

# Lineage-Selektion und Transplantation ES Zell-abgeleiteter neuraler Vorläuferzellen

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Tanja Schmandt

aus

Siegburg

Bonn (April) 2004

Anfertigung mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen  
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Scheidtmann
2. Referent: Prof. Dr. Brüstle

Tag der Promotion:

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV-V</b>
<b>Thematische Übersicht</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Neurale Stammzellen</b>	<b>2</b>
1.1.1 Primäre neurale Stammzellen	2
1.1.1.1 Persistenz neuraler Stammzellen im adulten Gehirn	3
1.1.2 Neurale Stammzelllinien	4
1.1.3 Xenogene neurale Stammzellen	5
1.1.4 Plastizität, Migrationsfähigkeit und regeneratives Potential neuraler Stammzellen	5
1.2 <b>Transdifferenzierung somatischer Stammzellen</b>	<b>6</b>
1.3 <b>Embryonale Stammzellen</b>	<b>7</b>
1.3.1 ES Zellen als Donorquelle für den Zellersatz	8
1.3.2 Strategien für die Herstellung reiner somatischer Vorläuferzellen aus ES Zellen	9
1.3.2.1 Gerichtete Differenzierung	9
1.3.2.2 Lineage-Selektion	10
1.4 <b>Humane embryonale Stammzellen</b>	<b>11</b>
1.5 <b>Risiken und Chancen</b>	<b>12</b>
1.6 <b>Ziel der Arbeit</b>	<b>13</b>
1.6.1 Gewinnung hoch aufgereinigter ES Zell-abgeleiteter Neurone durch Lineage-Selektion	13
1.6.2 Gewinnung hoch aufgereinigter glialer Vorläuferzellen und deren Integration in Gehirngewebe	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 <b>Materialien</b>	<b>15</b>
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.2 Chemikalien	15
2.1.3 Kits	15
2.1.4 Plasmide	15
2.1.5 Antikörper	16
2.1.5.1 Primäre Antikörper	16
2.1.5.2 Sekundäre Antikörper	17
2.1.6 Zelllinien	17
2.2 <b>Geräte</b>	<b>18</b>
2.3 <b>Lösungen</b>	<b>19</b>
2.3.1 Bakterien	19
2.3.2 Zellkultur	19
2.3.2.1 Puffer	19
2.3.2.2 Supplemente	20

---

2.3.2.3	Medien	21
2.3.3	Immunhistochemie und <i>in situ</i> Hybridisierung	23
2.3.3.1	Immuncytochemie	23
2.3.3.2	Immunhistochemie	23
2.3.3.3	<i>In situ</i> Hybridisierung	23
<b>2.4</b>	<b>Plasmidpräparation</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>ES Zellkultur</b>	<b>26</b>
2.5.1	Auftauen von $\gamma$ EF	26
2.5.2	Auftauen von ES Zellen	26
2.5.3	Passage auf Gelatine	26
2.5.4	Herstellung von Embryoidkörpern	27
2.5.5	Plattieren der EBs und Transfer zu ITSFn	28
2.5.6	Transfer in N3FL Medium	28
2.5.7	Transfer in N3EFL Medium	29
2.5.8	Transfer in N2FP Medium	30
2.5.9	Transfektion	31
2.5.9.1	Elektroporation	31
2.5.9.2	Lipofektion	31
2.5.10	Klonale Selektion	32
2.5.10.1	T $\alpha$ 1-EGFP Klone	32
2.5.10.2	CMV-EGFP Klone	32
2.5.11	Untersuchung der T $\alpha$ 1-EGFP Klone	33
2.5.12	Präparation der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellkulturen für die Transplantation	33
<b>2.6</b>	<b>Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung</b>	<b>34</b>
2.6.1	Präparation der ES Zell-abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellkulturen für die FACS-Sortierung	34
2.6.2	Zellsortierung	34
<b>2.7</b>	<b>Herstellung hippocampaler Schnittkulturen</b>	<b>35</b>
<b>2.8</b>	<b><i>In vitro</i> Transplantation und Aufarbeitung der hippocampalen Schnittkulturen</b>	<b>36</b>
<b>2.9</b>	<b><i>In vivo</i> Transplantate in den Hippocampus der Ratte und deren Aufarbeitung</b>	<b>37</b>
<b>2.10</b>	<b>Dye Coupling an hippocampalen Schnittkulturen</b>	<b>37</b>
<b>2.11</b>	<b>Immunhistochemie und <i>in situ</i> Hybridisierung</b>	<b>38</b>
2.11.1	Immuncyto- und Immunhistochemie	38
2.11.2	Tyramid	38
2.11.3	Kopplungsuntersuchungen <i>in vivo</i>	39
2.11.4	<i>In situ</i> Hybridisierung	39
<b>2.12</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Selektion von ES Zell-abgeleiteten Neuronen</b>	<b>42</b>
3.1.1	Charakterisierung T $\alpha$ 1-EGFP ES Zell-abgeleiteter neuronaler Vorläuferzellkulturen	42
3.1.2	Charakterisierung der ES Zell-abgeleiteten T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone	44
3.1.2.1	Zeitverlauf der T $\alpha$ 1-EGFP-Expression	44

---

3.1.2.2	Phänotypische Charakterisierung der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone	45
3.1.2.3	Neuronale Spezifität der T $\alpha$ 1-EGFP-Expression	46
3.1.3	Lineage-Selektion der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone	47
3.2	<b>Gewinnung und Charakterisierung EGFP-transgener ES Zell-abgeleitete glialer Vorläuferzellkulturen</b>	<b>48</b>
3.3	<b>Untersuchung der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in hippocampalen Schnittkulturen</b>	<b>50</b>
3.3.1	Inkorporation und Differenzierung ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach <i>in vitro</i> Transplantation	50
3.3.2	Kopplungsnachweis in hippocampalen Schnittkulturen	53
3.3.3	Zeitverlauf und Komplexität der Zell-Zell-Kopplung	54
3.4	<b>Inkorporation und Differenzierung transplanteder ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen <i>in vivo</i></b>	<b>56</b>
3.4.1	Verteilung und morphologische Integration der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen	56
3.4.2	Differenzierung der transplanteden ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen	58
3.4.3	Morphologische und elektrophysiologische Heterogenität der transplanteden ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen	59
3.4.4	Kopplungsuntersuchungen <i>in vivo</i>	60
4.	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	<b>Selektion von ES Zell-abgeleiteten Neuronen</b>	<b>62</b>
4.1.1	Wertigkeit des T $\alpha$ 1-EGFP-Transgens als selektierbarer Marker für die neuronale Lineage-Selektion	62
4.1.2	Charakterisierung der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone	64
4.1.3	Effizienz der T $\alpha$ 1-EGFP-basierten Lineage-Selektion	65
4.1.4	Vergleich mit anderen Lineage-Selektions-Verfahren zur Gewinnung ES Zell-abgeleiteter Neurone	67
4.2	<b>Untersuchung von ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in hippocampalen Schnittkulturen</b>	<b>69</b>
4.2.1	Organotypische Schnittkulturen als <i>in vitro</i> Modell für die neurale Transplantation	69
4.2.2	Funktionelle Ausreifung der transplanteden ES Zell-abgeleiteten Gliazellen	70
4.2.3	Integration der transplanteden ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in das endogene Gliazellnetzwerk	71
4.2.4	Vor- und Nachteile der organotypischen Schnittkultur	72
4.3	<b>Untersuchung von ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläufern nach <i>in vivo</i> Transplantation</b>	<b>73</b>
5.	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>76</b>
6.	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
7.	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>
8.	<b>Erklärung</b>	<b>101</b>
9.	<b>Lebenslauf</b>	<b>102</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AKV	Antikörper-Verdünnungs-Lösung
CMV	Cytomegalo-Virus
Cx43	Connexin43
CNPase	2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIFF	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagles Medium /F12 nutrient mixture
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Embryonaltag
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
EB's	Embryoid Bodies
EC	Entorhinaler Cortex
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Embryonale Fibroblasten
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green-Fluorescent Protein
ES Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
EYFP	Enhanced Yellow-Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälber Serum
Fn	Fibronectin
γ	Gamma
γEF	Gamma-bestrahlte embryonale Fibroblasten
γneoEF	Gamma-bestrahlte Neomycin-resistente embryonale Fibroblasten
GABA	Gamma Amino Butyric Acid
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein

---

HBSS	<b>H</b> anks <b>B</b> alanced <b>S</b> alt <b>S</b> olution
$I_{K(A)}$	Transiente auswärts $K^+$ -Ströme
$I_{K(D)}$	Verzögert auswärts-gleichrichtende $K^+$ -Ströme
$I_{Kir}$	Einwärts-gleichrichtende $K^+$ -Ströme
$I_{(P)}$	Zeit- und Spannungs-unabhängige ‚passive‘ Strommuster
ITSFn	F12-Medium unter Zusatz von <b>I</b> nsulin, <b>T</b> ransferrin, <b>S</b> odiumselenit und <b>F</b> ibronectin; Selektion der neuralen Vorläuferzellen
kb	<b>K</b> ilobasen
KZS	<b>K</b> örnerzellschicht
LIF	<b>L</b> eukemia <b>I</b> nhibitory <b>F</b> actor
LY	<b>L</b> ucifer <b>Y</b> ellow
MAP2	<b>M</b> ikrotubuli-assoziertes <b>P</b> rotein <b>2</b>
MBP	<b>M</b> yelin <b>B</b> asic <b>P</b> rotein
mRNA	messenger <b>R</b> ibonucleic <b>A</b> cid
N3EFL	<b>N3</b> Medium, <b>F</b> GF2, <b>E</b> GF und <b>L</b> aminin; Kultivierung von glialen Vorläufern
N3FL	<b>N3</b> Medium, <b>F</b> GF2 und <b>L</b> aminin; Kultivierung von neuralen Vorläuferzellen
NDS	<b>N</b> ormal <b>D</b> onkey <b>S</b> erum
Neo <sup>R</sup>	<b>N</b> eomycin-resistent
NeuN	<b>N</b> euron-spezifisches <b>N</b> ukleär-Protein
NGF	<b>N</b> erve <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
NGS	<b>N</b> ormal <b>G</b> oat <b>S</b> erum
P	Postnatal-Tag
PBS	<b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline
PDGF-AA	<b>P</b> latelet- <b>D</b> erived <b>G</b> rowth <b>F</b> actor <b>AA</b>
Pen/Strep	<b>P</b> enicillin/ <b>S</b> treptomycin
PO	<b>P</b> olyornithin
PROL	<b>P</b> roliferationsmedium
PNS	<b>P</b> eripheres <b>N</b> ervensystem
PSA-NCAM	<b>P</b> olysialic <b>A</b> cid - <b>N</b> eural <b>C</b> ell <b>A</b> dhesion <b>M</b> olecule
RA	<b>R</b> etinoic <b>A</b> cid
RNA	<b>R</b> ibonucleic <b>A</b> cid
RT	<b>R</b> aumtemperatur
TC	<b>T</b> emporaler <b>C</b> ortex
ZNS	<b>Z</b> entralnervensystem

## Thematische Übersicht

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) besitzen drei einzigartige Fähigkeiten, die sie als Spenderquelle für Zellersatzstrategien im Zentralnervensystem sehr attraktiv erscheinen lassen: sie sind **pluripotent**, sie zeichnen sich durch **unbegrenzte Vermehrbarkeit** aus und sie sind **einfach genetisch zu manipulieren**. Die Einsatzmöglichkeit von ES Zellen muss an der Möglichkeit gemessen werden, neurale Zellpopulationen von hoher Reinheit zu bilden. Es muss weiter gewährleistet sein, dass die ES Zell-abgeleiteten Neurone oder Gliazellen mit dem Wirtsgewebe interagieren und funktionelle Einheiten bilden können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten diese beiden Aspekte exemplarisch untersucht werden. Zunächst sollte ein Lineage-Selektions-Verfahren zur Herstellung reiner neuronaler Kulturen etabliert werden. Dazu sollten murine ES Zellen mit einem  $T\alpha 1$ -Tubulin-EGFP ( $T\alpha 1$ -EGFP) Konstrukt stabil transfiziert werden. Dieses Konstrukt erlaubt die Identifizierung junger Neurone durch EGFP-Fluoreszenz. Nach *in vitro* Differenzierung in neurale Vorläuferzellen sollten die EGFP-positive Population charakterisiert und  $T\alpha 1$ -EGFP-positive Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Fluorescence-activated cell sorting; FACS-Sortierung) isoliert werden. Für die Gewinnung hoch aufgereinigter glialer Kulturen sollte ein kontrolliertes *in vitro* Differenzierungsverfahren eingesetzt werden. Die so gewonnenen glialen Vorläuferzellen sollten mit einem CMV-EGFP Konstrukt stabil transfiziert und in organotypischen Schnittkulturen des Ratten-Hippocampus hinsichtlich ihrer Migrations-, Differenzierungs- und Integrations-Fähigkeit analysiert werden. In einem weiteren Schritt sollten die Differenzierung und Plastizität ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach *in vivo* Transplantation in den Hippocampus der Ratte untersucht werden.

### 1. Einleitung

Die Entwicklung von Zellersatzstrategien für das Zentralnervensystem (ZNS) stellt eine der größten medizinischen Herausforderungen dar. Kaum ein anderes Organsystem zeigt ein so geringes Regenerationspotential wie das ZNS des Menschen. Mit den Entwicklungen in der Stammzelltechnologie wurden Voraussetzungen geschaffen, Spenderzellen für neurale Transplantationen *in vitro* zu erzeugen und zu vermehren (Brüstle 1999b; Brüstle und McKay 1996; Franklin und Blakemore 1995). Grundvoraussetzungen für die Verwendung dieser Zellen sind eine hohe Reinheit der Zellpopulationen

und deren Fähigkeit, funktionell in das Empfängergewebe zu integrieren. Unter den verschiedenen Strategien haben insbesondere die Isolierung und Expansion neuraler Stammzellen, die Gewinnung neuraler Zellen aus gewebefremden Stammzellen (Transdifferenzierung) und die *in vitro* Differenzierung von ES Zellen besondere Bedeutung erlangt. Im Folgenden sollen diese drei Ansätze vorgestellt werden.

## 1.1 Neurale Stammzellen

### 1.1.1 Primäre neurale Stammzellen

Die enorme Komplexität des ZNS stellt für jeden zelltherapeutischen Ansatz eine große Herausforderung dar. Aufgrund der Vielzahl der neuronalen und glialen Zelltypen und ihrer mannigfachen Verbindungen ist die Transplantation bereits ausgereifter Zellen unmöglich. Vielmehr müssen unreife, noch migrationsfähige Vorläuferzellen in eine geschädigte Architektur transplantiert und zur Ausreifung gebracht werden. Bislang musste fetales Spendergewebe eingesetzt werden, um neurale Vorläuferzellen in ausreichender Zahl für Transplantationsstrategien zu erhalten. Bei Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington befindet sich diese Strategie bereits im klinischen Einsatz. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Vorläuferzellen, die aus dem ventralen Mesencephalon menschlicher Feten gewonnen wurden, in dopaminerge Neurone ausreifen, mehrere Jahre überleben und zu einer Reduzierung der Bewegungsstörungen führen (Lindvall 1994). Jedoch bestehen bezüglich der Verfügbarkeit des Spendergewebes Limitationsprobleme; für die Transplantation eines Parkinson-Patienten wurde z.T. Gewebe von sechs und mehr menschlichen Feten eingesetzt (Kordower *et al.* 1996). Der Transplantation von Astrozyten wurde hingegen bisher nur geringe Aufmerksamkeit gewidmet (Gates *et al.* 1998; Zhou und Lund 1993). Dies ist erstaunlich, wenn man die wichtige Rolle von Astrozyten beim Erhalt der neuronalen Integrität und der Stabilisierung des extrazellulären Milieus bedenkt. Erst kürzlich konnte eine Astrozyten-induzierte Neurogenese von adulten neuralen Stammzellen nachgewiesen werden, die die Sichtweise untermauert, dass Astrozyten beim Erhalt der neuronalen Population viel eher eine aktive als eine passive Rolle spielen (Song *et al.* 2002).

