsse von Quecksilber, Blei und EtOH auf die Zelldifferenzierung und Migration zeigen, dass das NHNP Zellmodell die Effekte dieser Noxen *in vivo* mimikriert und die Ergebnisse anderer *in vitro* Modelle reproduziert. Dies eröffnet die Möglichkeit der Anwendung von NHNP Zellen als *in vitro* Modell zur Untersuchung von ENT.

4.3 Molekulare Mechanismen der NHNP Zellmigration

Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die der Migration neuraler Progenitorzellen zu Grunde liegen, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit (Blockbild 1). Die Kenntnis solcher Mechanismen ermöglicht ein besseres Verständnis für die Wirkweise migrationsverändernder Chemikalien, was z. B. eine auf Mechanismen basierende Risikoabschätzung erleichtert.

Da aus verschiedenen Studien bekannt ist, dass die MAP Kinasen ERK1/2 an der Migration verschiedener Zellsysteme beteiligt sind (Huang *et al.*, 2004), konzentrierte sich diese Arbeit zunächst auf die Rolle dieser MAP Kinasen.

4.3.1 Die Bedeutung von ERK1/2 in der NHNP Zellmigration

Immunzytochemische Analysen ergaben, dass ERK1/2 während der NHNP Zellmigration phosphoryliert, d. h. aktiviert wird (Abb.15). Weitergehende Untersuchungen mit pharmakologischen Inhibitoren bestätigen die Beteiligung von ERK1/2 an Migrationsprozessen der neuralen Progenitorzellen (Abb.18,19,20). Die exakten Mechanismen, durch die eine ERK1/2-Aktivierung die Migration fördert, sind

nicht bekannt. Es ist möglich, dass ERK1/2 die Migration von NHNP Zellen durch eine Aktivierung von Proteinen fördern, die eine cytoplasmatische Umstrukturierung der Zellen ermöglichen, die für die Zellbewegung notwendig sind. Migrationsstudien mit Fibroblasten haben gezeigt, dass Zellen zunächst Lamellopodien und neue Adhäsionspunkte ausbilden bevor sie die bestehenden Verknüpfungen zur extrazellulären Matrix lösen und den Zellkörper mit sich ziehen (Lauffenburger *et al.*, 1996). ERK1/2 könnten die Migration promovieren, indem sie eine Reorganisation des Zytoskeletts und die Dissoziation von dem Substrat ermöglichen durch eine Interaktion mit der MLCK (myosin light chain kinase), Paxillin oder Calpain (Huang *et al.*, 2004). Die Bedeutung dieser Proteine in der Zellmigration wird im Folgenden kurz erläutert:

Die MLCK ist in dem Abbau von *focal adhesions* involviert und kann so ein Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix erleichtern (Totsukawa *et al.*, 2004). In Inhibierungsstudien konnte gezeigt werden, dass die MLCK ein Substrat für ERK1/2 darstellt, da eine Hemmung der ERK1/2-Signalkaskade zu einer Phosphorylierungsinhibierung der MLCK führte, die die Zellmigration verhinderte. Eine Expression an aktiver MEK1 resultierte jedoch in einer verstärkten MLCK-Phosphorylierung und Zellmigration in Cos-7, MCF-7 und Fibrosarcomazellen (Klemke *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1999).

Paxillin ist ein Zytoskelett-bildendes Protein, welches das Aktinskelett mit der Plasmamembran an *focal adhesions* verknüpft. Viele Zelladhäsionsmoleküle, wie Vinculin und Adhäsionskinasen (z. B. FAK) binden an Paxillin (Schaller, 2001), so dass dies ein Adapterprotein zwischen dem Zytoskelett und den *focal adhesions* darstellt. Eine Aktivierung von Paxillin durch ERK1/2 konnte in epithelialen Zellen gezeigt werden (Liu *et al.*, 2002).

Calpain ist ein proteolytisches Enzym, dass die Zellmigration reguliert (Dourdin *et al.*, 2001; Huttenlocher *et al.*, 1996). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch nicht vollends geklärt. Mutationsanalysen konnten jedoch belegen, dass die Aktivierung von Calpain für das Ablösen der Zellen vom Substrat benötigt wird (Glading *et al.*, 2004), was vermutlich auf einer Degradation von Zytoskelettproteinen basiert (Cuevas *et al.*, 2003). Eine ERK1/2-abhängige Calpainaktivierung konnte bereits in *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt werden (Glading *et al.*, 2004).

Die Bedeutung von ERK1/2 in der Zellmigration wird durch Befunde aus anderen Zellsystemen bestärkt. In Neuroblastomzellen konnte eine Abhängigkeit der NCAM-

induzierten Zellmigration von der ERK1/2-Aktivität gezeigt werden (Diestel *et al.*, 2005). Unter der Verwendung des MEK-Inhibitors U0126 konnte die Bedeutung der RAF-RAS-MEK-ERK1/2-Kaskade zusätzlich in der Migration kortikaler Mausneurone belegt werden (Segarra *et al.*, 2006). Auch die Migration von nicht-neuralen Zellen, wie Fibroblasten, ist ERK1/2-abhängig, was durch eine Blockade des ERK1/2-Signalwegs durch dominant-negative Expressionsstudien oder einer Hemmung der MEK gezeigt werden konnte (Anand-Apte *et al.*, 1997).

Die oben genannten Ergebnisse konnten zusätzlich zeigen, dass die neurotoxische Wirkung von EtOH auch auf einer Interaktion mit intrazellulären Signalkaskaden wie der ERK1/2 – Aktivierung basiert.

4.3.2 Regulation der ERK1/2-Aktivierung

Im Folgenden wurden Signalkaskaden charakterisiert, die die ERK1/2-Aktivierung in migrierenden NHNP Zellen regulieren. Hierzu wurde die Bedeutung des EGF-R, der PKC und der SFKs untersucht, welche die ERK1/2-Phosphorylierung in vielen Zelltypen modulieren können (Bode *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2005; Seger and Krebs, 1995).

Ist der EGF-R in die Regulation der Zellmigration durch eine Aktivierung von ERK1/2 involviert?

Eine Beteiligung des EGF-R an zellulären Migrationsprozessen wurde in verschiedenen *in vivo* Studien gezeigt. So haben EGF-R defiziente Mäuse eine Korrelation zwischen der Expression des EGF-R und der Migration gezeigt (Segarra *et al.*, 2006; Sibia *et al.*, 1998). Die Bedeutung des EGF-R in der Zellmigration wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass eine EGF-R-Überexpression zu einer prä- und postnatalen Zellmigration in Nagetieren führt (Aguirre *et al.*, 2005; Caric *et al.*, 2001). Auch eine intraventrikuläre Gabe des EGF-R Liganden EGF induziert die Migration subependymaler Zellen vom lateralen Ventrikel in neurales Gewebe (Craig *et al.*, 1996).

Inhibierungsstudien mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Tyrphostin AG1478 zeigten, dass der EGF-R einen Teil der NHNP Zellmigration steuert. Eine komplette Hemmung der ERK1/2 – Phosphorylierung durch AG1478 bewirkte lediglich eine partielle Reduktion der Migrationsstrecke (Abb.20) ohne die Zellviabilität zu beeinflussen. Da migrierende NHNP Zellen in Wachstumsfaktorfreiem-Medium kultiviert werden,

könnte eine Aktivierung des EGF-R auf einer para- oder autokrinen Sekretion von Wachstumsfaktoren basieren. Die Ergebnisse nach Behandlung mit Tyrphostin AG1478 zeigen, dass der EGF-R ein Hauptaktivator von ERK1/2 während der NHNP Zellmigration ist und dass die Migration von NHNP Zellen auch durch ERK1/2 – unabhängige Signalwege kontrolliert wird. Diese könnten auf der Aktivierung weiterer MAP Kinasen, wie p38 oder JNK basieren (Huang *et al.*, 2004).

Reguliert die PKC die ERK1/2-abhängige Zellmotilität?

Weitergehende Analysen zeigten, dass die Migrationsinhibierung durch EtOH mit einer verringerten ERK1/2-Phosphorylierung assoziiert war (Abb.14A, 16), während die PMA stimulierte NHNP Zellmigration mit einer Induktion der ERK1/2-Aktivierung einherging (Abb.17).

Da EtOH und PMA mit der PKC interagieren können (Liu *et al.*, 1998; Stubbs *et al.*, 1999) und eine Aktivierung der PKC eine ERK1/2-Phosphorylierung induzieren kann (Corbit *et al.*, 1999), wurde die Bedeutung dieser Kinase in der NHNP Zellmigration näher untersucht. Hierzu wurden Neurosphären während der Differenzierung mit dem PKC Inhibitor Bis1 belastet. Eine Inhibierung der PKC resultierte in einer reduzierten ERK1/2-Phosphorylierung und einer verkürzten Migrationsstrecke (Abb.19), was auf eine funktionelle Bedeutung der PKC in der NHNP Zellmigration durch ERK1/2-abhängige Signalkaskaden deutet. Die Bedeutung verschiedener PKC-Isoformen wurde auch in der neuronalen Migration von Gliomzellen und neuronalen Zellen des Hippocampus diskutiert (Besson *et al.*, 2001; Choe *et al.*, 2003; Tysnes *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1997). Verschiedene PKC-Isoformen beeinflussen die Morphologie des Zytoskeletts und können demnach an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sein. Die PKC α -Isoform ist z.B. für eine promovierende Wirkung auf die Migration von Endothel-, MCF-7 und Colonkarzinomzellen bekannt (Harrington *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 1999). Auch die β -Isoform scheint die Migration von T-Zellen und Monozyten zu beeinflussen (Carnevale *et al.*, 2003; Volkov *et al.*, 2001). Die PKC δ hingegen ist in der Migrationsregulation von Muskelzellen und Fibroblasten bedeutend (Iwabu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003), während die PKC ϵ die Migration von Gliomzellen beeinflusst (Besson *et al.*, 2002).

