

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

**Analyse von Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten Signalwegen in  
der ZNS-Entwicklung mithilfe des humanen 3D-Neurosphären-As-  
says**  
im Rahmen der Etablierung einer in-vitro-Testbatterie zur Ermittlung  
von Entwicklungsneurotoxizität

Dissertation

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

vorgelegt von

Mats Schade

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Ellen Fritsche

Zweitgutachter: PD Dr. med. Felsberg

*Für all die Tiere, welche für die menschliche Forschung leiden und sterben und denen ein freies, natürliches Leben verwehrt wird.*

*In der Hoffnung, dass diese Arbeit einen winzig kleinen Teil dazu beiträgt, dass Menschen alternative Forschungsmethoden benutzen, um ihr eigenes Wohl zu steigern, ohne unschuldige Wesen auszunutzen.*

## **I Zusammenfassung (deutsch)**

Eine Störung der menschlichen Gehirnentwicklung durch exogene Noxen kann über Störungen der zellulären Signalkaskaden zu Entwicklungsneurotoxizität (*developmental neurotoxicity*, DNT) führen. Die Testung von Chemikalien auf DNT wird derzeit nach internationalen Richtlinien in Tierstudien durchgeführt. Diese Studien gehen mit großem Ressourcen-Verbrauch einher, unterliegen methodischen Unsicherheiten und Speziesunterschiede erschweren ihre Übertragung auf den Menschen. Daher wurde in Zusammenarbeit mit der Europäischen Lebensmittelbehörde und der US-amerikanischen Umweltschutzbehörde eine DNT-In-vitro-Batterie (IVB) etabliert, die basale Schlüsselereignisse der menschlichen Gehirnentwicklung abbildet.

Der in dieser Arbeit verwendete Neurosphären-Assay ist Teil der DNT-IVB und untersucht mit 3D humanen neuronalen Vorläuferzellen (hNPC) neurologische Entwicklungsprozesse. Die Kultivierung von hNPCs mit Wachstumsfaktoren ermöglicht die Analyse der Proliferation; unter differenzierenden Bedingungen (ohne Wachstumsfaktoren) wird die radiale Glia-Migration, neuronale und Oligodendrozyten-Differenzierung sowie Zelltyp-spezifische Migration gemessen.

Ziel der Arbeit ist es, die Auswirkungen einer Aktivierung oder Inhibierung von fünf Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten Signalwegen (PDGF/PDGFR, CREB, PLC $\gamma$ , PI3K-PKB, BDNF/TrkB) auf die Endpunkte des Neurosphären-Assays zu analysieren, um zu seiner Validierung beizutragen. Diese Signalwege spielen in der Pathophysiologie entwicklungsneurologischer Krankheiten eine wichtige Rolle.

Alle getesteten Signalwege regulieren einen oder mehrere Endpunkte des Neurosphären-Assays. Eine Hemmung von TrkB und PDGF-Rezeptoren verringert die Migration von Radialglia, während die Aktivierung von PLC $\gamma$  und CREB die Differenzierung in Oligodendrozyten und die Migration von Radialglia reduziert. CREB zeigt sich als komplexer und sensibler Regulator der Proliferation, da sowohl seine Aktivierung als auch Inhibierung die Proliferationsrate reduzieren.

Die hier gewonnenen Daten geben neue Einblicke in die im Neurosphären-Assay abgebildeten Signalwege und stärken dessen Validität und Akzeptanz im Rahmen der DNT-IVB. Sie stimmen teilweise mit tierischen Studien überein, zeigen aber auch Unterschiede, was die schwierige Übertragbarkeit von Tierversuchen auf die menschliche Gehirnentwicklung verdeutlicht.

## **II Zusammenfassung (englisch)**

Disruption of human brain development by exogenous noxious agents can lead to developmental neurotoxicity (DNT) via interference with cellular signaling cascades. The testing of chemicals for DNT is currently carried out in animal studies according to international guidelines. These studies are associated with a high consumption of resources, are subject to methodological uncertainties, and species differences make it difficult to transfer them to humans. Therefore, an in vitro DNT battery (IVB) was established in collaboration with the European Food Safety Authority and the US Environmental Protection Agency, which reflects key processes of human brain development.

The neurosphere assay used in this work is part of the DNT-IVB and investigates key neurodevelopmental processes using 3D human neural precursor cells (hNPCs). Culturing hNPCs with growth factors allows the analysis of proliferation; under differentiating conditions (without growth factors), radial glia migration, neuronal and oligodendrocyte differentiation, and cell type-specific migration are measured.

The aim of the work is to analyse the effects of activation or inhibition of five receptor tyrosine kinase-mediated signaling pathways (PDGF/PDGFR, CREB, PLCy, PI3K-PKB, BDNF/TrKB) on the endpoints of the neurosphere assay for contributing to its validation. These signaling pathways play an important role in the pathophysiology of neurodevelopmental diseases.

All tested pathways regulate one or more endpoints of the neurosphere assay. Inhibition of TrkB and PDGF receptors reduces the migration of radial glia, while activation of PLCy and CREB reduces differentiation into oligodendrocytes and the migration of radial glia. CREB appears to be a more complex and sensitive regulator of proliferation, since both its activation and inhibition reduce the proliferation rate. The data obtained here provide new insights into the signaling pathways modelled in the neurosphere assay and strengthen its validity and acceptance in the context of the DNT-IVB. They are partly consistent with animal studies, but also show differences, which highlights the difficulties in transferring animal studies to human brain development.

### III. Abkürzungsverzeichnis

(h)NPCs	(humane) neurale Progenitorzellen
B27- Medium w/o	B27-Medium ohne Wachstumsfaktoren
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin-abhängige Protein Kinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP-response-element-binding protein
DAG	Diacylglycerin
db-cAMP	dibutryl-cAMP
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNT	Entwicklungsneurotoxizität (developmental neurotoxicity)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
GW	Gestationswoche
HGK	Hintergrundkontrolle
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
k.E.	kein relevanter Effekt
LDH	Laktatdehydrogenase
LMK	Lösungsmittelkontrolle
LYK	Lysekontrolle
MAP3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
NSCs	Neurale Stammzellen
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate-buffered saline
PBS-T	Phosphate-buffered saline mit Triton X
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PK1	Phosphoinositid-abhängige Protein Kinase-1
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLCy	Phospholipase C gamma
Poly-HEMA	Poly(2-hydroxyethylmethacrylate)
Ras	Rat sarcoma
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of Mean

SOS1 ..... *Son of Sevenless Homolog 1-Protein*  
TrkB ..... *Tropomyosin-Rezeptorkinase B*  
ZNS ..... *Zentrales Nervensystem*

## IV Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zelluläre Schlüsselprozesse der menschlichen Gehirnentwicklung	1
1.2 Der Neurosphären-Assay als biologische Applikationsdomäne zur Untersuchung von Entwicklungsneurotoxizität	3
1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung	6
1.4 Ziele der Arbeit	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>0</b>
2.1 Material	0
2.1.1 Geräte	0
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	1
2.1.3 Materialien für zellbiologische Methoden	1
2.1.3.1 Zellen	1
2.1.3.2 Medien und Medienzusätze	1
2.1.3.3 Kulturmedien	2
2.1.3.4 Beschichtungsreagenzien	2
2.1.3.5 Immunzytochemie	2
2.1.3.6 BrdU Zell-Proliferationstest	3
2.1.3.7 Alamar-Blue-Viabilitätsbestimmung	3
2.1.3.8 LDH-Zytotoxizitätsbestimmung	4
2.1.3.9 Substanzen für zelluläre Belastungen	4
2.1.4 Verwendete Softwares	6
2.2 Methoden	8
2.2.1 Beschichtungen	8
2.2.1.1 Beschichtung mit Poly-HEMA	8
2.2.1.2 Beschichtung mit PDL und Laminin	8
2.2.2 Zellkultur	9
2.2.2.1 Revitalisierung und Kultivierung kryokonservierter humaner neuraler Progenitorzellen	9
2.2.2.2 Passagieren der Neurosphären	10

<b>2.2.3 Neurosphären-Assay</b>	<b>10</b>
<b>2.2.3.1 Untersuchungen unter proliferierenden Bedingungen</b>	<b>11</b>
2.2.3.1.1 Untersuchung der Proliferation über die Messung der Flächenzunahme (NPC1a)	12
2.2.3.1.2 Untersuchung der Proliferation über die Messung des BrdU-Einbaus in die DNS (NPC1b)	13
<b>2.2.3.2 Untersuchungen unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)</b>	<b>14</b>
2.2.3.2.1 Untersuchung der Zellmigration (NPC2)	17
2.2.3.2.2 Immunzytochemische Färbungen zur Differenzierungs- und Migrationsanalyse	17
<b>2.2.3.3 Bestimmung der Zellviabilität und der Zytotoxizität</b>	<b>20</b>
2.2.3.3.1 Der Alamar-Blue-Assay	20
2.2.3.3.2 Der LDH-Assay	21
2.2.3.5 Statistische Analyse	23
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Der Einfluss des BDNF-Rezeptors TrkB</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1 TrkB-Aktivierung</b>	<b>24</b>
3.1.1.1 Effekte einer TrkB-Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen	24
3.1.1.2 Effekte einer TrkB-Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen	25
<b>3.1.2 Inhibierung des TrkB-Rezeptors</b>	<b>26</b>
3.1.2.1 Effekte einer Inhibierung des TrkB-Rezeptors unter proliferierenden Bedingungen	27
3.1.2.2 Effekte einer Inhibierung des TrkB-Rezeptors unter differenzierenden Bedingungen	27
<b>3.2 Der Einfluss des PDGF-Rezeptors</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1 PDGFR-Aktivierung</b>	<b>28</b>
3.2.1.1 Effekte einer PDGFR-Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen	29
3.2.1.2 Effekte einer PDGFR-Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen	29
<b>3.2.2 PDGFR-Hemmung</b>	<b>30</b>
3.2.2.1 Effekte einer PDGFR-Hemmung unter proliferierenden Bedingungen	31
3.2.2.1 Effekte einer PDGFR-Hemmung unter differenzierenden Bedingungen	31
<b>3.3 Der Einfluss der PLC<math>\gamma</math></b>	<b>33</b>
<b>3.3.1 PLC<math>\gamma</math>-Aktivierung</b>	<b>33</b>
3.3.1.1 Effekte einer PLC $\gamma$ -Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen	33
3.3.1.2 Effekte einer PLC $\gamma$ -Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen	33

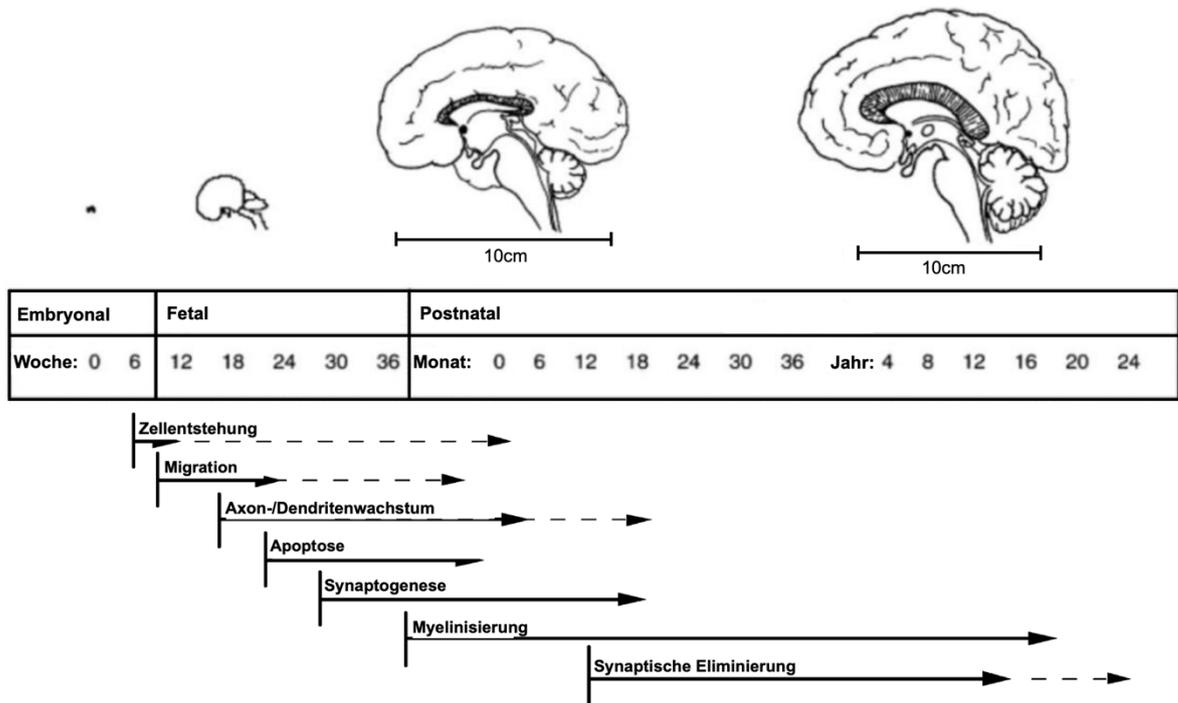
<b>3.3.2 PLCy-Hemmung</b>	<b>35</b>
<b>3.3.2.1 Effekte einer PLCy-Hemmung unter proliferierenden Bedingungen</b>	<b>35</b>
<b>3.3.2.1 Effekte einer PLCy-Hemmung unter differenzierenden Bedingungen</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Der Einfluss des PI3K-PKB-Signalweges</b>	<b>36</b>
<b>3.4.1 Aktivierung des PI3K-PKB-Signalweges</b>	<b>36</b>
<b>3.4.1.1 Effekte einer Aktivierung des PI3K-PKB-Signalweges unter proliferierenden Bedingungen</b>	<b>37</b>
<b>3.4.1.2 Effekte einer Aktivierung des PI3K-PKB-Signalweges unter differenzierenden Bedingungen</b>	<b>38</b>
<b>3.4.2 Hemmung des PI3K-PKB-Signalweges</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2.1 Effekte einer Hemmung des PI3K-PKB-Signalweges unter proliferierenden Bedingungen</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2.2 Effekte einer Hemmung des PI3K-PKB-Signalweges unter differenzierenden Bedingungen</b>	<b>39</b>
<b>3.5 Der Einfluss von CREB</b>	<b>40</b>
<b>3.5.1 CREB-Aktivierung</b>	<b>40</b>
<b>3.5.1.1 Effekte einer CREB-Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen</b>	<b>41</b>
<b>3.5.1.2 Effekte einer CREB-Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen</b>	<b>42</b>
<b>3.5.2 CREB-Hemmung</b>	<b>44</b>
<b>3.5.2.1 Effekte einer CREB-Hemmung unter proliferierenden Bedingungen</b>	<b>45</b>
<b>3.5.2.2 Effekte einer CREB- Hemmung unter differenzierenden Bedingungen</b>	<b>45</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Das Modulieren des BDNF-Rezeptors TrkB im humanen Neurosphären-Assay</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Das Modulieren des PDGF-Rezeptors im humanen Neurosphären-Assay</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Zwischenfazit: Analyse des Modulierens der Rezeptor-Tyrosinkinasen TrkB und PDGFR im humanen Neurosphären-Assay</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Das Modulieren der PLCy im humanen Neurosphären-Assay</b>	<b>54</b>
<b>4.5 Das Modulieren des PI3K-PKB-Signalweges im humanen Neurosphären-Assay</b>	<b>55</b>
<b>4.6 Das Modulieren von CREB im humanen Neurosphären-Assay</b>	<b>55</b>
<b>4.7 Fazit: Untersuchung Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege im humanen Neurosphären-Assay</b>	<b>57</b>
<b>5 Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>62</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Zelluläre Schlüsselprozesse der menschlichen Gehirnentwicklung

Das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark nimmt mit verschiedenen Funktionen essenzielle Rollen im menschlichen Organismus ein. Hervorzuheben ist die Steuerung somatischer und vegetativer Körperfunktionen und die sensorische Wahrnehmung. Außerdem ermöglicht das Gehirn dem Menschen das (Selbst-)Bewusstsein, das Gedächtnis, vielfältige kognitive Fähigkeiten, die Sprachfähigkeit und das Sozialverhalten (Harari, 2018).

Die Entwicklung des ZNS beginnt in der dritten Gestationswoche (GW) *post conceptionem* und ist nicht auf den pränatalen Zeitraum begrenzt. Sie kann in mehrere, sich zeitlich überlappende Prozesse eingeteilt werden und dauert bis ins Erwachsenenalter an (Andersen, 2003, Abb. 1). In der pränatalen Entwicklung unterscheidet man die embryonale von der fetalen Phase, wobei zum Ende der Embryonalphase (GW 8) die grundlegenden Strukturen des ZNS angelegt sind und im weiteren Verlauf wachsen und reifen (Stiles & Jernigan, 2010).



**Abb. 1: Zelluläre Schlüsselprozesse der humanen Gehirnentwicklung**

Die dargestellten zellulären Schlüsselprozesse der humanen Gehirnentwicklung überlappen sich stark und finden sowohl in der Embryonal- und der Fetalphase als auch postnatal statt (adaptiert nach Andersen, 2003).

Nach Abschluss der Gastrulation liegt der Embryo als dreiblättrige Keimscheibe, bestehend aus Entoderm, intraembryonalem Mesoderm und Ektoderm vor. Am 19.

Entwicklungstag beginnt die Neurulation mit der neuralen Induktion. Hierbei sendet die *Chorda dorsalis* Signale an das darüber liegende Ektoderm, woraufhin sich aus dessen Zellen die Neuralplatte bildet. Diese formt durch Einsenkung und Abschnürung vom Rest des Ektoderms den Vorläufer des ZNS, das Neuralrohr (Copp et al., 2003; Sadler, 2014). Der Begriff der Neurogenese umfasst die darauffolgenden Entwicklungsprozesse Proliferation, Migration, Differenzierung, Synaptogenese, Apoptose und Myelinisierung (siehe Abb. 1). In der fünften und sechsten GW kommt es zu einer starken Proliferation von neuralen Progenitorzellen (NPCs), welche das Neuralrohr bilden. NPCs sind in der Lage in die verschiedenen Effektorzellen des Gehirns (Neurone und Gliazellen) zu differenzieren. Zu den Gliazellen zählen unter anderem Astrozyten und Oligodendrozyten.

Astrozyten sind neben der mechanischen Stützfunktion des Nervengewebes an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt, helfen bei der Synaptogenese (W. S. Chung et al., 2015) und haben eine nutritive Funktion für Synapsen (Ikonen, 2008). Sie steuern den extrazellulären und synaptischen Elektrolythaushalt, sowie die synaptischen Neurotransmitterkonzentrationen und kontrollieren somit die neuronale Signalweiterleitung (W. S. Chung et al., 2015).

Oligodendrozyten können die Axone mehrerer Nervenzellen myelinisieren und dadurch schützen und bioelektrisch isolieren, was zu einer schnelleren und effizienteren neuronalen Erregungsweiterleitung führt (Simons & Nave, 2016).

Postmitotische Neuroblasten reifen zu Neuronen heran, was sich morphologisch durch Ausbildung von Dendriten und Axonen zeigt. Sie migrieren nach Verlassen der Proliferationszone in Richtung ihres Zielortes, wofür sie die Fortsätze (Corti Säulen) spezieller Gliazellen als zelluläres Gerüst nutzen. Alternativ können Nervenzellen auch durch somale Translokation an ihren Zielort migrieren (Hawthorne et al., 2010; Stiles & Jernigan, 2010). Dort angekommen verzweigen sie sich und bilden funktionelle Verbindungen mit anderen Neuronen (Synaptogenese), Astrozyten und Oligodendrozyten. Durch diese Verbindungen entsteht ein neuronales Netzwerk, welches sich durch elektrochemische, interzelluläre Kommunikation auszeichnet. Durch Autoregulationsmechanismen des Organismus kommt es zur Apoptose, wodurch etwa die Hälfte aller initial gebildeten Nervenzellen, die beispielsweise zu wenige oder nicht funktionsfähige Synapsen gebildet haben, entfernt wird. Auch 50% der Synapsen werden zu Gunsten der Funktionalität des neuronalen Netzwerkes wieder eliminiert (Stiles & Jernigan, 2010). Im adulten Gehirn entstehen

Neurone nur noch an ausgewählten Arealen (Q. Zhang et al., 2011), wohingegen die Genese neuer Synapsen im Erwachsenenalter nicht auf einzelne Regionen beschränkt ist (Andersen, 2003).

Gliazellen proliferieren und migrieren noch bis lange nach der Geburt weiter (Stiles & Jernigan, 2010). Die Oligodendrozyten-vermittelte Myelinisierung hingegen beginnt erst in der späten Pränatalphase und dauert bis ins junge Erwachsenenalter an (Barateiro et al., 2016).

Damit sich das ZNS gesund entwickeln kann, müssen viele komplexe und streng regulierte Prozesse korrekt ablaufen und perfekt aufeinander abgestimmt sein. Verschiedene Zelltypen müssen zur richtigen Zeit am richtigen Ort entstehen und untereinander präzise Verbindungen eingehen (Menon & Gupton, 2018).

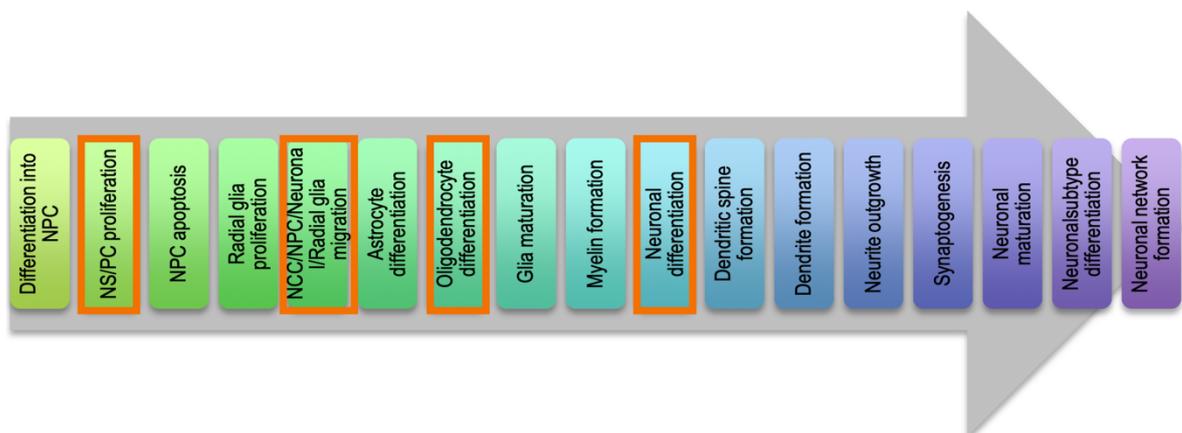
## **1.2 Der Neurosphären-Assay als biologische Applikationsdomäne zur Untersuchung von Entwicklungsneurotoxizität**

### Entwicklungsneurotoxizität

Wenn einer der in 1.1 Zelluläre Schlüsselprozesse der menschlichen Gehirnentwicklung beschriebenen Prozesse gestört ist, kann es zu Entwicklungsneurotoxizität (*developmental neurotoxicity*; DNT, Giordano & Costa, 2012) und schweren Anomalien des ZNS kommen. Von DNT spricht man, wenn biologische, chemische oder physikalische Einflüsse zu strukturellen oder morphologischen Veränderungen des sich entwickelnden Nervensystems führen, die in einem adversen Ergebnis resultieren (Giordano & Costa, 2012; Kandel, 2013). Um das DNT-Potential verschiedener Substanzen (z.B. Pestizide, Medikamente, Flammschutzmittel etc.) zu erforschen, werden heutzutage zum Großteil tierbasierte Versuche durchgeführt. Hierbei gibt es allerdings zu vielen der in der Umwelt des Menschen vorkommenden Chemikalien noch keine Daten (Sachana et al., 2019). Außerdem ist die Transition von Tierversuchs-Ergebnissen auf die Vorgänge im menschlichen Organismus problematisch (Hartung, 2009; Leist & Hartung, 2013). Die Mehrheit der Medikamente, welche die präklinischen Tierversuche erfolgsversprechend durchlaufen, scheitern in den darauffolgenden Studien an Menschen – vor allem in Phase II Studien – und erreichen die Marktzulassung nicht. Hauptverantwortlich hierfür sind fehlende Wirksamkeit oder Nebenwirkungen der Medikamente (Arrowsmith, 2012). Um diese Datenlücke zu schließen und besser auf den Menschen übertragbare Ergebnisse bereitzustellen, soll eine DNT-Testbatterie entwickelt werden, die aus verschiedenen *in vitro* Assays besteht, welche möglichst humane Zellen verwenden und

unterschiedliche Entwicklungszeitpunkte des ZNS abbilden. Für aussagekräftige Ergebnisse ist es notwendig, dass diese Testbatterie alle wesentlichen Schlüsselprozesse der ZNS-Entwicklung abdeckt (Bal-Price et al., 2015; Fritsche, Alm, et al., 2017; Fritsche, Crofton, et al., 2017). Es gibt bereits einige Assays, die zu einer solchen DNT-Testbatterie beitragen können (Bal-Price et al., 2019; Fritsche et al., 2018). Hierzu zählt der Neurosphären-Assay, welcher mit humanen NPCs die in Abb. 2 markierten zellulären Schlüsselprozesse untersucht.

Die Validierung neuer tierversuchsfreier Methoden erfordert eine umfassende Charakterisierung und Bewertung ihrer Zuverlässigkeit und Relevanz für die Humanbiologie, bevor die Methoden von den Behörden akzeptiert werden. Die OECD GD 211 (OECD, 2014) definiert die notwendigen Anforderungen für eine solche Validierung. Bal-Price et al. (2018) wenden diese Anforderungen auf das Feld der Entwicklungsneurotoxizität (DNT) an. Eine biologische Applikationsdomäne zur DNT-Testung soll molekulare Signalwege und zelluläre Prozesse identifizieren, welche zu relevanten unerwünschten Ereignissen (*adverse outcome pathways, AOPs*) führen. Die Kenntnis der modulierbaren Signalwege jeder Prüfmethode ist daher ein wichtiges Kriterium, um die Eignung von Prüfmethode für die Gefahrenbewertung von Substanzen zu definieren (Bal-Price et al., 2018).



### Abb. 2: Zelluläre Schlüsselprozesse der humanen Gehirnentwicklung

Diese Prozesse sollen der OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) zufolge *in vitro* mit humanen Zellen getestet werden, um valide Aussagen über den Einfluss verschiedener Chemikalien auf die ZNS-Entwicklung zu treffen. In der vorliegenden Arbeit wird mithilfe des Neurosphären-Assays der Einfluss verschiedener Signalwege auf die orangenen markierten Endpunkte untersucht. (Abb. nach Fritsche, Crofton, et al., 2017)

### Der Neurosphären-Assay

Der Neurosphären-Assay basiert auf primären humanen NPCs, welche aus Vollhirnhomogenaten menschlicher Feten der GW 16-19 gewonnen werden. Die NPCs

werden als dreidimensionale Zellaggregate, sogenannte Neurosphären kultiviert. Auch die Gewinnung von Neurosphären aus Nagern ist möglich. Man weiß unter anderem durch Genexpressionsanalysen, sowie durch Messung der neuronalen elektrischen Aktivität, dass sich humane NPCs deutlich von Nager-NPCs unterscheiden (Baumann et al., 2015, 2016; Masjosthusmann et al., 2018; Nimitz et al., 2020). Neurosphären können in serumfreiem Medium mit zugesetzten Wachstumsfaktoren mehrere Monate kultiviert werden. Regelmäßiges Passagieren gewährleistet Nährstoffzufuhr. Neurosphären können mit Chemikalien belastet werden, um den Einfluss dieser Chemikalien auf basale Schlüsselprozesse der Gehirnentwicklung, wie Proliferation, Migration, und Differenzierung zu untersuchen (Barenys et al., 2017; Baumann et al., 2015, 2016; Masjosthusmann et al., 2018; Moors et al., 2009; Nimitz et al., 2019).

Die Proliferation der Neurosphären wird sowohl über die Flächenzunahme (NPC1a), als auch über den Einbau des Thymidinanalogons BrdU<sup>1</sup> in die DNS (NPC1b) detektiert. Plattiert man die Neurosphären auf einer extrazellulären Matrix in einem Medium ohne Wachstumsfaktoren aus, migrieren die Zellen vom Sphärenkern aus radial nach außen (NPC2) und differenzieren in Neurone (NPC3), Oligodendrozyten (NPC5) und Astrozyten. Zusätzlich wird nach 120 h auch die zellspezifische Migration der Neurone (NPC2b) und der Oligodendrozyten (NPC2c) untersucht.

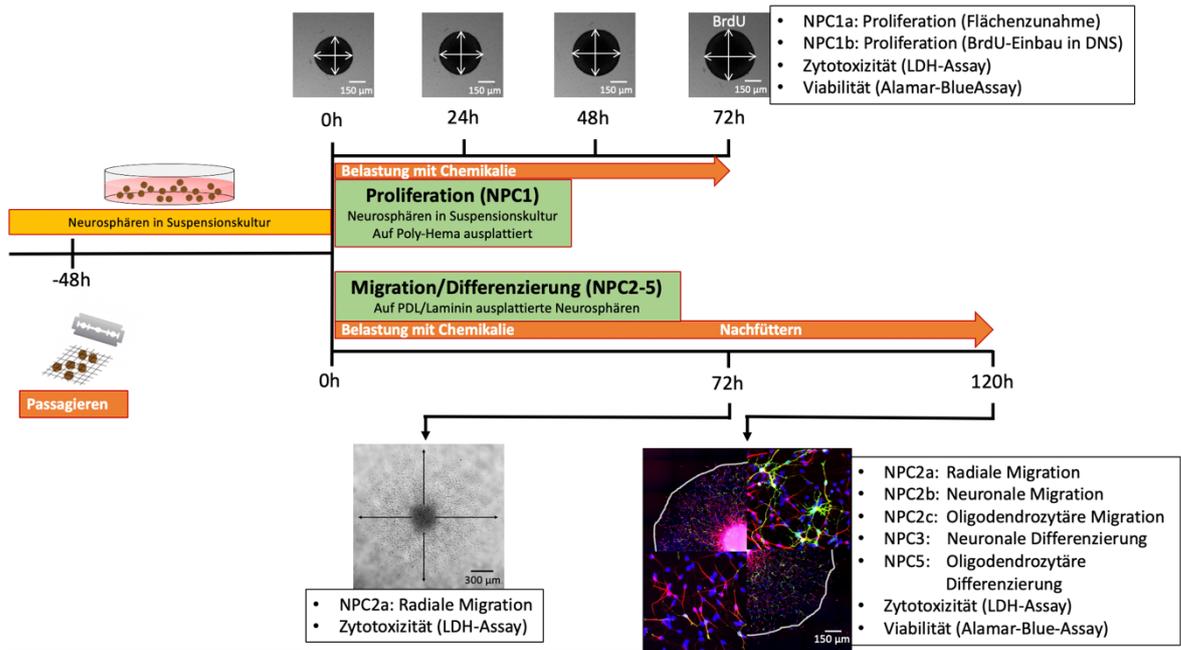
Darüber hinaus erfolgt eine Messung der Viabilität mittels Alamar-Blue-Assay und der Zytotoxizität mittels LDH<sup>2</sup>-Assay, um wahre Effekte der getesteten Substanzen von Beeinflussungen der Ergebnisse durch vermehrtes Zell-Sterben abgrenzen zu können.

In Abb. 3 ist der Ablauf des Neurosphären-Assays mit seinen Endpunktmöglichkeiten schematisch dargestellt.

---

<sup>1</sup> Bromdesoxyuridin

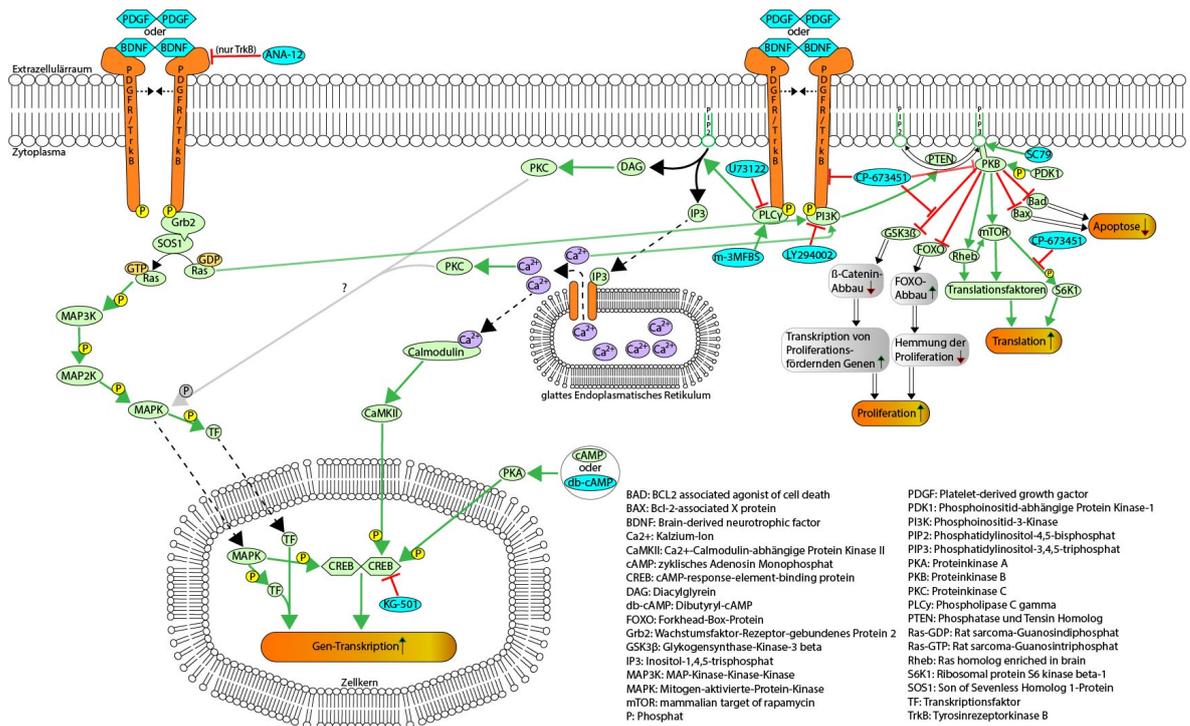
<sup>2</sup> Laktatdehydrogenase



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Neurosphären-Assays**  
 Durch mechanisches Zerkleinern 48h vor Beginn der Experimente und anschließendes erneutes Kultivieren formen sich kugelförmige Neurosphären, welche dann mit Chemikalien belastet werden. Die Zellproliferation wird über die Flächenzunahme der Neurosphären (NPC1a) und über den Einbau von BrdU (Bromdesoxyuridin) in die DNS (NPC1b) untersucht. Auf einer extrazellulären Matrix in einem Medium ohne Wachstumsfaktoren migrieren die Zellen vom Sphärenkern aus radial nach außen (NPC2) und differenzieren in Neurone (NPC3), Oligodendrozyten (NPC5;) und Astrozyten. Ebenso wird nach 120h die Migration von Neuronen (NPC2b) und Oligodendrozyten (NPC2c) detektiert. Die Zellviabilität wird durch den Alamar-Blue-Assay und zytotoxische Effekte durch Messung der Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht (LDH-Assay).