In den letzten Jahren hat sich das Konzept einer gemeinsamen neuralen Stammzelle für Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten etabliert. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass aus dem embryonalen Gehirn isolierte Stammzellen in diese drei Zelltypen differenzieren können (Johe *et al.* 1996; Davis und Temple 1994; Kilpatrick und Bartlett 1993; Reynolds *et al.* 1992; Temple 1989). Verschiedene Arbeitsgruppen isolierten neurale Vorläuferzellen aus dem embryonalen ZNS und

propagierten sie *in vitro* in der Anwesenheit von Fibroblastenwachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor; FGF2), epidermalem Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor; EGF) und anderen Faktoren. Unter diesen Bedingungen können die Zellen als multipotente Stammzellen vermehrt werden. Werden die Wachstumsfaktoren entzogen, reifen diese Stammzellen spontan in Neurone und Gliazellen aus (Goldman *et al.* 1996; Johe *et al.* 1996; Ghosh und Greenberg 1995; Kirschenbaum *et al.* 1994; Richards *et al.* 1992; Cattaneo und McKay 1990). Multipotente neurale Vorläuferzellen wurden inzwischen auch aus dem erwachsenen Gehirn und Rückenmark isoliert (Gritti *et al.* 1996; Johe *et al.* 1996; Weiss *et al.* 1996; Gage *et al.* 1995; Reynolds und Weiss 1992). Einige Arbeitsgruppen konnten diese an Nagetieren erzielten Ergebnisse auch auf aus dem fetalen und adulten menschlichen Gehirn isolierte Zellen übertragen (Palmer *et al.* 2001; Brüstle *et al.* 1998; Flax *et al.* 1998, Kirschenbaum *et al.* 1994).

Neben multipotenten konnten auch Stammzellen mit eingeschränktem glialen oder neuronalen Differenzierungspotential aus dem Neuralrohr und dem embryonalen Rückenmark gewonnen werden (Alvarez-Buylla *et al.* 2001; Mujtaba *et al.* 1999; Mayer-Proschel *et al.* 1997; Rao und Mayer-Proschel 1997). Aktuelle Befunde weisen darauf hin, dass auch Gliazellen als multipotente Vorläuferzellen fungieren können. Doetsch *et al.* (1999) konnten zeigen, dass Astrozyten der Subventrikularzone (SVZ) unter nicht-regenerativen Bedingungen als neuronale Vorläuferzellen fungieren. Diese ursprünglich GFAP-positiven Zellen wandern entlang des ‚rostral migratory streams‘ in den Bulbus olfactorius, wo sie zu Interneuronen differenzieren. Malatesta *et al.* (2003, 2000) beschrieben, dass sowohl radiäre Gliazellen als auch Astrozyten im neonatalen Gehirn in Neurone differenzieren können. Eine wichtige Rolle hierbei spielt der Transkriptionsfaktor Pax6. Heins *et al.* (2002) konnten zeigen, dass Pax6-defiziente Mäuse ein reduziertes Neurogenese-Potential aufweisen. Weiterhin wurde in Astrozyten, die aus dem postnatalen Cortex gewonnen wurden, *in vitro* durch retroviral vermittelte Pax6-Expression eine Differenzierung zu Neuronen induziert. Die Überführung astrozytär differenzierter Zellen in einen neuronalen Phänotyp bietet interessante Ansatzpunkte für die neuronale Regeneration.

#### **1.1.1.1 Persistenz neuraler Stammzellen im adulten Gehirn**

Im erwachsenen Säugergehirn konzentriert sich die Neubildung von Nervenzellen vor allem auf zwei Regionen. Innerhalb des Hippocampus findet im Bereich des Gyrus dentatus eine ständige Neubildung statt (Kuhn *et al.* 1996; Altman und Das 1965). Auch in der Subventrikularzone von Nagetieren werden Neurone neu gebildet (Doetsch *et al.* 1999; Altman 1969). Dieses Phänomen der adulten Neurogenese konnte vor kurzer Zeit auch beim Menschen nachgewiesen werden (Eriksson *et al.* 1998). Langfristig

könnte dieses Phänomen Perspektiven eröffnen, neu gebildete endogene Neurone in defekte Gehirnregionen zu rekrutieren.

### 1.1.2 Neurale Stammzelllinien

Allen Stammzellpopulationen ist die Fähigkeit zur Wachstumsfaktor-abhängigen Expansion *in vitro* gemeinsam. Dies macht sie zu einer attraktiven Alternative zu den bislang klinisch eingesetzten fetalen Primärzellpopulationen (Abb. 1A; Svendsen und Smith 1999; McKay 1997). Jedoch sind diese Zellen nur begrenzt expansionsfähig. Eine Möglichkeit, um große Zellzahlen generieren zu können, ist die Herstellung immortalisierter Stammzelllinien. Dazu werden aktivierte Onkogene eingeschleust, die Vorläuferzellen permanent vermehrungsfähig halten (Abb. 1B). Ein Beispiel ist die aus dem Kleinhirn gewonnene, durch das *v-myc*-Gen immortalisierte Linie C17.2 (Snyder *et al.* 1997). Bei einer weiteren immortalisierten Zelllinie (RN33B) konnten durch Transplantation in verschiedene Areale des neonatalen und adulten Gehirns regionalspezifische Phänotypen induziert werden (Shihabuddin *et al.* 1995). Kürzlich gelang es, immortalisierte neurale Vorläuferzelllinien mit glialem und neuronalem Differenzierungspotential ebenfalls aus fetalem humanem Gehirngewebe zu etablieren. Auch diese Zellen reifen nach Transplantation in das Nagetiergehirn in regionalspezifische Phänotypen aus (Flax *et al.* 1998). Trotz dieser viel versprechenden Befunde scheint ein klinischer Einsatz Onkogen-immortalisierter Stammzellen momentan wenig wahrscheinlich, denn in der Spenderzellpopulation verbleibt ein potenziell tumorigenes Gen.

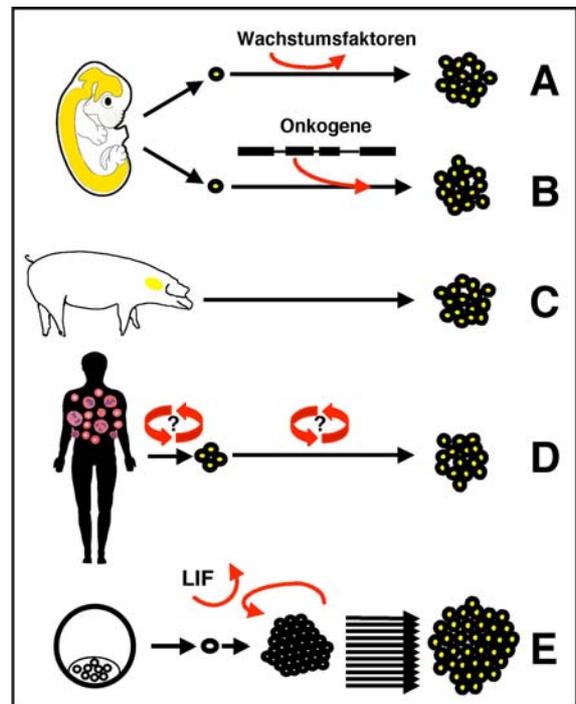


Abb. 1: Potentielle Spenderquellen für klinische Zellersatzstrategien, dargestellt am Beispiel der neuralen Transplantation. (+) und (-) kennzeichnen die wichtigsten Vor- und Nachteile der einzelnen Strategien. (A) Wachstumsfaktor-vermittelte Expansion fetaler Spenderzellen. (+) Rechtlich zulässige Quelle für menschliche Spenderzellen. (-) Erfordert fetales Hirngewebe, begrenzte Expansionsfähigkeit. (B) Onkogen-vermittelte Immortalisierung. (+) Uneingeschränkte Vermehrbarkeit. (-) Potentielle Tumorinduktion durch das eingefügte Onkogen. (C) Xenotransplantation. (+) Kein menschliches Gewebe erforderlich. (-) Potentielle Übertragung tierischer Pathogene auf den Menschen. (D) Gewinnung neuraler Vorläuferzellen aus somatischen Stammzellen. (+) Spenderzellen könnten vom selben Patienten gewonnen werden. (-) Bisher nicht gezielt in der Zellkultur durchführbar, Expansionsfähigkeit der somatischen Stammzellen vor und nach Transdifferenzierung unklar. (E) Gewinnung neuraler Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen. (+) Nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit, über Kernreprogrammierungs-Strategien auch autolog durchführbar, gezielte Elimination krankheitsassoziiierter Gene möglich. (-) Als Ausgangspunkt werden humane Blastozysten benötigt. Aus Wernig *et al.* 2003.