Mögliche Zielstrukturen der PKC könnten Proteine sein, die mit Mikrofilamenten assoziiert sind und so eine Reorganisation des Zytoskeletts ermöglichen. Hierzu

zählen MARCKS und Adducin. MARCKS ist eins der ersten identifizierten PKC-Substrate, welches ein wichtiger Faktor bei der Verankerung des Aktinzytoskeletts mit der Plasmamembran darstellt. Eine Dissoziation von MARCKS von der Plasmamembran führt zu einem Ablösen des Zytoskeletts von der Membran, was die Beweglichkeit der Zellen erhöht (Larsson, 2006). Eine Phosphorylierung von Adducin durch die PKC ist in Erythrozyten, dem Gehirn und Fibroblasten beobachtet wurden (Bennett *et al.*, 1988; Ling *et al.*, 1986; Waseem *et al.*, 1990). Eine Aktivierung von Adducin führt zu einem Lösen der Adducin-Aktin-Bindung was in morphologischen Veränderungen der Zelle resultiert (Barkalow *et al.*, 2003).

Da EtOH direkt mit der PKC interagieren kann und die Inhibierung der PKC zu einer Reduktion der Zellmigration auf nur 71% der Kontrollen führte, könnte die schwache Reaktion der Zellen auf EtOH zusätzlich zur Oberflächenbeschichtung auch auf den schwachen Einfluss der PKC zurückzuführen sein.

Sind SFKs an der Regulation der NHNP Zellmigration beteiligt?

Eine Bedeutung der SFKs in der Zellmigration konnte in unterschiedlichen *in vitro* Systemen und in SFK knock out Mäusen gezeigt werden (Altun-Gultekin and Wagner, 1996; Arnaud *et al.*, 2003; Jossin *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2005). Zusätzlich ist eine Wechselwirkung zwischen SFKs und verschiedenen Oberflächenrezeptoren, wie dem EGF-R oder NCAMs bekannt, die in der Zellmigration involviert sind (Beggs *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 1997).

Aus diesem Grund wurde auch die Rolle der SFKs in der Regulation der NHNP Zellmigration unter der Verwendung spezifischer Inhibitoren untersucht. Eine Exposition von NHNP Zellen gegenüber SU6656 oder PP2 resultierte in einer Inhibierung der Migration, die nicht mit einer veränderten ERK1/2-Aktivierung korreliert war (Abb.21). Diese Ergebnisse belegen, dass SFKs die NHNP Zellmigration regulieren, ohne einen Einfluss auf die ERK1/2-abhängigen Signalkaskaden aus zu üben. Dies bestärkt, dass die NHNP Zellmigration zusätzlich zu ERK1/2-abhängigen Mechanismen auch durch ERK1/2-unabhängige Signalkaskaden kontrolliert wird. Ein mögliches Targetmolekül der SFKs könnte die Kinase ERK5 sein, welche die Zellmotilität durch eine Disruption des Aktinzytoskeletts ermöglicht (Barros *et al.*, 2005). Ebenso könnte eine Aktivierung

von JNK oder des Reelinsystems an der Regulation der Migration durch SFKs beteiligt sein (Arnaud *et al.*, 2003; Qi and Elion, 2005).

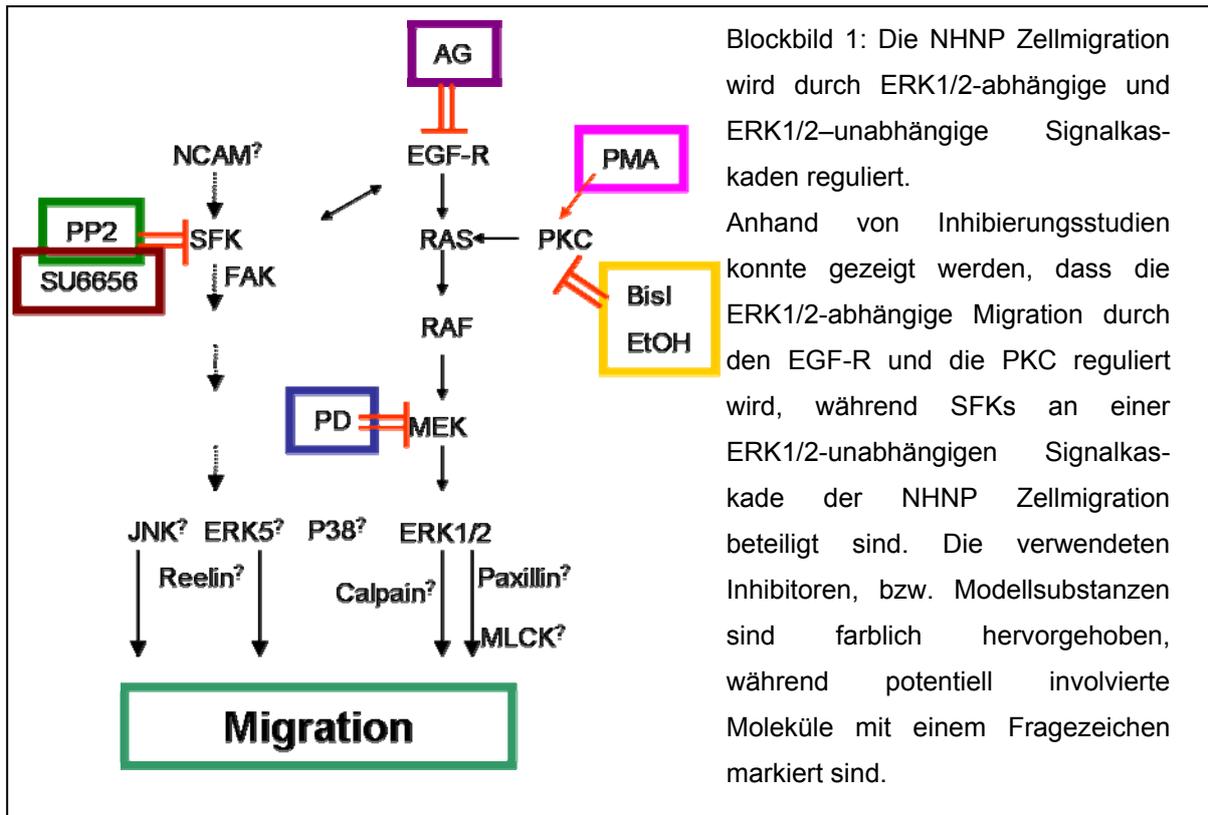
Zur näheren Charakterisierung der beteiligten SFKs wurden siRNA Experimente durchgeführt, in denen die Expression von Yes, Fyn oder Src reprimiert werden sollte. Aufgrund methodischer Probleme war eine Transfektion von Neurosphären mit den betreffenden siRNAs in dieser Arbeit nicht möglich (Tab.4). In der Literatur beschriebene Transfektionen von neuronalen Porgenitorzellen basieren auf einer Transfektion dissoziierter Neurosphären, was zu einer Zerstörung der dreidimensionalen Struktur führt (Widera *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

Wird die NHNP Zellmigration ausschließlich durch ERK1/2- und SFK-abhängige Signalkaskaden reguliert?

Um zu untersuchen, ob die NHNP Zellmigration ausschließlich durch ERK1/2-abhängige und SFK-vermittelte Signalkaskaden reguliert wird, wurden Kobelastungen mit dem EGF-R-Inhibitor AG1478 und dem SFK Inhibitor SU6656 durchgeführt (Abb.22). Die Kobelastung führt zu einer signifikant verstärkten Migrationsinhibierung im Vergleich zu den Einzelbelastungen, was auf eine kooperative Interaktion ERK1/2-abhängiger und SFK-regulierter Signalkaskaden hindeutet. Da auch die Kobelastung zu einer partiellen Migrationsinhibierung führte, existieren neben ERK1/2- und SFK-abhängigen Signalkaskaden weitere Regulationsmechanismen der NHNP Zellmigration (Blockbild 1). Diese könnten auf eine Aktivierung weiterer MAP Kinasen, wie JNK oder p38 zurückgehen (Huang *et al.*, 2004).

Differenzierungsanalysen haben nach Behandlung mit den untersuchten Inhibitoren und den Modellsubstanzen EtOH und PMA nicht zu einer signifikanten Verschiebung des Astrozyten/Neuronen-Verhältnisses geführt (Tab.5). Dies zeigt, dass die zellbiologischen Prozesse der Migration und der Differenzierung in diesem Neurosphärenmodell nicht zwingend miteinander verknüpft sein müssen. Ebenso wird an diesen Ergebnissen deutlich, dass es sich bei den gezeigten Migrationseffekten um spezifische Effekte handelt, die nicht auf eine generelle Störung der NHNP Zellreifung zurückgehen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die NHNP Zellmigration durch ERK1/2-abhängige und ERK1/2-unabhängige Signalwege kontrolliert wird. Die ERK1/2-Aktivierung selbst wird durch den EGF-R und die PKC induziert, während SFKs in der ERK1/2-unabhängigen Zellmigration involviert sind. Die Beteiligung des EGF-R, der PKC und der SFKs konnte in zwei weiteren Individuen verifiziert werden. Eine Interaktion exogener Noxen mit diesen intrazellulären Signalwegen könnte möglicherweise zu einer Störung der neuralen Entwicklung beim Menschen führen.

