

Aus dem
IUF – Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jean Krutmann

Die Einflüsse relevanter zellulärer Signalwege auf die
Entwicklung humaner neuraler Progenitorzellen *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Georgea Raad
2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Ellen Fritsche

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall

Mit Demut widme ich diese Arbeit den Tieren, denen ein unendliches
Leid zugefügt wird.

Zusammenfassung

Die Entwicklung des menschlichen Gehirns ist durch eine Vielzahl wichtiger Prozesse gekennzeichnet. Hierdurch ist das sich entwickelnde Gehirn sehr anfällig für eine Einflussnahme durch verschiedenste Substanzen. Gegenwärtig wird die Testung von Chemikalien auf die Entwicklungsneurotoxizität (*developmental neurotoxicity*, DNT) nach den Richtlinien der internationalen *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) und der *United States Environmental Protection Agency* (US-EPA) durchgeführt, welche *in vivo* Tierversuche als Standard vorgeben. Diese Studien sind mit einem sehr hohen Ressourcenverbrauch verbunden und werfen ethisch-moralische Fragen auf, zudem ist die Übertragbarkeit von Tests an nicht menschlichen Zellen auf den menschlichen Organismus mangelhaft. Um eine human-basierte, ressourcenschonende, präventive und tierfreundliche Alternative für die Identifikation adverser Effekte von Substanzen auf die Entwicklung des menschlichen Gehirns bereitzustellen, wurde in den letzten Jahren die sogenannte DNT *in vitro* Testbatterie (DNT-IVB) entwickelt. Diese ist in der Lage, eine Vielzahl von Schlüsselprozessen der menschlichen Gehirnentwicklung abzubilden.

Ein integraler Bestandteil der DNT-IVB ist der Neurosphären-Assay, welcher auf Arbeiten mit primären humanen neuronalen Progenitorzellen (*human neural progenitor cells*, hNPCs) basiert. Um die biologische Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays näher zu charakterisieren, wurden in dieser Studie insgesamt die sechs folgenden für die menschliche Gehirnentwicklung relevanten Signalwege ausgewählt: Notch, *Wingless Integration* (Wnt), Glykogen-Synthase-Kinase (GSK3 β), Prostaglandin-E2-Rezeptoren (EP α), *mechanistical target of rapamycin* (mTOR) und *signal transducer and activator of transcription* (STAT3). Diese Signalwege wurden mit je mindestens einem Aktivator und einem Inhibitor untersucht. Dabei wurden die Endpunkte NPC-Proliferation und -Migration, -Differenzierung zu Neuronen und Oligodendrozyten sowie die Neuritenmorphologie analysiert.

Die Resultate ergeben, dass einige Endpunkte des Neurosphären-Assays über die untersuchten Signalwege moduliert werden können. Konzentrations-Wirkungs-Kurven in logarithmischen Abständen zeigen beispielsweise, dass eine Wnt-Signalwegs-Aktivierung die Radial-Glia-Migration sowie die Differenzierung der Zellen zu Oligodendrozyten vermindert, die neuronale Differenzierung jedoch erhöht. Ein Beispiel für eine fehlende Modulierbarkeit ist der STAT3-Signalweg, bei welchem durch den Inhibitor Limonin keine spezifischen Veränderungen der Endpunkte festgestellt werden konnten.

Die hier generierten Daten geben neue Einblicke in die biologische Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays und stärken somit aufgrund der Relevanz der untersuchten Signalwege für entwicklungsneurologische Krankheiten auch die Validität und Vorhersagekraft der DNT-IVB. Die Daten werden internationale Sichtbarkeit erlangen, da sie nicht nur publiziert, sondern auch in der *ToxCast*-Datenbank der US-EPA verfügbar sein werden.

Abstract

The development of the human brain underlies a multitude of important evolutionary processes. Hereby, the developing brain is very sensitive and vulnerable to the influence of diverse substances. Currently, the testing of chemicals regarding their developmental neurotoxicity (DNT) potential is performed according to the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) and the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) guidelines, using *in vivo* animal testing methods as standard. These studies are characterized by the enormous use of resources and impose ethical-moral questions considering animal testing, furthermore, they lack good transferability of non-human test methods on the human organism. In need of a human-based, resource-efficient, preventative, and animal-friendly alternative for the identification of adverse effects of substances on the developing human brain, the DNT *in vitro* battery (DNT-IVB) was developed. This testing battery allows the depiction of key-processes during the development of the human brain.

An integral part of the DNT-IVB is represented by the Neurosphere-Assay, which is based on work with primary human neural progenitor cells (hNPCs). In order to characterize the biological applicability domain of the Neurosphere-Assay, this study examined the following six signaling pathways, which play a relevant role during human brain development: Notch, Wntless-Integration (Wnt), Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3 β), Prostaglandin E2-Receptors (EP R), mechanistical target of rapamycin (mTOR), and signal transducer and activator of transcription (STAT3). The signaling pathways were tested with at least one activator and one inhibitor. The Neurosphere-Assay endpoints NPC proliferation and migration, differentiation into neurons and oligodendrocytes, as well as neurite outgrowth were analysed.

The results show that some endpoints of the Neurosphere-Assay can be regulated through the studied signaling pathways. Concentration-effect curves in logarithmic scalings were able to demonstrate that Wnt-pathway-activation reduces the radial-glia-migration and the differentiation into oligodendrocytes, while increasing the neuronal differentiation. An example of lacking modulation capability is the STAT3-signaling pathway, in which the inhibitor Limonin did not lead to any specific endpoint changes. The here generated data give new insights into the biological applicability domain of the Neurosphere-Assay and strengthen the validity and predictability of the DNT-IVB through the relevance of the examined signaling pathways for human developmental neurotoxicological diseases. The data will receive international visibility as they will not only be published but will also be available in the ToxCast-data bank of the US-EPA.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloprotease 17</i>
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen
Akt	<i>RAC(Rho family)-alpha serine/threonine-protein kinase, auch: Proteinkinase B</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor Typ 2
ARA	Arachidonsäure
ASS	Autismus-Spektrum-Störungen
Axin2	<i>Adenomatous polyposis coli tumor suppressor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMC	<i>benchmark concentration</i>
BMP-7	<i>bone morphogenic protein 7</i>
BMR	<i>benchmark response</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridine
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bspw.	beispielsweise
C	Celsius
CADASIL	<i>Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy-Syndrome</i>
CAS-Nummer	<i>Chemical Abstract Service Registry Number</i>
CDK5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
CHIR99021	6-[[2-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile
CK1	Casein-Kinase 1
COX1/2	Cyclooxygenasen 1 und 2
CRStats	<i>Critical Role Statistics</i>
DAB1	<i>disabled-1</i>
DAPT	N-[N-(3,5-difluorophenylacetyl)-l-alanyl]-(S)-phenylglycine-t-butylester
DCX	<i>Doublecortin</i>
DepTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
DK	Degradationskomplex
DKK1	Dickkopf-1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNT	<i>developmental neurotoxicity</i> , Entwicklungsneurotoxizität
DNT-IVB	<i>DNT-in-vitro-battery</i> , DNT-Testbatterie
DSL	<i>Delta, Serrate/Jagged und Lag2</i>
DVL	<i>Dishevelled</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
eIF2B	<i>eukariotic Initiation Factor 2B</i>
EPR	Prostaglandin E2-Rezeptor
EPR1-4	Prostaglandin-E2-Rezeptor 1 bis -Rezeptor 4
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , fibroblastischer Wachstumsfaktor
FKBP12	FK506-Bindungsprotein-12
FRB	FKBP-Rapamycin-Bindungsstelle
FZDR	<i>Frizzled-Rezeptoren</i>
GCSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GH	<i>growth hormone</i>
GPR	G-Protein-Rezeptor-gekoppelte Rezeptortypen

GS	<i>goat serum</i>
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GW	Gestationswoche
HCS	<i>high content screening</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hiPSCs	<i>human-induced pluripotent stem cells</i> , human-induzierte pluripotente Stammzellen
hNPCs	<i>human neural progenitor cells</i> , humane neurale Progenitorzellen
IFN- α	Interferon-alpha
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
ISTNET	<i>international stakeholder network</i>
IWP2	<i>Inhibitor of Wnt Production 2</i>
JAK	Janus-Kinase
JNKs	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LEF	<i>lymphoid-enhancer-factor-1</i>
LMK	Lösemittelkontrolle/n
LPR5/6	<i>low-density lipoproteinreceptor-related proteins</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBOAT	<i>membrane-bound O-Acyltransferases</i>
MHY1485	(5-4-Hydroxybenzylidene)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione
mLST8	<i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mechanistical target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mTOR-complex-1</i>
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NECD	<i>notch extracellular domain</i> , extrazelluläre Notch-Domäne
NEXT	<i>notch intracellular truncation fragment</i>
NICD	<i>notch intracellular domain</i> , intrazelluläre Notch-Domäne
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> , Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (
OPPTS	<i>Office of prevention, pesticides and toxic substances</i> , Abteilung für Prävention, Pestizide und Toxine
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDKP1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PDL	Poly-D-Lysin-Hydrobromid
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PGES	Prostaglandin E-Synthasen
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PNS	Peripheres Nervensystem
Poly-HEMA	Poly(2-hydroxyethyl-methacrylate)
PORC	<i>Porcupine</i>
PP2	4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2
RapTOR	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>

RC	<i>readiness criteria</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RS	<i>Rabbit serum</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
s.	siehe
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SGLT2	<i>Sodium Glucose linked transporter 2</i>
Shh	<i>Sonic-Hedgehog</i>
SRC	<i>cellular sarcoma</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCF	T-Zell-Faktor
TG	<i>test guidelines</i>
TSC1	<i>tuberous sclerosis 1, Hamartin</i>
TSC2	<i>tuberous sclerosis 2, Tuberin</i>
TYK2	Tyrosin-Kinase 2
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency, amerikanische Umweltschutzbehörde</i>
VLDLR	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
VTI	variable temperature incubator
VZ	ventrikuläre Zone
w/o	<i>without</i>
Wnt	<i>Wingless-Integration</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Entwicklung des menschlichen Gehirns	1
1.2	Rolle von Signalwegen in der Hirnentwicklung	3
1.3	Entwicklungsneurotoxizität	4
1.4	Der Neurosphären-Assay als Teil der <i>in vitro</i> DNT-Testbatterie	6
1.5	Ausgewählte Signalwege in der Gehirnentwicklung	8
1.5.1	Notch-Signalweg	8
1.5.2	Kanonischer Wnt-Signalweg	9
1.5.3	GSK3 β -Signalweg	11
1.5.4	EPR-Signalweg	12
1.5.5	mTOR-Signalweg	14
1.5.6	STAT3-Signalweg	15
1.5.7	Zusammenfassung der Signalwege	16
1.6	Ziele der Arbeit	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3	Materialien für zellbiologische Methoden	20
2.1.3.1	Zellen	20
2.1.3.2	Medien und Medienzusätze	20
2.1.3.3	Kulturmedien	21
2.1.3.4	Beschichtungsreagenzien	21
2.1.3.5	Immunzytochemie	21
2.1.3.6	5-Bromo-2'-Desoxyuridine (BrdU) Zell-Proliferationstest	23
2.1.3.7	Alamar-Blue-Viabilitätsbestimmung	23
2.1.3.8	Lactatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsbestimmung	23
2.1.3.9	Chemikalien für zelluläre Signalwegsregulierung	23
2.1.4	Verwendete Software	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Beschichtungen	25
2.2.1.1	PDL-Laminin-Beschichtung	25
2.2.1.2	Beschichtungen mit Poly-HEMA	25
2.2.2	Revitalisierung kryokonservierter humaner neuraler Progenitorzellen	26
2.2.3	Kultivierung von Neurosphären	26
2.2.4	Passagieren der Neurosphären	26
2.2.5	Neurosphären-Assay	27
2.2.5.1	Untersuchung unter proliferierenden Bedingungen (NPC1)	27
2.2.5.1.1	Bestimmung der Proliferation über Einbau von BrdU in die DNS (NPC1)	28
2.2.5.2	Untersuchung unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)	29
2.2.5.2.1	Migrationsanalyse (NPC2)	30
2.2.6	Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH-Assay	31
2.2.7	Viabilitätsbestimmung mittels Alamar-Blue-Assay	32
2.2.8	Immunzytochemische Färbungen	33
2.2.9	Auswertung mit Omnisphero	35
2.2.10	Statistische Analyse	35

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Notch-Signalweg	36
3.1.1	Notch unter proliferierenden Bedingungen	36
3.1.1.1	Aktivierung mittels Reelin	36
3.1.1.2	Inhibierung mittels DAPT	37
3.1.2	Notch unter differenzierenden Bedingungen	38
3.1.2.1	Aktivierung mittels Reelin	38
3.1.2.2	Inhibierung mittels DAPT	40
3.2	Kanonischer Wnt-Signalweg	42
3.2.1	Kanonischer Wnt-Signalweg unter proliferierenden Bedingungen	42
3.2.1.1	Aktivierung mittels CHIR99021	42
3.2.1.2	Inhibierung mittels IWP2	42
3.2.1.3	Inhibierung mittels Pioglitazone	43
3.2.2	Kanonischer Wnt-Signalweg unter differenzierenden Bedingungen	44
3.2.2.1	Aktivierung mittels CHIR99021	44
3.2.2.2	Inhibierung mittels IWP2	46
3.2.2.3	Inhibierung mittels Pioglitazone	48
3.3	GSK3β-Signalweg	50
3.3.1	GSK3 β unter proliferierenden Bedingungen	50
3.3.1.1	Aktivierung mittels Insulin	50
3.3.1.2	Aktivierung mittels CHIR99021	50
3.3.1.3	Inhibierung mittels Pioglitazone	51
3.3.2	GSK3 β unter differenzierenden Bedingungen	51
3.3.2.1	Aktivierung mittels Insulin	51
3.3.2.2	Aktivierung mittels CHIR99021	53
3.3.2.3	Inhibierung mittels Pioglitazone	53
3.4	EPR-Signalweg	54
3.4.1	EPR unter proliferierenden Bedingungen	54
3.4.1.1	Aktivierung mittels PGE2	54
3.4.1.2	Inhibierung mittels Celecoxib	54
3.4.2	EPR unter differenzierenden Bedingungen	55
3.4.2.1	Aktivierung mittels PGE2	55
3.4.2.2	Inhibierung mittels Celecoxib	57
3.5	mTOR-Signalweg	59
3.5.1	mTOR unter proliferierenden Bedingungen	59
3.5.1.1	Aktivierung mittels MHY1485	59
3.5.1.2	Inhibierung mittels Everolimus	60
3.5.2	mTOR unter differenzierenden Bedingungen	61
3.5.2.1	Aktivierung mittels MHY1485	61
3.5.2.2	Inhibierung mittels Everolimus	63
3.6	STAT3-Signalweg	65
3.6.1	STAT3 unter proliferierenden Bedingungen	65
3.6.1.1	Aktivierung mittels Colivelin	65
3.6.1.2	Inhibierung mittels Limonin	66
3.6.2	STAT3 unter differenzierenden Bedingungen	66
3.6.2.1	Aktivierung mittels Colivelin	66
3.6.2.2	Inhibierung mittels Limonin	68
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	70

4	DISKUSSION	71
4.1	Notch-Signalweg	72
4.1.1	Notch unter proliferierenden Bedingungen	72
4.1.2	Notch unter differenzierenden Bedingungen.....	72
4.2	Kanonischer Wnt-Signalweg und GSK3β-Signalweg	75
4.2.1	Kanonischer Wnt-Signalweg und GSK3 β -Signalweg unter proliferierenden Bedingungen	75
4.2.2	Kanonischer Wnt-Signalweg und GSK3 β -Signalweg unter differenzierenden Bedingungen.....	76
4.3	EPR-Signalweg	79
4.3.1	EPR-Signalweg unter proliferierenden Bedingungen	79
4.3.2	Prostaglandin-Rezeptor-Signalweg unter differenzierenden Bedingungen	80
4.4	mTOR-Signalweg	82
4.4.1	mTOR unter proliferierenden Bedingungen	82
4.4.2	mTOR unter differenzierenden Bedingungen	82
4.5	STAT3-Signalweg.....	85
4.5.1	STAT3 unter proliferierenden Bedingungen.....	85
4.5.2	STAT3 unter differenzierenden Bedingungen	85
4.6	Schlussfolgerungen	87
5	LITERATURVERZEICHNIS	89
6	DANKSAGUNG	

1 Einleitung

1.1 Entwicklung des menschlichen Gehirns

Die Entwicklung des menschlichen Gehirns ist ein über mehrere Jahre andauernder Prozess, welcher mit der Bildung des Neuralrohrs beginnt und über die Geburt hinweg bis zum 25. Lebensjahr fortschreitet (Stiles, 2011; Stiles & Jernigan, 2010). Das Gehirn unterliegt jedoch bis zum Lebensende einem ständigen Wandel (Stiles, 2011; Stiles & Jernigan, 2010). Pränatal unterteilt man den Prozess der Gehirnentwicklung in ein Embryonalstadium, welches bis zur Gestationswoche (GW) acht abgeschlossen wird, und in ein Fetalstadium, welches von der GW acht bis zur Geburt andauert. Im Embryonalstadium wird die Basis für die Hirnentwicklung gelegt, und es erfolgt eine Unterteilung in das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS). Während der fetalen Phase kommt es zu einem ausgeprägten und schnellen Wachstum des Gehirns, der Anlage von neuronalen Bahnen und Netzwerken sowie zur komplexeren Entwicklung zuvor angelegter kortikaler und subkortikaler Strukturen (siehe (s.) Abbildung (Abb.) 1) (Silbereis et al., 2016; Stiles & Jernigan, 2010).

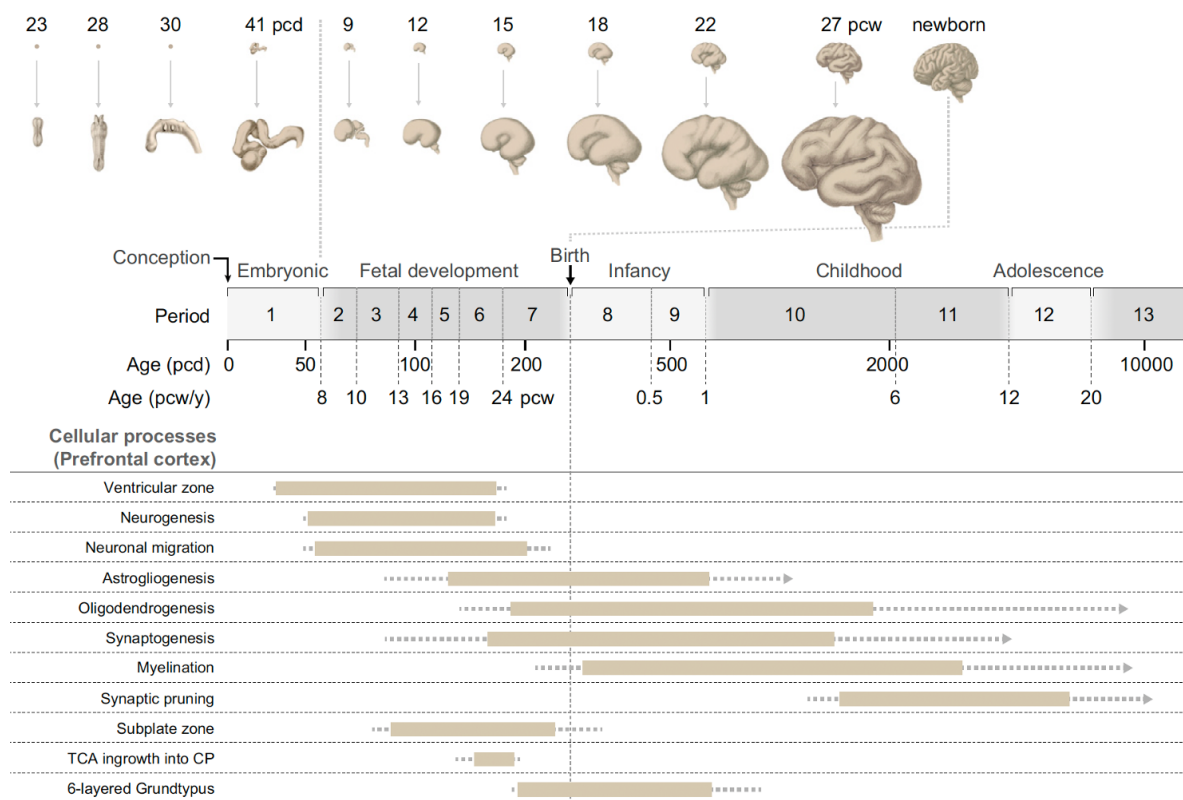


Abb. 1: Entwicklungsprozess des menschlichen Gehirns. Die Entwicklung des menschlichen Gehirns wird sowohl morphologisch nach Tagen und Wochen *post conceptionem* (*post conception days*, pcd sowie *post conception weeks*, pcw) als auch präpartal in Embryonal- und Fetalstadium und postpartal bis zur Jugend unterteilt und beschrieben. Passend zu diesen Phasen sind die zellulären Prozesse des menschlichen Gehirns mit ihrem Beginn und ihrer Dauer aufgelistet. Adaptiert nach Silbereis et al., 2016.

Damit das Nervensystem physiologisch funktionieren kann, muss bis zur dritten Gestationswoche die Gastrulation abgeschlossen sein. Bei korrektem Ablauf entstehen hierbei die drei Keimblätter Ektoderm,

Mesoderm und Entoderm (Solnica-Krezel & Sepich, 2012). Das Ektoderm kann in zwei Schichten, bestehend aus zwei verschiedenen Zelltypen, eingeteilt werden: epidermal-ektodermale sowie neuroektodermale Zellen. Die neuroektodermalen Stammzellen entsprechen den humanen neuralen Progenitorzellen (*human neural progenitor cells*, hNPCs), aus welchen sich das zentrale Nervensystem entwickelt (Copp, Greene, & Murdoch, 2003; Stiles & Jernigan, 2010).

Ab dem 20. Tag *post conceptionem* (GW3) beginnt die Neurulation, die erste Phase der Gehirnentwicklung. Diese bringt das Neuralrohr als die erste feststehende Struktur des Gehirns hervor. Die mit symmetrisch proliferierenden NPCs ausgekleidete Zone des Neuralrohrs befindet sich im Bereich, der später dem mit Liquor ausgefüllten Ventrikelsystem entspricht und wird daher als ventrikuläre Zone (VZ) bezeichnet (Rakic & Zecevic, 2000; Sachana et al., 2021; Stiles & Jernigan, 2010). Von der VZ aus können die NPCs ausmigrieren und differenzieren. Im Verlauf der Entwicklung formieren sich die NPCs in den kaudalen Regionen zu Rückenmark und Rhombencephalon, in den rostralen Regionen zu Mesencephalon (Mittelhirn) und Prosencephalon (Vorderhirn) (Stiles & Jernigan, 2010).

Die Neurogenese beginnt am 42. Tag *post conceptionem* (GW 6) und dauert bis Ende der GW 15 an (Bystron, Blakemore, & Rakic, 2008). Hier verändert sich der Teilungsmodus der hNPCs von symmetrischer zu asymmetrischer Zellteilung. Dies bedeutet, dass nun aus einer hNPC zwei verschiedene Zelltypen entstehen, jeweils eine hNPC und ein Neuron. Die neu entstehenden hNPCs verbleiben in der VZ, während die postmitotischen Neurone kurz nach ihrer Entstehung in kortikale Regionen migrieren. Dort differenzieren sie, produzieren neurotrophe Faktoren und Neurotransmitter und bilden ein dendritisches und axonales Netzwerk aus (Stiles & Jernigan, 2010). Die Migration erfolgt dabei in frühen Entwicklungsstadien über somale Translokation. Hierbei wächst die Ausstülpung eines Neurons in die Richtung des Migrationsziels, der Zellkörper bewegt sich entlang dieses Wachstums hinterher (Zhao et al., 2018). Später erfolgt eine radiale Migration mithilfe der Fortsätze von Radial-Glia-Zellen, an welchen sich die Neurone entlang bewegen (Cooper, 2014; Miyata et al., 2001; Nadarajah & Parnavelas, 2002). Die Neurone, die in der Zone der späteren Basalganglien entstehen, migrieren mittels tangentialer Migration. Bei dieser Art der Migration bestimmen Leitmoleküle die letztendliche Position der Neurone (Nadarajah & Parnavelas, 2002; Stiles & Jernigan, 2010). Zum Ende der Neurogenese nimmt die Zahl der hNPCs, die in asymmetrischer Zellteilung proliferieren, stark zu (Stiles & Jernigan, 2010).

In der postnatalen Phase findet die Neurogenese nur in drei Hirnbereichen statt, nämlich in den subventrikulären Zonen der beiden lateralen Ventrikel sowie der subgranulären Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus (Ribeiro & Xapelli, 2021). Die Proliferation und Migration von Gliazellen hingegen läuft weit über die pränatale Phase hinaus ab. Gliale Vorläuferzellen sind zeitlich unbegrenzt im menschlichen Gehirn zu finden (Cayre, Canoll, & Goldman, 2009; Stiles & Jernigan, 2010). Oligodendrozyten, eine Unterart der Gliazellen, beginnen erst kurz vor der Geburt mit der Bildung der Myelinscheide. Das Myelin ummantelt die neuronalen Axone, wodurch elektrische Signale effizient fortgeleitet werden können (Stiles & Jernigan, 2010). Die Oligodendrozyten tragen außerdem über die

Ausschüttung bestimmter trophischer Faktoren und über die Interaktion mit Neuronen zum Wachstum und zur Verschaltung des ZNS bei (McTigue & Tripathi, 2008; Stiles & Jernigan, 2010). Die Synaptogenese ist ebenfalls ein bis ins hohe Erwachsenenalter anhaltender Prozess, welcher die immerwährende Plastizität des menschlichen Gehirns aufrechterhält (Andersen, 2003; Cayre, Canoll, & Goldman, 2009; Stiles & Jernigan, 2010).

Die Entwicklung des Gehirns ist jedoch nicht nur von proliferativen und migrierenden, sondern ebenfalls von regressiven Ereignissen gekennzeichnet. Zentraler Prozess ist hierbei die Apoptose, der programmierte Zelltod (Buss & Oppenheim, 2004; Buss, Sun, & Oppenheim, 2006). Ab Mitte der Gestationsperiode werden bis weit über die postpartale Periode hinaus vorwiegend Synapsen und Gliazellen apoptotisch abgebaut (Rakic & Zecevic, 2000; Stiles & Jernigan, 2010). Dieser kontrollierte Zelltod ist essenziell, um die Effektivität der Zellen und Synapsen zu steigern, nur transient benötigte Hirnverbindungen abzuschalten und Fehler in der Entwicklung zu korrigieren (Rakic & Zecevic, 2000; Stiles & Jernigan, 2010).

Sowohl genetische wie auch Umwelteinflüsse spielen für die Entwicklung eines funktionsfähigen, gesunden Gehirns eine wesentliche Rolle. Dabei sind jedoch nicht immer direkte Rückschlüsse dieser Determinanten auf das letztendliche, individuelle Ergebnis zu ziehen. Vielmehr handelt es sich bei der Entwicklung des Gehirns um eine „komplexe Abfolge dynamischer und adaptiver Prozesse“, welche zu einer ständigen Weiterentwicklung der Hirnstrukturen und -funktionen beitragen (Stiles, 2011; Stiles & Jernigan, 2010).

1.2 Rolle von Signalwegen in der Hirnentwicklung

Die physiologische Entwicklung des Gehirns wird durch zahlreiche intrinsische und extrinsische Faktoren bestimmt, welche Einfluss nehmen über die Modulation von Signalwegen, die sogenannte Signaltransduktion. Die Signaltransduktion beschreibt dabei den komplexen Prozess von der Aufnahme eines Stimulus mithilfe von Rezeptoren über die Weiterleitung und Verarbeitung des daraus entstehenden Signals bis hin zum spezifischen Endprodukt (Heinrich et al., 2022; Torres & Forman, 2006). Durch die zahlreichen einzelnen Komponenten der Signaltransduktion, die in verschiedensten Zellen des Körpers in unterschiedlichen Kombinationen und Interaktionen über die letzten Jahrzehnte entdeckt werden konnten, ergibt sich eine Vielfalt an Signalwegen, welche eine große Rolle bei der Entwicklung und stetigen Remodellierung zellulärer Organismen einnehmen (Torres & Forman, 2006). In der pränatalen Entwicklungsphase kommt es zur erstmaligen Anlage, aber auch zu den ersten Um- und Abbauprozessen der zuvor entstandenen Hirnregionen. Es konnten verschiedene Signalwege ausfindig gemacht werden, welche eine tragende Rolle in der Entwicklung des menschlichen Gehirns spielen (Stiles & Jernigan, 2010) und welche somit für diese Arbeit von Relevanz sind.

1.3 Entwicklungsneurotoxizität

Beginnend mit der Neurulation in der dritten Gestationswoche ist die Entwicklung des menschlichen Gehirns, wenn physiologisch fortbestehend, ein lebenslanger Prozess, der verschiedensten Regulationsmechanismen unterliegt. In der fetalen und embryonalen Entwicklungsperiode befindet sich das menschliche ZNS jedoch in einer besonders vulnerablen Phase. Dies liegt zum einen an der hohen Zellteilungsrate und zum anderen an der Plazentagängigkeit vieler Substanzen und der noch nicht vollständig ausgebildeten Blut-Hirn-Schranke (BHS) (Dorman et al., 2001; Grandjean & Landrigan, 2014). Somit können sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren im sich entwickelnden Gehirn Disruptionen auslösen (Bondy & Campbell, 2005; Rodier, 1995). Führen diese Disruptionen zu einer abweichenden Morphologie oder abweichenden Funktion des Gehirns, spricht man von Entwicklungsneurotoxizität (*developmental neurotoxicity*, DNT) (Fritsche & Hogberg, 2020).

In den letzten Jahrzehnten konnte ein deutlicher Anstieg von entwicklungsneurologischen Erkrankungen bei Kindern beobachtet werden. Hierunter fallen unter anderem Autismus-Spektrum-Störungen (ASS), Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen (ADHS) und entwicklungsverzögernde Erkrankungen (Boyle et al., 2011; Goldman & Koduru, 2000; Grandjean & Landrigan, 2014). Diese Zunahme lässt sich vermutlich unter anderem durch den Einfluss entwicklungsneurologischer Substanzen erklären. Hierunter fallen viele industrielle Chemikalien wie Blei und Quecksilber (Grandjean & Landrigan, 2014), aber auch Pharmaka wie Retinole (Bondy & Campbell, 2005; Vorhees, 1994), körpereigene Botenstoffe wie Schilddrüsenhormone (Prezioso et al., 2018) und natürliche Umweltsubstanzen wie Fumonisine aus der Gruppe der Mykotoxine (Bondy & Campbell, 2005).

Entwicklungsneurologische Erkrankungen haben viele problematische Aspekte. Zum einen ist das Leid der Individuen und des direkten Umfeldes anzuführen: Kognitiv beeinträchtigte sowie körperlich behinderte Erwachsene und Kinder erfahren in allen Bereichen des Lebens sowohl durch strukturelle Gegebenheiten als auch durch kulturelle Normen Diskriminierung (Carter & Markham, 2001; Janardhana et al., 2015; Melville, 2005). Die Menge an Diskriminierung kognitiv retardierter sowie behinderter Menschen korreliert mit der Verschlechterung ihrer mentalen Gesundheit (Lee et al., 2022), was zu einer weiteren Beeinträchtigung führen kann. Verantwortliche für Kinder bzw. Eltern von Kindern mit Erkrankungen, Behinderungen oder besonderen Bedürfnissen sind durch finanzielle Einbußen einem erhöhten Armutsrisiko ausgesetzt und durch gesundheitliche Sorgen und die teils intensive körperliche und emotionale Pflege der Kinder stark belastet (Caicedo, 2014; Murphy & Christian, 2007). Trotz starker Bemühungen um Inklusion werden weltweit von Erkrankungen betroffene Menschen und ihre Familien aus wichtigen Bereichen des Alltages wie Bildung, Freizeit, Sozialleben und Arbeit ausgeschlossen (Lee et al., 2022).

Zum anderen wird die Leistungsfähigkeit der Gesellschaft durch einen höheren Anteil mental retardierter Menschen reduziert (Baumann et al., 2016; Grandjean & Landrigan, 2014). Bei einer Reduktion des durchschnittlichen IQs einer Bevölkerung wird der Anteil mental retardierter Menschen um den gleichen Prozentsatz erhöht, wie der Anteil hochbegabter Menschen sinkt (Schmidt, 2013).

Abgesehen von individuellen und sozialen Folgen entstehen auch hohe ökonomische Einbußen. Das Gesundheitssystem wird in Ländern mit einem hohen Anteil entwicklungsneurologischer Erkrankungen finanziell stark belastet und das Bruttoinlandsprodukt des jeweiligen Landes sinkt deutlich. Dies kann besonders für Länder, welche bereits von Armut und einer geschwächten Wirtschaft betroffen sind, einen deutlichen Rückschlag bedeuten (Grandjean & Landrigan, 2014).

Die Verhinderung der Entstehung entwicklungsneurologischer Erkrankungen ist somit weltweit ein ethisch, sozial und ökonomisch wichtiges Ziel. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen jedoch sowohl für lang bekannte als auch für neuere Chemikalien wenig Daten über ihr DNT-Potential vor (Bal-Price et al., 2015; Bal-Price & Fritsche, 2018; Judson et al., 2009; Kaufmann, 2003). Dies lag in der Vergangenheit vor allem an den festgelegten Vorgaben der amerikanischen Umweltschutzbehörde (*United States Environmental Protection Agency*, US-EPA) aus der Abteilung für Prävention, Pestizide und Toxine 870.6300 (*Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances*, OPPTS) sowie den Test-Leitlinien (test guidelines, TG) 426 und 443 der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD). Diese Leitlinien legten fest, dass potentiell entwicklungsneurologische Substanzen nur retrospektiv bei entsprechenden Hinweisen (Sachana et al., 2021) mittels *in vivo* Versuchen an Nagetieren getestet und evaluiert werden müssen anstatt präventiv (Nimtz et al., 2019). Dies bedeutet in der Praxis: Für die Evaluierung des neurotoxischen Potentials nur einer einzigen Substanz werden ca. 1.200 Tiere gezüchtet und getötet (Smirnova et al., 2014), dabei werden über 1,4 Millionen US-Dollar über einen Zeitraum von einem Jahr ausgegeben (Crofton, Mundy, & Shafer, 2012; Smirnova et al., 2014). Aufgrund solcher Kenntnisse wurde unter anderem bereits im Jahr 1959 das 3R-Prinzip nach Russell und Burch eingeführt, welches die Reduzierung (*reduce*) sowie den Ersatz (*replace*) von Tierversuchen durch Alternativmethoden und eine Verbesserung (*refine*) der bestehenden Testmethoden verlangt (Hubrecht & Carter, 2019; Neuhaus et al.; Russell & Burch, 1959).

Mittlerweile besteht Konsens in der Wissenschaft, dass moderne, tierversuchsfreie Testmethoden zur Reduktion und Vermeidung von Tierleid, einer besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und einer erhöhten Ressourceneffizienz unerlässlich sind (Fritsche, Gassmann, & Schreiber, 2011; Hamm et al., 2017; Kaufmann, 2003; Leist & Hartung, 2013; Stebbings et al., 2007; Tsuji & Crofton, 2012; Vanhaecke et al., 2011). Zur Verbesserung der Forschung wurde spezifisch im Bereich der Entwicklungsneurotoxizität im Jahr 2014 das *international stakeholder network* (ISTNET) gegründet. Diese internationale Vernetzung, bestehend aus Forschungsinstituten, Industrie und zuständigen Behörden, hat als gemeinsames Ziel, weitere Testmethoden und Datenbanken für die große Menge noch nicht evaluierter entwicklungsneurologischer Substanzen aufzubauen (Bal-Price et al., 2015).

1.4 Der Neurosphären-Assay als Teil der *in vitro* DNT-Testbatterie

Wie in den vorherigen Abschnitten erklärt, ist die Entwicklung des Gehirns ein Prozess, welcher sich bis ungefähr zum 25. Lebensjahr ausdehnt. Ein besonders wichtiger Abschnitt ist die pränatale Entwicklung des menschlichen Gehirns, da *in utero* die strukturellen Voraussetzungen für ein funktionelles Organ gesetzt werden (Bal-Price et al., 2015; Bal-Price & Fritsche, 2018; Judson et al., 2009; Kaufmann, 2003).

Die experimentelle Verwendung von hNPCs *in vitro* ermöglicht es, genau diese vulnerable Phase der Hirnentwicklung abzubilden und somit Daten über das DNT-Potential einzelner Substanzen zu generieren. Da eine einzelne Testmethode nicht ausreichend ist, um die gesamte humane Gehirnentwicklung *in vitro* abzubilden, wurde eine *in vitro* DNT-Testbatterie (DNT-*in-vitro-battery*, DNT-IVB) entwickelt, welche aus größtenteils humanbasierten Assays besteht. Diese können in ihrer Gesamtheit 17 wichtige Schlüsselprozesse abbilden (Bal-Price & Fritsche, 2018; Blum et al., 2022; Crofton, Mundy, & Shafer, 2012; Fritsche et al., 2017; Masjosthusmann et al., 2018).

Ein zentraler Bestandteil der DNT-IVB ist der Neurosphären-Assay, welcher auf primären hNPCs aus Vollhirnhomogenaten menschlicher Föten in den GW 16 und 19 basiert. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) und dem fibroblastischen Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) in einer Zellkultur bilden sich aus den hNPCs dreidimensionale Zellaggregate. Diese werden Neurosphären genannt (Baumann et al., 2016; Fritsche, Gassmann, & Schreiber, 2011; Moors et al., 2009; Reynolds & Rietze, 2005; Reynolds & Weiss, 1992).

Der humane Neurosphären-Assay ist in der Lage, verschiedene basale Hirnentwicklungs-Prozesse *in vitro* darzustellen. Hierunter fallen die Endpunkte Proliferation (NPC1), Migration (NPC2) von Radial-Glia-Zellen (NPC2a), Neuronen (NPC2b) und Oligodendrozyten (NPC2c), die Differenzierung in Neurone (NPC3), die Neuritenmorphologie (NPC4) mit den Unterpunkten Neuritenfläche (NPC4a) und Neuritenlänge (NPC4b) sowie die Differenzierung in Oligodendrozyten (NPC5) und Reifung der Oligodendrozyten (NPC6; Anmerkung: NPC6 wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wird der Vollständigkeit halber hier jedoch genannt) (s. Abb. 2). Dabei besteht die Möglichkeit, die Zellen verschiedenen Substanzen auszusetzen und daraus folgende Effekte zu beobachten (Barenys et al., 2017; Baumann et al., 2016; Buc-Caron, 1995; Fritsche, Gassmann, & Schreiber, 2011; Koch et al., 2022; Nimtz et al., 2019).

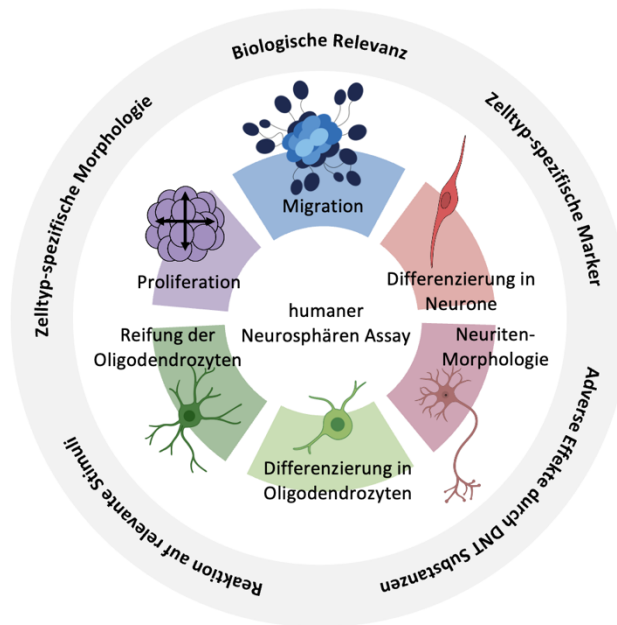


Abb. 2: Schematische Darstellung des humanen Neurosphären-Assays, seiner einzelnen Endpunkte und Grundlagen. Im Zentrum steht der humane Neurosphären-Assay für die Testung von entwicklungsneurologischen-Substanzen mit seinen Endpunkten Proliferation (NPC1), Migration (NPC2), Differenzierung in Neurone (NPC3), Neuritenmorphologie (NPC4) und Differenzierung der Oligodendrozyten (NPC5). Die Reifung der Oligodendrozyten (NPC6) wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wird der Vollständigkeit halber jedoch hier mit aufgeführt. Der äußere Ring bildet mit seinen fünf Aussagen die Grundlage für die Validierung des humanen Neurosphären-Assays. Adaptiert nach Koch et al., 2022.