### 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung

Die in 1.1 Zelluläre Schlüsselprozesse der menschlichen Gehirnentwicklung beschriebenen Prozesse werden über multiple zelluläre Signalwege reguliert, welche über mannigfaltige Wege aktiviert, gehemmt oder anderweitig moduliert werden. Die molekularen Zielstrukturen dieser Signalwege sind häufig Transkriptions- oder Translationsfaktoren, welche konsekutiv die Genexpression beziehungsweise die Proteinbiosynthese beeinflussen. Im Folgenden, sowie in Abb. 4, sind die in dieser Arbeit untersuchten Signalwege dargestellt.



**Abb. 4: Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Signalwege**

Die Bindung extrazellulärer Liganden an Transmembran-Rezeptoren induziert den Ablauf intrazellulärer Signalkaskaden, die das Verhalten der Zelle beeinflussen. Die in der Arbeit verwendeten Aktivator und Inhibitoren bestimmter Schritte der Signalwege sind an den entsprechenden Stellen türkis hinterlegt eingezeichnet.

### PDGF (Platelet-derived Growth Factor)

PDGF<sup>3</sup> wird von Thrombozyten bei Gewebsverletzungen ausgeschüttet, um die Heilung und das Wachstum des Gewebes anzuregen (Evrova & Buschmann, 2017). Im ZNS wird PDGF unter anderem von NPCs, Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten sezerniert (Funa & Sasahara, 2014; Sil et al., 2018). Bei mehreren neurologischen Erkrankungen, darunter die Alzheimer-Krankheit, Morbus Parkinson, die Amyotrophen Laterale Sklerose und das Glioblastom spielen PDGF sowie die PDGFR-vermittelten Signalwege eine Rolle (Sil et al., 2018).

NPCs, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten exprimieren allesamt PDGF-Rezeptoren (PDGFR) an ihrer Zelloberfläche, wodurch PDGF autokrin und parakrin wirkt. PDGF-Monomere bilden funktionell aktive Dimere (Funa & Sasahara, 2014; Sil et al., 2018). Die transmembranären PDGF-Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosinkinasen, an deren extrazelluläre Domänen PDGF-Dimere binden können, was die Dimerisierung zweier Rezeptoren bewirkt (Andrae et al., 2008; P. H. Chen et al., 2013; Funa & Sasahara, 2014). Die Rezeptor-Dimerisierung führt zu einer Aktivierung durch gegenseitige Phosphorylierung der Tyrosin-Seitenketten der

<sup>3</sup> englisch für „von Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor“

intrazellulären Kinase-Domänen der Rezeptoren (Transphosphorylierung), welche dann wiederum andere Proteine, sogenannte *second-messengers*, phosphorylieren und damit aktivieren (Andrae et al., 2008; Funa & Sasahara, 2014). Zu den von den PDGFR-Tyrosinkinase aktivierten *second-messengers* zählen vor allem die PI3K<sup>4</sup>, die PLC $\gamma$ <sup>5</sup> und das kleine G-Protein Ras<sup>6</sup> (mit konsekutivem Ablauf des MAPK<sup>7</sup>-Signalweges) (Andrae et al., 2008).

Die Rollen von PDGF-vermittelten Signalen, sowie seine wachstumssteigernde Funktion ist in vielen Zelltypen gut, im menschlichen ZNS hingegen wenig untersucht. Die bisherigen Erkenntnisse stammen hauptsächlich aus *in vivo* Tierversuchen und *in vitro* Versuchen mit Nager-Zellen. PDGF-vermittelte Signale haben demnach Einfluss auf verschiedene Prozesse der ZNS-Entwicklung, unter anderem auf die „Neurogenese, zelluläres Überleben, die Synaptogenese, [...] und die Entwicklung spezifischer Neuronentypen“ (Sil et al., 2018). Hirnrindenzellen von Ratten-Embryonen können durch PDGF-Stimulation zur vermehrten Proliferation und neuronalen Differenzierung angeregt werden (Erlandsson et al., 2001). Der proliferationssteigernde Effekt, welcher auch bei hippocampalen NPCs von Ratten zu beobachten ist (Yao et al., 2012), wird unter anderem durch die PDGFR-abhängige Aktivierung des MAPK-Signalweges begründet (Chao et al., 2014). PDGF hat eine neuroprotektive Wirkung: Neurone in PDGF-Knockout-Mäusen weisen eine erhöhte Zelltod-Rate auf (Tang et al., 2010). Auch auf menschliche Neuroblastomzellen und hippocampale Ratten-Zellen wirkt PDGF protektiv, was sich auf eine vermehrte Aktivität des PI3K-PKB-Signalweges zurückführen lässt (Peng et al., 2008; S. X. L. Zhang et al., 2003).

Bereits 1988 konnte an primären Gliavorläuferzellen aus der Ratte, sowie 2008 anhand von humanen fetalen neuronalen Precursorzellen gezeigt werden, dass PDGF eine Rolle bei der Differenzierung zu Oligodendrozyten, Astrozyten und in humanen neuronalen Precursorzellen auch zu Neuronen spielt (Chojnacki et al., 2008; Richardson et al., 1988). Aus Versuchen mit Oligodendrozyten-Vorläuferzellen von Ratten ist bekannt, dass PDGF über den MAPK-Signalweg eine Reorganisation des Zytoskeletts anregt und auf diese Weise zu einer vermehrten Zellmigration führt (Singh et al., 2019).

---

<sup>4</sup> Phosphoinositid-3-Kinase

<sup>5</sup> Phospholipase C *gamma*

<sup>6</sup> Rat sarcoma

<sup>7</sup> Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase, auch ERK genannt

Aus Studien mit Knockout-Mäusen weiß man, dass PDGF und der MAPK-Signalweg für die Oligodendrozyten-Entwicklung und -Proliferation essentiell sind und dass hier auftretende Störungen zu einer pathologischen Hypomyelinisierung und Neuralrohrdefekten führen können (S. H. Chung et al., 2015; Ding et al., 2004; Fruttiger et al., 1999; Murtie et al., 2005). Letztere können beim Menschen perinatale Komplikationen und körperliche und seltener auch geistige Behinderungen verursachen (Oakeshott & Hunt, 2003).

#### BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*)

Der Wachstumsfaktor BDNF ist ein sehr aktives Neurotrophin, welches unter anderem von Astrozyten und Neuronen sezerniert wird und seine Zielzellen parakrin und autokrin erreicht (Harward et al., 2016; Liu et al., 2017). Es ist – ebenso wie sein Rezeptor TrkB<sup>8</sup> – sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten ZNS verbreitet (Huang und Reichardt 2001). BDNF und TrkB-Rezeptor-assoziierte Signalwege sind relevant für strukturbildende und funktionelle Prozesse des ZNS, weshalb Beeinträchtigungen der BDNF-Signaltransduktion mit diversen neurologischen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit, Morbus Parkinson, der Amyotrophen Lateralsklerose, Chorea Huntington und Depressionen assoziiert sind (Nagahara & Tuszynski, 2011).

BDNF-Monomere bilden Dimere, welche an TrkB-Rezeptoren binden und deren Dimerisierung bewirken. Auch hier handelt es sich um Tyrosinkinase-Rezeptoren, die ihre Wirkungen vor allem über die drei bereits erwähnten intrazellulären Signalwege vermitteln (siehe 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung, Abschnitt PDGF): beginnend mit Aktivierungen von PI3K, PLC $\gamma$  und Ras (Numakawa et al., 2010).

BDNF reguliert mittels der von ihm aktivierten intrazellulären Signalkaskaden den Zellzyklus und die Differenzierung der Zielzellen (Minichiello, 2009). Einige Studien an menschlichen adulten Hirnzellen sowie *in vivo* und *in vitro* Maus- und Rattenversuche ergaben einen stimulierenden Effekt von BDNF auf die neuronale Differenzierung, die Reifung neuer Neurone (Durany et al., 2000; Gil et al., 2005; Grote et al., 2005; Lee et al., 2016; Numakawa et al., 2010; Siegel & Chauhan, 2000; Zuccato et al., 2001) und die synaptische Plastizität (Binder & Scharfman, 2004). Widersprüchlicherweise zeigte eine aktuellere *in vitro* Studie an adulten Maushippocampuszellen, dass eine Inhibierung des BDNF-Rezeptors TrkB zu einer

---

<sup>8</sup> Tropomyosin-Rezeptorkinase B

gesteigerten Neurogenese führt, was im Umkehrschluss auf einen hemmenden Einfluss von BDNF auf die Neurogenese hindeutet (Groves et al., 2019). Sowohl in Versuchen mit humanen als auch mit von Ratten stammenden Zellen hat BDNF proliferations- und migrationssteigernde Effekte: Es verstärkt die EGF<sup>9</sup>-induzierte Proliferation und Migration humaner NPCs, vermutlich über die Aktivierung des PI3K-PKB<sup>10</sup>-Signalweges (Q. Zhang et al., 2011) und fördert auch die Migration postmitotischer Neurone von Ratten (Carabalona et al., 2016) sowie die Proliferation und Migration neuraler Ratten-Stammzellen (Lee et al., 2016). Des Weiteren wird durch BDNF die Proliferationsrate sowie die Viabilität humaner aus dem Rückenmark gewonnener Astrozyten über den PI3K-PKB-Signalweg gesteigert (Tu et al., 2017; K. Zhang et al., 2017) und auch die Reifung von Maus-Astrozyten angeregt (Holt et al., 2019).

*In vivo* Maus und *in vitro* Ratten-Versuche ergaben, dass Astrozyten mittels der Sekretion von BDNF die Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten fördern, was bei der Regeneration von Defekten der weißen Substanz hilft (Miyamoto et al., 2015).

Neben dem TrkB-Rezeptor, über den BDNF die beschriebenen Signalwege induziert, gibt es noch einen weiteren, den p75-Rezeptor, mittels dessen BDNF wirkt. Dieser wird außer durch BDNF auch durch andere Neurotrophine aktiviert und interagiert in Rattenhirnzellen mit dem TrkB-Rezeptor (Bibel et al., 1999, Reichardt, 2006). Es wurde gezeigt, dass die BDNF-abhängige Aktivierung des p75-Rezeptors Mäuse-NPCs zur neuronalen Differenzierung anregt (Hosomi et al., 2003).

Im Folgenden werden die drei genannten Signalkaskaden, die vom PDGF-Rezeptor und von TrkB induziert werden, erläutert:

Die PI3K wandelt PIP<sup>2</sup><sup>11</sup>, welches sich in der Zellmembran befindet, zu PIP<sup>3</sup><sup>12</sup> um. Die PKB bindet nun an PIP<sup>3</sup> und wird somit an die Zellmembran rekrutiert. Dort kann sie unter anderem von der PDK1<sup>13</sup> phosphoryliert und somit aktiviert werden. Die nun aktive PKB phosphoryliert daraufhin verschiedene Substrate, was entweder deren Aktivierung oder Inhibierung zur Folge haben kann (Bozulic & Hemmings, 2009; Brugge et al., 2007; Salmena et al., 2008). Die PKB reguliert mittels der von ihr aktivierten und inhibierten Substrate diverse zelluläre Prozesse.

---

<sup>9</sup> Epidermaler Wachstumsfaktor

<sup>10</sup> Proteinkinase B

<sup>11</sup> Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

<sup>12</sup> Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat

<sup>13</sup> Phosphoinositid-abhängige Protein Kinase-1

Man weiß aus vielen *in vivo* und *in vitro* Nager-Versuchen, dass der PI3K-PKB-Signalweg wichtig für die Differenzierung und Proliferation von Oligodendrozyten und somit auch für die Axonmyelinisierung und posttraumatische Remyelinisierungsprozesse ist. Diese Effekte werden unter anderem über beta-Catenin vermittelt, dessen Abbau durch PKB-Signale unterdrückt wird (Pérez et al., 2013; Vallée et al., 2018). Weitere Studien zeigen eine vermehrte neuronale Differenzierung durch die PI3K (Pérez et al., 2013) und die PI3K-induzierte mTOR<sup>14</sup>-Aktivierung (Han et al., 2008). Eine wiederum andere Veröffentlichung zeigt, dass die gleichzeitige Inhibierung von PI3K und mTOR zu einer astrozytären Differenzierung führt und schlussfolgert daraus, dass der Signalweg dazu dient, den Stammzellstatus beizubehalten. Eine isolierte Hemmung von entweder der PI3K oder mTOR führe zu einer reduzierten Proliferation der NPCs (Sato et al., 2010).

Die Migration von humanen und Maus-NPCs wird durch den PI3K-PKB-Signalweg gesteigert (Pan et al., 2022; Q. Zhang et al., 2011).

Einige Substrate der aktivierten PKB mitsamt ihren zellulären Effekten sind in Abb. 4 dargestellt.

Die PLC $\gamma$  wird von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen phosphoryliert und aktiviert und spaltet daraufhin das Membranlipid PIP<sub>2</sub> in die *second-messengers* DAG<sup>15</sup> und IP<sub>3</sub><sup>16</sup>. Während DAG an der Zellmembran verbleibt und die membranständige Proteinkinase C (PKC) aktiviert, sorgt IP<sub>3</sub> durch Bindung an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren für Freisetzung von Kalzium-Ionen<sup>17</sup> aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien (Minichiello, 2009). Ca<sup>2+</sup> aktiviert die zytoplasmatische PKC und die PI3K (K. P. Huang, 1989; Nicholson-Fish et al., 2016), so dass hier eine Interaktion zwischen dem PLC $\gamma$ - und dem PI3K-PKB-Signalweg besteht. Über die PKC weiß man aus *in vivo* und *in vitro* Studien, dass ihre Hemmung die neuronale Differenzierung von Maus-NPCs steigert (García-Bernal et al., 2018). Damit im Einklang steht, dass eine Aktivierung der PLC $\gamma$  bzw. des PLC $\gamma$ -PKC-Signalweges die Proliferationsrate von adulten Ratten-NSCs<sup>18</sup> und -NPCs erhöht und durch Reduktion der Differenzierung deren Verbleib im Stammzellstatus begünstigt (Lai & Feng, 2004; Ma et al., 2009).

---

<sup>14</sup> mammalian target of rapamycin

<sup>15</sup> Diacylglycerin

<sup>16</sup> Inositol-1,4,5-trisphosphat

<sup>17</sup> Ca<sup>2+</sup>

<sup>18</sup> Neuronale Stammzellen

Ca<sup>2+</sup> bindet unter anderem an das regulatorische Protein Calmodulin, welches daraufhin die CaMKII<sup>19</sup> aktiviert. Diese aktiviert den Transkriptionsfaktor CREB<sup>20</sup> durch Phosphorylierung (Minichiello, 2009). Zwei phosphorylierte CREB-Monomere können ein Dimer bilden und die Transkription bestimmter Gene stimulieren (Böer et al., 2007). *In vivo* Maus-Versuche demonstrieren, dass CREB bereits früh in der ZNS-Entwicklung wichtig für die Differenzierung, das Überleben, die dendritische Verzweigung und die Migration von Nervenzellen ist (Díaz-Ruiz et al., 2008; Landeira et al., 2018; Xia et al., 2015). CREB ist ebenfalls für die Proliferation von Ratten-NPCs bedeutsam (Peltier et al., 2007). Funktionsstörungen von CREB können zu neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Chorea Huntington) führen (Mantamadiotis et al., 2002). Im Rahmen des Rubinstein-Taybi-Syndroms kommt es durch eine Mutation im CREB-Gen zur mentalen Retardierung der betroffenen Kinder (Roelfsema & Peters, 2007).

Darüber hinaus hat ein Anstieg der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration diverse weitere Effekte. Kalzium reguliert das Verhalten beziehungsweise die Aktivität vieler Proteine/Enzyme, wodurch es zum Beispiel die Zell-Mobilität und -Migration durch Modulieren des Zytoskeletts fördert (Rajnicek & McCaig, 1997; Tsai et al., 2015). Steigt die zytoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration über einen kritischen Schwellenwert an, kann es zum Zelltod durch Apoptose oder Autophagie kommen (Orrenius et al., 2015).

Beim MAPK-Signalweg bindet eine aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase das Protein Grb<sup>21</sup>, welches dann das Protein SOS<sup>22</sup> bindet. SOS1 kann nun inaktives Ras-GDP<sup>23</sup> in aktives Ras-GTP<sup>24</sup> umwandeln. Durch eine Phosphorylierungs-Kaskade werden im Folgenden mehrere Enzyme aktiviert, welche dann wiederum weitere aktivieren: zunächst eine MAP3K<sup>25</sup>, z.B. B-Raf, dann die MAP2K<sup>26</sup> und daraufhin die MAPK. Die MAPK phosphoryliert und aktiviert sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern verschiedene Proteine, darunter Transkriptionsfaktoren. Ein wichtiger dieser Transkriptionsfaktoren ist CREB, welcher wie oben beschrieben auch eine

---

<sup>19</sup> Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängige Protein Kinase II

<sup>20</sup> cAMP-response-element-binding protein

<sup>21</sup> Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2

<sup>22</sup> Son of Sevenless Homolog 1-Protein

<sup>23</sup> Guanosindiphosphat

<sup>24</sup> Guanosintriphosphat

<sup>25</sup> MAP-Kinase-Kinase-Kinase

<sup>26</sup> auch MEK genannt

bedeutende Zielstruktur des PLC $\gamma$ -Signalweges ist (Guo et al., 2020; Reichardt, 2006).

Viele der beschriebenen Signalwege sind in in Abb. 4 vereinfacht dargestellt. In der Realität sind sie komplexer und untereinander, sowie mit weiteren, hier nicht gezeigten Signalwegen vernetzt (Carracedo & Pandolfi, 2008). So aktiviert zum Beispiel Ras den PI3K-Signalweg (Nussinov et al., 2019) und auch eine PI3K-abhängige CREB-Aktivierung ist beschrieben (Peltier et al., 2007). Zudem besteht ein nicht eindeutig geklärter Zusammenhang zwischen der PKC- und der MAPK-Aktivität: In verschiedenen nicht-neuronalen Zelltypen wie zytotoxischen T-Zellen, Hepatozyten oder HeLa-Zellen wurden einerseits aktivitätssteigernde (via Phosphorylierung), andererseits hemmende Effekte der PKC auf die MAPK gezeigt (Hu et al., 2013; Li et al., 2016; Puente et al., 2006). Zu hNPCs fehlen bislang Daten.

#### **1.4 Ziele der Arbeit**

Nicht nur Erkenntnisse über das entwicklungsneurotoxische Potenzial vieler Chemikalien, sondern auch das Wissen über den Einfluss zellulärer Signalwege auf die ZNS-Entwicklung stammen hauptsächlich aus Tierversuchen oder *in vitro* Versuchen mit Nagerzellen (siehe 1.2 Der Neurosphären-Assay). Da die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den menschlichen Organismus, wie in 1.2 Der Neurosphären-Assay erläutert, jedoch schwach ist, bedarf es alternativer, auf humanen Zellen basierender Assays, um die Gehirnentwicklungsprozesse beim Menschen als Grundlage für die Toxizität von Chemikalien zu verstehen. Neben der mangelnden Humanrelevanz sind weitere Nachteile von Versuchen an Nagern, dass sie sehr zeit- und kostenaufwändig sind, einen hohen Tierverbrauch haben und durch hohe Variabilität in ihrer Aussage unsicher zu bewerten sind (Freires et al., 2017, Paparella et al., 2020).

Da bekannt ist, dass die in 1.1 Zelluläre Schlüsselprozesse der menschlichen Gehirnentwicklung beschriebenen basalen zellulären Prozesse in der Pathophysiologie vieler neurologischer Krankheiten eine Rolle spielen (Nagahara & Tuszynski, 2011; Sil et al., 2018), ist es notwendig die biochemischen Signalkaskaden, welche diese Schlüsselprozesse regulieren, zu verstehen, um neue diagnostische und therapeutische Ansätze entwickeln zu können (Nagahara & Tuszynski, 2011). Der für DNT-Testung entwickelte Neurosphären-Assay mit humanen primären NPCs bildet mit seinen Endpunkten Proliferation, Migration und Differenzierung drei dieser

Schlüsselprozesse ab. Daher wird er in dieser Arbeit für die Erforschung des Einflusses bestimmter Signalwege auf die ZNS-Entwicklung verwendet. Untersucht werden Signalwege, deren Relevanz für die ZNS-Entwicklung aus Tier-Modellen bekannt ist (siehe 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung) und welche bei verschiedenen Erkrankungen des ZNS eine Rolle spielen.

Daher trägt diese Arbeit zur Validierung des humanen Neurosphären-Assays und zu seiner Akzeptanz als biologische Applikationsdomäne im Rahmen der DNT-Testung bei.

Zusammengefasst werden in dieser Arbeit folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

- (1) Untersuchung des Einflusses von PDGF/PDGFR, CREB, PLC $\gamma$ , PI3K-PKB und BDNF/TrKB auf Proliferation, Migration und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen als Schlüsselprozesse der menschlichen ZNS-Entwicklung
- (2) Validierung des Neurosphären-Assays als tierversuchsfreie Methode zur Erforschung der Hirnentwicklung und als biologische Applikationsdomäne zur Untersuchung von Entwicklungsneurotoxizität mit primären humanen NPCs durch Untersuchung zellulärer Signalwege

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Stepper	Eppendorf
8-Kanalpipette, elektronisch	Integra
12-Kanalpipette (10-100 µl)	Eppendorf
Analysewaage	A200S, Olympus
Autoklav	KSG GmbH, Bioklav
Binokular	SZ51, Olympus
Cellomics Array Scan VTI HCS Reader	Thermo Fisher Scientific
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss
Gewebezerkleinerer	Mcllwain Tissue Chopper, Vibratome
Inkubatoren	HeraCell 240, 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
Pipetten (0,5-10; 10-100; 100-1000 {µl})	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank	HeraGuard, Thermo Fisher Scientific Mars Safety Class 2 SCANLAF
Tischzentrifuge	5417R, Eppendorf
Vakuumpumpe	KNF Lab, Laboport
Wärmeschrank	Memmert
Wasser-Deionisierer	Milli-Q. Millipore

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

50 ml Kulturflasche	Greiner Bio-One
8-Kammerobjektträger (Glas, unbeschichtet)	BD-Falcon
96-Well Flachbodenplatten (farblos)	Sarstedt GmbH/Greiner Bio-One
96-Well Rundbodenplatten (farblos)	Falcon
96-Well Flachbodenplatten (weiß)	Oehmen
60x15 mm Petrischalen	Greiner Bio-One
100x20 mm Petrischalen	BD Falcon
Einwegpasteurpipetten	Roth
Einwegpipetten (10; 25 {ml})	Greiner Bio-One
Eppendorf Gefäß (0,5; 1,5; 2,0; 5 {ml})	Eppendorf
Falcon Röhrchen (15; 50 {ml})	Sarstedt
Parafilm	Pechinery
Pipettenspitzen (10; 100; 1000 µl)	nerbe plus, Biozym
Pipettenspitzen (1250 µl)	Integra
Rasierklingen	Wilkinson

## 2.1.3 Materialien für zellbiologische Methoden

### 2.1.3.1 Zellen

Für diese Arbeit wurden humane NPCs der Firma Lonza Group Ltd. (Belgien) verwendet. Es wurden NPCs von zwei männlichen Individuen der GW 16 (Lot-Nr. 0000549062, 0000516385) und einem männlichen Individuum der GW 19 (Lot-Nr. 0000391398) benutzt, die aus Vollhirnhomogenaten der Feten gewonnen und kryokonserviert wurden.

### 2.1.3.2 Medien und Medienzusätze

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Invitrogen
Ham's F12	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
Phosphate-buffered saline (PBS) (+CaCl <sub>2</sub> +MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAN-Biotech

### 2.1.3.3 Kulturmedien

B27-Proliferationsmedium:	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
B27- Medium w/o (ohne Wachstumsfaktoren):	DMEM und Ham's F12 (1:3) (DMEM (1x) + GlutaMAX <sup>TM</sup> -I + 4,5 g/l D-Glucose, + Pyruvate) 1:100 N2 Supplement (100x) 1:100 Penicillin/Streptomycin (100x)
N2-Differenzierungsmedium:	DMEM und Ham's F12 (1:3) (DMEM (1x) + GlutaMAX <sup>TM</sup> -I + 4,5 g/l D-Glucose, + Pyruvate) 1:100 N2 Supplement (100x) 1:100 Penicillin/Streptomycin (100x)

### 2.1.3.4 Beschichtungsreagenzien

Poly-D-Lysin-Hydrobromid	Merck
Laminin, 1 mg/mL	Merck
Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (Poly-HEMA)	Merck

### 2.1.3.5 Immunzytochemie

Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis
-----------------------------	-----------------------

Goat Serum	Merck
Hoechst 33258	Merck
Natronlauge, 1N	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
10x PBS (-/-)	PAN-Biotech
Rabbit Serum	Thermo Fisher
Triton-X 100	Merck

Lösungen:

Paraformaldehyd-Lösung (12 %):	12 g PFA 5 Tropfen 1 N NaOH 100 ml PBS (-/-) 1x pH auf 7,4 einstellen
1x PBS (-/-):	100 ml 10x PBS (-/-) + 900 ml dH <sub>2</sub> O
PBS-T (0,5 % (v/v) Triton-X):	50 µl Triton-X 100 9,95 ml 1x PBS (-/-)
Hoechst 33258 (0,2 mg/ml)-Lösung:	10 mg/ml Hoechst 33258 Stock in DMSO (Dimethylsulfoxid) 1:50 in H <sub>2</sub> O verdünnen

**Tabelle 1: Antikörper für immunzytochemische Färbungen**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-beta III Tubulin antibody [EP1569Y] (Alexa Fluor® 647) (primärer Antikörper)	1:80	Abcam
Oligodendrocyte Marker O4 Antibody (primärer Antikörper)	1:80	R&D Systems
Goat anti-Mouse IgM Alexa Fluor 488 (sekundärer Antikörper)	1:80	Thermo Fisher

**2.1.3.6 BrdU Zell-Proliferationstest**

Akkutase	PAA
Cell Proliferation Elisa, BrdU (chemilumineszent)	Roche (#11669915001)

**2.1.3.7 Alamar-Blue-Viabilitätsbestimmung**

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega (#G8081)
--------------------------------------	------------------

### 2.1.3.8 LDH-Zytotoxizitätsbestimmung

CytoToxOne Homogenous Membrane

Promega (#G7891)

Integrity Assay

### 2.1.3.9 Substanzen für zelluläre Belastungen

**Tabelle 2: Substanzen für zelluläre Belastungen in NPC1ab und in NPC2-5**

Die Konzentrationsangaben sind auf zwei beziehungsweise drei Nachkommastellen gerundet.

Substanz	CAS- Nummer	Stock-Kon- zentration und Lö- sungsmit- tel	Belas- tungskon- zentratio- nen	Hersteller
ANA-12	219766-25-3	20 mM in DMSO	Angaben in $\mu\text{M}$ : 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041	Merck
BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)	218441-99-7	0,93 $\mu\text{M}$ in BSA/DPBS	Angaben in nM: 18,6; 6,2; 2,07; 0,69; 0,23; 0,077; 0,026	Thermo- Fischer
CP-673451	343787-29-1	20 mM in DMSO	Angaben in $\mu\text{M}$ :  Für NPC1ab: 5; 1,67; 0,56; 0,19; 0,062; 0,021; 0,007  Für NPC2-5: 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041; 0,014	Selleckchem

db-cAMP	16980-89-5	30 mM in Medium	Angaben in mM: 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041; 0,014	Merck
hPDGF-A (human Platelet-derived neu- rotrophic factor A)		0,34 $\mu$ M in 4mM Hcl	Angaben in nM: 3,4; 1,13; 0,38; 0,13; 0,042; 0,014; 0,005	R&D Systems
KG-501	18228-17-6	30 mM in DMSO	Angaben in $\mu$ M:  Für NPC1ab: 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041  Für NPC2-5: 3; 1; 0,33; 0,11; 0,037; 0,012; 0,004	Selleckchem
LY294002	154447-36-6	10 mM in DMSO	Angaben in $\mu$ M: 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041; 0,014	Adooq Bioscienc
m-3M3FBS	200933-14-8	30 mM in DMSO	Angaben in $\mu$ M: 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041	Merck

SC79	305834791	20 mM in DMSO	Angaben in $\mu\text{M}$ : 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041; 0,014	Merck Millipore
U73122	112648-68-7	5 mM in DMSO	Angaben in $\mu\text{M}$ : 5; 1,67; 0,56; 0,19; 0,062; 0,021; 0,007	Merck

## 2.1.4 Verwendete Softwares

Tabelle 3: Verwendete Software-Versionen und deren Verwendungszweck in dieser Arbeit

Software	Version	Verwendungszweck
<b>CellomicsScan</b>	<b>6.6.3</b>	Automatisierte Bildaufnahme, Quantifizierung der Zellkerne
<b>Excel</b>	Microsoft 2019	Auswertung der Daten, Berechnungen
<b>GraphPad Prism</b> (GraphPad Software, San Diego, California USA, <a href="http://www.graphpad.com">www.graphpad.com</a> )	8.0 für Windows	Statistische Analyse, Darstellung der Daten
<b>Icontrol (Tecan Reader)</b>	3.22	Messung der Lumineszenz und Fluoreszenz von Mikroplatten
<b>ImageJ</b>	1.52p	Auswertung
<b>Omnisphero</b> (Schmuck et al., 2017), weiterentwickelt von Nils Förster (Ruhr Universität Bochum) und Eike Keßel	38 und neuere	Auswertung der Bilder der immunzytochemischen Färbungen
<b>Adobe Illustrator 2020</b>	24.1	Erstellung von Abbildungen und Schemata
<b>Spot Advanced</b>	4.6.4.8	Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop

<b>Word</b>	Microsoft 2019	Textbearbeitung
-------------	-------------------	-----------------

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Beschichtungen

Da die verschiedenen Kultivierungsbedingungen jeweils bestimmte Oberflächeneigenschaften der Kultur- und Versuchsgefäße verlangen, wurden zwei Beschichtungen verwendet.

#### 2.2.1.1 Beschichtung mit Poly-HEMA

Poly-HEMA<sup>27</sup> ist ein Polymer, welches in Verbindung mit Wasser ein Hydrogel bildet. Als solches verfügt es über anti-adhärenente Eigenschaften und verhindert dadurch ein Absetzen der Neurosphären auf dem Boden von Petrischalen oder Multiwell-Platten.

Für diese Arbeit wurden die Petrischalen, in denen die Neurosphären kultiviert wurden, sowie die 96-Well-Rundboden-Platten für den NPC1ab-Assay mit Poly-HEMA beschichtet. Die Poly-HEMA Lösung wurde aus 1,2 g Poly-HEMA, 39,5 ml 96-prozentigem (vol/vol) Ethanol und 0,5 ml sterilem Wasser hergestellt, anschließend für fünf bis 16 Stunden auf einem Magnetrührer gerührt und bis zu zwei Monate lang bei 4 °C gelagert.

Für die Beschichtung von 100 mm x 20 mm messenden Petrischalen und 96-Well-Rundbodenplatten wurden 3 ml Poly-Hema-Lösung pro Schale beziehungsweise 25 µl Poly-Hema-Lösung pro Well gleichmäßig verteilt. Daraufhin wurden die Gefäße ohne Deckel für 3 bis 16 Stunden unter einer Sterilbank gelagert, bis das Ethanol vollständig verdampft war. Bis zur Benutzung wurden die beschichteten Petrischalen und Platten im Dunkeln für bis zu 14 Tage gelagert.