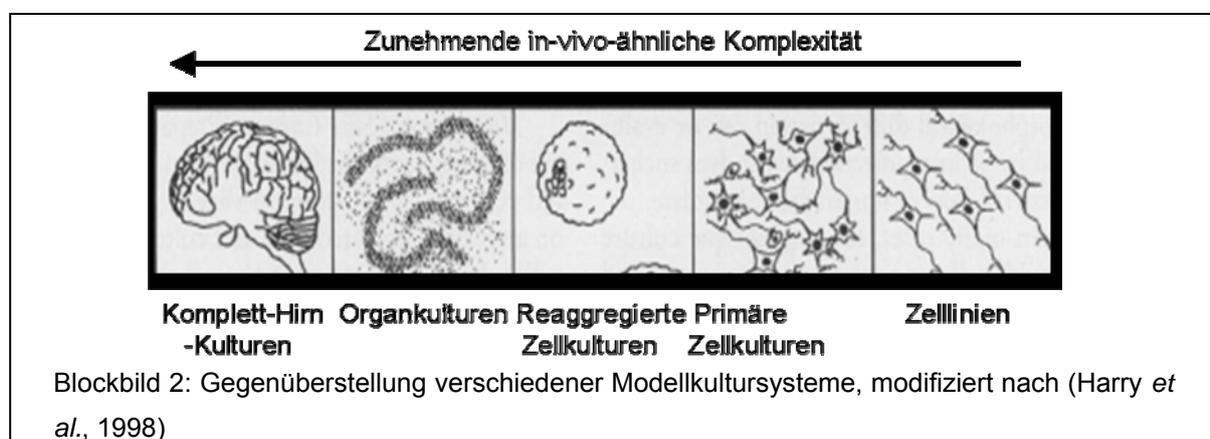


4.4 Bewertung von NHNP Zellen als *in vitro* Modellsystem für ENT

NHNP Zellen sind eine dreidimensionale, heterogene, selbstregulierende Kultur, die das Potential aufweist, ohne Zugabe exogener Stimulantien in die verschiedenen Zellpopulationen neuraler Hirnzellen zu differenzieren.

Dieses primäre humane Zellmodell bietet im Vergleich zu den bisher verfügbaren *in vitro* Modelle einige Vorteile.

1. Proliferierende NHNP Zellen können in einem definierten Medium ohne die Zugabe von Serum kultiviert werden, was die Einführung von standardisierten Bedingungen ermöglicht. Im Gegensatz hierzu werden andere Modellsysteme, wie PC12 Zellen, Neuroblastom- oder Glioblastomzelllinien und neurale Zellkulturen in FCS-versetztem Medium kultiviert (Besson *et al.*, 2000; Buzanska *et al.*, 2002; Diestel *et al.*, 2005; Sano *et al.*, 1998; Segarra *et al.*, 2006), was die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen kann.
2. Ein weiterer Vorteil von Neurosphären gegenüber Einzelzellkulturen ist die Existenz von Zell-Zell-Interaktionen innerhalb des dreidimensionalen Zellverbands, was für Chemikaliertestungen bedeutend ist. Eine Gegenüberstellung der zur Verfügung stehenden Kultursysteme im Hinblick auf *in-vivo*-relevante Komplexität zeigt, dass die Vorhersagbarkeit toxischer Effekte auf den Menschen von Zelllinien über dissoziierte primäre Zellkulturen, Neurosphären und Organkulturen bis hin zu Komplett-Hirn-Modellen zunimmt (Harry *et al.*, 1998). Da Organkulturen und Komplett-Hirn-Modelle menschlichen Ursprungs nicht möglich sind, bieten Zellaggregate, wie Neurosphären, die zurzeit besten Voraussetzungen für ein *in vitro* Modellsystem zur Vorhersage toxischer Effekte.



3. Auch die zelluläre Heterogenität der NHNP Zellen bietet einen nicht zu unterschätzenden Vorteil, da besonders Gliazellen und Neurone vielfach funktionelle Einheiten bilden. So sezernieren Astrozyten neuroaktive Transmitter, wie Glutamat, Neuropeptide oder Steroide, die die Anzahl an Synapsen, den Vernetzungsgrad von Neuronen und auch die synaptische Aktivität erhöhen. Auch die Differenzierung von adulten Stammzellen in Neurone wird durch Astrozyten induziert, was die Bedeutung von Astrozyten in einem möglichst physiologischen *in vitro* Modell belegt (Gomes *et al.*, 2001; Nedergaard *et al.*, 2003; Svendsen, 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Astrozyten eine protektive Funktion gegenüber Neuronen aufweisen, die nur in Kokulturen berücksichtigt werden kann (Morken *et al.*, 2005). Diese Beispiele verdeutlichen die Vorteile eines auf Neurosphären basierendem Zellmodells, in dem die zelluläre Heterogenität des sich entwickelnden Gehirns simuliert wird, um eine möglichst relevante Vorhersage der Toxizität für die neurale Entwicklung des Menschen treffen zu können.

4. Belastungsstudien mit verschiedenen Modellsubstanzen ergaben, dass die NHNP Zelldifferenzierung zu Oligodendrozyten, Astrozyten und Neurone durch exogene Noxen beeinflusst werden kann. Versuche mit Retinolsäure, cAMP oder Quecksilber haben gezeigt, dass die Differenzierung von NHNP Zellen zugunsten der Astrozyten und der Neuronenpopulation verschoben werden kann. Dies belegt, dass NHNP Zellen ein dynamisches, selbstregulierendes Zellsystem bilden.

5. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Migrationstest im NHNP Zellmodell etabliert werden, der nur in einem sphäroiden System angewendet werden kann. Mit Hilfe dieses Tests konnte gezeigt werden, dass die NHNP Zellmigration durch eine Exposition gegenüber verschiedener Noxen, wie Quecksilber oder EtOH beeinflusst werden kann. Auch hier traten Übereinstimmungen mit *in vivo* Daten auf.

6. Die Migrations- und Differenzierungseffekte waren nach Belastungen mit subtoxischen Konzentrationen bestimmbar, so dass die etablierten Differenzierungs- und Migrationsanalysen spezifische Endpunkte für entwicklungsneurotoxikologische Untersuchungen darstellen.

7. Betrachtet man die hohe Anzahl an Chemikalien, die im REACH-Programm getestet werden müssen, so ist die Durchführung von Hochdurchsatzmethoden essentiell. Demnach ist auch die Kultivierung von NHNP Zellen unter proliferierenden und differenzierenden Bedingungen in 96-well-Platten von enormen Vorteil für Toxizitätsbelastungen.

8. Ein Vergleich verschiedener NHNP Zellisolate unterschiedlicher Spender hat gezeigt, dass NHNP Zellen ein valides Modellsystem sind, dass trotz interindividueller Unterschiede verifizierbare Ergebnisse zulässt (Abb.24;25). Diese Eigenschaft ist für andere *in vitro* Zellkultursysteme noch nicht gezeigt worden.

Obwohl NHNP Zellen zur Testung von ENT durch viele Vorteile bestechen, gibt es auch einige Nachteile, die im Folgenden erläutert werden.

Der Einsatz von Neurosphären zur Charakterisierung molekularer Mechanismen ist durch die Heterogenität der Sphären nur eingeschränkt möglich, da die Ergebnisse zellbiologischer Endpunkte in der Regel nicht auf einen spezifischen Zelltyp zurückgeführt werden können. Zudem ist die Anwendung moderner molekularbiologischer Methoden wie Transfektionsversuche in solchen dreidimensionalen Zellmodellen mit außerordentlichen Schwierigkeiten verbunden. Auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Individuen ist möglicherweise schwierig, so dass eine relativ große Anzahl verschiedener Spender getestet werden muss, um verlässliche Aussagen über adverse Effekte von Stoffen auf die neurale Entwicklung treffen zu können.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass NHNP Zellen ein vielversprechendes *in vitro* Modellsystem zur Bewertung von Entwicklungsneurotoxizität darstellen. In NHNP Zellen konnten Methoden etabliert werden, die neben Untersuchungen zur Zellviabilität auch spezifische Endpunkte für die Hirnentwicklung, wie Apoptose, Differenzierung und Migration erfassen.

4.5 Ausblick

Als relevante Endpunkte zur Untersuchung von ENT werden verschiedene Prozesse diskutiert. Neben der neuronalen Differenzierung und Migration sind auch die Synaptogenese und die Ausbildung neuronaler Netzwerke bedeutende Endpunkte für die neurale Entwicklung. Im Rahmen dieser Arbeit war eine Etablierung dieser Endpunkte jedoch nicht möglich. Durch Western Blot Analysen und immunzytochemische Färbungen konnte die Ausbildung eines immer dichter werdenden Netzwerks an β (III)-Tubulin⁺-Zellen gezeigt werden, was auf die Entstehung eines funktionellen Netzwerks hindeutet. Elektrophysiologische

Untersuchungen würden einen Einblick in die Aktivität dieser Netzwerke ermöglichen.

Auch die Etablierung eines Proliferationstests in NHNP Zellen ist für die Validierung als *in vitro* Modellsystem zur ENT-Testung essentiell.

Neben der Ausweitung physiologisch relevanter Endpunkte ist auch eine Verbreiterung des Substanzspektrums sinnvoll. Die Auswahl von Referenzsubstanzen zur Testung von ENT ist jedoch äußerst schwierig und wird derzeit auf internationaler Ebene diskutiert (CAAT Meeting 2006, Reston, Virginia). Zusätzlich zu klassischen Toxinen bieten sich Pestizide aufgrund ihrer entwicklungsneurotoxischen Eigenschaften zur Etablierung des Modellsystems an.

Ein weiterer Aspekt in Hinblick auf die Verwendung von NHNP Zellen als toxikologisches Modell ist die Charakterisierung der metabolischen Kapazität. Da es Stoffe gibt, die erst nach metabolischer Aktivierung entwicklungsneurotoxisch wirken, sind Expressionsanalysen und Enzymaktivitätstests notwendig, um die metabolische Kapazität von NHNP Zellen bestimmen zu können.