Um eine wissenschaftlich valide Evaluierung von Substanzeffekten *in vitro* zu ermöglichen, müssen die Testmethoden sogenannte *readiness criteria* (RC) erfüllen. Diese RC beschreiben, ob eine entwickelte *in vitro* Testmethode (wie der Neurosphären-Assay) mittels der bekannten Standards in beispielsweise (bspw.) Teststrategie und Datenevaluierung dazu ausreicht, bestimmte Chemikalien/Signalwege/adverse Effekte abzubilden. In diese RC fließen Daten ein, welche in toxikologischen Untersuchungen als relevant für die Abbildung der Entwicklungsneurotoxizität erkannt wurden. Anhand der einzelnen Kriterien kann letztendlich beurteilt werden, ob ein Testsystem bereit (*ready*) für die Anwendung für regulatorische Zwecke ist oder ob zuvor eine weitere Ausarbeitung durch eine Ergänzung von Daten und/oder Testdesigns nötig ist (Bal-Price et al., 2018).

Die Literatur zeigt, dass die für diese Arbeit angewendeten Neurosphären-Assays NPC1-3 und NPC5 in den meisten Bereichen gut bis sehr gut ausgebaut sind (Bal-Price et al., 2018; Koch et al., 2022). Es wurde zum Ziel gemacht, diese sowie weitere Endpunkte innerhalb der nächsten Jahre zu optimieren (Bal-Price et al., 2018; Fritsche et al., 2017; Fritsche & Hogberg, 2020).

Um die biologische Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays weiter zu untersuchen und somit die Akzeptanz der DNT-IVB zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit bekannte Signalwege moduliert, siehe Abb. 3. Diese sind angepasst an das Entwicklungsstadium der Neurosphären (GW 16-19) und spielen in der physiologischen Entwicklung des menschlichen Gehirns eine tragende Rolle.

<u>Signalwege</u>	<u>Modulatoren</u>	<u>Substanzklasse</u>
1. Notch-Signalweg	<u>Aktivator:</u> Reelin	Glykoprotein
	<u>Inhibitor:</u> N-[N-(3,5-difluorophenylacetyl)-l-alanyl]-(S)-phenylglycine-t-butylester (DAPT)	Chemikalie
2. Kanonischer <i>Wingless-Integration</i> (Wnt)-Signalweg	<u>Aktivator:</u> 6-[[2-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile (CHIR99021)	Chemikalie
	<u>Inhibitor 1:</u> <i>Inhibitor of Wnt Production 2</i> (IWP2)	Chemikalie
	<u>Inhibitor 2:</u> Pioglitazone	Antidiabetikum aus der Gruppe der <i>sodium glucose linked transporter 2-Inhibitor</i> und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (PPAR γ)-Agonist
3. Glukogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β)-Signalweg	<u>Aktivator 1:</u> Insulin	Proteohormon des Pankreas
	<u>Aktivator 2:</u> CHIR99021	Siehe oben
	<u>Inhibitor:</u> Pioglitazone	Siehe oben
4. Prostaglandin E2-Rezeptor (EP2)-Signalweg	<u>Aktivator:</u> Prostaglandin E2 (PGE2)	Prostanoid, Gewebshormon
	<u>Inhibitor:</u> Celecoxib	Nicht-steroidales Antirheumatikum aus der Gruppe der Cyclooxygenase 2 (COX2)-Inhibitoren
5. <i>Mechanistical target of rapamycin</i> (mTOR)-Signalweg	<u>Aktivator:</u> 5-(4-Hydroxybenzylidene)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (MHY1485)	Chemikalie
	<u>Inhibitor:</u> Everolimus	Rapamycin-Derivat aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Bakterium)
6. <i>Signal transducer and activator of transcription</i> (STAT3)-Signalweg	<u>Aktivator:</u> Colivelin	Chemikalie
	<u>Inhibitor:</u> Limonin	Kristalliner Feststoff aus Kernen von Zitrusfrüchten

Abbildung 3: Übersicht über die ausgewählten Signalwege, ihre Modulatoren und Substanzklassen.

1.5 Ausgewählte Signalwege in der Gehirnentwicklung

Es wurden insgesamt sechs Signalwege ausgewählt und untersucht, welche für die menschliche Hirnentwicklung von Bedeutung sind. In den folgenden Kapiteln werden deren Funktionen in der humanen Gehirnentwicklung, die Folgen von Dysregulationen sowie der physiologisch aktive Signalweg mit seinen einzelnen Komponenten und Modulatoren näher beschrieben.

1.5.1 Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein stark konservierter Signalweg, welcher sowohl im embryonalen als auch im adulten Gehirn von Säugetieren eine wichtige Rolle spielt (Fortini, 2009; Imayoshi et al., 2013; Masjosthusmann et al., 2018; Zhang et al., 2019). Dieser Signalweg wurde ausgewählt, da er wichtig ist für die adäquate Proliferation, Migration und Differenzierung von hNPCs, unter letzterer besonders für die Neurogenese und die Gliogenese. Eine Dysregulierung des Notch-Signalwegs ist mit zahlreichen Erkrankungen des Gehirns assoziiert, unter anderem der Lissenzephalie und der zerebellären Hypoplasie (Chang et al., 2007; Hong et al., 2000), den ASS (Zhang et al., 2019), dem Alagille-Syndrom, der spondylokostalen Dysostose und dem *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy-Syndrome*, auch CADASIL-Syndrom genannt (Gridley, 2003).

Der Notch-Rezeptor wird im Trans-Kompartiment des Golgi-Apparates synthetisiert und lässt sich in Notch1 bis Notch4 einteilen (Fortini, 2009; Imayoshi et al., 2013). An demselben Rezeptor befinden sich jeweils eine intrazelluläre (*notch intracellular domain*, NICD) und eine extrazelluläre (*notch*

extracellular domain, NECD) Domäne (Imayoshi et al., 2013). Bei direkter Interaktion mit einer extrazellulären Liganden-Einheit, bestehend aus Delta, Serrate/Jagged und Lag2 (DSL), wird die NICD vom Rezeptor-NECD-Komplex abgespalten (Fortini, 2009). Dies passiert über einen zweistufigen Prozess, bei dem zunächst *A disintegrin and metalloprotease 17* (ADAM17) einen Großteil der NECD abspaltet und das *notch intracellular truncation fragment* (NEXT) übrigbleibt. NEXT ist in der Zellmembran eingebunden und wird anschließend durch die γ -Sekretase von intrazellulär mittels intramembranärer Proteolyse gespalten, die NICD kann daraufhin frei in der Zelle flottieren (Fortini, 2009). Die γ -Sekretase bleibt zunächst an NICD angeheftet und trennt sich später von dieser ab. Die NICD kann daraufhin den kanonischen Signalweg im Zellkern (Fortini, 2009), nicht-kanonische Signalwege außerhalb des Zellkernes in Gang setzen (Ayaz & Osborne, 2014). In dieser Arbeit wurden beide Signalwege moduliert und werden in ihrer Gesamtheit als Notch-Signalweg bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde Reelin als Aktivator des Notch-Signalwegs verwendet. Reelin wurde nach der Reeler-Maus benannt, welche aufgrund einer autosomal rezessiven Spontanmutation taumelte, auf englisch *‘to reel’*. Reelin ist ein Glykoprotein, welches von den Cajal-Retzius-Zellen im sich entwickelnden Gehirn ausgeschüttet wird und über den *very low density lipoprotein receptor* (VLDLR) und den Apolipoprotein E Rezeptor Typ 2 (ApoER2) agiert (Hawthorne, 2014; Jossin, 2020). Im Anschluss führen *cellular sarcoma* (SRC)-Rezeptortyrosinkinasen zu einer Phosphorylierung des Adapterproteins *disabled-1* (DAB1), welches wiederum die NICD stabilisiert und dadurch zu einer erhöhten Verfügbarkeit der NICD führt (Hashimoto-Torii et al., 2008; Hawthorne, 2014; Jossin, 2020). In humanen Studien konnte erkannt werden, dass ein Reelin-Mangel zur Lissenzephalie und zerebellären Hypoplasie führt (Chang et al., 2007; Hong et al., 2000) und Erkrankungen wie ASS, bipolare Störungen, Schizophrenien, Depressionen, die Alzheimer-Demenz und Epilepsien (Fatemi, Earle, & McMenomy, 2000; Guidotti et al., 2000; Jossin, 2020; Persico et al., 2001) auslösen kann.

Als Inhibitor des Notch-Signalwegs wurde N-[N-(3,5-difluorophenylacetyl)-l-alanyl]-(S)-phenylglycine-t-butylester (DAPT) verwendet. DAPT ist ein direkter Inhibitor der γ -Sekretase und disruptiert somit indirekt den Notch-Signalweg (Dong, 2021; Alattia, 2011). DAPT verhindert die zweite Abtrennung der NICD vom extrazellulären Komplex, woraufhin der Signalweg unterbrochen wird (Dong, 2021).

1.5.2 Kanonischer Wnt-Signalweg

Der kanonische *Wingless-Integration* (Wnt)-Signalweg wurde ausgewählt, da er im intakten Zustand einer der wichtigsten Regulatoren der Funktion neuraler Progenitorzellen ist (Esfandiari et al., 2012). Er wurde in mehreren Studien als essenziell für eine adäquate Neurogenese sowie für eine balancierte Regulierung von Proliferation und Differenzierung neuraler Progenitorzellen identifiziert (Dastjerdi et al., 2012; Gao et al., 2021; Nusse, 2008). Außerdem spielt er nicht nur eine wichtige Rolle im sich entwickelnden Gehirn (Nusse, 2008), sondern auch im adulten aufgrund seiner Fähigkeiten zur Regulation von Stammzellgenerierung, Reifung und Differenzierung (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015). Disruptionen des Wnt-Signalwegs können entwicklungsneurologische Erkrankungen wie ASS

und Epilepsie (Chen et al., 2009; Gao et al., 2021), aber auch neurologische und psychiatrische Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz, Schizophrenien und Morbus Parkinson auslösen (Gao et al., 2021). Ein veränderter Wnt-Signalweg konnte außerdem als Treiber verschiedener maligner Tumore identifiziert werden (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015; Shang, Hua, & Hu, 2017).

Es kann eine Einteilung in einen kanonischen, also einen β -catenin abhängigen und in nicht-kanonische, nicht β -catenin abhängige Signalwege vollzogen werden (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015). In dieser Arbeit wurde vor allem der kanonische Signalweg moduliert und wird deswegen genauer erläutert.

Das intrazelluläre Signalmolekül, welches beim Wnt-Signalweg von zentraler Bedeutung ist, ist das β -catenin. Dieses Protein liegt im Ruhezustand des Signalwegs ubiquitinyliert, somit inaktiv vor und ist an einen Proteinkomplex gebunden, welcher auch als Degradationskomplex (DK) bezeichnet wird. Der DK besteht aus den Proteinen und *Adenomatous polyposis coli* (APC), *Adenomatous polyposis coli tumor suppressor* (Axin2), *Dishevelled* (DVL), Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und Casein-Kinase 1 (CK1) und sorgt für den stetigen Abbau des durch GSK3 β phosphorylierten β -catenins (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015; Centelles, 2012; Hermida, Dinesh Kumar, & Leslie, 2017). Bindet nun von extrazellulär ein palmitoyliertes aktives Wnt-Protein über Hauptrezeptoren aus der Familie der *Frizzled*-Rezeptoren (FZDR) und Co-Rezeptoren aus der Familie der *low-density lipoproteinreceptor-related proteins* (LPR5/6), wandert der DK intrazellulär zur Zellmembran. Dieser Wanderungs- und Bindungsvorgang des DK reguliert vermutlich über zwei Mechanismen die erhöhte Verfügbarkeit von β -catenin: Früher wurde angenommen, dass die Membranbindung den DK direkt inhibiert. Neuere Daten suggerieren, dass durch die Bindung des DK an die Membran hauptsächlich die Phosphorylierung und Ubiquitinylierung von β -catenin gehemmt werden, wodurch weniger β -catenin abgebaut wird (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015). Freies intrazelluläres β -catenin wandert in den Zellkern und bindet dort einen Transkriptionsfaktoren-Komplex - bestehend aus dem T-Zell-Faktor (TCF) und dem *lymphoid-enhancer-factor-1* (LEF) - wodurch mehrere Wnt-Zielgene transkribiert werden (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015; Gao et al., 2021).

Als Aktivator des Wnt-Signalwegs wurde 6-[[2-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)-2pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile (CHIR99021) verwendet. CHIR99021 ist ein direkter, spezifischer Inhibitor von GSK3 β (Esfandiari et al., 2012). Dadurch wird die Aktivität des gesamten DK herabgesetzt und β -catenin wird stabilisiert (Law & Zheng, 2022; Ramirez-Calderon et al., 2022).

Als erster Inhibitor des Wnt-Signalwegs wurde *Inhibitor of Wnt Production 2* (IWP2) verwendet. IWP2 ist ein selektiver Hemmstoff von *Porcupine* (PORC), einem Protein aus der Gruppe der *membrane-bound O-Acyltransferases* (MBOAT). PORC palmitoyliert das Wnt-Protein und ermöglicht diesem dadurch die Bindung an den FZDR-LPR5/6-Komplex (Chen et al., 2009). Wird PORC inhibiert, kann das Wnt-Protein nicht palmitoyliert und die Signalkaskade nicht ausgelöst werden. Es kommt folglich keine Transkription von Wnt-Genen zustande.

Als weiterer Inhibitor des Wnt-Signalwegs wurde Pioglitazone ausgewählt. Pioglitazone gehört zu den Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR γ)-Agonisten und wird in der Humanmedizin als *Sodium Glucose linked transporter 2* (SGLT2)-Inhibitor bei Diabetes mellitus Typ II eingesetzt. Pioglitazone ist ein Antidiabetikum, welches zufällig über zahlreiche positive Effekte in neurodegenerativen Erkrankungen auffiel sowie Wnt-gesteuertes Tumorwachstum mindern konnte (Breidert et al., 2002; Vallee, Vallee, & Lecarpentier, 2019) und daraufhin als Signalwegsmodulator im Gehirn entdeckt wurde. PPAR γ -Agonisten aktivieren sowohl die intrazelluläre GSK3 β sowie das extrazelluläre Protein Dickkopf-1 (DKK1). GSK3 β ist Teil des DK, bei dessen Aktivierung die Aktivität des DK hochreguliert wird. Dadurch wird β -catenin vermehrt ubiquitinyliert und anschließend abgebaut (Vallee, Vallee, & Lecarpentier, 2019). DKK1 bindet wie Wnt an den LPR5/6 Rezeptor, bei Bindung wird jedoch der FZDR nicht rekrutiert, dadurch bindet der DK nicht an den Rezeptor-Komplex, sondern bleibt im Zytosol aktiv und ubiquitinyliert das β -catenin weiter. Pioglitazone hemmt zudem direkt eine Neuroinflammation durch Inhibierung von Zytokinen und der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und zeigte zahlreiche positive Wirkungen auf Erkrankungen wie Parkinson, ASS und weitere neurodegenerativen Erkrankungen. Es ist Gegenstand aktueller Studien, ob PPAR γ -Agonisten als Medikation für ASS genutzt werden können, da in *post mortem* Sezierungsstudien an Menschen mit ASS eine Hochregulation des Wnt-Signalwegs im Gehirn bewiesen werden konnte (Vallee, Vallee, & Lecarpentier, 2019).

1.5.3 GSK3 β -Signalweg

GSK3 β ist ein zelluläres Enzym und Signalmolekül, welches *Cross-Talks* zu Signalwegen besitzt wie bspw. zum Wnt- und mTOR-Signalweg und Interaktionen mit anderen Proteinen wie bspw. *RAC(Rho family)-alpha serine/threonine-protein kinase* (Akt, auch: Proteinkinase B) und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) aufweist. Darüber werden viele für die menschliche Hirnentwicklung wichtige Prozesse reguliert. Aufgrund dessen kann eine Veränderung von GSK3 β und seiner Co-Signalwege zu einer Bandbreite an Erkrankungen führen. Zu den entwicklungsneurologischen Erkrankungen zählen hier kognitive Beeinträchtigungen, Hirntumore, Fehlbildungen des Gehirns, ASS und Epilepsien (Chen et al., 2009; Gao et al., 2021; Populo, Lopes, & Soares, 2012). Das adulte Gehirn ist eher betroffen von Alzheimer-Demenz, Schizophrenien und Morbus Parkinson (Gao, Sang, & Cao, 2019), aber auch von frontotemporaler Demenz, Chorea Huntington und amyotropher Lateralsklerose (Laplane & Sabatini, 2012). Eine Hochregulierung von GSK3 β konnte auch in Karzinom-Zellen entdeckt werden (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015; Shang, Hua, & Hu, 2017).

Von zentraler Bedeutung im GSK3 β -Signalweg ist die Serin-Threonin Kinase Akt. Akt reguliert den Zellzyklus und dient als zentraler Verschaltungspunkt in vielen verschiedenen Signalwegen (Manning & Cantley, 2007).

Der Signalweg beginnt mit den Rezeptor-Tyrosinkinasen aus der Familie der Transmembranproteine, welche über Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und zelluläre Reize die Kaskade beeinflussen

können (Manning & Cantley, 2007). Bei Aktivierung des Signalwegs wird die PI3K an die Rezeptoren rekrutiert, welche das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert und damit aktiviert. PIP₃ ist ein an die Zellmembran gebundener Botenstoff. An ein PIP₃-Molekül bindet die *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDKP1), an ein anderes Akt (Manning & Cantley, 2007). PDKP1 phosphoryliert nach der Bindung an PIP₃ die Aktivierungsschleife im Akt-Protein. Darauf folgend phosphoryliert Akt direkt das Protein GSK3 β . Dadurch wird dessen enzymatische Aktivität für andere Substrate blockiert (Duda et al., 2020; Manning & Cantley, 2007). GSK3 β ist ebenfalls ein Schaltprotein, welches in vielen verschiedenen Signalwegen vor allem als inaktivierende Kinase bekannt ist (Duda et al., 2020; Manning & Cantley, 2007). Bei Inhibierung von GSK3 β können Substrate wie β -catenin (Wnt-Signalweg), *eukariotic Initiation Factor 2B* (eIF2B) oder das Tau-Protein nicht mehr ubiquitinyliert und abgebaut werden, wodurch die Transkription und Translation von Zielgenen gestartet werden (Duda et al., 2020; Hermida, Dinesh Kumar, & Leslie, 2017; Manning & Cantley, 2007).

Ein Aktivator des GSK3 β -Signalwegs ist Insulin, ein Proteohormon aus dem Pankreas. Es bindet an den Insulin-Rezeptor, eine durch Liganden aktivierbare Rezeptor-Tyrosinkinase (Lee & Pilch, 1994). Dadurch wird der oben beschriebene Signalweg durchlaufen, es kommt zu einer Aktivierung von Akt mit konsekutiver Inhibierung von GSK3 β und führt somit zu einer verminderten Phosphorylierung der GSK3 β -Substrate, was zur Aktivierung des Signalwegs führt (McManus et al., 2005; Pal et al., 2017; Sutherland, Leighton, & Cohen, 1993).

Ein weiterer Aktivator des GSK3 β -Signalwegs ist das in Absatz 1.5.2 erläuterte CHIR99021, welches GSK3 β spezifisch und direkt inhibiert, dessen Substratumsetzung blockiert und konsekutiv den Signalweg aktiviert (Law & Zheng, 2022; Ramirez-Calderon et al., 2022).

Der Inhibitor des GSK3 β -Signalwegs ist der PPAR γ -Agonist Pioglitazone, welcher ebenfalls bereits oben in Kapitel 1.5.2 als direkter GSK3 β -Aktivator beschrieben wurde. Eine Hochregulierung von GSK3 β ohne Gegenregulation führt zu vermehrter Ubiquitinylierung und konsekutivem Abbau von dessen Substraten, wodurch es zur verminderten Aktivierung des Signalwegs kommt (Vallee, Vallee, & Lecarpentier, 2019).

1.5.4 EPR-Signalweg

Die für diese Arbeit relevanten Effekte des Prostaglandin E₂-Rezeptor (EPR)-Signalwegs sind die Zelldifferenzierung sowie -proliferation (Wong et al., 2016). Sowohl das in dieser Arbeit als Aktivator genutzte Prostaglandin E₂ (PGE₂) als auch Cyclooxygenase-Inhibitoren wie das hier genutzte Celecoxib wirken sich auf nahezu alle Organsysteme des Körpers aus und können zahlreiche Erkrankungen auslösen. Außerdem kann PGE₂ die BHS passieren und Einfluss auf das Gehirn nehmen (Smyth et al., 2009). Disruptionen des EPR-Signalwegs werden folglich, vermutlich auch aufgrund der zahlreichen *Cross-Talks* zu Wnt, mit der Entstehung von neurotoxikologischen Erkrankungen wie den ASS in Verbindung gebracht (Rai-Bhagal et al., 2018; Wong et al., 2014). Veränderungen im PGE₂-Spiegel können sowohl protektiv als auch neurodegenerativ wirken und Erkrankungen wie Alzheimer-

Demenzen auslösen (Wei et al., 2010). Außerdem kann es bei einer Überaktivierung des Signalwegs, also bei vermehrtem physischem oder psychischem Stress, zu psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen oder Störungen wie chronischem Fieber, Lethargie, Hypersomnie, Anorexie und Hyperalgesie kommen (Furuyashiki & Narumiya, 2011).

Der Prostaglandin-Rezeptor-Signalweg kann über vier verschiedene G-Protein-Rezeptor-gekoppelte Rezeptortypen (GPR) stimuliert werden: Prostaglandin-E2-Rezeptor 1 bis -Rezeptor 4 (EP1-4). Prostaglandine stammen aus der Gruppe der Eicosanoide und wirken als Gewebshormone, welche in einem gesunden Organismus zu einem bestimmten Ausmaß ausgeschüttet werden (Sreeramkumar, Fresno, & Cuesta, 2012; Wong et al., 2016).

PGE2 ist das meist vertretene Prostanoid im gesamten Körper (Sreeramkumar, Fresno, & Cuesta, 2012). Bei entzündlichen Prozessen, aber auch unter psychischer Belastung wird PGE2 vermehrt ausgeschüttet und induziert Reaktionen wie bspw. Fieber und die Kardinalsymptome von Entzündungen (Furuyashiki & Narumiya, 2011; Sreeramkumar, Fresno, & Cuesta, 2012).

PGE2 wird aus der Arachidonsäure (ARA) in zwei Schritten synthetisiert: Zunächst werden durch die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX1/2) zwei Sauerstoffgruppen ($2O_2$) an die ARA angehängt. Im Anschluss stellen die zytosolischen Prostaglandin E-Synthasen (PGES) sowie die mikrosomalen PGES1 und 2 über mehrere Schritte PGE2 her (Furuyashiki & Narumiya, 2011; Sreeramkumar, Fresno, & Cuesta, 2012).

Bindet PGE2 an einen der EP1-4 Rezeptoren, wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Bae et al., 2022). Die PKA ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche β -catenin phosphoryliert und dadurch die Einwanderung von phosphoryliertem β -catenin in den Nukleus mit konsekutiver Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Rai-Bhagal et al., 2018). Des Weiteren wird untersucht, ob die aktivierte PKA GSK3 β inhibiert und dadurch ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären β -catenin-Level führen kann (Rai-Bhagal et al., 2018). Außerdem aktiviert die Bindung von PGE2 an die EPR auch die PI3K. Dies lässt Rückschlüsse auf *Cross-Talks* zu den mTOR und GSK3 β -Signalwegen ziehen (Wong et al., 2014; Wong et al., 2016).

Die Regulation von β -catenin weist darauf hin, dass der PGE2-Signalweg eng mit dem Wnt-Signalweg verbunden ist. Zudem gibt es eine positive *feedback*-Schleife im Wnt-PGE2-*Cross-Talk*: Das Wnt-Zielgen Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (PTGS2) kodiert für die COX2 und ist somit verantwortlich für die Herstellung von PGE2 (Wong et al., 2016).

Aus den Syntheseschritten ergeben sich sowohl die Verwendung des EPR-Signalwegs-Inhibitors Celecoxib als auch des Aktivators PGE2. Das aktive PGE2 stimuliert die EPR und führt dadurch zu einer Aktivierung des Signalwegs (Furuyashiki & Narumiya, 2011; Rai-Bhagal et al., 2018; Sreeramkumar, Fresno, & Cuesta, 2012). Celecoxib hingegen inhibiert die COX2, somit wird bereits der erste Syntheseschritt des PGE2 blockiert. Konsekutiv wird der Signalweg vermindert aktiviert (Rai-Bhagal et al., 2018).

1.5.5 mTOR-Signalweg

Der *mechanistical target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg sorgt im humanen (embryonalen) Gehirn vor allem für die Proliferation, Migration und die nahrungs- bzw. nährstoffsensitive Regulation von Zell-Wachstum und Differenzierung sowie das Zell-Überleben und die Autophagie (Ayuk & Abrahamse, 2019). Eine Dysregulation des Signalwegs ist mit der Entstehung einiger Entwicklungsstörungen assoziiert, welche auch mit entwicklungsneurologischen Erkrankungen einhergehen. Hierzu zählen bspw. das *Cowden's-Syndrom* (geistige Behinderungen, Makrozephalie, ASS) und die tuberöse Sklerose (Fehlbildungen des Gehirns, Epilepsie, teilweise kognitive Retardierung) (Populo, Lopes, & Soares, 2012). All diese Erkrankungen weisen ein allgemein erhöhtes Karzinomrisiko auf und fördern die Entstehung benigner Hirntumore (Populo, Lopes, & Soares, 2012). mTOR ist einer der bedeutendsten Signalwege für die Autophagie und ist damit wichtig für die Verhinderung von Akkumulation toxischer Metabolite und Proteinaggregate im Gehirn, wodurch es eine große Rolle in der zellulären Alterung spielt. Es wird vermutet, dass besonders diese Fähigkeit des mTOR-Signalwegs über eine Disruption zu einer großen Anzahl neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer-Demenz, frontotemporaler Demenz, Chorea Huntington und Amyotropher Lateralsklerose führen kann (Laplane & Sabatini, 2012). Aber auch maligne Tumore und metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus können auf eine Dysregulation des mTOR-Signalwegs zurückgeführt werden (Laplane & Sabatini, 2012; Sancak et al., 2007).

mTOR ist ein hoch konservierter Signalweg. An seinem Anfang stehen die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) (Populo, Lopes, & Soares, 2012). Diese Transmembranproteine mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität aktivieren bei Stimulierung die PI3K. Diese wiederum phosphoryliert das PIP2 zu PIP3. PIP3 agiert als sekundärer Botenstoff, diffundiert frei durch das Zytosol und bindet für die Aktivierung des mTOR-Signalwegs an die Akt-Kinase (Populo, Lopes, & Soares, 2012). Die aktivierte Akt-Kinase hemmt die Komplexbildung von Hamartin (*tuberous sclerosis 1*, TSC1) mit Tuberin (*tuberous sclerosis 2*, TSC2). Die Hemmung des TSC1/2-Komplexes führt zu einer verminderten Hemmung des *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) (Populo, Lopes, & Soares, 2012). Rheb ist eine kleine Guanosintriphosphatase (GTPase), welche durch Hydrolyse Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) umsetzt. Im aktivierten Zustand stimuliert Rheb im nächsten Schritt den mTOR-complex-1 (mTORC1), welcher sich aus mTOR, *regulatory associated protein of mTOR* (RapTOR), *mammalian lethal with SEC13 protein 8* (mLST8), *proline-rich Akt substrate of 40 kDa* (PRAS40) und *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (DepTOR) zusammensetzt (Populo, Lopes, & Soares, 2012). Der mTORC1 Komplex wirkt im Folgenden auf viele verschiedene Transkriptionsfaktoren und nimmt zahlreiche Einflüsse auf den Organismus.

Als Aktivator wurde 5-(4-Hydroxybenzylidene)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (MHY1485) verwendet. MHY1485 kann aufgrund seiner Struktur an mTOR binden, führt zu einer Phosphorylierung und aktiviert damit unmittelbar das mTOR-Molekül im mTORC1-Komplex. Damit verstärkt MHY1485 die Wirkung des Signalwegs (Choi et al., 2012).

Als Inhibitor dieses Signalwegs wurde Everolimus verwendet, ein Rapamycin-Derivat, welches in der Medizin als Immunsuppressivum eingesetzt wird. Everolimus bindet mit hoher Affinität an das Immunophilin FK506-Bindungsprotein-12 (FKBP12) im Zytosol. Als Komplex binden sie gemeinsam an die FKBP-Rapamycin-Bindungsstelle (FRB) von mTOR. Dadurch wird der gesamte mTORC1-Komplex inhibiert und der Signalweg wird abgebrochen (Benjamin et al., 2011; Meric-Bernstam & Mills, 2004).

1.5.6 STAT3-Signalweg

Die für diese Dissertation relevanten Effekte des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)-Signalwegs sind das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation von Zellen in der embryonalen Entwicklung (Raz et al., 1999; Zhao et al., 2019; Zou et al., 2020). Zudem hält der STAT3-Signalweg die Pluripotenz-Fähigkeit der Stammzellen aufrecht (Raz et al., 1999). Disruptionen STAT3-codierender Gene werden mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Chromosomenaberrationen wie der Trisomie 11 in Verbindung gebracht (Raz et al., 1999). Bei dieser Erkrankung kann es zu neurologischen Anomalien wie sensorineuraler Schwerhörigkeit, Analgesie und mangelnder Bildung expressiver Sprache kommen, aber auch psychiatrische Störungen mit Ähnlichkeiten zur ASS und auditiven Halluzinationen wurden beobachtet (orpha.net, 2024). Ein hyperaktiver STAT3-Signalweg kann im adulten Gehirn zu einer Neuroinflammation und darüber zu einer Progression der Alzheimer-Demenz führen (Wen & Hu, 2024). STAT3 nimmt außerdem einen Einfluss auf das Immunsystem und findet sich heraufreguliert in einer Vielzahl von Karzinomen (Zou et al., 2020). STAT3 kann außerdem durch den mTOR-Signalweg moduliert werden, die dann ausgelösten Erkrankungen finden sich in Kapitel 1.5.5.

Der STAT3-Signalweg wird über Zytokin- bzw. Wachstumsfaktor-Rezeptoren reguliert. Der Signalweg ist in unstimulierten Zellen nicht aktiv, da die STAT-Moleküle im Zytoplasma in einem methylierten bzw. acetylierten Zustand vorliegen (Zou et al., 2020). An der intrazellulären Seite der Rezeptoren befinden sich die phosphorylierenden Enzyme Tyrosin-Kinase 2 (TYK2) und Janus-Kinase (JAK). Bei Stimulation der Rezeptoren, bspw. durch Interleukin-6, *growth hormone* (GH) oder *granulocyte-colony stimulating factor* (GCSF), kommt es zur einfachen Phosphorylierung der intrazellulären STAT3-Moleküle (Zou et al., 2020) an dessen Tyrosin- oder Serin-Resten. Für die maximale Aktivierung der Zielgentranskription ist es jedoch essenziell, dass die Phosphorylierung durch zwei unabhängige Proteine durchgeführt wird. Die erste Phosphorylierung erfolgt durch die TYK/JAK-Familie. Die zweite Phosphorylierung erfolgt durch die Tyrosinkinasen SRC und *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1* (ABL) (Zou et al., 2020); sie kann aber auch durch mTOR und durch mTOR-aktivierte Kinasen erfolgen (Vella et al., 2020; Yokogami et al., 2000). Die Phosphorylierung ist ein Reiz für die STAT3-Moleküle, sich zu Dimeren zusammenzulagern. In dieser Form können sie in den Zellkern einwandern und die Transkription und Translation Zytokin-responsiver Gene starten (Zou et al., 2020).

Als Aktivator wurde Colivelin verwendet. Colivelin bindet an Rezeptoren mit Tyrosinkinase- bzw. Januskinaseaktivität. Dadurch wird die Phosphorylierung von STAT3 angetrieben, und Zielgene können transkribiert werden (Zhao et al., 2019).

Als Inhibitor wurde Limonin verwendet. Limonin inhibiert die Migrationsfähigkeit von am Tyrosinrest phosphoryliertem STAT3, somit kann dieses nicht in den Zellkern einwandern. Dadurch blockiert Limonin die Eigenschaften des Signalwegs, einen zellulären Verbund zu stabilisieren, Stammzellfähigkeit zu stärken sowie Differenzierung und Migration zu fördern (Gao, Sang, & Cao, 2019).

1.5.7 Zusammenfassung der Signalwege

In der untenstehenden Abbildung sind die Wechselwirkungen und Beziehungen der einzelnen Signalwege zueinander dargestellt (s. Abb. 4). Zwischen den einzelnen Kaskaden gibt es zahlreiche Interaktionen, was die Komplexität der zellulären Vorgänge in Säugetieren abbildet. Dies lässt vermuten, dass die Disruption einzelner Signalwege erhebliche Auswirkungen auf den menschlichen Organismus und damit auch auf die Entwicklung des menschlichen Gehirns haben könnte. Demgegenüber steht die Möglichkeit, dass die zahlreichen Interaktionen auch als Rettungsmechanismen ausgebildet wurden, welche den Ausfall eines Signalwegs durch die Überaktivierung eines anderen kompensieren und dadurch eine physiologische Funktion, Weiterentwicklung und das Überleben von Zellen und eines Organismus sichern können.

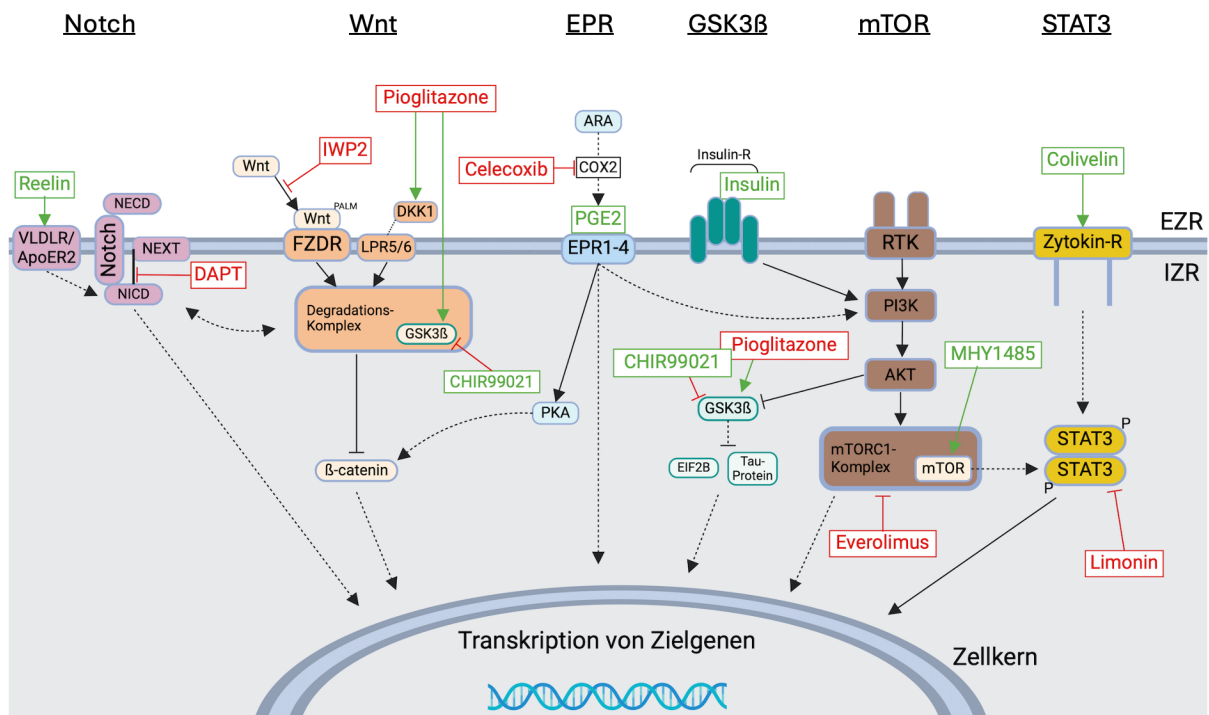


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung über die in dieser Arbeit modulierten Signalwege mit ihren Aktivatoren (eckig, grün) und Inhibitoren (eckig, rot). Die Abbildung kann in einen Extrazellulärraum (EZR) und einen Intrazellulärraum (IZR) unterteilt werden (rechts oben im Bild). Intrazellulär befindet sich der Zellkern, in welchem bei adäquatem Reiz die Transkription von Zielgenen stattfindet. Aktivierende Signale wurden mittels grüner Pfeile, inhibierende mittels roter T-förmiger Zeichen gekennzeichnet. Schwarze Pfeile und T-Zeichen

zeigen den Verlauf der Signalwege an. Gestrichelte schwarze Pfeile symbolisieren vereinfacht den Verlauf der Signalwege. Geschwungene, gestrichelte schwarze Pfeile signalisieren Wechselwirkungen zwischen Signalwegen entweder in eine (eine Pfeilspitze), oder beide (Pfeilspitzen an beiden Enden) Richtungen. Von links nach rechts:

Notch-Signalweg: Der Notch-Rezeptor beinhaltet eine *Notch extracellular-* und *-intracellular domain* (NECD und NICD). Essenziell zur Aktivierung des Notch-Signalwegs ist die Abspaltung der NICD (Fortini, 2009; Imayoshi et al., 2013). Reelin führt über die Stimulation der *very low density lipoprotein-* und Apolipoprotein E Rezeptoren Typ 2 (VLDLR und ApoER2) zu einer Stabilisierung der abgespaltenen NICD, was den Signalweg aktiviert (Hawthorne, 2014; Jossin, 2020). N-[N-(3,5-difluorophenylacetyl)-l-alanyl]-l-phenylglycine-t-butylester (DAPT) dagegen inhibiert die Aktivität der γ -Sekretase, welche für die Abspaltung der NICD vom *notch intracellular truncation fragment* (NEXT) verantwortlich ist. Somit kann sich die NICD nicht abspalten und nicht in den Zellkern zur Transkription von Zielgenen einwandern (Dong et al., 2021).

Wingless-Integration (Wnt)-Signalweg: Der Notch-Signalweg hat zahlreiche Wechselwirkungen mit dem Wnt-Signalweg. Der Wnt-Signalweg wird im Organismus über ein palmitoyliertes (PALM) Wnt-Molekül aktiviert, welches an den *Frizzled*-Rezeptor (FZDR) und den Co-Rezeptoren der *low-density lipoproteinreceptor-related proteins* (LPR5/6) bindet. Daraufhin spaltet sich Dickkopf-1 (DKK1) von LPR5/6 ab und die Rezeptoren binden den Degradations-Komplex (DK), welcher auch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) beinhaltet, an die Zellmembran. Im Folgenden kann das Zielmolekül β -catenin nicht vom DK abgebaut werden und wandert in den Zellkern ein (Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015; Gao et al., 2021). Der Aktivator dieses Signalwegs 6-[[2-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitril (CHIR99021) inhibiert die GSK3 β , was zu einer erhöhten Verfügbarkeit von β -catenin führt, welches vermehrt in den Zellkern einwandern und die Transkription starten kann (Esfandiari et al., 2012; Ramirez-Calderon et al., 2022). Der erste Inhibitor des Signalwegs ist IWP2, welches die Palmitoylierung von Wnt inhibiert. Dadurch kann Wnt nicht an den Rezeptor binden, was konsekutiv zur Aktivierung des DK führt (Chen et al., 2009). Der zweite Inhibitor Pioglitazone sorgt über zwei Mechanismen für die Inhibierung von β -catenin: Von extrazellulär verhindert er die Abspaltung von DKK1 vom LPR5/6 und inhibiert damit den Start des Signalwegs, von intrazellulär aktiviert Pioglitazone die GSK3 β und sorgt damit für den vermehrten Abbau von β -catenin (Vallee, Vallee, & Lecarpentier, 2019).

Prostaglandin E2-Rezeptor (EP2)-Signalweg: Aus der Arachidonsäure (ARA) wird über mehrere Schritte, die die Cyclooxygenase-2 (COX2) involvieren, Prostaglandin E2 (PGE2) gebildet (Sreeramkumar, Fresno, & Cuesta, 2012). PGE2 aktiviert den Signalweg, indem es an die EP2 Prostaglandin Rezeptoren Typ 1-4 (EP1-4) bindet und dann über die Proteinkinase A (PKA) und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), aber auch über andere Wege die Transkription im Zellkern starten kann (Bae et al., 2022; Rai-Bhogal et al., 2018). Die PKA bspw. stärkt β -catenin und aktiviert damit auch den Wnt-Signalweg, während die Aktivierung von PI3K den *Mechanistical target of Rapamycin* (mTOR)-Signalweg stimuliert (Wong et al., 2016). Der Inhibitor des Signalwegs ist Celecoxib, welcher die COX2 beeinträchtigt und damit die Herstellung von PGE2 vermindert (Rai-Bhogal et al., 2018).