#### 2.2.1.2 Beschichtung mit PDL und Laminin

Um die Migration und Differenzierung der hNPCs zu gewährleisten, bedarf es einer extrazellulären Matrix. Dafür wurden 8-Kammerobjektträger und 96-Well-Flachboden-Platten mit PDL<sup>28</sup> und Laminin beschichtet. Die bei den im Folgenden beschriebenen Schritten verwendeten Volumina sind Tabelle 4 zu entnehmen. Zuerst wurde in jede Kammer/jedes Well auf 37 °C vorgewärmtes PDL gegeben, woraufhin die Objektträger/die Platten bei 37 °C für eine Stunde inkubiert wurden. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Oberfläche mit sterilem destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gewaschen. Im Folgenden wurde verdünntes Laminin (1:80 in dH<sub>2</sub>O) auf die

---

<sup>27</sup> Poly(2-hydroxyethylmethacrylat)

<sup>28</sup> Poly-D-Lysin

Kammern/in die Wells gegeben und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die Objektträger/Platten konnten dann entweder sofort verwendet oder bei 4 °C für maximal 7 Tage gelagert werden. Die Kammern/Wells wurden vor dem Verwenden zunächst mit dH<sub>2</sub>O und dann mit sterilem PBS (+/+) gewaschen.

**Tabelle 4: Volumina für die Beschichtung mit PDL und Laminin**

	96-Well-Flachbodenplatten	8-Kammerobjektträger
PDL	50 µl	250 µl
Laminin (1:80 in dH <sub>2</sub> O)	50 µl	250 µl
Steriles dH <sub>2</sub> O	100 µl	500 µl
Steriles PBS (-/-)	100 µl	500 µl

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.1 Revitalisierung und Kultivierung kryokonservierter humaner neuraler Progenitorzellen

Zur Vorbereitung der Revitalisierung der kryokonservierten hNPCs wurde das Kulturmedium B27 mit humanem FGF<sup>29</sup> (20 ng/ml) angereichert. Davon wurden je 10 ml in drei mit Poly-Hema beschichteten (siehe 2.2.1.1 Beschichtung mit Poly-HEMA) 100 mm x 20 mm Petrischalen und 30 ml in eine 50 ml Kulturflasche gefüllt und für mindestens eine Stunde auf 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriert. Zunächst wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten hNPCs unter sterilen Bedingungen entlüftet und aufgetaut. Letzteres geschah durch wiederholtes Auf- und Ab-Pipettieren von 500-1000 µl B27-Proliferationsmedium. Der Auftauprozess erfolgte zügig, da der hohe DMSO-Gehalt des Einfriermediums zytotoxisch wirken kann. Daher wurde die aufgetaute Zellsuspension in die vorbereitete Kulturflasche gegeben und das Einfriermedium somit verdünnt. Die Suspension wurde anschließend vorsichtig mit einer 10 ml Stabpipette re-suspendiert und jeweils 10 ml in die vorbereiteten Petrischalen übertragen. Die Zellen wurden vier Wochen lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei alle zwei bis drei Tage die Hälfte des Mediums durch frisches, auf 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriertes B27-Proliferationsmedium ausgetauscht wurde. Das abgenommene Medium wurde in einer separaten Petrischale gesammelt und für zwei bis drei Tage kultiviert. Die Neurosphären, die sich darin gebildet hatten, wurden wieder in die ursprüngliche Petrischale transferiert, um den Verlust an

<sup>29</sup> Fibroblasten-Wachstumsfaktor

Zellmaterial durch den Wechsel des Mediums gering zu halten. Die Poly-Hema-Beschichtung verhinderte das Absetzen und Ausdifferenzieren der Neurosphären am Schalenboden.

Als Qualitätskontrolle wurden 24 Stunden nach dem Auftauen 25 µl der Zellsuspension auf einen mit PDL und Laminin beschichteten 8-Kammerobjektträger (siehe 2.2.1.2 Beschichtung mit PDL und Laminin) in 500 µl N2-Differenzierungsmedium gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Anteil der differenzierenden Zellen an der Gesamtzellanzahl bestimmt. Lag dieser bei mindestens 70 %, wurde die Kultivierung fortgeführt.

### **2.2.2.2 Passagieren der Neurosphären**

Um zu verhindern, dass die Neurosphären zu groß (> 0,7 mm) und die innenliegenden Zellen dadurch von der Nährstoffzufuhr abgeschnitten werden, wurden sie einmal wöchentlich mechanisch passagiert (gechoppt). So gelang es, die hNPCs zur Proliferation und die Sphären zur Expansion anzuregen. Hierfür wurden sie zunächst mit einer Einwegpasteurpipette in möglichst wenig B27-Proliferationsmedium aufgenommen und mittig in den Deckel einer 60 mm x 15 mm Petrischale platziert. Mit einer 100 µl Pipette wurde überschüssiges Medium verworfen und der Deckel in einen Gewebe-Zerkleinerer eingespannt, welcher die Neurosphären mit einer Rasierklinge auf die eingestellte Größe zerkleinerte. Um zu Beginn der Experimente den gewünschten Sphären-Durchmesser von 0,3 mm zu erreichen wurden die Zellen entweder drei Tage vorher auf 0,15 mm, zwei Tage vorher auf 0,2 mm oder einen Tag vorher auf 0,25 mm gechoppt. Die gechoppten Sphären wurden daraufhin in 1 ml B27-Proliferationsmedium re-suspendiert und die Zellsuspension auf eine von der Zelldichte abhängige Anzahl an mit Poly-Hema beschichteten (siehe 2.2.1.1 Beschichtung mit Poly-HEMA) 100 mm x 20 mm Petrischalen verteilt, welche jeweils 20 ml auf 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriertes B27-Proliferationsmedium enthielten.

### **2.2.3 Neurosphären-Assay**

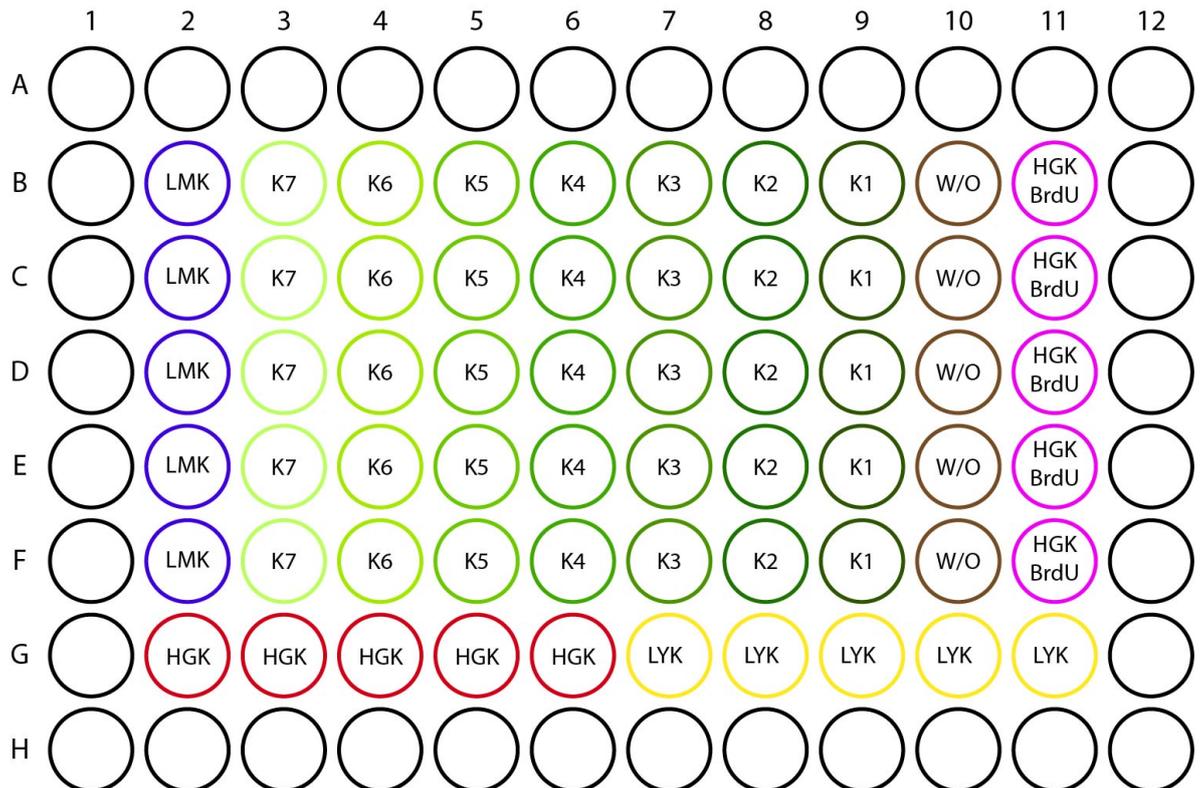
Der Neurosphären-Assay kann mit seinen Endpunkten Zell-Proliferation, -Migration und -Differenzierung in Neurone und Oligodendrozyten basale Prozesse der Gehirnentwicklung abbilden und wurde daher in dieser Arbeit für die Untersuchung des Einflusses bestimmter Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege auf die Entwicklung des ZNS genutzt. Dafür wurden primäre humane Neurosphären mit einem

Durchmesser von 0,3 mm verwendet. Die Experimente wurden auf 96-Well-Platten mit je fünf technischen Replikaten pro Belastungs- und Kontrollbedingung durchgeführt.

### **2.2.3.1 Untersuchungen unter proliferierenden Bedingungen**

Für die Untersuchung des Einflusses der Substanzen auf die Zellproliferation wurden 96-Well-Rundbodenplatten verwendet, die zuvor mit Poly-HEMA beschichtet wurden (siehe 2.2.1.1 Beschichtung mit Poly-HEMA), um ein Adhären der Sphären am Wellboden zu verhindern. Pro Well wurden 100 µl der jeweiligen Belastungs-/Kontrolllösung vorgelegt und daraufhin je eine 0,3 mm durchmessende Neurosphäre in die Wells übertragen. Der Durchmesser der Neurosphären wurde mithilfe des integrierten Maßstabes eines Lichtmikroskops ermittelt. Pro Platte wurde eine Substanz, welche die Signalwege modulieren sollte, getestet (siehe Tabelle 2). In allen Wells (außer in der Positivkontrolle, siehe weiter unten und Abb. 5) wurden die Zellen in B27-Proliferationsmedium für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Substanzen wurden für die Belastungsbedingungen auf die in der Tabelle 2 angegebenen jeweils sieben verschiedenen Konzentrationen in B27-Proliferationsmedium verdünnt. Die Konzentration des jeweiligen Lösungsmittels wurde in allen Belastungsbedingungen einer Platte gleich gehalten, damit ein möglicher zellulärer Effekt des Lösungsmittels beim Vergleich der verschiedenen Bedingungen nicht einen Effekt der Substanz vortäuscht. Zusätzlich zu den sieben Belastungskonzentrationen wurde eine Lösungsmittelkontrolle (LMK) geführt, welche neben dem B27-Proliferationsmedium nur das jeweilige Lösungsmittel der Substanz, jedoch nicht die Substanz selbst enthielt. Als Positivkontrolle wurden fünf technische Replikate in B27-Medium w/o (ohne die Wachstumsfaktoren EGF und FGF) inkubiert. Hier wurde keine, beziehungsweise nur eine sehr geringe Proliferation erwartet. Für den BrdU-Assay wurde eine Hintergrundkontrolle (HGK BrdU) mit derselben Lösung wie die der LMK mitgeführt, in welche als einzige an Tag 2 kein BrdU-Labeling gegeben wurde (siehe 2.2.3.1.2 Untersuchung der Proliferation über die Messung des BrdU-Einbaus in die DNS (NPC1b)). Um zwischen zytotoxischen und spezifischen Effekten der jeweiligen Substanz zu unterscheiden, wurde am letzten Tag des Experiments mithilfe des LDH-Assays die Zytotoxizität und mittels des Alamar-Blue-Assays die Aktivität der mitochondrialen Reduktase als Indikator für die Zellviabilität gemessen. Hierfür wurde als Positivkontrolle eine sogenannte Lysekontrolle (LYK) mitgeführt, in welcher die Zellen 2 h 45 min vor Beendigung des Versuches mit

Triton-X 100 lysiert wurden (siehe 2.2.3.3.1 Der Alamar-Blue-Assay und 2.2.3.3.2 Der LDH-Assay). Als Hintergrundkontrolle (HGK) für die Zytotoxizitäts- und Viabilitäts-Messung wurde in fünf Wells nur die LMK-Lösung, aber keine Neurosphäre gegeben. Die randständigen Wells der Platte erhielten weder Medium noch Sphären und wurden, um einem verdunstungs-bedingten Flüssigkeitsverlust der anderen Wells entgegenzuwirken, mit sterilem dH<sub>2</sub>O belegt. Das Belegungsschema der Platten ist in Abb. 5 dargestellt.



**Abb. 5: Belegungsschema zur Untersuchung des Einflusses Signalweg-modulierender Substanzen unter proliferierenden Bedingungen (NPC1ab)**

Die 96-Well-Rundbodenplatten wurden zuvor mit Poly-Hema beschichtet. In jedes Well wurden 100 µl einer Kontroll- bzw. Belastungslösung und anschließend je eine Neurosphäre (außer in die Hintergrundkontrolle = HGK) gegeben. Die nicht beschrifteten äußeren Wells enthielten 100 µl steriles dH<sub>2</sub>O. Die zu testende Substanz wurde in einer 1:3-Verdünnungsreihe in sieben verschiedenen Konzentrationen in B27-Proliferationsmedium verdünnt. K1 stellt die höchste, K7 die niedrigste Substanz-Konzentration dar. HGK BrdU = Hintergrundkontrolle BrdU; LMK = Lösungsmittelkontrolle; LYK = Lysekontrolle; W/O = B27-Medium ohne Wachstumsfaktoren. Für jede Bedingung wurden fünf technische Replikate verwendet.

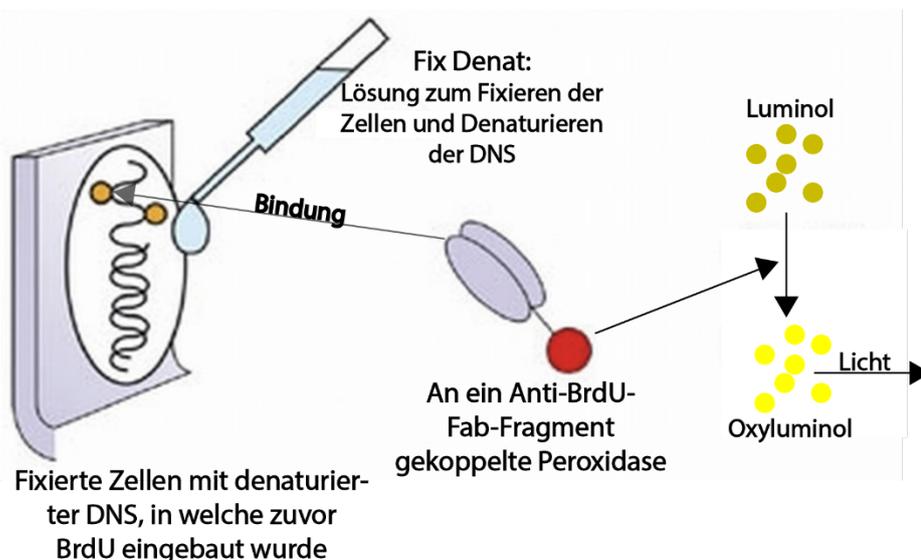
### 2.2.3.1.1 Untersuchung der Proliferation über die Messung der Flächenzunahme (NPC1a)

Basierend auf der Annahme, dass eine Neurosphäre an Größe zunimmt, wenn sich die primären hNPCs vervielfältigen, wurden an Tag 0, 1, 2 und 3 des Experimentes mit einem automatisierten Lichtmikroskop (Cellomics Array Scan VTI HSC Reader) Bilder der Sphären gemacht und durch die Software die Sphärenfläche berechnet. Aus den sich zeitabhängig verändernden Sphärenflächen wurde eine

Wachstumsgerade generiert, deren Steigung auf die Proliferationsaktivität schließen ließ und mögliche Proliferationseffekte der eingesetzten Substanzen detektierte.

### 2.2.3.1.2 Untersuchung der Proliferation über die Messung des BrdU-Einbaus in die DNS (NPC1b)

Zusätzlich zur oben beschriebenen Messung der Flächenzunahme wurde die Zellvermehrung mittels des BrdU-Assays direkt auf DNS-Ebene untersucht. Dafür wurde das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) ins Zellmedium gegeben und von den Zellen während der DNS-Synthese-Phase der Zellteilungen anstelle von Thymidin in die DNS eingebaut. Dieses konnte durch Bindung eines gegen BrdU gerichteten Antikörper-Fab-Fragments und eine an dieses gekoppelte Peroxidase mittels Chemilumineszenz-Messung nachgewiesen werden. Die Lumineszenz entsteht durch Umsetzung des Substrats Luminol in Oxyluminol durch die Peroxidase und ist proportional zur Menge des eingebauten BrdUs (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: Prinzip des BrdU-Assays zur Messung der Proliferationsrate**

BrdU wird anstelle von Thymidin in die DNS sich teilender Zellen eingebaut und nach Fixieren der Zellen und Denaturieren der DNS mit einem Anti-BrdU-Fab-Fragment markiert. Die daran gekoppelte Peroxidase setzt das zugegebene Substrat Luminol zu lumineszierendem und somit messbarem Oxyluminol um (modifiziert nach <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cell-pro-ro>; merck, CELLPRO-RO Roche, Zellproliferationsreagenz, Cell Proliferation Reagent WST-1, Stand 17.01.2020)

In alle Wells, außer in die des BrdU-Hintergrundes, wurden 18 Stunden vor Ende des Versuches je 10 µl der BrdU-Färbelösung (1:100 in B27 w/o verdünnt) gegeben. Der BrdU-Hintergrund erhielt zum Volumenausgleich 10 µl reines B27 w/o.

Nach 16 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden zunächst ein Alamar-Blue-Assay (siehe 2.2.3.3.1 Der Alamar-Blue-Assay) und ein LDH-Assay (siehe

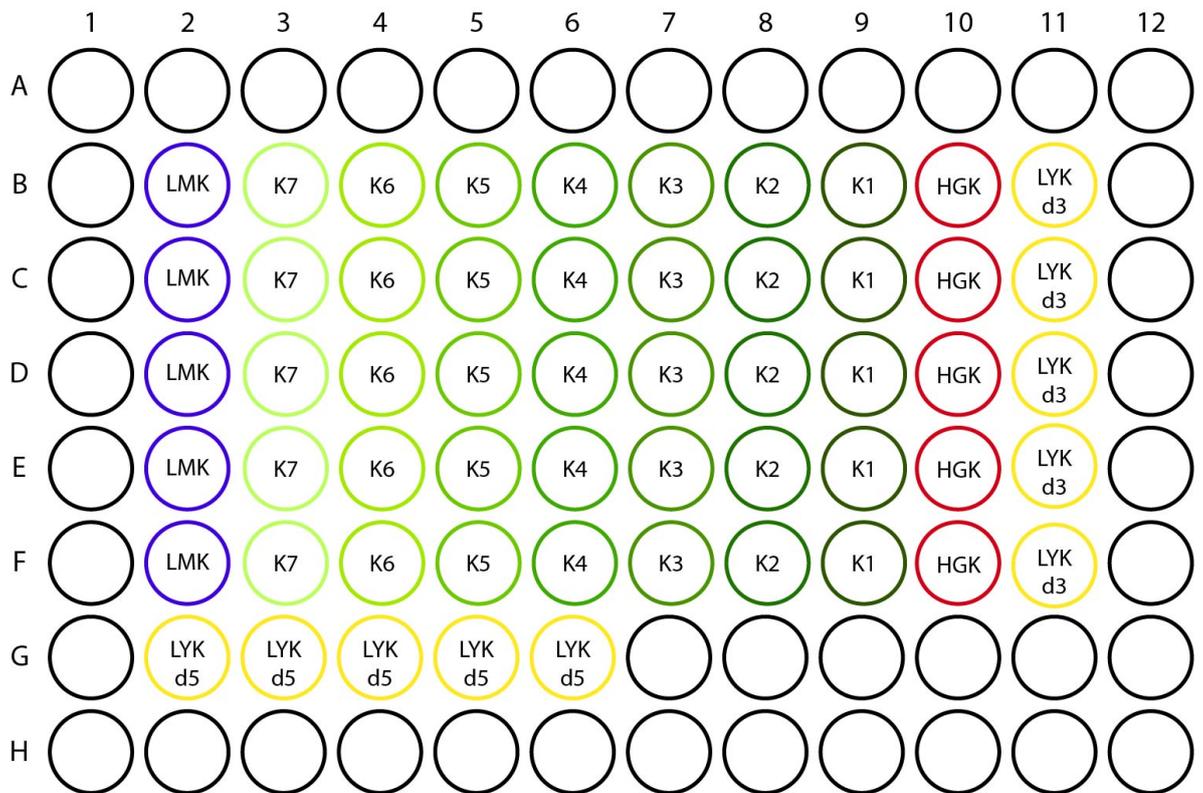
2.2.3.3.2 Der LDH-Assay) durchgeführt. Anschließend wurden die Sphären jeweils mitsamt 10 µl Medium in eine weiße 96-Well-Flachboden-Platte mit 25 µl vorgewärmter Akkutase übertragen.

Damit die Akkutase die interzellulären Verbindungen trennen konnte, wurden die Sphären für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach durch mehrfaches Auf- und Ab-Pipettieren der Lösung vereinzelt. Mithilfe eines Haartrockners wurden die Platten für etwa 15 bis 20 Minuten getrocknet und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Fix Denat Lösung pro Well am Boden der Wells fixiert und die DNS denaturiert. Nach 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) im Dunklen wurde die Fix Denat Lösung verworfen und 100 µl der Anti-BrdU-Peroxidase-Arbeitslösung (1:100 Anti-BrdU-Peroxidase Stock Solution in Antibody Dilution Solution) auf die Wells gegeben. Der Antikörper konnte während weiterer eineinhalb Stunden Inkubation bei RT im Dunklen an das in die DNS eingebaute BrdU binden. Anschließend wurden die Wells dreimal mit je 200 µl eines Waschpuffers (1:10 in dH<sub>2</sub>O) gewaschen, daraufhin mit 100 µl der Substrat-Lösung (1:400 Substratkomponente B in Substratkomponente A) für 10 Minuten abgedunkelt bei RT inkubiert und schließlich die Lumineszenz mit einem Multimode Mikroplattenleser gemessen.

### **2.2.3.2 Untersuchungen unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)**

Entzieht man Neurosphären durch Kultivierung in N2-Differenzierungsmedium die Wachstumsfaktoren und platziert sie mittig auf einer extrazellulären Matrix, so adhären sie an dieser Matrix und die Zellen beginnen, vom Sphärenkern aus radial nach außen zu migrieren und in Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten zu differenzieren. Dafür wurden mit PDL/Laminin beschichtete 96-Well-Flachbodenplatten (siehe 2.2.1.2 Beschichtung mit PDL und Laminin) verwendet und je 100 µl der entsprechenden Belastungs-/Kontrolllösung vorgelegt. Pro Platte wurde eine Substanz in jeweils sieben Konzentrationen, verdünnt in N2-Differenzierungsmedium, getestet (siehe Tabelle 2). Die Konzentration des Lösungsmittels der jeweiligen Substanz wurde in allen Bedingungen gleichgehalten. Zusätzlich zu den Belastungslösungen wurde eine Lösungsmittelkontrolle geführt, die neben dem N2-Differenzierungsmedium nur das Lösungsmittel der jeweiligen Substanz, nicht aber die Substanz selbst enthielt. Darüber hinaus wurde eine Lysekontrolle für den LDH-Assay nach drei Tagen, eine Lysekontrolle für den LDH- und den Alamar-Blue-Assay nach fünf Tagen, sowie eine Hintergrundkontrolle für die genannten Assays

mitgeführt. Die randständigen Wells der Platte wurden mit sterilem dH<sub>2</sub>O belegt. Alle Bedingungen und Kontrollen wurden in je fünf technischen Replikaten getestet. Das Belegungsschema ist in Abb. 7 dargestellt.



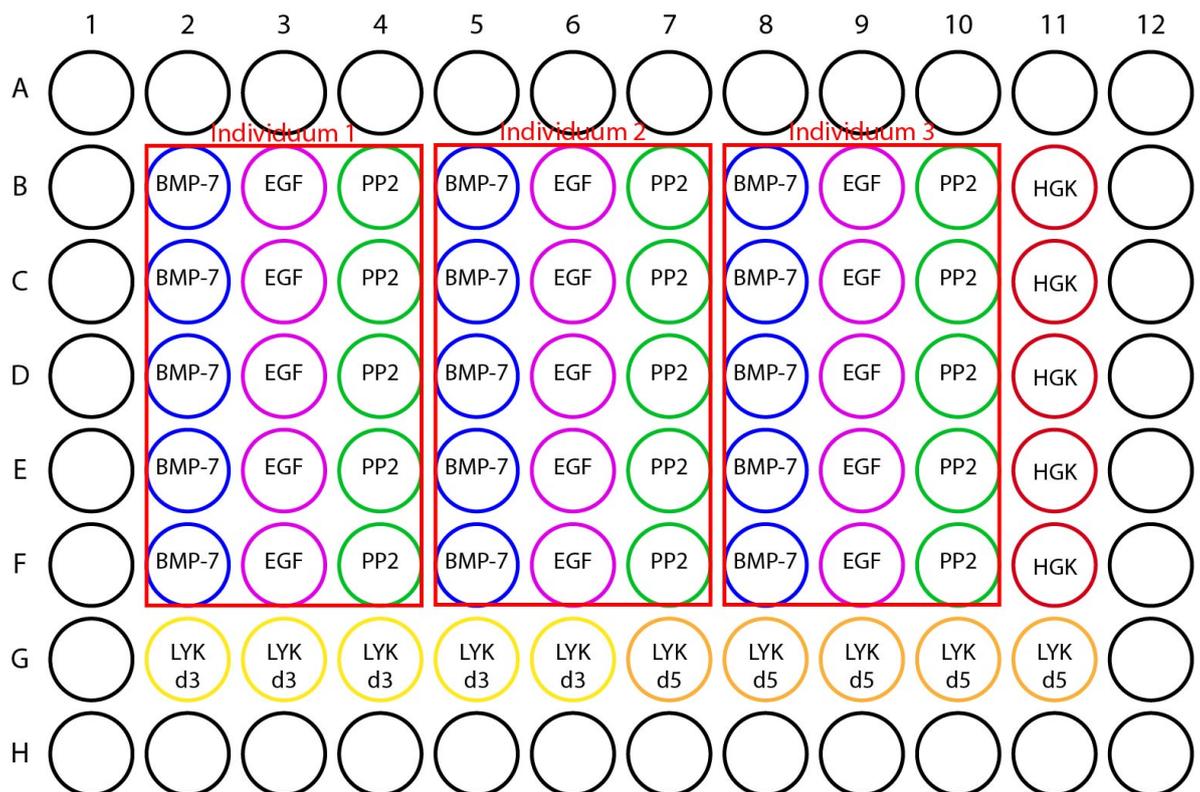
**Abb. 7: Belegungsschema zur Untersuchung des Einflusses Signalweg-modulierender Substanzen unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)**

In jedes Well der zuvor mit PDL/Laminin beschichteten 96-Well-Flachbodenplatten wurden 100 µl der Kontroll- bzw. Belastungslösung und anschließend je eine Neurosphäre (außer in die Hintergrundkontrolle = HGK) gegeben. Die äußeren Wells enthielten 100 µl steriles dH<sub>2</sub>O. Die zu testende Substanz wurde in einer 1:3-Verdünnungsreihe in sieben verschiedenen Konzentrationen in N2-Differenzierungsmedium verdünnt. K1 stellt die höchste, K7 die niedrigste Substanz-Konzentration dar. LMK = Lösungsmittelkontrolle; LYK = Lysekontrolle (d3/d5: für den LDH-/ Alamar-Blue-Assay Assay nach drei/fünf Tagen). Für jede Bedingung wurden fünf technische Replikate verwendet.

Sphären mit einer Größe von 0,3 mm wurden mit einer 100 µl Pipette aus der Suspensionskultur in eine andere mit auf 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriertem N2-Differenzierungsmedium gefüllte Petrischale (je nach Sphärenanzahl 100 mm x 20 mm oder 60 mm x 15 mm Größe) vorsortiert. Dies diente dem Abwaschen proliferationsfördernden und differenzierungshemmenden B27-Proliferationsmediums, sowie überschüssigen Zellmaterials. Im Folgenden wurde je eine der vorsortierten Neurosphären mit einer auf 2,5 µl eingestellten 10 µl Pipette in ein Well übertragen. Nach dem Ausplattieren wurden die Platten fünf Tage lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei nach drei Tagen die Hälfte der Belastungslösung ersetzt wurde. Das hierbei abgenommene Medium wurde für einen LDH-Assay verwendet (siehe 2.2.3.3.2 Der LDH-Assay). Zum Nachfüttern wurden für die einzelnen Wells die

gleichen Belastungs-/Kontrollkonzentrationen wie zu Beginn des Experimentes verwendet. An Tag 5 wurde ein Alamar-Blue-Assay und erneut ein LDH-Assay durchgeführt und die Zellen anschließend für 30 Minuten mit 4 % PFA<sup>30</sup> fixiert (siehe 2.2.3.2.2 Immunzytochemische Färbungen zur Differenzierungs- und Migrationsanalyse).

Zu jeder Passage und jedem Individuum wurden außerdem endpunktspezifische Kontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle für den Endpunkt Migration wurden 10 µM PP2, ein src Kinase Inhibitor, welcher durch Hemmung des src-Signalweges die Migration reduziert, verwendet (Moors et al., 2007). Der Epitheliale Wachstumsfaktor (EGF) hemmt die neuronale Differenzierung und diente in einer Konzentration von 0,02 µg/ml (Ayuso-Sacido et al., 2010) als Positivkontrolle für diesen Endpunkt. BMP-7 hemmt die Differenzierung zu Oligodendrozyten (Gao et al., 2006), weshalb es in dieser Arbeit als Positivkontrolle dieses Endpunktes verwendet wurde (Konzentration 0,1 µg/ml). Das Schema der Kontrollplatte ist in Abb. 8 veranschaulicht.



**Abb. 8: Belegungsschema der Kontrollplatte zur Untersuchung zellulärer Effekte unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)**

Die 96-Well-Flachbodenplatten wurden zuvor mit PDL/Laminin beschichtet. In jedes Well wurden 100 µl Lösung und anschließend je eine Neurosphäre (außer in die Hintergrundkontrolle = HGK) gegeben. Die äußeren Wells enthielten 100 µl steriles dH<sub>2</sub>O. Die Kontrollsubstanzen BMP-7, EGF und PP2 wurden in N2-Differenzierungsmedium verdünnt. Jedes Individuum wurde mit jeder Kontrollsubstanz in je fünf technischen Replikaten kontrolliert. Die Lysekontrolle (LYK; d3/d5: für den

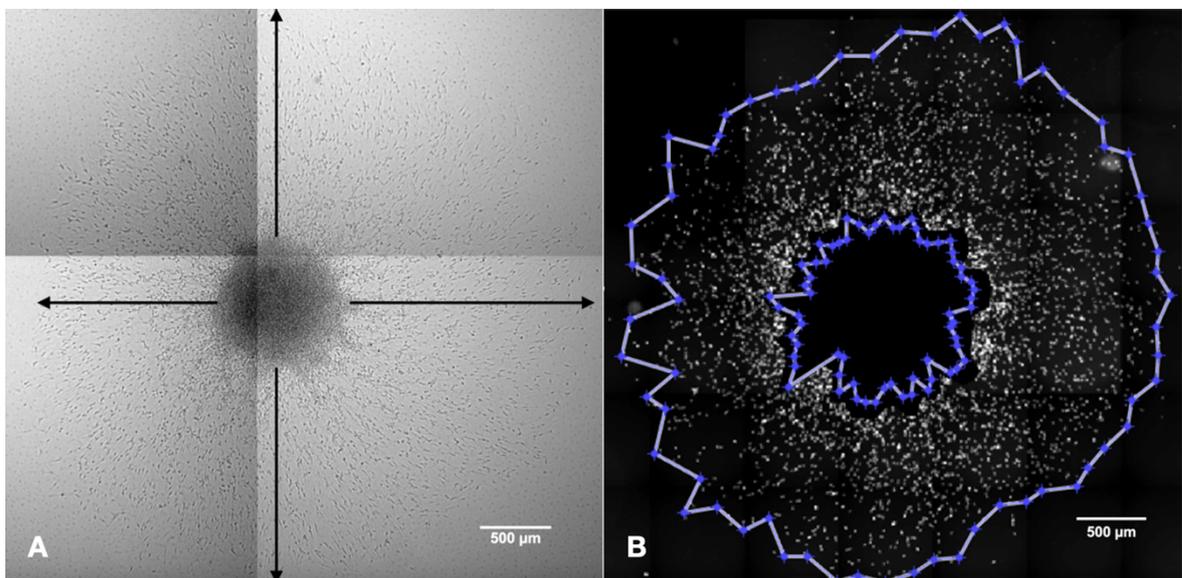
<sup>30</sup> Paraformaldehyd

LDH-/Alamar-Blue-Assay nach drei/fünf Tagen) enthielt Neurosphären verschiedener Individuen. LMK = Lösungsmittelkontrolle.

### 2.2.3.2.1 Untersuchung der Zellmigration (NPC2)

Um die Migrationsstrecken der Zellen zu messen, wurden nach drei Tagen mit dem Cellomics Array Scan VTI HSC Reader lichtmikroskopische Bilder der Neurosphären angefertigt. Die Migrationsstrecke wurde manuell mit dem Programm Image J gemessen, indem in vier Richtungen vom Rand des Sphärenkerns ausgehend die Distanz zu der am weitesten migrierten Zelle gemessen wurde (siehe Abb. 9A).