### 1.1.3 Xenogene neurale Stammzellen

Die Xenotransplantation ist eine weitere Möglichkeit, die limitierte Verfügbarkeit von humanem Spendergewebe zu umgehen (**Abb. 1C**). Gewebe tierischen Ursprungs wird bereits seit längerer Zeit für die Organteilrekonstruktion eingesetzt. Für diesen Ansatz hat sich insbesondere porcines Gewebe bewährt, da die Größe und die Funktion von Organen des Schweins denen menschlicher Organe sehr nahe kommen. Die Xenotransplantation birgt ein besonderes Abstoßungsrisiko, jedoch besteht für Zelltransplantate im ZNS eine Sondersituation. Da die intakte Blut-Hirn-Schranke den Zugriff des Immunsystems auf das ZNS einschränkt, wird die Problematik der Histoinkompatibilität relativiert. Einige Gruppen konnten zeigen, dass neurale Vorläuferzellen, die aus unterschiedlichen Spezies isoliert wurden, die Fähigkeit haben, das adulte Nagergehirn zu innervieren (Isacson *et al.* 1995; Davies *et al.* 1994; Wictorin *et al.* 1990). Die ersten klinischen Studien zur Transplantation porciner Neurone in Parkinson- und Huntington-Patienten wurden bereits durchgeführt (Fink *et al.* 2000, Schumacher *et al.* 2000). Neuere Überlegungen gehen dahin, transgene Tiere mit ‚humanisierten‘ Oberflächenantigenen als Spender einzusetzen. Auf diese Art wäre es möglich, tierische Zellen mit humanen MHC-Antigenen zu erhalten und so Abstoßungsreaktionen zu mildern (Lee *et al.* 2002). Ein Risiko der Xenotransplantation bleibt jedoch die mögliche Übertragung tierischer Pathogene auf den Menschen (Blusch *et al.* 2002; Van der Laan *et al.* 2000).

### 1.1.4 Plastizität, Migrationsfähigkeit und regeneratives Potential neuraler Stammzellen

Neurale Stammzellen müssen über die notwendige Plastizität verfügen, am Zielort in den gewünschten Phänotyp auszureifen, um sie für den Zellersatz nutzen zu können. Die Ergebnisse mehrerer Arbeiten weisen darauf hin, dass aus dem embryonalen Gehirn gewonnene Vorläuferzellen eine große Plastizität besitzen und – unabhängig von ihrem Herkunftsort – an der Neurogenese zahlreicher anderer Regionen teilnehmen können (Brüstle *et al.* 1995; Campbell *et al.* 1995; Fishell 1995). Da die überwiegende Zahl der mit einem Zellverlust verbundenen neurologischen Erkrankungen große Teile von Gehirn und Rückenmark mit einbezieht, wäre für eine effiziente Rekonstruktion die Einschleusung von Spenderzellen in eine Vielzahl von Gehirnregionen nötig. Dieses Problem ist am erwachsenen Gehirn heute selbst im Tierversuch noch nicht lösbar. Anders verhält es sich mit der Behandlung von Defekten in früheren Entwicklungsstadien. Sowohl im embryonalen Gehirn als auch kurz nach der Geburt ist es noch möglich, größere Zellmengen über das Ventrikelsystem zu applizieren. Auf diese Art ließen sich beispielsweise Myelin-bildende gliale Spenderzellen in das Gehirn Myelin-defizienter Ratten und Mäuse einschleusen. Dies führt in verschiedenen Regionen zum Aufbau neuer Myelinscheiden (Brüstle *et al.* 1999a; Learish *et*

*al.* 1999; Yandava *et al.* 1999). Die Behandlung generalisierter Defekte im adulten ZNS wird entscheidend davon abhängen, ob die Migrationseigenschaften transplanteder neuraler Vorläuferzellen weiter optimiert und diese Zellen von den Defekten selbst rekrutiert werden können.

Die Transplantation neuraler Stamm- und Vorläuferzellen eröffnet auch interessante Perspektiven für den Zell-vermittelten Gentransfer. Dies gilt insbesondere für die Verwendung von Astrozyten. Bei diesem Ansatz werden in den Empfänger Zellen eingeschleust, die genetisch verändert wurden und therapeutisch wirksame Faktoren exprimieren. Insbesondere in schwer zugänglichen und besonders vulnerablen Geweben böten migratorisch aktive Vorläuferzellen eine attraktive Möglichkeit, systemisch nicht applizierbare Substanzen in größere Areale einzubringen. Ein am Tiermodell bereits umgesetztes Beispiel hierfür ist die Substitution von Enzymen bei Speichererkrankungen (Lacorazza *et al.* 1996; Snyder *et al.* 1995). Auch der Zell-vermittelte Gentransfer von Wachstumsfaktoren und Neurotrophen hat in verschiedenen Modellen neurologischer Erkrankungen positive Effekte erbracht. So konnten z.B. durch die Transplantation von ‚nerve growth factor‘ (NGF)-produzierenden neuralen Vorläuferzellen in das Septum axotomierte cholinerge Neurone vor dem Untergang bewahrt werden (Martinez-Serrano *et al.* 1995).

## 1.2 Transdifferenzierung somatischer Stammzellen

Die klassische Anschauung, dass adulte, gewebespezifische Stammzellen lediglich innerhalb ihres Organsystems ausdifferenzieren können, ist in den letzten Jahren durch zahlreiche experimentelle Befunde in Frage gestellt worden. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass zumindest bestimmte adulte Stammzellpopulationen ein weitaus breiteres Differenzierungspotential besitzen als bisher angenommen wurde. So konnte gezeigt werden, dass neurale Stammzellen aus dem embryonalen und adulten Gehirn nach Injektion in bestrahlte Mäuse in verschiedene hämatopoetische Zelllinien ausreifen (Bjornson *et al.* 1999). Auch nach Injektion von neuralen Stammzellen aus dem erwachsenen Mäusegehirn in Blastozysten, die daraufhin in die Gebärmutter implantiert und zu Embryonen weiterentwickelt wurden, fanden sich Abkömmlinge der neuralen Stammzellen in zahlreichen Organen wie z.B. Darm, Herzmuskel, Haut und Gehirn (Clarke *et al.* 2000).

Eine derartige ‚Transdifferenzierung‘ adulter Stammzellen wäre medizinisch vor allem dann interessant, wenn es gelänge, aus Stammzellen regenerativer Gewebe wie dem Knochenmark und der Haut Spenderzellen für Zellersatzstrategien in nicht oder wenig regenerativen Organen wie dem Gehirn zu

entwickeln (**Abb. 1D**). Aus Knochenmarks-Transplantaten ergaben sich Hinweise darauf, dass Knochenmarkszellen in das Gehirn von Tier und Mensch einwandern und dort zu einem geringen Prozentsatz neuronale Marker exprimieren können (Weimann *et al.* 2003; Priller *et al.* 2001; Brazelton *et al.* 2000; Mezey *et al.* 2000). Ob es sich bei diesen Zellen tatsächlich um funktionell aktive Neurone handelt, ist zurzeit noch unklar. Eine weitere als sehr plastisch beschriebene Zellpopulation stellen die aus adultem Knochenmark gewonnenen, so genannten ‚multipotent adult progenitor cells‘ (MAPCs) dar. MAPCs sind über zahlreiche Passagen vermehrbar und exprimieren *in vitro* neben Merkmalen mesenchymaler Zellen auch neuroektodermale und endodermale Antigene (Jiang *et al.* 2002).

Andere Befunde mahnen zu einer vorsichtigen Interpretation von Transdifferenzierungsstudien. Nach Kokultur von adulten Knochenmarkszellen bzw. adulten neuralen Stammzellen mit embryonalen Stammzellen fand sich eine geringe Anzahl von Zellen, welche die Eigenschaften sowohl von adulten als auch von ES Zellen aufwiesen. In weiteren Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass dem nicht eine Transdifferenzierung, sondern eine Fusion adulter und embryonaler Stammzellen zugrunde lag (Terada *et al.* 2002; Ying *et al.* 2002). Derzeit ist unklar, welche Wertigkeit den Fusionsphänomenen bei der Interpretation von Transdifferenzierungsstudien zukommt. Condorelli *et al.* (2001), De Angelis *et al.* (1999) und Steffel *et al.* (2003) fanden heraus, dass heterotop transplantierte Zellen zusätzliche ortsspezifische Charakteristika annehmen konnten, ohne ihre ursprünglichen Merkmale zu verlieren. Diese Befunde deuten weniger auf eine *bona fide* Transdifferenzierung als vielmehr auf ein Mimikry-Phänomen hin.