GSK3 β -Signalweg: GSK3 β ist ein intrazelluläres Molekül, was bereits aus dem Wnt-Signalweg bekannt ist (Manning & Cantley, 2007). Der Aktivator des Signalwegs ist Insulin, welches an Rezeptoren wie dem Insulin-Rezeptor (Insulin-R) bindet. Daraufhin wird die PI3K aktiviert, welche wiederum die *RAC(Rho family)-alpha serine/threonine-protein kinase* (AKT) aktiviert, die daraufhin das GSK β -Molekül hemmt. Dadurch werden die inhibitorischen Effekte von GSK3 β selbst geschwächt und Zielmoleküle wie bspw. das Tau-Protein oder der *eukaryotic Initiation Factor 2B* (eIF2B) heraufreguliert, welche die Transkription aktivieren können (Lee & Pilch, 1994; Pal et al., 2017). Als zweiter Aktivator des Signalwegs fungiert erneut CHIR99021 wegen der bekannten Wirkung. Inhibitorisch wirkt Pioglitazone, welches GSK3 β aktiviert und zu einer Reduktion der Zielproteine führt, was den Signalweg insgesamt hemmt.

mTOR-Signalweg: Rezeptortyrosinkinasen (RTK) stehen am Anfang des mTOR-Signalwegs und aktivieren bei adäquatem Reiz die PI3K, welche die AKT-Kinase stimuliert, die daraufhin den mTOR-complex 1 (C1) stärkt. Der mTORC1-Komplex beinhaltet unter anderem das mTOR-Molekül und sorgt im weiteren Verlauf für die Transkription von Zielgenen (Populo, Lopes, & Soares, 2012). Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt mittels 5-(4-Hydroxybenzylidene)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (MHY1485), welches mTOR direkt aktiviert und zur Transkription von Zielgenen führt (Choi et al., 2012). Everolimus ist ein Inhibitor des mTORC1-Komplexes und hemmt darüber die weitere Kaskade des Signalwegs (Benjamin et al., 2011).

Signal transducer and activator of transcription (STAT3)-Signalweg: Der STAT3-Signalweg beginnt mit einer Aktivierung der Zytokin-Rezeptoren (Zytokin-R), welche über mehrere Schritte STAT3-Moleküle phosphorylieren, wodurch sich diese zu Dimeren zusammenlagern und direkt in den Zellkern zur Transkription einwandern können (Yokogami et al., 2000; Zou et al., 2020). Aktivator des Signalwegs ist Colivelin, welches direkt an die Zytokin-R bindet und darüber den Signalweg auslöst (Zhao et al., 2019). Inhibitor des Signalwegs ist Limonin, welches die Migrationsfähigkeit von phosphoryliertem STAT3 reduziert und darüber die Transkription von Zielgenen verhindert (Gao, Sang, & Cao, 2019). Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.6 Ziele der Arbeit

Der beschriebene Paradigmenwechsel in der toxikologischen Risikobewertung zeigt, dass eine dringende Notwendigkeit besteht, alternative Testmethoden zu Tierversuchen zu etablieren, zu explorieren und weiterzuentwickeln. Besonders zur Abschätzung von Entwicklungsneurotoxizität sind Methoden gefragt, die schneller, kostengünstiger und mit hoher Humanrelevanz das entwicklungsneurotoxikologische Potential von Substanzen vorhersagen können, da weltweit bisher sehr wenige Substanzen auf diesen Endpunkt getestet wurden. Daher wurde in einem internationalen Konsortium eine DNT-IVB etabliert, welche mittlerweile von der OECD empfohlen wird (OECD, 2023). Bestandteil dieser DNT-IVB ist auch der humanbasierte Neurosphären-Assay, welcher die Basis dieser Arbeit darstellt. Die weitere Definition der biologischen Applikationsdomäne der DNT-IVB und des Neurosphären-Assays sind wichtig, um das Vertrauen in die biologische Validität des Assays zu stärken und so dessen regulatorische Akzeptanz voranzutreiben. Vor diesem Hintergrund lauten die Ziele meiner Arbeit:

1. Die Untersuchung der Einflüsse der Signalwege Notch, Wnt, GSK3 β , EPR, mTOR und STAT3 auf die basalen Prozesse der fetalen humanen neuronalen Entwicklung und damit auf das DNT-Potential ihrer Signalwegsmodulation.
2. Die Verbesserung der Validität des Neurosphären-Assays durch ein erweitertes Verständnis der biologischen Applikationsdomäne.

Zusätzlich zur Publikation der hier generierten Daten sollen diese zur internationalen Verfügbarkeit und Sichtbarkeit sowie zur weiteren Verkleinerung der DNT-Datenlücke in der *ToxCast*-Datenbank der US-EPA veröffentlicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerätschaft	Hersteller
0,5-10/10-100/100-1000 µl - Pipetten	Eppendorf
8-Kanalpipette, elektronisch	Integra
12-Kanalpipette, 10-100 µl	Eppendorf
Autoklav	KSG GmbH, Bioklav
Binokular	SZ51, Olympus
Cellomics Array Scan variable temperature incubator (VTI) high content screening (HCS) Reader	Thermo Fisher Scientific
Gewebezerkleinerer	McIlwain Tissue Chopper, Vibratome
Inkubatoren	HeraCell240, Thermo Scientific MCO 20AIC, Panasonic
Kamera	ColorMosaik 18.2, Visitron Systems
Kühl-/Gefrierschränke	Comfort, Liebherr Profi Line, Liebherr Hera Freeze, Thermo Fisher Scientific
Lichtmikroskop	CKX41, Olympus
Multimode Mikroplattenleser	Infinite M200Pro, TECAN
Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank	HeraGuard, Thermo Fisher Scientific Mars Safety Class 2 SCANLAF
Tischzentrifuge	5417R, Eppendorf
Vakuumpumpe	KNF Lab, Laboport
Wärmeschrank	Memmert
H ₂ O-Deionisierer	Mili-Q. Milipore

Tabelle 1: Für diese Arbeit verwendete Gerätschaften unter Angabe der jeweiligen Hersteller.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
100x20 mm Petrischalen	BD-Falcon
50 ml Kulturflasche	Greiner Bio-One
8-Kammer-Objektträger	BD-Falcon
60x15 mm Petrischalen	Greiner Bio-One

90x20 mm Petrischalen	Greiner Bio-One
96-well Flachbodenplatten, farblos	Sarstedt GmbH/Greiner Bio-One
96-well Flachbodenplatten, schwarz	BRAND
96-well Flachbodenplatten, weiß	BRAND
96-well Rundbodenplatten, farblos	Falcon
Einwegpasteurpipetten	Roth
Einwegpipetten: 5/10/25 ml	Greiner Bio-One
Eppendorf-Gefäß: 0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf
Falcon-Röhrchen: 15/50 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen: 10/100/1000 µl	Nerbe plus, Biozym
Pipettenspitzen: 50/100/1000 µl	Hamilton
Pipettenspitzen: 1250 µl	Integra
Rasierklngen	Wilkinson

Tabelle 2: Für diese Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien unter Angabe der jeweiligen Hersteller.

2.1.3 Materialien für zellbiologische Methoden

2.1.3.1 Zellen

Die beschriebenen Arbeiten wurden mit neuronalen Progenitorzellen aus Vollhirnhomogenaten dreier männlicher und zweier weiblicher humaner Individuen der Firma Lonza Group Ltd. (Belgien) durchgeführt. Die Zellen von vier Individuen stammen dabei aus der GW 16 (männlich: 0000516385, 0000549062, weiblich: 0000540263, 0000550806), von einem aus der GW 19 (0000391398, männlich). Die Progenitorzellen wurden kryokonserviert bezogen und gelagert. Zur Durchführung der Experimente wurden diese aufgetaut und weiterverarbeitet.

2.1.3.2 Medien und Medienzusätze

Medien und Medienzusätze	Hersteller
Anti-Adherence Rinsing Solution	Stemcell Technologies
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen
DMEM/F-12 mit 15 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Stemcell Technologies
Ham's F12 Nährstoffmischung	Gibco, Invitrogen
Glutamin	PAN-Biotech
B27 Supplement, 50x	Gibco, Invitrogen
N2 Supplement, 100x	Gibco, Invitrogen
EGF, human rekombinant 10 µg/ml	Gibco, Life Technologies
FGF, human rekombinant 10 µg/ml	R&D Systems

<i>Phosphate buffered saline (PBS) (-/-) und (+/+)</i>	Merck
Penicillin/Streptomycin, 100x	PAN-Biotech

Tabelle 3: Für diese Arbeit verwendete Medien und Medienzusätze unter Angabe der jeweiligen Hersteller.

2.1.3.3 Kulturmedien

Kulturmedium	Bestandteile
<u>B27-Proliferationsmedium</u>	DMEM und Ham's F12 (1:3) (DMEM (1x) + GlutaMAX™-I + 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvate) 1:50 B27 Supplement, 50x 1:100 Penicillin/Streptomycin, 100x 20 ng/ml EGF 20 ng/ml FGF human rekombinant
<u>B27-Medium without (w/o, ohne Wachstumsfaktoren)</u>	DMEM und Ham's F12 (1:3) (DMEM (1x) + GlutaMAX™-I + 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvate) 1:50 B27 Supplement (50x) 1:100 Penicillin/Streptomycin (100x)
<u>N2-Differenzierungsmedium</u>	DMEM und Ham's F12 (1:3) (DMEM (1x) + GlutaMAX™-I + 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvate) 1:100 N2-Supplement, 100x 1:100 Penicillin/Streptomycin, 100x

Tabelle 4: Für diese Arbeit verwendete Kulturmedien unter Angabe der einzelnen Bestandteile.

2.1.3.4 Beschichtungsreagenzien

Beschichtungsreagenz	Hersteller
Laminin, 1 mg/ml	Merck
Poly-D-Lysin-Hydrobromid (PDL)	Merck
Poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Poly-HEMA)	Merck

Tabelle 5: Für diese Arbeit verwendete Beschichtungsreagenzien unter Angabe der jeweiligen Hersteller.

2.1.3.5 Immunzytochemie

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
<i>Bovine serum albumine (BSA)</i> , 0,1-1 %	Merck
<i>Goat serum (GS)</i> , 2-5 %	Merck

Hoechst 33258, 1 %	Merck
Natronlauge, 1N	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
10x PBS (-/-)	PAN-Biotech
<i>Rabbit serum</i> (RS), 2-5 %	Merck
Triton-X 100	Merck

Tabelle 6: Für die immunzytochemischen Experimente dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien unter Angabe der jeweiligen Hersteller.

Lösungen	Hersteller
<u>Paraformaldehyd-Lösung (12 %)</u>	12 g PFA 5 Tropfen 1 N NaOH 100 ml PBS (-/-) 1x pH 7,4
<u>1x PBS (-/-)</u>	100 ml 10x PBS (-/-) + 900 ml H ₂ O
<u>PBS-T (0,1 % (v/v) Triton X)</u>	10 µl Triton-X 100 10 ml 1x PBS (-/-)
<u>Hoechst 33258 (0,2 mg/ml)</u>	10 mg/ml Hoechst 33258 Stock in DMSO 1:50 in H ₂ O verdünnen

Tabelle 7: Wasch- und Fixationslösung der immunzytochemischen Experimente und deren jeweilige Zusammensetzung.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Mouse-Anti-O4	1:400	R&D Systems	#MAB1326
Rabbit-Anti-β3-Tubulin Alexa 647	1:400	Abcam	ab190575

Tabelle 8: Primäre Antikörper für immunzytochemische Färbungen mit verwendeten Verdünnungen, Herstellern und Bestellnummern.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Mouse-IgM Alexa 488	1:400	Life Technologies	#A-21042

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für immunzytochemische Färbungen unter Angabe der verwendeten Verdünnung, des Herstellers und der Bestellnummer.

2.1.3.6 5-Bromo-2'-Desoxyuridine (BrdU) Zell-Proliferationstest

Verwendete Substanzen	Hersteller
Accutase™	Gibco, Life Technologies
Cell Proliferation ELISA, BrdU chemilumineszent	Roche (#11669915001)

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für immunzytochemische Färbungen unter Angabe der verwendeten Verdünnung, des Herstellers und der Bestellnummer.

2.1.3.7 Alamar-Blue-Viabilitätsbestimmung

Für die Bestimmung der mitochondrialen Aktivität, also der Viabilität der hNPCs, wurde der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay von der Firma Promega (#G8081) verwendet. Er wird im Folgenden auch als Viabilitäts-Assay bezeichnet.

2.1.3.8 Lactatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsbestimmung

Für die Lactatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsbestimmung wurde der CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assay® von der Firma Promega (#G7891) verwendet. Er wird im Folgenden als LDH-Assay bezeichnet.

2.1.3.9 Chemikalien für zelluläre Signalwegsregulierung

Im Folgenden (Abb. 5) soll ein Überblick über die Signalwege und ihre Substanzen gegeben werden. Dabei berücksichtigt die Abbildung die Angaben zu der Chemical Abstract Service Registry Number (CAS-Nummer), *Stock-Concentration* (Konzentration der Substanz in Lagerung, von welcher aus die Verdünnung stattfindet), dem Konzentrationsbereich, der Lösemittel und der jeweiligen Hersteller.

	<u>Substanzen</u>	<u>CAS-Nummer</u>	<u>Stock-Concentration</u>	<u>Konzentrationsbereich</u>	<u>Lösemittel</u>	<u>Hersteller</u>
1. Notch-Signalweg	A: Reelin	867021-12-3	2,45 mM	0,0003 µM – 0,003 µM	PBS (-/-)	R&D Systems
	I: DAPT	208225-80-5	40.000 mM	0,01 µM – 10 µM	DMSO	Sigma Aldrich
2. Kanonischer Wnt-Signalweg	A: CHIR99021	252917-06-9	10.000 mM	0,01 µM – 10 µM	DMSO	bio-technie/TOCRIS
	1. I: IWP2	686770-61-6	5.000 mM	0,007 µM – 5 µM	DMSO	bio-technie/TOCRIS
	2. I: Pioglitazone	111025-46-8	20.000 mM	0,03 µM – 20 µM	DMSO	Sigma Aldrich
3. GSK3β-Signalweg	1. A: Insulin	11061-68-0	1.808 mM	0,03 µM – 20 µM	DMSO	Sigma Aldrich
	2. A: CHIR99021	siehe oben				
	I: Pioglitazone	siehe oben				
4. EPR-Signalweg	A: PGE2	363-24-6	20.000 mM	0,03 µM – 20 µM	H ₂ O	Sigma Aldrich
	I: Celecoxib	169590-42-5	20.000 mM	0,04 µM – 30 µM	DMSO	Sigma Aldrich
5. mTOR-Signalweg	A: MHY1485	326914-06-1	20.000 mM	0,03 µM – 20 µM	DMSO	Selleckchem
	I: Everolimus	159351-69-6	30.000 mM	NPC1: 0,00004 µM – 0,04 µM NPC2-5: 0,04 – 10 µM	DMSO	Sigma Aldrich
6. STAT3-Signalweg	A: Colivelin	867021-83-8	189,025 mM	0,0001 µM – 1 µM	H ₂ O	bio-technie/TOCRIS
	I: Limonin	1180-71-8	20.000 mM	0,03 µM – 20 µM	DMSO	Sigma Aldrich

Abb. 5: Die jeweiligen Chemikalien zur Signalwegsmodulation zugeordnet zu ihren Signalwegen unter Angabe der jeweiligen Chemical Abstract Service Registry Number (CAS-Nummer) und der *Stock-Concentration*, des Konzentrationsbereiches, der Lösemittel und der Hersteller.

2.1.4 Verwendete Software

Software	Version	Verwendung
BioRender	Ohne etablierte Versionsangabe	Erstellung von Abbildungen
CellomicsScan	6.6.0	Automatisierte Aufnahme von Bildern zur Quantifizierung der Zell-Veränderungen
Endnote 21	21.0.1	Literaturverzeichnis, Quellenangaben
Excel	16.88	Berechnung, Auswertung und graphische Darstellung der Daten, Führung des Laborbuches, Erstellen von Übersichten
GraphPad Prism	8.4.1	Statistische Analyse, graphische Darstellung der Daten
Icontrol (TECAN Reader)	3.22	Messung von Lumineszenz und Fluoreszenz von (Mikro-)Platten
ImageJ	1.52p	Auswertung
Omnisphero	V45	Auswertung der immunzytochemischen Färbungen
PowerPoint	16.88.1	Erstellung von Abbildungen, Schemata
Spot Advanced	4.6.4.8	Lichtmikroskopische Aufnahmen
Word	16.88	Texterstellung und -bearbeitung, Erstellen von Übersichten

Tabelle 11: Für diese Arbeit verwendete Software mit Version und Verwendungszweck.

2.2 Methoden

2.2.1 Beschichtungen

Alle Beschichtungsvorgänge fanden unter den sterilen Bedingungen statt. Es wurden zu den Kultivierungsbedingungen und Reaktionsgefäßen passende Beschichtungen ausgewählt.

2.2.1.1 PDL-Laminin-Beschichtung

Für den NPC2-5-Assay (Migration und Differenzierung) wurden 96-*well*-Flachbodenplatten mit Poly-D-Lysin (PDL) und Laminin beschichtet. Diese Beschichtung dient als extrazelluläre Matrix für die Neurosphären, welche sich darauf absetzen und anschließend migrieren und differenzieren können. Tiefgefrorenes PDL wurde zunächst für ca. 45 Minuten im Wärmeschrank auf 37 ° Celsius (C) vorgewärmt, im Anschluss erfolgte die Beschichtung der 96-*well*-Flachbodenplatten mit jeweils 50 µl PDL pro *well* bzw. der 8-Kammer-Objektträger zur Probedifferenzierung und Qualitätskontrolle der Neurosphären mit jeweils 250 µl PDL pro Kammer. Die Platten wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 100 µl deionisiertem sterilem H₂O gewaschen. Das parallel bei Raumtemperatur aufgetaute Laminin wurde im Verhältnis von 1:80 in deionisiertem, sterilem H₂O gelöst. Im nächsten Schritt wurden die 96-*well*-Platte mit 50 µL Laminiumgemisch pro *well* sowie die 8-Kammer-Objektträger mit 250 µl Laminiumgemisch pro Kammer beschichtet, um danach erneut bei 37 °C für eine Stunde zu inkubieren.

Die Platten wurden entweder sofort verwendet oder im Kühlschrank bei vier Grad Celsius bis zu maximal sieben Tagen gelagert. Vor der Verwendung wurde einmal mit sterilem H₂O und PBS (+/+) gewaschen.

2.2.1.2 Beschichtungen mit Poly-HEMA

Für die Kultivierung der hNPCs sowie für den Proliferations-Assay wurden die Platten bzw. Petrischalen mit Poly-HEMA beschichtet. Poly-HEMA ist ein Polymer, welches in Verbindung mit H₂O ein Hydrogel formt und somit die Adhärenz der Sphären an der Oberfläche des beschichteten Materials verhindert.

Für die Herstellung der Beschichtung wurden 39,5 ml 96 %-iges (vol/vol) Ethanol mit 500 µL sterilem H₂O und 1,2 g Poly-HEMA vermischt. Anschließend wurde die Lösung für fünf bis 16 Stunden auf einem Magnetrührer gerührt. Die so hergestellte Poly-HEMA-Lösung kann bei vier Grad Celsius für bis zu zwei Monate gelagert werden.

Zur Beschichtung der Petrischalen sowie für die Kultivierung der Sphären im Proliferations-Assay wurden 1,3 ml in der 60x15 mm Petrischale und 3,5 ml Poly-HEMA in der 100x20 mm Petrischale beziehungsweise (bzw.) 25 µL Poly-HEMA pro *well* einer 96-*well*-Rundbodenplatte aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Beschichtete Kulturgefäße wurden ohne Deckel für drei bis 16 Stunden unter sterilen Bedingungen, meist über Nacht, bis zur vollständigen Verdampfung des Ethanols gelagert. Beschichtete Kulturgefäße können für bis zu zwei Wochen im Dunkeln gelagert und verwendet werden.

2.2.2 Revitalisierung kryokonservierter humaner neuraler Progenitorzellen

Die hNPCs wurden kryokonserviert bezogen und gelagert. Zur Vorbereitung der Revitalisierung wurden drei 100x20 mm Petrischalen mit je 10 ml B27-Proliferationsmedium und eine 50 ml Kulturflasche mit 30 ml B27-Proliferationsmedium befüllt und für mindestens eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Kryoröhrchen wurden zunächst unter sterilen Bedingungen entlüftet, damit der flüssige Stickstoff entweichen konnte. Durch Auf- und Abpipettieren des temperierten B27-Proliferationsmediums konnten sich die Zellen lösen und in das Medium überführt werden. Eine rasche Vorgehensweise war hier besonders wichtig, da hohe DMSO-Konzentration im Einfriermedium zytotoxisch wirken können. Sobald die Zellen vollständig aufgetaut und in eine 50 ml Kulturflasche überführt wurden, konnte die Zellsuspension vorsichtig resuspendiert und im Anschluss auf drei Petrischalen verteilt werden. Die Zellen wurden für vier Wochen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei alle zwei bis drei Tage die Hälfte des B27-Proliferationsmediums durch frisches Medium ersetzt wurde. Das ausgetauschte Medium wurde, zur Verhinderung von Zellverlust, in einer separaten Petrischale gesammelt und beobachtet. Bildeten sich dort Neurosphären, so wurden sie beim nächsten Wechsel des B27-Proliferationsmediums in die ursprüngliche Petrischale überführt.

Zur Qualitätskontrolle der hNPCs wurden 24 Stunden nach dem Auftauen 25 µl des Zell-B27-Gemisches in jeweils 500 µl N2-Differenzierungsmedium auf einem mit PDL-Laminin-beschichteten 8-Kammer-Objektträger gegeben und differenziert. Nach weiteren 24 Stunden konnte das Verhältnis der differenzierenden Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmt werden. Für die weitere Kultivierung mussten mindestens 70 % der hNPCs differenziert sein.

2.2.3 Kultivierung von Neurosphären

Nach dem Auftauen wurden die Neurosphären im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) im B27-Proliferationsmedium auf 100x20 mm mit Poly-HEMA beschichteten Petrischalen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde zur stetigen Förderung der Proliferation die Hälfte des B27-Proliferationsmediums durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt.

2.2.4 Passagieren der Neurosphären

Einmal pro Woche wurden die kultivierten hNPCs mechanisch passagiert, um die Proliferationskapazität aufrechtzuerhalten und die Nährstoff- sowie die Sauerstoffversorgung im Inneren der Sphäre zu gewährleisten. Hierfür wurden die Neurosphären mittels kreisender Bewegungen in die Mitte der Petrischale befördert und mit möglichst wenig Medium in den Deckel einer 60x15 mm Petrischale transferiert. Mithilfe des McIlwain Tissue Choppers, ausgestattet mit einer frischen Rasierklinge, wurden die hNPCs in kleine Quadrate (0,2 mm Seitenlänge) geschnitten und anschließend in 1 ml B27-Proliferationsmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde gleichmäßig auf mehrere Poly-HEMA-beschichtete Petrischalen verteilt, in denen sich bereits je 20 ml vorgewärmtes B27-Proliferationsmedium befand. Für den experimentellen Einsatz wurden die Neurosphären zwei Tage

zuvor auf 220 µm geschnitten, sodass der Sphärendurchmesser am Tag null des Experimentes 300 µm betrug.

2.2.5 Neurosphären-Assay

Der Neurosphären-Assay ermöglicht mittels hNPCs die Abbildung basaler Endpunkte der menschlichen Gehirnentwicklung, wie die Proliferation (NPC1), Migration (NPC2) und Differenzierung zu Neuronen (NPC3) und Oligodendrozyten (NPC5) sowie das Neuritenwachstum und -morphologie (NPC4).

Hierfür wurden primäre humane Neurosphären mit einem Durchmesser von 300 µm ausgewählt und unter proliferierenden bzw. differenzierenden Bedingungen kultiviert, um die Auswirkungen der in dieser Arbeit getesteten Substanzen auf die entsprechenden Endpunkte zu untersuchen. Pro Substanz wurden sieben Konzentrationen in einer Verdünnung von 1:3 in jeweils mindestens vier Replikaten getestet. Zusätzlich wurde eine Lösemittelkontrolle (LMK) mitgeführt. Jede Substanz wurde in mindestens drei biologischen Replikaten und drei verschiedenen Individuen getestet.

2.2.5.1 Untersuchung unter proliferierenden Bedingungen (NPC1)

Die Untersuchung unter proliferierenden Bedingungen wurde auf mit Poly-HEMA beschichteten 96-well-Rundbodenplatten durchgeführt. In jedes *well* wurde 100 µl Kontroll- bzw. Belastungslösung vorgelegt, mittels einer auf 2,5 µl eingestellten 10 µl Pipette wurde genau eine Neurosphäre mit einem Durchmesser von 300 µm zentral in das jeweilige *well* überführt. Die Inkubationszeit betrug drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂.

Für die Konzentrations-Wirkungsversuche wurden die in Abb. 3 angegebenen Substanzen von ihrer jeweiligen Startkonzentration aus in einer 1:3 Verdünnung in sieben verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Um zytotoxische Effekte der Lösemittel zu identifizieren, wurden LMK mitgeführt. In DMSO gelöste Substanzen erhielten eine LMK mit einer Konzentration von 0,1 % DMSO, in H₂O gelöste Substanzen erhielten eine LMK mit einer Konzentration von 0,1 % H₂O, und in PBS (-/-) gelöste Substanzen wurden mittels einer LMK von 0,1 % PBS (-/-) kontrolliert. Die jeweiligen Verdünnungsreihen wurden ebenfalls mit 0,1 % DMSO/H₂O/PBS (-/-) angesetzt. Als Positivkontrolle wurde B27-Medium w/o verwendet, welches EGF und FGF-defizient ist und dadurch keine bzw. eine stark verringerte Proliferation der Neurosphären zu erwarten war.

Am dritten Versuchstag wurde die Proliferation quantifiziert, indem die Chemilumineszenz des in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) eingebauten Thymidinanalogs BrdU gemessen wird (BrdU-Assay). Die mitochondriale Aktivität der Zellen wurde mittels Viabilitäts-Assay und die Zytotoxizität mittels LDH-Assay bestimmt. Als Positivkontrolle wurde eine Lysekontrolle mitgeführt, in welcher die Sphären 45 Minuten vor der LDH- und Viabilitäts-Analyse mit 2 µl des 10 %-igen Detergens Triton X-100 behandelt wurden. Zudem wurden fünf Replikate mit Medium ohne Neurosphären als Hintergrundwerte verwendet. Weitere fünf Replikate mit Neurosphären, aber ohne BrdU-Zugabe, wurden als Hintergrund für den BrdU-Assay verwendet.

2.2.5.1.1 Bestimmung der Proliferation über Einbau von BrdU in die DNS (NPC1)

Um eine direkte Quantifizierung der Proliferation auf Zellniveau zu erheben, wurde der BrdU-Assay durchgeführt. Bei diesem wird das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin während der DNS-Synthese eingebaut, mittels Antikörperbindung können chemilumineszente Signale direkt proportional zur DNS-Menge nachgewiesen werden. Die verwendete Antikörper-Lösung enthält die Anti-BrdU-Peroxidase. Durch die Kopplung des Antikörpers an die Peroxidase kann das Substrat Luminol umgesetzt werden (s. Abb. 6).

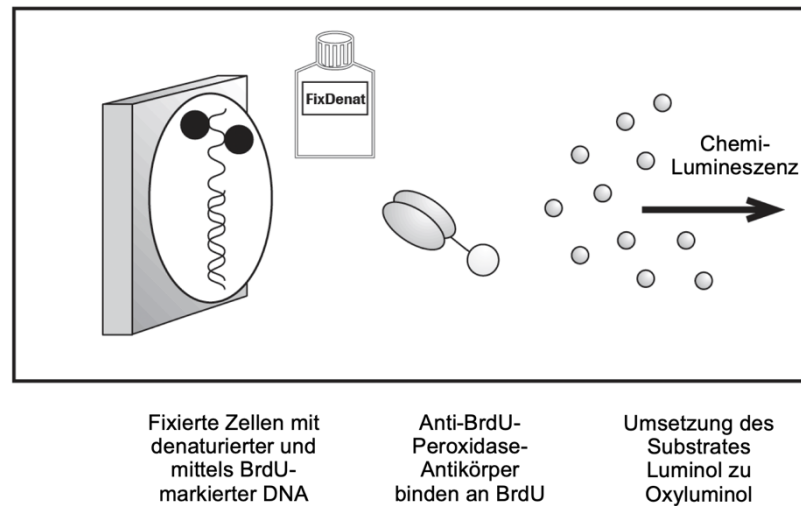


Abb. 6: Prinzip des 5-Bromo-2'-Desoxyuridine (BrdU)-Assays zur Quantifizierung der Proliferation. Neurosphären wurden mit BrdU an Tag 3 der Versuchsreihe inkubiert. BrdU ist ein Thymidinanalogon, welches anstelle von Thymidin in die DNS eingebaut wird. Nach Fixierung der Zellen mittels Fixier-Lösung (FixDenat) werden die Anti-BrdU-Peroxidase-Antikörper hinzugegeben, welche an BrdU binden. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol zu Oxyluminol in einer Chemilumineszenz-Reaktion, welche anschließend im TECAN-Mikroplattenleser gemessen werden kann. Adaptiert nach dem Manual der Firma Roche, Stand 12/2020.

Für den NPC1-Assay wurden 18 Stunden vor Beendigung des Versuches alle *wells* (bis auf den BrdU-Hintergrund) mit 10 µl einer 1:100 Verdünnung BrdU-Färbelösung in B27-Medium w/o behandelt und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um dadurch einen Volumenausgleich zu schaffen, wurde den *wells*, welche als BrdU-Hintergrund markiert wurden, 10 µl reines B27-Medium w/o hinzugegeben. 16 Stunden nach BrdU-Zugabe wurden die in den nächsten Abschnitten beschriebenen Assays zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität (Viabilitäts-Assay) und Zytotoxizität (LDH-Assay) durchgeführt.

Zum Beenden des Versuches wurden jeweils 25 µl Accutase™ (ein Medium bestehend aus kollagenolytischen und proteolytischen Enzymen) pro *well* in schwarze bzw. weiße, undurchsichtige 96-*well*-Flachbodenplatten pipettiert und für zehn Minuten bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden aus den 96-*well*-Rundbodenplatten die Sphären gemeinsam mit 10 µl Medium entnommen und in die vorgelegte Accutase™ transferiert. Die Accutase™ brach den Zellverband auf und sorgte dafür, dass nach zehn Minuten Inkubationszeit bei 37 °C die Zellen leicht durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden konnten. Dieser Schritt wurde mit einer auf 50 µl eingestellten 100 µl 8-Kanal-Pipette

durchgeführt. Anschließend wurden die vereinzelter Zellen mit einem Haartrockner belüftet, bis die AccutaseTM und das mit den Sphären transferierte Medium vollständig evaporiert waren. Durch Hinzugabe von 200 µl Fix-Denat-Lösung pro *well* und Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen am Boden der Platten fixiert. Das vollständige Abpipettieren der Fix-Denat-Lösung und Auftragen von 100 µl pro *well* Anti-BrdU-Peroxidase-Antikörperlösung sorgte für die gewünschte Lumineszenz-Reaktion.

Im Anschluss an eine 45-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die *wells* in einem im Verhältnis von 1:10 verdünnten Waschpuffer in deionisiertem H₂O insgesamt drei Mal mit 200 µl pro *well* gewaschen. Dann wurden 100 µl der Substrat-Lösung (Verhältnis 1:100 Substratkomponente B zu A) hinzugegeben, nach fünf Minuten Inkubationszeit in einem dunklen Raum wurde die Chemilumineszenz am TECAN-Mikroplattenleser gemessen.

2.2.5.2 Untersuchung unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)

Zur Vorbereitung der Neurosphären-Kultivierung unter migrierenden und differenzierenden Bedingungen wurden 96-*well*-Flachbodenplatten mit PDL-Laminin (s. 2.2.1.1) beschichtet. Diese Beschichtung erlaubt es den Zellen, sich abzusetzen, radial aus dem Sphärenkern auszumigrieren und in Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten zu differenzieren.

In diese Platten wurden an Tag 0 der Experimente zunächst jeweils 100 µl Belastungs- bzw. Kontrolllösung eingebracht, dann jeweils eine 300 µm große Neurosphäre zentral in ein *well* platziert. Unter 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Platten für drei Tage lang inkubiert. An Tag 3 des Experimentes wurde die Belastungslösung erneuert. Hierfür wurde zunächst 50 µl des alten Mediums aus jedem *well* abgezogen und frische Lösung hinzugefügt. Das Medium-Überstand wurde für die Zytotoxizitätsbestimmung im LDH-Assay (Abschnitt 2.2.6) verwendet. An Tag 5 wurde das Experiment nach Durchführung von LDH-Assay und Viabilitäts-Assay (Abschnitt 2.2.7) durch die Fixierung mit 4 %-igem PFA beendet (Abschnitt 2.2.8).

Die Konzentrations-Wirkungs-Versuche mit den verschiedenen Signalwegsaktivatoren und -inhibitoren wurden in sieben Konzentrationen in einer 1:3 Verdünnung über den in Abb. 5 angegebenen Konzentrationsbereich angelegt. Der Großteil der Substanzen wurden in 0,1 % DMSO gelöst, die Substanzen PGE2 und Colivelin wurden in 0,1 % H₂O und der Notch-Aktivator Reelin wurde in 0,1 % PBS (-/-) gelöst. Auf jeder Platte befand sich eine Kontrollreihe zum Ausschluss zytotoxischer Effekte des Lösemittels, also eine LMK bestehend aus fünf Replikaten, in welchen sich ausschließlich Neurosphären mit 0,1% DMSO/0,1 % H₂O/0,1 % PBS (-/-) befanden.

Für alle Experimente des NPC2-5-Assays wurde eine endpunktspezifische Positivkontrolle mitgeführt. Dies wurde auf einer separaten Kontrollplatte durchgeführt. Hier wurden drei verschiedene inhibierende Substanzen mit jeweils fünf Replikaten pro Platte pro Individuum ausplattiert: 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2, Konzentration: 10 µM pro *well*), EGF (Konzentration: 0,02 µg/ml pro *well*) und *bone morphogenic protein 7* (BMP-7, Konzentration: 0,1 µg/ml). PP2 ist ein SRC-Tyrosine-Protein Kinase-Inhibitor, welcher durch die Inhibierung des Src-

Signalwegs die Migration beeinträchtigt (Moors et al., 2009; Sanna et al., 2000). EGF inhibiert die Differenzierung der Zellen in Neurone (Ayuso-Sacido et al., 2010). BMP-7 sorgt für eine Inhibition der Differenzierung zu Oligodendrozyten (Gao et al., 2006).

2.2.5.2.1 Migrationsanalyse (NPC2)

An Tag drei des NPC2-5 Assays wurde die radiale Migration durch die Erstellung lichtmikroskopischer Aufnahmen mit dem Celloomics Array Scan VTI HSC Reader der Marke Thermo Fisher überprüft. Die Migrationsstrecke wurde manuell mit ImageJ gemessen. Hierfür wurde der Abstand vom äußeren Rand des Sphärenkernes bis zur am weitesten migrierten Zelle in insgesamt vier im 90°-Winkel zueinander stehenden Richtungen gemessen. (s. Abb. 7A).

Zur weiteren Bestimmung der Migration nach fünf Tagen wurde die Migrationsstrecke und die Anzahl an migrierten Zellen anhand der immunzytochemischen Färbung der Zellkerne mithilfe von Hoechst 33258 mit der Software Omnisphero (s. Abschnitt 2.2.9) analysiert (s. Abb. 7B).

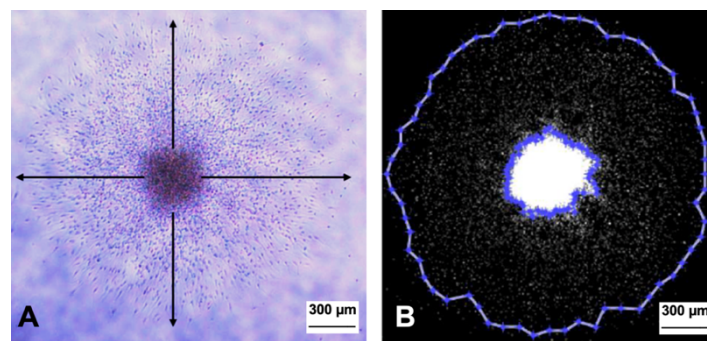


Abb. 7: Schema einer Migrationsanalyse von hNPCs mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen (A) sowie mittels Omnisphero anhand immunzytochemischer Färbungen (B), 200-fache Vergrößerung. 300 µm große Neurosphären wurden für die Differenzierungs-Analyse auf einer PDL/Laminin beschichteten 96-well-Flachbodenplatte aufgebracht. Die Migrationsstrecke wurde in Abb. 6A mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen und *ImageJ* an vier Stellen vom äußeren Sphärenrand bis hin zur weitesten Migrationsstrecke der einzelnen Zellen gemessen. Abb. 6B zeigt die Bestimmung der Migrationsstrecke anhand der Hoechst 33258-Zellkernfärbung nach Auswertung mittels Omnisphero.

2.2.6 Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH-Assay

Der LDH-Assay ist eine Methode zur Untersuchung der Zytotoxizität von Testsubstanzen. Die LDH wird bei Schädigung einer Zellmembran freigesetzt und kann im umgebenden Medium Laktat unter dem Verbrauch von oxidiertem Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) in einer enzymatischen Reaktion zu Pyruvat umsetzen. Aus dieser Reaktion entsteht reduziertes NAD (NADH). Im Anschluss setzt das Enzym Diaphorase eine Reduktion von Resazurin zu Resorufin unter der Oxidation von NADH zu NAD^+ um. Die messbare Menge Resorufin ist proportional zur Menge der LDH und damit ein korrelierender Nachweis für Zellschädigung und -zerfall. Intakte Zellen setzen kein LDH frei, dementsprechend gelingt bei Ihnen kein Nachweis einer Fluoreszenz durch Resorufin (s. Abb. 8).

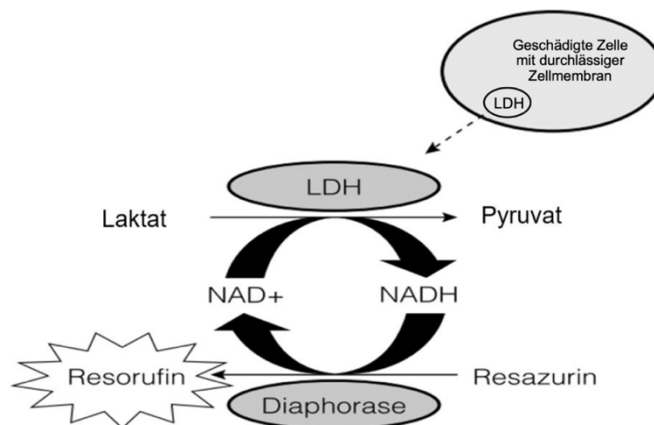


Abb. 8: Prinzip des LDH-Assays zur Zytotoxizitäts-Bestimmung im Neurosphären-Assay. Eine zelluläre Beschädigung kann zu einer durchlässigen Zellmembran und zu einem Austritt von LDH aus der Zelle in den Extrazellulärraum führen. Das LDH führt zu einer Umsetzung von Laktat zu Pyruvat unter der Entstehung von NADH . NADH wird anschließend selbst zu NAD oxidiert und katalysiert dabei die Reduktion von Resazurin zu dem fluoreszierenden Resorufin. Die Menge von Resorufin ist dabei proportional zur freigesetzten Menge an LDH. Adaptiert nach dem Manual der Firma Promega, Stand 05/2009.

Fünf Replikate auf der 96-well-Platte wurden als Lysekontrolle verwendet. Hier wurden die im Lösungsmittel kultivierten Sphären mit 2 μl des 10 %-igen Detergens Triton X-100 belastet, welches die Proteine aus der Zellmembran herauslöst. LDH kann somit aus der Zelle austreten und gelangt ins Medium, wo es durch die oben beschriebene enzymatische Reaktion gemessen werden kann. Dieser Schritt wurde unter proliferierenden Bedingungen 45 Minuten, unter differenzierenden Bedingungen 30 Minuten vor der Zugabe des LDH-Reagenz CytoTox-ONE™ durchgeführt. Als Hintergrundkontrolle diente das jeweilige Proliferations- oder Differenzierungsmedium ohne Neurosphäre.

Zum Start des LDH-Assays wurden 50 μl Medium pro well abgezogen, auf eine 96-well-Flachbodenplatte überführt und 50 μl CytoTox-ONE™-Medium hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Platte im TECAN-Mikroplattenleser für fünf Sekunden bei einer Amplitude von 2 mm geschüttelt. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen, die Wellenlänge bei Extinktion betrug 540 nm.

Zwischenzeitlich wurde die Zellkultur zur Weiterführung des Versuches an Tag drei mit jeweils 50 µl pro *well* frischem Belastungs- bzw. Kontrollmedium nachgefüllt (siehe Abs. 2.2.5.1 und 2.2.5.2). Die *wells* der Lysekontrolle wurden einmal mit sterilem deionisiertem H₂O aufgefüllt, um zytotoxische Effekte auf benachbarte *wells* auszuschließen.