Nach fünf Tagen erfolgte eine weitere Analyse der Migrationsdistanz durch das Programm Omnisphero (siehe Abb. 9B), basierend auf der Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33258 (siehe 2.2.3.2.2 Immunzytochemische Färbungen zur Differenzierungs- und Migrationsanalyse).



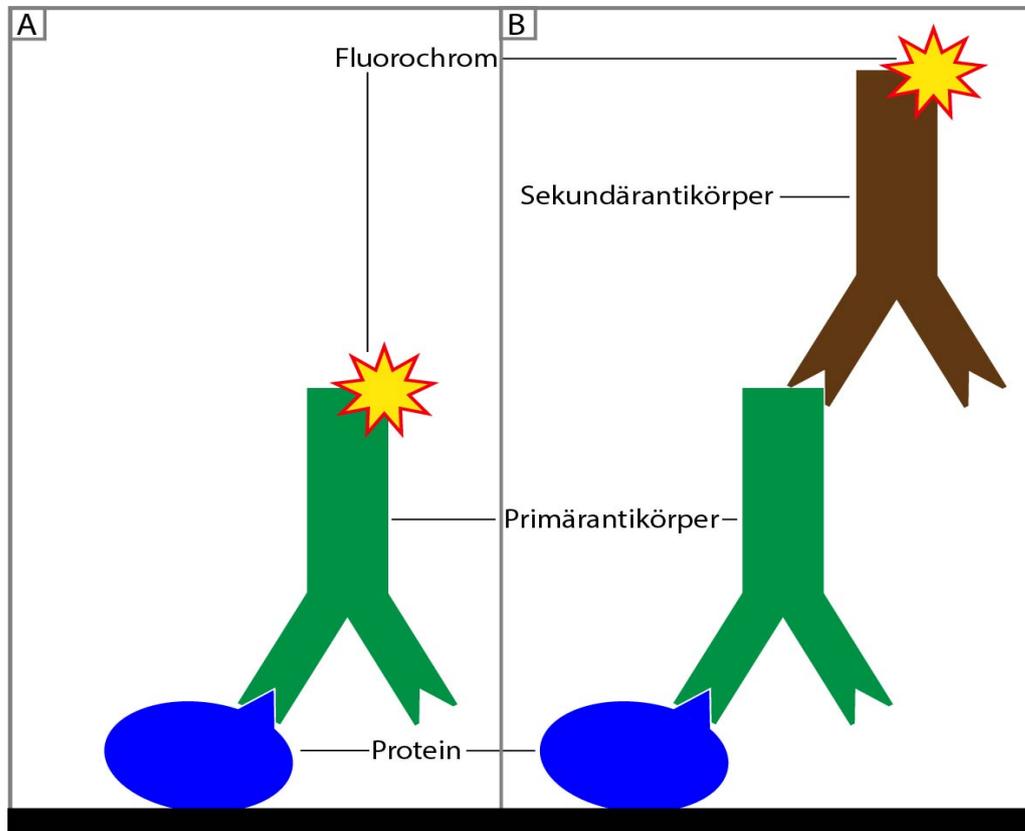
**Abb. 9: Methoden der Migrationsanalyse von primären humanen Neurosphären nach 72 (A) und 120 (B) Stunden**

0,3 mm große Neurosphären wurden auf einer mit PDL/Laminin beschichteten 96-Well Flachbodenplatte unter differenzierenden Bedingungen ausplattiert. Nach 72 h wurde die Migrationsstrecke mittels ImageJ an 4 zueinander rechtwinkligen Stellen vom äußeren Rand des Sphärenkernes bis hin zur am weitesten migrierten Zelle gemessen. Nach 120 h wurde die Migrationsstrecke mit Omnisphero anhand von mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkernen analysiert.

### 2.2.3.2.2 Immunzytochemische Färbungen zur Differenzierungs- und Migrationsanalyse

Immunzytochemische Färbungen dienen der Darstellung von zellulären Strukturen und beruhen auf dem Prinzip, dass die eingesetzten Antikörper an die zellulären Ziel-Antigene binden, welche sich auf der Zellmembran-Außenseite oder im Zellinneren befinden. Die zellulären Zielstrukturen können indirekt durch ein Molekül

namens Fluorochrom sichtbar gemacht werden, welches entweder direkt an den das zelluläre Antigen bindenden Antikörper gekoppelt ist (siehe Abb. 10A) oder an einen sekundären Antikörper, welcher an den Fc (*fragment crystallisable*)-Teil des primären Antikörpers bindet (siehe Abb. 10B).



**Abb. 10: Prinzip einer Immunfluoreszenz-Färbung**

Ein Antikörper bindet an ein spezifisches Epitop des gesuchten Proteins. Entweder ist der Primärantikörper direkt an ein detektierbares Fluorochrom gekoppelt (A) oder dient einem an ein Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper als Epitop (B).

Sind die Ziel-Antigene für eine bestimmte Zellart spezifisch, kann man das Vorkommen dieser Zellart in einer Probe quantitativ nachweisen. In dieser Arbeit wurde ein muriner Antikörper gegen das spezifische Oberflächen-Glykoprotein O4 zum Nachweis von Oligodendrozyten verwendet und zum Nachweis von Neuronen ein aus Hasen gewonnener direkt an das Fluorochrom Alexa 647 gekoppelter Antikörper gegen das Zytoskelett-Protein  $\beta$ 3-Tubulin (siehe Tabelle 1). Da sich dieses Ziel-Antigen im Zellinneren befindet, mussten die Zellmembranen vor diesem Färbeschritt permeabilisiert werden, um die Antikörper-Antigen-Bindung zu ermöglichen. Die Zellkerne aller Zellen wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt.

Durchführung der Färbung

An Tag 5 wurden die Zellen zunächst mit 4 % PFA fixiert (66  $\mu$ l 12 % PFA zu 133  $\mu$ l Rest-Medium) und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden

149 µl des Überstandes abgenommen und nach folgendem Schema gewaschen:

1. Zugabe von 250 µl PBS (-/-)
2. Drei Minuten Einwirkzeit bei RT
3. Abnahme von 250 µl Überstand
4. Insgesamt dreimalige Durchführung der Schritte 1-3

Beim dritten Waschschrift wurden hier 260 µl Überstand abgenommen und danach 10 µl der Oligodendrozyten-Blocking-Lösung (siehe Tabelle 5) hinzugegeben, um andere freie Epitope abzudecken und somit unspezifische Bindungen der O4-Antikörper zu reduzieren. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden 10 µl abgenommen und dann 10 µl der Primärantikörperlösung hinzugegeben. Über Nacht wurden die Platten bei 4 °C inkubiert, sodass der Primärantikörper binden konnte. Am Folgetag wurde zunächst nach dem oben beschriebenen Schema gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 10 µl der Sekundärantikörperlösung hinzugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, sodass der sekundäre Antikörper an den primären binden konnte. Dann wurde erneut nach dem beschriebenen Schema gewaschen, beim dritten Waschschrift wurden nun aber 265 µl Überstand abgenommen, daraufhin 15 µl einer 12 % PFA-Lösung hinzugegeben und die Platten für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen erneut zu fixieren. Nach erneutem Waschen und Abnahme von 260 µl Überstand beim letzten Waschschrift wurden 10 µl PBS-T (0,5 % Triton-X) hinzugegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Nach einmaligem Waschen (Schritt 1 und Schritt 2 und anschließende Abnahme von 260 µl Überstand) wurden 10 µl der Blocking-Lösung für die Neuronenfärbung zugegeben und anschließend für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachdem im Folgenden 10 µl des Überstandes abgenommen wurden, wurden 10 µl der Antikörperlösung hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach abschließendem dreimaligem Waschen wurden mit dem Cellomics Array Scan VTI HSC Reader fluoreszenzmikroskopische Bilder aufgenommen, welche mit Omnisphero per *High Content Image Analysis* analysiert werden konnten.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen für (immunzytochemische) Färbungen**

	<b>Blocking-Lösung</b>	<b>Primärantikörperlösung</b>	<b>Sekundärantikörperlösung</b>
<b>Oligodendrozyten</b>	50 % Goat-Serum 5 % BSA in PBS (-/-) (1x)	1:80 Mouse-Anti-O4 10 % Goat-Serum 1 % BSA in PBS (-/-) (1x)	1:80 Anti-Mouse IgM Alexa 488 10 % Goat-Serum 5 % BSA in PBS (-/-) (1x)
<b>Neurone</b>	50 % Rabbit Serum 5 % BSA in PBS (-/-) (1x)	1:80 Rabbit-Anti- $\beta$ 3-Tubulin Alexa 647 10 % Rabbit Serum 1 % BSA 5 % 0,2 mg/ml Hoechst 33258 (= 10 $\mu$ g/ml) in PBS (-/-) (1x)	X

#### Auswertung mit Omnisphero

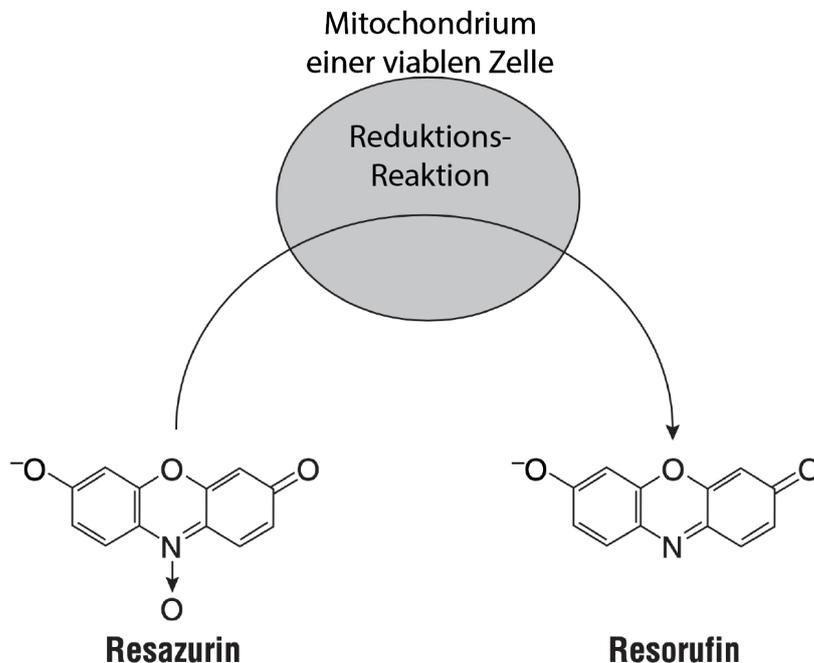
Das in der Arbeitsgruppe entwickelte Programm Omnisphero ist in der Lage die immunzytochemisch angefärbten Neurone und Oligodendrozyten zu erkennen (Schmuck et al., 2017). Dies gelingt, indem es Überlappungen der immunzytochemischen Färbungen mit den von Hoechst 33258 angefärbten Zellkernen detektiert. Ist die jeweilige Überlappung deutlich genug, wird die Zelle dem entsprechenden Zelltyp zugeordnet. Neben der Differenzierungsanalyse wird auch die allgemeine Migrationsdistanz über die Zellkernfärbung (siehe Abb. 9B) und die Zelltyp-spezifische Migrationsdistanz untersucht.

### **2.2.3.3 Bestimmung der Zellviabilität und der Zytotoxizität**

#### **2.2.3.3.1 Der Alamar-Blue-Assay**

Der Alamar-Blue-Assay misst die mitochondriale Aktivität, indem das nicht fluoreszierende Resazurin ins Medium gegeben und daraufhin von mitochondrialen

Dehydrogenasen in das fluoreszierende Resorufin umgewandelt wird (siehe Abb. 11). Basierend auf der Annahme, dass die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen in metabolisch aktiveren Zellen höher und proportional zur Zellviabilität ist, lässt sich die Menge viable Zellen und der Grad ihrer metabolischen Aktivität durch die Messung der Fluoreszenz indirekt untersuchen.



**Abb. 11: Prinzip des Alamar-Blue-Assays zur Messung der mitochondrialen Aktivität**

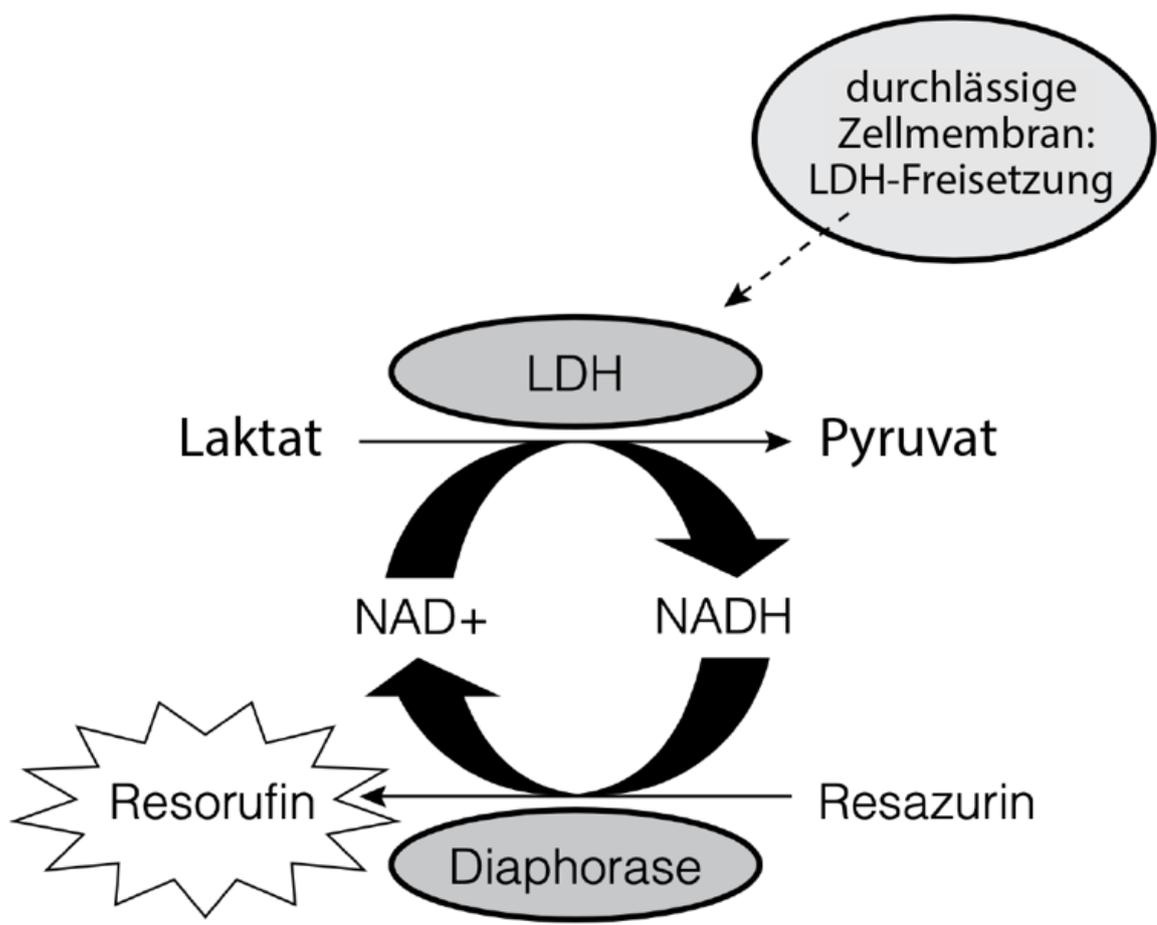
Dehydrogenasen in Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen reduzieren das Substrat Resazurin zu fluoreszierendem Resorufin. (adaptiert nach Manual der Firma Promega, Stand: 03/2016)

Das CellTiter Blue Reagenz wurde im Verhältnis 1:7,5 in B27-Proliferationsmedium (unter proliferierenden Bedingungen) beziehungsweise N2-Differenzierungsmedium (unter differenzierenden Bedingungen) verdünnt. Nach Abnahme von je 50 µl Medium aus den Wells für den LDH-Assay (siehe 2.2.3.3.2 Der LDH-Assay) wurden 83 µl der Cell Titer Blue-Medium-Lösung auf die verbleibenden 50 µl Medium gegeben und für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Abschließend wurde die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 590 nm mit dem Multimode Mikroplattenleser gemessen.

**2.2.3.3.2 Der LDH-Assay**

Da endpunktspezifische Effekte der getesteten Substanzen von Zytotoxizität abzugrenzen sind, wurde Letztere mit dem LDH-Assay untersucht. Die Membran beschädigter Zellen wird durchlässig für zytoplasmatische Zellbestandteile, wie etwa das Enzym LDH, welches sich daraufhin vermehrt im Medium nachweisen lässt. LDH katalysiert die Dehydrogenation von Laktat zu Pyruvat, wobei es den ins

Medium hinzugegebenen Cofaktor NAD<sup>+</sup> zu NADH umwandelt. NADH kann wiederum von dem Enzym Diaphorase genutzt werden, um das zugegebene Resazurin zu fluoreszierendem Resorufin zu reduzieren (siehe Abb. 12). Die Menge an umgesetztem Resorufin ist somit proportional zur Menge an LDH. Zellen mit intakter Zellmembran setzen keine LDH frei und fördern somit auch nicht die Bildung des nachweisbaren Resorufins.



**Abb. 12: Prinzip des LDH-Assays zur Zytotoxizitäts-Messung**

Aus dem Zytoplasma sterbender Zellen mit Zellmembran-Defekten gelangt LDH ins Medium. Nach Zugabe der Substrate Laktat, NAD<sup>+</sup> und Resazurin wird Letzteres durch das Enzym Diaphorase in Resorufin umgesetzt, dessen messbare Fluoreszenz proportional zur Menge toter Zellen ist. (adaptiert nach dem Manual der Firma Promega, Stand: 05/2009)

Als Positivkontrolle wurde eine Lysekontrolle mitgeführt, in deren Medium zu Beginn des LDH-Assays 2 µl 10 % Triton-X 100 gegeben wurden. Dies ist ein Detergens, welches Proteine aus den Membranen der Zellen löst, woraufhin diese LDH freisetzen. Zudem dienten Wells mit Medium aber ohne Neurosphären als Hintergrundkontrolle.

Nach der Zugabe von Triton-X 100 wurden die Platten erneut für 30 Minuten (unter differenzierenden Bedingungen) beziehungsweise 45 Minuten (unter proliferierenden Bedingungen) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden pro Well 50 µl

abgenommen und auf eine andere 96-Well-Flachbodenplatte überführt. Nach Zugabe von 50 µl LDH (*Cyto Tox-ONE*)- Reagenz wurde die Platte für 2 h im Dunkeln bei RT inkubiert und darauffolgend im Multimode Mikroplattenleser für 5 Sekunden mit einer Amplitude von 2 mm geschüttelt. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 590 nm. Sollten die Zellen nach dem LDH-Assay noch weiter kultiviert werden, so wurden sie mit 50 µl des entsprechenden Mediums nachgefüttert (siehe 2.2.3.2 Untersuchungen unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)). Die Wells der Lysekontrolle wurden, um sie zu waschen, je zweimal abgesaugt und mit sterilem dH<sub>2</sub>O gefüllt, um eine Beeinflussung benachbarter Wells durch das Triton-X 100 zu verhindern.

### **2.2.3.5 Statistische Analyse**

Für die statistische Analyse eines jeden Endpunktes wurden mindestens drei voneinander unabhängige, mit verschiedenen Individuen durchgeführte Experimente herangezogen. Abweichungen hiervon sind in der Abbildungsunterschrift als solche beschrieben. Für jede Belastungskonzentration und Kontrolle wurden fünf technische Replikate verwendet, von denen für die Auswertung mindestens drei zur Mittelwertberechnung herangezogen wurden. Innerhalb jedes Experimentes wurden die Mittelwerte der Belastungen auf die der Lösungsmittel- beziehungsweise Lysekontrolle normalisiert. Die Standardabweichungen wurden als Standard Error of Mean (SEM) angegeben. In gekennzeichneten Fällen, in denen weniger als drei biologische Replikate in die Auswertung eingeflossen sind, wurde der Minimal-/Maximalwert angegeben.

Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism (Version 9.1.0) als einfaktorielle ANOVA-Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Post-hoc-Test. Wurden nur zwei Bedingungen miteinander verglichen, so wurde ein t-Test durchgeführt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit einem Konfidenzintervall von 95% und einem p-Wert von 0,05. Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden mit GraphPad Prism erstellt und als sigmoidale Kurven mit variabler Steigung angepasst. Der niedrigste Wert wurde auf 0 begrenzt. Da die Proliferationsänderung unter CP-673451 einen glockenförmigen Verlauf hat, wurde in diesem Fall die entsprechende Konzentrations-Wirkungskurve als glockenförmige Kurve gefittet.

### **3 Ergebnisse**

Um die biologische Applikationsdomäne des humanen Neurosphären-Assays zu untersuchen und somit die Akzeptanz ausgewählter Assays der DNT-*in vitro*-Testbatterie zu erhöhen, wurde der Einfluss verschiedener Signalwegsmodulatoren auf die Endpunkte des Neurosphären-Assays untersucht (siehe Abb. 4).

Getestet wurde der Einfluss von BDNF, PDGF, der PLC $\gamma$ , dem PI3K-PKB-Signalweg und vom Transkriptionsfaktor CREB auf die Endpunkte Proliferation, Differenzierung und Migration von hNPCs.

Zudem erfolgte eine Messung der Viabilität und der Zytotoxizität. Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu beachten, dass ein beschriebener Effekt wohlmöglich durch ein vermehrtes Sterben der Zellen zustande kommt, wenn sich in derselben Konzentration auch eine erhöhte Zytotoxizität oder eine verminderte Viabilität zeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Graphen der Zytotoxizität so angezeigt, dass sie wie die Graphen der anderen Endpunkte bei einer „Verschlechterung“ im Vergleich zur LMK abfallen und nicht ansteigen. Wenn eine Substanz in einer Konzentration zum Beispiel eine 30 % höhere LDH-Freisetzung verursacht als die LMK, ist der entsprechende Datenpunkt des Graphen bei 70 % und nicht bei 130 % der LMK abgebildet.

Die Konzentrationen der Substanzen wurden mithilfe entsprechender Literatur, anhand von Herstellerinformationen oder basierend auf Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit den Substanzen ausgewählt. Im Falle von Zytotoxizität wurden die Konzentrationen in Folgeversuchen angepasst.

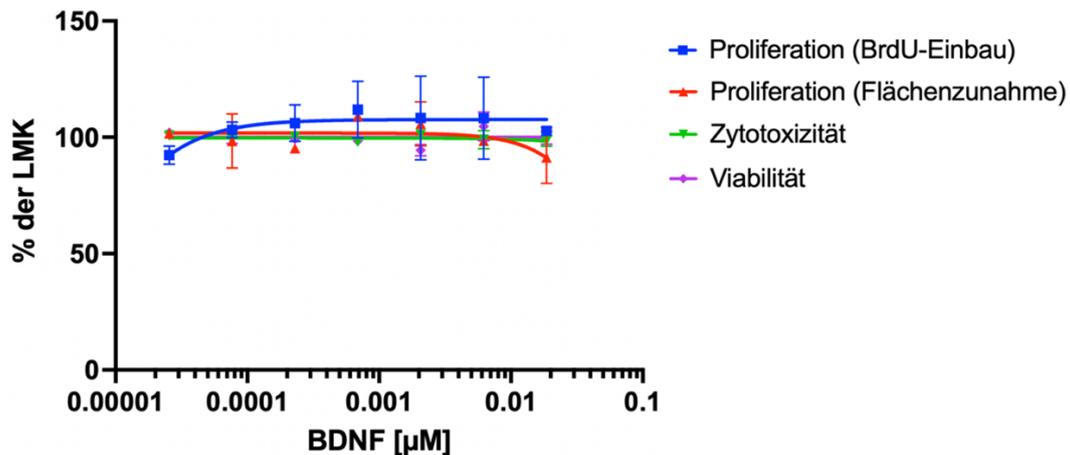
#### **3.1 Der Einfluss des BDNF-Rezeptors TrkB**

##### **3.1.1 TrkB-Aktivierung**

Um die Auswirkungen einer Aktivierung des TrkB-Rezeptors zu untersuchen, wurden die Zellen mit dessen Liganden BDNF behandelt. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 0,026 nM bis 18,6 nM gewählt.

##### **3.1.1.1 Effekte einer TrkB-Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen**

BDNF hat keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation von hNPCs. Ebenso wenig ruft BDNF unter proliferierenden Bedingungen Zytotoxizität oder eine veränderte Viabilität hervor (siehe Abb. 13).



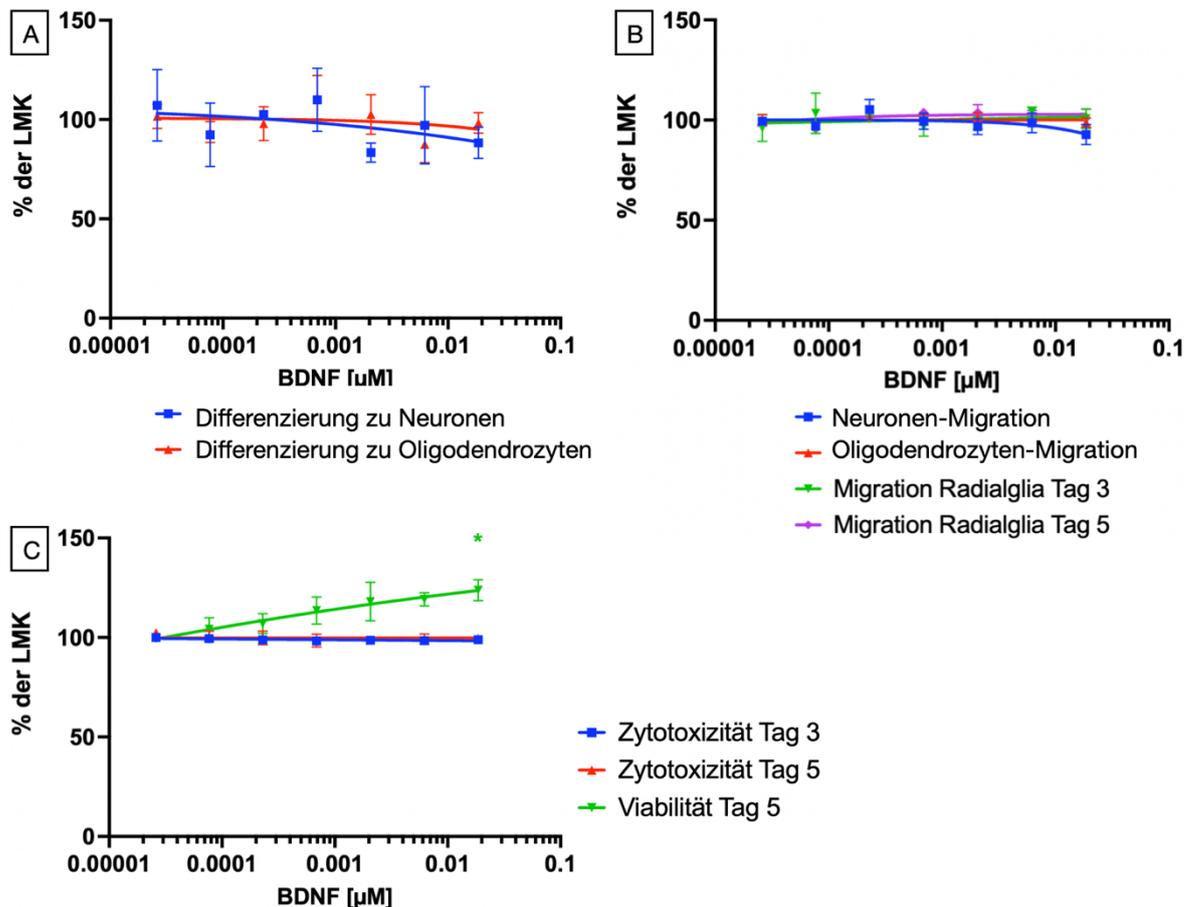
**Abb. 13: Einfluss von BDNF auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab).**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 18,6; 6,2; 2,07; 0,69; 0,23; 0,077 und 0,026 nM BDNF behandelt. Als LMK wurde B27-Medium verwendet, da in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass BSA/DPBS keinen Einfluss auf die untersuchten Endpunkte hat. Der Einfluss von BDNF auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)].

### 3.1.1.2 Effekte einer TrkB-Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen

Unter differenzierenden Bedingungen wird die Aktivität der mitochondrialen Reduktase (angegeben als Viabilität) durch BDNF in der höchsten Konzentration (0,0186  $\mu$ M) signifikant auf 123,79 % gesteigert.

Die Neuronen- und Oligodendrozyten-Differenzierung und -Migration sowie die allgemeine radiale Migration verändern sich unter BDNF-Behandlung nicht. BDNF wirkt hier nicht zytotoxisch (siehe Abb. 14).



**Abb. 14: Einfluss von BDNF auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 18,6; 6,2; 2,07; 0,69; 0,23; 0,077 und 0,026 nM BDNF behandelt. Als LMK wurde B27-Medium verwendet, da in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass BSA/DPBS keinen Einfluss auf die untersuchten Endpunkte hat. Der Einfluss von BDNF auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten; \* = p < 0,05 bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

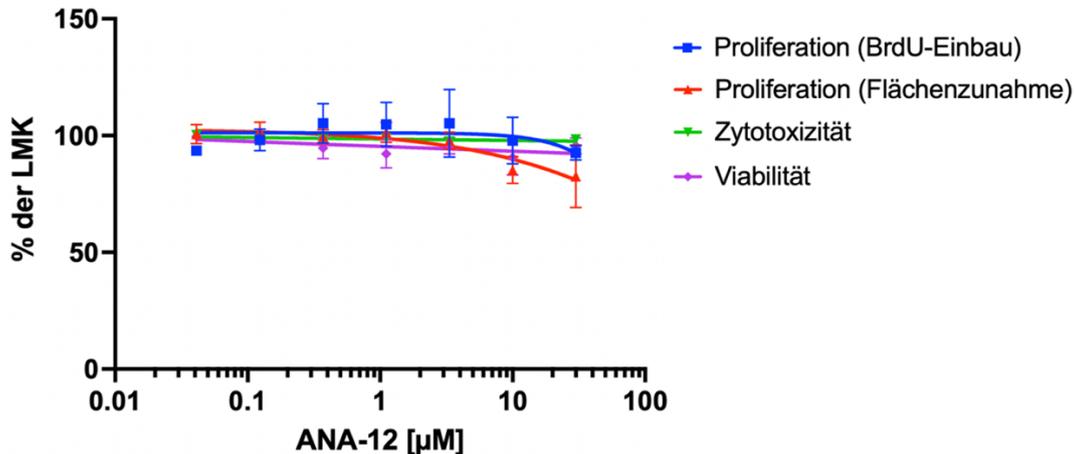
### 3.1.2 Inhibierung des TrkB-Rezeptors

ANA-12, ein nicht-kompetitiver Antagonist des TrkB-Rezeptors, wurde verwendet, um die Auswirkungen einer Inhibierung der Rezeptor-Aktivität zu untersuchen. ANA-12 wurde in einer Konzentrationsreihe von 0,041  $\mu$ M bis 30  $\mu$ M verwendet.

### 3.1.2.1 Effekte einer Inhibierung des TrkB-Rezeptors unter proliferierenden Bedingungen

30  $\mu\text{M}$  ANA-12 reduzieren tendenziell die Flächenzunahme (-17,4 %) und die DNS-Syntheserate (-7,4 %). Diese Ergebnisse zeigen unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% jedoch keine Signifikanz.

Es zeigen sich unter Belastung mit ANA-12 keine Zytotoxizität und keine Veränderungen der Viabilität (siehe Abb. 15).