### 1.3 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen, die zu diesem Zeitpunkt aus dem Trophektoderm und der inneren Zellmasse aufgebaut ist (**Abb. 1E**). Aus dem Trophektoderm entsteht das Chorion, das den embryonalen Teil der Plazenta bildet (Gilbert 2000). Aus den ES Zellen entwickeln sich alle Zelltypen des Embryos. Erstmals wurden ES Zellen aus der Maus isoliert, aber in der Zwischenzeit konnten sie aus unterschiedlichen Spezies gewonnen werden (Pain *et al.* 1996; Thomson *et al.* 1995; Iannaccone *et al.* 1994; Wheeler 1994; Doetschman *et al.* 1985; Evans und Kaufman 1981; Martin 1981). Ein erster Schritt in Richtung therapeutischer Anwendung von ES Zellen ist sicherlich die Herstellung von embryonalen Stammzellen des Menschen (Thomson *et al.* 1998). Ihre nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit (Smith *et al.* 1988) und ihre Pluripotenz machen embryonale Stammzellen zu einer viel versprechenden Donorquelle für Transplantationsstrategien, denn

diese Zellen bilden eine unerschöpfliche Spenderquelle für gewebsspezifische Vorläuferzellen (**Abb. 1E**). Eine eindruckliche Bestätigung der Pluripotenz von ES Zellen spiegelt sich in Befunden der letzten Monate wieder. Hubner *et al.* (2003) konnten zeigen, dass ES Zellen der Maus in der Zellkultur Oozyten bilden können, die in die Meiose eintreten, benachbarte Zellen zur Bildung einer Follikel-ähnlichen Struktur rekrutieren und sich parthenogenetisch zu einer Blastozyste weiter entwickeln können. Toyooka *et al.* (2003) demonstrierten die Bildung männlicher Keimzellen aus ES Zellen *in vitro*. Nach Transplantation in rekonstituierte Tubuli testiculares beteiligten sich diese ES Zell-abgeleiteten Keimzellen an der Spermatogenese.

Ein weiterer entscheidender Vorteil von ES Zellen ist die Möglichkeit, an ihnen komplexe genetische Veränderungen durchführen zu können. Diese Eigenschaft findet vor allem bei der Herstellung transgener Mäuse Anwendung. Über homologe Rekombination werden einzelne Gene in ES Zellen ersetzt, inaktiviert oder modifiziert. Nach Keimbahntransfer und Gewinnung homozygoter Nachkommen kann an solchen Tieren die Bedeutung einzelner Gene während der Entwicklung oder im Krankheitsverlauf studiert werden (Brinster 1993; Zimmer 1992). Die Transfektion von ES Zellen erlaubt es ebenfalls, selektierbare Marker für bestimmte Zelltypen einzubringen und aus ES Zellen somatische Zelltypen in hoher Reinheit zu generieren.

### 1.3.1 ES Zellen als Donorquelle für den Zellersatz

In den letzten Jahren wurde intensiv daran geforscht, aus ES Zellen für die Transplantation relevante Zellpopulationen wie Herzmuskelzellen (Wobus *et al.* 2002, 1997; Hescheler *et al.* 1997; Klug *et al.* 1996; Maltsev *et al.* 1994), Insulin-produzierende Zellen (Lumelsky *et al.* 2001; Soria *et al.* 2000), hämatopoetische Zellen (Palacios *et al.* 1995; Gutierrez-Ramos und Palacios 1992; Wiles und Keller 1991) und Zellen des Zentralnervensystems (Wernig *et al.* 2002; Benninger *et al.* 2000; Fuchs und Serge 2000; Lee *et al.* 2000; Brüstle *et al.* 1999a; McDonald *et al.* 1999; Li *et al.* 1998; Finley *et al.* 1996; Okabe *et al.* 1996; Bain *et al.* 1995; Fraichard *et al.* 1995; Strübing *et al.* 1995) herzustellen. Bei den ursprünglich eingesetzten Protokollen wurde die neurale Differenzierung von ES Zellen durch Zugabe von Retinsäure induziert. Neuere Protokolle generieren neurale Vorläuferzellen in definierten serumfreien Medien ohne Zugabe von Retinsäure (Okabe *et al.* 1996). Ähnlich wie Primärzellen können diese Zellen mit Wachstumsfaktoren wie FGF2 expandiert werden und reifen nach Wachstumsfaktorentzug in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone aus. Brüstle *et al.* (1997) konnten zeigen, dass ES Zell-abgeleitete neurale Vorläuferzellen nach Injektion in embryonale Rattengehirne in unterschiedliche Wirtsregionen inkorporieren und in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone differenzieren. Ein ernst

zu nehmendes Risiko transplanteder ES Zell-abgeleiteter Zellen ist die Tumorbildung. Es ist seit langem bekannt, dass ES Zellen nach Transplantation Teratome bilden können. In der Tat wurde dies sowohl für Retinsäure-behandelte ES Zellen als auch für nach dem Okabe-Protokoll hergestellte Zellen nach Transplantation beschrieben (Wernig *et al.* 2004; Deacon *et al.* 1998; Brüstle *et al.* 1997; Dinsmore *et al.* 1996; Damjanov 1993). Dies verdeutlicht, dass die Herstellung reiner Zellpopulationen für den therapeutischen Einsatz dieser Zellen unentbehrlich ist.

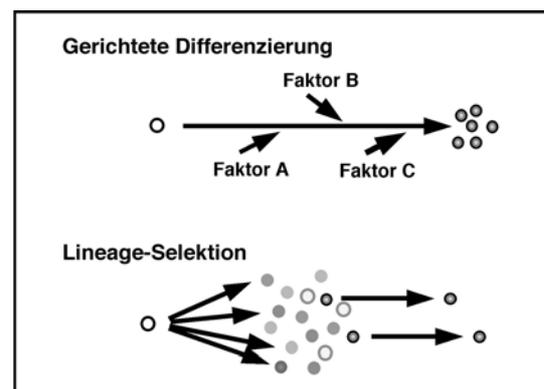
### 1.3.2 Strategien für die Herstellung reiner somatischer Vorläuferzellen aus ES Zellen

Die Aussicht, ES Zell-abgeleitete somatische Vorläuferzellen für Transplantationszwecke nutzen zu können, rief eine intensive Suche nach Aufreinigungs-Strategien hervor. Im Prinzip gibt es zwei Wege für die Herstellung hoch aufgereinigter Populationen:

#### 1.3.2.1 Gerichtete Differenzierung

Die Strategie der gerichteten Differenzierung zielt darauf ab, die gesamte Zellpopulation in Richtung eines bestimmten Phänotyps zu dirigieren (Abb. 2). Dieses Konzept basiert auf der Zugabe von definierten Medien und extrinsischen Faktoren zu verschiedenen Stadien der *in vitro* Differenzierung (Schuldiner *et al.* 2000). Bei der neuronalen Differenzierung von ES Zellen häufig verwendete Faktoren umfassen unter anderem FGF2, EGF, PDGF (platelet derived growth factor), Retinsäure und LIF (leukemia inhibitory factor). In den letzten Jahren ist es gelungen, unter Verwendung der gerichteten Differenzierung aus ES Zellen vermehrbare neurale Vorläuferzellen zu generieren (Abb. 3). Okabe

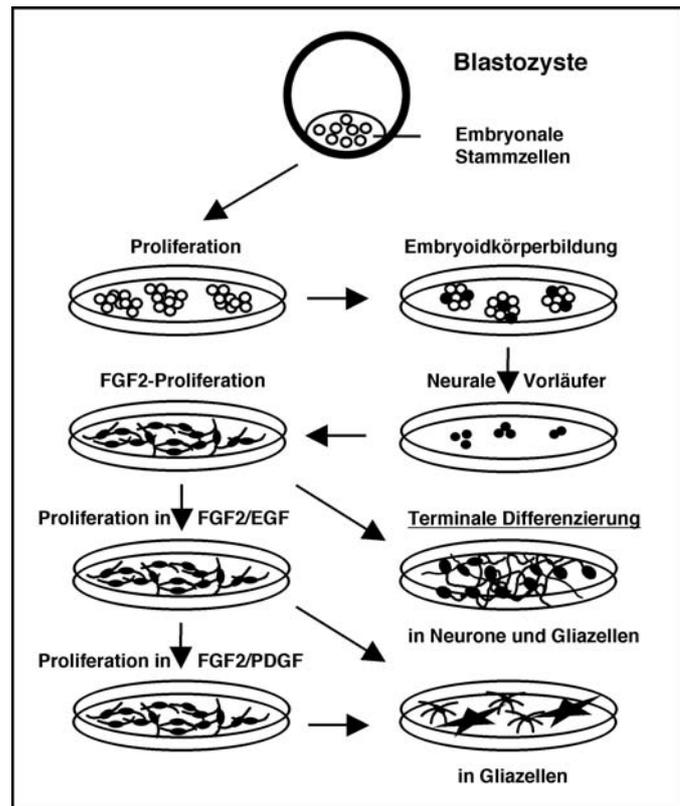
*et al.* (1996) beschrieben ein Protokoll, mit dem über die Zugabe von FGF2, Laminin und definiertem Medium neurale Vorläuferzellen angereichert werden können. Hierzu werden die ES Zellen in Anwesenheit von LIF proliferiert und dann zu Embryoidkörpern (EBs) aggregiert. Nach vier Tagen werden die EBs plattiert und in einem Medium kultiviert, welches das Überleben neuraler Vorläuferzellen begünstigt. Die neuralen Vorläuferzellen werden dann in einem definierten Medium unter Zugabe von FGF2 proliferiert. Nach Wachstumsfaktorentzug differenzieren die neuralen Vorläuferzellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten aus. Werden diese Zellen während der Gehirnentwicklung in das



**Abb. 2:** Verfahren zur Gewinnung hoch aufgereinigter somatischer Zellpopulationen aus embryonalen Stammzellen. Bei der *gerichteten Differenzierung* wird die Gesamtheit der undifferenzierten ES Zellen durch Wahl entsprechender Zellkulturmedien und extrinsisch applizierter Faktoren in einen bestimmten Zelltyp überführt. Die *Lineage-Selektion* beruht auf einer zunächst wenig gerichteten, spontanen Differenzierung in verschiedene Zelltypen, aus denen die gewünschte Population mit Hilfe Zelltyp-spezifisch exprimierter selektierbarer Marker isoliert wird. Häufig werden beide Methoden kombiniert angewandt. Aus Wernig *et al.* 2003 (modifiziert).