Diese Arbeit bildet die Grundlage der Etablierung eines primären, menschlichen Zellmodells zur Untersuchung von ENT, aus welchem sich in weiteren Studien ein validiertes ENT-Testmodell entwickeln könnte.

5 Zusammenfassung

Das sich entwickelnde Gehirn weist eine besonders hohe Sensitivität gegenüber schädigenden Einflüssen auf, die zu einer Beeinflussung der Gehirnfunktion führen können. Mehr als 10% der Kinder leiden an neurologischen Erkrankungen, die neben genetischen Faktoren auch auf eine Exposition gegenüber exogenen Noxen während der Gehirnentwicklung zurückzuführen sind, so dass eine Bewertung des entwicklungsneurotoxischen Potentials von Chemikalien zunehmend an Bedeutung gewinnt. Im Rahmen des REACH Programms müssen etwa 30.000 Chemikalien hinsichtlich ihres toxischen Potentials bewertet werden. Außer kosten- und zeitaufwendigen Tierversuchen existieren bis heute jedoch keine validierten Testmethoden, die eine verlässliche Risikobewertung in Hinblick auf Entwicklungsneurotoxizität (ENT) erlauben.

In dieser Arbeit wurden normale humane neurale Progenitorzellen (NHNP Zellen) als *in vitro* Modellsystem etabliert und auf ihre Anwendung als alternatives Testmodell zur Bewertung von ENT untersucht. Durch Expressionsanalysen mittels Affymetrix GeneChip Arrays, RT-PCR- und Western Blot Analysen konnte die zelluläre Zusammensetzung und die Reifung von NHNP Zellen näher charakterisiert werden. Für eine Bewertung von NHNP Zellen als *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung von ENT wurden Methoden etabliert, die neben Untersuchungen der Zellviabilität auch entwicklungspezifische Endpunkte wie Apoptose, Differenzierung und Migration erfassen.

Die Expressionsanalysen zeigten, dass NHNP Zellen eine heterogene Zellpopulation aus unreifen Progenitor-, Gliazellen und verschiedenen neuronalen Subpopulationen bilden, die in die verschiedenen Zelltypen des Gehirns differenzieren können. Hierbei migrieren Astrozyten- und Neuronen-ähnliche Zellen aus der Sphäre, wobei sich mit zunehmender Differenzierungszeit ein immer dichter werdendes neuronales Netzwerk auszubilden scheint. Eine genauere Charakterisierung der NHNP Zelldifferenzierung ergab eine differentiell regulierte Genexpression, die neben einer Änderung der Transkriptions- und Zellzykluskontrolle auch auf Prozesse hindeutet, die in der Neurogenese, Zelladhäsion und Migration involviert sind. Weitergehende Analysen zeigten, dass die NHNP Zellmigration durch ERK1/2-abhängige und -unabhängige Signalkaskaden reguliert wird. Während der EGF-R und die PKC die

Zellmigration über eine ERK1/2-Aktivierung kontrollieren, sind Mitglieder der src-Kinasen in ERK1/2-unabhängige Migrationssignalkaskaden involviert.

Eine Belastung von NHNP Zellen mit verschiedenen entwicklungsneurotoxischen Stoffen störte deren Differenzierung zu Oligodendrozyten, Astrozyten und Neurone. Migrationsanalysen zeigten, dass auch die NHNP Zellmigration durch eine Exposition gegenüber verschiedenen Noxen wie Quecksilber oder Ethanol in subtoxischen Konzentrationen moduliert werden kann, wobei ein Vergleich verschiedener NHNP Zellisolate unterschiedlicher Individuen die Migrationsmessung als validen Endpunkt für ENT identifizieren konnte.

Die Effekte auf die Zelldifferenzierung und Migration reproduzieren *in vivo* und *in vitro* Befunde anderer Modellsysteme, was die Möglichkeit der Anwendung von NHNP Zellen als alternatives *in vitro* Modell zur Untersuchung von ENT eröffnet. Demnach bildet diese Arbeit die Grundlage der Etablierung eines primären, menschlichen Zellmodells zur Untersuchung von ENT, aus welchem sich ein validiertes Testmodell entwickeln könnte.

Literaturverzeichnis

1. Aguirre, A., Rizvi, T. A., Ratner, N., and Gallo, V. (2005). Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors. *J.Neurosci.* **25**, 11092-11106.
2. Altun-Gultekin, Z. F., and Wagner, J. A. (1996). Src, ras, and rac mediate the migratory response elicited by NGF and PMA in PC12 cells. *J.Neurosci.Res.* **44**, 308-327.
3. Anand-Apte, B., Zetter, B. R., Viswanathan, A., Qiu, R. G., Chen, J., Ruggieri, R., and Symons, M. (1997). Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J.Biol.Chem.* **272**, 30688-30692.
4. Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci.Biobehav.Rev.* **27**, 3-18.
5. Aoki, Y. (2001). Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease. *Environ.Res.* **86**, 2-11.
6. Arnaud, L., Ballif, B. A., Forster, E., and Cooper, J. A. (2003). Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr.Biol.* **13**, 9-17.
7. Barkalow, K. L., Italiano, J. E., Jr., Chou, D. E., Matsuoka, Y., Bennett, V., and Hartwig, J. H. (2003). Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation. *J.Cell Biol.* **161**, 557-570.
8. Barros, J. C., and Marshall, C. J. (2005). Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *J.Cell Sci.* **118**, 1663-1671.
9. Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* **81**, 871-927.
10. Bearer, C. F., Swick, A. R., O'Riordan, M. A., and Cheng, G. (1999). Ethanol inhibits L1-mediated neurite outgrowth in postnatal rat cerebellar granule cells. *J.Biol.Chem.* **274**, 13264-13270.
11. Beggs, H. E., Baragona, S. C., Hemperly, J. J., and Maness, P. F. (1997). NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J.Biol.Chem.* **272**, 8310-8319.
12. Bennett, V., Gardner, K., and Steiner, J. P. (1988). Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directed assembly at the spectrin-actin junction. *J.Biol.Chem.* **263**, 5860-5869.
13. Besson, A., Davy, A., Robbins, S. M., and Yong, V. W. (2001). Differential activation of ERKs to focal adhesions by PKC epsilon is required for PMA-

- induced adhesion and migration of human glioma cells. *Oncogene* **20**, 7398-7407.
14. Besson, A., Wilson, T. L., and Yong, V. W. (2002). The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility. *J.Biol.Chem.* **277**, 22073-22084.
 15. Besson, A., and Yong, V. W. (2000). Involvement of p21(Waf1/Cip1) in protein kinase C alpha-induced cell cycle progression. *Mol.Cell Biol.* **20**, 4580-4590.
 16. Bez, A., Corsini, E., Curti, D., Biggiogera, M., Colombo, A., Nicosia, R. F., Pagano, S. F., and Parati, E. A. (2003). Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.* **993**, 18-29.
 17. Bode, A. M., and Dong, Z. (2003). Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci.STKE.* **2003**, RE2.
 18. Bondy, S. C., and Campbell, A. (2005). Developmental neurotoxicology. *J.Neurosci.Res.* **81**, 605-612.
 19. Brannen, C. L., and Sugaya, K. (2000). In vitro differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium. *Neuroreport* **11**, 1123-1128.
 20. Buesen, R., Visan, A., Genschow, E., Slawik, B., Spielmann, H., and Seiler, A. (2004). Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview. *ALTEX.* **21**, 15-22.
 21. Buzanska, L., Jurga, M., and Domanska-Janik, K. (2006). Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener.Dis.* **3**, 19-26.
 22. Buzanska, L., Machaj, E. K., Zablocka, B., Pojda, Z., and Domanska-Janik, K. (2002). Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J.Cell Sci.* **115**, 2131-2138.
 23. Cai, Y., Wu, P., Ozen, M., Yu, Y., Wang, J., Ittmann, M., and Liu, M. (2006). Gene expression profiling and analysis of signaling pathways involved in priming and differentiation of human neural stem cells. *Neuroscience* **138**, 133-148.
 24. Campbell, C. G., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1997). Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions. *Brain Res.Bull.* **43**, 179-189.
 25. Caric, D., Raphael, H., Viti, J., Feathers, A., Wancio, D., and Lillien, L. (2001). EGF-Rs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon. *Development* **128**, 4203-4216.
 26. Carnevale, K. A., and Cathcart, M. K. (2003). Protein kinase C beta is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J.Biol.Chem.* **278**, 25317-25322.

27. Carstens, C. P., Blum, J. K., and Witte, I. (1990). The role of hydroxyl radicals in tetrachlorohydroquinone induced DNA strand break formation in PM2 DNA and human fibroblasts. *Chem.Biol.Interact.* **74**, 305-314.
 28. Castoldi, A. F., Coccini, T., Ceccatelli, S., and Manzo, L. (2001). Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res.Bull.* **55**, 197-203.
 29. Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B., Matter, J. M., and Guillemot, F. (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev.Cell* **11**, 831-844.
 30. Cernichiari, E., Brewer, R., Myers, G. J., Marsh, D. O., Lapham, L. W., Cox, C., Shamlaye, C. F., Berlin, M., Davidson, P. W., and Clarkson, T. W. (1995). Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology* **16**, 705-710.
 31. Chen, Y., Teng, F. Y., and Tang, B. L. (2006). Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. *Cell Mol.Life Sci.* **63**, 1649-1657.
 32. Choe, Y., Jung, H., Khang, I., and Kim, K. (2003). Selective roles of protein kinase C isoforms on cell motility of GT1 immortalized hypothalamic neurones. *J.Neuroendocrinol.* **15**, 508-515.
 33. Clarkson, T. W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environ.Health Perspect.* **110 Suppl 1**, 11-23.
 34. Claudio, L., Kwa, W. C., Russell, A. L., and Wallinga, D. (2000). Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **164**, 1-14.
 35. Coecke, S and Goldberg, A. M. Allen S Buzanska L Calamandrei G Crofton K Hareng L Hartung L Knaut H Henegger P Jacobs M Lein P Li A Mundy W Owen D Schneider S Silbergeld E Reum T Trnovec T Monnet-Tschudi F Anna-Bal-Price. Incorporating In Vitro Alternative Methods for Developmental Neurotoxicity into International Hazard Risk Assessment Strategies. *EHP* doi:10.1289/ehp.9427. 6-2-2007.
- Ref Type: Magazine Article
36. Corbit, K. C., Foster, D. A., and Rosner, M. R. (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol.Cell Biol.* **19**, 4209-4218.
 37. Cornell, R. A., and Eisen, J. S. (2005). Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Semin.Cell Dev.Biol.* **16**, 663-672.
 38. Craig, C. G., Tropepe, V., Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Weiss, S., and van der, K. D. (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J.Neurosci.* **16**, 2649-2658.