**Abb. 15: Einfluss von ANA-12 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

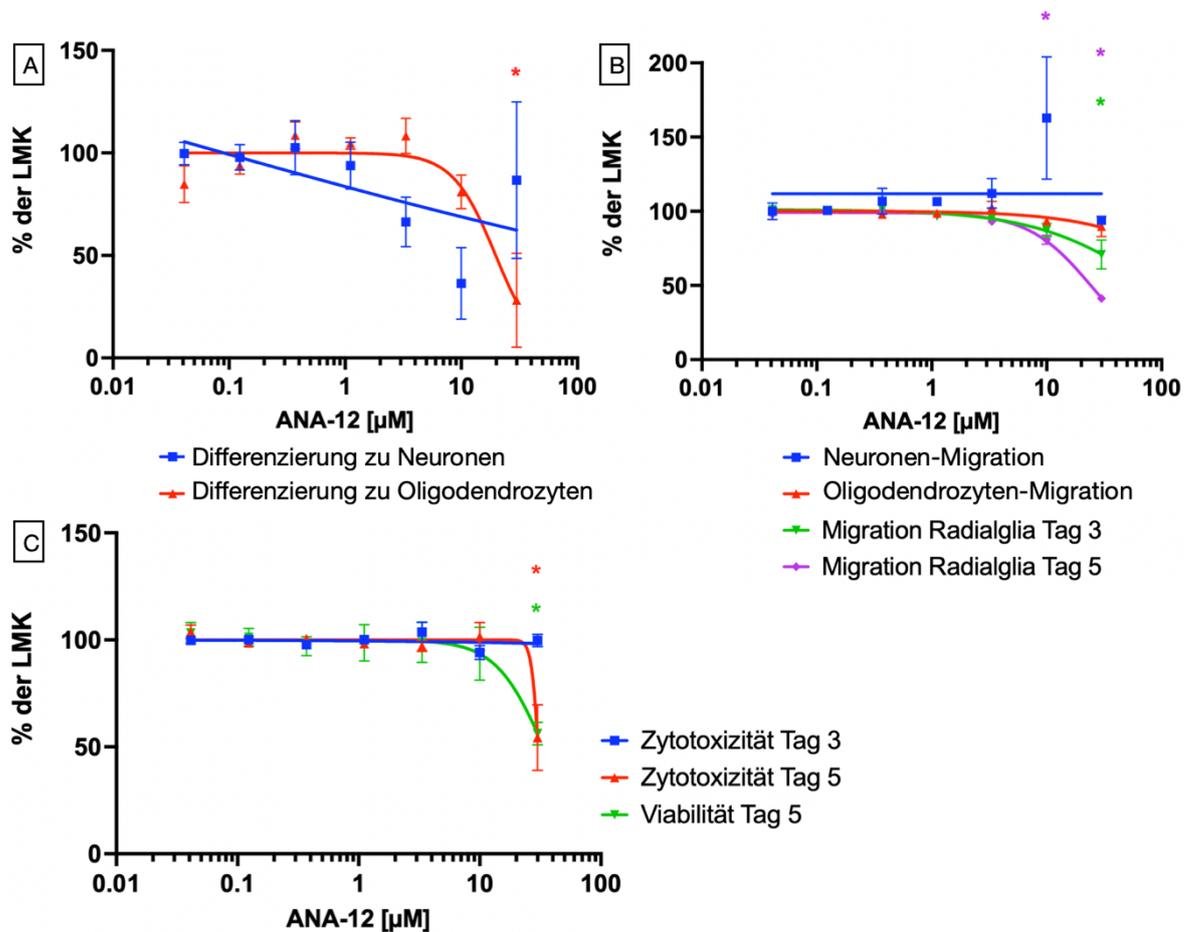
Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 und 0,041  $\mu\text{M}$  ANA-12 behandelt. Als LMK wurde 0,15 % DMSO in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von ANA-12 auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.1.2.2 Effekte einer Inhibierung des TrkB-Rezeptors unter differenzierenden Bedingungen

30  $\mu\text{M}$  ANA-12 wirken nach fünf Tagen zytotoxisch und vermindern die Viabilität (-45,63 % bzw. -43,79 %, jeweils signifikant). In derselben Konzentration und nach derselben Zeit kommt es zu Reduktionen der Oligodendrozyten-Differenzierung (-71,85 %, signifikant), der allgemeinen radialen Migration (-41,29 %, signifikant) und der Oligodendrozyten-Migration (-10,2 %, nicht signifikant).

Nach 72 h zeigt ANA-12 noch keinen zytotoxischen Effekt, reduziert jedoch die allgemeine radiale Migration (-29,13 %, signifikant).

Tendenziell hemmen 10  $\mu\text{M}$  ANA-12 die neuronale Differenzierung und steigern die neuronale Migration (-63,61 % bzw. +62,8 %, jeweils nicht signifikant) (siehe Abb. 16).



**Abb. 16: Einfluss von ANA-12 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 und 0,041 µM ANA-12 behandelt. Als LMK wurde 0,15 % DMSO in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von ANA-12 auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem β3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte ± SEM aus n = 3 (Ausnahme: Oligodendrozyten-Migration bei 30 µM: n = 2) unabhängigen Experimenten; \* = p<0,05 bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

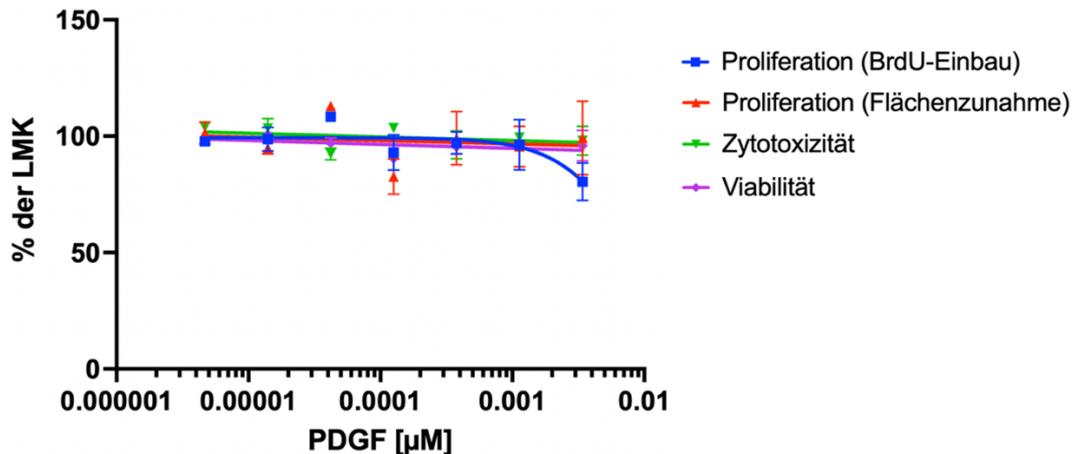
## 3.2 Der Einfluss des PDGF-Rezeptors

### 3.2.1 PDGFR-Aktivierung

Der PDGFR wurde durch humanes PDGF-A, in den Konzentrationen 0,0047 nM bis 3,4 nM aktiviert.

### 3.2.1.1 Effekte einer PDGFR-Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen

Die DNS-Syntheserate zeigt unter PDGF-Behandlung in höchster Konzentration (3,4 nM) eine tendenzielle Reduktion (-19,5 %; p-Wert = 0,26), die aufgrund eines zu hohen Standardfehlers aber nicht signifikant ist. Flächenzunahme und Viabilität werden durch PDGF nicht beeinflusst. PDGF ruft keine Zytotoxizität hervor (siehe Abb. 17).



**Abb. 17: Einfluss von PDGF auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

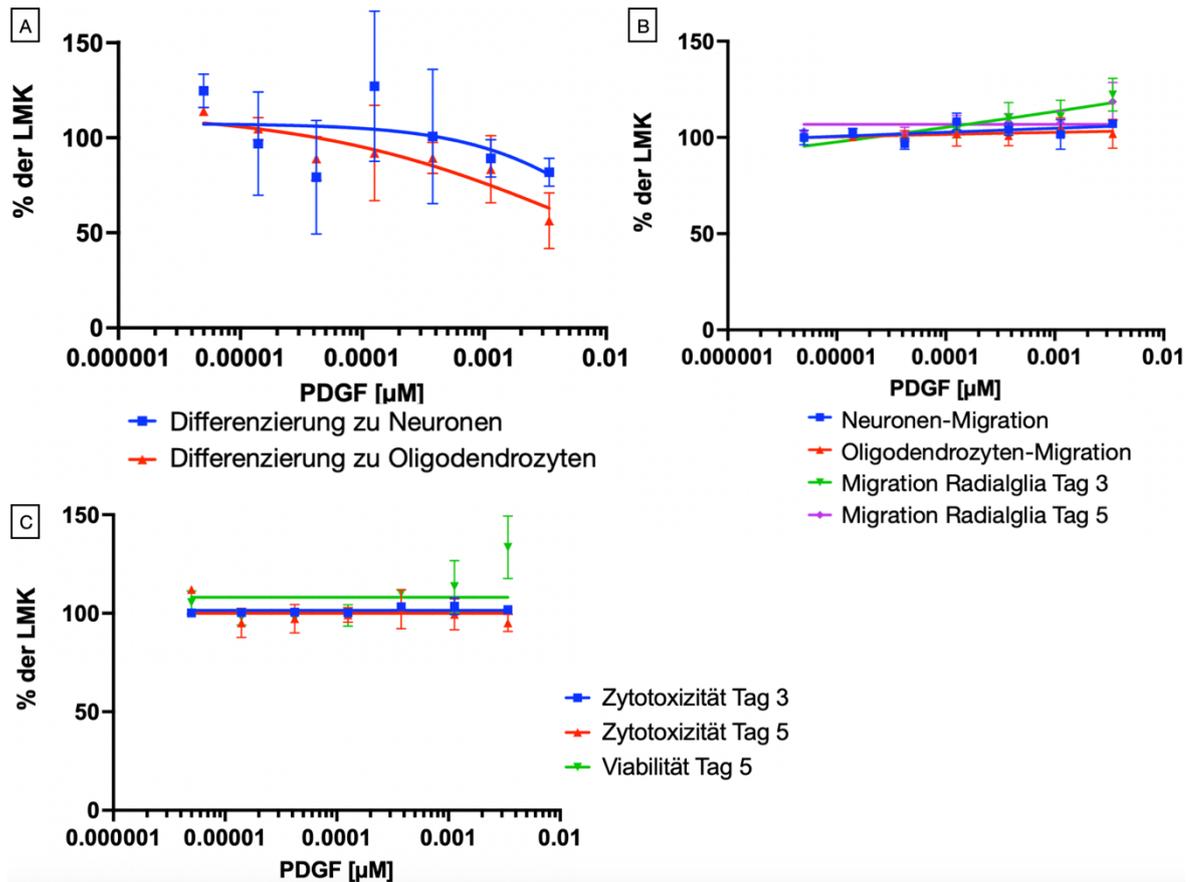
Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 3,4; 1,13; 0,38; 0,13; 0,042; 0,014 und 0,005 nM PDGF behandelt. Als LMK wurde 40 μM HCl in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von PDGF auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte ± SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten; \* = p < 0,05 bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.2.1.2 Effekte einer PDGFR-Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen

PDGF steigert in einer Konzentration von 3,4 nM die allgemeine radiale Zellmigration nach drei Tagen (+22,21 %) und nach fünf Tagen (+18,63 %), sowie die Viabilität (+33,42 %), jedoch jeweils, ohne die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zu unterschreiten (p = 0,0682 bzw. p = 0,1106 und p = 0,0632). Die zellspezifische Neuronen- und Oligodendrozyten-Migration wird durch PDGF nicht verändert.

Die Differenzierung in Oligodendrozyten wird durch 3,4 nM PDGF tendenziell reduziert (-43,61 %, nicht signifikant), die Differenzierungsrate zu Neuronen wird nicht verändert.

PDGF wirkt nicht zytotoxisch (siehe Abb. 18).



**Abb. 18: Einfluss von PDGF auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

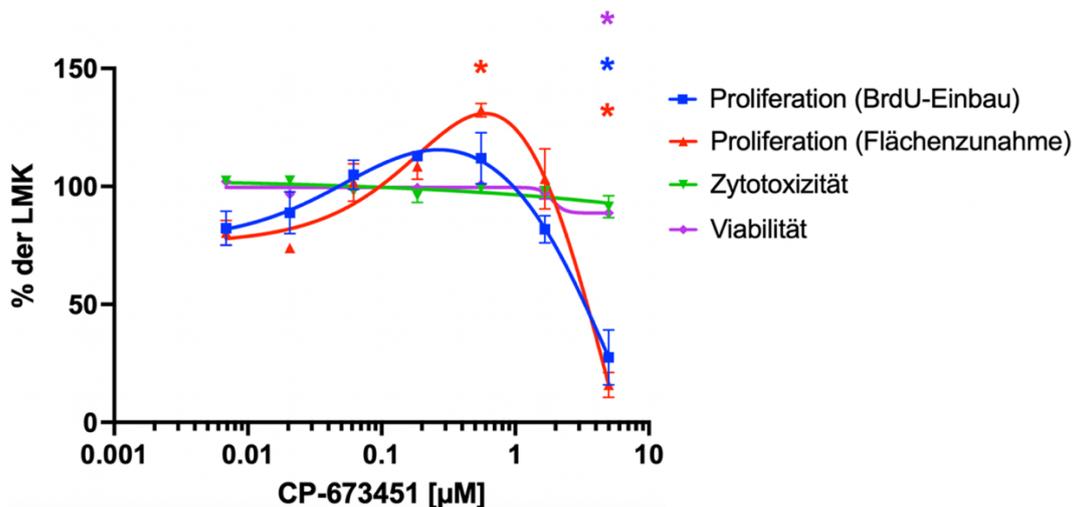
Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 3,4; 1,13; 0,38; 0,13; 0,042; 0,014 und 0,005 nM PDGF behandelt. Als LMK wurde 40  $\mu\text{M}$  HCl in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von PDGF auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.2.2 PDGFR-Hemmung

CP-673451 hemmt das *downstream signaling* des PDGF-Rezeptors an mehreren Stellen, indem es die Phosphorylierung vieler Substrate (u.a. PKB, GSK3 $\beta$ , S6K1) inhibiert. CP-673451 wurde in differenzierenden Bedingungen in Konzentrationen von 0,014  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  und unter proliferierenden Bedingungen von 0,0069  $\mu\text{M}$  bis 5  $\mu\text{M}$  verwendet.

### 3.2.2.1 Effekte einer PDGFR-Hemmung unter proliferierenden Bedingungen

Während sich in den hier gezeigten Konzentrationen keine Zytotoxizität von CP-673451 zeigt, werden in der höchsten Konzentration (5  $\mu\text{M}$ ) sowohl die DNS-Syntheserate (-27,5 %, signifikant), als auch die Flächenzunahme (-84,1 %, signifikant) deutlich vermindert. Auch die Viabilität (-11,3 %, signifikant) nimmt in dieser Konzentration ab. Entgegengesetzt zu der Proliferationsminderung unter Einfluss von 5  $\mu\text{M}$  CP-673451 zeigte sich bei 0,56  $\mu\text{M}$  eine vermehrte Flächenzunahme (+32,3 %, signifikant) (siehe Abb. 19).



**Abb. 19: Einfluss von CP-673451 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 5; 1,67; 0,56; 0,19; 0,062; 0,021 und 0,007  $\mu\text{M}$  CP-673451 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von CP-673451 auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.2.2.1 Effekte einer PDGFR-Hemmung unter differenzierenden Bedingungen

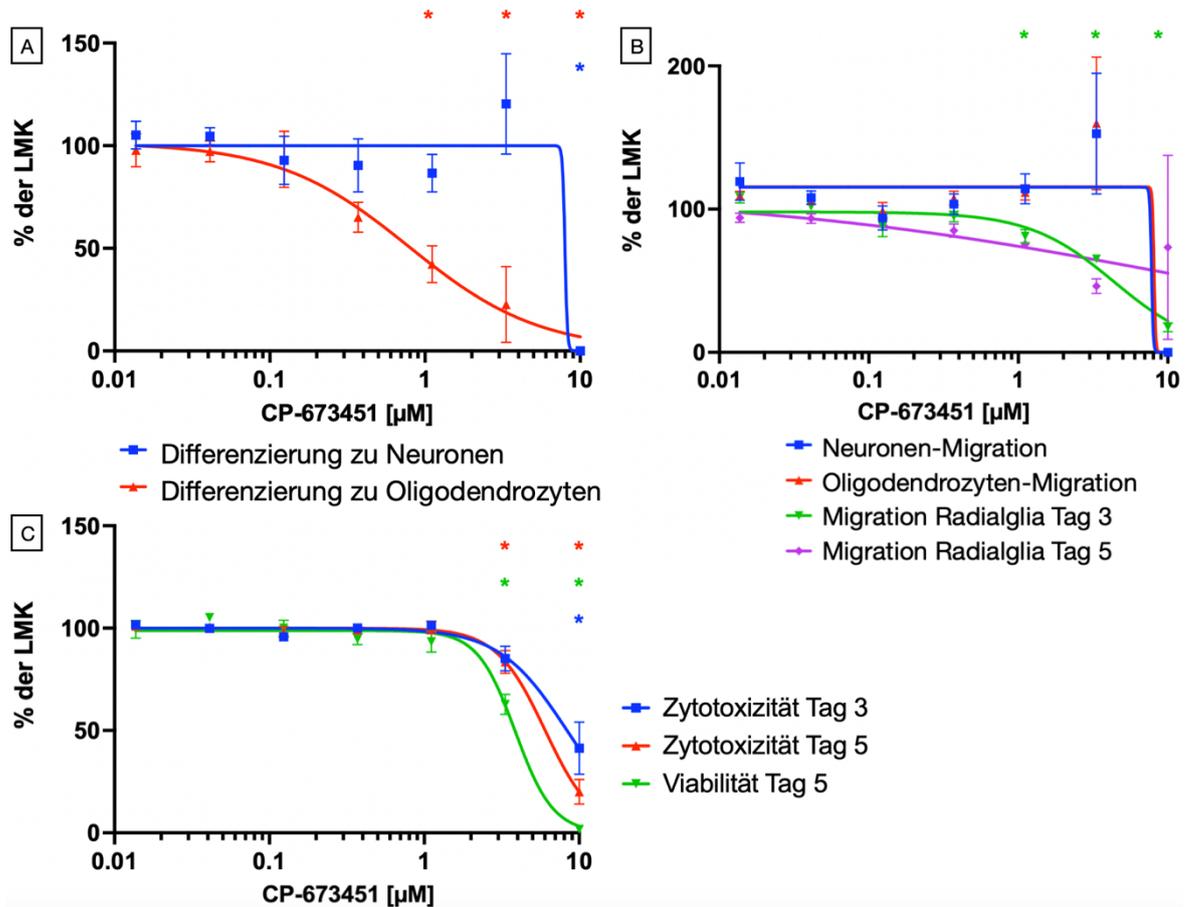
CP-673451 wirkt bei 3,33  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zytotoxisch nach drei Tagen (-14,89 %, nicht signifikant bzw. -58,64 %, signifikant) und nach fünf Tagen (-16,55 % bzw. -79,94 %, jeweils signifikant).

Es reduziert die Viabilität der hNPCs signifikant bei 3,33  $\mu\text{M}$  (-37,27 %) und 10  $\mu\text{M}$  (-98,33 %).

Die Oligodendrozyten-Differenzierung wird bei 1,11  $\mu\text{M}$  und 3,33  $\mu\text{M}$  signifikant reduziert (-57,73 % bzw. -77,39 %). Nach 5 Tagen Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  CP-673451 ließen sich in keinem von fünf Versuchen Oligodendrozyten oder Neurone

nachweisen. Demzufolge ließ sich in dieser Konzentration auch keine zellspezifische Migrationsdistanz messen.

Die allgemeine radiale Migration zeigt sich bei 1,11  $\mu\text{M}$ , 3,33  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  CP-673451 nach drei Tagen signifikant reduziert (-18,94 %; -34,81 % bzw. -82,5 %). Auch nach fünf Tagen ist sie vermindert (-24,52 %; -53,79 % bzw. -26,61%, jeweils nicht signifikant) (siehe Abb. 20).



**Abb. 20: Einfluss von CP-673451 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041 und 0,014  $\mu\text{M}$  CP-673451 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von CP-673451 auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  (Ausnahmen: neuronale Differenzierung und die Differenzierung zu Oligodendrozyten  $n = 5$ ; Migration Radialglia Tag 3:  $n = 5$ ; Migration Radialglia Tag 5:  $n = 5$ , außer bei 10  $\mu\text{M}$ :  $n = 3$ ; Neuronen- und Oligodendrozyten-Migration:  $n = 4$ ) unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.3 Der Einfluss der PLCy

#### 3.3.1 PLCy-Aktivierung

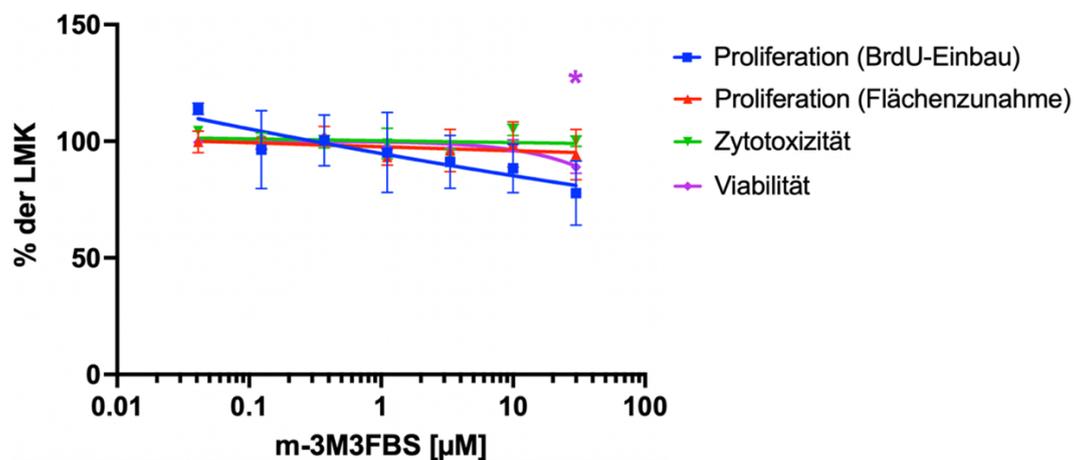
Der Zellmembran-permeable PLCy-Aktivator m-3M3FBS kam in Konzentrationen von 0,041  $\mu\text{M}$  bis 30  $\mu\text{M}$  zur Anwendung.

##### 3.3.1.1 Effekte einer PLCy-Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen

Die Viabilität zeigt sich bei 30  $\mu\text{M}$  m-3M3FBS signifikant um 11,1% reduziert.

Die Proliferation wird nicht verändert.

Es wird keine Zytotoxizität hervorgerufen (siehe Abb. 21).



**Abb. 21: Einfluss von m-3M3FBS auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 und 0,041  $\mu\text{M}$  m-3M3FBS behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von m-3M3FBS auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

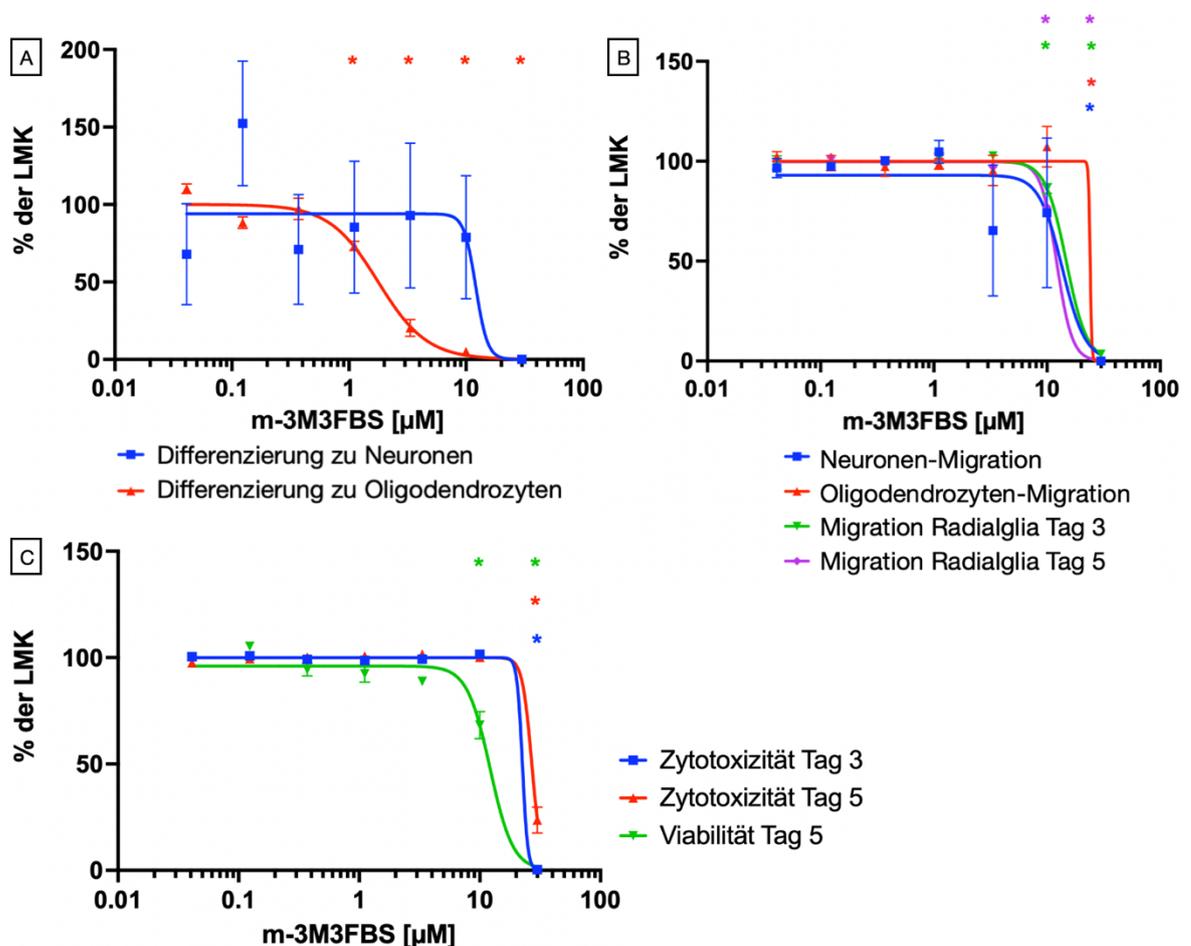
##### 3.3.1.2 Effekte einer PLCy-Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen

M-3M3FBS wirkt in der höchsten eingesetzten Konzentration (30  $\mu\text{M}$ ) signifikant zytotoxisch nach drei und nach fünf Tagen (-99,65 % bzw. -76,31 %).

Die Viabilität wird durch 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  signifikant reduziert (-31,69 % bzw. -99,71 %).

Ebenso wird die allgemeine radiale Zellmigration nach drei Tagen durch 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  (-13,64 % bzw. -96,57 %) und nach fünf Tagen durch 10  $\mu\text{M}$  m-3M3FBS (-22,94 %) signifikant vermindert.

Nach fünf Tagen Behandlung mit der zytotoxischen m-3M3FBS-Konzentration 30  $\mu\text{M}$  lassen sich keine Zellkerne und somit auch keine migrierten oder differenzierten Zellen mehr nachweisen. In den nicht zytotoxischen Konzentrationen zeigt sich kein klarer Einfluss auf die Migration von Neuronen und Oligodendrozyten. Die Differenzierung in Oligodendrozyten sinkt signifikant bei 1,11  $\mu\text{M}$ , 3,33  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  (-26,73 %, -79,71 % bzw. -94,88 %). Auf die neuronale Differenzierung lässt sich wegen zu hoher Standardfehler kein deutlicher Einfluss ausmachen (siehe Abb. 22).



**Abb. 22: Einfluss von m-3M3FBS auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 und 0,041  $\mu\text{M}$  m-3M3FBS behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von m-3M3FBS auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  (Ausnahmen: Neuronen-,

Oligodendrozyten- und radiale Migration nach drei Tagen: jeweils bei 30  $\mu\text{M}$ : n = 2) unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

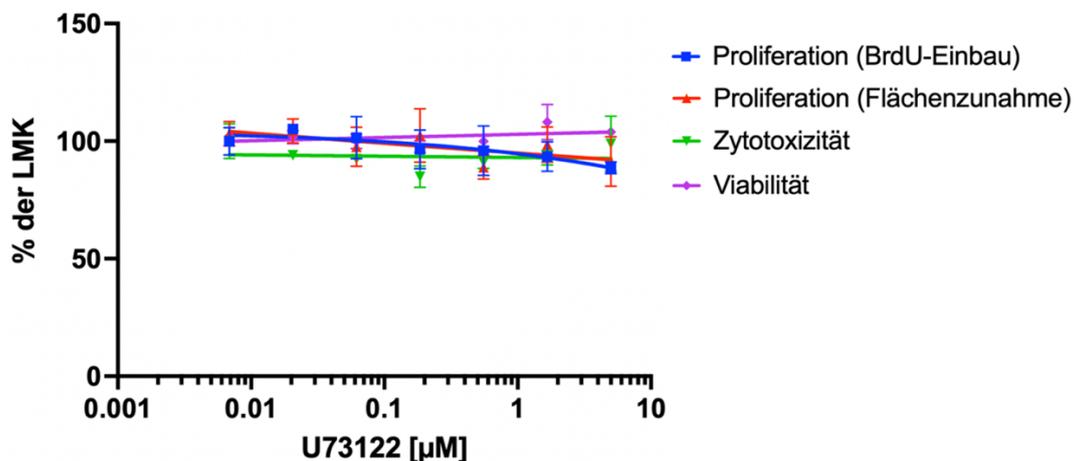
### 3.3.2 PLCy-Hemmung

Als Inhibitor der PLCy kam U73122 in den Konzentrationen 0,0069  $\mu\text{M}$  bis 5  $\mu\text{M}$  zum Einsatz.

#### 3.3.2.1 Effekte einer PLCy-Hemmung unter proliferierenden Bedingungen

U73122 zeigt keinen Einfluss auf die Proliferation und die Viabilität.

U73122 wirkt nicht zytotoxisch (siehe Abb. 23).



**Abb. 23: Einfluss von U73122 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 5; 1,67; 0,56; 0,19; 0,062; 0,021 und 0,007  $\mu\text{M}$  U73122 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von U73122 auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

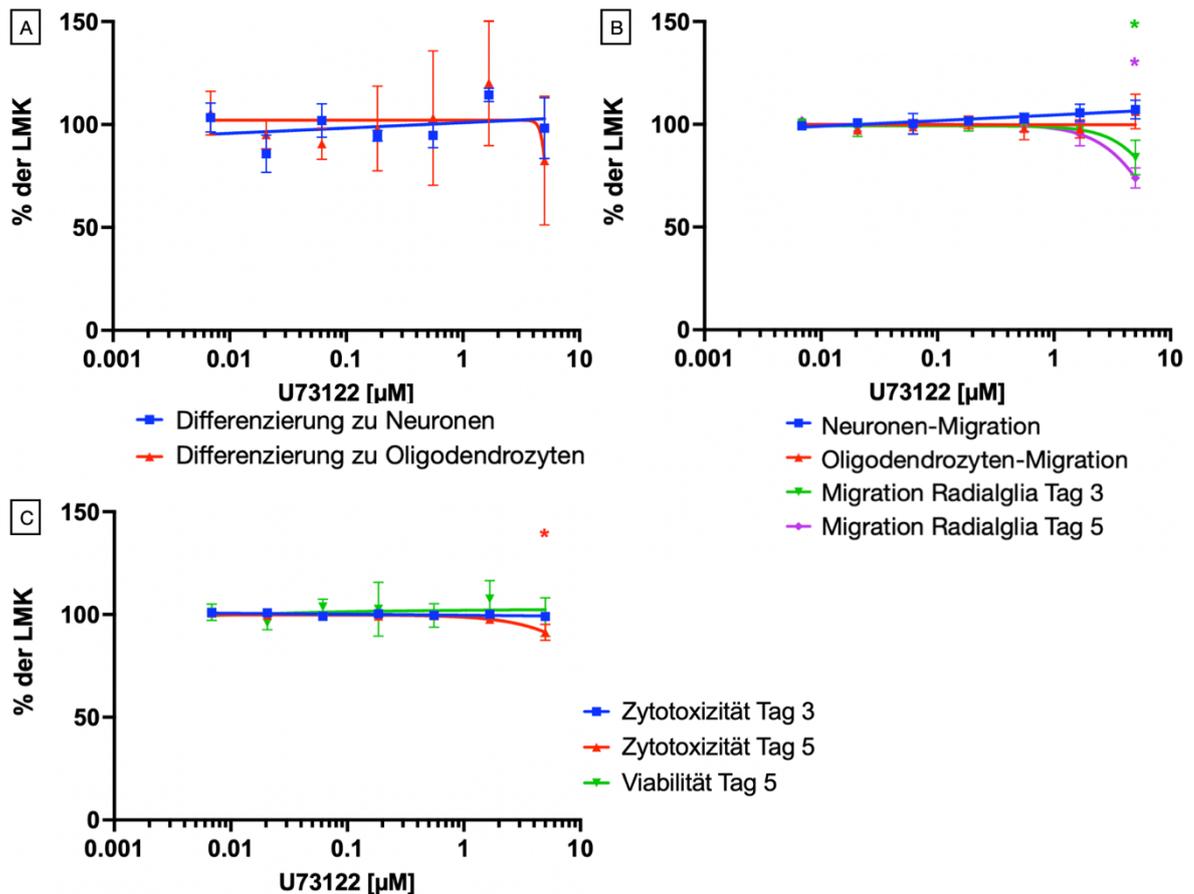
#### 3.3.2.1 Effekte einer PLCy-Hemmung unter differenzierenden Bedingungen

U73122 wirkt bei einer fünftägigen Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  leicht, aber signifikant zytotoxisch (-8,68 %). Nach drei Tagen zeigt sich noch keine Zytotoxizität.

Die Viabilität wird durch U73122 nicht verändert.

Die Migration der Radialglia wird durch 5  $\mu\text{M}$  U73122 nach drei und nach fünf Tagen signifikant reduziert (-16,16 % bzw. -26,11 %).

Die Differenzierung in Neurone und Oligodendrozyten sowie die zellspezifische Migration werden nicht verändert (siehe Abb. 24).