2.2.7 Viabilitätsbestimmung mittels Alamar-Blue-Assay

Über die mitochondriale Aktivität der hNPCs kann indirekt auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden. Im Alamar-Blue-Assay wird die Substanz Resazurin durch mitochondriale Dehydrogenasen zu fluoreszierendem Resorufin reduziert (s. Abb. 9). In einem *well*, wo wenige Zellen stoffwechselaktiv sind, kann folglich nur wenig Fluoreszenz nachgewiesen werden.

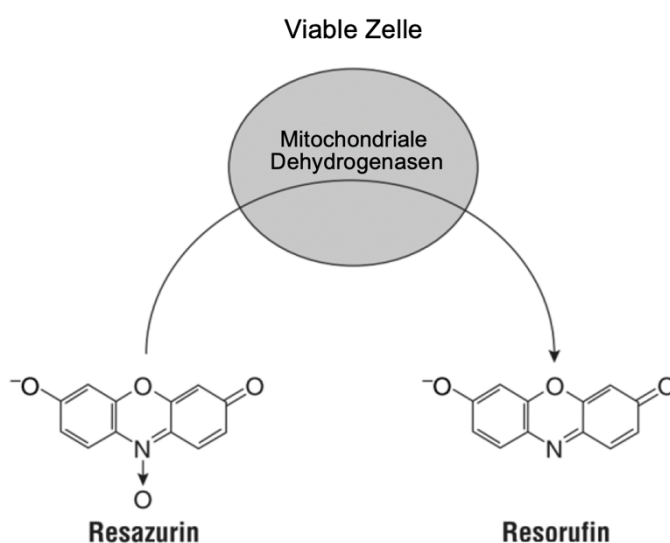


Abb. 9: Prinzip des Alamar-Blue-Viabilitäts-Assays zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität. Intakte, viable Zellen verfügen über Mitochondrien mit ihren Dehydrogenasen, welche die Reduktion von Resazurin in das fluoreszierende Resorufin vollziehen können. Eine hohe Menge an Resorufin korreliert dabei mit der mitochondrialen Aktivität der getesteten Zellen. Adaptiert nach dem Manual der Firma Promega, Stand 07/2023.

Das für die Viabilitätsbestimmung notwendige Reagenz CellTiter-Blue® wurde in einem auf 37 °C vorgewärmtem N2-Differenzierungsmedium (NPC2-5) bzw. B27-Medium w/o (NPC1) in einer Konzentration von 1:7,5 verdünnt. Da parallel der LDH-Assay durchgeführt wurde, konnten hier Arbeitsschritte zusammengelegt werden: Nach Abnahme von 50 µl Medium pro *well* für die Zytotoxizitätsbestimmung konnte 83 µl der CellTiter-Blue®-Verdünnung pro *well* zugegeben werden. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ konnte die Emission mit dem TECAN-Mikroplattenleser gemessen werden. Wie in 2.2.6 betrugen die Wellenlängen von Emission 590 nm, von Extinktion 540 nm.

2.2.8 Immunzytochemische Färbungen

Zur Analyse der Differenzierung in verschiedene Zelltypen wurden in dieser Arbeit immunzytochemische Färbungen durchgeführt, welche auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen. Unterschiedliche Zelltypen können durch an Antikörper gekoppelte Fluorochrome (Fluoreszenzfarbstoffe) oder Chromogene (Kopplung von Oligopeptiden an Farbstoffe) sichtbar gemacht und mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen werden.

Im ersten Schritt werden primäre Antikörper eingesetzt, welche an spezifische Epitope auf den Membranproteinen der differenzierten Zellen binden. Entweder kann das Fluorochrom direkt an den Primärantikörper binden, oder ein sekundärer Antikörper bindet an den Primärantikörper, woran sich wiederum das Fluorochrom konjugiert. Das Fluorochrom ist in der Lage, Energie in Form von fluoreszierendem Licht abzugeben, welches gemessen werden kann.

Verschiedene Substanzen wurden für die Sichtbarmachung verschiedener Zelltypen verwendet: Antikörper gegen β 3-Tubulin als Marker für Neurone (rot), gegen O4 als Marker für Oligodendrozyten (grün) sowie den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (blau) für Zellkerne. Die größte Migrationsfläche wurde hier mit der Migrationsdistanz von Radial-Glia-Zellen gleichgesetzt (da diese im Säugetiergehirn am weitesten migrieren) und ergibt sich somit aus der Menge rein blau fluoreszierender Zellkerne.

Die Färbungen wurden an Tag 5 des NPC2-5-Assays durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 133 μ l Rest-Medium (Belastungs- bzw. Kontrolllösung plus Mischung aus CellTiter-Blue® und N2-Differenzierungsmedium) in jedem *well*. Zur Fixierung der migrierten und differenzierten hNPCs wurden pro *well* 66 μ l 4 %-iges PFA dazugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden 149 μ l Überstand pro *well* abgezogen und die *wells* drei Mal für drei Minuten durch Zu- und Abpipettieren von 250 μ l PBS (-/-) gewaschen. Im letzten Waschvorgang wurden 260 μ l Überstand entnommen und 10 μ l *Blocking*-Lösung bestehend aus 5% GS und 1 % BSA in PBS (-/-) zugegeben. Diese Lösung sorgt für die Reduktion der Verfügbarkeit unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurden 10 μ l aus den *wells* abgenommen und 10 μ l der Primärantikörper-Lösung mit O4-Antikörpern zur Färbung der Oligodendrozyten hinzugegeben, welcher bei Inkubation in 4 °C über Nacht die Bindungsstellen an den Oligodendrozyten besetzen konnte.

Am folgenden Tag wurden die Platten unter erneutem dreimaligem Zu- und Abpipettieren von 250 μ l PBS (-/-) für drei Minuten gewaschen. Nach der erneuten Abnahme von 260 μ l wurden 10 μ l Sekundärantikörper-Lösung hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte wieder derselbe, oben beschriebene Waschschritt, mit dem einzigen Unterschied, dass am Ende 265 μ l Überstand pro *well* abgenommen wurden. Daraufhin wurden zur Fixierung pro *well* 15 μ l 12 %-iges PFA aufgetragen und für 30 Minuten bei 37 °C erwärmt. Ein erneuter dreimaliger Waschschritt mit anschließendem Abpipettieren von 260 μ l Überstand diente der Vorbereitung der Membran-Permeabilisierung. Hierfür wurden pro *well* 10 μ l 0,5 %-iges PBS (-/-) -Triton-Gemisch mit einer Endkonzentration von 0,1 % Triton hinzugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wiederholung des bekannten Waschschrittes und Abzug von 260 μ l Überstand PBS (-/-) pro *well* wurde mit 10 μ l pro *well* *Blocking*-Lösung geblockt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nachfolgend wurden 10 µl Überstand entfernt und 10 µl pro *well* Antikörperlösung hinzugefügt. Diese Lösung besteht aus Anti-β3-Tubulin konjugiert an Alexa 647 und wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im letzten Schritt erfolgt erneut der bekannte Waschschritt, hier wurde jedoch final kein Überstand mehr abgezogen. Im Kühlschrank bei 4 °C und in Dunkelheit gelagert, konnten nun die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels eines automatisierten Mikroskops (Cellomics Array Scan VTI HSC Reader, Thermo Fisher) erstellt und anschließend mithilfe der Software Omnisphero per *High Content Image Analysis* ausgewertet werden (s. Abb. 10).

	Blocken	Primäranantikörper- lösung	Sekundäranantikörper- lösung
Oligodendrozyten	5 % GS 1 % BSA In PBS (-/-) (1x)	1:400 Mouse-Anti-O4 2 % GS, 0,2 % BSA In PBS (-/-) (1x)	1:400 Anti-Mouse IgM Alexa 488 2 % GS, 0,1 % BSA In PBS (-/-) (1x)
Neurone	5 % RS 1 % BSA In PBS (-/-) (1x)	1:400 Rabbit-Anti-β3- Tubulin Alexa 647 2% RS, 0,2 % BSA 1 % Hoechst 33258 In PBS (-/-) (1x)	/

Tabelle 12: Zusammensetzung verwendeter immunzytochemischer Lösungen zur Identifikation differenzierter Zelltypen.

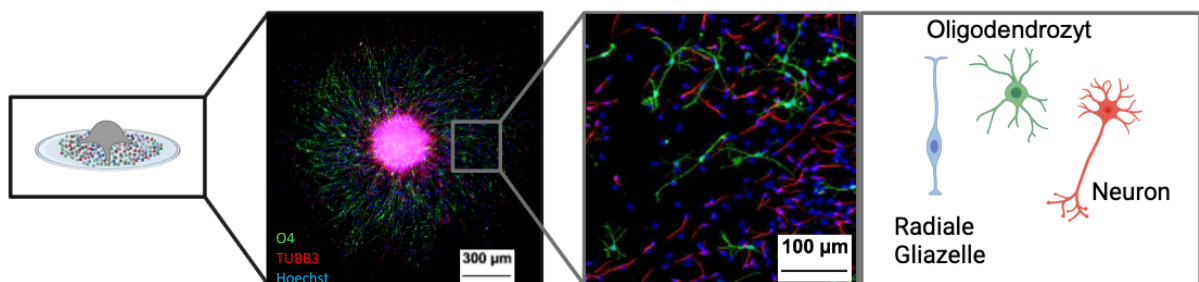


Abb. 10: Von links nach rechts: Schematische Darstellung einer Neurosphäre unter differenzierenden Bedingungen mit ausmigrierten Zellen, dazu passende fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gesamten Neurosphäre mit ausmigrierten Zellen (Vergrößerung ca. 200-fach), Ausschnitt der vorangegangenen Aufnahme zur Darstellung einzelner ausmigrierter Zelltypen (Vergrößerung ca. 1000-fach), sowie schematische Darstellung der einzelnen angefärbten Zelltypen. Nach der immunzytochemischen Färbung lassen sich die einzelnen Zelltypen in Neurone (rot, Färbung mittels TUBB3) und Oligodendrozyten (grün, Färbung mittels O4) unterteilen. Die rein blau fluoreszierenden Zellkerne (Färbung mittels Hoechst 33258) wurden zur Bestimmung der maximalen Zellmigration mit der Radial-Glia-Migration gleichgesetzt. Rechts schematische Darstellung der einzelnen Zell-Unterarten nach Farben und Morphologie in der Immunzytochemie. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

2.2.9 Auswertung mit Omnisphero

Omnisphero ist ein Programm, welches über *High Content Image Analysis* eine automatisierte Quantifizierung von Neuronen, Oligodendrozyten und Zellkernen anhand immunzytochemischer Färbungen ermöglicht (Keßel et al., 2023; Schmuck et al., 2017). Das Programm bestimmt dies anhand der Überlappungen der Färbung von Neuronen bzw. Oligodendrozyten und deren Zellkernen. Liegt eine ausreichende Überlappung vor, wird die detektierte Zelle dem entsprechenden Zelltypen zugeordnet. Die rein blau gefärbten Zellkerne ohne Überlappungen mit anderen Fluoreszenzen wurden, wie oben beschrieben, zur Messung der größten Migrationsfläche herangezogen und mit der Migrationsdistanz von Radial-Glia-Zellen gleichgesetzt.

Die Migration wird, wie in 2.2.5.2.1 erwähnt, auch über eine Zellkernfärbung an Tag fünf analysiert.

2.2.10 Statistische Analyse

Für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit den hNPCs mindestens drei verschiedener Individuen (männliche Individuen: 0000549062, 0000516385, 0000390398; weibliche Individuen: 0000550806, 0000540263) durchgeführt. Der Median von mindestens vier technischen Replikaten wurde berechnet und innerhalb eines Experimentes die Behandlung auf die Lösemittel- oder Lysekontrolle normalisiert. Die Standardabweichung der biologischen Replikate wurde als *Standard Error of the Mean* (SEM) angegeben. Die Signifikanz mit einem Konfidenzintervall von 95 % und einem p-Wert von unter 0,05 wurde mit einer einfaktoriellen (*one-way*) Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc-test* bestimmt. Zusätzlich wurde das in der toxikologischen Risikobewertung anerkannte Modell der *benchmark responses* (BMR) und *benchmark concentrations* (BMC) angewandt. Die BMR sind für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays spezifisch berechnete Werte basierend auf dem Variationskoeffizienten der niedrigsten Substanzkonzentration multipliziert mit dem Faktor 1,5. Die BMC ergibt sich anschließend aus der Konzentration im Graphen, bei der die BMR erreicht wird. Die beschriebenen Analysen wurden mit der in der Arbeitsgruppe entwickelten, R-basierten Software Critical-Role-Statistics (CRStats) durchgeführt (Blum et al., 2022; Keßel et al., 2023), welche für jeden Endpunkt die Graphen nach dem ‚*best fit*‘ ausgelegt hat. Die Graphen wurden anschließend in der GraphPad-Prism Software visualisiert.

3 Ergebnisse

Der Neurosphären-Assay ermöglicht es, basale Endpunkte der Gehirnentwicklung *in vitro* abzubilden. Unter diese grundlegenden Vorgänge fallen die Proliferation und Migration humaner neuraler Progenitorzellen, die Migration radialer Gliazellen, sowie die Migration und Differenzierung von Neuronen und Oligodendrozyten und das Neuritenwachstum.

Die vorliegende Arbeit untersucht die biologische Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays mittels verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren wichtiger Signalwege während der fetalen menschlichen Hirnentwicklung. Diese Daten tragen somit zu einer höheren Validität, Vorhersagekraft und Akzeptanz der DNT-IVB und des Neurosphären-Assays bei und haben eine direkte regulatorische Bedeutung als Alternativen zum Tierversuch.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Arbeiten beschrieben. Sie geben einen Überblick darüber, wie die ausgewählten Signalwege in den verschiedenen Endpunkten des Neurosphären-Assays abgebildet werden können.

Die Endpunkte des NPC1-Assays sind die hNPC-Proliferation, die Zytotoxizität und die mitochondriale Aktivität. Diese wurden, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, nach 72 Stunden gemessen und analysiert. Zum NPC2-5-Assay gehören die folgenden Endpunkte: die Radial-Glia-Migration (NPC2a), die neuronale Migration (NPC2b), die Oligodendrozyten-Migration (NPC2c), die neuronale Differenzierung (NPC3), die Neuritenlänge (NPC4a), die Neuritenfläche (NPC4b), die Oligodendrozyten-Differenzierung (NPC5), die Zytotoxizität und die mitochondriale Aktivität. Diese wurden, wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben, nach 120 Stunden evaluiert.

Als Effekte werden Veränderungen des spezifischen Endpunktes im Vergleich zur LMK beschrieben, welche die Endpunkt-spezifische BMR im getesteten Konzentrationsbereich erreichen. Veränderungen, welche die BMR nicht erreichen, beschreiben keinen Effekt.

3.1 Notch-Signalweg

Für die Aktivierung des Notch-Signalwegs wurden die Neurosphären mit dem Glykoprotein Reelin in Konzentrationen zwischen 0,0003 μM und 0,003 μM belastet.

Die Inhibierung des Notch-Signalwegs wurde mittels des γ -Sekretase-Inhibitors DAPT in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,01 μM und 10 μM DAPT durchgeführt.

3.1.1 Notch unter proliferierenden Bedingungen

3.1.1.1 Aktivierung mittels Reelin

Reelin steigert die Proliferation der hNPCs im Vergleich zur LMK nicht (Abb. 11A).

Zytotoxische Effekte durch Reelin sind im Vergleich zur LMK nicht zu verzeichnen (Abb. 11B).

Die mitochondriale Aktivität der hNPCs wird durch Reelin nicht beeinflusst (Abb. 11C).

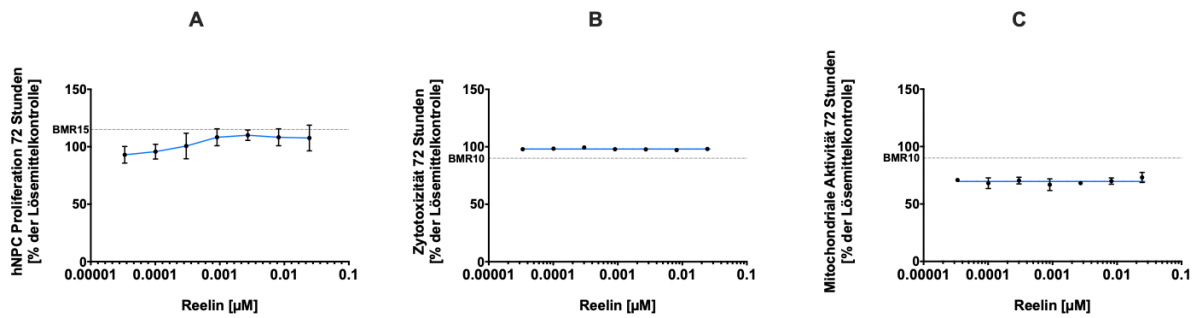


Abb. 11: Einfluss der Aktivierung des Notch-Signalwegs mittels Reelin auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,0003 μM bis zu 0,003 μM) Reelin (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % PBS (-/-) verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.1.1.2 Inhibierung mittels DAPT

DAPT inhibiert bei steigenden Konzentrationen die Proliferation der hNPCs konzentrationsabhängig und spezifisch. Während in der niedrigsten Konzentration (0,0137 μM) die Proliferation noch bei 102 % liegt, fällt diese in der höchsten Konzentration auf 67,3 % ab. Die BMR₁₅ wird bei einer BMC von 0,6 μM DAPT erreicht (Abb. 12A).

DAPT löst in den hNPCs keine zytotoxischen Effekte verglichen zur LMK aus (s. Abb. 12B). Damit ist der Proliferations-Effekt substanzspezifisch. Die mitochondriale Aktivität der Neurosphären wird durch DAPT nicht verändert (s. Abb. 12C).

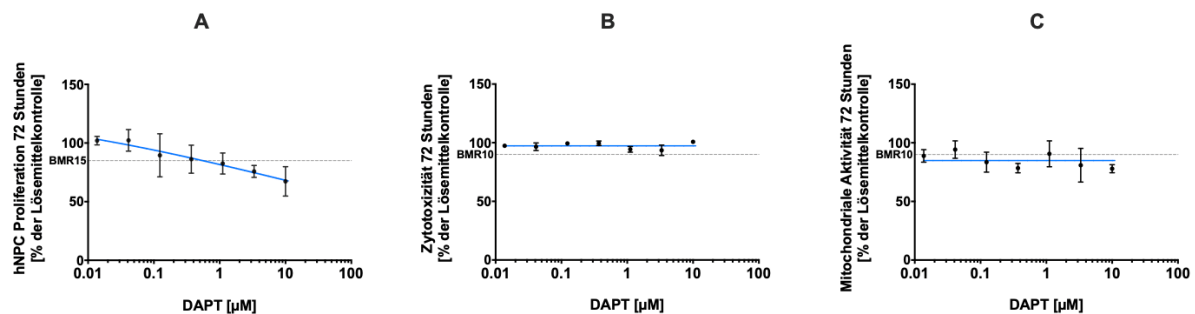


Abb. 12: Einfluss der Inhibierung des Notch-Signalwegs mittels DAPT auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,01 μM bis 10 μM) DAPT (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten).

biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.1.2 Notch unter differenzierenden Bedingungen

3.1.2.1 Aktivierung mittels Reelin

Die Migration der Radial-Glia-Zellen wird durch Reelin nicht beeinflusst (Abb. 13A).

Die neuronale Migration wird durch Reelin verglichen mit der LMK nicht verändert (Abb. 13B).

Die Oligodendrozyten-Migration wird im Vergleich zur LMK nicht verändert (Abb. 13C).

Die neuronale Differenzierung wird durch Reelin nicht beeinflusst (Abb. 13D).

Die Neuritenfläche wird durch Reelin mit einer BMR_{20} von 0,02 μM auf bis zu 80,2 % (0,003 μM) reduziert (Abb. 13E).

Die Neuritenlänge bleibt in den fünf niedrigsten Konzentrationen ähnlich zur LMK. In den höchsten beiden Konzentrationen kommt es plötzlich zu einer deutlichen Reduktion der Neuritenlänge bis auf minimal 74,8 % in der zweithöchsten Konzentration (ca. 0,0008 μM) Reelin. Die BMR_{20} wird bei 0,005 μM erreicht (Abb. 13F).

Die oligodendrogliale Differenzierung wird durch Reelin mit einer BMC_{35} von ca. 0,01 μM inhibiert (Abb. 13G).

Reelin erzeugt in dem von uns ausgewählten Konzentrationsbereich weder zytotoxische (Abb. 13H) noch viabilitätsmindernde Effekte in den hNPCs (Abb. 13I). Damit sind alle genannten Effekte substanzspezifisch.

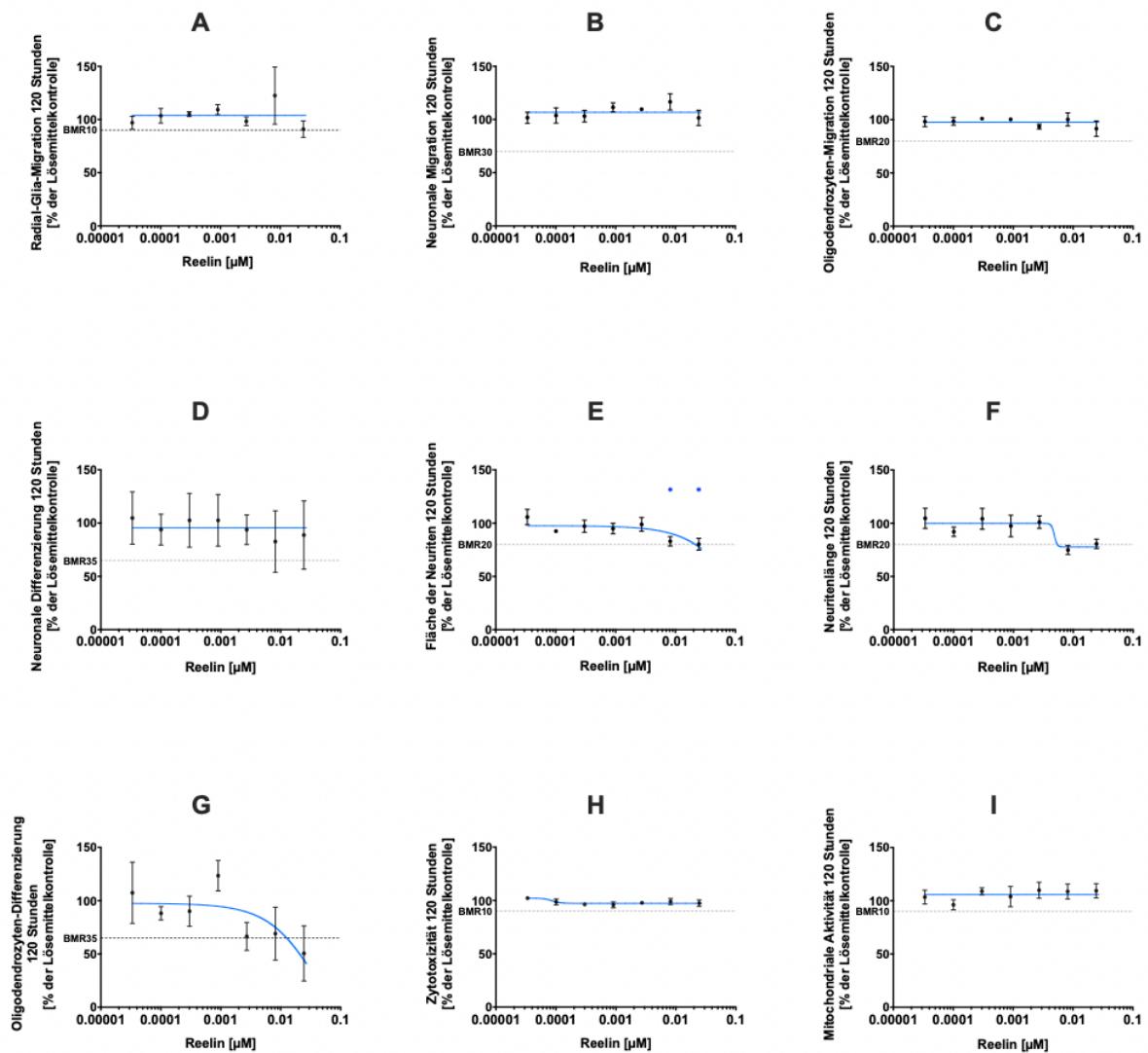


Abb. 13: Einfluss der Aktivierung des Notch-Signalwegs mittels Reelin auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenfläche (E), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,0003 µM bis 0,003 µM) Reelin (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % PBS (-/-) verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc*-Test berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.1.2.2 Inhibierung mittels DAPT

Die Migration der Radial-Glia-Zellen wird bei der Exposition mit DAPT mit einer BMC_{10} von $9,5 \mu M$ bis auf etwa 75 % ($10 \mu M$ DAPT) reduziert im Vergleich zur LMK (Abb. 14A).

Die Migration der Neurone zeigt eine leicht erhöhte Tendenz, jedoch wird die BMR nicht erreicht (Abb. 14B), auch die oligodendrogliale Migration zeigt keine Beeinflussung durch DAPT (Abb. 14C).

Die neuronale Differenzierung nimmt konzentrationsabhängig mit einer BMC_{35} von $0,03 \mu M$ stark zu. In der niedrigsten Konzentration von DAPT ($0,01 \mu M$) befindet sich die Differenzierungsrate bei 108 % im Vergleich zur LMK und steigt weiter an bis auf maximal 501,5 % in der höchsten Konzentration ($10 \mu M$). Der letztgenannte Effekt ist zudem signifikant. (Abb. 14D).

Die Neuritenfläche (Abb. 14E) und die Neuritenlänge werden durch DAPT nicht beeinflusst (Abb. 14F). Die Differenzierung der Oligodendrozyten zeigt sich bereits in der niedrigsten Konzentration ($0,014 \mu M$) mit 72,2 % deutlich reduziert im Vergleich zur LMK. Es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion mit einer BMC_{35} von $0,05 \mu M$. In der höchsten Konzentration von $10 \mu M$ wird ein Minimum von 19,4 % erreicht, dieser Effekt ist signifikant (Abb. 14G).

DAPT wirkt im ausgewählten Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch auf die hNPCs (Abb. 14H). Damit sind alle hier beschriebenen Effekte substanzspezifisch.

Die mit DAPT belasteten Neurosphären zeigen eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der mitochondrialen Aktivität mit einer BMC_{10} von $0,07 \mu M$. Ab der dritthöchsten Konzentration ($0,1 \mu M$) sind alle gemessenen Effekte signifikant, ab der vierthöchsten ($0,4 \mu M$) bis zur höchsten Konzentration ($10 \mu M$) zeichnet sich ein Plateau um ca. 47 % ab (Abb. 14I).

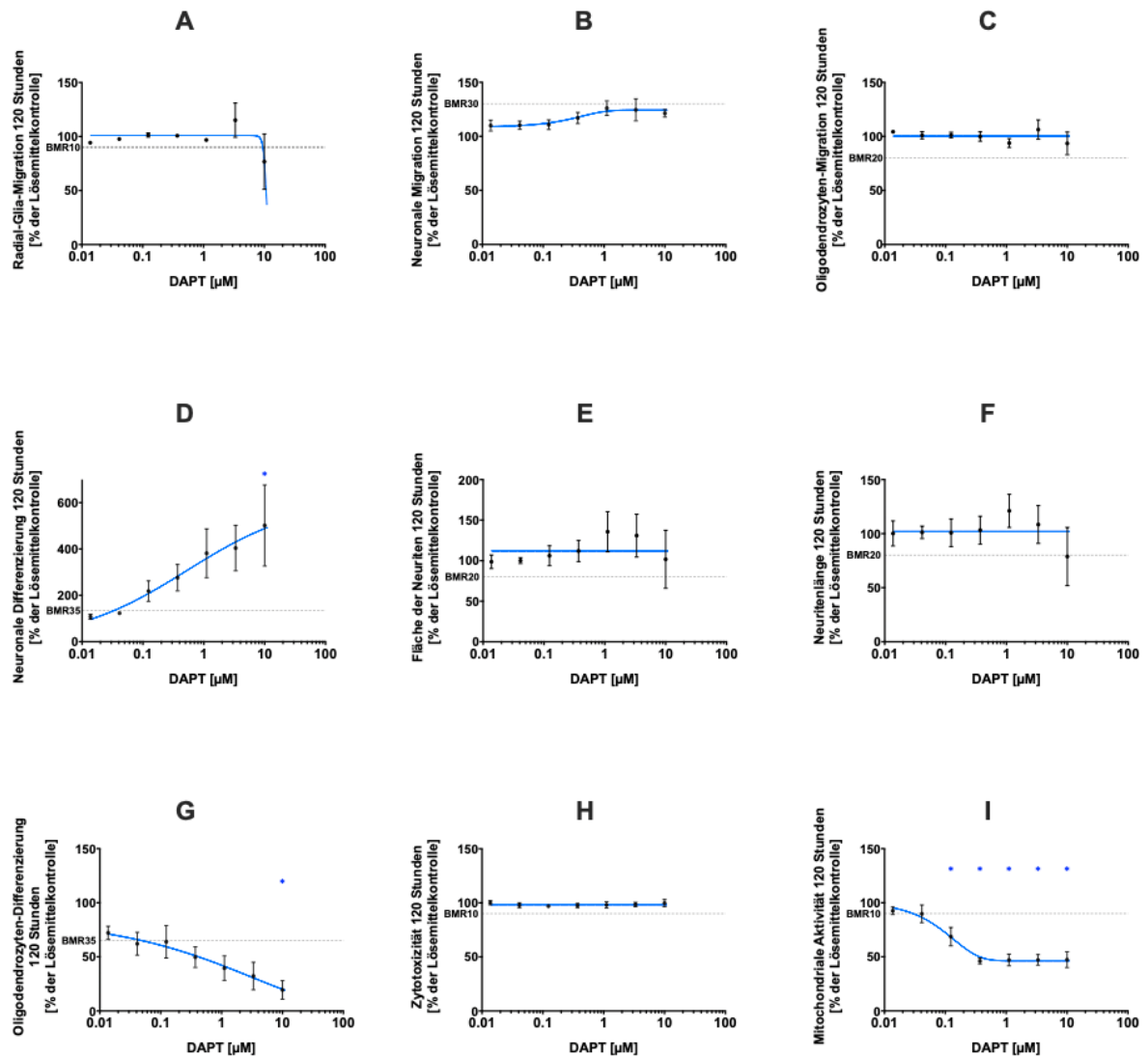


Abb. 14: Einfluss der Inhibition des Notch-Signalwegs mittels DAPT auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,01 μM bis 10 μM) DAPT (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β 3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc*-test berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.2 Kanonischer Wnt-Signalweg

CHIR99021 wurde in Konzentrationen von 0,01 μM bis 10 μM für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs eingesetzt.

Der PORC-Inhibitor IWP2 wurde für die Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs eingesetzt. Der getestete Konzentrationsbereich reicht von 0,007 μM bis 5 μM .

Als weiterer Inhibitor des Wnt-Signalwegs wurde das Antidiabetikum Pioglitazone in einer Konzentration von 0,03 μM bis 20 μM verwendet.

3.2.1 Kanonischer Wnt-Signalweg unter proliferierenden Bedingungen

3.2.1.1 Aktivierung mittels CHIR99021

Die Proliferation der Neurosphären verändert sich unter CHIR99021 im Vergleich zur LMK nicht (Abb. 15A).

CHIR99021 löst über den gesamten Konzentrationsbereich keine zytotoxischen Effekte aus (Abb. 15B), zudem kommt es zu keinen Veränderungen der mitochondrialen Aktivität (Abb. 15C).

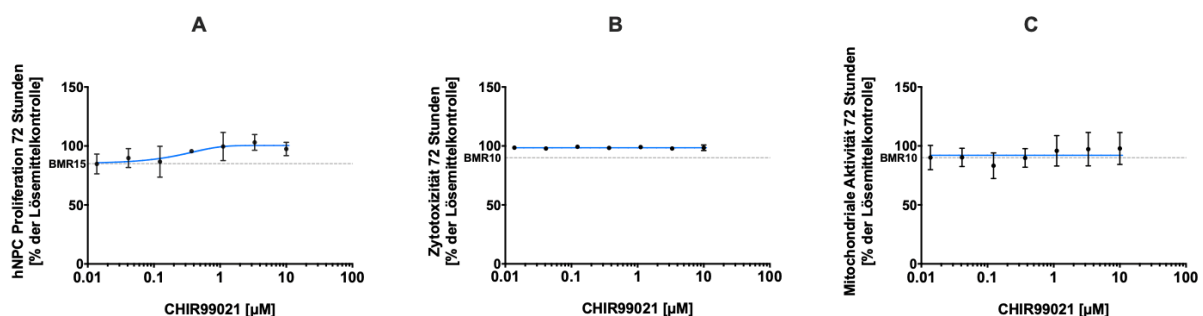


Abb. 15: Einfluss der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs sowie des GSK3 β -Signalwegs mittels CHIR99021 auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,01 μM bis 10 μM) CHIR99021 (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter *best fit* mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.2.1.2 Inhibierung mittels IWP2

IWP2 verändert die Proliferationsrate der hNPCs nicht. (Abb. 16A).

Es lassen sich weder zytotoxische (Abb. 16B) noch viabilitätsmindernde Effekte auf die Neurosphären durch IWP2 erkennen (Abb. 16C).

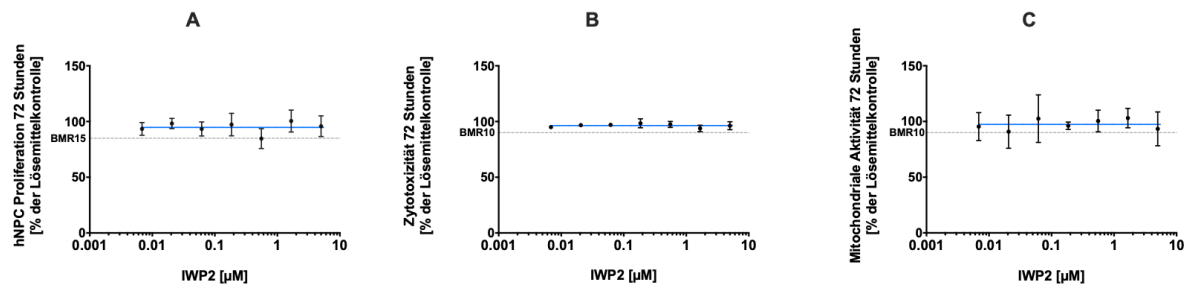


Abb. 16: Einfluss der Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs mittels IWP2 auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,007 μM bis 5 μM) IWP2 (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter *best fit* mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.2.1.3 Inhibition mittels Pioglitazone

Die Proliferation der hNPCs wird durch Pioglitazone nicht beeinflusst (Abb. 17A).

Pioglitazone löst in den hNPCs weder Zytotoxizität (Abb. 17B) noch eine Veränderung der mitochondrialen Aktivität aus (Abb. 17C).

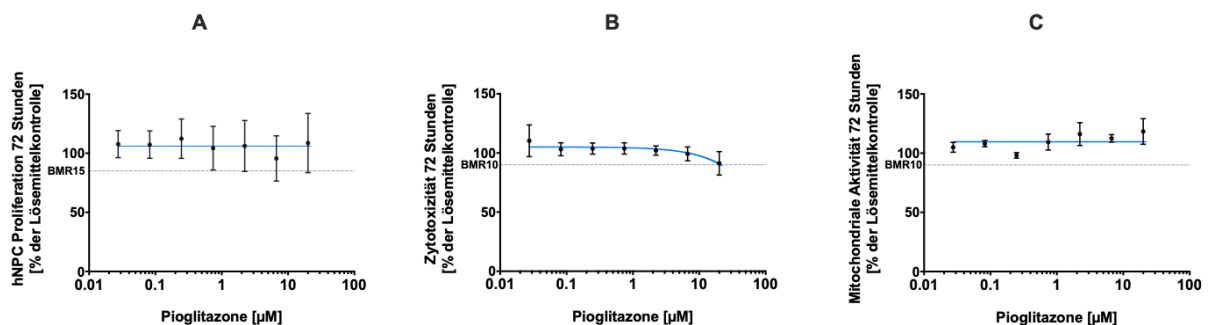


Abb. 17: Einfluss der Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs sowie des GSK3β-Signalwegs mittels Pioglitazone auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 μM bis 20 μM) Pioglitazone (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter *best fit* mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.2.2 Kanonischer Wnt-Signalweg unter differenzierenden Bedingungen

3.2.2.1 Aktivierung mittels CHIR99021

Die Radial-Glia-Migration reduziert sich mit einer BMC_{15} von 0,1 μM bis auf 56 % in der höchsten Konzentration (10 μM). Die drei höchsten Konzentrationen (1,1 μM bis 10 μM) weisen signifikante Effekte auf (Abb. 18A).

Die neuronale Migration ist insgesamt deutlich erhöht im Vergleich zur LMK. Die Werte liegen durchschnittlich bei ca. 254,1 % oberhalb der BMR und erreichen diese damit nicht (Abb. 18B).

Die oligodendrogliale Migration liegt durchschnittlich bei ca. 166,5 % verglichen zur LMK; die Messungen liegen alle oberhalb der BMR (Abb. 18C).

Die neuronale Differenzierung wird mit einer BMC_{35} von 0,06 μM CHIR99021 gesteigert. Zunächst kommt es zu einem leichten, dann zu einem starken konzentrationsabhängigen Anstieg der Differenzierungsrate auf 261,9 % in der dritthöchsten (1,1 μM) und auf maximal 289,6 % in der zweithöchsten Konzentration (3,3 μM). Diese beiden Effekte sind signifikant. Hiernach kommt es zu einer starken Reduktion der neuronalen Differenzierungsrate auf 128,8 %. Dieser Effekt ist nicht signifikant. (Abb. 18D).

Die Neuritenfläche wird von CHIR99021 nicht beeinflusst (Abb. 18E).

CHIR99021 sorgt für eine kontinuierliche Reduktion der Neuritenlänge mit einer BMC_{20} von 0,4 μM auf ein Minimum von 43,1 % in der höchsten Konzentration (10 μM) (Abb. 18F).

Die mit CHIR99021 belasteten hNPCs zeigen eine kontinuierliche Reduktion der Oligodendrozyten-Differenzierung bis auf 3,2 % in der höchsten Konzentration von 10 μM . Die Effekte in den fünf höchsten Konzentrationen (0,1 μM bis 10 μM) sind signifikant. Die BMC_{35} wird bei einer Konzentration von 0,1 μM erreicht (Abb. 18G).

CHIR99021 löst keine zytotoxischen Effekte auf die hNPCs aus (Abb. 18H). Damit sind alle hier beschriebenen Effekte substanzspezifisch.

Die mitochondriale Aktivität der Neurosphären zeigt einen Anstieg bis auf maximal 128,8 % (3,3 μM). Anschließend kommt es zu einer Reduktion der mitochondrialen Aktivität mit einer BMC_{10} von 9,7 μM (Abb. 18I).