39. Cuevas, B. D., Abell, A. N., Witowsky, J. A., Yujiri, T., Johnson, N. L., Kesavan, K., Ware, M., Jones, P. L., Weed, S. A., DeBiasi, R. L., Oka, Y., Tyler, K. L., and Johnson, G. L. (2003). MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J.* **22**, 3346-3355.
40. Deng, W., McKinnon, R. D., and Poretz, R. D. (2001a). Lead exposure delays the differentiation of oligodendroglial progenitors in vitro. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **174**, 235-244.
41. Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., and Prockop, D. J. (2001b). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **282**, 148-152.
42. Diestel, S., Hinkle, C. L., Schmitz, B., and Maness, P. F. (2005). NCAM140 stimulates integrin-dependent cell migration by ectodomain shedding. *J.Neurochem.* **95**, 1777-1784.
43. Dourdin, N., Bhatt, A. K., Dutt, P., Greer, P. A., Arthur, J. S., Elce, J. S., and Huttenlocher, A. (2001). Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J.Biol.Chem.* **276**, 48382-48388.
44. Eriksson, P. (1997). Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. *Neurotoxicology* **18**, 719-726.
45. Eriksson, P., Ahlbom, J., and Fredriksson, A. (1992). Exposure to DDT during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res.* **582**, 277-281.
46. Evangelista de Duffard, A. M., and Duffard, R. (1996). Behavioral toxicology, risk assessment, and chlorinated hydrocarbons. *Environ.Health Perspect.* **104 Suppl 2**, 353-360.
47. Flanagan, L. A., Rebaza, L. M., Derzic, S., Schwartz, P. H., and Monuki, E. S. (2006). Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *J.Neurosci.Res.* **83**, 845-856.
48. Fritsche, E., Cline, J. E., Nguyen, N. H., Scanlan, T. S., and Abel, J. (2005). Polychlorinated biphenyls disturb differentiation of normal human neural progenitor cells: clue for involvement of thyroid hormone receptors. *Environ.Health Perspect.* **113**, 871-876.
49. Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., Bremer, S., and Becker, K. (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern.Lab Anim* **30**, 151-176.
50. Glading, A., Bodnar, R. J., Reynolds, I. J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D. A., Blair, H. C., and Wells, A. (2004). Epidermal growth factor activates m-

calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol.Cell Biol.* **24**, 2499-2512.

51. Goldman, L. R., and Koduru, S. (2000). Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: a public health and policy perspective. *Environ.Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 443-448.
52. Gomes, F. C., Spohr, T. C., Martinez, R., and Moura, N., V (2001). Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **34**, 611-620.
53. Guan, K., Chang, H., Rolletschek, A., and Wobus, A. M. (2001). Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res.* **305**, 171-176.
54. Guerri, C. (1998). Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin.Exp.Res.* **22**, 304-312.
55. Guerri, C. (2002). Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotox.Res.* **4**, 327-335.
56. Gurok, U., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Ropers, H. H., Scharff, C., and Nuber, U. A. (2004). Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation. *J.Neurosci.* **24**, 5982-6002.
57. Hannon, G. J., Casso, D., and Beach, D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 1731-1735.
58. Harrington, C., Lan, Y., and Akman, S. A. (1997). The identification and characterization of a G4-DNA resolvase activity. *J.Biol.Chem.* **272**, 24631-24636.
59. Harry, G. J., Billingsley, M., Bruinink, A., Campbell, I. L., Classen, W., Dorman, D. C., Galli, C., Ray, D., Smith, R. A., and Tilson, H. A. (1998). In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environ.Health Perspect.* **106 Suppl 1**, 131-158.
60. Heldin, C. H., and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* **79**, 1283-1316.
61. Hoffrogge, R., Mikkat, S., Scharf, C., Beyer, S., Christoph, H., Pahnke, J., Mix, E., Berth, M., Uhrmacher, A., Zubrzycki, I. Z., Miljan, E., Volker, U., and Rolfs, A. (2006). 2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM). *Proteomics.* **6**, 1833-1847.
62. Horiguchi, S., Takahashi, J., Kishi, Y., Morizane, A., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Tsuji, M., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S., and Hashimoto, N. (2004). Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. *J.Neurosci.Res.* **75**, 817-824.

63. Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M. D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J.Cell Sci.* **117**, 4619-4628.
64. Humtsoe, J. O., Feng, S., Thakker, G. D., Yang, J., Hong, J., and Wary, K. K. (2003). Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *EMBO J.* **22**, 1539-1554.
65. Huttenlocher, A., Ginsberg, M. H., and Horwitz, A. F. (1996). Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J.Cell Biol.* **134**, 1551-1562.
66. Iwabu, A., Smith, K., Allen, F. D., Lauffenburger, D. A., and Wells, A. (2004). Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* **279**, 14551-14560.
67. Jensen, J. B., and Parmar, M. (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol.Neurobiol.* **34**, 153-161.
68. Jones, K. L. (1975). Aberrant neuronal migration in the fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Orig.Artic.Ser.* **11**, 131-132.
69. Jones, S. E., and Jomary, C. (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* **24**, 811-820.
70. Jossin, Y., Ogawa, M., Metin, C., Tissir, F., and Goffinet, A. M. (2003). Inhibition of SRC family kinases and non-classical protein kinases C induce a reeler-like malformation of cortical plate development. *J.Neurosci.* **23**, 9953-9959.
71. Kakeyama, M., and Tohyama, C. (2003). Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Ind.Health* **41**, 215-230.
72. Kalyani, A. J., Piper, D., Mujtaba, T., Lucero, M. T., and Rao, M. S. (1998). Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J.Neurosci.* **18**, 7856-7868.
73. Kaufmann, W. (2003). Current status of developmental neurotoxicity: an industry perspective. *Toxicol.Lett.* **140-141**, 161-169.
74. Kawasaki, T., Ito, K., and Hirata, T. (2006). Netrin 1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *Development* **133**, 845-853.
75. Kennea, N. L., and Mehmet, H. (2002). Neural stem cells. *J.Pathol.* **197**, 536-550.
76. Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P., and Cheresch, D. A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J.Cell Biol.* **137**, 481-492.
77. Kogler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A. I., Colletti, E. J., Almeida-

Porada, G., Muller, H. W., Zanjani, E., and Wernet, P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J.Exp.Med.* **200**, 123-135.

78. Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., and Gage, F. H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J.Neurosci.* **17**, 5820-5829.
79. Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., and Cooper, J. A. (2005). Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *J.Neurosci.* **25**, 8578-8586.
80. Larsson, C. (2006). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal.* **18**, 276-284.
81. Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-369.
82. Lein, P., Locke, P., and Goldberg, A. Meeting Report: Alternatives for Developmental Neurotoxicity Testing. *EHP* doi:10.1289/ehp.9841. 2007. 29-1-2007.

Ref Type: Magazine Article

83. Li, C., Wernig, F., Leitges, M., Hu, Y., and Xu, Q. (2003). Mechanical stress-activated PKCdelta regulates smooth muscle cell migration. *FASEB J.* **17**, 2106-2108.
84. Ling, E., Gardner, K., and Bennett, V. (1986). Protein kinase C phosphorylates a recently identified membrane skeleton-associated calmodulin-binding protein in human erythrocytes. *J.Biol.Chem.* **261**, 13875-13878.
85. Liu, W. S., and Heckman, C. A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.* **10**, 529-542.
86. Liu, Z. X., Yu, C. F., Nickel, C., Thomas, S., and Cantley, L. G. (2002). Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J.Biol.Chem.* **277**, 10452-10458.
87. Lo, L., Sommer, L., and Anderson, D. J. (1997). MASH1 maintains competence for BMP2-induced neuronal differentiation in post-migratory neural crest cells. *Curr.Biol.* **7**, 440-450.
88. Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T., and Anderson, D. J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev.* **5**, 1524-1537.
89. Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr.Biol.* **6**, 417-426.