Ventrikelsystem embryonaler Empfängertiere transplantiert, wandern sie in zahlreiche Gehirnregionen ein und bilden reife Neurone und Gliazellen aus. Allerdings weisen die Transplantat-Empfänger auch Teratome auf (Brüstle *et al.* 1997; 1.3.1).

Brüstle *et al.* (1999a) konnten ein Protokoll etablieren, mit dem es erstmals möglich wurde, aus embryonalen Stammzellen der Maus hoch aufgereinigte gliale Vorläuferzellen zu generieren (Abb. 3). Die nach dem Protokoll von Okabe *et al.* (1996) gewonnenen neuralen Vorläuferzellen werden unter FGF2 proliferiert und fünf Tage später geerntet und in definiertem Medium unter Zugabe von FGF2 und EGF replattiert. Erlangen die ES Zell-abgeleiteten neuralen Vorläuferzellen Subkonfluenz, werden die Zellen erneut geerntet und in einem Medium, das FGF2 und PDGF-AA enthält, replattiert. Diese Kombination von Wachstumsfaktoren fördert die Proliferation von glialen Vorläuferzellen (Bogler *et al.* 1990). Die Zellen lassen sich mit dem Antikörper A2B5 markieren, der ein für gliale Vorläuferzellen typisches Epitop erkennt. Der Entzug von Wachstumsfaktoren erlaubt die Differenzierung in Astrozyten und Oligodendrozyten. Werden diese Zellen in das Ventrikelsystem myelindefizienter Ratten transplantiert, wandern sie in viele Gehirnregionen ein und bilden Myelinscheiden (Brüstle *et al.* 1999a).



**Abb. 3:** Gezielte Differenzierung von murinen ES Zellen in multipotente neurale und nachfolgend gliale Vorläuferzellen. Nach einer initialen Proliferationsphase werden die ES Zellen zu so genannten Embryoidkörpern aggregiert. Diese frei im Zellkulturmedium schwimmenden Sphäroide werden nach wenigen Tagen plattiert und in ein serumfreies Medium überführt, welches das Überleben neuraler Vorläuferzellen begünstigt. Diese werden in Anwesenheit von FGF2 weiter vermehrt. Durch die sequentielle Behandlung mit den Wachstumsfaktoren FGF2 und EGF bzw. FGF2 und PDGF entstehen hoch aufgereinigte gliale Vorläuferzellen. Nach Wachstumsfaktorentzug differenzieren die Zellen in reife Neurone, Astro- und Oligodendrozyten (terminale Differenzierung).

### 1.3.2.2 Lineage-Selektion

Bei der Lineage-Selektion werden aus einem Pool an weit gehend ungerichtet differenzierten ES Zellen über ein Selektionsverfahren die Zellen mit dem gewünschten Phänotyp isoliert (Abb. 2). Exprimiert die zu isolierende Zellpopulation einen spezifischen Oberflächen-Marker, können diese Zellen über immunologische Methoden, wie z.B. Immunopanning, magnetische oder Fluoreszenz-aktivierte

Zellsortierung (FACS-Sortierung) angereichert werden (Cassidy und Frisen 2001; Kawaguchi *et al.* 2001; Keyoung *et al.* 2001; Rietze *et al.* 2001; Sawamoto *et al.* 2001a, 2001b; Malatesta *et al.* 2000; Roy *et al.* 2000a, 2000b, 1999; Uchida *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000, 1998). Im Übrigen bietet sich die Möglichkeit, einen selektierbaren genetischen Marker in die ES Zellen einzuschleusen, der während der *in vitro* Differenzierung nur von der Zielpopulation exprimiert wird. Handelt es sich hierbei um ein Antibiotikaresistenzgen, kann der gewünschte Zelltyp durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums auf einfache Weise selektioniert werden (Pasumarthi und Field 2002; Li *et al.* 1998; Klug *et al.* 1996). Auch durch Transfektion mit fluoreszierenden Transgenen, die unter der Kontrolle Zelltyp-spezifischer Promotoren stehen, ist es in der Vergangenheit gelungen, etwa neurale Vorläuferzellen aus gemischten Zellpopulationen durch FACS-Sortierung zu isolieren (Rietze *et al.* 2001; Roy *et al.* 2000a, 2000b, 1999; Wang *et al.* 2000, 1998). Da aus ES Zellen unbegrenzte Mengen an Gewebe-spezifischen Vorläuferzellen generiert werden können, lassen sich mit Hilfe der Lineage-Selektion auch prozentual seltene Phänotypen effizient anreichern.

#### 1.4 Humane embryonale Stammzellen

Erstmals wurden humane embryonale Stammzellen 1998 im Labor von James Thomson etabliert (Thomson *et al.* 1998). Weitere humane ES Zelllinien folgten (Amit *et al.* 2000; Jones und Thomson 2000; Pera *et al.* 2000). Die isolierten ES Zellen zeigen wesentliche, schon für murine ES Zellen beschriebene Merkmale: Sie lassen sich über lange Zeiträume vermehren und differenzieren in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen aus (Odorico *et al.* 2001). Die Etablierung der ersten humanen ES Zelllinien führte zu einer Expansion der medizinisch orientierten Stammzellforschung (Itskovitz-Eldor *et al.* 2000; Reubinoff *et al.* 2000). Durch Aggregation zu EBs und anschließender Differenzierung werden wie bei Mauszellen somatische Zellen verschiedener Gewebe gebildet. Kehat *et al.* (2001) beschrieben spontan kontrahierende Zellen, die morphologische und immunocytochemische Eigenschaften von Kardiomyozyten aufweisen. Auf ähnliche Weise behandelte ES Zellen bilden Insulin-produzierende Zellen, die nach Glukosestimulation Insulin ins Zellkulturmedium abgaben (Assady *et al.* 2001). Jedoch machen diese beschriebenen Zellpopulationen nur einen kleinen Anteil der Gesamtzellpopulation aus. Hingegen konnten neurale Zellen bereits in einer Reinheit gewonnen werden, die erste Transplantationsexperimente am Tiermodell ermöglichten (Reubinoff *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2001). Nach der Transplantation ins Ventrikelsystem neugeborener Mäuse zeigen diese Zellen ein ausgeprägtes Migrationspotential und wandern in zahlreiche Gehirnregionen ein (Zhang *et al.* 2001). Dort differenzieren sie in Zellen, die morphologisch reifen Neuronen und Gliazellen entsprechen. Vor einer

klinischen Anwendung müssen jedoch tierexperimentelle Studien belegen, dass humane ES Zellen zu einer funktionellen Verbesserung entsprechender Krankheitsbilder führen können.