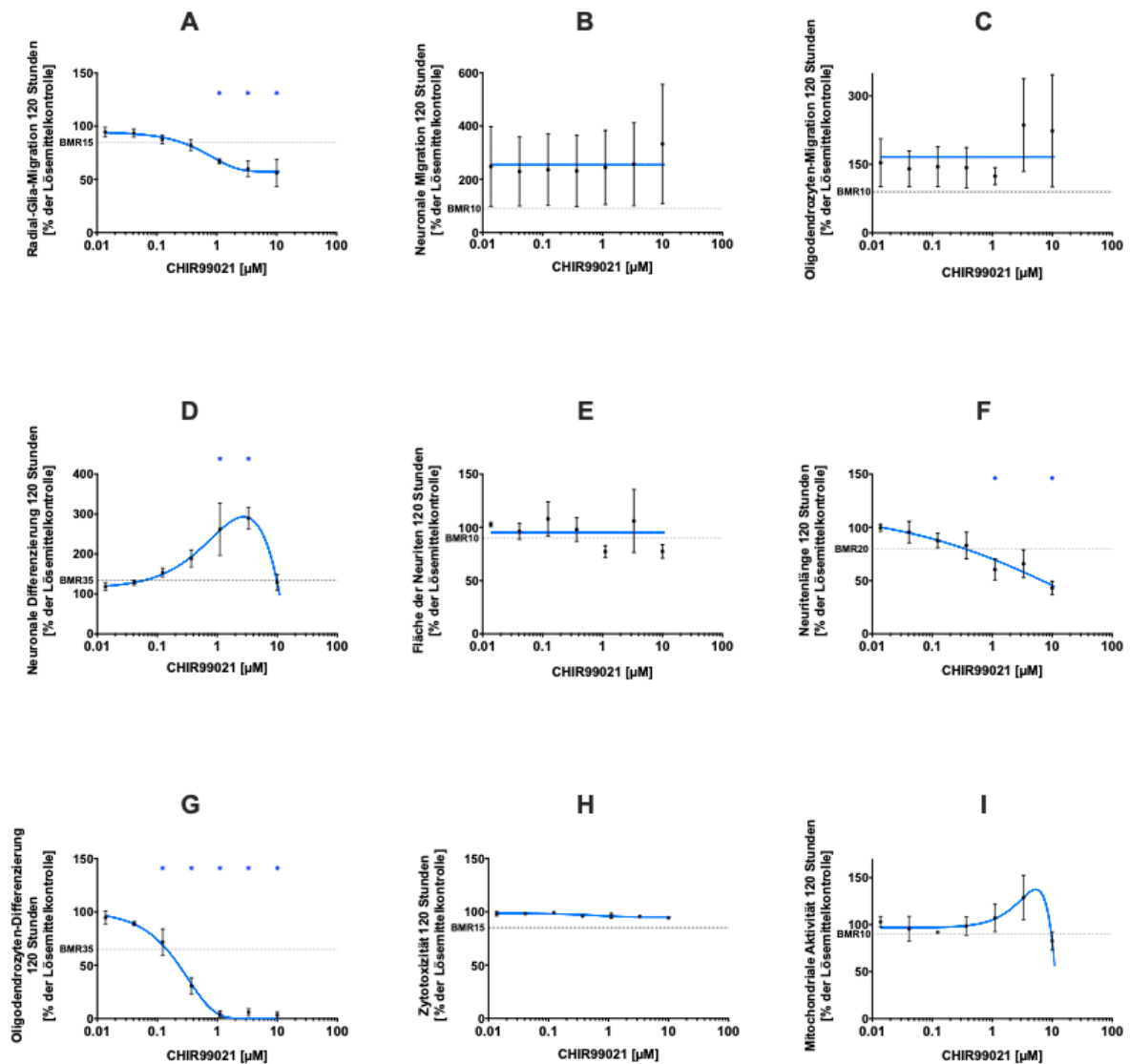


Abb. 18: Einfluss der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs sowie des GSK3 β -Signalwegs mittels CHIR99021 auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,01 µM bis 10 µM) CHIR99021 (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β 3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-post-hoc-test berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.2.2.2 Inhibierung mittels IWP2

IWP2 führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Radial-Glia-Migration mit einer BMC₁₀ von 2,4 µM (Abb. 19A).

Die neuronale Migration (Abb. 19B) und die Oligodendrozyten-Migration (Abb. 19C) werden, verglichen mit der LMK, durch IWP2 nicht beeinflusst.

Weder die neuronale Differenzierung (Abb. 19D) noch die Neuritenlänge (Abb. 19E) und -fläche (Abb. 19F) werden durch IWP2 verändert.

Die Differenzierung der Oligodendrozyten ist im Vergleich zur LMK deutlich reduziert: Das Maximum liegt in zweitniedrigsten Konzentrationen (0,02 µM) noch bei 59,5 % und fällt bis auf ein Minimum von 11,9 % (1,7 µM). Die BMR wird nicht geschnitten, da alle Werte unterhalb dieser liegen (Abb. 19G), es erfolgt aber eine eindeutige, konzentrationsabhängige Veränderung im Vergleich zur LMK.

IWP2 löst keine Zytotoxizität auf die hNPCs aus (Abb. 19H) und verändert ihre mitochondriale Aktivität nicht (Abb. 19I). Damit sind alle hier beschriebenen Effekte substanzspezifisch.

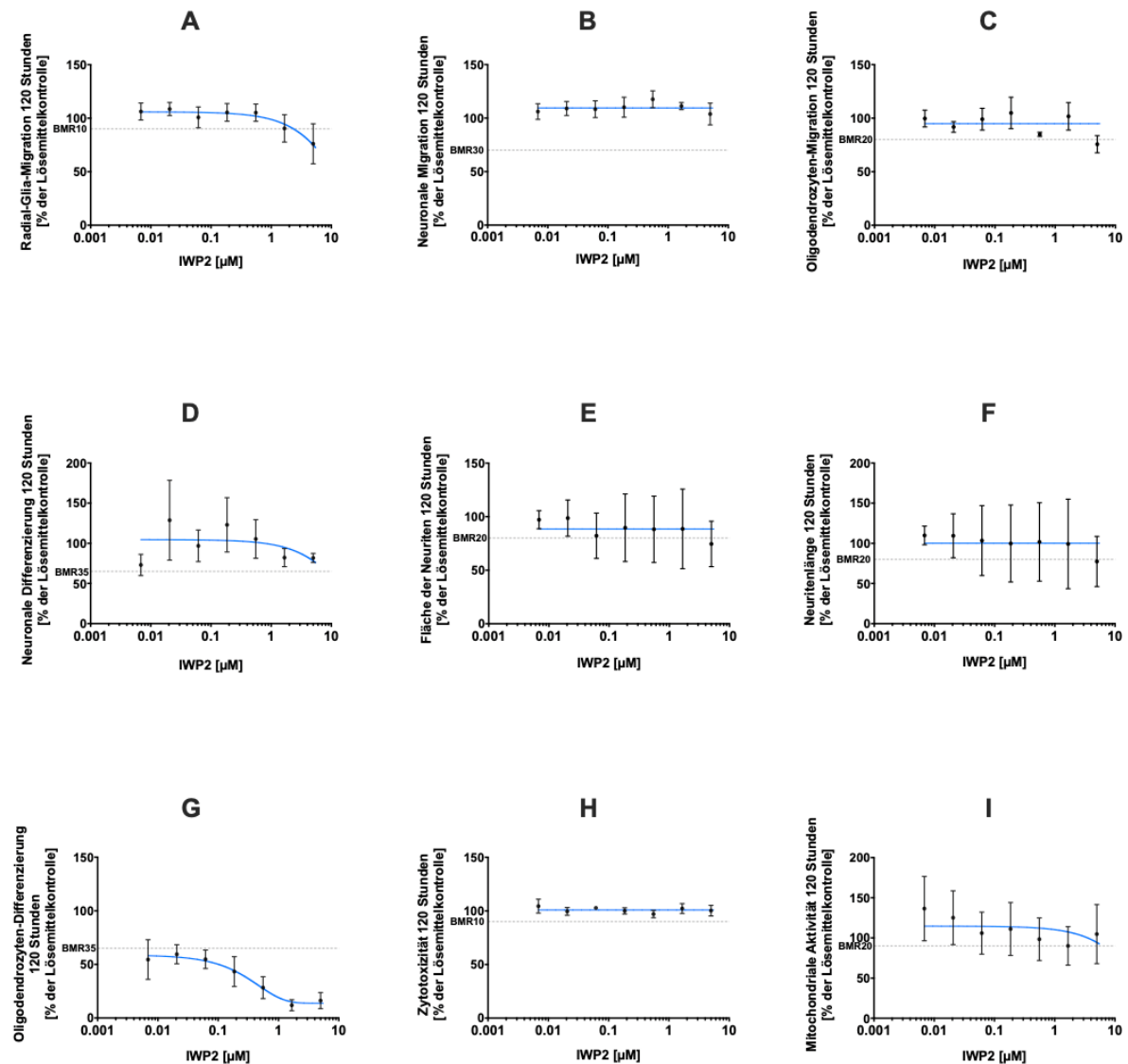


Abb. 19: Einfluss der Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs mittels IWP2 auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,007 µM bis 5 µM) IWP2 (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc*-test berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.2.2.3 Inhibierung mittels Pioglitazone

Pioglitazone reduziert die Radial-Glia-Migration mit einer BMC_{10} von $5,1 \mu M$ (Abb. 20A). In einer Konzentration von $20 \mu M$ liegt die Radial-Glia-Migration bei 69,9 % im Vergleich zur LMK.

Die neuronale Migration (Abb. 20B) und die Oligodendrozyten-Migration (Abb. 20C) werden durch Pioglitazone nicht verändert.

Pioglitazone beeinflusst weder die neuronale Differenzierung (Abb. 20D) noch die Neuritenfläche (Abb. 20E) oder -länge (Abb. 20F) im Vergleich zur LMK.

Pioglitazone verändert die Oligodendrozyten-Differenzierung im Vergleich zur LMK nicht (Abb. 20G).

Die BMR_{10} der Zytotoxizitäts-Kurve wird nicht geschnitten, daher kommt es zu keiner statistisch aussagekräftigen Zytotoxizität (Abb. 20H). Alle zuvor beschriebenen Effekte sind damit substanzspezifisch.

Die mitochondriale Aktivität wird durch Pioglitazone im Vergleich zur LMK nicht beeinflusst (Abb. 20I).

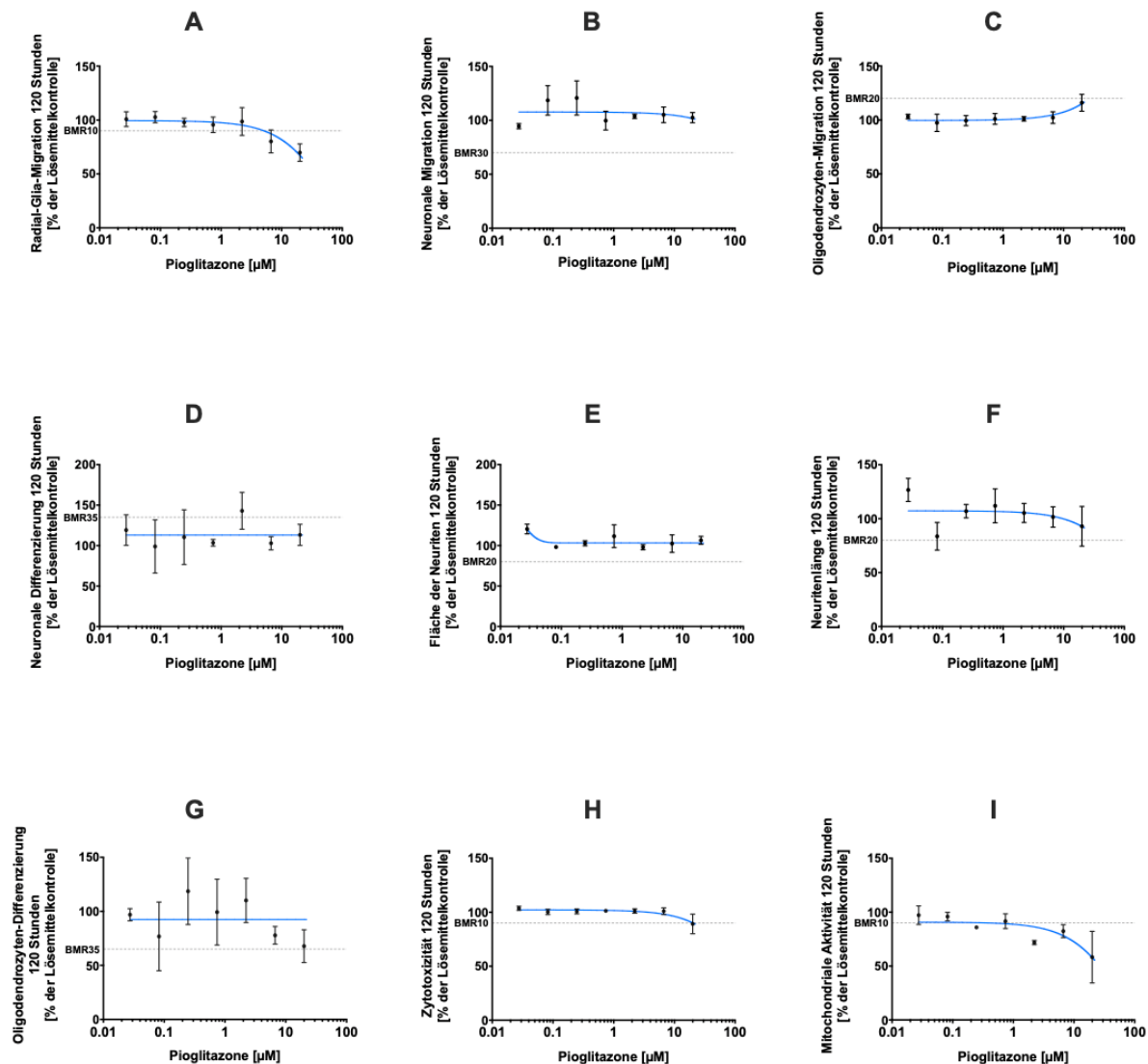


Abb. 20: Einfluss der Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs sowie des GSK3 β -Signalwegs mittels Pioglitazone auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μ m wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 μ M bis 20 μ M) Pioglitazone (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β 3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.3 GSK3 β -Signalweg

Das Pankreashormon Insulin wurde zur Aktivierung des GSK3 β -Signalwegs eingesetzt. Die niedrigste getestete Konzentration beträgt 0,03 μ M, die höchste 20 μ M.

Der Inhibitor des GSK3 β -Moleküles CHIR99021 wurde als zweiter Aktivator des Signalwegs in einem Konzentrationsbereich von 0,01 μ M bis 10 μ M eingesetzt. Zuvor wurde CHIR99021 als Aktivator von Wnt genutzt.

Der Inhibitor Pioglitazone wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,03 bis 20 μ M eingesetzt. Ebenfalls wurde Pioglitazone bereits im Wnt-Signalweg als Inhibitor getestet und wirkt hier über die direkte Aktivierung der intrazellulären GSK3 β .

3.3.1 GSK3 β unter proliferierenden Bedingungen

3.3.1.1 Aktivierung mittels Insulin

Insulin beeinflusst die Proliferationsrate der hNPCs im Vergleich zur LMK nicht (Abb. 21A).

Insulin löst keine zytotoxischen Effekte bei den Neurosphären aus (Abb. 21B). Die mitochondriale Aktivität verläuft ähnlich zur LMK (Abb. 21C).

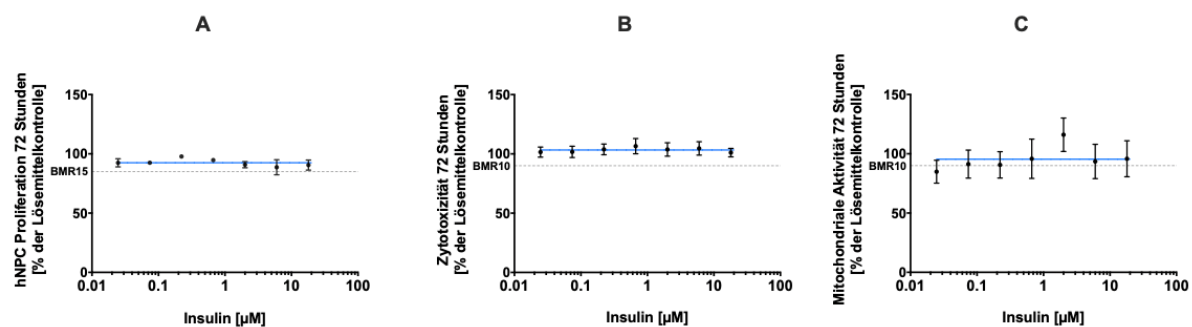


Abb. 21: Einfluss der Aktivierung des GSK3 β -Signalwegs mittels Insulin auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μ m wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 μ M bis 20 μ M) Insulin (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % H₂O verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.3.1.2 Aktivierung mittels CHIR99021

Der Aktivator CHIR99021 wurde nicht nur in der Testung des GSK3 β -Signalwegs, sondern auch für die Steuerung des kanonischen Wnt-Signalwegs eingesetzt. Die Effekte auf die Proliferationsrate, Zytotoxizität und Viabilität der Neurosphären wurden oben in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben.

3.3.1.3 Inhibierung mittels Pioglitazone

Pioglitazone wurde nicht nur zur Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs verwendet, sondern ebenfalls für die Inhibierung des GSK3 β -Signalwegs eingesetzt. Die Effekte auf die Proliferationsrate, Zytotoxizität und Viabilität der Neurosphären wurden oben in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben.

3.3.2 GSK3 β unter differenzierenden Bedingungen

3.3.2.1 Aktivierung mittels Insulin

Die Migration der Radial-Glia-Zellen (Abb. 22A), der Neurone (Abb. 22B) und der Oligodendrozyten (Abb. 22C) wird durch Insulin nicht beeinflusst.

Weder die neuronale Differenzierung (Abb. 22D) noch die Neuritenfläche (Abb. 22E) und die -länge (Abb. 22F) verändern sich durch die Exposition mit Insulin.

Insulin steigert die Differenzierungsrate der Oligodendrozyten mit einer BMC₃₅ von 14 μ M (Abb. 22G). Die Zytotoxizität von Insulin liegt über dem gesamten Konzentrationsbereich bei durchschnittlich ca. 88,5 %, verglichen zur LMK. Die gesamte Kurve liegt unterhalb der BMR und erreicht diese nicht (Abb. 22H). Damit sind alle hier beschriebenen Effekte substanzspezifisch.

Die BMR₁₀ der Viabilitäts-Kurve wird nicht geschnitten, daher kommt es zu keiner statistisch aussagekräftigen Reduktion der mitochondrialen Aktivität (Abb. 22I).

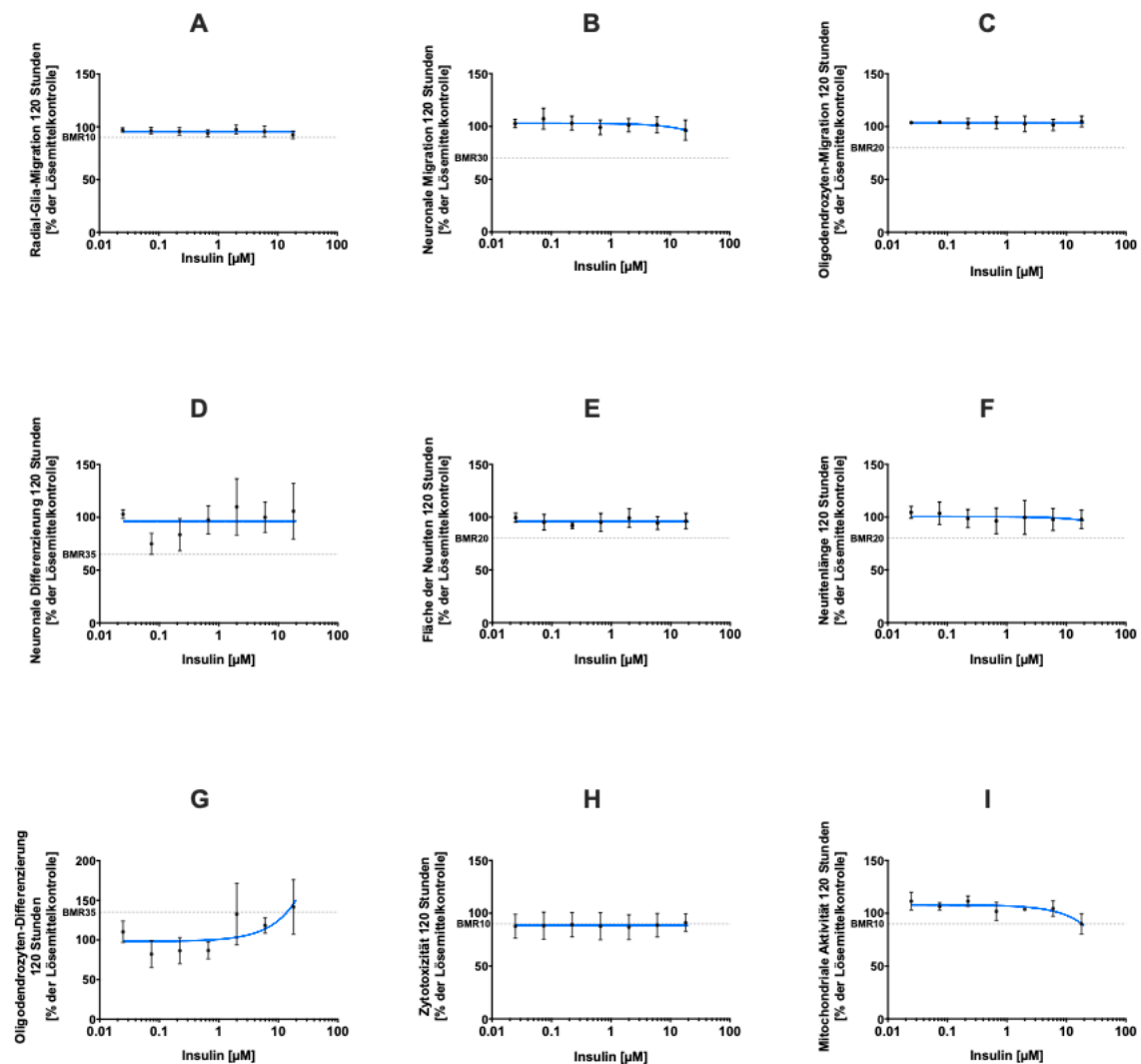


Abb. 22: Einfluss der Aktivierung des GSK3 β -Signalwegs mittels Insulin auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenfläche (E), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μ m wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 μ M bis 20 μ M) Insulin (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % H₂O verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β 3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.3.2.2 Aktivierung mittels CHIR99021

Der Aktivator CHIR99021 wurde nicht nur in der Testung des GSK3 β -Signalwegs, sondern auch für die Steuerung des kanonischen Wnt-Signalwegs eingesetzt. Die Effekte unter migrierenden und differenzierenden Bedingungen wurden oben in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

3.3.2.3 Inhibierung mittels Pioglitazone

Pioglitazone wurde nicht nur zur Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs verwendet, sondern ebenfalls für die Inhibierung des GSK3 β -Signalwegs eingesetzt. Die Effekte unter migrierenden und differenzierenden Bedingungen wurden oben in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben.

3.4 EPR-Signalweg

Für die Aktivierung des EPR-Signalwegs haben wir das Gewebeshormon PGE2 eingesetzt. Hierfür wurden die hNPCs mit Konzentrationen von 0,03 μM bis 20 μM behandelt.

Das Analgetikum Celecoxib kann über die COX2-Inhibition den vorliegenden Signalweg unterbrechen. Der Konzentrationsbereich reicht von 0,04 μM bis 30 μM Celecoxib.

3.4.1 EPR unter proliferierenden Bedingungen

3.4.1.1 Aktivierung mittels PGE2

Abbildung 23A zeigt, dass eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit PGE2 den Einbau von BrdU in die Zellen mit einer BMC₁₅ von 14,1 μM inhibiert. Zusätzlich ist ein glockenförmiger Verlauf der Kurve in niedrigeren Konzentrationen zwischen 0,03 μM und 6,7 μM zu sehen. Das Maximum dieses Effekts liegt bei 131,5 % (1 μM) im Vergleich zur LMK.

Außerdem ist die mitochondriale Aktivität mit einer BMC₁₀ von 13,1 μM leicht reduziert (Abb. 23C). Im getesteten Konzentrationsbereich konnte keine Zytotoxizität festgestellt werden (Abb. 23B). Damit ist der Proliferationseffekt substanzspezifisch.

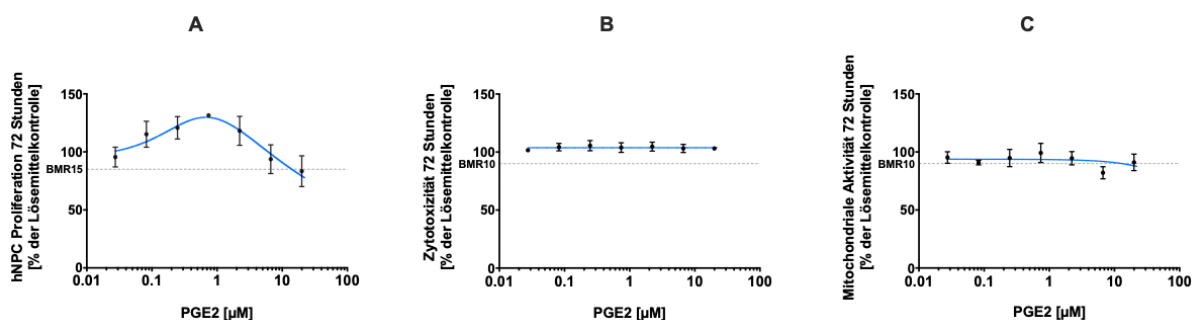


Abb. 23: Einfluss der Aktivierung des kanonischen EPR-Signalwegs mittels PGE2 auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 μM bis 20 μM) PGE2 (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % H_2O verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMC wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.4.1.2 Inhibierung mittels Celecoxib

In der Proliferationsanalyse zeigt sich eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferationsrate, angefangen bei 94,1 % (0,04 μM) fällt diese bis auf 40,3 % (30 μM). Der Effekt in dieser höchsten Konzentration von 30 μM ist signifikant. Die BMC₁₅ wird bei 0,3 μM Celecoxib erreicht (Abb. 24A).

Es zeigen sich keine zytotoxischen Effekte (Abb. 24B) und keine Beeinträchtigungen der mitochondrialen Aktivität (Abb. 24C) in dem von uns ausgewählten Konzentrationsbereich. Der Proliferationseffekt von Celecoxib ist damit als substanzspezifisch zu bewerten.

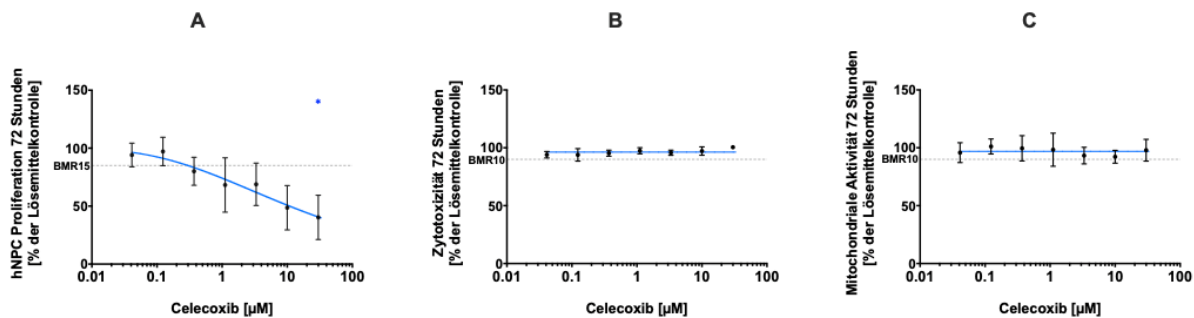


Abb. 24: Einfluss der Inhibierung des EPR-Signalwegs mittels Celecoxib auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,04 µM bis 30 µM) Celecoxib (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc-test* berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMC wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.4.2 EPR unter differenzierenden Bedingungen

3.4.2.1 Aktivierung mittels PGE2

PGE2 reduziert die Radial-Glia-Migration mit einer BMC₁₀ von 15 µM (Abb. 25A).

Die neuronale (Abb. 25B) und die Oligodendrozyten-Migration (Abb. 25C) unterliegen keiner Beeinflussung durch PGE2 verglichen mit der LMK.

PGE2 sorgt für eine konzentrationsabhängige Reduktion der neuronalen Differenzierung mit einer BMC₃₅ von 19,1 µM. In den niedrigsten drei Konzentrationen (0,03 µM bis 0,3 µM) kommt es zunächst nicht zu starken Abweichungen im Vergleich zur LMK, im Anschluss fällt die Differenzierung bis auf 62,3 % ab (20 µM) (Abb. 25D).

Die Neuritenfläche wird durch PGE2 mit einer BMC₂₀ von 15,3 µM reduziert. (Abb. 25E).

Die Neuritenlänge zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion mit einer BMC₂₀ von 12,8 µM (Abb. 25F).

Die oligodendrogliale Differenzierung wird durch PGE2 im Vergleich zur LMK mit einer BMC₃₅ von 18,1 µM reduziert (Abb. 25G).

Es werden durch PGE2 weder zytotoxische (Abb. 23H) noch viabilitätsmindernde (Abb. 25I) Effekte im Vergleich zur LMK generiert. Damit sind alle hier beschriebenen Effekte substanzspezifisch.

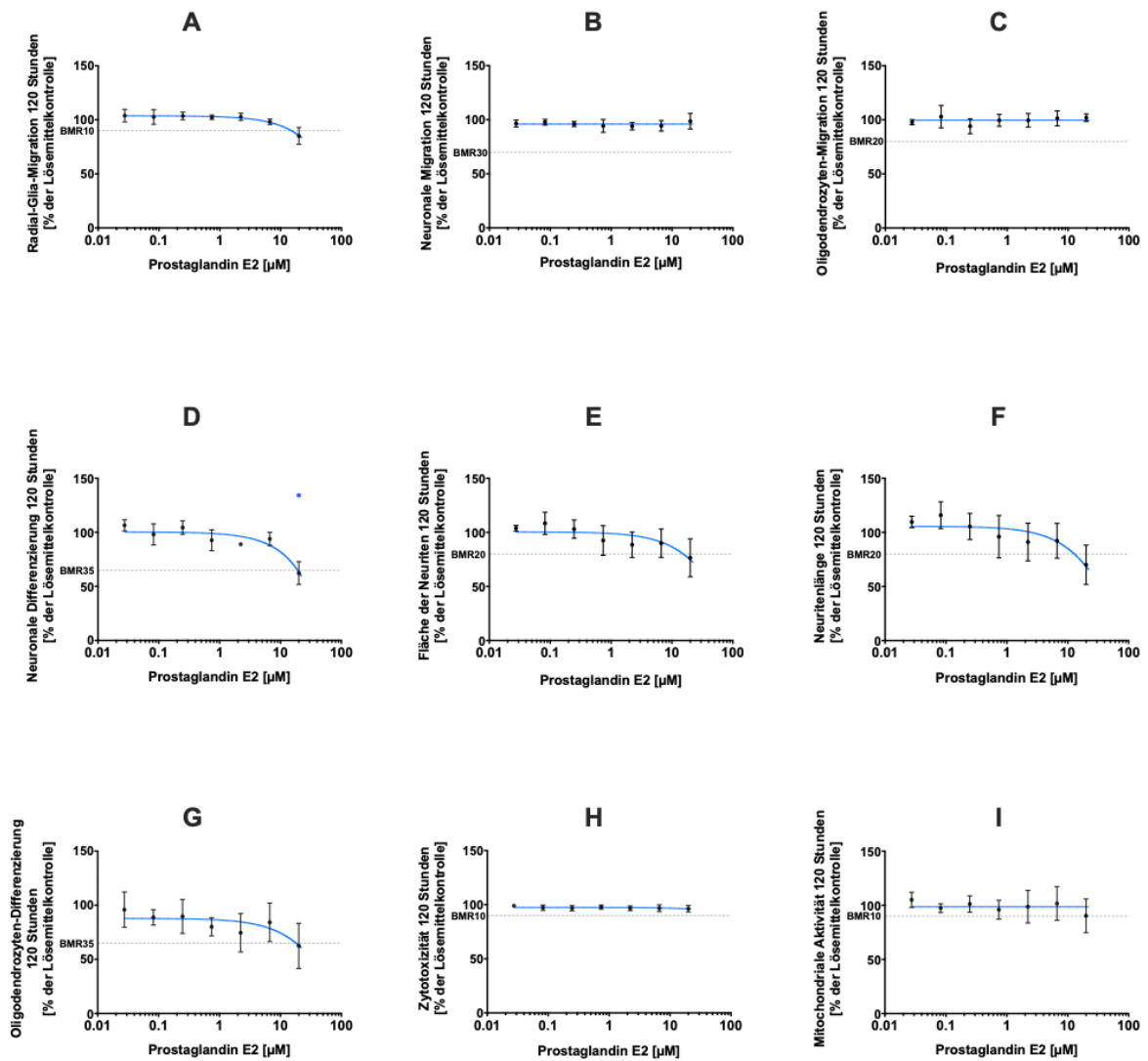


Abb. 25: Einfluss der Aktivierung des EPR-Signalwegs mittels PGE2 auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenfläche (E), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 µM bis 20 µM) PGE2 (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % H₂O verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc-test* berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.4.2.2 Inhibierung mittels Celecoxib

Aufgrund hoher Zytotoxizität wurden die Datenpunkte der höchsten Celecoxib-Konzentration von 30 μM aus allen Endpunkten, bis auf Zytotoxizität und mitochondriale Aktivität, exkludiert.

Celecoxib verändert weder die Migration der Radial-Glia-Zellen (Abb. 26A) noch die der Neurone (Abb. 26B) oder die der Oligodendrozyten (Abb. 26C).

Celecoxib verändert weder die neuronale Differenzierung (Abb. 26D) noch die Neuritenfläche (Abb. 26E) und -länge (Abb. 26F) im Vergleich zur LMK.

Die oligodendrogliale Differenzierung wird durch Celecoxib mit einer BMC_{35} von 2,9 μM inhibiert. In der zweitniedrigsten Konzentration (0,1 μM) liegt die Differenzierung bei 145,8 %. Danach kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion bis auf 9 % in einer Konzentration von 10 μM , hier wird Signifikanz erreicht. (Abb. 26G).

Celecoxib löst mit einer BMC_{10} von 19,3 μM zytotoxische Effekte auf die Neurosphären aus (Abb. 26H). Aufgrund der Exklusion des Konzentrationsbereiches zwischen 10 μM und 30 μM sind alle hier beschriebenen Effekte substanzspezifisch.

Die mitochondriale Aktivität der hNPCs wird durch Celecoxib mit einer BMC_{10} von 0,6 μM im Vergleich zur LMK deutlich verringert. In den Konzentrationen von 1,1 μM bis 10 μM ist dieser Effekt signifikant (Abb. 26I).

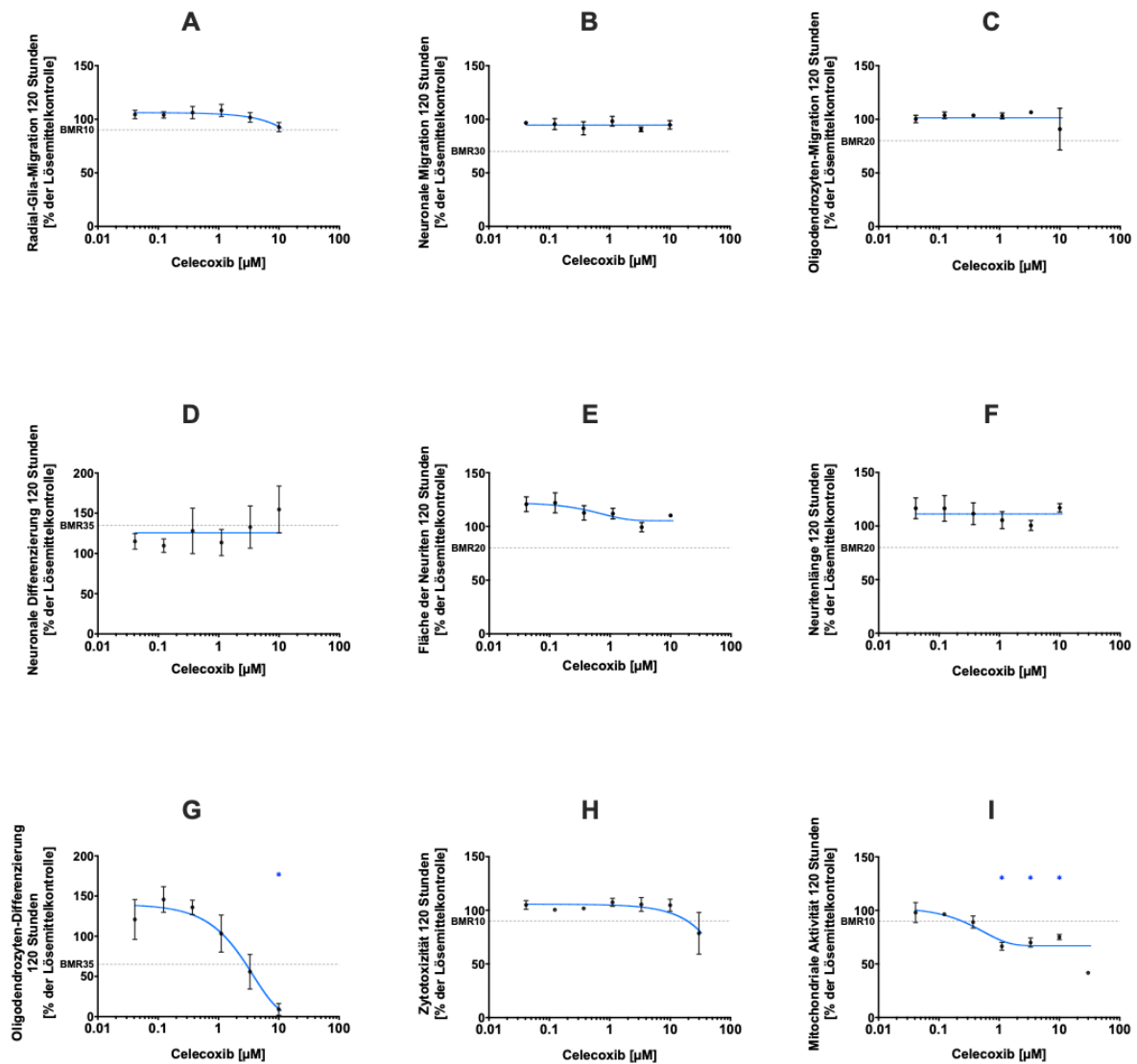


Abb. 26: Einfluss der Inhibition des EPR-Signalwegs mittels Celecoxib auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,04 µM bis 30 µM) Celecoxib (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way ANOVA* mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc-test* berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.5 mTOR-Signalweg

Der Aktivator MHY1485 wurde zur Stimulation des mTOR-Signalwegs in Konzentrationen von 0,03 μM bis 20 μM eingesetzt.

Everolimus inhibiert den mTOR-Signalweg und wurde unter proliferierenden Bedingungen in einem Konzentrationsbereich von 0,00004 μM bis 0,04 μM getestet.

3.5.1 mTOR unter proliferierenden Bedingungen

3.5.1.1 Aktivierung mittels MHY1485

Die Proliferation der hNPCs unter MHY1485 verläuft graphisch aufgetragen glockenförmig. Nach einer initialen Zunahme (0,03 μM bis 0,2 μM) kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion mit einer BMC_{15} von 1,8 μM . Das Minimum wird bei 50,5 % (20 μM) erreicht, dieser Effekt ist signifikant (Abb. 27A).

Es können keine zytotoxischen Effekte unter der Exposition mit MHY1485 gemessen werden (Abb. 27B). Damit ist die Proliferationsminderung durch MHY1485 substanzspezifisch.

Die mitochondriale Aktivität sinkt bis auf 74 % (20 μM), die Kurve liegt jedoch unterhalb der BMR und schneidet diese nicht (Abb. 27C).

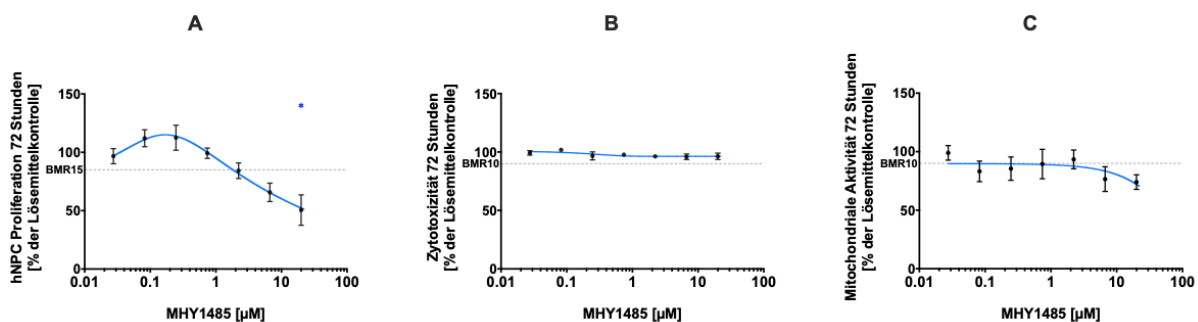


Abb. 27: Einfluss der Aktivierung des mTOR-Signalwegs mittels MHY1485 auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,00004 μM bis 0,04 μM) MHY1485 (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc*-test berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.5.1.2 Inhibierung mittels Everolimus

Everolimus führt zu einer Reduktion der Proliferation mit einer BMC_{15} von $0,005 \mu M$. Das Minimum von 44,8 % wird bei einer Konzentration von $0,04 \mu M$ Everolimus erreicht. Die Effekte in beiden höchsten Konzentrationen ($0,01 \mu M$ und $0,04 \mu M$) sind signifikant (Abb. 28A).

Es zeigt sich keine Zytotoxizität im Vergleich zur LMK (Abb. 28B), damit sind alle gemessenen Effekte substanzspezifisch.

Die mitochondriale Aktivität wird durch Everolimus mit einer BMC_{10} von $0,004 \mu M$ reduziert (Abb. 28C).