90. Manes, T., Zheng, D. Q., Tognin, S., Woodard, A. S., Marchisio, P. C., and Languino, L. R. (2003). Alpha(v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. *J.Cell Biol.* **161**, 817-826.
91. Matsuki, T., Hori, G., and Furuichi, T. (2005). Gene expression profiling during the embryonic development of mouse brain using an oligonucleotide-based microarray system. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **136**, 231-254.
92. Mayer-Proschel, M., Kalyani, A. J., Mujtaba, T., and Rao, M. S. (1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* **19**, 773-785.
93. McCaffery, P. J., Adams, J., Maden, M., and Rosa-Molinar, E. (2003). Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur.J.Neurosci.* **18**, 457-472.
94. Messina, D. J., Alder, L., and Tresco, P. A. (2003). Comparison of pure and mixed populations of human fetal-derived neural progenitors transplanted into intact adult rat brain. *Exp.Neurol.* **184**, 816-829.
95. Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., and Honegger, P. (1996). Comparison of the developmental effects of two mercury compounds on glial cells and neurons in aggregate cultures of rat telencephalon. *Brain Res.* **741**, 52-59.
96. Morken, T. S., Sonnewald, U., Aschner, M., and Syversen, T. (2005). Effects of methylmercury on primary brain cells in mono- and co-culture. *Toxicol.Sci.* **87**, 169-175.
97. Morriss-Kay, G. M., and Sokolova, N. (1996). Embryonic development and pattern formation. *FASEB J.* **10**, 961-968.
98. Muller, T., Choidas, A., Reichmann, E., and Ullrich, A. (1999). Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J.Biol.Chem.* **274**, 10173-10183.
99. Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* **26**, 523-530.
100. Ng, T., Shima, D., Squire, A., Bastiaens, P. I., Gschmeissner, S., Humphries, M. J., and Parker, P. J. (1999). PKCalpha regulates beta1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *EMBO J.* **18**, 3909-3923.
101. Nguyen, D. H., Catling, A. D., Webb, D. J., Sankovic, M., Walker, L. A., Somlyo, A. V., Weber, M. J., and Gonias, S. L. (1999). Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J.Cell Biol.* **146**, 149-164.
102. Nordberg, A., Zhang, X. A., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (1991). Neonatal nicotine exposure induces permanent changes in brain nicotinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res.Dev.Brain Res.* **63**, 201-207.

103. Nordberg, G. F., Goyer, R. A., and Clarkson, T. W. (1985). Impact of effects of acid precipitation on toxicity of metals. *Environ.Health Perspect.* **63**, 169-180.
104. Olney, J. W., Farber, N. B., Wozniak, D. F., Jevtovic-Todorovic, V., and Ikonomidou, C. (2000). Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ.Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 383-388.
105. Orger, M. B., Gahtan, E., Muto, A., Page-McCaw, P., Smear, M. C., and Baier, H. (2004). Behavioral screening assays in zebrafish. *Methods Cell Biol.* **77**, 53-68.
106. Pacey, LKK., Stead, S., Gleave, JA., Tomczyk, K., and Doering, LC. Neural Stem Cell Culture: Neurosphere generation, microscopical analysis and cryopreservation. *Nature Protocols* . 25-8-2006.

Ref Type: Magazine Article

107. Parsons, J. T., and Parsons, S. J. (1997). Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 187-192.
108. Peters, D. G., Kassam, A. B., Feingold, E., Heidrich-O'Hare, E., Yonas, H., Ferrell, R. E., and Brufsky, A. (2001). Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling. *Stroke* **32**, 1036-1042.
109. Piao, J. H., Odeberg, J., Samuelsson, E. B., Kjaeldgaard, A., Falci, S., Seiger, A., Sundstrom, E., and Akesson, E. (2006). Cellular composition of long-term human spinal cord- and forebrain-derived neurosphere cultures. *J.Neurosci.Res.* **84**, 471-482.
110. Piper, D. R., Mujtaba, T., Keyoung, H., Roy, N. S., Goldman, S. A., Rao, M. S., and Lucero, M. T. (2001). Identification and characterization of neuronal precursors and their progeny from human fetal tissue. *J.Neurosci.Res.* **66**, 356-368.
111. Piper, D. R., Mujtaba, T., Rao, M. S., and Lucero, M. T. (2000). Immunocytochemical and physiological characterization of a population of cultured human neural precursors. *J.Neurophysiol.* **84**, 534-548.
112. Qi, M., and Elion, E. A. (2005). MAP kinase pathways. *J.Cell Sci.* **118**, 3569-3572.
113. Ramanathan, R., Wilkemeyer, M. F., Mittal, B., Perides, G., and Charness, M. E. (1996). Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J.Cell Biol.* **133**, 381-390.
114. Reya, T. (2003). Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent Prog.Horm.Res.* **58**, 283-295.
115. Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J.Neurosci.* **12**, 4565-4574.

116. Rice, D., and Barone S Jr (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ.Health Perspect.* **108 Suppl 3**, 511-533.
117. Rodier, P. M. (1995). Developing brain as a target of toxicity. *Environ.Health Perspect.* **103 Suppl 6**, 73-76.
118. Sanfeliu, C., Sebastia, J., Cristofol, R., and Rodriguez-Farre, E. (2003). Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox.Res.* **5**, 283-305.
119. Sano, M., and Kitajima, S. (1998). Activation of mitogen-activated protein kinases is not required for the extension of neurites from PC12D cells triggered by nerve growth factor. *Brain Res.* **785**, 299-308.
120. Schaller, M. D. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* **20**, 6459-6472.
121. Schettler, T. (2001). Toxic threats to neurologic development of children. *Environ.Health Perspect.* **109 Suppl 6**, 813-816.
122. Segarra, J., Balenci, L., Drenth, T., Maina, F., and Lamballe, F. (2006). Combined signaling through ERK, PI3K/AKT, and RAC1/p38 is required for met-triggered cortical neuron migration. *J.Biol.Chem.* **281**, 4771-4778.
123. Seger, R., and Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
124. Seiler, A., Visan, A., Pohl, I., Genschow, E., Buesen, R., and Spielmann, H. (2002). [Improving the embryonic stem cell test (EST) by establishing molecular endpoints of tissue specific development using murine embryonic stem cells (D3 cells)]. *ALTEX.* **19 Suppl 1**, 55-63.
125. Sibilgia, M., Steinbach, J. P., Stingl, L., Aguzzi, A., and Wagner, E. F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J.* **17**, 719-731.
126. Slee, E. A., Keogh, S. A., and Martin, S. J. (2000). Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death.Differ.* **7**, 556-565.
127. Sobotka, T. J., Ekelman, K. B., Slikker, W., Jr., Raffaele, K., and Hattan, D. G. (1996). Food and Drug Administration Proposed Guidelines for Neurotoxicological Testing of Food Chemicals. *Neurotoxicology* **17**, 825-836.
128. Sommer, L., Shah, N., Rao, M., and Anderson, D. J. (1995). The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. *Neuron* **15**, 1245-1258.
129. Stagliano, K. E., Carchman, E., and Deb, S. (2003). Real-time polymerase chain reaction quantitation of relative expression of genes modulated by p53 using SYBR Green I. *Methods Mol.Biol.* **234**, 73-91.

130. Stubbs, C. D., and Slater, S. J. (1999). Ethanol and protein kinase C. *Alcohol Clin.Exp.Res.* **23**, 1552-1560.
131. Sun, W., Buzanska, L., Domanska-Janik, K., Salvi, R. J., and Stachowiak, M. K. (2005). Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells* **23**, 931-945.
132. Svendsen, C. N. (2002). The amazing astrocyte. *Nature* **417**, 29-32.
133. Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Shen, J., ter Borg, M. G., Rosser, A. E., Tyers, P., Karmioli, S., and Dunnett, S. B. (1997). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp.Neurol.* **148**, 135-146.
134. Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **135**, 397-402.
135. Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D. J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., and Matsumura, F. (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J.Cell Biol.* **164**, 427-439.
136. Trojan, L., Schaaf, A., Steidler, A., Haak, M., Thalmann, G., Knoll, T., Gretz, N., Alken, P., and Michel, M. S. (2005). Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res.* **25**, 183-191.
137. Tsai, L. H., Lees, E., Faha, B., Harlow, E., and Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* **8**, 1593-1602.
138. Tysnes, O. B., and Laerum, O. D. (1993). Differential effects of 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (TPA) on growth, migration and invasion of a human glioma cell line. *Anticancer Res.* **13**, 1325-1330.
139. Verity, M. A. (1990). Comparative observations on inorganic and organic lead neurotoxicity. *Environ.Health Perspect.* **89**, 43-48.
140. Volkov, Y., Long, A., McGrath, S., Ni, E. D., and Kelleher, D. (2001). Crucial importance of PKC-beta(I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. *Nat.Immunol.* **2**, 508-514.
141. Wang, Y. J., Lee, C. C., Chang, W. C., Liou, H. B., and Ho, Y. S. (2001). Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. *Toxicol.Lett.* **122**, 157-169.
142. Waseem, A., and Palfrey, H. C. (1990). Identification and protein kinase C-dependent phosphorylation of alpha-adducin in human fibroblasts. *J.Cell Sci.* **96 (Pt 1)**, 93-98.