## 1.5 Risiken und Chancen

Aus dem genannten wird deutlich, dass ein medizinischer Einsatz von ES Zellen nicht nur Vorteile bietet, sondern auch Risiken birgt. So ist die Verwendung von ES Zellen zu therapeutischen Zwecken ohne die Überwindung des Tumorrisikos (1.3.1) nicht denkbar. Hierzu müssen Aufreinigungsverfahren etabliert werden, die potentiell tumorigene undifferenzierte ES Zellen sicher eliminieren. Wie bei anderen nicht-autologen Spenderquellen besteht auch bei der Transplantation ES Zell-abgeleiteter Zellpopulationen das Risiko der Transplantatabstoßung. Hier könnten Kerntransfer-Verfahren langfristig Perspektiven eröffnen, autologe Ersatzzellen zu gewinnen. Bei diesem Verfahren wird der adulte Zellkern, z.B. eines Patienten, mit einer entkernten Eizelle fusioniert. Die so gewonnene Zelle lässt sich zur Blastozyste weiterentwickeln, aus der pluripotente ES Zellen isoliert werden können, deren Kerngenom identisch mit dem des Patienten ist. Dadurch würde eine Transplantation dieser Zellen ohne Abstoßungsreaktionen ermöglicht werden. Bei diesem Verfahren müssten jedoch menschliche Embryonen bis zum Blastozystenstadium kultiviert werden. Weiter wäre eine Vielzahl von Eizellen erforderlich, um für jeden Patienten eine eigene Zelllinie etablieren zu können. Zudem verläuft die Reprogrammierung des Zellkerns meist fehlerhaft und unvollständig, was durch die zahlreichen Fehlbildungen an geklonten Säugetieren dokumentiert wird (Young *et al.* 1998). Diese Aspekte lassen es nicht realistisch erscheinen, dass Kerntransfer-Verfahren in absehbarer Zeit klinisch eingesetzt werden können.

Allerdings stellen Kerntransferstudien eine interessante Möglichkeit dar, die an der Kernreprogrammierung beteiligten Faktoren und Mechanismen zu identifizieren. Das Zytoplasma von Eizellen und pluripotenten Stammzellen könnte Faktoren beinhalten, die eine direkte Reprogrammierung von Zellkernen in frühere Entwicklungsstadien zulassen. Die Identifikation derartiger Faktoren könnte es in Zukunft ermöglichen, adulte Zellen auf direktem Weg in ein pluripotentes, ES Zell-ähnliches Stadium zu überführen, aus dem sich dann autologe somatische Zellen für Zellersatzstrategien entwickeln ließen – ohne Verwendung von Eizellen und ohne Erzeugung von Blastozysten. In diesem Zusammenhang wird die Forschung an embryonalen Stammzellen einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung von Verfahren zur Transdifferenzierung adulter Stammzellen leisten. Die Erkenntnisse von Hubner *et al.* (2003), wonach aus ES Zellen Oozyten entwickelt werden können, könnte bei Übertragung auf den Menschen neue Perspektiven zur Generierung von Empfängerzellen für den Kerntransfer darstellen.

Der Einsatz von ES Zellen geht jedoch weit über den Zellersatz hinaus. Die Stammzellforschung eröffnet der modernen Medizin weitere faszinierende Perspektiven. Die grundlegenden Arbeiten zur Differenzierung embryonaler und gewebespezifischer Stammzellen werden dazu beitragen, die Mechanismen der Entstehung verschiedener Gewebe und Zelltypen besser zu verstehen. So können diese Arbeiten neue Einblicke in die Entwicklungsbiologie des menschlichen Organismus gewähren. Durch ihre einfache genetische Manipulierbarkeit kann der klassische Zell-vermittelte Gentransfer ausgeweitet werden. Nicht nur ein bestimmter Zelltyp kann so ersetzt werden, sondern durch gezielte Modifikation einzelner Gene können Zellen geschaffen werden, die gezielt mit den pathologischen Prozessen im Wirtsgewebe interagieren und funktionelle Defekte kompensieren. Auch für pharmakologische und toxikologische Studien können die aus humanen Stammzellen gewonnenen somatischen Zelltypen herangezogen werden. Die gezielte Modifizierung von Genen in humanen ES Zellen wird es weiterhin ermöglichen, die molekularen Mechanismen vieler Erkrankungen an transgenen zellulären Modellen zu untersuchen.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten zwei Grundvoraussetzungen für den Einsatz von ES Zellen zu Transplantationszwecken erarbeitet werden. Zum einen sollte ein Verfahren zur Gewinnung hoch aufgereinigter neuronaler Zellen aus murinen ES Zellen entwickelt und charakterisiert werden. Hierzu sollte geprüft werden, ob und in wie weit  $T\alpha 1$ -Tubulin als selektierbarer Marker für die Gewinnung von neuronalen Zellen eingesetzt werden kann. So ist aus früheren Arbeiten bekannt, dass  $T\alpha 1$ -Tubulin spezifisch in sich entwickelnden Neuronen exprimiert wird (Gloster *et al.* 1999, 1994; Miller *et al.* 1989; Hieber *et al.* 1998; Przyborski und Cambray-Deakin 1996). Zum anderen sollten hoch aufgereinigte gliale Vorläuferzellen über eine gerichtete Differenzierung gewonnen und deren Integration nach Transplantation in das Gehirngewebe charakterisiert werden.

### 1.6.1 Gewinnung hoch aufgereinigter ES Zell-abgeleiteter Neurone durch Lineage-Selektion

Zunächst sollten durch die Kombination von gerichteter Differenzierung und Lineage-Selektion hoch aufgereinigte ES Zell-abgeleitete Neurone generiert werden. Dabei sollte insbesondere die Wertigkeit des  $T\alpha 1$ -Tubulin Promotors für die Lineage-Selektion von Neuronen untersucht werden. Dazu war vorgesehen, murine ES Zellen mit einem Konstrukt stabil zu transfizieren, das EGFP unter der Kontrolle des  $T\alpha 1$ -Tubulin Promotors enthält. Nach Selektion sollten ES Zellen, die das  $T\alpha 1$ -EGFP-Transgen

stabil exprimierten, in neurale Vorläuferzellen differenziert werden. Die T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen sollten in einem weiteren Schritt anhand der Expression verschiedener neuronaler Marker näher charakterisiert werden. Zur Herstellung einer reinen neuronalen Population sollten die T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen durch FACS-Sortierung isoliert und charakterisiert werden.

### **1.6.2 Gewinnung hoch aufgereinigter glialer Vorläuferzellen und deren Integration in Gehirngewebe**

Für diesen Teil der Arbeit sollten hoch aufgereinigte gliale Vorläuferzellen aus ES Zellen hergestellt und stabil mit einem EGFP-Konstrukt markiert werden. Migration, Differenzierung und Integration dieser Zellen in ZNS-Gewebe sollten an organotypischen Schnittkulturen des Hippocampus untersucht werden. Dieses reduktionistische Modell erlaubt eine detaillierte Analyse dieser Vorgänge in einem Echtzeit-Szenario, was nach *in vivo* Transplantation nicht gewährleistet ist. In einem letzten Schritt sollte die Differenzierung und Plastizität der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen nach Transplantation *in vivo* untersucht werden. Hier sollte insbesondere analysiert werden, ob transplantierte ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen in morphologisch und funktionell distinkte Subpopulationen segregieren. Sowohl in der Schnittkultur als auch nach *in vivo* Transplantation sollte die Fähigkeit der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen nachgeprüft werden, funktionelle Gap Junctions mit residenten Gliazellen auszubilden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Gewebekulturschalen, 96- und 24-well Platten, Falcon-Röhrchen und Elektroporationsküvetten wurden von den Firmen BioRad Laboratories GmbH (München), Corning (New York, USA), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Nürtingen) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

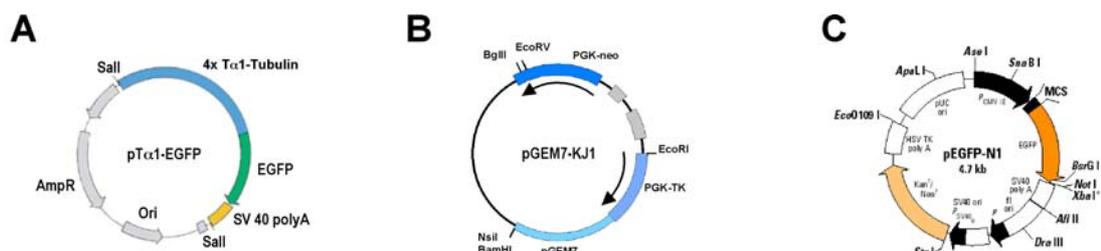
#### 2.1.2 Chemikalien

Die Chemikalien für die Pufferlösungen und Medien wurden von folgenden Firmen bezogen: Biochrom AG Seromed (Berlin), BioRad Laboratories GmbH (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Cellsystems (St. Katharinen), Chemicon (Hofheim), Intergene (Purchase, USA), Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt), Sigma (München), VWR (Lohmar) und Vector Laboratories (Burlingame, USA).