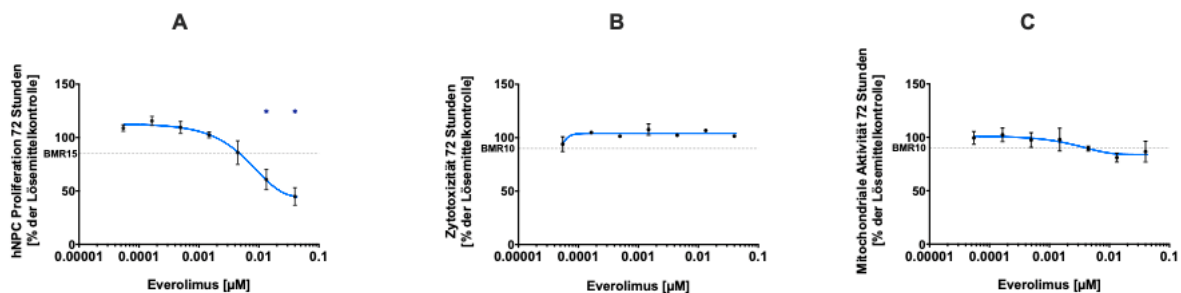


Abb. 28: Einfluss der Inhibierung des mTOR-Signalwegs mittels Everolimus auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von $300 \mu m$ wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen ($0,04 \mu M$ bis $10 \mu M$) Everolimus (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc*-test berechnet. Effekte mit p-Werten $< 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.5.2 mTOR unter differenzierenden Bedingungen

Der Konzentrationsbereich des mTOR-Aktivators MHY1485 bleibt unter differenzierenden Bedingungen gleich (0,03 μ M bis 20 μ M).

Unter differenzierenden Bedingungen wurde der mTOR-Inhibitor Everolimus (höher als unter proliferierenden Bedingungen) in einem Konzentrationsbereich von 0,04 μ M bis 10 μ M verwendet.

3.5.2.1 Aktivierung mittels MHY1485

Die Migration der Radial-Glia-Zellen wird durch MHY1485 mit einer BMC_{10} von 18,1 μ M reduziert, in der höchsten Konzentration von 20 μ M ist dieser Effekt signifikant (Abb. 29A).

MHY1485 verändert weder die neuronale (Abb. 29B) noch die Oligodendrozyten-Migration im Vergleich zur LMK (Abb. 29C).

Weder die Differenzierung der Neurone (Abb. 29D) noch die Neuritenfläche (Abb. 29E) werden durch MHY1485 beeinflusst.

MHY1485 reduziert die Neuritenlänge mit einer BMC_{20} von 19,1 μ M (Abb. 29F).

MHY1485 führt zu einer Reduktion der Oligodendrozyten-Differenzierung mit einer BMC_{35} von 1,7 μ M. In den beiden höchsten Konzentrationen findet eine Reduktion auf 39,4 % (6,7 μ M) sowie 19,2 % (20 μ M) statt. Diese beiden Effekte sind signifikant (Abb. 29G).

In dem von uns gewählten Konzentrationsbereich löst MHY1485 keine Zytotoxizität in den hNPCs aus (Abb. 29H). Damit sind alle hier genannten Effekte substanzspezifisch.

Die mitochondriale Aktivität der Neurosphären wird durch MHY1485 mit einer BMC_{10} von 1,1 μ M reduziert. In der höchsten Konzentration (20 μ M) fällt die Viabilität bis auf 78 % im Vergleich zur LMK (Abb. 29I).

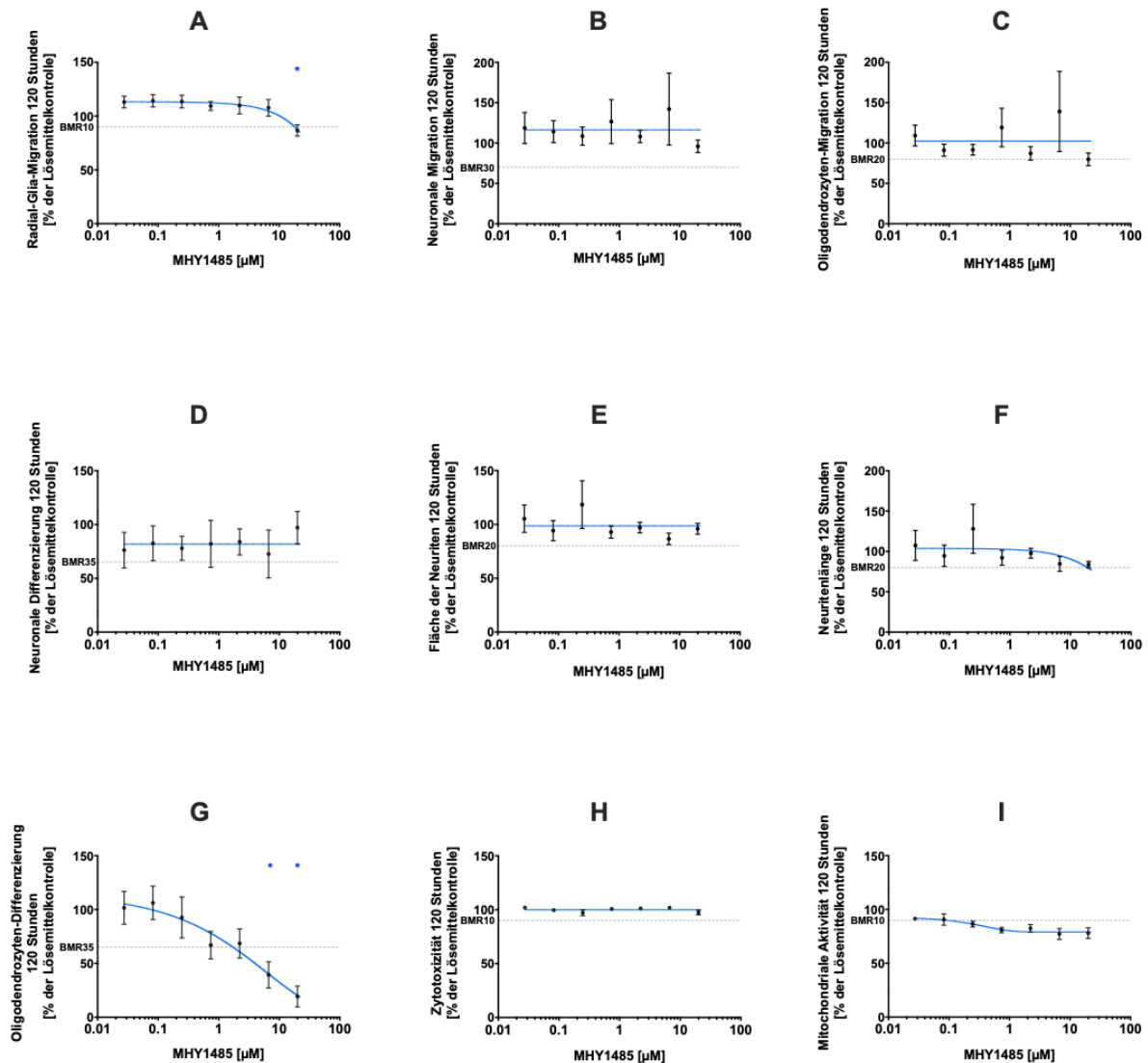


Abb. 29: Einfluss der Aktivierung des mTOR-Signalwegs mittels MHY1485 auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 µM bis 20 µM) MHY1485 (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc-test* berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.5.2.2 Inhibierung mittels Everolimus

Aufgrund hoher Zytotoxizität wurden die Ergebnisse in der höchsten Everolimus-Konzentration von 30 μM , bis auf im Graphen zur Abbildung der Zytotoxizität, ausgeschlossen.

Everolimus beeinflusst weder die Migration der Radial-Glia-Zellen (Abb. 30A) noch die der Neurone (Abb. 30B) oder die der Oligodendrozyten (Abb. 30C).

Ausgehend von einer bereits verringerten neuronalen Differenzierung in niedrigen Konzentrationen (bspw. 0,04 μM – 85,2 %) kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion durch Everolimus mit einer BMR_{35} von 7,7 μM (Abb. 30D).

Die Neuritenfläche (Abb. 30E) und die Neuritenlänge (Abb. 30F) werden durch Everolimus im Vergleich zur LMK nicht beeinflusst.

Die Oligodendrozyten-Differenzierung wird durch Everolimus nicht verändert (Abb. 30G).

Everolimus weist mit einer BMR_{10} von 30 μM in genau der höchsten Konzentration von Everolimus zytotoxische Effekte im Vergleich zur LMK auf (Abb. 30H). Da wir den Konzentrationsbereich von 10 μM bis 30 μM Everolimus aus den anderen Endpunkten exkludiert haben, sind alle hier beschriebenen Effekte als substanzspezifisch zu bewerten.

Die mitochondriale Aktivität wird durch Everolimus, verglichen mit der LMK, nicht beeinflusst (Abb. 30I).

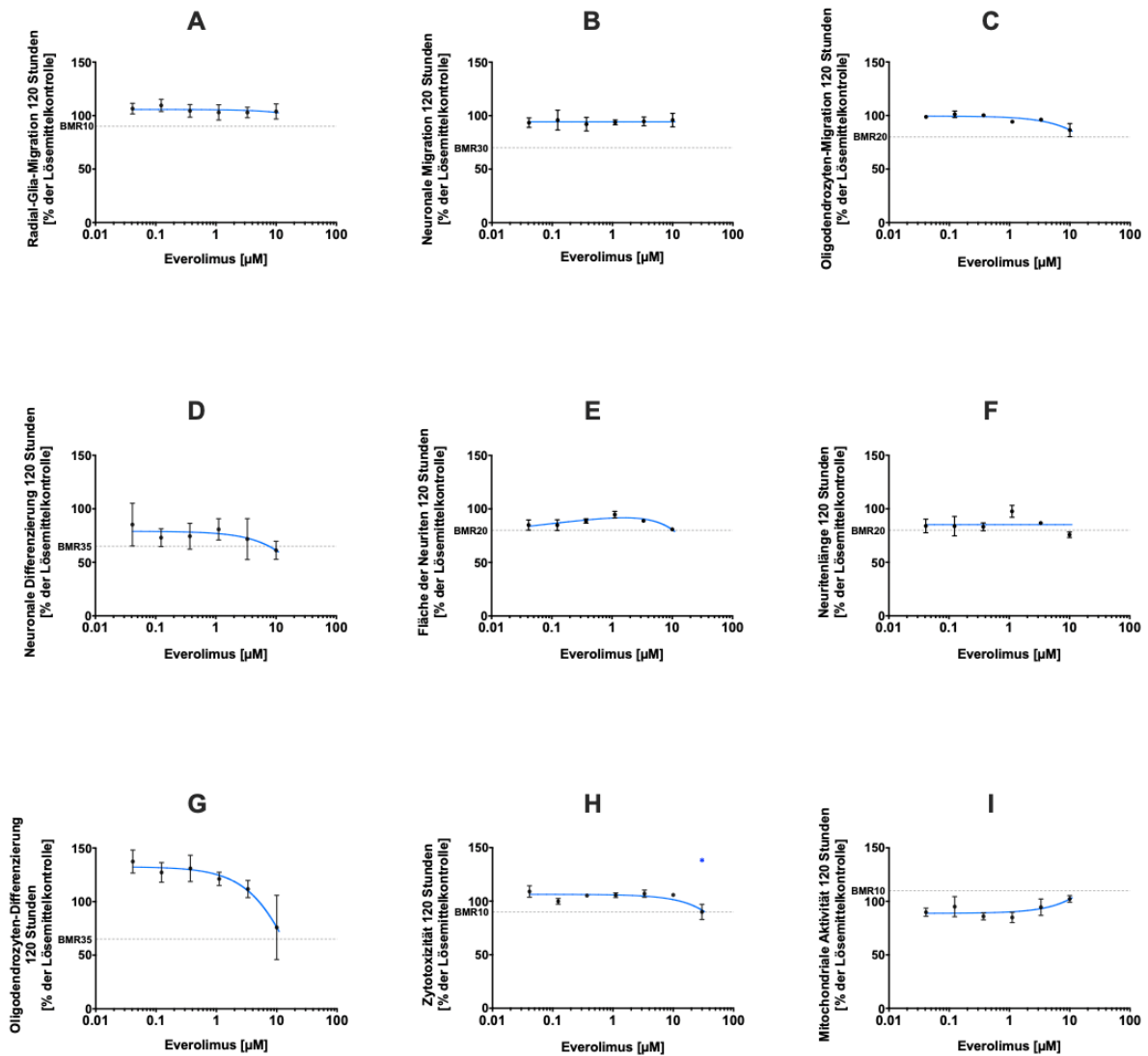


Abb. 30: Einfluss der Inhibition des mTOR-Signalwegs mittels Everolimus auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,04 µM bis 10 µM) Everolimus (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % H₂O verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die Signifikanz wurde anhand einer *one-way* ANOVA mit anschließendem Bonferroni-*post-hoc*-test berechnet. Effekte mit p-Werten < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet (*). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.6 STAT3-Signalweg

Colivelin ist Aktivator des STAT3-Signalwegs und wurde in der vorliegenden Arbeit in einem Konzentrationsbereich von 0,0001 μM bis 0,1 μM angewendet.

Limonin wurde in anderen Studien als Inhibitor des STAT3-Signalwegs identifiziert und wurde hier in Konzentrationen von 0,03 μM bis 20 μM getestet.

3.6.1 STAT3 unter proliferierenden Bedingungen

3.6.1.1 Aktivierung mittels Colivelin

Colivelin verändert die Proliferation der hNPCs im Vergleich zur LMK nicht (Abb. 31A).

Es können keine zytotoxischen Effekte durch Colivelin im Vergleich zur LMK nachgewiesen werden (Abb. 31B).

Colivelin beeinflusst die mitochondriale Aktivität der hNPCs nicht (Abb. 31C).

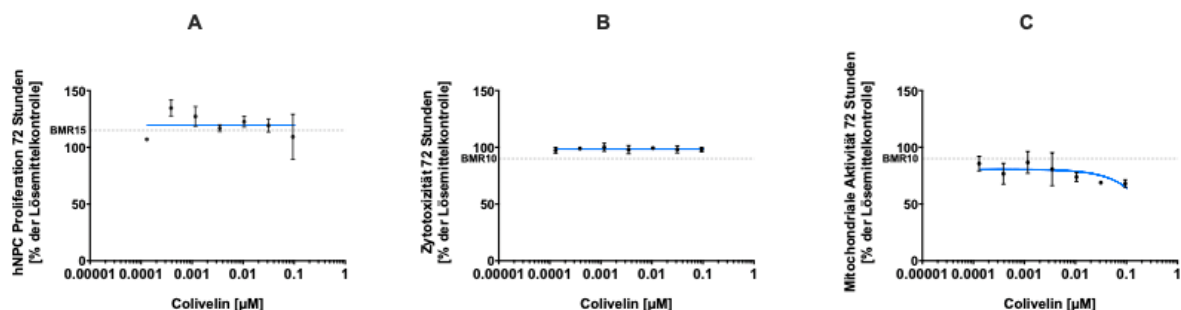


Abb. 31: Einfluss der Aktivierung des STAT3-Signalwegs mittels Colivelin auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 μm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,0001 μM bis 0,1 μM) Colivelin (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösungsmittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösungsmittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.6.1.2 Inhibierung mittels Limonin

Limonin beeinträchtigt die Proliferation der hNPCs im Vergleich zur LMK nicht (Abb. 32A).

Limonin löst in dem uns vorliegenden Konzentrationsbereich keine Zytotoxizität aus (Abb. 32B).

Ebenso wird die Viabilität der hNPCs nicht beeinträchtigt (Abb. 32C).

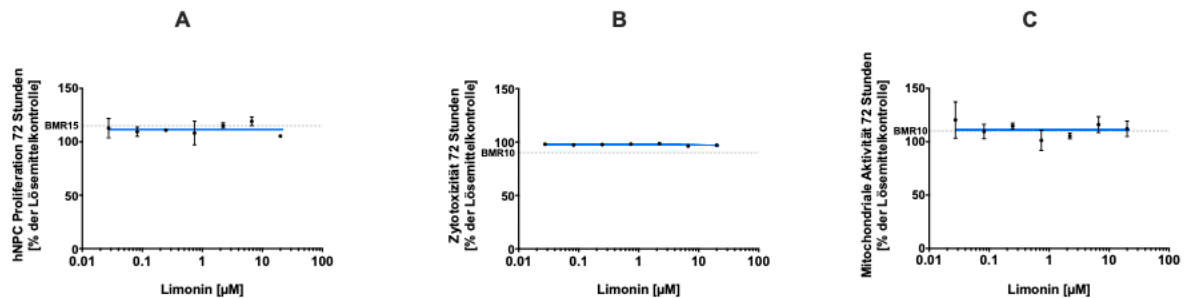


Abb. 32: Einfluss der Inhibierung des STAT3-Signalwegs mittels Limonin auf die Proliferation (A), Zytotoxizität (B) und mitochondriale Aktivität (C) von primären hNPCs nach 72 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter proliferierenden Bedingungen über 72 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 µM bis 20 µM) Limonin (Verdünnungsreihe 1:3) in B27-Proliferationsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde B27-Proliferationsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte wurden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Die Proliferation wurde über den Einbau von chemilumineszentem BrdU in die DNS der hNPCs bestimmt (A). Die Zytotoxizität (B) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (C) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.6.2 STAT3 unter differenzierenden Bedingungen

3.6.2.1 Aktivierung mittels Colivelin

Die Migration der Radial-Glia-Zellen wird durch Colivelin mit einer BMC_{10} von 0,06 µM inhibiert (Abb. 33A).

Colivelin verändert weder die neuronale (Abb. 33B) noch die Oligodendrozyten-Migration (Abb. 33C) im Vergleich zur LMK.

Weder die neuronale Differenzierung (Abb. 33D) noch die Neuritenfläche (Abb. 33E) und -länge (Abb. 33F) werden durch Colivelin im Vergleich zur LMK beeinflusst.

Die Differenzierung der Oligodendrozyten wird durch Colivelin mit einer BMC_{35} von 0,03 µM bis auf ein Maximum von 199,7 % bei 0,1 µM gesteigert (Abb. 33G).

Colivelin löst keine Zytotoxizität aus (Abb. 33H). Damit sind alle beobachteten Effekte als substanzspezifisch zu klassifizieren.

Die mitochondriale Aktivität der hNPCs wird durch Colivelin nicht beeinträchtigt (Abb. 33I).

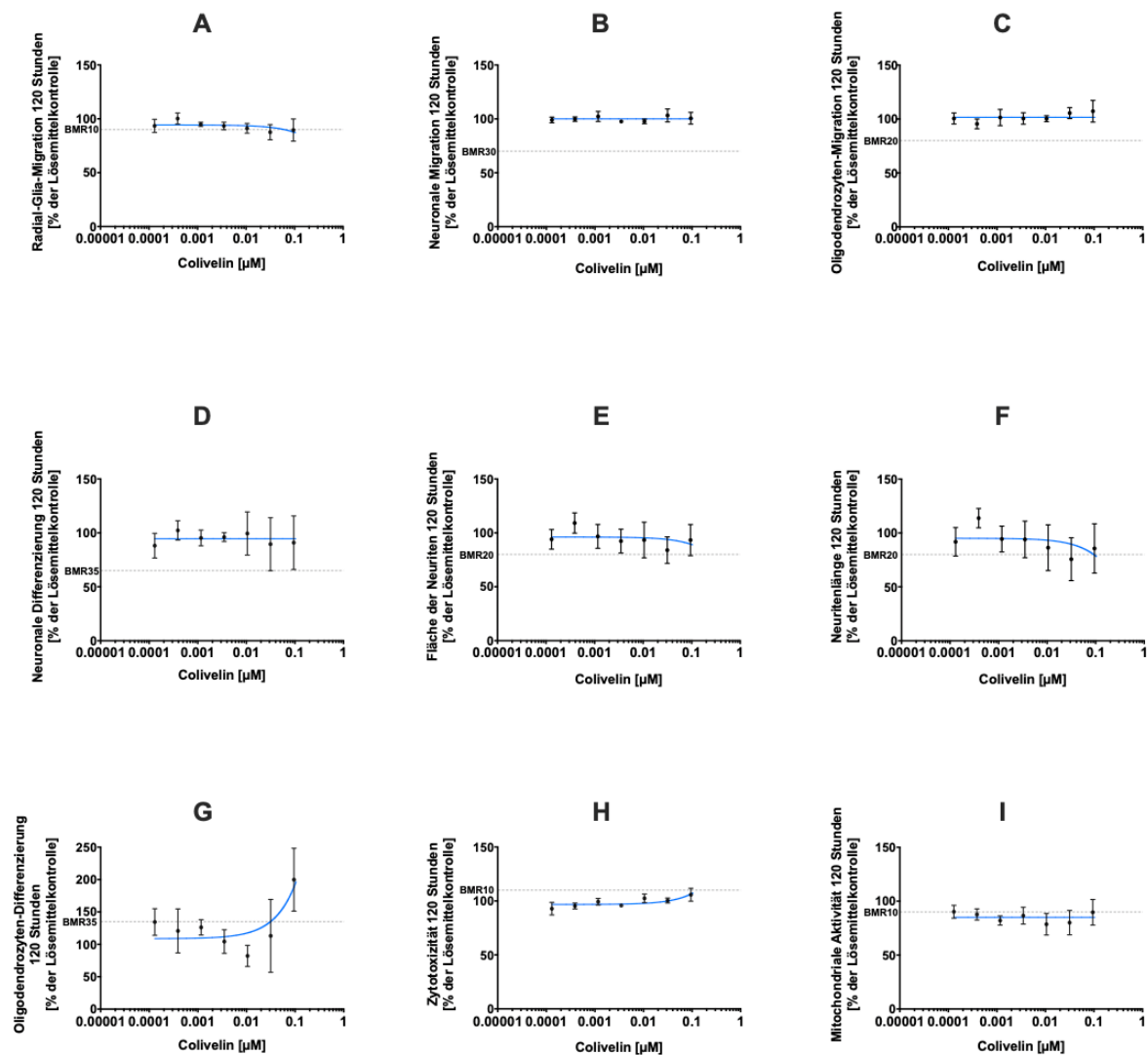


Abb. 33: Einfluss der Aktivierung des STAT3-Signalwegs mittels Colivelin auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenfläche (E), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,00001 µM bis 0,1 µM) Colivelin (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % H₂O verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter ‚best fit‘ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.6.2.2 Inhibierung mittels Limonin

Aufgrund hoher zytotoxischer Effekte in der höchsten Konzentration (20 μM) von Limonin wird diese Konzentration in den einzelnen Endpunkten, außer in der Zytotoxizität, nicht ausgewertet.

Die Migration der Radial-Glia-Zellen (Abb. 34A), die der Neurone (Abb. 34B) und die der Oligodendrozyten (Abb. 34C) wird durch Limonin im Vergleich zur LMK nicht beeinflusst.

Die Differenzierung der Neurone zeigt unter Limonin eine leicht verminderte Tendenz, ohne jedoch die BMR zu erreichen (Abb. 34D).

Die Neuritenfläche (Abb. 34E) und -länge (Abb. 34F) bleiben durch Limonin im Vergleich zur LMK unbeeinflusst.

Limonin verändert die Differenzierung der Oligodendrozyten nicht (Abb. 34G).

Limonin löst zytotoxische Effekte mit einer BMC_{10} von 15,5 μM im Vergleich zur LMK aus (Abb. 34H).

Da die zytotoxischen Effekte im Konzentrationsbereich zwischen 6,7 μM bis 20 μM in allen anderen Endpunkten exkludiert wurden, sind alle zuvor genannten Effekte substanzspezifisch.

Die mitochondriale Aktivität der Neurosphären wird durch Limonin im Vergleich zur LMK nicht beeinflusst (Abb. 34I).

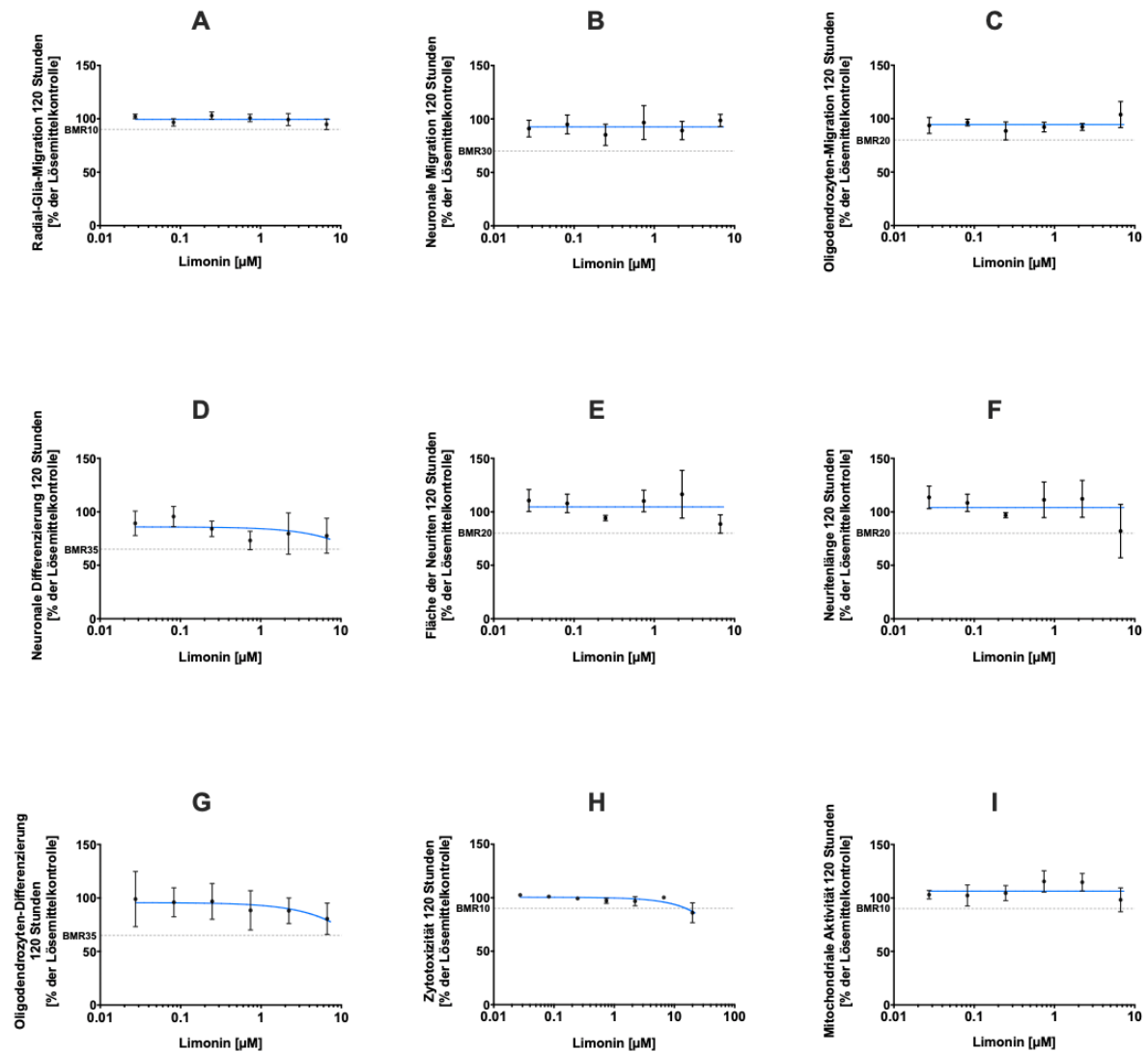


Abb. 34: Einfluss der Inhibition des STAT3-Signalwegs mittels Limonin auf die Radial-Glia-Migration (A), neuronale Migration (B), Oligodendrozyten-Migration (C), neuronale Differenzierung (D), Neuritenfläche (E), Neuritenlänge (F), Oligodendrozyten-Differenzierung (G) sowie Zytotoxizität (H) und mitochondriale Aktivität (I) von primären hNPCs nach 120 Stunden. Neurosphären einer Größe von 300 µm wurden unter differenzierenden Bedingungen über 120 Stunden mit sieben Konzentrationen (0,03 µM bis 20 µM) Limonin (Verdünnungsreihe 1:3) in N2-Differenzierungsmedium behandelt. Als Lösemittelkontrolle wurde N2-Differenzierungsmedium mit 0,1 % DMSO verwendet. Die entsprechenden Datenpunkte werden als % der Lösemittelkontrolle berechnet und aufgetragen. Nach 120 Stunden Exposition wurde die Migration radialer Gliazellen mittels Hoechst 33258-Färbung der Zellkerne ermittelt (A). Mittels immunzytochemischer Färbungen der ausmigrierten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip wurde die Migration von Neuronen (B) und Oligodendrozyten (C), deren Differenzierung (D und G) sowie die Fläche (E) und Länge (F) der Neurite bestimmt. Hierfür wurden Antikörper gegen β3-Tubulin als Marker für Neurone und gegen O4 für die Oligodendrozyten verwendet. Im Anschluss wurden die generierten Bilder durch Omnisphero analysiert und die Endpunkte quantifiziert. Die Zytotoxizität (H) wurde mittels LDH-Assay und die mitochondriale Aktivität (I) mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay gemessen. Die Konzentrationswirkungskurven sind als mathematisch berechneter „best fit“ mit den einzelnen Datenpunkten als Prozent der Lösemittelkontrolle dargestellt (Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen Replikaten). Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgende Abbildung (Abb. 35) stellt die Effekte aller getesteten Aktivatoren (A) und Inhibitoren (I) der untersuchten Signalwege auf die verschiedenen Endpunkte des Neurosphären-Assays dar. Die blauen Felder markieren Effekte, bei denen die jeweilige BMR erreicht wurde. Die Berechnungen bilden die Grundlage für die anschließende Diskussion der zuvor gezeigten Ergebnisse.

NPC1ab

		<u>NPC1:</u> Proliferation (BMR ₁₀)	<u>NPC1:</u> Zytotoxizität (BMR ₁₀)	<u>NPC1:</u> Mitochondriale Aktivität (BMR ₁₀)
1. Notch-Signalweg	A: Reelin			
	I: DAPT	0,6 µM		
2. Kanonischer Wnt-Signalweg	A: CHIR99021			
	1. I: IWP2			
	2. I: Pioglitazone			
3. GSK3β-Signalweg	1. A: Insulin			
	2. A: CHIR99021	siehe oben		
	I: Pioglitazone	siehe oben		
4. EPR-Signalweg	A: PGE2	14,1 µM		13,1 µM
	I: Celecoxib	0,3 µM		
5. mTOR-Signalweg	A: MHY1485	1,8 µM		
	I: Everolimus	0,005 µM		0,004 µM
6. STAT3-Signalweg	A: Colivelin			
	I: Limonin			

BMR erreicht
BMR nicht erreicht

NPC2-5

		<u>NPC2a:</u> Radial-Glia- Migration (BMR ₁₀)	<u>NPC2b:</u> Neuronale Migration (BMR ₃₀)	<u>NPC2c:</u> Oligodendro- zyten- Migration (BMR ₃₀)	<u>NPC3:</u> neuronale Differen- zierung (BMR ₁₀)	<u>NPC4a:</u> Fläche d. Neuriten (BMR ₃₀)	<u>NPC4b:</u> Länge d. Neuriten (BMR ₃₀)	<u>NPC5:</u> Oligodendro- zyten- Differen- zierung (BMR ₃₀)	<u>NPC2-5:</u> Zytotoxizität (BMR ₁₀)	<u>NPC2-5:</u> Mitochon- driale Aktivität (BMR ₁₀)
1. Notch-Signalweg	A: Reelin					0,02 µM	0,005 µM	0,01 µM		
	I: DAPT	9,5 µM			0,03 µM			0,05 µM		0,07 µM
2. Kanonischer Wnt-Signalweg	A: CHIR99021	0,1 µM			0,06 µM		0,4 µM	0,1 µM		9,7 µM
	1. I: IWP2	2,4 µM								
	2. I: Pioglitazone	5,1 µM								
3. GSK3β-Signalweg	1. A: Insulin							14 µM		
	2. A: CHIR99021	siehe oben								
	I: Pioglitazone	siehe oben								
4. EPR-Signalweg	A: PGE2	15 µM			19,1 µM	15,3 µM	12,8 µM	18,1 µM		
	I: Celecoxib							2,9 µM	19,3 µM	0,6 µM
5. mTOR-Signalweg	A: MHY1485	18,1 µM					19,1 µM	1,7 µM		1,1 µM
	I: Everolimus				7,7 µM				30 µM	
6. STAT3-Signalweg	A: Colivelin	0,06 µM						0,03 µM		
	I: Limonin								15,6 µM	

Abb. 35: Darstellung der substanzspezifischen Effekte (*benchmark response*, BMR) sowie der dazugehörigen *benchmark concentration* (BMC) pro Signalweg und Endpunkt im NPC1-5-Assay. Vertikal in beiden Tabellen aufgetragen zeigen sich die einzelnen Signalwege mit Ihren Aktivatoren (A) und Inhibitoren (I). Horizontal sind die einzelnen Endpunkte der Assays mit den jeweiligen BMR-Grenzen dargestellt. Blau gekennzeichnete Felder mit einer Konzentrationsangabe zeigen ein Erreichen der BMR im jeweiligen Signalweg und Endpunkt an. Die Konzentrationsangabe gibt die jeweilige BMC in µM wieder. Weiße Felder ohne Inhalt zeigen, dass in dem jeweiligen Signalweg und Endpunkt die vorgegebene BMR nicht erreicht wurde. Die BMR wurde auf Grundlage des Variationskoeffizienten und der niedrigsten Substanzkonzentration unter Multiplikation mit dem Faktor 1,5 für jeden Endpunkt des Neurosphären-Assays einzeln berechnet.

4 Diskussion

Die Entwicklung des menschlichen Gehirns ist ein besonders sensibler und höchst präzise ablaufender Prozess, der bei Disruptionen durch intrinsische und extrinsische Faktoren immense Auswirkungen auf das Leben nach der Geburt haben kann (Stiles & Jernigan, 2010).

Untersuchungen aus dem Jahr 2000 berichten, dass 3 % aller Entwicklungsstörungen direkt auf die Exposition mit einer entwicklungsneurologischen Chemikalie zurückzuführen sind und weitere 25 % aufgrund einer genetischen Anfälligkeit in Kombination mit einer Noxenexposition entstehen (US National Research Council, 2000). Wie in Abschnitt 1.3 bereits erläutert, führen entwicklungsneurologische Erkrankungen zu einem hohen individuellen, aber auch sozioökonomischen Leiden. Trotz dieser Erkenntnisse findet immer noch keine breite Substanzevaluierung und Testung auf entwicklungsneurologisches Potential statt – erst, wenn eine Substanz als neurotoxisch eingestuft wird, kommt es zu einer retrospektiven Substanztestung auf DNT (Bal-Price et al., 2015). Diese Substanztestung wird an Tieren *in vivo* durchgeführt und bringt die bekannten Problematiken mit sich (s. Abs. 1.3). Ziel ist es, die entstandene Datenlücke in der Entwicklungsneurotoxikologie weiter zu schließen und effiziente *in vitro* Assays zu entwickeln, welche zuverlässig adverse Effekte von Chemikalien und Umweltsubstanzen prädiktieren können (Bal-Price et al., 2015; Fritsche et al., 2017). Hierfür ist ein auf humanen Zellen basierender Assay unerlässlich und hat zur Entwicklung der DNT-IVB, mit dem Neurosphären-Assay als integralen Bestandteil, geführt (Bal-Price et al., 2015; Fritsche, Gassmann, & Schreiber, 2011). Ein weiteres Ziel ist es aufgrund des massiven erzeugten Tierleides, der mangelnden Interspezies-Übertragbarkeit sowie des hohen Ressourcenverbrauches, Tierversuche durch *in vitro* Testmethoden zu ersetzen (Fritsche et al., 2017).

Um die oben genannten Punkte sowie die Akzeptanz, Validität und Vorhersagekraft des Neurosphären-Assays zu stärken, wurden in dieser Arbeit Signalwegstestungen mit hNPCs durchgeführt, deren Ergebnisse im vorherigen Kapitel beschrieben wurden. Es folgt die wissenschaftliche Einordnung und Diskussion der generierten Daten in Referenz zu bereits bestehenden Studien. Die Schlussfolgerung am Ende soll die Stärken und Schwächen des Assays hervorheben, die Relevanz erkennen und ein Bild zukünftiger entwicklungsneurotoxikologischer Testungen zeichnen.

Im Folgenden werden nur die Endpunkte diskutiert, für welche eine BMC errechnet werden konnte (s. Abb. 35).

4.1 Notch-Signalweg

Notch spielt als hoch konservierter und bereits seit langem bekannter Signalweg eine immense Rolle für die adäquate Entwicklung des Säugetier-Gehirns. Als Notch-Aktivator wurde Reelin, als Notch-Inhibitor DAPT verwendet (s. Kapitel 1.5.1).

4.1.1 Notch unter proliferierenden Bedingungen

Während eine Notch-Aktivierung mittels Reelin keine Effekte im Proliferations-Assay zeigte, führt eine Notch-Inhibierung mittels DAPT zu einer Reduktion der hNPC-Proliferation mit einer BMC_{15} von 0,6 μM . Auch in murinen retinalen Stammzellen führt DAPT in einer Konzentration von 10 μM zu einer Proliferations-Minderung (Nelson et al., 2007), derselbe Effekt findet sich in Gehirnzellen Reelin-defizienter Mäuse (Sibbe et al., 2015). Eine Reelin-Defizienz ist vergleichbar mit einer Disruption durch eine vermehrte Inhibierung des Notch-Signalwegs und bestätigt damit unsere Beobachtungen.

Reelin verändert in der vorliegenden Arbeit die mitochondriale Aktivität der hNPCs auf durchschnittlich ca. 69,9 %. Andere Studien bestätigen, dass Reelin über verschiedene Mechanismen die mitochondriale Funktionsfähigkeit je nach Bedarf herauf- oder herabregulieren kann (Manning & Toker, 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Notch-Inhibierung die hNPC-Proliferation konzentrationsabhängig verringert, während eine Notch-Aktivierung mittels Reelin keine Effekte auf die hNPC-Proliferation hervorruft. Dies könnte daran liegen, dass Reelin über Gradienten im Gehirn wirkt (Armstrong, Anderson, & McDermott, 2019) und nicht (nur) über eine Signalwegsmodulation.

4.1.2 Notch unter differenzierenden Bedingungen

Der Notch-Aktivator Reelin verändert die Radial-Glia-Migration der hNPCs nicht, während der Inhibitor DAPT die Radial-Glia-Migration reduziert. In Spezies-spezifischen Studien zu den Effekten der Notch-Inhibition mittels DAPT auf murine und humane NPCs ließ sich eine Reduktion der Migration nur in den Ratten-NPCs erkennen (Masjosthusmann et al., 2018). Warum die Migration der hNPCs in der zitierten Studie von der hier vorliegenden Arbeit abweicht, begründet sich im Konzentrationsbereich: In der zitierten Studie wurde DAPT in einer Konzentration von 0,08 μM bis 5 μM eingesetzt. Die Radial-Glia-Migration wird in der vorliegenden Arbeit jedoch erst im Konzentrationsbereich zwischen 5 μM und 10 μM verringert. Bestätigend sind zudem indirekte Rückschlüsse aus Untersuchungen zu dem Einfluss von Reelin-Defizienz. Diese führt aufgrund der fehlenden Aktivierung von Notch (in der vorliegenden Arbeit simuliert über die Notch-Inhibition mittels DAPT) zu einer fehlerhaften, reduzierten Migration von Radial-Glia-Zellen (Chang et al., 2007; Hong et al., 2000; Sibbe et al., 2015; Zhao et al., 2004).