143. Widera, D., Mikenberg, I., Elvers, M., Kaltschmidt, C., and Kaltschmidt, B. (2006). Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling. *BMC.Neurosci.* **7**, 64.
144. Widholm, J. J., Clarkson, G. B., Strupp, B. J., Crofton, K. M., Seegal, R. F., and Schantz, S. L. (2001). Spatial reversal learning in Aroclor 1254-exposed rats: sex-specific deficits in associative ability and inhibitory control. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **174**, 188-198.
145. Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., III, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-452.
146. Wispriyono, B., Matsuoka, M., and Igisu, H. (2002). Effects of pentachlorophenol and tetrachlorohydroquinone on mitogen-activated protein kinase pathways in Jurkat T cells. *Environ.Health Perspect.* **110**, 139-143.
147. Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* **96**, 379-386.
148. Yu, J., Gonzalez, S., Martinez, L., Diez-Pardo, J. A., and Tovar, J. A. (2003). Effects of retinoic acid on the neural crest-controlled organs of fetal rats. *Pediatr.Surg.Int.* **19**, 355-358.
149. Zhang, P. L., Izrael, M., Ainbinder, E., Ben Simchon, L., Chebath, J., and Revel, M. (2006). Increased myelinating capacity of embryonic stem cell derived oligodendrocyte precursors after treatment by interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor fusion protein. *Mol.Cell Neurosci.* **31**, 387-398.
150. Zhang, W., Law, R. E., Hinton, D. R., and Couldwell, W. T. (1997). Inhibition of human malignant glioma cell motility and invasion in vitro by hypericin, a potent protein kinase C inhibitor. *Cancer Lett.* **120**, 31-38.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADS	Aufmerksamkeitsdefizienzsyndrom
AK	Antikörper
A/N-Verhältnis	Astrozyten/Neuronen-Verhältnis
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aRNA	amplifizierte RNA
atRA	all-trans Retinolsäure
B27	Proliferationsmedium
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
Bisl	Bisindolylmaleimide I
BSA	Bovine Serum Albumin
BTG2	BTG family, member 2
cAMP	N ⁶ -2'-O Dibutyryladenosen, zyklisches AMP
cDNA	komplementäre DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
CLK1	CDC-ähnliche Kinase 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFN	Differenzierungsmedium
DIC	Tage in Differenzierungskultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	EGF-Rezeptor
EIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
ENO2	Neurale Enolase 2
ENT	Entwicklungsneurotoxizität
ERK1/2	Extrazellulär-signalregulierte Kinasen 1+2
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F12	Ham's Nut Mix F12
FCS	Fötale Kälberserum

7 Abkürzungsverzeichnis

FGF	Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
GABA	Gamma-Amino-Butter-Säure
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
H2AFX	H2A Histon Familie, Vertreter X
HDAC	Histondeacetylase
HgCl ₂	Quecksilberchlorid
Hist1H4c	Histon Cluster 1, H4c
HRP	<i>Horseradish</i> Peroxidase
Igf	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
Igf-R	IGF-Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
MA	Micro Array
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
β-ME	β-Mercaptoethanol
MeHgCl	Methylquecksilberchlorid
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Boten-RNA
MW	Mittelwert
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NEF	Neurofilament
NHNP Zellen	Normale Humane Neurale Progenitorzellen
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSC	Neurale Stammzellen
NSE	Neuronenspezifische Enolase
p.a.	per analysis
Pb	Bleiacetat
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGF-R	PDGF-Rezeptor

7 Abkürzungsverzeichnis

PKC	Protein Kinase C
PLP	Proteolipid Protein
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
R ²	Regressionskoeffizient
RAR	Retinolsäurerezeptor
RGD	Arginin-Glycin-Asparagin
RPL	ribosomales Protein
RT-PCR	Real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reverse Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase /-ion
RXR	Retinoid X-Rezeptor
S	Staurosporin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec	Sekunden
SEM	Abweichung vom Mittelwert aus zwei Versuchen
SFK	Familie der Src-Kinasen
siRNA	silencing RNA
SORLA	sortilin-related receptor, L(DLR class) A
Stabw	Standardabweichung
SYPL	synaptophysin-like protein
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCHQ	Tetrachlorhydrochinon
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TPH-1	Tryptophan-Hydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethylmethan)-aminomethan
U	Unit
VCAM	Vaskulares Zelladhäsionsmolekül
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

8 Anhang

8.1 Aufstellung von *Probe Set IDs* und *Accession numbers*

Zur näheren Charakterisierung von NHNP Zellen und deren Differenzierung wurden Expressionsanalysen durchgeführt (s. 4.1.1 bzw. 4.1.2). In der folgenden Tabelle (Tab.AI) sind die Affymetrix *Probe Set IDs* und *Accession numbers* der in Tab.1 und Tab. 2 (s. 4.1.1 und 4.1.2) aufgeführten Gene aufgelistet.

Tab.AI Affymetrix *Probe Set IDs* und *Accession numbers* der aufgeführten Gene

Gen	Probe Set ID	Accession number
ABCB6	203192_at	NM_005689
ACSL3	201661_s_at	NM_004457
ADAM19	209765_at	Y13786
ADORA2B	205891_at	NM_000676
ANKRD11	219437_s_at	NM_013275
ARHGAP29	203910_at	NM_004815
ASNS	205047_s_at	NM_001673
B4GALT5	221485_at	AL035683
BAZ2B	203080_s_at	NM_013450
BMP Rezeptor1A	213578_at	AI678679
BMP7	209591_s_at	M60316.1
BTG2	201236_s_at	NM_006763
C1orf24	217967_s_at	AF288391
CA12	203963_at	NM_001218
CALD1	201616_s_at	AL577531
CBR3	205379_at	NM_001236
CD9	201005_at	NM_001769
CDH2	203440_at	M34064
CDKN3	209714_s_at	AF213033
CHST11	219634_at	NM_018413
CKLF	219161_s_at	NM_016951
CLDN10	205328_at	NM_006984
CLIC1	208659_at	AF034607
CLK1	214683_s_at	AI251890
CORO1C	221676_s_at	BC002342
CXCL14	218002_s_at	NM_004887
CYP51A1	202314_at	NM_000786
DACH1	205471_s_at	AW772082
DLX2	207147_at	NM_004405
Dopamin Rezeptor D5	208486_at	NM_000798.1
EIF1AY	204409_s_at	BC005248
EIF4G1	208624_s_at	BE966878
EMP3	203729_at	NM_001425
ENO2	201313_at	NM_001975.1
ENO2	201313_at	NM_001975
FALZ	207186_s_at	NM_004459
FRZB	203697_at	U91903

8 Anhang

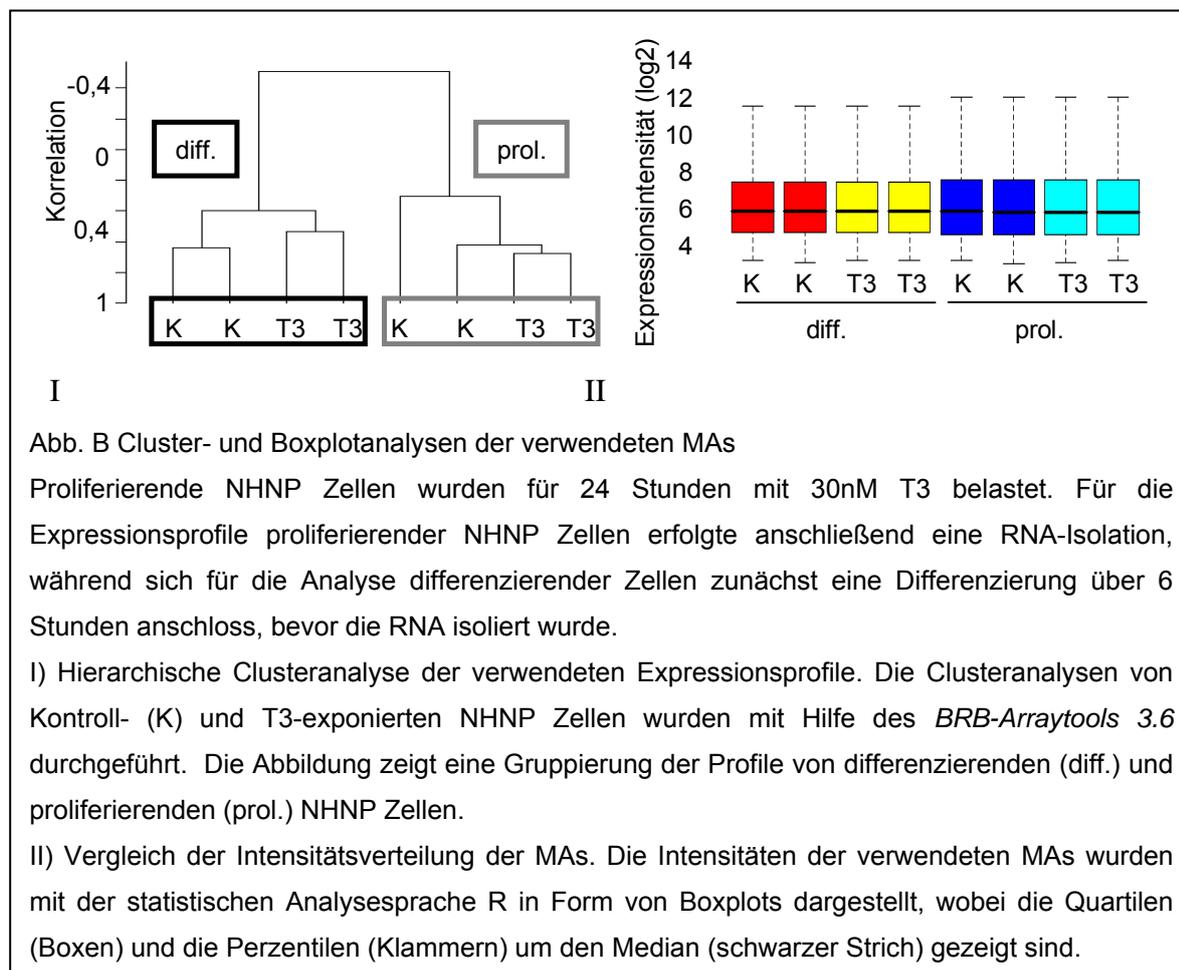
GABA-A RA2	207014_at	NM_000807.1
GABA-A RB1	207010_at	NM_000812.2
GABA-B R1	203146_s_at	NM_001470.1
GABA-B Rho1	206525_at	NM_002042.1
GADD45G	204121_at	NM_006705
GFAP	203540_at	NM_002055.1
GFAP	203540_at	NM_002055
GRIA3 /// FLJ21839	206730_at	NM_007325
GSTO1	201470_at	NM_004832
HDAC9	205659_at	NM_014707
HES1	203395_s_at	NM_005524.2
HIST1H2AC	215071_s_at	AL353759
HIST1H4C	205967_at	NM_003542
HMGCR	202539_s_at	AL518627
HOMER1	213793_s_at	BE550452
ICT1	204868_at	NM_001545
IGF1-R	203627_at	NM_000875.2
IGF1-R	208441_at	NM_015883.1
IGF2-R	201393_s_at	NM_000876.1
Integrin A10	206766_at	AF112345.1
Integrin A5	201389_at	NM_002205.1
Integrin A6	201656_at	NM_000210.1
Integrin A7	216331_at	AK022548.1
Integrin AE	205055_at	NM_002208.3
Integrin B5	210213_s_at	AF022229.1
ITGB1BP1	203336_s_at	AL548363
ITGB5	201124_at	AL048423
ITPR2	202660_at	AA834576
KCNJ16	219564_at	NM_018658
KIF1A	203849_s_at	BG473130
LAMA4	202202_s_at	NM_002290
LIPG	219181_at	NM_006033
LMO2	204249_s_at	NM_005574
LOC653483	210409_at	AB016898
LPL	203549_s_at	NM_000237
LYN	202625_at	AI356412
MAP4K3	218311_at	NM_003618
MASH-1	209988_s_at	BC001638.1
MASH-1	209988_s_at	BC001638
MATN2	202350_s_at	NM_002380
MPDZ	205079_s_at	NM_003829
MXI1	202364_at	NM_005962
MYCN	209757_s_at	BC002712
NCAM1	212843_at	AA126505
NCAM2	205669_at	NM_004540.1
NDUFA6	202001_s_at	NM_002490
NDUFS4	209303_at	BC005270
NEF3	205113_at	NM_005382
Nikotinerger Cholinrezeptor 6	220210_at	NM_020402.2
Nikotinerger Cholinrezeptor 10	207568_at	NM_004198.1
NOL5A	200875_s_at	NM_006392