**Abb. 24: Einfluss von U73122 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 5; 1,67; 0,56; 0,19; 0,062; 0,021 und 0,007 μM U73122 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von U73122 auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem β3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte ± SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten; \* = p<0,05 bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.4 Der Einfluss des PI3K-PKB-Signalweges

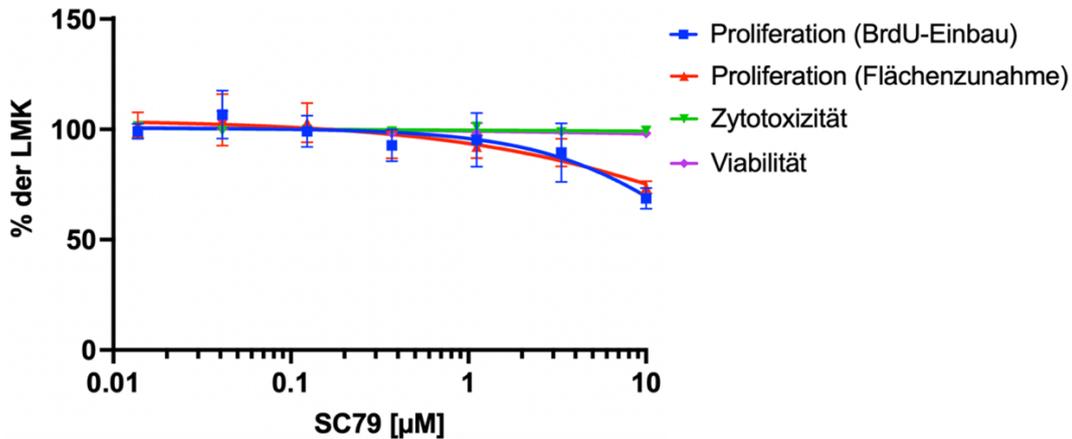
#### 3.4.1 Aktivierung des PI3K-PKB-Signalweges

SC79 imitiert die Bindung von PIP an die PKB, sodass diese ihre Konformation ändert, von Up-Stream-Kinasen (z.B. PDK1) vermehrt phosphoryliert und aktiviert wird und dadurch Substrate phosphorylieren kann.

SC79 kam in Konzentrationen von 0,014 μM bis 10 μM zur Anwendung.

### 3.4.1.1 Effekte einer Aktivierung des PI3K-PKB-Signalweges unter proliferierenden Bedingungen

SC79 reduziert in allen drei getesteten Individuen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Proliferation deutlich, jedoch nicht signifikant (BrdU-Einbau: -31,29 %; Flächenzunahme: -26,31 %). Die Viabilität wird durch SC79 unter proliferierenden Bedingungen nicht beeinflusst. Es zeigt sich keine Zytotoxizität (siehe Abb. 25).



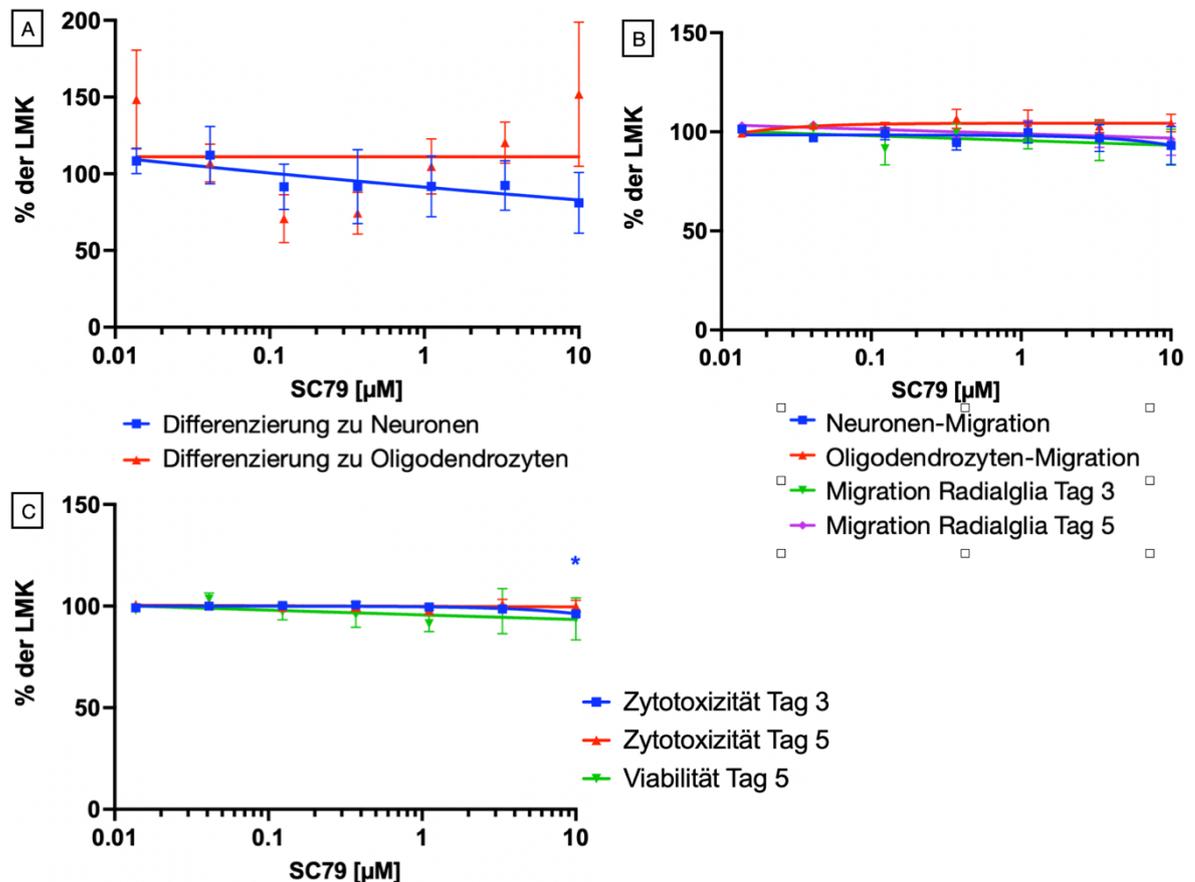
**Abb. 25: Einfluss von SC79 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041 und 0,014  $\mu\text{M}$  SC79 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von SC79 auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.4.1.2 Effekte einer Aktivierung des PI3K-PKB-Signalweges unter differenzierenden Bedingungen

10  $\mu\text{M}$  SC79 wirken nach drei Tagen leicht, aber signifikant zytotoxisch (-3,75 %). Nach fünf Tagen zeigt sich jedoch keine Zytotoxizität. Die Viabilität wird nicht verändert.

Weder die Viabilität noch die Differenzierung oder Migration zeigen Veränderungen unter einer SC79-Behandlung (siehe Abb. 26).



**Abb. 26: Einfluss von SC79 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

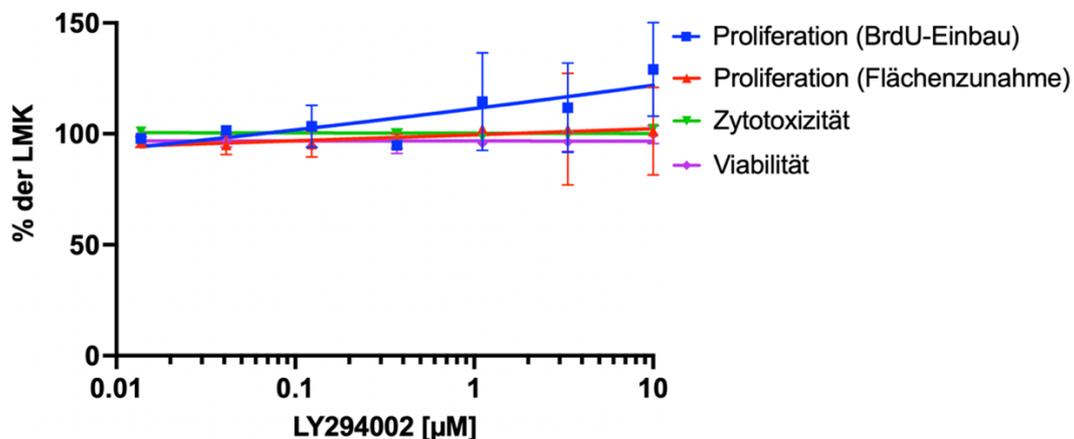
Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041 und 0,014  $\mu\text{M}$  SC79 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von SC79 auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 4$  (Ausnahme: Oligodendrozyten-Differenzierung:  $n = 3$ ) unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.4.2 Hemmung des PI3K-PKB-Signalweges

LY294002 bindet an die ATP-Bindungsstelle der PI3K, wodurch es die Aktivität des Enzyms reversibel inhibiert. LY294002 kam in Konzentrationen von 0,014  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  zur Anwendung.

#### 3.4.2.1 Effekte einer Hemmung des PI3K-PKB-Signalweges unter proliferierenden Bedingungen

LY294002 steigert in den höheren Konzentrationen tendenziell die DNS-Syntheserate, am deutlichsten bei 10  $\mu\text{M}$  (+29 %). Da dieser Effekt aber nicht bei allen Individuen zu beobachten ist, wird hier kein signifikantes Ergebnis erreicht. Die Flächenzunahme und die Viabilität werden durch LY294002 nicht beeinflusst. LY294002 wirkt nicht zytotoxisch (siehe Abb. 27).



**Abb. 27: Einfluss von LY294002 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

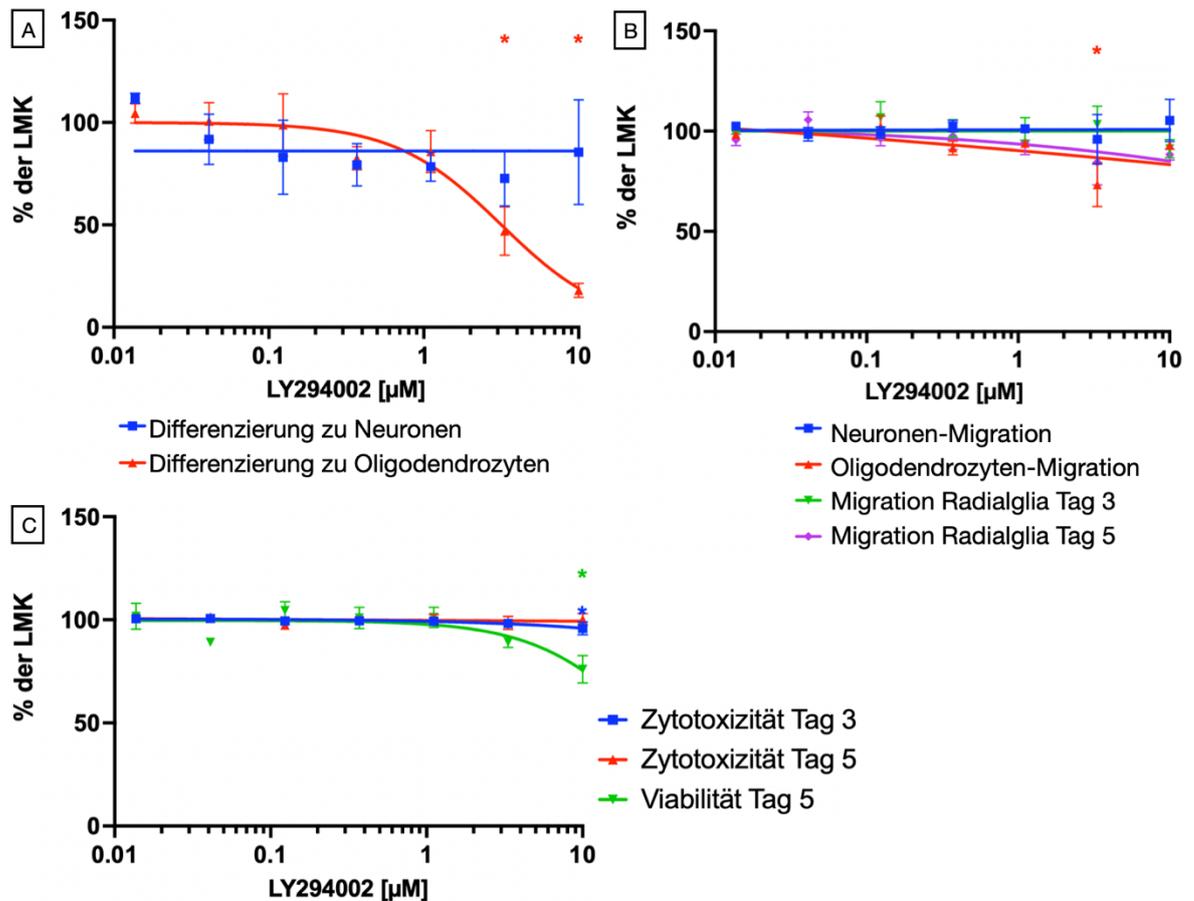
Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041 und 0,014  $\mu\text{M}$  LY294002 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von LY294002 auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 4$  (BrdU-Einbau  $n = 3$ ) unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

#### 3.4.2.2 Effekte einer Hemmung des PI3K-PKB-Signalweges unter differenzierenden Bedingungen

Unter differenzierenden Bedingungen senkt LY294002 in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Viabilität signifikant um 23,97 %. Zytotoxizität zeigt sich nicht.

Während sich keine Veränderungen der neuronalen Differenzierung und Migration zeigen, wird die Oligodendrozyten-Differenzierung bei 3,33  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  LY294002 (-53,04 % bzw. -82,01 %) und die Oligodendrozyten-Migration bei 3,33  $\mu\text{M}$  (-26,73 %) jeweils signifikant reduziert.

Die allgemeine radiale Migration wird nicht beeinflusst (siehe Abb. 28).



**Abb. 28: Einfluss von LY294002 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041 und 0,014 μM LY294002 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von LY294002 auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem β3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte ± SEM aus n = 4 (Ausnahmen: neuronale Differenzierung und die Differenzierung zu Oligodendrozyten und Migration und Migration Radialglia Tag 5: jeweils bei 10 μM: n = 3) unabhängigen Experimenten; \* = p<0,05 bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

### 3.5 Der Einfluss von CREB

#### 3.5.1 CREB-Aktivierung

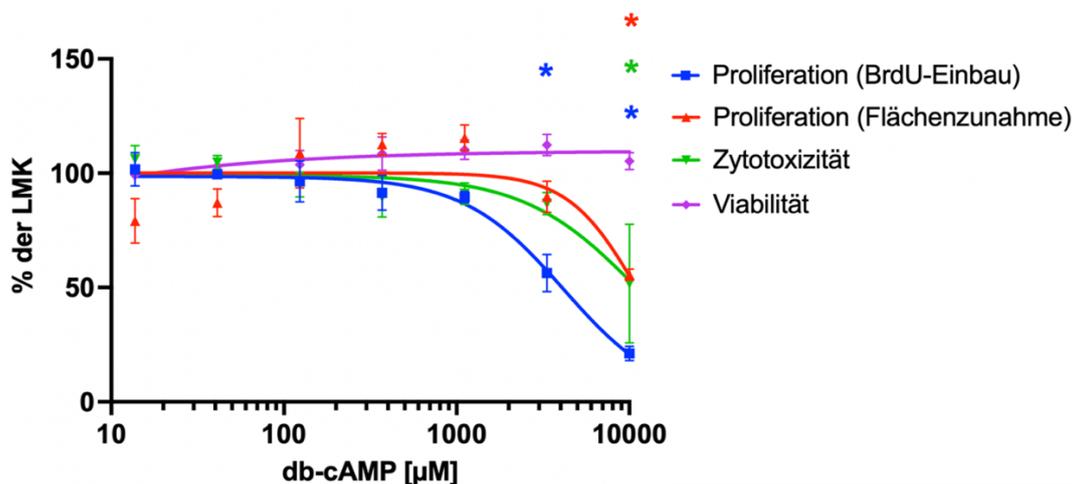
CREB kann über den MAPK-Signalweg und durch die CaMKII phosphoryliert und aktiviert werden (siehe 1.1 Zelluläre Schlüsselprozesse der menschlichen Gehirnentwicklung). Daneben gibt es noch die Möglichkeit der CREB-Phosphorylierung

durch die PKA<sup>31</sup>, welche ihrerseits durch cAMP<sup>32</sup> aktiviert wird (Delghandi et al., 2005). In dieser Arbeit wurde cAMP in Form des lipophilen und somit Zellmembranpermeablen db<sup>33</sup>-cAMP verwendet, um CREB indirekt über die PKA zu aktivieren. Db-cAMP kam in Konzentrationen von 13,27  $\mu\text{M}$  bis 10 mM zur Anwendung.

### 3.5.1.1 Effekte einer CREB-Aktivierung unter proliferierenden Bedingungen

Db-cAMP wirkt in der höchsten Konzentration (10000  $\mu\text{M}$ ) signifikant zytotoxisch (-51,71 %).

Die Proliferation ist in dieser Konzentration deutlich und signifikant reduziert (BrdU-Einbau: -78,83 %; Flächenzunahme: -44,4 %). Der BrdU-Einbau ist auch in einer nicht zytotoxischen Konzentration (3333,33  $\mu\text{M}$ ) signifikant vermindert (-43,64 %). Die Viabilität wird in den oberen sechs db-cAMP-Konzentrationen tendenziell, aber nicht signifikant gesteigert, am stärksten bei 3333,33  $\mu\text{M}$  (+12,35 %) (siehe Abb. 29).



**Abb. 29: Einfluss von db-cAMP auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 10000; 3333,33; 1111,11; 370,37; 123,46; 41,15 und 13,72  $\mu\text{M}$  db-cAMP behandelt. Als LMK wurde reines B27-Medium verwendet. Der Einfluss von db-cAMP auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

<sup>31</sup> Proteinkinase A

<sup>32</sup> cyclisches Adenosinmonophosphat

<sup>33</sup> dibutyryl

### **3.5.1.2 Effekte einer CREB-Aktivierung unter differenzierenden Bedingungen**

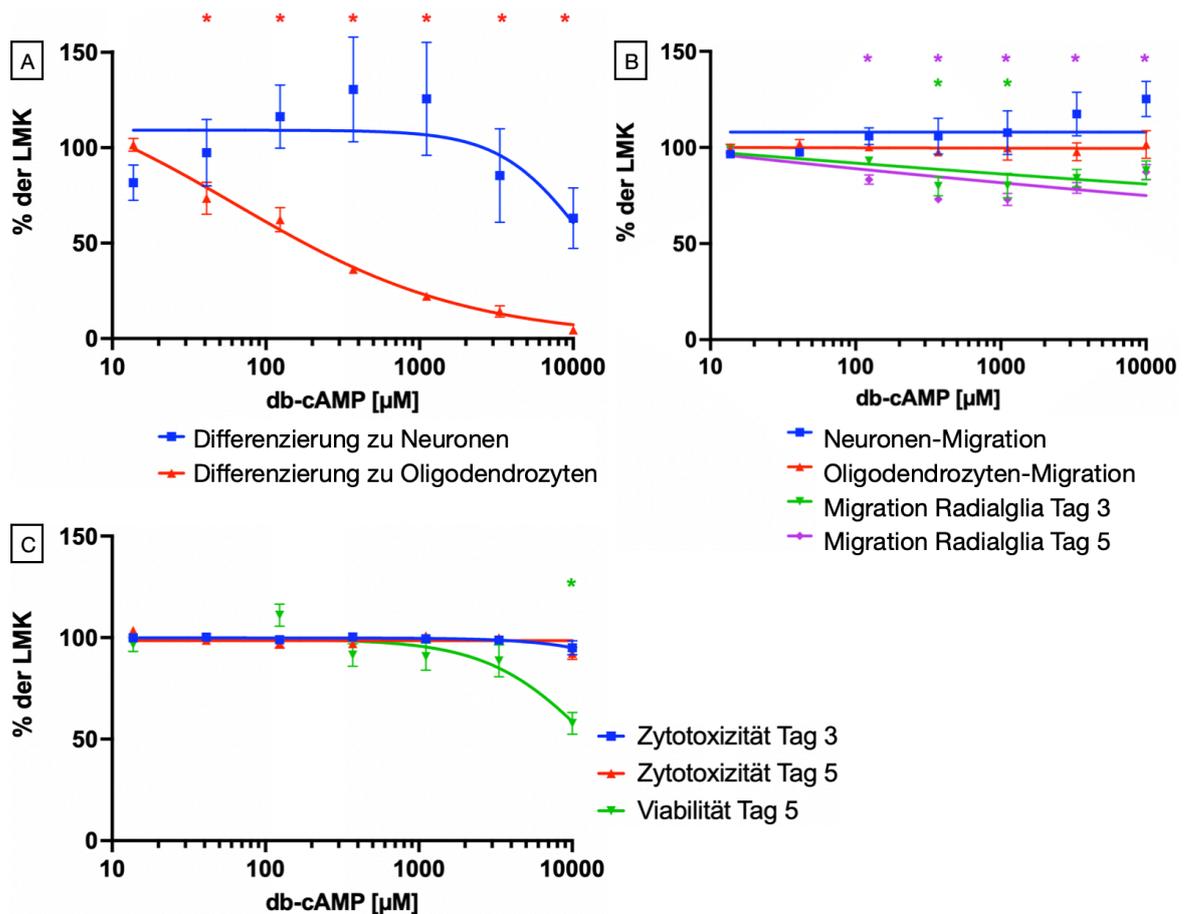
Die Viabilität wird durch 10000  $\mu\text{M}$  db-cAMP unter differenzierenden Bedingungen signifikant vermindert (-42,25 %). Es zeigt sich keine Zytotoxizität.

Mit zunehmenden db-cAMP-Konzentrationen differenzieren weniger NPCs in Oligodendrozyten. Dieser antiproportionale Effekt besteht in den oberen sechs Konzentrationen und ist jeweils signifikant (41,15  $\mu\text{M}$ : -26,53 %; 123,46  $\mu\text{M}$ : -37,67 %; 370,37  $\mu\text{M}$ : -63,76 %; 1111,11  $\mu\text{M}$ : -77,79 %; 3333,33  $\mu\text{M}$ : -85,79 %; 10000  $\mu\text{M}$ : -95,5 %) (siehe Abb. 31).

Auf die neuronale Differenzierung ergibt sich wegen zu hoher Standardfehler kein klarer Effekt.

Neurone legen bei 3333,33  $\mu\text{M}$  und 10000  $\mu\text{M}$  db-cAMP tendenziell weitere Migrationsdistanzen zurück (+17,42 % bzw. +25,28 %, jeweils nicht signifikant), während sich die Oligodendrozyten-Migration nicht verändert.

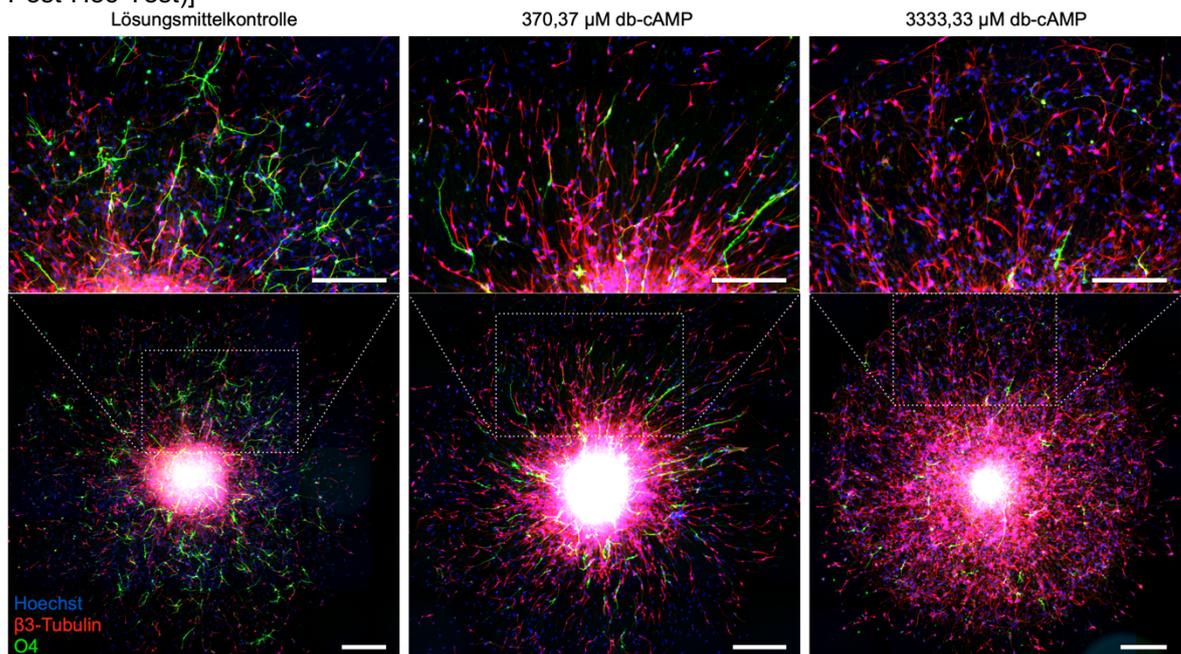
Die allgemeine radiale Zellmigration hingegen wird durch db-cAMP signifikant reduziert (nach drei Tagen: 370,37  $\mu\text{M}$ : -20,08 %; 1111,11  $\mu\text{M}$ : -19,86 % und nach fünf Tagen: 123,46  $\mu\text{M}$ : -16,69 %; 370,37  $\mu\text{M}$ : -26,96 %; 1111,11  $\mu\text{M}$ : -27,04 %; 3333,33  $\mu\text{M}$ : -21,02 %; 10000  $\mu\text{M}$ : -12,74 %) (siehe Abb. 30).



**Abb. 30: Einfluss von db-cAMP auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 10000; 3333,33; 1111,11; 370,37; 123,46; 41,15 und 13,72  $\mu\text{M}$  db-cAMP behandelt. Als LMK wurde reines N2-Medium verwendet. Der Einfluss von db-cAMP auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen

Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]



**Abb. 31: Einfluss von db-cAMP auf die Differenzierung von hNPCs zu Oligodendrozyten und Neuronen**

Gezeigt sind repräsentative fluorezenzmikroskopische Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung von humanen primären Neurosphären nach Behandlung mit db-cAMP unter differenzierenden und migrierenden Bedingungen. Als LMK wurde reines N2-Medium verwendet. Db-cAMP wurde in sieben verschiedenen Konzentrationen getestet; hier sind beispielhaft Bilder nach Behandlung mit 370,07  $\mu\text{M}$  db-cAMP und mit 3333,33  $\mu\text{M}$  db-cAMP dargestellt. Nach fünftägiger Inkubation wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33258 (blau), die Neurone mit Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Tubulin (rot) und die Oligodendrozyten mit Antikörpern gegen O4 (grün) gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Cellomics Array Scan VTI HSC Reader (Thermo Fisher) und der prozentuale Anteil an Neuronen und Oligodendrozyten im Vergleich zur LMK wurde durch die Software Omnisphero bestimmt (siehe 2.2.3.2 **Immunzytochemische Färbungen zur Differenzierungs- und Migrationsanalyse**). Die weißen Größenmaßstabsbalken entsprechen 300  $\mu\text{m}$  in der unteren Reihe bzw. 200  $\mu\text{m}$  in der oberen Reihe.

### 3.5.2 CREB-Hemmung

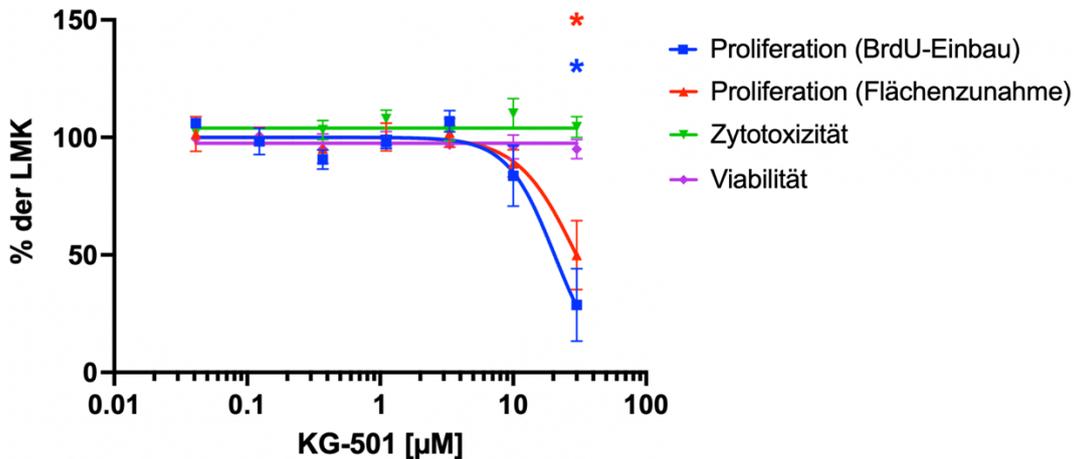
KG-501 hemmt die Interaktion zwischen CREB und dessen Kofaktor *CREB-binding-protein*, was in einer reduzierten Transkription CREB-abhängiger Gene resultiert ([https://www.medchemexpress.com/KG-501.html?locale=de-DE?src=google-product&gclid=Cj0KCQiA2-2eBhCIARIsAGLQ2RkoHHuY25vcsCe2UkeNrnUKnoePjOIAomFpmXGkdXsxXrbFOCoMBcgaAgQ7EALw\\_wcB](https://www.medchemexpress.com/KG-501.html?locale=de-DE?src=google-product&gclid=Cj0KCQiA2-2eBhCIARIsAGLQ2RkoHHuY25vcsCe2UkeNrnUKnoePjOIAomFpmXGkdXsxXrbFOCoMBcgaAgQ7EALw_wcB), Stand 2.2.2023).

KG-501 wurde in Konzentrationen von 0,041  $\mu\text{M}$  bis 30  $\mu\text{M}$  untersucht. Unter differenzierenden Bedingungen zeigte sich in der höchsten Konzentration eine starke Zytotoxizität (hier nicht gezeigt), weshalb die Versuche für NPC2-5 mit Konzentrationen von 0,004  $\mu\text{M}$  bis 3  $\mu\text{M}$  wiederholt wurden.

### 3.5.2.1 Effekte einer CREB-Hemmung unter proliferierenden Bedingungen

KG-501 inhibiert bei 30  $\mu\text{M}$  die Proliferation deutlich und signifikant (BrdU-Einbau: -71,31 %; Flächenzunahme: -50,06 %).

Es zeigt sich kein Einfluss auf die Viabilität und keine Zytotoxizität (siehe Abb. 32).



**Abb. 32: Einfluss von KG-501 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 72 Stunden lang unter proliferierenden Bedingungen in B27-Medium mit 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041  $\mu\text{M}$  KG-501 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in B27-Medium verwendet. Der Einfluss von KG-501 auf die Proliferation wurde anhand des BrdU-Einbaus in die DNS und der Flächenzunahme untersucht. Die Zytotoxizität wurde mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  (Ausnahme: Viabilität  $n = 2$ ) unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)].

### 3.5.2.2 Effekte einer CREB-Hemmung unter differenzierenden Bedingungen

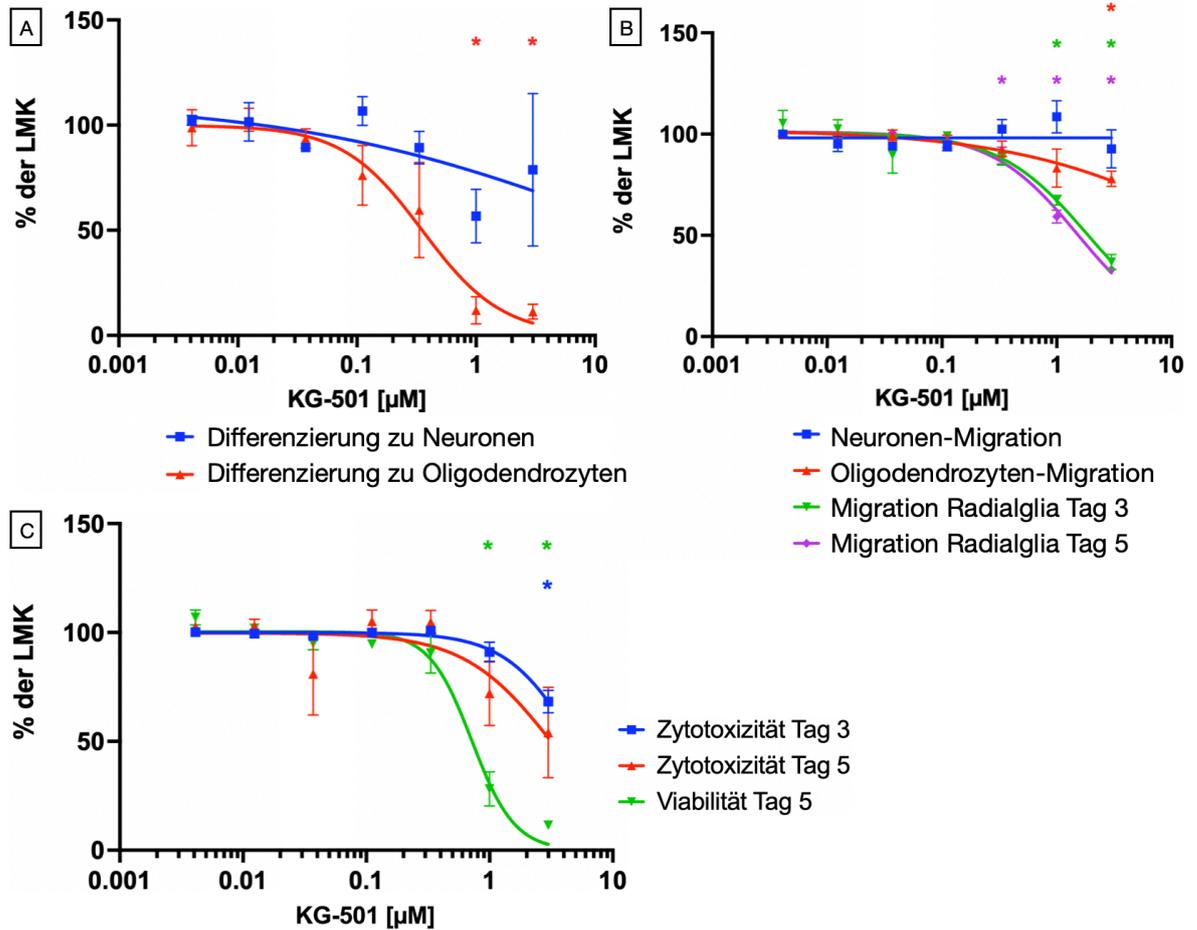
KG-501 ist unter differenzierenden Bedingungen bei 3  $\mu\text{M}$  zytotoxisch (nach drei Tagen: -31,7 %, signifikant; nach fünf Tagen: -45,91 %, nicht signifikant).