Die Neurogenese, gemessen anhand der neuronalen Differenzierung, wird durch den Aktivator Reelin nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führt eine Notch-Inhibierung mittels DAPT in den vorliegenden Versuchen zu einer signifikanten Steigerung der neuronalen Differenzierung. Diese Steigerung durch DAPT konnte ebenfalls in humanen, nicht jedoch in den NPCs von Nagetieren (Masjosthusmann et al.,

2018) sowie in aus human-induzierten pluripotenten Stammzellen (*human-induced pluripotent stem cells*, hiPSCs) generierten hNPCs (Esfandiari et al., 2012) nachgewiesen werden. Dies bestätigt erneut die gute Reproduzierbarkeit von Versuchen im Neurosphären-Assay. Außerdem bieten die Ergebnisse interessante neue Einblicke, da aus hiPSCs generierte hNPCs einem frühen embryonalen Entwicklungsstadium entsprechen, während die vorliegende Arbeit die Signalwegsmodulation von Zellen im Fetalstadium untersucht hat. Der Notch-Signalweg scheint somit über die embryonale Entwicklung des Gehirns hinaus zu persistieren und ebenfalls im Fetalstadium für eine adäquate Neurogenese verantwortlich zu sein. Die Neuritenmorphologie konnte in der vorliegenden Arbeit durch DAPT jedoch nicht moduliert werden. Reelin hingegen reduziert die Neuritenfläche und -länge konzentrationsabhängig. Dies bestätigt sich in murinen Zellmodellen, in welchen Reelin für die Verkürzung von Neuriten sorgt (Sestan, Artavanis-Tsakonas, & Rakic, 1999). Diese Effekte dienen dem Zweck, die Neurite nur so lang wie nötig zu gestalten, wie es für die Perfektionierung des neuronalen Netzwerkes erforderlich ist (Sestan, Artavanis-Tsakonas, & Rakic, 1999). Jedoch besteht eine Unsicherheit in der Interpretation dieser Ergebnisse. Neuere Studien weisen daraufhin, dass Reelin möglicherweise im Gehirn über Gradienten die Positionierung der Neurone und der Länge ihrer Neurite bestimmt und weniger über eine direkte Signalwegsmodulation (Armstrong, Anderson, & McDermott, 2019). Währenddessen kann die neuronale Migration in der vorliegenden Arbeit weder durch Reelin noch durch DAPT beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Oligodendrozyten-Differenzierung durch eine Notch-Aktivierung mittels Reelin reduziert. Zahlreiche Studien und Übersichtsarbeiten belegen, dass Reelin die Oligodendrogenese inhibiert, und zwar sowohl an murinen Gehirn- und Nervus opticus-Zellen *in vitro* (Ogino et al., 2020; Tran, Loew, & Franco, 2023; Wang et al., 1998), als auch in humanen embryonalen und adulten Gehirnen (Ables et al., 2011). *In vitro* zeigte sich zudem, dass murine oligodendrogliale Progenitorzellen weniger in Bereiche hoher Reelin-Konzentrationen ausmigrierten (Ogino et al., 2020). Reelin wurde aufgrund dessen als eine Art Repellens klassifiziert (Ogino et al., 2020), welches über Gradienten im Gehirn wirkt (Armstrong, Anderson, & McDermott, 2019) und nicht (nur) über die Notch-Modulation einen Einfluss auf die Entwicklung von Progenitorzellen nehmen kann. Die Kombination dieser Ursachen könnte zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeiten geführt haben. Eine Notch-Inhibierung mittels DAPT reduziert ebenfalls die Oligodendrozyten-Differenzierung in der vorliegenden Studie. Dieser Effekt bestätigt sich in den bereits oben erwähnten Spezies-spezifischen Untersuchungen (Masjosthusmann et al., 2018). DAPT führte hier ebenfalls zu einer Reduktion der Oligodendrozyten-Differenzierung in hNPCs, während Ratten-NPCs unbeeinflusst blieben und Maus-NPCs zur Differenzierung in Oligodendrozyten induziert wurden (Masjosthusmann et al., 2018). Währenddessen bleibt die oligodendrogliale Migration durch eine Notch-Modulation unbeeinflusst.

Im Differenzierungs-Assay reduziert DAPT die mitochondriale Aktivität der hNPCs signifikant. Der Notch-Inhibitor wurde zwar für Mitochondrien als membranstabilisierend beschrieben (Sheng et al.,

2009), reduzierte aber bereits in anderen Untersuchungen ab Konzentrationen von 1,25 μ M DAPT die mitochondriale Aktivität in Maus-, Ratten- und humanen NPCs (Masjosthusmann et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Notch-Inhibierung mittels DAPT zu einer Reduktion der Radial-Glia-Migration, einer signifikanten Reduktion der Oligodendrozyten-Differenzierung und der mitochondrialen Aktivität der hNPCs sowie zu einer signifikanten Steigerung der neuronalen Differenzierung führte. Diese Effekte bestätigen sich unter anderem in Vergleichsstudien zu dem Einfluss von DAPT auf hNPCs. Der fetale Neurosphären-Assay ist damit in der Lage, gewisse Disruptionen durch eine Notch-Inhibierung *in vitro* darzustellen. Eine Notch-Aktivierung mittels Reelin führt in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Reduktion der Neuritenfläche sowie einer Reduktion der Neuritenlänge und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Aufgrund der Erkenntnis, dass Reelin als Repellens für bestimmte Zellarten wirkt und über Gradienten die zelluläre Struktur des Gehirns organisiert, müssen die Ergebnisse der Notch-Aktivierung durch Reelin kritisch hinterfragt werden. Beitragend zu dieser erschwerten Interpretation sind die Umstände, dass vor Versuchsbeginn keine Bestimmung der VLDL- und ApoE-Rezeptoren in den hNPCs erfolgte und auch nicht die bereits von den hNPCs selbst sekretierte Menge an Reelin quantifiziert wurde. Dies könnte in Folgestudien vorab genauer untersucht werden. Eventuell könnten komplexere Modelle hier noch genauere Einblicke geben, wie bspw. Versuche an humanen fetalen Organoiden mit vorheriger Bestimmung der Rezeptor-Exprimierung und der endogenen Reelin-Synthese.

4.2 Kanonischer Wnt-Signalweg und GSK3 β -Signalweg

Wie bereits einleitend in Kapitel 1.5.2 erklärt, spielt der Wnt-Signalweg eine zentrale Rolle in verschiedensten Endpunkten der menschlichen Hirnentwicklung. Eines der zentralen Schaltmoleküle im Wnt-Signalweg ist das GSK3 β , welches über eine Modulation Auswirkungen auf den Wnt-Signalweg haben kann. GSK3 β kann jedoch auch einer separaten, eigenen Signalwegsmodulation unterliegen (s. Abb. 4). Durch diese enge Beziehung finden sich in dieser Arbeit Substanzen, welche sowohl den Wnt-Signalweg als auch den GSK3 β -Signalweg modulieren. Aufgrund dessen werden diese beiden Signalwege im Folgenden gemeinsam diskutiert. Da der GSK3 β -Signalweg außerdem Verschaltungen zu zahlreichen Proteinen und weiteren Signalwegen besitzt, ist er unabdingbar für die physiologische Entwicklung des menschlichen Gehirns (s. Kapitel 1.5.3).

CHIR99021 wurde sowohl als Wnt- als auch als GSK3 β -Signalwegs-Aktivator eingesetzt. Insulin wurde hingegen als alleiniger GSK3 β -Signalwegs-Aktivator verwendet. IWP2 wurde zur alleinigen Wnt-Signalwegs-Inhibierung genutzt. Pioglitazone wurde zur Inhibierung beider Signalwege verwendet.

4.2.1 Kanonischer Wnt-Signalweg und GSK3 β -Signalweg unter proliferierenden Bedingungen

Der Wnt- und GSK3 β -Aktivator CHIR99021 modulierte die Proliferation der fetalen hNPCs nicht. Eine Studie, welche mit aus hiPSCs generierten hNPCs unter sehr ähnlichen Rahmenbedingungen arbeitete (bspw. EGF/FGF-haltiges Medium für die Proliferation, N2-Supplement für die Differenzierung, überschneidender Konzentrationsbereich), beschreibt gegensätzlich zu unseren Beobachtungen eine deutliche Proliferationssteigerung bei 3 μ M CHIR99021 (Esfandiari et al., 2012). Dagegen zeigt eine Studie mit humanen Organoiden, dass die Proliferation neuraler Zellen unter CHIR99021 konzentrationsabhängig ist und besonders in niedrigen Konzentrationen (1 μ M) eine deutliche Proliferationssteigerung gemessen werden kann, während jedoch hohe Konzentrationen (10 μ M) nicht dazu führen (Delepine et al., 2021). Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt dies am Entwicklungsstadium der untersuchten Zellsysteme. Aus hiPSCs generierte hNPCs entsprechen eher der frühen embryonalen Entwicklung, während die hier verwendeten Zellen aus der fetalen Entwicklungsphase (GW 16-19) stammen. Nur während der frühen Expansionsphase, nicht aber in der neurogenen Phase der Gehirnentwicklung, steigert die Aktivierung des Wnt-Signalwegs die hNPC-Proliferation (Hirabayashi & Gotoh, 2005).

Eine Wnt- und GSK3 β -Signalwegs-Inhibition verändert die hNPC-Proliferation nicht. Insulin hat als Aktivator des GSK3 β -Signalwegs ebenfalls keine Auswirkung auf die hNPC-Proliferation.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl die Wnt- als auch die GSK3 β -Signalwegs-Modulation in den Proliferations-Versuchen des Neurosphären-Assays keine Effekte zeigte. Dies begründet sich zum einen in dem Entwicklungsstadium der Zellen (siehe hiPSCs und hNPCs), zum anderen könnte das Fehlen bestimmter Rezeptoren (wie bspw. dem Insulin-Rezeptor) zu einer mangelnden

Modulationsfähigkeit der hNPCs im Neurosphären-Assay geführt haben. Somit könnte eine zukünftige Rezeptor-Quantifizierung vor Versuchsstart hilfreich sein für die Substanzfindung.

4.2.2 Kanonischer Wnt-Signalweg und GSK3 β -Signalweg unter differenzierenden Bedingungen

Sowohl eine Aktivierung des Wnt- und des GSK3 β -Signalwegs durch CHIR99021 als auch eine Wnt-Inhibierung mittels IWP2 und (einer kombinierten GSK3 β -Signalwegs-Inhibition mittels) Pioglitazone reduzieren in der vorliegenden Arbeit die Migration der aus primären fetalen hNPCs differenzierenden Radial-Glia-Zellen. Auch in humanen Glioblastomzellen wurde die Migration *in vitro* durch Wnt-Inhibierung (Yin et al., 2023) oder Wnt-Aktivierung (Wan et al., 2011) gehemmt. Mäuse mit defektem Wnt-Signalweg durch einen Gen-*Knockout* zeigten ebenfalls Störungen in der Radial-Glia-Migration, die sich im Organ als gestörtes Radial-Glia-Gerüst im Hippocampus manifestieren (Zhou, Zhao, & Pleasure, 2004). Warum sowohl Wnt-Aktivierung als auch Wnt-Inhibierung zu einer Reduzierung der Radial-Glia-Migration führt, ist nicht klar, und könnte in weiteren Studien untersucht werden. Der alleinige GSK3 β -Signalwegs-Aktivator Insulin verändert die Radial-Glia-Migration in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht.

Wnt- und GSK3 β -Signalwegs-Aktivierung mittels CHIR99021 induziert die neuronale Differenzierung aus hNPCs in dieser Arbeit, während Wnt-Inhibierung mittels IWP2 und (kombinierte GSK3 β -Signalwegs-Inhibierung mittels) Pioglitazone keine Effekte zeigt. Im Gegensatz dazu reduziert Wnt-Aktivierung die Zahl der *Doublecortin* (DCX)-positiven Neurone sowie die DCX-messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression in humanen Hirn-Organoiden (Delepine et al., 2021). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass eine Wnt-Aktivierung Entwicklungsstadium-spezifische Effekte ausübt. Organoiden, die aus hiPSCs generiert werden, entsprechen eher der frühen embryonalen Entwicklung, während die hier verwendeten primären hNPCs aus der fetalen Entwicklungsphase (GW16-19) stammen. Eine weitere Studie differenzierte hNPCs aus hiPSCs und quantifizierte den Einfluss von Wnt-Aktivierung auf die neuronale Differenzierung. In diesen Zellen führte Wnt-Aktivierung ebenfalls zu einer deutlich vermehrten Neurogenese (Esfandiari et al., 2012). Diese Daten stehen nicht im Einklang mit den Befunden aus anderen hiPSCs-basierten Studien. Erklärungen für die anscheinend schon reiferen aus hiPSCs generierten hNPCs könnten die hiPSC-Linie an sich sein, das verwendete Medium oder auch das Protokoll für die Generierung der hNPCs, alles Faktoren, die das Verhalten von hiPSC-stämmigen Zellen *in vitro* beeinflussen können. Wnt-Aktivierung steigert auch lediglich in der neurogenen, späteren Phase der Gehirnentwicklung der Maus die Differenzierung der NPCs zu Neuronen, während, wie oben beschrieben, eine Wnt-Aktivierung in früheren Entwicklungsstadien die Proliferation der NPCs fördert (Hirabayashi & Gotoh, 2005). Auch in adulten Mäusen führt aktivierter Wnt-Signalweg zu einer gesteigerten Neurogenese im Hippocampus *in vivo* (Zhang et al., 2022). Der alleinige GSK3 β -Signalwegs-Aktivator Insulin verändert die Neurogenese der hNPCs nicht. In Ratten-NPCs führte Insulin vornehmlich zu einer gliogenetischen und weniger zu einer neurogenetischen Induktion der Progenitorzellen (Erickson et al., 2008). Dieser Unterschied könnte sich

in der Interspezies-Variabilität, aber auch in dem Vorhandensein von Insulin-Rezeptoren begründen. In Folgestudien sollte vor einer Signalwegsmodulation mittels Insulin eine entsprechende Rezeptor-Quantifizierung stattfinden.

Während Wnt- und GSK3 β -Signalwegs-Aktivierung mittels Insulin die neurale Differenzierung von hNPCs fördert, wird die Ausbildung von Neuriten gehemmt, welche in dieser Arbeit über die Neuritenlänge gemessen wurde. Eine große Menge von Literatur beschreibt die Wnt-Aktivierung als promovierend für die Bildung von Axonen (Valvezan & Klein, 2012). Ein Screening-Projekt mit aus hiPSCs differenzierten Neuronen bestätigt jedoch unsere Daten, da zehn verschiedene Inhibitoren des GSK3 β -Moleküles ebenfalls die Ausbildung von Neuriten hemmten (Sherman & Bang, 2018). Die Autoren diskutieren die ambivalenten Effekte von Wnt-Aktivatoren auf die Entwicklung von Neuriten und nennen bspw. das Entwicklungsstadium oder das GSK-Aktivitätslevel als Einfluss nehmende Faktoren.

Im Gegensatz zur Neurogenese wird die neuronale Migration durch Wnt- und GSK3 β -Signalwegs-Modulation in dieser Arbeit nicht verändert. Wiederum steigerte Wnt-Aktivierung in humanen Hirn-Organoiden die neuronale Migration (Delepine et al., 2021), was die Beobachtung der unterschiedlichen Effekte von Wnt in unterschiedlichen Entwicklungsstadien unterstützt und einen neuen Einblick in die Regulierung von späteren entwicklungsneurologischen Prozessen menschlicher Gehirnzellen verschafft. Als weiterer untersuchter Endpunkt wird die Oligodendrozyten-Differenzierung durch Wnt- und GSK3 β -Signalwegs-Aktivierung mit CHIR99021 konzentrationsabhängig reduziert. Dies steht im Einklang mit der publizierten Literatur. Wnt-Aktivierung vermindert in humanen sowie murinen embryonalen Progenitorzellen die Differenzierung zu Oligodendrozyten (Fancy et al., 2009; Feigenson et al., 2009). Auch in embryonalen Ratten-Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass β -catenin in bestimmten, eher frühen Entwicklungsstadien die Oligodendrozyten-Differenzierung inhibiert (Liu et al., 2021). Es wird diskutiert, ob diese Differenzierungs-Inhibierung das sich entwickelnde Gehirn möglicherweise vor einer zu frühen Ausreifung schützt (Liu et al., 2021). Interessanterweise übt auch eine Wnt-Inhibierung mittels IWP2, ähnlich wie bei der Radial-Glia-Migration, einen vergleichbaren Effekt auf die Oligodendrozyten-Differenzierung aus wie die Wnt- und GSK3 β -Signalwegs-Aktivierung. Auch dieser Effekt müsste in nachfolgenden Studien genauer untersucht werden. Im Gegensatz zur Oligodendrozyten-Differenzierung wird die Migration dieser Zellen durch Wnt-Modulation nicht beeinflusst. Auch eine isolierte Aktivierung des GSK3 β -Signalwegs mittels Insulin fördert in der vorliegenden Arbeit die Oligodendrozyten-Differenzierung. Mehrere Studien zeigen, dass *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) zu einer vermehrten Proliferation von Oligodendrozyten-Progenitoren, einer vermehrten Differenzierung in Oligodendrozyten und einer verstärkten Myelinisierung *in vivo* und *in vitro* führt (De Paula et al., 2014; Hsieh et al., 2004; McMorris et al., 1993). IGF-1 ist ein Wachstumshormon, welches eine hohe Strukturähnlichkeit zu Insulin aufweist und ebenfalls über den Insulinrezeptor, aber auch über IGF-spezifische Rezeptoren wirken kann (De Paula et al., 2014). Zudem förderten Insulin und IGF-1 in einer Studie an Ratten-Glia-Zellkulturen *in vitro* gleichermaßen die Differenzierung von Oligodendrozyten und deren Entwicklung; IGF-1 führte bereits

in geringeren Konzentrationen zu einem Effekt (IGF-1: 0,013 μ M, Insulin: 0,1 μ M) (van der Pal et al., 1988). Zukünftige Untersuchungen des GSK3 β -Signalwegs im humanen Neurosphären-Assay könnten IGF-1 mit einbeziehen, um die in Tierversuchen generierten Ergebnisse mit den Effekten auf hNPCs vergleichen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Wnt- und eine GSK3 β -Signalwegs-Aktivierung mittels CHIR99021 die Radial-Glia-Migration, die Neuritenlänge und die Oligodendrozyten-Differenzierung konzentrationsabhängig hemmt, während sie die neuronale Differenzierung stimuliert. Eine Wnt- und GSK3 β -Signalwegs-Inhibierung mittels IWP2 und Pioglitazone scheint (nicht signifikant) ebenfalls die Radial-Glia-Migration zu hemmen. Zudem wird auch die Oligodendrozyten-Differenzierung konzentrationsabhängig reduziert, jedoch lediglich durch den Wnt-Signalwegs-Inhibitor IWP2. Der GSK3 β -Signalwegs-Aktivator Insulin steigert dagegen die Oligodendrozyten-Differenzierung. Diese Daten zeigen, dass der fetale Neurosphären-Assay in der Lage ist, gewisse Wnt- und GSK3 β -abhängige Prozesse *in vitro* abzubilden. Des Weiteren liefert er interessante neue Einblicke in die Effekte der Signalwege während der humanen fetalen Gehirnentwicklung, die *in vivo* nicht zu untersuchen sind. Zusätzlich beleuchten die hier ausgewählten Substanzen die engen Verbindungen zwischen einzelnen Signalwegen und der Komplexität von Signalwegsmodulationen. Diese Erkenntnisse können in der Zukunft mit weiteren Wnt- und GSK3 β -Modulatoren bestätigt werden, um mehr Vertrauen in die Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays zu gewinnen.

4.3 EPR-Signalweg

Der EPR-Signalweg zeichnet sich durch seine vielfältigen Wirkungen und Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen und zellulären Molekülen aus.

Der EPR-Signalwegs-Aktivator PGE2 und der Inhibitor Celecoxib wirken beide von extrazellulär auf die Signalkaskade (s. Kapitel 1.5.4). Da PGE2 im menschlichen Organismus als Gewebshormon ubiquitär vorhanden ist und Celecoxib als Schmerzmittel in der Humanmedizin eine breite Anwendung findet, kommt der hier durchgeführten Signalwegsmodulation eine große Bedeutung durch ihre Humanrelevanz im Alltag zu.

4.3.1 EPR-Signalweg unter proliferierenden Bedingungen

Sowohl die Aktivierung des EPR-Signalwegs durch PGE2 als auch dessen Inhibierung durch Celecoxib reduziert die hNPC-Proliferation in der vorliegenden Arbeit. Neuroektodermale Stammzellen von Rattenembryonen *in vitro* zeigten proliferative Effekte unter dem Einfluss von PGE2 in Konzentrationen von 1 μM und 10 μM (Wong et al., 2016). Diese unterschiedlichen Ergebnisse der Effekte von PGE2 könnten sich in der Interspezies-Variabilität, aber auch in den unterschiedlichen genutzten Zellarten begründen. Die von uns beobachtete Reduktion der Proliferation durch eine COX2- und damit EPR-Inhibition zeigte sich auch in murinen NPCs aus der SVZ und dem Hippocampus (Goncalves et al., 2010; Wong et al., 2014). Dieselben Studien heben jedoch auch die Notwendigkeit der Testung an humanen NPCs zur Detektion adverser Effekte im Menschen hervor. Dass die EPR-Aktivierung nach einer initialen Proliferationssteigerung in niedrigeren Konzentrationen ähnliche proliferationsmindernde Effekte wie die EPR-Inhibierung auslöst (s. Abb. 23A), könnte sich in dem Hormesis-Effekt begründen. Dieser beschreibt, dass niedrige Konzentrationen potentiell schädlicher Substanzen positive Effekte auf Organismen oder Zellen haben können, während hohe Konzentrationen sicher Schädigungen auslösen (Calabrese & Baldwin, 2001; Calabrese et al., 2021).

In hohen Konzentrationen von PGE2 (ab 13,1 μM) kommt es zu einer Reduktion der mitochondrialen Aktivität der hNPCs, während in niedrigen Konzentrationen keine Viabilitätsminderung beobachtet werden kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen zur Viabilität der zuvor genannten Studie (Wong et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die EPR-Modulation in der vorliegenden Arbeit die hNPC-Proliferation reduziert hat. Dies zeigt, dass der Neurosphären-Assay die Möglichkeit bietet, EPR-abhängige Effekte *in vitro* abzubilden. Um die hier erhobenen Daten auf den menschlichen Organismus zu übertragen, könnte eine Ergänzung mit humanen Daten sinnvoll sein.

4.3.2 Prostaglandin-Rezeptor-Signalweg unter differenzierenden Bedingungen

Eine Aktivierung des EPR-Signalwegs durch PGE2 reduziert in der vorliegenden Arbeit die Migration der aus primären fetalen hNPCs differenzierenden Radial-Glia-Zellen, während eine EPR-Inhibition durch Celecoxib keine Effekte auf die Radial-Glia-Migration zeigte. Da es zum jetzigen Zeitpunkt für die EPR-Modulation in diesem Endpunkt keine vergleichbaren Daten gibt, ist eine Einordnung erschwert. Dies betont erneut die hohe Relevanz der DNT-IVB zur Detektion adverser Effekte, besonders bei Substanzen mit einer hohen Humanrelevanz.

Eine EPR-Aktivierung inhibiert die neuronale Differenzierung aus hNPCs in der vorliegenden Arbeit, während eine EPR-Inhibition keine Effekte zeigt. Mehrere Studien beschreiben PGE2 als Aktivator für die neuronale Differenzierung. Diese Differenzierungssteigerung wurde in murinen neuroektodermalen Stammzellen (Rai-Bhagal et al., 2018; Wong et al., 2014) sowie in murinen Neuroblastom- und Motoneuron-Zelllinien (Nango et al., 2017) nachgewiesen, und sie ist vermutlich anteilig über die Wirkung auf die PKA auch auf den Wnt-Signalweg zurückzuführen (Kissoondoyal & Crawford, 2022). Diese Unterschiede könnten auf das Entwicklungsstadium der Zellen (fetal und adult) sowie auf die verschiedenen verwendeten Spezies (human und murin) zurückzuführen sein.

PGE2 inhibiert in der vorliegenden Arbeit sowohl die Neuritenfläche als auch die Neuritenlänge, während eine EPR-Inhibition durch Celecoxib keinen Einfluss auf diese Endpunkte nimmt. Im Gegensatz dazu steigerte PGE2 in aus Motoneuronen generierten hiPSCs *in vitro* das Neuritenwachstum konzentrationsabhängig (Nango et al., 2017). Diese unterschiedlichen Beobachtungen begründen sich vermutlich in dem bereits zuvor erwähnten unterschiedlichen Entwicklungsstadium der Zellen (hiPSCs – frühe embryonale Entwicklung, hNPCs aus GW16-19 – fetale Phase). Im Gegensatz zur Neurogenese und der Neuritenmorphologie wird die neuronale Migration durch EPR-Modulation in dieser Arbeit nicht beeinflusst.

Die Oligodendrozyten-Differenzierung wird durch EPR-Aktivierung mittels PGE2 reduziert. Dies steht im Einklang mit der publizierten Literatur. In fetalen Gehirnzellen humaner Aborte aus dem dritten Trimester (GW 28-40) führte PGE2 zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion reifer Oligodendrozyten (Shiow et al., 2017). Auch eine EPR-Inhibition mittels Celecoxib führt in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Reduktion der Oligodendrozyten-Differenzierung. Dieser Effekt kann jedoch nicht in die wissenschaftliche Literatur eingeordnet werden, da es aktuell keine Studien gibt, welche Celecoxib oder eine COX-2-Inhibition auf diese Weise untersucht haben. Im Gegensatz zur Oligodendrozyten-Differenzierung wird die Migration dieser Zellen in der vorliegenden Arbeit durch eine EPR-Modulation nicht beeinflusst.

Celecoxib beeinträchtigt die mitochondriale Aktivität der hNPCs. Da Celecoxib als anti-inflammatorisch und neuroprotektiv gilt (Dhapola et al., 2021), zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermutlich Effekte, welche sich erst über einen längeren Zeitraum und in höheren Konzentrationen von Celecoxib *in vitro* manifestieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine EPR-Aktivierung durch PGE₂ die Radial-Glia-Migration, die neuronale Differenzierung, die Neuritenfläche und -länge sowie die Oligodendrozyten-Differenzierung konzentrationsabhängig hemmt. Eine EPR-Inhibierung durch Celecoxib reduziert signifikant die Oligodendrozyten-Differenzierung. Diese Daten zeigen, dass der Neurosphären-Assay in der Lage ist, einige Endpunkte der EPR-Aktivierung *in vitro* abzubilden. Dies ermöglicht einen Einblick in an humanen Modellen noch unerkundete Endpunkte. Aufgrund der hohen Humanrelevanz der EPR-Modulation könnten sich an diese Arbeit Versuche anschließen, welche mit weiteren Prostaglandinen (bspw. Prostaglandin D₂, G₂) und COX-Inhibitoren (bspw. Ibuprofen, Etoricoxib) arbeiten und welche den Endpunkt der Oligodendrozyten-Reifung (NPC6, s. Kapitel 1.5) miteinschließen. Eine Ergänzung mit humanen Daten könnte, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, auch hier sinnvoll sein.

4.4 mTOR-Signalweg

Der mTOR-Signalweg gilt als hoch konservierter Signalweg (s. Kapitel 1.5.5), welcher im gesamten menschlichen Organismus zu finden ist und unterschiedlichste Wirkungen auf den Metabolismus der inneren Organe und des Gehirns hat (Laplane & Sabatini, 2012). Als mTOR-Signalwegs-Aktivator wurde MHY1485 verwendet. Zur mTOR-Inhibition wurde Everolimus (Rapamycin-Derivat) eingesetzt.

4.4.1 mTOR unter proliferierenden Bedingungen

Die Aktivierung des mTOR-Signalwegs mittels MHY1485 führt in der vorliegenden Arbeit zu einer Reduktion der hNPC-Proliferation. In humanen Hirn-Organoiden, welche die frühe embryologische Entwicklung abbilden, führte MHY1485 zu einem Organoid-Wachstum (Park et al., 2024). Diese Beobachtungen betonen die unterschiedlichen Effekte einer mTOR-Aktivierung in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die vorliegende Arbeit bietet damit einen neuen Einblick in fetale entwicklungsneurologische Prozesse humaner Zellen. Ebenfalls führt Everolimus über die mTOR-Inhibition zu einer reduzierten hNPC-Proliferation. Dies steht im Einklang mit einer Studie, die wie in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Everolimus an hNPCs *in vitro* untersuchte und eine konzentrationsabhängige, signifikante Proliferationsreduktion erkannte (Skardelly et al., 2013). Außerdem zeigte die bereits erwähnte humane Hirnorganoid-Studie, dass das Organoid-Wachstum unter Everolimus deutlich vermindert wurde im Vergleich zu unbehandelten Organoiden und zur mTOR-Aktivierung mittels MHY1485 (Park et al., 2024). Eine mTOR-Modulation führt damit sowohl in der frühen embryologischen als auch in der fetalen Entwicklungsphase zu denselben Ergebnissen im Bezug auf die Proliferation von Gehirnzellen.

Everolimus reduziert die mitochondriale Aktivität der hNPCs. Andere Studien weisen auf die komplexen Wechselwirkungen des mTOR-Signalwegs im zellulären Metabolismus hin (Laplane & Sabatini, 2012; Vadlakonda et al., 2013). Es ist unklar, welche Faktoren exakt zu der veränderten Viabilität in der vorliegenden Arbeit führen.

Es lässt sich festhalten, dass sowohl eine mTOR-Aktivierung als auch -Inhibition die hNPC-Proliferation in der vorliegenden Arbeit signifikant reduziert. Die aktuelle Studienlage bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Dies hebt die gute Anwendbarkeit des Neurosphären-Assays für die DNT-Testung hervor und definiert dessen Applikationsdomäne genauer.

4.4.2 mTOR unter differenzierenden Bedingungen

Eine mTOR-Signalwegs-Aktivierung mittels MHY1485 reduziert die Radial-Glia-Migration. Eine *in vivo* Studie an Mäusen mit einer TSC1-*Knockout*-Mutation führte zu einem verstärkten mTORC1-Signal und darüber zu einer Fehlentwicklung von Gliazellen und ihren Nachkommen (Carson et al., 2012). Im Anschluss konnte die Behandlung mit Rapamycin, dessen Derivat Everolimus ist, die Gliazellfunktion retten und gliale Pathologien reversieren (Carson et al., 2012). Vermutlich führt eine

fehlerhafte Glia-Funktion zu einer verringerten Radial-Glia-Migration wie in der vorliegenden Arbeit. Der *rescue*-Effekt Rapamycins in der zitierten Studie ist besonders und könnte in Co-Expositionsversuchen von MHY1485 und Everolimus auch im humanen Neurosphärenmodell zukünftig erprobt werden.

In der vorliegenden Arbeit beeinflusst MHY1485 die neuronale Migration, die neuronale Differenzierung und die Neuritenlänge nicht. Währenddessen nimmt die Neuritenlänge unter MHY1485 deutlich ab. Übersichtsarbeiten beschreiben, dass eine Hyperaktivierung von mTORC1 in unterschiedlichen Spezies zu einer verringerten axonalen Ausbreitung der Neurone führt, nach ZNS-Läsionen aber auch zu einem verstärkten Wachstum und einer verstärkten Regeneration von Neuronen führen kann (Bockaert & Marin, 2015; Tavazoie et al., 2005). Damit unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die bereits bekannten, entwicklungsstadium-spezifischen Effekte einer mTOR-Modulation.

In den hier vorliegenden Arbeiten kann der mTOR-Inhibitor Everolimus nur dem Endpunkt der neuronalen Differenzierung reduzieren. Eine Studie zur Untersuchung von Immunsuppressiva auf die Entwicklung von hNPCs zeigte, dass Everolimus zwar die Proliferation von hNPCs reduzierte, jedoch keinen Einfluss auf die Neurogenese, Gliogenese und Zellmigration nahm (Skardelly et al., 2013). Eine Zusammenfassung mehrerer Studien beschreibt, dass eine mTORC1-Inhibition zu einer akzelerierten neuronalen Migration und Differenzierung in Säugetieren führt (Bockaert & Marin, 2015). Warum sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von der aktuellen Literatur unterscheiden, ist unklar. Eine Substanztestung mit weiteren mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin oder dessen Derivaten Temsirolimus und Ridoforolimus könnten hier hilfreich sein.

Während die Migration der Oligodendrozyten durch MHY1485 nicht moduliert wird, reduziert MHY1485 die Differenzierung der Oligodendrozyten. Eine Übersichtsarbeit beschreibt die promovierenden Effekte einer mTOR- sowie einer mTORC1-Aktivierung auf die Oligodendrogenese (Bockaert & Marin, 2015). Jedoch führte in TSC1/2-*Knockout* Mäusen *in vivo* eine aberrante mTORC1-Aktivierung zu einer verminderten Oligodendrozyten-Differenzierung und folglich zu einer Hypomyelinisierung des Gehirns (Bockaert & Marin, 2015; Lebrun-Julien et al., 2014; Meikle et al., 2008). Die Autoren führen diesen Effekt darauf zurück, dass eine sehr sensible Regulation von mTORC1 nötig ist, um Disruptionen in der Oligodendrogenese zu verhindern. Dieser Umstand hat vermutlich zu den beobachteten Effekten in der vorliegenden Arbeit geführt. Des Weiteren wird beschrieben, dass eine durch die Überaktivierung von mTORC1 ausgelöste veränderte Oligodendrogenese in denselben TSC1/2-*Knockout*-Mäusen durch Rapamycin reversiert werden konnte (Bockaert & Marin, 2015; Meikle et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit kann der mTOR-Inhibitor Everolimus weder die oligodendrogliale Migration noch deren Differenzierung modulieren. Dies weist erneut auf die Wichtigkeit der Co-Expositionsversuche von MHY1485 und Everolimus im Neurosphärenmodell hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine mTOR-Aktivierung in der vorliegenden Arbeit die Radial-Glia-Migration, die Neuritenlänge und die Oligodendrozyten-Differenzierung konzentrationsabhängig

hemmt. Eine mTOR-Inhibierung reduziert ausschließlich die Oligodendrozyten-Differenzierung. Diese Daten zeigen, dass der fetale Neurosphären-Assay in der Lage ist, vor allem die Prozesse der mTOR-Aktivierung in vitro abzubilden. Um das Vertrauen in den Neurosphären-Assay weiter zu stärken und die mTOR-Inhibierung weiter zu untersuchen, sollten in Zukunft weitere mTOR-Modulatoren (wie die oben genannten Temsirolimus und Ridoforolimus) getestet werden. Zudem bieten sich durch die empfindliche Regulierbarkeit von mTORC1 Co-Expositionsversuche mit mTOR-Aktivatoren und mTOR-Inhibitoren an.

4.5 STAT3-Signalweg

Der STAT3-Signalweg ist relevant für das Überleben embryonaler Zellen und wird vor allem als Proliferations- und Differenzierungs-kontrollierend beschrieben.

Colivelin wurde als STAT3-Signalwegs-Aktivator eingesetzt. Als STAT3-Signalwegs-Inhibitor dient Limonin (s. Kapitel. 1.5.6).

4.5.1 STAT3 unter proliferierenden Bedingungen

Keiner der beiden STAT3-Modulatoren verändert in der vorliegenden Arbeit die hNPC-Proliferation. Es lässt sich vermuten, dass der STAT3-Signalweg im Neurosphären-Assay unter proliferierenden Bedingungen nicht abgebildet werden kann und somit außerhalb der biologischen Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays liegt. Dies könnte sich darin begründen, dass der STAT3-Signalweg nicht ubiquitär und eher in der fetalen Phase der Neurogenese im menschlichen Gehirn aktiv ist (Hong & Song, 2015). Im Gegensatz dazu befinden sich die hier verwendeten hNPCs in den GW 16-19 und damit im Stadium der embryonalen Neurogenese.

4.5.2 STAT3 unter differenzierenden Bedingungen

Eine STAT3-Aktivierung mittels Colivelin reduziert die Radial-Glia-Migration in dieser Arbeit, während eine STAT3-Inhibierung mittels Limonin keine Effekte zeigt. In einem *in vitro* Neurosphären-Modell mit murinen NPCs führte eine verstärkte STAT3-Aktivierung zu einer Zunahme der Radial-Glia-Zellen (Hong & Song, 2015). Ein direkter Nachweis für eine erhöhte Radial-Glia-Migration findet sich in der Literatur nicht. Eine STAT3-Aktivierung durch Colivelin steigert außerdem die Oligodendrozyten-Differenzierung in der vorliegenden Arbeit. An einem murinen *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, dass eine verminderte STAT3-Aktivierung zu einer Reduktion der Oligodendrozyten-Population, ihrer Entwicklung und der (Re-)Myelinisierung durch diese führte (Ma et al., 2022). Dies lässt Rückschlüsse auf die von uns beobachtete Steigerung der Oligodendrozyten-Differenzierung durch Colivelin zu.

Bis auf den genannten Endpunkt lassen sich keine weiteren Effekte einer STAT3-Modulation in den Differenzierungs-Versuchen der vorliegenden Arbeit erkennen. Dies könnte unter Anderem an der Exprimierung von STAT3, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, liegen. Des Weiteren ist bekannt, dass STAT3 vor allem in der Astrogliogenese (Cao et al., 2010; Fukuda et al., 2007; Kanski et al., 2014) sowie dem neuronalen Überleben und der Neuroregeneration nach ZNS-Läsion (Dziennis & Alkayed, 2008) eine zentrale Rolle spielt. Diese Endpunkte können jedoch im aktuellen Neurosphären-Assay (noch) nicht abgebildet werden oder sind auf diesen nicht anwendbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende Arbeit den STAT3-Signalweg im Neurosphären-Assay zum jetzigen Zeitpunkt nur ungenügend abbilden kann. Die fehlende Modulierbarkeit des STAT3-Signalwegs könnte dem geschuldet sein, dass STAT3 nicht konstitutiv und

ubiquitär in den hNPCs und allen daraus differenzierenden Zell-Unterarten aktiv ist, sondern nur in bestimmten Entwicklungsphasen und in bestimmten Gehirnzellen eine STAT3-Modulation erfolgen kann (s. Kapitel 4.5.1). Zukünftige Arbeiten sollten vorab die Aktivität von STAT3 bestimmen, um das richtige Stadium zu identifizieren und eine Signalwegsmodulation zu ermöglichen.

4.6 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie hatte zum einen das Ziel, sechs für die menschliche fetale Hirnentwicklung wichtige Signalwege zu untersuchen und ihr entwicklungsneurologisches Potential im Neurosphären-Assay zu detektieren. Das zweite Ziel war es, die biologische Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays als integralen Bestandteil der DNT-IVB zu untersuchen. Ein tiefgehendes Verständnis der von der DNT-IVB abgedeckten Signalwege erhöht das Vertrauen in die Methoden zum Schutz der menschlichen Gesundheit in regulatorischen Anwendungen (van der Zalm et al., 2022).

Ein Vorteil des humanen Neurosphären-Assays liegt in den zahlreichen Endpunkten (NPC1-6, s. Kapitel 1.4), mit denen diese Versuche in der Lage sind, eine Vielzahl an Prozessen der menschliche Hirnentwicklung abzubilden. Des Weiteren stellt der Neurosphären-Assay ein sehr gut etabliertes und bekanntes Zellsystem dar, welches über Fortschritte in der Labortechnik homogen reproduzierbar wird und so in verschiedenen Forschungsgruppen weltweit unter den gleichen Bedingungen für die Signalwegstestung genutzt werden kann. Zudem ist durch die schnelle Generierung von Ergebnissen aufgrund der insgesamt kurzen Versuchsdauer (NPC1: 72 Stunden, NPC2-5: 120 Stunden) eine schnelle Anpassbarkeit von Konzentrationen und Substanzen möglich. Im Gegensatz zu anderen Zellkulturen zeichnet sich der Neurosphären-Assay durch sein dreidimensionales System aus. Auch die Ressourcenschonung, wie in Kapitel 1.3 erwähnt, stellt eine deutliche Verbesserung zu den konventionellen *in vivo* Testmethoden dar.

Hier ist es besonders wichtig, erneut den Punkt der Tierversuchsfreiheit zu beleuchten: Tierversuche stehen seit Jahrzehnten stark in der Kritik. Es ist lange bekannt, dass Tiere so wie Menschen Emotionen wie Freude und Trauer sowie somatische Reize wie Schmerz empfinden können. In Freiheit verbringen sie ihr Leben in selbst ausgewählten familiären und sozialen Strukturen. Die Industrialisierung und Standardisierung der Forschung führen dazu, dass Tiere ihrer natürlichen Rechte beraubt werden, dazu wird ihnen ein unnatürliches und grausames Leid durch Versuche zugefügt. Die Forschung sieht sich mit dem noblen Ziel konfrontiert, das naturgegebene Recht unserer Begleiter seit dem Anbeginn der Evolution zu respektieren und sich von Tierversuchen zu distanzieren. Der humane Neurosphären-Assay mit der DNT-IVB kann dahingehend ein Schritt in die richtige Richtung bedeuten.

In dieser Arbeit konnten fünf von sechs ausgewählten Signalwegen moduliert werden: Notch, Wnt, GSK3 β , EPR und mTOR. Nichtsdestotrotz zeigen diese Arbeiten auch, dass der STAT3-Signalweg im Neurosphären-Assay nicht moduliert werden konnte. Die Endpunkte neuronale und oligodendrogliale Migration konnten in den Signalwegen der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht moduliert werden.