8 Anhang

NOTCH2	212377_s_at	AU158495
NOTCH3	203238_s_at	NM_000435.1
NQO2	203814_s_at	NM_000904
NTRK3	206462_s_at	NM_002530
OMG	207093_s_at	NM_002544
PBX3	204082_at	NM_006195
PCID1	202232_s_at	NM_006360
PDGFD	219304_s_at	NM_025208
PDGF-RA	203131_at	NM_006206.1
PELI2	219132_at	NM_021255
PER2	205251_at	NM_022817
PFKP	201037_at	NM_002627
PLOD1	200827_at	NM_000302
PLP	210198_s_at	BC002665.1
PLU-1	201548_s_at	W02593
PMP2	206826_at	NM_002677
POU3F2	207084_at	NM_005604
PPAP2B	209355_s_at	AB000889
PRDX4	201923_at	NM_006406
PTPRF	200636_s_at	NM_002840
RGS20	210138_at	AF074979
RPA3	209507_at	BC005264
RPL24	200013_at	NM_000986
RPL36A /// LOC644889	201406_at	NM_021029
SC4MOL	209146_at	AV704962
SC65	204078_at	NM_006455
SCG5	203889_at	NM_003020
SFRS3	208673_s_at	AF107405
SNCAIP	219511_s_at	NM_005460
SNRPD1	202690_s_at	BC001721
SOX11	204915_s_at	AB028641.1
SOX12	204432_at	NM_006943.1
SOX3	214633_at	AI824954
SOX4	201417_at	NM_003107.1
SOX9	202936_s_at	NM_000346.1
SRPX	204955_at	NM_006307
SRRM2	208610_s_at	AI655799
SSBP1	202591_s_at	NM_003143
SSPN	204963_at	AL136756
SYNGR3	205691_at	NM_004209
TCF7L1	221016_s_at	NM_031283
TJP2	202085_at	NM_004817
TLE1	203221_at	AI758763
TPM2	204083_s_at	NM_003289
TPR /// BTRC	201730_s_at	BF110993
TRIM23	204732_s_at	AI021991
TSPAN5	209890_at	AF065389
UAP1	209340_at	S73498
VAV3	218807_at	NM_006113
VCAM1	203868_s_at	NM_001078
VEGF	210512_s_at	AF022375
ZFAND5	210275_s_at	AF062347

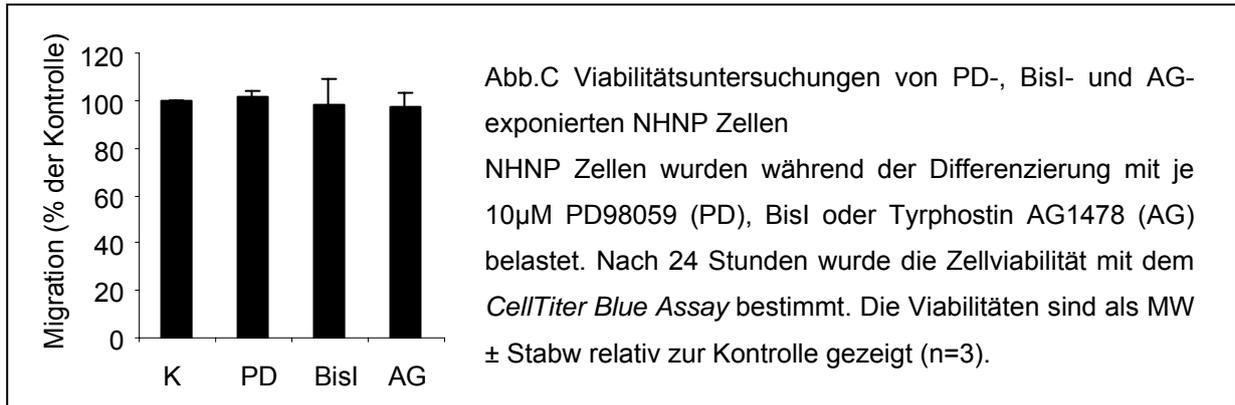
8.2 Genexpressionsanalysen zur Differenzierung von NHNP Zellen

Zur Untersuchung von Transkriptomänderungen während der NHNP Zelldifferenzierung wurden Expressionsprofile proliferierender und differenzierender Neurosphären verglichen. Hierzu wurden Expressionsdaten von NHNP Zellen nach Exposition gegenüber dem Schilddrüsenhormon (T3) verwendet. Da diese Behandlung zu einer differentiellen Genregulation von maximal 0,001% aller Transkripte führte, ist eine Verwendung dieser Daten für vergleichende Expressionsanalysen von proliferierenden und differenzierenden NHNP Zellen legitim. Zusätzlich zeigten Clusteranalysen eine Trennung der Expressionsprofile von proliferierenden und differenzierenden Zellen (Abb.BI). Für die Analysen wurden die Expressionsdaten der jeweiligen Behandlungsgruppe für proliferierende oder differenzierende Zellen zusammengefasst, wie es in Abbildung BI dargestellt ist. Abbildung BII zeigt eine Qualitätskontrolle der verwendeten MAs in Form einer Boxplotanalyse, die belegt, dass die Fluoreszenzintensitäten der verwendeten MAs vergleichbar waren.



8.3 Viabilitätsmessungen von NHNP Zellen nach Belastung mit migrationsmodulierenden Substanzen

Für die Charakterisierung von migrationsregulierenden Signalkaskaden wurden NHNP Zellen mit den Inhibitoren PD98059, Bisl oder Tyrphostin AG1478 belastet. Durch Zellviabilitätsuntersuchungen wurde ein Einfluss dieser Substanzen auf die Zytotoxizität ausgeschlossen (Abb.C)



8.4 Veröffentlichungen

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Moors M, Cline JE, Abel J, Fritsche E. (2007).

ERK-dependent and -independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15;221(1):57-67

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Josef Abel möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine umfassende Betreuung und vielseitige Unterstützung danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich möchte ich mich für die fakultätsübergreifende Betreuung bedanken, durch die meine Dissertation möglich war.

Ganz besonders danke ich Dr. Ellen Fritsche, die stets bereit war, mir jederzeit in allen Fragen zu helfen und mich zu unterstützen. Außerdem möchte ich mich bei ihr für die gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit bedanken.

Den „beiden Chefs“ der Toxikologie-Gruppe möchte ich ganz besonders für die individuelle wissenschaftliche Förderung und die wirklich nette Arbeitsatmosphäre danken, die maßgeblich zu dem erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit beigetragen hat.

Allen ehemaligen, alten und neuen Kollegen der Tox-Gruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit, die wertvollen Diskussionen und die vielen Hilfestellungen. Bei Jason Cline bedanke ich mich ganz besonders für die tatkräftige Unterstützung während meiner Arbeit. Auch meinen „Wegbegleitern“ Claudia Schäfer, Ulrike Hübenthal und Thomas Haarmann-Stemmann danke ich ganz herzlich, die mich während der ganzen Zeit begleitet haben und mir nicht nur für wissenschaftliche Diskussionen und Fragestellungen zur Verfügung standen!

Den „Mädels des Brain-Departments“ Kathrin Gassmann, Julia Tigges und Jessica Heinrichs danke ich für die Schaffung einer wirklich netten und unterhaltsamen Atmosphäre in unserem neuen Büro!

Bei Markus Frericks bedanke ich mich für die Hilfe bei den MicroArray-Experimenten, die sich nicht nur auf die Auswertung der Rohdaten bezog.

Ganz besonders habe ich die „Diskussionen“ an jedem Donnerstagabend mit Marc Majora, Markus Frericks, Tanja Maresch, Lars Alberts...genossen. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für frustrierende, anstrengende und nervende Erfahrungen hattet!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, die mich immer tatkräftig unterstützt und in meinem Vorhaben bestärkt hat.

Meinem Partner Markus danke ich von ganzem Herzen für die wissenschaftliche und private Unterstützung auf voller Linie. Auch die Geduld und das Verständnis für meine Stressallüren und „Wehwechen“ haben mir den nötigen Rückhalt gegeben, um mein Ziel zu verwirklichen.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die von mir angegebenen Hilfsmittel angewendet habe.

(Michaela Moors)

Düsseldorf, 22.05.2007