Die Zell-Viabilität wird durch 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  KG-501 deutlich und signifikant reduziert (-71,84 % bzw. -88,49 %).

Die allgemeine radiale Migration ist in den zytotoxischen KG-501-Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  signifikant vermindert (nach drei Tagen: -32,69 % bzw. -63,21 % und nach fünf Tagen: -40,8 % bzw. -66,81 %). Zusätzlich wird die allgemeine radiale Migration nach fünf Tagen auch in einer nicht-zytotoxischen KG-501-Konzentration (0,33  $\mu\text{M}$ ) signifikant gehemmt (-10,59 %). Die Migration der Oligodendrozyten zeigt sich bei 3  $\mu\text{M}$  signifikant um 22,03 % reduziert, die neuronale Migration wird hingegen nicht verändert.

Es lassen sich nach fünf Tagen in den zytotoxischen KG-501-Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  signifikant weniger Oligodendrozyten nachweisen (-88,1 % bzw. -88,7 %).

Auf die neuronale Differenzierung lässt sich aufgrund zu hoher Standardabweichungen kein klarer KG-501-Einfluss definieren (siehe Abb. 33).



**Abb. 33: Einfluss von KG-501 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)**

Neurosphären mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurden 120 Stunden lang unter differenzierenden Bedingungen in N2-Medium mit 30; 10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12; 0,041  $\mu\text{M}$  KG-501 behandelt. Als LMK wurde 0,1 % DMSO in N2-Medium verwendet. Der Einfluss von KG-501 auf die allgemeine Radialglia-Migration wurde nach 72 h mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern mit dem Programm ImageJ gemessen. Nach 120 h erfolgte eine Zellkern-Färbung mit Hoechst 33258, sowie eine immunzytochemische Färbung der Neurone mit einem  $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper und der Oligodendrozyten mit einem O4-Antikörper. Dies ermöglichte mithilfe des Programms Omnisphero eine Untersuchung der allgemeinen und der zellspezifischen (Neuronen- und Oligodendrozyten-) Migration sowie der Neuronen- und der Oligodendrozyten-Differenzierung. Die Zytotoxizität wurde nach drei und nach fünf Tagen mittels LDH-Assay und der Einfluss auf die Viabilität nach 5 Tagen mithilfe des Alamar-Blue-Assays bestimmt. Pro Bedingung wurden 5 technische Replikate mitgeführt, von welchen mindestens 3 zur Auswertung herangezogen wurden. Die Daten sind als prozentualer Anteil der jeweiligen Kontrolle dargestellt. [Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \* =  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweilige Kontrolle (einfaktorieller ANOVA + Bonferroni-Post-Hoc-Test)]

## 4 Diskussion

Tabelle 6 und 7: Übersicht über die Effekte des Modulierens von BDNF- und PDGF-vermittelten Signalwegen im humanen Neurosphären-Assay

		TrkB-Rezeptor		PDGF-Rezeptor	
		+	-	+	-
		BDNF	ANA-12	PDGF	CP-673451
NPC1ab: Proliferation	BrdU-Einbau	k.E.	(↓)	(↓)	↓
	Flächenzunahme	k.E.	(↓)	k.E.	↑↓
Zytotoxizität & Viabilität (NPC1ab)	Zytotoxizität	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
	Viabilität	k.E.	k.E.	k.E.	↓
NPC2: Migration	Migration 72 h	k.E.	↓	(↑)	↓
	Migration 120 h	k.E.	↓	(↑)	(↓)
	Migration Neurone	k.E.	(↑)	k.E.	k.E.
	Migration Oligodendrozyten	k.E.	(↓)Z	k.E.	k.E.
NPC3&5: Differenzierung	Differenzierung in Neurone	k.E.	(↓)	k.E.	↓Z
	Differenzierung in Oligodendrozyten	k.E.	↓Z	(↓)	↓
Zytotoxizität & Viabilität (NPC2-5)	Zytotoxizität 72 h	k.E.	k.E.	k.E.	Z
	Zytotoxizität 120 h	k.E.	Z	k.E.	Z
	Viabilität	↑	↓Z	(↑)	↓Z

+: Aktivator des Signalweges

-: Inhibitor des Signalweges

↑: signifikant gesteigert

↓: signifikant vermindert in mindestens einer nicht zytotoxischen Konzentration

( ): Tendenz, nicht signifikant

Z: signifikant zytotoxisch

↓Z: nur in zytotoxischer Konzentration signifikant vermindert

↑↓: in kleinerer Konzentration Steigerung, in höherer Konzentration Verminderung

k.E.: kein Effekt

		PLCy		PI3K-PKB		CREB	
		+	-	+	-	+	-
		m-3 M3FBS	U73 122	SC7 9	LY29 4002	db- cAMP	KG- 501
NPC1ab: Proliferation	BrdU-Einbau	(↓)	k.E.	(↓)	(↑)	↓	↓
	Flächenzunahme	k.E.	k.E.	(↓)	k.E.	↓ <b>Z</b>	↓
Zytotoxizität & Viabilität (NPC1ab)	Zytotoxizität	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	<b>Z</b>	k.E.
	Viabilität	↓	k.E.	k.E.	k.E.	(↑)	k.E.
NPC2: Migration	Migration 72 h	↓	↓	k.E.	k.E.	↓	↓ <b>Z</b>
	Migration 120 h	↓	↓ <b>Z</b>	k.E.	k.E.	↓	↓
	Migration Neu- rone	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	(↑)	k.E.
	Migration Oli- godendrozyten	k.E.	k.E.	k.E.	↓	k.E.	↓ <b>Z</b>
NPC3&5: Differenzierung	Differenzierung in Neurone	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.
	Differenzierung in Oligodendrozyten	↓	k.E.	k.E.	↓	↓	↓ <b>Z</b>
Zytotoxizität & Viabilität (NPC2-5)	Zytotoxizität 72 h	<b>Z</b>	k.E.	<b>Z</b>	k.E.	k.E.	<b>Z</b>
	Zytotoxizität 120 h	<b>Z</b>	<b>Z</b>	k.E.	k.E.	k.E.	( <b>Z</b> )
	Viabilität	↓	k.E.	k.E.	↓	↓	↓

Das Ziel dieser Arbeit ist zum einen, im Rahmen der wissenschaftlichen (mechanistischen) Validierung des Neurosphären-Assays (Koch et al. 2022) zu überprüfen, inwieweit die hier getesteten Signalwege PDGF/PDGFR, CREB, PLCy, PI3K-PKB und BDNF/TrKB in den humanen NPCs abgebildet sind. Zum anderen soll der Einfluss der Signalwege auf bestimmte zelluläre Schlüsselprozesse spezifiziert werden, von welchen man weiß, dass eine Störung ihres Ablaufs zu einer pathologischen Gehirnentwicklung und neurologischen Krankheitsbildern führen kann (Nagahara & Tuszynski, 2011; Fritsche, Crofton, et al., 2017; Sil et al., 2018). Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden in den Kontext der publizierten wissenschaftlichen Literatur gesetzt.

Wenn in den hier durchgeführten Versuchen das gezielte pharmazeutische Modulieren eines Signalweges zu einer Veränderung der Endpunkte Proliferation, Migration oder Differenzierung führt, ist also anzunehmen, dass der entsprechende Signalweg in den humanen NPCs aktiv und bedeutend für die Entwicklung des ZNS

ist. Führt eine Substanz in einem Endpunkt hingegen zu keiner Veränderung, lässt sich eine Rolle des untersuchten Signalweges für den entsprechenden Schlüsselprozess der Hirnentwicklung für das spezifische Zeitfenster der Entwicklung (16-te und 19-te GW) ausschließen, da die verwendeten Zellen von zwei Feten aus der 16-ten und einem Fetus aus der 19-ten GW stammen. Somit bilden sie bestimmte Zeitpunkte in der fetalen Gehirnentwicklung ab, zu welchen einige Signalwege möglicherweise nicht aktiv sind. Zudem bildet das hier genutzte Zellsystem nicht alle Schlüsselprozesse der Gehirnentwicklung ab, so dass auch die Ermangelung eines Prozesses, wie zum Beispiel der Synaptogenese, zu einem negativen Testergebnis in dieser Arbeit führen kann. Vor diesem Hintergrund werden im Folgenden die Ergebnisse diskutiert.

Bei den nachfolgend beschriebenen Effekten handelt es sich um solche, welche in mindestens einer nicht zytotoxischen Konzentration signifikant sind. Ist ein Effekt nicht signifikant, so ist er im Text als solcher oder als „tendenziell“ beschrieben.

#### **4.1 Das Modulieren des BDNF-Rezeptors TrkB im humanen Neurosphären-Assay**

Die Aktivierung von TrkB durch BDNF wirkt sich weder auf die gemessene Proliferationsrate noch auf die Aktivität der mitochondrialen Reduktasen (als Viabilität angegeben) der hNPCs in B27-Medium aus. In N2-Medium, welches im Gegensatz zu B27 nicht die Wachstumsfaktoren EGF und FGF enthält, steigt jedoch die Viabilität proportional zur BDNF-Konzentration (siehe Abb. 14 C). Dies lässt sich möglicherweise durch eine vermehrte Zellproliferation in der Migrationsfläche erklären, da durch gesteigerte Proliferation die Menge an mitochondrialen Reduktasen in der Migrationsfläche wächst, welche Resazurin zu im Alamar-Blue-Assay messbaren Resorufin umsetzen können (Fritsche et al., 2018). Aus Studien mit humanen NSCs, adulten Nager-Hirnzellen und verschiedenen differenzierten Neuronen-Subtypen weiß man, dass EGF und FGF unter anderem über MAPK, PLC $\gamma$  und PI3K die Proliferation steigern<sup>34</sup> (X. Chen et al., 2019; Ma et al., 2009; Peltier et al., 2007; Sütterlin et al., 2013; Voigt et al., 1996; Wang & Wang, 2003). Es ist ebenfalls bekannt, dass auch BDNF über die genannten intrazellulären Signalkaskaden wirkt (siehe 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung). Eine Theorie ist, dass eine BDNF-Zugabe – wie hier gezeigt – nicht

---

<sup>34</sup> Eine EGF-abhängige PLC $\gamma$ -Aktivierung ist bislang jedoch nur aus nicht-neuronalen Zellen bekannt.

zu einer weiteren Steigerung der Proliferation führt, wenn die Kapazitäten dieser Signalwege bereits durch EGF- und FGF-abhängige Aktivierung gesättigt sind.

In zukünftigen Studien könnte man BDNF höher dosieren, da durch die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen außer einer Viabilitätserhöhung keine direkten BDNF-Einflüsse beobachtet werden können, eine BDNF-Antagonisierung mit ANA-12 jedoch – wie weiter unten erläutert – einen relevanten Einfluss des BDNF-TrkB-Signalweges auf diverse Endpunkte des Neurosphären-Assays zeigt. Da BDNF in den hier angewandten Dosen nicht zytotoxisch ist, ergibt sich Spielraum für solche Konzentrationssteigerungen.

Die Hemmung von TrkB durch ANA-12 führt tendenziell zu einer Verminderung der Proliferation (siehe Abb. 15), was die zuvor begründete Möglichkeit einer BDNF-vermittelten Proliferationssteigerung wahrscheinlicher macht.

Die allgemeine radiale Zellmigration wird durch eine ANA-12-Behandlung reduziert (siehe Abb. 16 B), was einen Hinweis auf eine spiegelbildliche Migrations-fördernde Rolle von BDNF in hNPCs gibt. Gestützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse einer Studie, welche sich ebenfalls eines humanen Neurosphären-Assays bediente und zeigte, dass BDNF zu einer Steigerung der EGF-induzierten Migration von hNPCs führt (Q. Zhang et al., 2011).

Besonders bedeutsam erscheint der Einfluss von BDNF auf die Entwicklung der Neurone: Eine TrkB-Inhibierung mit 10  $\mu\text{M}$  ANA-12 führt zu nicht signifikanten, aber deutlichen Veränderungen in der neuronalen Migration und Differenzierung (Migration: +62,8 %,  $p = 0,0788$ ; Differenzierung: -63,61 %,  $p = 0,1197$ ). Die letztgenannten Effekte werden durch eine Dosiserhöhung auf 30  $\mu\text{M}$  ANA-12 nicht mehr gesteigert, was sich durch den zytotoxischen Effekt dieser Konzentration erklären lässt. Die beobachtete tendenzielle Hemmung der neuronalen Differenzierung durch BDNF-Antagonisierung deutet auf einen fördernden Effekt von BDNF auf die Neurogenese hin und steht somit im Einklang mit einigen Studien mit adulten humanen Hirnzellen sowie *in vivo* und *in vitro* Maus- und Rattenversuchen (Durany et al., 2000; Gil et al., 2005; Grote et al., 2005; Lee et al., 2016; Numakawa et al., 2010; Siegel & Chauhan, 2000; Zuccato et al., 2001). Dabei muss bedacht werden, dass BDNF neben seinem bekanntesten Rezeptor TrkB auch über den p75-Rezeptor die neuronale Differenzierung fördern kann, wie an Maus-NPCs gezeigt wurde (Hosomi et al., 2003). Im Gegensatz zu den eben genannten Daten und den Ergebnissen

der vorliegenden Arbeit beschreibt eine andere Publikation eine Steigerung der Neurogenese von hippocampalen Mauszellen durch ANA-12 (Groves et al., 2019). Die auf Ergebnissen aus *in vivo* Maus und *in vitro* Ratten-Versuchen basierende Hypothese, dass BDNF die Oligodendrozyten-Differenzierung steigert (Miyamoto et al., 2015), kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit weder gestützt noch widerlegt werden.

Ein BDNF-TrkB-Einfluss auf die Hirnentwicklung, insbesondere auf die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes, ist aus vielen tierbasierten Versuchen bekannt (siehe 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung, Abschnitt BDNF) und wird auch durch die hier gezeigten Ergebnisse nahegelegt. Es sollten zukünftig nicht nur Versuche mit höheren BDNF-Konzentrationen erfolgen, sondern auch anhand von hNPCs der BDNF-Einfluss auf weitere zelluläre Schlüsselprozesse, wie Synaptogenese, synaptische Plastizität, neuronale elektronische Aktivität und astrozytäre Differenzierung und Migration getestet werden.

## **4.2 Das Modulieren des PDGF-Rezeptors im humanen Neurosphären-Assay**

Eine Aktivierung des PDGF-Rezeptors durch PDGF unter migrierenden und differenzierenden Bedingungen führt zu einer tendenziellen Steigerung der Aktivität der mitochondrialen Reduktase um durchschnittlich 33,42% (siehe Abb. 18 C). Da in dieser Arbeit die Grenze zum Erreichen des Signifikanzniveaus auf einen p-Wert von 0,05 festgelegt wurde, verfehlt die Viabilitäts-Steigerung diese mit einem p-Wert von 0,063 zwar knapp, lässt sich aber als relevant diskutieren. In B27-Medium, welches EGF und FGF enthält, fallen keine relevanten Veränderungen der Proliferationsrate auf. Der tendenziell geringere BrdU-Einbau in der höchsten PDGF-Konzentration ist mit einem p-Wert von 0,26 am ehesten durch einen Standardfehler bedingt, auch da die Flächenzunahme nicht abnimmt.

Somit scheint es möglich, dass PDGF, wie auch BDNF (siehe 4.1 Das Modulieren des BDNF-Rezeptors TrkB im humanen ) über MAPK, PI3K und PLC $\gamma$  zu einer vermehrten hNPC-Proliferation führt, wenn die genannten Signalwege nicht bereits durch EGF und FGF aktiviert sind. Dafür spricht auch, dass eine Hemmung des PDGF-Rezeptors mit 5  $\mu$ M CP-673451 die Proliferation (BrdU-Einbau und Flächenzunahme) und die Viabilität signifikant senkt (siehe Abb. 19 und Abb. 20 C). Die Viabilitätsabnahme bei fehlender Zytotoxizität kann dadurch erklärt werden, dass

aufgrund der reduzierten Proliferationsrate weniger Zellen und somit weniger mitochondriale Reduktasen vorliegen. Bei einer niedrigeren CP-673451-Konzentration von 0,56  $\mu\text{M}$  kommt es paradoxerweise zu einer Steigerung der Flächenzunahme und somit zu einer scheinbaren Erhöhung der Proliferationsrate, was sich in einem glockenförmigen Kurvenverlauf widerspiegelt. Im Gegensatz dazu wird die DNS-Syntheserate in dieser Dosis nicht relevant verändert (siehe Abb. 19). Da der BrdU-Einbau in die DNS der spezifischere Endpunkt für Änderungen der Proliferationsrate ist, liegt hier jedoch am ehesten kein echter Proliferations-steigernder Effekt vor: Die erhöhte Flächenzunahme weist auf eine vermehrte Sphärengroße hin, deren Ursache neben einer vermehrten Zellzahl durch gesteigerte Proliferation auch eine aufgelockerte Neurosphäre mit geringerer Zelldichte oder ein größeres Volumen der einzelnen Zellen sein kann, wohingegen ein erhöhter BrdU-Einbau direkt auf eine gesteigerte Zellteilungs-Rate hindeutet.

Die erläuterten Hinweise auf eine Proliferationssteigerung durch PDGF decken sich mit den Ergebnissen aus Studien mit Hirnrindenzellen von Ratten-Embryonen und hippocampalen Ratten-NPCs (Erlandsson et al., 2001; Yao et al., 2012).

Es ist bekannt, dass PDGF die Migration von Oligodendrozyten-Progenitorzellen von Ratten anregt (Singh et al., 2019). Auch in der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass PDGF tendenziell die allgemeine radiale hNPC-Migration steigert (siehe Abb. 18 B). Es ist wahrscheinlich, dass diese Tendenz auf einem tatsächlichen Effekt beruht, da die hNPCs unter CP-673451-Behandlung signifikant weniger migrieren (siehe Abb. 20 B).

Interessant ist der Einfluss des PDGF-Rezeptors auf die Oligodendrozyten-Differenzierung, da diese sowohl durch PDGF (-43,61 %, nicht signifikant) als auch durch CP-673451 (-57,72 % in der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration 1,11  $\mu\text{M}$ , signifikant) verringert wird (siehe Abb. 18 A und Abb. 20 A). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass jegliche Manipulation des natürlichen Ablaufes des PDGFR-Signalweges – ob Aktivierung oder Hemmung – zu einer Störung und somit verminderten Ausreifung von Oligodendrozyten führt. Auch einige Ratten- und Mausversuche zeigen die Wichtigkeit von PDGF für die Oligodendrozyten-Differenzierung (Fruttiger et al., 1999; Murtie et al., 2005; Richardson et al., 1988), welche in weiteren Studien mit humanen Zellen spezifiziert werden sollte.

### **4.3 Zwischenfazit: Analyse des Modulierens der Rezeptor-Tyrosinkinasen TrkB und PDGFR im humanen Neurosphären-Assay**

Auffällig ist die Analogie zwischen den Ergebnissen des Modulierens des BDNF-Rezeptors TrkB (siehe 4.1 Das Modulieren des BDNF-Rezeptors TrkB im humanen ) und des PDGF-Rezeptors (siehe 4.2 Das Modulieren des PDGF-Rezeptors im humanen ): Eine Aktivierung führt jeweils zu einer erhöhten mitochondrialen Aktivität, was sich möglicherweise durch eine vermehrte Proliferation begründen lässt. Dies lässt sich aber nur beobachten, wenn den Zellen kein EGF und kein FGF im Medium angeboten wird. Eine Hemmung der Rezeptoren mindert jeweils signifikant die Proliferation. Darüber hinaus bestehen weitere Parallelen in den Auswirkungen einer Inhibierung beider Rezeptoren: ANA-12 und CP-673451 führen jeweils zu einer Reduktion der allgemeinen radialen Migrationsdistanz, einer Minderung der Viabilität und wirken zytotoxisch. Dies legt nahe, dass BDNF und PDGF – wie aus Nager-basierten Studien bekannt – auch in humanen NPCs über die gleichen intrazellulären Signalkaskaden wirken und so das Verhalten der Zellen beeinflussen: Beginnend mit einer Aktivierung der jeweiligen Rezeptor-Tyrosinkinase und konsekutiv über die PI3K, die PLC $\gamma$  und den MAPK-Signalweg (siehe 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung

Das unterstützt die Hypothese, dass die hier untersuchten, aus Tierversuchen und Tierzell-basierten *in vitro* Studien bekannten Signalwege auch in hNPCs abgebildet sind und sich in humanen Assays wie dem Neurosphären-Assay testen lassen.

Eine Möglichkeit für zukünftige Studien wäre, BDNF und PDGF (welche in den hier verwendeten Konzentrationen jeweils nicht zytotoxisch sind) nicht nur in höheren Konzentrationen, sondern auch ohne Zugabe von EGF und FGF oder unter Zugabe nur eines dieser beiden Wachstumsfaktoren im Hinblick auf Änderungen der Proliferationsrate zu testen. So ließe sich die hier formulierte Hypothese überprüfen, dass BDNF, PDGF, EGF und FGF sich in hNPCs intrazelluläre *second-* und *third-messengers* teilen und untersuchen, welche Wachstumsfaktor-Kombinationen durch Ko-Stimulation eine Übersättigung dieser Signalwege hervorrufen, sodass es zu keiner weiteren Steigerung der Proliferation kommt. Auch wäre es auf diese Weise möglich herauszufinden, wie stark der jeweilige alleinige Einfluss der genannten Botenstoffe auf die Proliferation ist. Es existiert bereits eine solche Studie, welche in einem humanen Neurosphären-Assay die Kombination aus EGF und BDNF ohne FGF getestet hat und zeigt, dass BDNF die EGF-induzierte Proliferation noch weiter erhöht (Q. Zhang et al., 2011).

Die aus Tierzell-basierten Versuchen und aus Untersuchungen an Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen bekannte zyto- und neuroprotektive Rolle von PDGF und BDNF (Colucci-D'amato et al., 2020; Funa & Sasahara, 2014; Sil et al., 2018; Tang et al., 2010) wird in dieser Arbeit durch die gesteigerte Viabilität und fehlende Zytotoxizität gestützt.

#### **4.4 Das Modulieren der PLCy im humanen Neurosphären-Assay**

Eine Aktivierung der PLCy mit m-3M3FBS führt zu einer deutlichen Reduktion der Oligodendrozyten-Differenzierung in drei nicht-zytotoxischen Konzentrationen (siehe Abb. 22 A). Dass hier die neuronale Differenzierung weder durch Aktivierung noch Hemmung der PLCy verändert wird (siehe Abb. 22 A), bedeutet, dass die hNPCs entweder in ihrem Stammzellstatus verbleiben oder vermehrt in Astrozyten differenzieren, welche in dieser Arbeit jedoch nicht gefärbt wurden. Daten aus Studien mit Nager-Zellen sprechen für einen PLCy-induzierten Verbleib im Stammzellstatus und eine vermehrte Stammzell-Proliferation (Lai & Feng, 2004; Ma et al., 2009). Eine Änderung der Proliferation wird in dieser Arbeit aber nicht gesehen.

Eine aktivierte PLCy führt über DAG zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums, (Minichiello, 2009), welches wiederum die Migration der Zellen durch Modulieren des Zytoskeletts fördert (Tsai et al., 2015). Dies ist ein möglicher Grund für die hier gezeigte verminderte allgemeine Radialglia-Migration durch den PLCy-Inhibitor U73122 (siehe Abb. 24 B). Allerdings führt paradoxerweise auch eine PLCy-Aktivierung mit m-3M3FBS zu einer verminderten allgemeinen radialen Radialglia-Migration (siehe Abb. 22 B). Neben einem unspezifischen störenden Einfluss der Substanz auf die Zellen wäre ein anderer Grund, dass ein potenzieller PLCy-induzierter zu hoher Kalzium-Spiegel schädigend für die intrazelluläre Homöostase ist und außerdem pro-apoptische Signale vermittelt (Orrenius et al., 2015). Das könnte nicht nur die Migrationsfähigkeit einschränken, sondern auch eine Ursache für die verminderte Viabilität (unter proliferierenden und differenzierenden Bedingungen) und die Zytotoxizität (unter differenzierenden Bedingungen) unter m-3M3FBS-Behandlung sein (siehe Abb. 21 und Abb. 22 C).

Während die Ergebnisse dieser Arbeit die Relevanz der PLCy für die allgemeine Radialglia-Migration nahelegen, zeigt sich weder durch PLCy-Aktivierung noch durch ihre Hemmung eine Änderung der zellspezifischen Migrationsdistanz von Neuronen oder Oligodendrozyten.

#### **4.5 Das Modulieren des PI3K-PKB-Signalweges im humanen Neurosphären-Assay**

Wird die PKB durch die PI3K aktiviert, so kann sie diverse *downstream*-Moleküle (z.B. mTOR, Rheb, GSK3 $\beta$ , FOXO sowie Bad und Bax) phosphorylieren und dadurch entweder aktivieren oder inhibieren (siehe 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung mit Abb. 4).

In dieser Arbeit reduziert eine Hemmung der PI3K mit LY294002 die Oligodendrozyten-Differenzierung (siehe Abb. 28 A). Einige Nager-Zell-basierte Studien zeigen ebenfalls die Wichtigkeit des PI3K-PKB-Signalweges für die Differenzierung von Oligodendrozyten (Pérez et al., 2013; Vallée et al., 2018), wohingegen andere Daten – anders als die vorliegende Arbeit – für einen PI3K-PKB-induzierten Verbleib im Stammzellstatus (Peltier et al., 2007; Sato et al., 2010) oder eine durch die PI3K gesteigerte neuronale Differenzierung sprechen (Han et al., 2008).

Während das Modulieren des PI3K-PKB-Signalweges hier keinen Einfluss auf die Migration von Neuronen und Radialgliazellen hat, reduziert LY294002 die Migrationsdistanz von Oligodendrozyten (siehe Abb. 28 B). Auch die aktuelle Literatur veranschaulicht anhand von Versuchen mit Ratten-OPCs, hNPCs und Maus-NPCs die Bedeutung von PI3K und PKB für die Migration (Pan et al., 2022; Tian et al., 2018; Q. Zhang et al., 2011).

Der aus Versuchen mit Nager-Zellen und hNPCs beschriebene Proliferations-fördernde Effekt des PI3K-PKB-Signalweges (Sato et al., 2010; Q. Zhang et al., 2011) kann in dieser Arbeit durch eine PKB-Aktivierung mit SC79 nicht reproduziert werden (siehe Abb. 25). Auch eine PI3K-Inhibition durch LY294002 führt nicht zu einer reduzierten Proliferation.

Da die *downstream* Proteine/Enzyme der PKB noch in andere Signalkaskaden eingebunden sind (Murtaza et al., 2017; Switon et al., 2017; Valvezan & Klein, 2012), liegt es nahe, dass die Auswirkungen eines Modulierens des PI3K-PKB-Signalweges – wie anhand dieser Arbeit und anderen Publikationen gezeigt – divers ausfallen und sich in verschiedenen Zelltypen und Umgebungsbedingungen unterscheiden.

#### **4.6 Das Modulieren von CREB im humanen Neurosphären-Assay**

CREB ist als Transkriptionsfaktor ein Effektor des PLC $\gamma$ - und des MAPK-Signalweges (siehe 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege

in der ZNS-Entwicklung mit Abb. 4); auch eine CREB-Aktivierung durch den PI3K-Signalweg ist beschrieben (Peltier et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde CREB indirekt über die PKA mittels db-cAMP aktiviert. Die Inhibition von CREB erfolgte mittels KG-501, welches die Interaktion zwischen CREB und dessen Kofaktor *CREB-binding-protein* hemmt.

Mehrere Publikationen betonen die Wichtigkeit von CREB für die neuronale Entwicklung (Landeira et al., 2018; Xia et al., 2015). Anhand von *Knockout*-Mäusen ist ein fördernder Einfluss von CREB auf die neuronale Migration gezeigt worden (Díaz-Ruiz et al., 2008). Hier kann keine Änderung der neuronalen Differenzierung (siehe Abb. 30 A), aber eine tendenzielle Steigerung der neuronalen Migration durch db-cAMP gesehen werden, während die zell-unspezifische allgemeine radiale Migration durch db-cAMP reduziert wird (siehe Abb. 30 B).

Vor allem fällt aber eine starke Hemmung der Oligodendrozyten-Differenzierung in den oberen sechs db-cAMP-Konzentrationen auf (siehe Abb. 30 A) und deutet auf einen deutlichen CREB- bzw. PKA-Einfluss auf die Entwicklung von Oligodendrozyten hin.

Es ist ein Proliferations-fördernder Effekt von CREB auf Ratten-NPCs beschrieben (Peltier et al., 2007). Dieser kann hier durch db-cAMP (Reduktion des BrdU-Einbaus, siehe Abb. 29) nicht gezeigt werden, allerdings führt eine CREB- Hemmung mittels KG-501 zu einer Verminderung der Flächenzunahme und des BrdU-Einbaus (siehe Abb. 32), was im Einklang mit der zitierten Proliferationssteigerung durch CREB steht.

Die multiplen Veränderungen mehrerer Endpunkte durch Modulieren der CREB-Aktivität unterstreichen die in 1.3 Die Rolle Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege in der ZNS-Entwicklung beschriebene Wichtigkeit des Transkriptionsfaktors für die Hirnentwicklung. Dass sich keine klaren gegensätzlichen Auswirkungen durch CREB-Aktivierung und -Hemmung ergeben, sondern sich einige Endpunkte paradoxerweise sowohl durch db-cAMP als auch KG-501 in dieselbe Richtung verändern (Reduktion der allgemeinen radialen Migration nach 120 h und Reduktion des BrdU-Einbaus) lässt allerdings die Frage offen, wie gut der humane Neurosphären-Assay bzw. die beiden verwendeten Substanzen in der Lage sind, den Einfluss von CREB auf die Hirnentwicklung abzubilden. Die PKA phosphoryliert neben CREB noch weitere Proteine (Seung & Conti, 2006), weshalb die molekularen Auswirkungen einer db-cAMP-Behandlung am ehesten unspezifisch sind. Db-cAMP

und KG-501 dürfen also nicht als klassische Antagonisten betrachtet werden. Eine andere Erklärung könnte sein, dass jegliches Eingreifen in die Signalkaskaden von CREB und ein damit einhergehendes Abweichen von deren physiologischen Abläufen zu einer Störung und Reduktion der allgemeinen Radialglia-Migration und der Proliferation führt. In folgenden Studien mit hNPCs sollten andere, spezifischere CREB-Aktivatoren verwendet werden, um diese Hypothese zu prüfen.

#### **4.7 Fazit: Untersuchung Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelter Signalwege im humanen Neurosphären-Assay**

*In vitro* Studien mit Tier-Zellen liefern zwar ähnliche, aber dennoch andere und schlechter auf den Menschen übertragbare Ergebnisse als *in vitro* Assays mit humanen NPCs (Baumann et al., 2016). Der Vergleich zwischen humanen *in vitro* Assays und *in vivo* Tierversuchen ist hingegen schwieriger, da letztere die Effekte bestimmter pharmazeutischer Einflüsse in einem lebenden Organismus messen können. Auf der Hand liegt aber, dass man Ergebnisse aus *in vivo* Tierversuchen nicht ohne Weiteres auf den menschlichen Organismus übertragen kann (Arrowsmith, 2012).

Der humane Neurosphären-Assay bietet in dieser Arbeit eine alternative Methode, mit welcher in der Hirnentwicklung und in der Pathogenese vieler neurologischer Krankheiten entscheidende zelluläre Schlüsselprozesse (Proliferation, neuronale Differenzierung und Differenzierung zu Oligodendrozyten, allgemeine radiale Migration sowie zellspezifische Migration) untersucht werden können. Die Kenntnis der für diese Schlüsselprozesse wichtigen intrazellulären Signalwege stammte bisher hauptsächlich aus Tierversuchen. Hier kann gezeigt werden, dass es durch Modulieren der getesteten Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten Signalwege zu Veränderungen der untersuchten zellulären Prozesse kommt, was ein Indiz für die Aktivität der Signalwege in humanen NPCs ist. Somit können mit dem Neurosphären-Assay Signalwege, wie zum Beispiel die BDNF- und PDGF-vermittelten Signalkaskaden genauer untersucht werden, deren Relevanz für neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, Chorea Huntington), maligne Erkrankungen (z.B. Glioblastom), Autismus-Spektrum-Störung oder neurogenetische Pathologien (z.B. Rubinstein-Taybi-Syndrom) bekannt ist (Nagahara & Tuszynski, 2011; Roelfsema & Peters, 2007; Sil et al., 2018, Pistollato et al., 2020). Folglich ließe sich die Pathogenese der Erkrankungen besser verstehen, sodass sich neue Therapie- oder Präventionsstrategien ergeben

können.

Während sich einige Ergebnisse des Neurosphären-Assays mit bestehender Literatur decken, stehen andere im Widerspruch zu den Ergebnissen vorhandener Studien oder können diese zumindest nicht verifizieren. Es bleibt in Folgestudien zu prüfen, ob sich diese Differenzen reproduzieren lassen und somit auf molekularbiologische Unterschiede zwischen der Hirnentwicklung von Menschen und der von Nagern hinweisen oder auf methodischen Fehlern des noch jungen humanen Neurosphären-Assays basieren.