Da bisher nur wenige Studien die Signalwegsmodulation an humanen Neurosphären erforscht haben, ist es hier zu früh, eine eindeutige Aussage über die Abbildbarkeit bestimmter Signalwege treffen zu können. Des Weiteren ist die Einordnung in den allgemeinen Forschungsstand teilweise erschwert, da es bisher kaum vergleichbare Untersuchungen zu spezielleren Endpunkten wie Neuritenfläche und -länge (NPC4a und b) gibt. Um dies weiter evaluieren zu können, sollten die Signalwege mit den in der spezifischen Signalwegs-Diskussion genannten Verbesserungsvorschlägen in Folgestudien getestet werden. Da sich außerdem bei der Literaturrecherche für einige Substanzen ein Einfluss auf nur

bestimmte Zell-Unterarten detektieren ließ (bspw. Reelin auf die Proliferation von oligodendroglialen Progenitorzellen), könnten Differenzierungs-Analysen im Anschluss an Proliferationsversuche noch genauere Ergebnisse liefern. Analysen zu dem Vorhandensein von Rezeptoren und Signalmolekülen könnten im Vorfeld der Substanztestung die Wahrscheinlichkeit einer Modulation prädictieren. Des Weiteren sollten zu einer breiteren Beurteilung die Konzentrationsbereiche erweitert werden, um mögliche adverse Effekte in niedrigeren und höheren Konzentrationen detektieren zu können. Kombinationsversuche könnten zudem von Vorteil sein, da sie das komplexe Zusammenspiel inhibitorischer und aktivatorischer Signale besser darstellen könnten. Ein weiterer wichtiger Bestandteil zum Ausbau der Forschung in der Entwicklungsneurotoxikologie könnte außerdem aus der klinischen Medizin erlangt werden. Zum Beispiel könnte man periphere oder Nabelschnur-Blutproben oder Amnionflüssigkeit von Schwangeren mit bspw. Entzündungen, Erkrankungen oder Intoxikationen analysieren. Im Anschluss daran könnten computerbasierte Modelle eine Substanzfilterung über die embryonale BHS sowie die maternale Plazentaschranke simulieren. Darüber könnte die Substanz- und Konzentrationsfindung erleichtert werden. Des Weiteren sollte in Zukunft die biologische Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays weiter erforscht werden unter Einbeziehung von weiteren Signalwegen wie bspw. *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *Sonic-Hedgehog* (Shh), *Cyclin-dependent kinase 5* (CDK5), *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs) und Interferon-alpha (IFN- α).

Abschließend lässt sich über die generierten Daten sagen, dass der Neurosphären-Assay den Großteil der gewählten Signalwege und ihre Veränderung durch Modulationen abbilden kann. Dadurch haben wir die biologische Applikationsdomäne des Neurosphären-Assays weiter definiert. Dies führt zu einer Stärkung der DNT-IVB in ihrer Validität, Vorhersagekraft und Akzeptanz. Die hier generierten Ergebnisse werden in die *ToxCast*-Datenbank der US-EPA aufgenommen und zielgemäß publiziert. Die Gesamtheit dieser Ergebnisse trägt dazu bei, die große Datenlücke im Bereich der Entwicklungsneurotoxizität zu schließen und eine flächendeckende Beurteilung des DNT-Potentials unterschiedlichster Substanzen auch auf regulatorischer Ebene voranzutreiben.

5 Literaturverzeichnis

- Ables, J. L., Breunig, J. J., Eisch, A. J., & Rakic, P. (2011). Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci*, 12(5), 269-283. <https://doi.org/10.1038/nrn3024>
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev*, 27(1-2), 3-18. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(03\)00005-8](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(03)00005-8)
- Armstrong, N. C., Anderson, R. C., & McDermott, K. W. (2019). Reelin: Diverse roles in central nervous system development, health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 112, 72-75. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.04.009>
- Ayaz, F., & Osborne, B. A. (2014). Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front Oncol*, 4, 345. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00345>
- Ayuk, S. M., & Abrahamse, H. (2019). mTOR Signaling Pathway in Cancer Targets Photodynamic Therapy In Vitro. *Cells*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/cells8050431>
- Ayuso-Sacido, A., Moliterno, J., Kratovac, S., Kapoor, G., O'Rourke, D., Holland, E., García-Verdugo, J., Roy, N., & Boockvar, J. (2010). Activated EGFR signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells. *J Neurooncol*. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0035-x>
- Bae, G. H., Kim, Y. S., Park, J. Y., Lee, M., Lee, S. K., Kim, J. C., Kim, J. G., Shin, Y. J., Lee, H., Kim, S. Y., Bae, Y. S., Zabel, B. A., Kim, H. S., & Bae, Y. S. (2022). Unique characteristics of lung-resident neutrophils are maintained by PGE2/PKA/Tgm2-mediated signaling. *Blood*, 140(8), 889-899. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014283>
- Bal-Price, A., Crofton, K. M., Leist, M., Allen, S., Arand, M., Buetler, T., Delrue, N., FitzGerald, R. E., Hartung, T., Heinonen, T., Hogberg, H., Bennekou, S. H., Lichtensteiger, W., Oggier, D., Paparella, M., Axelstad, M., Piersma, A., Rached, E., Schilter, B., . . . Fritsche, E. (2015). International STakeholder NETwork (ISTNET): creating a developmental neurotoxicity (DNT) testing road map for regulatory purposes. *Arch Toxicol*, 89(2), 269-287. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1464-2>
- Bal-Price, A., & Fritsche, E. (2018). Editorial: Developmental neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 354, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.07.016>
- Bal-Price, A., Hogberg, H. T., Crofton, K. M., Daneshian, M., FitzGerald, R. E., Fritsche, E., Heinonen, T., Hougaard Bennekou, S., Klima, S., Piersma, A. H., Sachana, M., Shafer, T. J., Terron, A., Monnet-Tschudi, F., Viviani, B., Waldmann, T., Westerink, R. H. S., Wilks, M. F., Witters, H., . . . Leist, M. (2018). Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: Exemplified for developmental neurotoxicity. *ALTEX*, 35(3), 306-352. <https://doi.org/10.14573/altex.1712081>
- Barenys, M., Gassmann, K., Baksmeier, C., Heinz, S., Reverte, I., Schmuck, M., Temme, T., Bendt, F., Zschauer, T. C., Rockel, T. D., Unfried, K., Watjen, W., Sundaram, S. M., Heuer, H., Colomina, M. T., & Fritsche, E. (2017). Epigallocatechin gallate (EGCG) inhibits adhesion and migration of neural progenitor cells in vitro. *Arch Toxicol*, 91(2), 827-837. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1709-8>
- Baumann, J., Gassmann, K., Masjosthusmann, S., DeBoer, D., Bendt, F., Giersiefer, S., & Fritsche, E. (2016). Comparative human and rat neurospheres reveal species differences in chemical effects on neurodevelopmental key events. *Arch Toxicol*, 90(6), 1415-1427. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1568-8>
- Bengoa-Vergniory, N., & Kypta, R. M. (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci*, 72(21), 4157-4172. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2028-6>

- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., & Hall, M. N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 10(11), 868-880.
<https://doi.org/10.1038/nrd3531>
- Blum, J., Masjosthusmann, S., Bartmann, K., Bendt, F., Dolde, X., Donmez, A., Forster, N., Holzer, A. K., Hubenthal, U., Kessel, H. E., Kilic, S., Klose, J., Pahl, M., Sturzl, L. C., Mangas, I., Terron, A., Crofton, K. M., Scholze, M., Mosig, A., . . . Fritsche, E. (2022). Establishment of a human cell-based in vitro battery to assess developmental neurotoxicity hazard of chemicals. *Chemosphere*, 311(Pt 2), 137035.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137035>
- Bockaert, J., & Marin, P. (2015). mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiol Rev*, 95(4), 1157-1187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2014>
- Bondy, S. C., & Campbell, A. (2005). Developmental neurotoxicology. *J Neurosci Res*, 81(5), 605-612. <https://doi.org/10.1002/jnr.20589>
- Boyle, C., Boulet, S., Schieve, L., Cohen, R., Blumberg, S., Yeargin-Allsopp, M., Visser, S., & Kogan, M. (2011). Trends in the prevalence of developmental disabilities in US children, 1997-2008. *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2989>
- Breidert, T., Callebert, J., Heneka, M., Landreth, G., Launay, J., & Hirsch, E. (2002). Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00990.x>
- Buc-Caron, M. (1995). Neuroepithelial progenitor cells explanted from human fetal brain proliferate and differentiate in vitro. *Neurobiol*.
<https://doi.org/10.1006/nbdi.1995.0004>
- Buss, R., & Oppenheim, R. (2004). Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat Sci Int*. <https://doi.org/10.1111/j.1447-073x.2004.00088.x>
- Buss, R. R., Sun, W., & Oppenheim, R. W. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci*, 29, 1-35.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800>
- Bystron, I., Blakemore, C., & Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci*, 9(2), 110-122.
<https://doi.org/10.1038/nrn2252>
- Caicedo, C. (2014). Families with special needs children: family health, functioning, and care burden. *J Am Psychiatr Nurses Assoc*, 20(6), 398-407.
<https://doi.org/10.1177/1078390314561326>
- Calabrese, E., & Baldwin, L. (2001). Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends Pharmacol Sci*. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01719-3](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01719-3)
- Calabrese, E. J., Agathokleous, E., Kapoor, R., Dhawan, G., & Calabrese, V. (2021). Luteolin and hormesis. *Mech Ageing Dev*, 199, 111559.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111559>
- Cao, F., Hata, R., Zhu, P., Nakashiro, K., & Sakanaka, M. (2010). Conditional deletion of Stat3 promotes neurogenesis and inhibits astroglialogenesis in neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(3), 843-847. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.092>
- Carson, R. P., Van Nielen, D. L., Winzenburger, P. A., & Ess, K. C. (2012). Neuronal and glia abnormalities in Tsc1-deficient forebrain and partial rescue by rapamycin. *Neurobiol Dis*, 45(1), 369-380. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.024>
- Carter, J., & Markham, N. (2001). Disability discrimination.
<https://doi.org/10.1136/bmj.323.7306.178>

- Cayre, M., Canoll, P., & Goldman, J. E. (2009). Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 88(1), 41-63.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.001>
- Centelles, J. J. (2012). General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncol*, 2012, 139268.
<https://doi.org/10.5402/2012/139268>
- Chang, B. S., Duzcan, F., Kim, S., Cinbis, M., Aggarwal, A., Apse, K. A., Ozdel, O., Atmaca, M., Zencir, S., Bagci, H., & Walsh, C. A. (2007). The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B(1), 58-63.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30392>
- Chen, B., Dodge, M. E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C. W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N. S., Roth, M. G., Amatruda, J. F., Chen, C., & Lum, L. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*, 5(2), 100-107. <https://doi.org/10.1038/nchembio.137>
- Choi, Y. J., Park, Y. J., Park, J. Y., Jeong, H. O., Kim, D. H., Ha, Y. M., Kim, J. M., Song, Y. M., Heo, H. S., Yu, B. P., Chun, P., Moon, H. R., & Chung, H. Y. (2012). Inhibitory effect of mTOR activator MHY1485 on autophagy: suppression of lysosomal fusion. *PLoS One*, 7(8), e43418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043418>
- Cooper, J. A. (2014). Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. *Front Cell Neurosci*, 8, 386.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00386>
- Copp, A., Greene, N., & Murdoch, J. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet*, 4(10), 784-793. <https://doi.org/10.1038/nrg1181>
- Crofton, K. M., Mundy, W. R., & Shafer, T. J. (2012). Developmental neurotoxicity testing: a path forward. *Congenit Anom (Kyoto)*, 52(3), 140-146.
<https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2012.00377.x>
- Dastjerdi, F. V., Zeynali, B., Tafreshi, A. P., Shahraz, A., Chavoshi, M. S., Najafabadi, I. K., Vardanjani, M. M., Atashi, A., & Soleimani, M. (2012). Inhibition of GSK-3 β enhances neural differentiation in unrestricted somatic stem cells. *Cell Biol Int*, 36(11), 967-972. <https://doi.org/10.1042/CBI20110541>
- De Paula, M. L., Cui, Q. L., Hossain, S., Antel, J., & Almazan, G. (2014). The PTEN inhibitor bisperoxovanadium enhances myelination by amplifying IGF-1 signaling in rat and human oligodendrocyte progenitors. *Glia*, 62(1), 64-77.
<https://doi.org/10.1002/glia.22584>
- Delepine, C., Pham, V. A., Tsang, H. W. S., & Sur, M. (2021). GSK3 α inhibitor CHIR 99021 modulates cerebral organoid development through dose-dependent regulation of apoptosis, proliferation, differentiation and migration. *PLoS One*, 16(5), e0251173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251173>
- Dhapola, R., Hota, S. S., Sarma, P., Bhattacharyya, A., Medhi, B., & Reddy, D. H. (2021). Recent advances in molecular pathways and therapeutic implications targeting neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, 29(6), 1669-1681. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00889-6>
- Dong, Z., Huo, J., Liang, A., Chen, J., Chen, G., & Liu, D. (2021). Gamma-Secretase Inhibitor (DAPT), a potential therapeutic target drug, caused neurotoxicity in planarian regeneration by inhibiting Notch signaling pathway. *Sci Total Environ*, 781, 146735. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146735>
- Dorman, D., SL, A., Byczkowski, J., Claudio, L., Fisher, J. J., Fisher, J., Harry, G., Li, A., Makris, S., Padilla, S., Sultatos, L., & Miles, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. III: pharmacokinetic

- and pharmacodynamic considerations. *Environmental Health Perspectives*.
<https://doi.org/10.1289/ehp.01109s1101>
- Duda, P., Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Martelli, A. M., Cocco, L., Ratti, S., Candido, S., Libra, M., Montalto, G., Cervello, M., Gizak, A., Rakus, D., & McCubrey, J. A. (2020). Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051110>
- Dziennis, S., & Alkayed, N. (2008). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci*.
<https://doi.org/10.1515/revneuro.2008.19.4-5.341>
- Erickson, R. I., Paucar, A. A., Jackson, R. L., Visnyei, K., & Kornblum, H. (2008). Roles of insulin and transferrin in neural progenitor survival and proliferation. *J Neurosci Res*, 86(8), 1884-1894. <https://doi.org/10.1002/jnr.21631>
- Esfandiari, F., Fathi, A., Gourabi, H., Kiani, S., Nemati, S., & Baharvand, H. (2012). Glycogen synthase kinase-3 inhibition promotes proliferation and neuronal differentiation of human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem Cells Dev*, 21(17), 3233-3243. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0678>
- Fancy, S. P., Baranzini, S. E., Zhao, C., Yuk, D. I., Irvine, K. A., Kaing, S., Sanai, N., Franklin, R. J., & Rowitch, D. H. (2009). Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev*, 23(13), 1571-1585. <https://doi.org/10.1101/gad.1806309>
- Fatemi, S., Earle, J., & McMenomy, T. (2000). Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000783>
- Feigenson, K., Reid, M., See, J., Crenshaw, E. B., 3rd, & Grinspan, J. B. (2009). Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation. *Mol Cell Neurosci*, 42(3), 255-265. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.07.010>
- Fortini, M. E. (2009). Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell*, 16(5), 633-647. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.010>
- Fritsche, E., Crofton, K. M., Hernandez, A. F., Hougaard Bennekou, S., Leist, M., Bal-Price, A., Reaves, E., Wilks, M. F., Terron, A., Solecki, R., Sachana, M., & Gourmelon, A. (2017). OECD/EFSA workshop on developmental neurotoxicity (DNT): The use of non-animal test methods for regulatory purposes. *ALTEX*, 34(2), 311-315. <https://doi.org/10.14573/altex.1701171>
- Fritsche, E., Gassmann, K., & Schreiber, T. (2011). Neurospheres as a model for developmental neurotoxicity testing. *Methods Mol Biol*, 758, 99-114. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3_7
- Fritsche, E., & Hogberg, H. T. (2020). A Brainer on Neurotoxicity. *Front Toxicol*, 2, 3. <https://doi.org/10.3389/ftox.2020.00003>
- Fukuda, S., Abematsu, M., Mori, H., Yanagisawa, M., Kagawa, T., Nakashima, K., Yoshimura, A., & Taga, T. (2007). Potentiation of astroglialogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells. *Mol Cell Biol*, 27(13), 4931-4937. <https://doi.org/10.1128/MCB.02435-06>
- Furuyashiki, T., & Narumiya, S. (2011). Stress responses: the contribution of prostaglandin E(2) and its receptors. *Nat Rev Endocrinol*, 7(3), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.194>
- Gao, J., Liao, Y., Qiu, M., & Shen, W. (2021). Wnt/ β -Catenin Signaling in Neural Stem Cell Homeostasis and Neurological Diseases. *Neuroscientist*.
<https://doi.org/10.1177/1073858420914509>

- Gao, L., Macklin, W., Gerson, J., & Miller, R. H. (2006). Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Dev Biol*, 290(2), 277-286.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.007>
- Gao, L., Sang, J. Z., & Cao, H. (2019). Limonin enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells via attenuating Stat3-induced cell stemness. *Biomed Pharmacother*, 118, 109366. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109366>
- Goldman, L., & Koduru, S. (2000). Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: a public health and policy perspective. *Environ Health Perspect*.
<https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3443>
- Goncalves, M. B., Williams, E. J., Yip, P., Yanez-Munoz, R. J., Williams, G., & Doherty, P. (2010). The COX-2 inhibitors, meloxicam and nimesulide, suppress neurogenesis in the adult mouse brain. *Br J Pharmacol*, 159(5), 1118-1125.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00618.x>
- Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*, 13(3), 330-338. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70278-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70278-3)
- Gridley, T. (2003). Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 1, R9-13. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg052>
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J., Di-Giorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R., Uzunov, D., & Costa, E. (2000). Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Archives of General Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.11.1061>
- Hamm, J., Sullivan, K., Clippinger, A. J., Strickland, J., Bell, S., Bhatarai, B., Blaauboer, B., Casey, W., Dorman, D., Forsby, A., Garcia-Reyero, N., Gehen, S., Graepel, R., Hotchkiss, J., Lowit, A., Matheson, J., Reaves, E., Scarano, L., Sprankle, C., . . . Allen, D. (2017). Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: Moving from research to regulatory testing. *Toxicol In Vitro*, 41, 245-259.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.004>
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Sarkisian, M. R., Bartley, C. M., Shen, J., Radtke, F., Gridley, T., Sestan, N., & Rakic, P. (2008). Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron*, 60(2), 273-284.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.026>
- Hawthorne, A. L. (2014). Repurposing Reelin: the new role of radial glia, Reelin and Notch in motor neuron migration. *Exp Neurol*, 256, 17-20.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.02.024>
- Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L., & Koch, H.-G. (2022). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Vol. 10). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-60266-9>
- Hermida, M. A., Dinesh Kumar, J., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul*, 65, 5-15.
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.003>
- Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2005). Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci Res*, 51(4), 331-336.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.01.004>
- Hong, S., Shugart, Y., Huang, D., Shahwan, S., Grant, P., Hourihane, J., & Martin, N. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet*. <https://doi.org/10.1038/79246>

- Hong, S., & Song, M. R. (2015). Signal transducer and activator of transcription-3 maintains the stemness of radial glia at mid-neurogenesis. *J Neurosci*, 35(3), 1011-1023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-14.2015>
- Hsieh, J., Aimone, J. B., Kaspar, B. K., Kuwabara, T., Nakashima, K., & Gage, F. H. (2004). IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol*, 164(1), 111-122. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308101>
- Hubrecht, R. C., & Carter, E. (2019). The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>
- Imayoshi, I., Shimojo, H., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2013). Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 70(12), 2045-2057. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1151-x>
- Janardhana, N., Muralidhar, D., Naidu, D. M., & Raghevendra, G. (2015). Discrimination against differently abled children among rural communities in India: Need for action. *J Nat Sci Biol Med*, 6(1), 7-11. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.149070>
- Jossin, Y. (2020). Reelin Functions, Mechanisms of Action and Signaling Pathways During Brain Development and Maturation. *Biomolecules*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/biom10060964>
- Judson, R., Richard, A., Dix, D. J., Houck, K., Martin, M., Kavlock, R., Dellarco, V., Henry, T., Holderman, T., Sayre, P., Tan, S., Carpenter, T., & Smith, E. (2009). The toxicity data landscape for environmental chemicals. *Environ Health Perspect*, 117(5), 685-695. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800168>
- Kanski, R., van Strien, M. E., van Tijn, P., & Hol, E. M. (2014). A star is born: new insights into the mechanism of astrogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 71(3), 433-447. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1435-9>
- Kaufmann, W. (2003). Current status of developmental neurotoxicity: an industry perspective. *Toxicol Lett*, 140-141, 161-169. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00503-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00503-9)
- Keßel, H. E., Masjosthusmann, S., Bartmann, K., Blum, J., Donmez, A., Forster, N., Klose, J., Mosig, A., Pahl, M., Leist, M., Scholze, M., & Fritsche, E. (2023). The impact of biostatistics on hazard characterization using in vitro developmental neurotoxicity assays. *ALTEX*, 40(4), 619-634. <https://doi.org/10.14573/altex.2210171>
- Kissoondoyal, A., & Crawford, D. A. (2022). Prostaglandin E2 Increases Neurite Length and the Formation of Axonal Loops, and Regulates Cone Turning in Differentiating NE4C Cells Via PKA. *Cell Mol Neurobiol*, 42(5), 1385-1397. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-01029-4>
- Koch, K., Bartmann, K., Hartmann, J., Kapr, J., Klose, J., Kuchovska, E., Pahl, M., Schluppmann, K., Zühr, E., & Fritsche, E. (2022). Scientific Validation of Human Neurosphere Assays for Developmental Neurotoxicity Evaluation. *Front Toxicol*, 4, 816370. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.816370>
- Laplane, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Law, S. M., & Zheng, J. J. (2022). Premise and peril of Wnt signaling activation through GSK-3beta inhibition. *iScience*, 25(4), 104159. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104159>
- Lebrun-Julien, F., Bachmann, L., Norrmen, C., Trotschmuller, M., Kofeler, H., Ruegg, M. A., Hall, M. N., & Suter, U. (2014). Balanced mTORC1 activity in oligodendrocytes is required for accurate CNS myelination. *J Neurosci*, 34(25), 8432-8448. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1105-14.2014>
- Lee, H., Jeong, W., Chon, D., Kim, J., & Moon, J. (2022). The Association between Perceived Discrimination and Mental Health of Wage Workers with Disabilities: Findings from

- the Panel Survey of Employment for the Disabled 2016-2018. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148541>
- Lee, J., & Pilch, P. (1994). The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.2.C319>
- Leist, M., & Hartung, T. (2013). Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Arch Toxicol*, 87(4), 563-567. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1038-0>
- Liu, Y., Wang, Y., Yuan, W., Dong, F., Zhen, F., Liu, J., Yang, L., Qu, X., & Yao, R. (2021). Reelin promotes oligodendrocyte precursors migration via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Neurol Res*, 43(7), 543-552. <https://doi.org/10.1080/01616412.2021.1888604>
- Ma, Y., Liu, H., Ou, Z., Qi, C., Xing, R., Wang, S., Han, Y., Zhao, T., & Chen, Y. (2022). DHHC5 facilitates oligodendrocyte development by palmitoylating and activating STAT3. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.24113>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381-405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Masjosthusmann, S., Becker, D., Petzuch, B., Klose, J., Siebert, C., Deenen, R., Barenys, M., Baumann, J., Dach, K., Tigges, J., Hubenthal, U., Kohrer, K., & Fritsche, E. (2018). A transcriptome comparison of time-matched developing human, mouse and rat neural progenitor cells reveals human uniqueness. *Toxicol Appl Pharmacol*, 354, 40-55. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.009>
- McManus, E. J., Sakamoto, K., Armit, L. J., Ronaldson, L., Shpiro, N., Marquez, R., & Alessi, D. R. (2005). Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J*, 24(8), 1571-1583. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600633>
- McMorris, F., Mozell, R., Carson, M., Shinar, Y., Meyer, R., & Marchetti, N. (1993). Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb26247.x>
- McTigue, D. M., & Tripathi, R. B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem*, 107(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05570.x>
- Meikle, L., Pollizzi, K., Egnor, A., Kramvis, I., Lane, H., Sahin, M., & Kwiatkowski, D. J. (2008). Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function. *J Neurosci*, 28(21), 5422-5432. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0955-08.2008>
- Melville, C. (2005). Discrimination and health inequalities experienced by disabled people. *Med Educ*, 39(2), 124-126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2929.2004.02061.x>
- Meric-Bernstam, F., & Mills, G. B. (2004). Mammalian target of rapamycin. *Semin Oncol*, 31(6 Suppl 16), 10-17; discussion 33. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2004.10.013>
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., & Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00420-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00420-2)
- Moors, M., Rockel, T. D., Abel, J., Cline, J. E., Gassmann, K., Schreiber, T., Schuwald, J., Weinmann, N., & Fritsche, E. (2009). Human neurospheres as three-dimensional

- cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect*, 117(7), 1131-1138. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800207>
- Murphy, N., & Christian, B. (2007). Disability in children and young adults: the unintended consequences. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*. <https://doi.org/10.1001/archpedi.161.10.930>
- Nadarajah, B., & Parnavelas, J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 3(6), 423-432. <https://doi.org/10.1038/nrn845>
- Nango, H., Kosuge, Y., Miyagishi, H., Sugawa, K., Ito, Y., & Ishige, K. (2017). Prostaglandin E2 facilitates neurite outgrowth in a motor neuron-like cell line, NSC-34. *J Pharmacol Sci*, 135(2), 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.09.001>
- Nelson, B. R., Hartman, B. H., Georgi, S. A., Lan, M. S., & Reh, T. A. (2007). Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol*, 304(2), 479-498. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.01.001>
- Neuhaus, W., Reininger-Gutmann, B., Rinner, B., Plasenzotti, R., Wilflingseder, D., De Kock, J., Vanhaecke, T., Rogiers, V., Jirova, D., Kejlova, K., Knudsen, L. E., Nielsen, R. N., Kleuser, B., Kral, V., Thone-Reineke, C., Hartung, T., Pallocca, G., Rovida, C., Leist, M., . . . Spielmann, H. (2022). The Current Status and Work of Three Rs Centres and Platforms in Europe. *Altern Lab Anim*, 50(6), 381-413. <https://doi.org/10.1177/02611929221140909>
- Nimtz, L., Klose, J., Masjosthusmann, S., Barenys, M., & Fritsche, E. (2019). The Neurosphere Assay as an In Vitro Method for Developmental Neurotoxicity (DNT) Evaluation. In *Cell Culture Techniques* (pp. 141-168). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9228-7_8
- Nusse, R. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res*, 18(5), 523-527. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.47>
- OECD. (2023). *Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In-Vitro Testing Battery* OECD Series on Testing and Assessment, Ogino, H., Nakajima, T., Hirota, Y., Toriuchi, K., Aoyama, M., Nakajima, K., & Hattori, M. (2020). The Secreted Glycoprotein Reelin Suppresses the Proliferation and Regulates the Distribution of Oligodendrocyte Progenitor Cells in the Embryonic Neocortex. *J Neurosci*, 40(40), 7625-7636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0125-20.2020>
- orpha.net. (2024). *Distale Duplikation 11q*, ORPHA:96103. orpha.net. Retrieved 04.11.2024 from <https://www.orpha.net/de/disease/detail/96103#:~:text=Die%20distale%20Trisomie%2011q%20ist,mit%20hoher%20ph%C3%A4notypischer%20Variabilit%C3%A4t%20einhergeht.>
- Pal, R., Bondar, V. V., Adamski, C. J., Rodney, G. G., & Sardiello, M. (2017). Inhibition of ERK1/2 Restores GSK3beta Activity and Protein Synthesis Levels in a Model of Tuberous Sclerosis. *Sci Rep*, 7(1), 4174. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04528-5>
- Park, S., Lim, B., Kim, K., & Koh, B. (2024). Long and Short-Term Effect of mTOR Regulation on Cerebral Organoid Growth and Differentiations. *Tissue Eng Regen Med*. <https://doi.org/10.1007/s13770-023-00611-3>
- Persico, A., D'Agruma, L., Maiorano, N., Totaro, A., Militerni, R., Bravaccio, C., Wassink, T., Schneider, C., Melmed, R., Trillo, S., Montecchi, F., Palermo, M., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Reichelt, K., Conciatori, M., Marino, R., Quattrocchi, C., Baldi, A., . . . Keller, F. (2001). Collaborative Linkage Study of Autism. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000850>
- Populo, H., Lopes, J. M., & Soares, P. (2012). The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 13(2), 1886-1918. <https://doi.org/10.3390/ijms13021886>
- Promega. (05/2009). CytoTox-ONE(TM) Homogeneous Membrane Integrity Assay. In.

- Promega. (07/2023). CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. In.
- Rai-Bhagal, R., Wong, C., Kissoondoyal, A., Davidson, J., Li, H., & Crawford, D. A. (2018). Maternal exposure to prostaglandin E(2) modifies expression of Wnt genes in mouse brain - An autism connection. *Biochem Biophys Rep*, 14, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.03.012>
- Rakic, S., & Zecevic, N. (2000). Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur J Neurosci*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00153.x>
- Ramirez-Calderon, G., Colombo, G., Hernandez-Bautista, C. A., Astro, V., & Adamo, A. (2022). Heart in a Dish: From Traditional 2D Differentiation Protocols to Cardiac Organoids. *Front Cell Dev Biol*, 10, 855966. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.855966>
- Raz, R., Lee, C., Cannizzaro, L., d'Eustachio, P., & Levy, D. (1999). Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci* <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2846>
- Reynolds, B. A., & Rietze, R. L. (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods*, 2(5), 333-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth758>
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- Ribeiro, F. F., & Xapelli, S. (2021). An Overview of Adult Neurogenesis. In *Recent Advances in NGF and Related Molecules - Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1331, pp. 77-94). Springer, Cham. https://doi.org/doi.org/10.1007/978-3-030-74046-7_7
- Roche, F. (12/2020). Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). In.
- Rodier, P. (1995). Developing brain as a target of toxicity. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s673>
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of Humane Experimental Technique*. Butler & Tanner, Frome and London.
- Sachana, M., Willett, C., Pistollato, F., & Bal-Price, A. (2021). The potential of mechanistic information organised within the AOP framework to increase regulatory uptake of the developmental neurotoxicity (DNT) in vitro battery of assays. *Reprod Toxicol*, 103, 159-170. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.06.006>
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25(6), 903-915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- Sanna, P., Berton, F., Cammalleri, M., Tallent, M., Siggins, G., Bloom, F., & Francesconi, W. (2000). A role for Src kinase in spontaneous epileptiform activity in the CA3 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.140219097>
- Schmidt, C. (2013). Beyond Uncertainty Factors: Protecting the Tails of the Bell Curve. *Environ Health Perspect*. <https://doi.org/10.1289/ehp.121-a26>
- Schmuck, M. R., Temme, T., Dach, K., de Boer, D., Barenys, M., Bendt, F., Mosig, A., & Fritsche, E. (2017). Omnisphero: a high-content image analysis (HCA) approach for phenotypic developmental neurotoxicity (DNT) screenings of organoid neurosphere cultures in vitro. *Arch Toxicol*, 91(4), 2017-2028. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1852-2>
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., & Rakic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.741>

- Shang, S., Hua, F., & Hu, Z. (2017). The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15687>
- Sheng, B., Gong, K., Niu, Y., Liu, L., Yan, Y., Lu, G., Zhang, L., Hu, M., Zhao, N., Zhang, X., Tang, P., & Gong, Y. (2009). Inhibition of gamma-secretase activity reduces Abeta production, reduces oxidative stress, increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: Implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 46(10), 1362-1375. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.018>
- Sherman, S. P., & Bang, A. G. (2018). High-throughput screen for compounds that modulate neurite growth of human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Dis Model Mech*, 11(2). <https://doi.org/10.1242/dmm.031906>
- Shiow, L. R., Favrais, G., Schirmer, L., Schang, A. L., Cipriani, S., Andres, C., Wright, J. N., Nobuta, H., Fleiss, B., Gressens, P., & Rowitch, D. H. (2017). Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury. *Glia*, 65(12), 2024-2037. <https://doi.org/10.1002/glia.23212>
- Sibbe, M., Kuner, E., Althof, D., & Frotscher, M. (2015). Stem- and progenitor cell proliferation in the dentate gyrus of the reeler mouse. *PLoS One*, 10(3), e0119643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119643>
- Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, 89(2), 248-268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>
- Skardelly, M., Glien, A., Groba, C., Schlichting, N., Kamprad, M., Meixensberger, J., & Milosevic, J. (2013). The influence of immunosuppressive drugs on neural stem/progenitor cell fate in vitro. *Exp Cell Res*, 319(20), 3170-3181. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.08.025>
- Smirnova, L., Hogberg, H. T., Leist, M., & Hartung, T. (2014). Developmental neurotoxicity - challenges in the 21st century and in vitro opportunities. *ALTEX*, 31(2), 129-156. <https://doi.org/10.14573/altex.1403271>
- Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., & FitzGerald, G. A. (2009). Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res*, 50 Suppl(Suppl), S423-428. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800094-JLR200>
- Solnica-Krezel, L., & Sepich, D. S. (2012). Gastrulation: making and shaping germ layers. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 687-717. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154043>
- Sreeramkumar, V., Fresno, M., & Cuesta, N. (2012). Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol Cell Biol*, 90(6), 579-586. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.75>
- Stebbing, R., Findlay, L., Edwards, C., Eastwood, D., Bird, C., North, D., Mistry, Y., Dilger, P., Liefoghe, E., Cludts, I., Fox, B., Tarrant, G., Robinson, J., Meager, T., Dolman, C., Thorpe, S. J., Bristow, A., Wadhwa, M., Thorpe, R., & Poole, S. (2007). "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol*, 179(5), 3325-3331. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3325>
- Stiles, J. (2011). Brain development and the nature versus nurture debate. *Prog Brain Res*, 189, 3-22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53884-0.00015-4>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*, 20(4), 327-348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Sutherland, C., Leighton, I., & Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J*. <https://doi.org/10.1042/bj2960015>

- Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J., & Sabatini, B. L. (2005). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci*, 8(12), 1727-1734. <https://doi.org/10.1038/nn1566>
- Torres, M., & Forman, H. (2006). *Encyclopedia of respiratory medicine* (G. J. Laurent & S. D. Shapiro, Eds. Vol. 1) [Bookchapter]. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00351-3>
- Tran, L. N., Loew, S. K., & Franco, S. J. (2023). Notch Signaling Plays a Dual Role in Regulating the Neuron-to-Oligodendrocyte Switch in the Developing Dorsal Forebrain. *J Neurosci*, 43(41), 6854-6871. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0144-23.2023>
- Tsuji, R., & Crofton, K. M. (2012). Developmental neurotoxicity guideline study: issues with methodology, evaluation and regulation. *Congenit Anom (Kyoto)*, 52(3), 122-128. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2012.00374.x>
- US National Research Council, C. o. D. T. (2000). Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment. *National Academies Press (US)*. <https://doi.org/10.17226/9871>
- Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K., & Reddanna, P. (2013). The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front Oncol*, 3, 165. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00165>
- Vallee, A., Vallee, J. N., & Lecarpentier, Y. (2019). PPARgamma agonists: potential treatment for autism spectrum disorder by inhibiting the canonical WNT/beta-catenin pathway. *Mol Psychiatry*, 24(5), 643-652. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0131-4>
- Valvezan, A. J., & Klein, P. S. (2012). GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder. *Front Mol Neurosci*, 5, 1. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00001>
- van der Pal, R., Koper, J., van Golde, L., & Lopes-Cardozo, M. (1988). Effects of insulin and insulin-like growth factor (IGF-I) on oligodendrocyte-enriched glial cultures. *J Neurosci Res*. <https://doi.org/10.1002/jnr.490190412>
- van der Zalm, A. J., Barroso, J., Browne, P., Casey, W., Gordon, J., Henry, T. R., Kleinstreuer, N. C., Lowit, A. B., Perron, M., & Clippinger, A. J. (2022). A framework for establishing scientific confidence in new approach methodologies. *Arch Toxicol*, 96(11), 2865-2879. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03365-4>
- Vanhaecke, T., Pauwels, M., Vinken, M., Ceelen, L., & Rogiers, V. (2011). Towards an integrated in vitro strategy for repeated dose toxicity testing. *Arch Toxicol*, 85(5), 365-366. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0711-4>
- Vella, A., D'Aversa, E., Api, M., Breveglieri, G., Allegri, M., Giacomazzi, A., Marinelli Busilacchi, E., Fabrizzi, B., Cestari, T., Sorio, C., Bedini, G., D'Amico, G., Bronte, V., Poloni, A., Benedetti, A., Bovo, C., Corey, S. J., Borgatti, M., Cipolli, M., & Bezzetti, V. (2020). mTOR and STAT3 Pathway Hyper-Activation is Associated with Elevated Interleukin-6 Levels in Patients with Shwachman-Diamond Syndrome: Further Evidence of Lymphoid Lineage Impairment. *Cancers (Basel)*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030597>
- Wan, Z., Shi, W., Shao, B., Shi, J., Shen, A., Ma, Y., Chen, J., & Lan, Q. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone inhibits beta-catenin-mediated glioma cell growth and invasion. *Mol Cell Biochem*, 349(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0637-9>
- Wang, S., Sdrulla, A., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., & Barres, B. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80515-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80515-2)

- Wei, L. L., Shen, Y. D., Zhang, Y. C., Hu, X. Y., Lu, P. L., Wang, L., & Chen, W. (2010). Roles of the prostaglandin E2 receptors EP subtypes in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, 26(1), 77-84. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-0703-z>
- Wen, X., & Hu, J. (2024). Targeting STAT3 signaling pathway in the treatment of Alzheimer's disease with compounds from natural products. *Int Immunopharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.112936>
- Wong, C., Ahmad, E., Li, H., & Crawford, D. (2014). Prostaglandin E2 alters Wnt-dependent migration and proliferation in neuroectodermal stem cells: implications for autism spectrum disorders. *Cell Commun Signal*. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-19>
- Wong, C. T., Ussyshkin, N., Ahmad, E., Rai-Bhogal, R., Li, H., & Crawford, D. A. (2016). Prostaglandin E2 promotes neural proliferation and differentiation and regulates Wnt target gene expression. *J Neurosci Res*, 94(8), 759-775. <https://doi.org/10.1002/jnr.23759>
- Yin, X., Liu, X., Xiao, X., Yi, K., Chen, W., Han, C., Wang, L., Li, Y., & Liu, J. (2023). Human neural stem cells repress glioma cell progression in a paracrine manner by downregulating the Wnt/beta-catenin signalling pathway. *FEBS Open Bio*, 13(9), 1772-1788. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13671>
- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., & Reeves, S. (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*. [https://doi.org/doi:10.1016/s0960-9822\(99\)00268-7](https://doi.org/doi:10.1016/s0960-9822(99)00268-7)
- Zhang, Y., Xiang, Z., Jia, Y., He, X., Wang, L., & Cui, W. (2019). The Notch signaling pathway inhibitor Dapt alleviates autism-like behavior, autophagy and dendritic spine density abnormalities in a valproic acid-induced animal model of autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 94, 109644. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109644>
- Zhang, Z., Wei, D., Li, Z., Guo, H., Wu, Y., & Feng, J. (2022). Hippocampal Mitochondrial Transplantation Alleviates Age-Associated Cognitive Decline via Enhancing Wnt Signaling and Neurogenesis. *Comput Intell Neurosci*, 2022, 9325302. <https://doi.org/10.1155/2022/9325302>
- Zhao, H., Feng, Y., Wei, C., Li, Y., Ma, H., Wang, X., Cui, Z., Jin, W. N., & Shi, F. D. (2019). Colivelin Rescues Ischemic Neuron and Axons Involving JAK/STAT3 Signaling Pathway. *Neuroscience*, 416, 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.020>
- Zhao, S., Chai, X., Forster, E., & Frotscher, M. (2004). Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development*, 131(20), 5117-5125. <https://doi.org/10.1242/dev.01387>
- Zhao, S., Fan, W., Guo, X., Xue, L., Berninger, B., Salierno, M. J., & Del Campo, A. (2018). Microenvironments to study migration and somal translocation in cortical neurons. *Biomaterials*, 156, 238-247. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.042>
- Zhou, C. J., Zhao, C., & Pleasure, S. J. (2004). Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci*, 24(1), 121-126. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4071-03.2004>
- Zou, S., Tong, Q., Liu, B., Huang, W., Tian, Y., & Fu, X. (2020). Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer*, 19(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01258-7>

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten für das Ermöglichen dieser Dissertation bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ellen Fritsche, welche mich herzlich in Ihrer Arbeitsgruppe aufnahm, mir dieses spannende Forschungsprojekt bereitstellte und mich umfassend betreut hat.

Vielen Dank an Frau Dr. Kristina Bartmann für die Einarbeitung, konstante Unterstützung sowie die langjährige und intensive Betreuung meiner Dissertation.

Mein Dank gilt ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe der ehemaligen AG Fritsche. Besonders möchte ich meinen Kommilitonen Mats Schade hervorheben, der mit mir an diesem Projekt gearbeitet hat und der auch unsere ersten verzweifelten Fehlversuche im Labor mit Humor gerettet hat. Auch danke ich explizit Lynn-Christin Saborowski für die Einarbeitung und die immerwährende Unterstützung im Labor.

Frau Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall möchte ich dafür danken, dass sie sich so komplikationslos als meine Zweitgutachterin zur Verfügung gestellt hat.

Ich möchte all meinen Freund*innen danken, die mich durchs Leben und durch die stressigen Phasen der letzten Jahre begleitet haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Meine Eltern, Helga Raad und Dr. George Raad, haben mit mir jede Hürde des Lebens genommen, standen und stehen immer unterstützend an meiner Seite. Meinem Hund Russel danke ich für all die liebevollen Kuscheleinheiten, dafür, dass wir zusammen aufgewachsen sind und dass er mir die Augen für die Lebensrealität der Tiere geöffnet hat. Meinem Partner Philipp Wisniowski danke ich für die Harmonie in stressigen wie auch in entspannten Zeiten, und dass wir gemeinsam für unsere Zukunftsvision einer besseren Welt kämpfen.