Neben den hier getesteten Endpunkten wird die Hirnentwicklung natürlich auch von anderen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel Synaptogenese, synaptischer Plastizität, neuronaler elektrochemischer Aktivität und astrozytärer Differenzierung und Migration bestimmt (Andersen, 2003; Fritsche, Crofton, et al., 2017). Um die Rollen von BDNF, PDGF, der PLC $\gamma$ , dem PI3K-PKB-Signalweg und CREB in der Gehirnentwicklung noch besser definieren zu können, müssen auch diese Prozesse im Hinblick auf die für sie entscheidenden Signalwege anhand von menschlichen Hirnzellen untersucht werden. Es konnte bereits an humanen NPCs und humanen embryonalen Stammzellen gezeigt werden, dass Veränderungen der BDNF- und CREB-Signaltransduktion das Neuritenwachstum und die Synaptogenese beeinflussen bzw. beeinträchtigen (Pistollato et al., 2014; Pistollato et al. 2020).

Gelingt es zukünftig weiteren Assays mit humanen Zellen - wie hier dem Neurosphären-Assay - valide Ergebnisse in diversen Endpunkten zu liefern, also Ergebnisse, die reproduzierbar sind und durch die Fülle der produzierten Daten an Plausibilität gewinnen, können solche Methoden Tierversuche zunehmend ablösen. Dies würde nicht nur das Bias des Interspezies-Vergleiches eliminieren, sondern auch viele Ressourcen (u.a. Kosten, Arbeitsaufwand, Zeit, Züchtung) einsparen (Freires et al., 2017). Nicht monetär messbar, aber ebenso wichtig sei abschließend hervorzuheben, dass Tiere nicht nur lebende Organismen sind, die ein grobes biologisches Abbild des menschlichen Körpers für Forschungszwecke bereitstellen, sondern vor allem fühlende Wesen. Unser Anspruch als Menschen sollte sein, auch ohne die Ausbeutung anderer unschuldiger Spezies die Forschung für unsere eigene Gesundheit voranzutreiben. Zur Erreichung dieses Ziels entwickeln sich neben dem hier dargestellten humanen Neurosphären-Assay aktuell diverse weitere moderne Testmethoden. Hierzu zählen u.a. Modelle mit Organoiden, mikrophysiologischen Systemen wie „3D Hirn-Kulturen“ und auf künstlicher Intelligenz

basierende Systeme, welche sich bereits vorhandener Daten bedienen und selbst ohne *in vitro* oder *in vivo* Testungen auskommen (Cao et al., 2023; Hogberg et a., 2022; Vinken M, 2021).

## V Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zelluläre Schlüsselprozesse der humanen Gehirnentwicklung	1
Abb. 2: Zelluläre Schlüsselprozesse der humanen Gehirnentwicklung	4
Abb. 3: Schematische Darstellung des Neurosphären-Assays	6
Abb. 4: Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Signalwege	7
Abb. 5: Belegungsschema zur Untersuchung des Einflusses Signalweg-modulierender Substanzen unter proliferierenden Bedingungen (NPC1ab)	12
Abb. 6: Prinzip des BrdU-Assays zur Messung der Proliferationsrate	13
Abb. 7: Belegungsschema zur Untersuchung des Einflusses Signalweg-modulierender Substanzen unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)	15
Abb. 8: Belegungsschema der Kontrollplatte zur Untersuchung zellulärer Effekte unter differenzierenden Bedingungen (NPC2-5)	16
Abb. 9: Methoden der Migrationsanalyse von primären humanen Neurosphären nach 72 (A) und 120 (B) Stunden	17
Abb. 10: Prinzip einer Immunfluoreszenz-Färbung	18
Abb. 11: Prinzip des Alamar-Blue-Assays zur Messung der mitochondrialen Aktivität	21
Abb. 12: Prinzip des LDH-Assays zur Zytotoxizitäts-Messung	22
Abb. 13: Einfluss von BDNF auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab).	25
Abb. 14: Einfluss von BDNF auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	26
Abb. 15: Einfluss von ANA-12 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)	27
Abb. 16: Einfluss von ANA-12 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	28
Abb. 17: Einfluss von PDGF auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)	29
Abb. 18: Einfluss von PDGF auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	30
Abb. 19: Einfluss von CP-673451 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)	31
Abb. 20: Einfluss von CP-673451 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	32
Abb. 21: Einfluss von m-3M3FBS auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)	33
Abb. 22: Einfluss von m-3M3FBS auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	34
Abb. 23: Einfluss von U73122 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)	35
Abb. 24: Einfluss von U73122 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	36
Abb. 25: Einfluss von SC79 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)	37
Abb. 26: Einfluss von SC79 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	38
Abb. 27: Einfluss von LY294002 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)	39
Abb. 28: Einfluss von LY294002 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)	40

<b>Abb. 29: Einfluss von db-cAMP auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)</b>	<b>41</b>
<b>Abb. 30: Einfluss von db-cAMP auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)</b>	<b>43</b>
<b>Abb. 31: Einfluss von db-cAMP auf die Differenzierung von hNPCs zu Oligodendrozyten und Neuronen</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 32: Einfluss von KG-501 auf die Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität von humanen neuronalen Progenitorzellen (NPC1ab)</b>	<b>45</b>
<b>Abb. 33: Einfluss von KG-501 auf die Differenzierung von NPCs zu Neuronen und Oligodendrozyten (A), die zellspezifische und die allgemeine radiale Migration (B) und die Viabilität und Zytotoxizität (C); (NPC2-5)</b>	<b>46</b>

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.  
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00005-8)
- Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. In *Genes and Development*.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1653708>
- Appiah-Kubi, K., Wang, Y., Qian, H., Wu, M., Yao, X., Wu, Y., & Chen, Y. (2016). Platelet-derived growth factor receptor/platelet-derived growth factor (PDGFR/PDGF) system is a prognostic and treatment response biomarker with multifarious therapeutic targets in cancers. In *Tumor Biology*.  
<https://doi.org/10.1007/s13277-016-5069-z>
- Arrowsmith, J. (2012). A decade of change. In *Nature Reviews Drug Discovery*.  
<https://doi.org/10.1038/nrd3630>
- Ayuso-Sacido, A., Moliterno, J. A., Kratovac, S., Kapoor, G. S., O'Rourke, D. M., Holland, E. C., Garci'a-Verdugo, J. M., Roy, N. S., & Boockvar, J. A. (2010). Activated EGFR signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0035-x>
- 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. In *Archives of Toxicology*.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-015-1464-2>
- 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. (2019). Corrigendum to Recommendation on test readiness criteria for new approach methods in toxicology: exemplified for developmental neurotoxicity. In *ALTEX*. <https://doi.org/10.14573/altex.1904112>
- Barateiro, A., Brites, D., & Fernandes, A. (2016). Oligodendrocyte Development

- and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Current Pharmaceutical Design*.  
<https://doi.org/10.2174/1381612822666151204000636>
- Barenys, M., Gassmann, K., Baksmeier, C., Heinz, S., Reverte, I., Schmuck, M., Temme, T., Bendt, F., Zschauer, T. C., Rockel, T. D., Unfried, K., Wätjen, 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. *Archives of Toxicology*.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1709-8>
- Baumann, J., Dach, K., Barenys, M., Giersiefer, S., Goniwiecha, J., Lein, P. J., & Fritsche, E. (2015). *Application of the Neurosphere Assay for DNT Hazard Assessment: Challenges and Limitations*.  
[https://doi.org/10.1007/7653\\_2015\\_49](https://doi.org/10.1007/7653_2015_49)
- 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. *Archives of Toxicology*.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-015-1568-8>
- Bibel, M., Hoppe, E., & Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75(NTR). *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.616>
- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. In *Growth Factors*. <https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
- Böer, U., Eglins, J., Krause, D., Schnell, S., Schöfl, C., & Knepel, W. (2007). Enhancement by lithium of cAMP-induced CRE/CREB-directed gene transcription conferred by TORC on the CREB basic leucine zipper domain. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20070796>
- Bos, J. L. (1989). Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research*.
- Bozulic, L., & Hemmings, B. A. (2009). PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. In *Current Opinion in Cell Biology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.02.002>
- Brugge, J., Hung, M. C., & Mills, G. B. (2007). A New Mutational activation in the PI3K Pathway. In *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.014>
- Cao Y, Hu D, Cai C, Zhou M, Dai P, Lai Q, Zhang L, Fan Y, Gao Z. Modeling early

- human cortical development and evaluating neurotoxicity with a forebrain organoid system. *Environ Pollut.* 2023 Nov 15;337:122624. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122624
- Carabalona, A., Hu, D. J. K., & Vallee, R. B. (2016). KIF1A inhibition immortalizes brain stem cells but blocks BDNF-mediated neuronal migration. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4213>
- Carracedo, A., & Pandolfi, P. P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: Of feedbacks and cross-talks. In *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.247>
- Chao, J., Yang, L., Yao, H., & Buch, S. (2014). Platelet-derived growth factor-BB restores HIV Tat-mediated impairment of neurogenesis: Role of GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9509-x>
- Chen, P. H., Chen, X., & He, X. (2013). Platelet-derived growth factors and their receptors: Structural and functional perspectives. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.015>
- Chen, X., Wu, H., Chen, H., Wang, Q., Xie, X. jiao, & Shen, J. (2019). Astragaloside VI Promotes Neural Stem Cell Proliferation and Enhances Neurological Function Recovery in Transient Cerebral Ischemic Injury via Activating EGFR/MAPK Signaling Cascades. *Molecular Neurobiology*, 56(4). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1294-3>
- Chojnacki, A., Kelly, J. J. P., Hader, W., & Weiss, S. (2008). Distinctions between fetal and adult human platelet-derived growth factor-responsive neural precursors. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.21421>
- Chung, S. H., Biswas, S., Selvaraj, V., Liu, X. B., Sohn, J., Jiang, P., Chen, C., Chmilewsky, F., Marzban, H., Horiuchi, M., Pleasure, D. E., & Deng, W. (2015). The p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase is a key regulator of myelination and remyelination in the CNS. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.119>
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>
- Colucci-D'amato, L., Speranza, L., & Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. In *International Journal of Molecular*

- Sciences* (Vol. 21, Issue 20). <https://doi.org/10.3390/ijms21207777>
- Copp, A. J., Greene, N. D. E., & Murdoch, J. N. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. In *Nature Reviews Genetics*.  
<https://doi.org/10.1038/nrg1181>
- Delghandi, M. P., Johannessen, M., & Moens, U. (2005). The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cellular Signalling*, 17(11). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.02.003>
- Díaz-Ruiz, C., Parlato, R., Aguado, F., Ureña, J. M., Burgaya, F., Martínez, A., Carmona, M. A., Kreiner, G., Bleckmann, S., del Río, J. A., Schütz, G., & Soriano, E. (2008). Regulation of neural migration by the CREB/CREM transcription factors and altered Dab1 levels in CREB/CREM mutants. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(4).  
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.019>
- Ding, H., Wu, X., Boström, H., Kim, I., Wong, N., Tsoi, B., O'Rourke, M., Koh, G. Y., Soriano, P., Betsholtz, C., Hart, T. C., Marazita, M. L., Field, L. L., Tam, P. P. L., & Nagy, A. (2004). A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- $\alpha$  signaling. *Nature Genetics*.  
<https://doi.org/10.1038/ng1415>
- Durany, N., Michel, T., Kurt, J., Cruz-Sánchez, F. F., Cervós-Navarro, J., & Riederer, P. (2000). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels in Alzheimer's disease brains. *International Journal of Developmental Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00046-0)
- Ein, L., Bracho, O., Mei, C., Patel, J., Boyle, T., Monje, P., Fernandez-Valle, C., Bas, E., Thomas, G., Weed, D., Sargi, Z., & Dinh, C. (2019). Inhibition of tropomyosine receptor kinase B on the migration of human Schwann cell and dispersion of oral tongue squamous cell carcinoma in vitro. *Head and Neck*, 41(12). <https://doi.org/10.1002/hed.25956>
- Erlandsson, A., Enarsson, M., & Forsberg-Nilsson, K. (2001). Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-03483.2001>
- Evrova, O., & Buschmann, J. (2017). In vitro and in vivo effects of PDGF-BB delivery strategies on tendon healing: A review. In *European Cells and Materials*. <https://doi.org/10.22203/eCM.v034a02>

- Freires, I. A., Sardi, J. de C. O., de Castro, R. D., & Rosalen, P. L. (2017). Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharmaceutical Research*.  
<https://doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z>
- Fritsche, E., Alm, H., Baumann, J., Geerts, L., Håkansson, H., Masjosthusmann, S., & Witters, H. (2017). Literature review on in vitro and alternative Developmental Neurotoxicity (DNT) testing methods. *EFSA Supporting Publications*. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.en-778>
- Fritsche, E., Barenys, M., Klose, J., Masjosthusmann, S., Nimitz, L., Schmuck, M., Wuttke, S., & Tigges, J. (2018). Current availability of stem cell-Based in vitro methods for developmental neurotoxicity (DNT) testing. In *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy178>
- Fritsche, E., Crofton, K. M., Hernandez, A. F., Bennekou, S. H., 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*. <https://doi.org/10.14573/altex.1701171>
- Fritsche, E. (2016). Report of the OECD/EFSA workshop on developmental neurotoxicity (DNT): the use of non-animal test methods for regulatory purposes
- Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A. C., Abramsson, A., Calver, A. R., Boström, H., Willetts, K., Bertold, C. H., Heath, J. K., Betsholtz, C., & Richardson, W. D. (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development*.
- Funa, K., & Sasahara, M. (2014). The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. In *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9479-z>
- Gao, L., MacKlin, W., Gerson, J., & Miller, R. H. (2006). Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.007>
- García-Bernal, F., Geribaldi-Doldán, N., Domínguez-García, S., Carrasco, M., Murillo-Carretero, M., Delgado-Ariza, A., Díez-Salguero, M., Verástegui, C., & Castro, C. (2018). Protein kinase C inhibition mediates neuroblast enrichment in mechanical brain injuries. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

- <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00462>
- Gil, J. M. A. C., Mohapel, P., Araújo, I. M., Popovic, N., Li, J. Y., Brundin, P., & Petersén, Å. (2005). Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiology of Disease*.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.05.006>
- Giordano, G., & Costa, L. G. (2012). Developmental Neurotoxicity: Some Old and New Issues. *ISRN Toxicology*. <https://doi.org/10.5402/2012/814795>
- Grote, H. E., Bull, N. D., Howard, M. L., Van Dellen, A., Blakemore, C., Bartlett, P. F., & Hannan, A. J. (2005). Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04365.x>
- Groves, N., O'Keeffe, I., Lee, W., Toft, A., Blackmore, D., Bandhavkar, S., Coulson, E. J., Bartlett, P. F., & Jhaveri, D. J. (2019). Blockade of TrkB but not p75NTR activates a subpopulation of quiescent neural precursor cells and enhances neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Developmental Neurobiology*. <https://doi.org/10.1002/dneu.22729>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Han, J., Wang, B., Xiao, Z., Gao, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Chen, B., Wang, X., & Dai, J. (2008). Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.003>
- Harari, Y. N. (2014). Sapiens: A Brief History of Humankind by Yuval Noah Harari. *The Guardian*.
- Hartung, T. (2009). Toxicology for the twenty-first century. In *Nature*.  
<https://doi.org/10.1038/460208a>
- Harward, S. C., Hedrick, N. G., Hall, C. E., Parra-Bueno, P., Milner, T. A., Pan, E., Laviv, T., Hempstead, B. L., Yasuda, R., & McNamara, J. O. (2016). Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature*.  
<https://doi.org/10.1038/nature19766>
- Hawthorne, A. L., Wylie, C. J., Landmesser, L. T., Deneris, E. S., & Silver, J. (2010). Serotonergic neurons migrate radially through the neuroepithelium by dynamin-mediated somal translocation. *Journal of Neuroscience*.

- <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2333-09.2010>
- Hogberg HT, Smirnova L. The Future of 3D Brain Cultures in Developmental Neurotoxicity Testing. *Front Toxicol*. 2022 Jan 27;4:808620. doi: 10.3389/ftox.2022.808620
- Holt, L. M., Hernandez, R. D., Pacheco, N. L., Torres Ceja, B., Hossain, M., & Olsen, M. L. (2019). Astrocyte morphogenesis is dependent on BDNF signaling via astrocytic TrkB.T1. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.44667>
- Hosomi, S., Yamashita, T., Aoki, M., & Tohyama, M. (2003). The p75 receptor is required for BDNF-induced differentiation of neural precursor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00077-9)
- Hosseinian, S., Arefian, E., Rakhsh-Khorshid, H., Eivani, M., Rezayof, A., Pezeshk, H., & Marashi, S. A. (2020). A meta-analysis of gene expression data highlights synaptic dysfunction in the hippocampus of brains with Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64452-z>
- Hu, C. T., Cheng, C. C., Pan, S. M., Wu, J. R., & Wu, W. S. (2013). PKC mediates fluctuant ERK-paxillin signaling for hepatocyte growth factor-induced migration of hepatoma cell HepG2. *Cellular Signalling*, 25(6). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.03.011>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huang, K. P. (1989). The mechanism of protein kinase C activation. In *Trends in Neurosciences*. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90091-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90091-X)
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2336>
- Jin, W., Lo, T. M., Loh, H. H., & Thayer, S. A. (1994). U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Research*, 642(1–2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90927-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90927-X)
- Kandel, E. R. (2013). principles of neural science 5 th. *My Book Shelf*.
- Lai, C., & Feng, L. (2004). Neuregulin induces proliferation of neural progenitor cells via PLC/PKC pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.027>

- Landeira, B. S., Santana, T. T. D. S., Araújo, J. A. D. M., Tabet, E. I., Tannous, B. A., Schroeder, T., & Costa, M. R. (2018). Activity-Independent Effects of CREB on Neuronal Survival and Differentiation during Mouse Cerebral Cortex Development. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw387>
- Lee, W. Di, Wang, K. C., Tsai, Y. F., Chou, P. C., Tsai, L. K., & Chien, C. L. (2016). Subarachnoid hemorrhage promotes proliferation, differentiation, and migration of neural stem cells via BDNF upregulation. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165460>
- Leist, M., & Hartung, T. (2013). Inflammatory findings on species extrapolations: Humans are definitely no 70-kg mice. In *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1038-0>
- Li, Y., Xu, M., Ding, X., Yan, C., Song, Z., Chen, L., Huang, X., Wang, X., Jian, Y., Tang, G., Tang, C., Di, Y., Mu, S., Liu, X., Liu, K., Li, T., Wang, Y., Miao, L., Guo, W., ... Yang, C. (2016). Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nature Cell Biology*, 18(10). <https://doi.org/10.1038/ncb3407>
- Liu, Y., Yan, Y., Inagaki, Y., Logan, S., Bosnjak, Z. J., & Bai, X. (2017). Insufficient astrocyte-derived brain-derived neurotrophic factor contributes to propofol-induced neuron death through Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ /Mitochondrial Fission Pathway. *Anesthesia and Analgesia*. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002137>
- Ma, D. K., Ponnusamy, K., Song, M. R., Ming, G. L., & Song, H. (2009). Molecular genetic analysis of FGFR1 signalling reveals distinct roles of MAPK and PLC1 activation for self-renewal of adult neural stem cells. *Molecular Brain*. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-16>
- Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S. C., Kern, H., Kretz, O., Villalba, A. M., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., Otto, C., Schmid, W., & Schütz, G. (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature Genetics*, 31(1). <https://doi.org/10.1038/ng882>
- Masjosthusmann, S., Becker, D., Petzuch, B., Klose, J., Siebert, C., Deenen, R., Barenys, M., Baumann, J., Dach, K., Tigges, J., Hübenthal, U., Köhrer, K., & Fritsche, E. (2018). A transcriptome comparison of time-matched developing human, mouse and rat neural progenitor cells reveals human uniqueness. *Toxicology and Applied Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.009>

- Mazzu, Y. Z., Hu, Y., Shen, Y., Tuschl, T., & Singer, S. (2019). miR-193b regulates tumorigenesis in liposarcoma cells via PDGFR, TGF $\beta$ , and Wnt signaling. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39560-0>
- Menon, S., & Gupton, S. (2018). Recent advances in branching mechanisms underlying neuronal morphogenesis [version 1; referees: 2 approved]. In *F1000Research*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16038.1>
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2738>
- Miyamoto, N., Maki, T., Shindo, A., Liang, A. C., Maeda, M., Egawa, N., Itoh, K., Lo, E. K., Lok, J., Ihara, M., & Arai, K. (2015). Astrocytes promote oligodendrogenesis after white matter damage via brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1592-15.2015>
- Moors, M., Cline, J. E., Abel, J., & Fritsche, E. (2007). ERK-dependent and -independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.018>
- Moors, M., Rockel, T. D., Abel, J., Cline, J. E., Gassmann, K., Schreiber, T., Shuwald, J., Weinmann, N., & Fritsche, E. (2009). Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800207>
- Murtaza, G., Khan, A. K., Rashid, R., Muneer, S., Hasan, S. M. F., & Chen, J. (2017). FOXO Transcriptional Factors and Long-Term Living. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). <https://doi.org/10.1155/2017/3494289>
- Murtie, J. C., Zhou, Y. X., Le, T. Q., Vana, A. C., & Armstrong, R. C. (2005). PDGF and FGF2 pathways regulate distinct oligodendrocyte lineage responses in experimental demyelination with spontaneous remyelination. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.12.006>
- Nagahara, A. H., & Tuszynski, M. H. (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. In *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd3366>

- Nicholson-Fish, J. C., Cousin, M. A., & Smillie, K. J. (2016). Phosphatidylinositol 3-Kinase Couples Localised Calcium Influx to Activation of Akt in Central Nerve Terminals. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1663-5>
- Nimtz, L., Hartmann, J., Tigges, J., Masjosthusmann, S., Schmuck, M., Keßel, E., Theiss, S., Köhrer, K., Petzsch, P., Adjaye, J., Wigmann, C., Wieczorek, D., Hildebrandt, B., Bendt, F., Hübenthal, U., Brockerhoff, G., & Fritsche, E. (2020). Characterization and application of electrically active neuronal networks established from human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells for neurotoxicity evaluation. *Stem Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101761>
- 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 *Neuromethods*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9228-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9228-7_8)
- Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M., & Kunugi, H. (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. In *Histology and Histopathology*. <https://doi.org/10.14670/HH-25.237>
- Nussinov, R., Tsai, C. J., & Jang, H. (2019). Does Ras Activate Raf and PI3K Allosterically? In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01231>
- Oakeshott, P., & Hunt, G. M. (2003). Long-term outcome in open spina bifida. *British Journal of General Practice*.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.137>
- Pan, J., Sheng, S., Ye, L., Xu, X., Ma, Y., Feng, X., Qiu, L., Fan, Z., Wang, Y., Xia, X., & Zheng, J. C. (2022). Extracellular vesicles derived from glioblastoma promote proliferation and migration of neural progenitor cells via PI3K-Akt pathway. *Cell Communication and Signaling*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00760-9>
- Paparella, M., Hougaard Bennekou, S. Bal-Price, A., An analysis of the limitations and uncertainties of in vivo developmental neurotoxicity testing and assessment to identify the potential for alternative approaches. *Reproductive*

- Toxicology, Volume 96, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.002>
- Pelegri, N. G., Gorrie, C. A., & Santos, J. (2019). Rat hippocampal neural stem cell modulation using PDGF, VEGF, PDGF/VEGF, and BDNF. *Stem Cells International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4978917>
- Peltier, J., O'Neill, A., & Schaffer, D. V. (2007). PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Developmental Neurobiology*, 67(10). <https://doi.org/10.1002/dneu.20506>
- Peng, F., Dhillon, N., Callen, S., Yao, H., Bokhari, S., Zhu, X., Baydoun, H. H., & Buch, S. J. (2008). Platelet-derived growth factor protects neurons against gp120-mediated toxicity. *Journal of NeuroVirology*. <https://doi.org/10.1080/13550280701809084>
- Peng, F., Yao, H., Bai, X., Zhu, X., Reiner, B. C., Beazely, M., Funa, K., Xiong, H., & Buch, S. (2010). Platelet-derived growth factor-mediated induction of the synaptic plasticity gene Arc/Arg3.1. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107003>
- Pérez, M. J., Fernandez, N., & Pasquini, J. M. (2013). Oligodendrocyte differentiation and signaling after transferrin internalization: A mechanism of action. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.06.014>
- Pistollato, F., Louisse, J., Scelfo, B., Mennecozzi, M., Accordi, B., Basso, G., Gaspar, J. A., Zagoura, D., Barilari, M., Palosaari, T., Sachinidis, A., & Bremer-Hoffmann, S. (2014). Development of a pluripotent stem cell derived neuronal model to identify chemically induced pathway perturbations in relation to neurotoxicity: Effects of CREB pathway inhibition. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(2). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.08.007>
- Pistollato F, de Gyves EM, Carpi D, Bopp SK, Nunes C, Worth A, Bal-Price A. Assessment of developmental neurotoxicity induced by chemical mixtures using an adverse outcome pathway concept. *Environ Health*. 2020 Feb 24;19(1):23. doi: 10.1186/s12940-020-00578-x
- Puente, L. G., He, J. S., & Ostergaard, H. L. (2006). A novel PKC regulates ERK activation and degranulation of cytotoxic T lymphocytes: Plasticity in PKC regulation of ERK. *European Journal of Immunology*, 36(4). <https://doi.org/10.1002/eji.200535277>
- Rajnicek, A. M., & McCaig, C. D. (1997). Guidance of CNS growth cones by

- substratum grooves and ridges: Effects of inhibitors of the cytoskeleton, calcium channels and signal transduction pathways. *Journal of Cell Science*.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Richardson, W. D., Pringle, N., Mosley, M. J., Westermarck, B., & Dubois-Dalcq, M. (1988). A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90392-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90392-3)
- Roelfsema, J. H., & Peters, D. J. M. (2007). Rubinstein-Taybi syndrome: Clinical and molecular overview. In *Expert Reviews in Molecular Medicine* (Vol. 9, Issue 23). <https://doi.org/10.1017/S1462399407000415>
- Sachana, M., Bal-Price, A., Crofton, K. M., Bennekou, S. H., Shafer, T. J., Behl, M., & Terron, A. (2019). International regulatory and scientific effort for improved developmental neurotoxicity testing. *Toxicological Sciences*.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy211>
- Sadler, T. W. (2014). Taschenlehrbuch Embryologie. In *Taschenlehrbuch Embryolog*.
- Salmena, L., Carracedo, A., & Pandolfi, P. P. (2008). Tenets of PTEN Tumor Suppression. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.013>
- Sato, A., Sunayama, J., Matsuda, K. ichiro, Tachibana, K., Sakurada, K., Tomiyama, A., Kayama, T., & Kitanaka, C. (2010). Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. *Neuroscience Letters*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.067>
- 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. *Archives of Toxicology*.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1852-2>
- Seung, J. H., & Conti, M. (2006). New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. In *Cell Cycle* (Vol. 5, Issue 3). <https://doi.org/10.4161/cc.5.3.2395>
- Siegel, G. J., & Chauhan, N. B. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. In *Brain Research Reviews*.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00030-8)

- Sil, S., Periyasamy, P., Thangaraj, A., Chivero, E. T., & Buch, S. (2018). PDGF/PDGFR axis in the neural systems. In *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.01.006>
- Simons, M., & Nave, K. A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>
- Singh, J., Sharma, K., Frost, E. E., & Pillai, P. P. (2019). Role of PDGF-A-Activated ERK Signaling Mediated FAK-Paxillin Interaction in Oligodendrocyte Progenitor Cell Migration. *Journal of Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-1260-1>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. In *Neuropsychology Review*. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Sütterlin, P., Williams, E. J., Chambers, D., Saraf, K., von Schack, D., Reisenberg, M., Doherty, P., & Williams, G. (2013). The molecular basis of the cooperation between EGF, FGF and eCB receptors in the regulation of neural stem cell function. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.006>
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. In *Neuroscience* (Vol. 341). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>
- Tang, Z., Arjunan, P., Lee, C., Li, Y., Kumar, A., Hou, X., Wang, B., Wardega, P., Zhang, F., Dong, L., Zhang, Y., Zhang, S. Z., Ding, H., Fariss, R. N., Becker, K. G., Lennartsson, J., Nagai, N., Cao, Y., & Li, X. (2010). Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3 $\beta$  phosphorylation. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20091704>
- Tian, Y., Yin, H., Deng, X., Tang, B., Ren, X., & Jiang, T. (2018). CXCL12 induces migration of oligodendrocyte precursor cells through the CXCR4-activated MEK/ERK and PI3K/AKT pathways. *Molecular Medicine Reports*, 18(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9444>
- Tsai, F. C., Kuo, G. H., Chang, S. W., & Tsai, P. J. (2015). Ca<sup>2+</sup> signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. In *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/409245>
- Tu, Z., Li, Y., Dai, Y., Li, L., Lv, G., Chen, I., & Wang, B. (2017). MiR-140/BDNF

- axis regulates normal human astrocyte proliferation and LPS-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.016>
- Vallée, A., Vallée, J. N., Guillevin, R., & Lecarpentier, Y. (2018). Interactions Between the Canonical WNT/Beta-Catenin Pathway and PPAR Gamma on Neuroinflammation, Demyelination, and Remyelination in Multiple Sclerosis. In *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0550-9>
- Valvezan, A. J., & Klein, P. S. (2012). GSK-3 and Wnt signaling in neurogenesis and bipolar disorder. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Issue JANUARY 2012). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00001>
- Vinken M, Benfenati E, Busquet F, Castell J, Clevert DA, de Kok TM, Dirven H, Fritsche E, Geris L, Gozalbes R, Hartung T, Jennen D, Jover R, Kandarova H, Kramer N, Krul C, Luechtefeld T, Masereeuw R, Roggen E, Schaller S, Vanhaecke T, Yang C, Piersma AH. Safer chemicals using less animals: kick-off of the European ONTOX project. *Toxicology*. 2021 doi: 10.1016/j.tox.2021.152846
- Voigt, P., Ma, Y. J., Gonzalez, D., Fahrenbach, W. H., Wetsel, W. C., Berg-Von Der Emde, K., Hill, D. F., Taylor, K. G., Costa, M. E., Seidah, N. G., & Ojeda, S. R. (1996). Neural and glial-mediated effects of growth factors acting via tyrosine kinase receptors on luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 137(6). <https://doi.org/10.1210/endo.137.6.8641214>
- Wang, Y., & Wang, Z. (2003). Regulation of EGF-induced phospholipase C- $\gamma$ 1 translocation and activation by its SH2 and PH domains. *Traffic*, 4(9). <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00121.x>
- Wellman, G. C., & Nelson, M. T. (2003). Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: Sparks and the activation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive ion channels. In *Cell Calcium*. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00124-6)
- Xia, W., Liu, Y., & Jiao, J. (2015). GRM7 regulates embryonic neurogenesis via CREB and YAP. *Stem Cell Reports*, 4(5). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.03.004>
- Xu, Y., Gao, Y. W., & Yang, Y. (2018). SC79 protects dopaminergic neurons from oxidative stress. *Oncotarget*, 9(16). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23538>
- Yao, H., Duan, M., Yang, L., & Buch, S. (2012). Platelet-derived growth factor-BB

- restores human immunodeficiency virus Tat-cocaine-mediated impairment of neurogenesis: Role of TRPC1 channels. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0638-12.2012>
- Zahir, T., Chen, Y. F., MacDonald, J. F., Leipzig, N., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2009). Neural stem/progenitor cells differentiate in vitro to neurons by the combined action of dibutyryl cAMP and interferon- $\gamma$ . *Stem Cells and Development*, 18(10). <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0412>
- Zhang, K., Wu, S., Li, Z., & Zhou, J. (2017). MicroRNA-211/BDNF axis regulates LPS-induced proliferation of normal human astrocyte through PI3K/AKT pathway. *Bioscience Reports*. <https://doi.org/10.1042/BSR20170755>
- Zhang, Q., Liu, G., Wu, Y., Sha, H., Zhang, P., & Jia, J. (2011). BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules*.  
<https://doi.org/10.3390/molecules161210146>
- Zhang, S. X. L., Gozal, D., Sachleben, L. R., Rane, M., Klein, J. B., & Gozal, E. (2003). Hypoxia induces an autocrine-paracrine survival pathway via platelet-derived growth factor (PDGF)-B/PDGF-beta receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in RN46A neuronal cells. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(12). <https://doi.org/10.1096/fj.02-1111fje>
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., Timmusk, T., Sipione, S., & Cattaneo, E. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1059581>

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, welche mir auf dem Weg meiner Doktorarbeit zur Seite standen:

Vielen Dank an Prof. Ellen Fritsche, für die Ermöglichung der Arbeit, Auswahl des spannenden Themas und deine Unterstützung beim Schreiben der Dissertation!

Ein großes Dankeschön an Dr. Kristina Bartmann für deine tolle Betreuung, für deine geduldige Beratung und Hilfe und für deine Erreichbarkeit zu jeder Zeit. Es war ein großes Glück, dich als Betreuerin haben zu dürfen!

Muchas gracias an Georgea Raad. Ohne dich wäre ich nicht auf diese Arbeit gekommen. Danke, dass du das Projekt mit mir geteilt und die gemeinsame Laborarbeit mit Humor und Salsa gefüllt hast!

Danke allen weiteren MitarbeiterInnen der ehemaligen AG Fritsche für eure Unterstützung bei der Recherche, für eure Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche (ein besonderer Dank an Lynn-Christin Stürzl!) und für das Teilen eurer wissenschaftlichen Erfahrung. Ich habe viel von euch gelernt!

Danke meinen Eltern, dass ihr immer für mich da wart, seid und mir ein solch privilegiertes Leben ermöglicht habt! Ohne euch hätte ich nicht Medizin studieren und promovieren können.

Danke meinem Schmombat für dein Schmombat-Dasein! Du bist der beste deiner Art!

Glück auf!