#### 2.1.3 Kits

Endofree Maxi Plasmid Purification Kit	Qiagen (Düsseldorf)
FuGENE™ 6	Roche Diagnostics (Mannheim)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Düsseldorf)

#### 2.1.4 Plasmide



**Abb. 4:** Übersicht der verwendeten Plasmide. (A) pT $\alpha$ 1-EGFP: In ein pUC Backbone wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen HindIII und XhoI eine vierfache T $\alpha$ 1-Tubulin Promotorsequenz eingebracht. Die EGFP-cDNA wurde mit Hilfe einer NotI Schnittstelle in das Plasmid subkloniert (Geschenk von S. Okabe). (B) pGEM7-KJ1: In das Plasmid pGEM7-zt(+) wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen EcoRI und HindIII der Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor mit anschließender Neomycin-Kassette subkloniert (Geschenk von T. Magin). (C) pEGFP-N1: In diesem Plasmid steht EGFP unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (CMV)-Promotors. Zur Selektion in Eukaryoten dient eine Neomycin-Kassette (Clontech, Palo Alto, USA).

## 2.1.5 Antikörper

### 2.1.5.1 Primäre Antikörper

Antigen	Antigen-Beschreibung	Verdünnung	Art	Vorbehandlung	Hersteller
A2B5	Epitop von Silaogangliosiden und Sulfatiden auf der Plasmamembran von Neuronen, Neuroendokrinen und Gliazellen	1:200	Maus IgM		Chemicon (Hofheim)
$\beta$ -III Tubulin	Neuron-spezifischer Zytoskelett-Bestandteil; früher neuronaler Marker	1:500	Maus IgG	Triton-X	BabCo (Covance, USA)
CNPase	2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; wird von Zellen der Oligodendrozyten-Linie (Precursor, Progenitor, Preoligodendrozyten, myelinisierende, reife Oligodendrozyten) exprimiert	1:200	Maus IgG	Triton-X	Sigma (München)
Cx43	Connexin43; typischer Bestandteil von Gap Junctions in Astrozyten	1:300	Kaninchen IgG		Zymed (Berlin)
Doublecortin	Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das exklusiv in migratorisch aktiven und differenzierenden Neuronen exprimiert wird	1:100	Ziege IgG	NDS, Triton-X	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
GABA	Gamma amino butyric acid; inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS	1:300	Kaninchen IgG	Triton-X	Sigma (München)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein; Intermediärfilament in reifen Astrozyten	1:500	Maus IgG Kaninchen IgG	Triton-X	ICN (Costa Mesa, USA) DAKO (Hamburg)
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	1:4000	Kaninchen IgG	Triton-X	Abcam (Cambridge, USA)
Glutamat	Glutamaterge Neurone; excitatorischer Neurotransmitter	1:300	Kaninchen IgG	Triton-X	Sigma (München)
M2	Wird von Astrozyten der Maus exprimiert	1:10	Ratte IgG		Geschenk von C. Lagenaur
MAP2ab	Mikrotubuli-assoziiertes Protein; Isoformen a und b werden in Dendriten reifer Neurone gefunden	1:200	Maus IgG	Triton-X	Sigma (München)
MAP2abc	Mikrotubuli-assoziiertes Protein; Isoform c wird in sich entwickelnden Neuronen und anderen Zellen gefunden (Isoform ab siehe MAP2ab)	1:200	Maus IgG	Triton-X	Sigma (München)
MBP	Myelin basic protein; Myelinisierungsmarker	1:500	Maus IgG	EtOH	Chemicon (Hofheim)
Nestin	Zytoskelett-Bestandteil u.a. neuraler Vorläuferzellen	1:50	Maus IgG Kaninchen IgG	Triton-X	Chemicon (Hofheim) Geschenk R. McKay
NeuN	Ist in den meisten neuronalen Zelltypen des ZNS und des peripheren Nervensystems zu finden; es wird in gerade postmitotischen Neuronen exprimiert	1:200	Maus IgG	Triton-X	Chemicon (Hofheim)
Neurofilament	Axonales Polypeptid; Intermediärfilament reifer Neurone	1:100	Maus IgG	Triton-X	Sigma (München)
NG2	Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan (NG2), das auf der Oberfläche von sich entwickelnden und reifen Gliazellen zu finden ist, die die Eigenschaften von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen haben	1:500	Kaninchen IgG	EtOH	Chemicon (Hofheim)
O4	Sulfatide und Glykolipide, die in Preoligodendrozyten und reifen Oligodendrozyten zu finden sind	1:5	Maus IgM		Chemicon (Hofheim)
S100 $\beta$	Calcium-bindendes Protein (S100 $\beta$ ), das von Gliazellen des ZNS und peripheren Nervensystems produziert und sekretiert wird	1:2000	Kaninchen IgG	Triton-X	Swant (Bellinzona, Schweiz)
Serotonin	Neurotransmitter	1:2000	Kaninchen IgG	Triton-X	Biogenesis (Poole, UK)
Tyrosin Hydroxylase	Wichtiges Enzym bei der Dopaminsynthese	1:200	Kaninchen IgG	Triton-X	Affiniti Research Products (Golden, USA)

### 2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Konjugat	Verdünnung	Art	Hersteller
Biotin	1:500	Esel anti-Ziege IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Biotin	1:200	Ziege anti-Maus IgG	DAKO (Hamburg)
Biotin	1:100	Ziege anti-Maus IgM	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Biotin	1:200	Ziege anti-Kaninchen IgG	DAKO (Hamburg)
Biotin	1:50	Ziege anti-Ratte IgG	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Cy3	1:250	Ziege anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Cy3	1:250	Ziege anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Cy3	1:125 oder 1:200	Streptavidin D	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Cy5	1:250	Ziege anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Cy5	1:250	Ziege anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Cy5	1:125 oder 1:200	Streptavidin D	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
FITC	1:100	Ziege anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
FITC	1:100	Ziege anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
FITC	1:125 oder 1:200	Avidin D	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Hoechst	1:1000	Kernfärbung	Sigma (München)
Lucifer Yellow	1:200	Farbstoff	Molecular Probes (Eugene, USA)
Peroxidase	1:200	Ziege anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Peroxidase	1:200	Ziege anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Rhodamin	1:500	Schaf anti-Digoxigenin IgG	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rhodamin	1:100	Ziege anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Rhodamin	1:100	Ziege anti-Kaninchen IgG	ICN (Costa Mesa, USA)
Texas Red	1:125 oder 1:200	Avidin D	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Tyramid-FITC	1:50	Peroxidase Substrat	Perkin Elmer Life Science (Wellesley, USA)

### 2.1.6 Zelllinien

Für die Koelektroporation der pT $\alpha$ 1-EGFP und pGEM7-KJ1 Plasmide wurde die ES Zelllinie CJ7, für die Lipofektion des pEGFP-N1 Plasmids die ES Zelllinie J1 verwendet. Für die Selektion wurden  $\gamma$ -bestrahlte Neomycin-resistente embryonale Fibroblasten (EFs) eingesetzt.

## 2.2 Geräte

Bühler Schüttler	EB KS-15 Control, Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Cryostat	HM 560, Microm Laborgeräte GmbH (Walldorf)
Elektrotrationsgerät	Gene-Pulser® II, BioRad Laboratories GmbH (München)
Heizblock	UNITEK HB-130/E (Jepson Bolton & Co., Watford, UK)
Hybridisierungsöfen	OV3, Biometra (Göttingen)
Inkubator	Heracell, Heraeus Instruments (Hanau)
Mikroskope	Axiovert 25, Zeiss (Göttingen) Axiovert 135, Zeiss (Göttingen) Axioskop 2, Zeiss (Göttingen) Leica (Wetzlar) LSM-510, Zeiss (Göttingen)
Neubauer Zählkammer	Roth (Karlsruhe)
pH-Meter	CG840, Schott (Mainz)
Photometer	Opti-max tunable, Molecular Devices, Beckmann DU-600
Pipette-Boy	Vacu-Petus, Faust (Schaffhausen, Schweiz)
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus Instruments (Hanau)
Thermostat	MW-26, Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach)
Waagen	LA310S, Sartorius (Göttingen) BL610, Sartorius (Göttingen)
Wärmeplatten	OTS40, Medite (Burgdorf)
Wasserbäder	1008, GFL (Burgwedel)
Vakuumpumpe	BVC21 + BVC01, Vacuubrand GmbH und Co (Wertheim)
Vibratom	VT1000S, Leica (Wetzlar)
Zentrifugen	Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments (Hanau) Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf (Hamburg) RC5B Plus, Sorvall Heraeus Instruments (Hanau)

## 2.3 Lösungen

### 2.3.1 Bakterien

#### LB-Agar

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 7 g Agar

→ mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen, 20 min bei 120°C autoklavieren und bei +4°C lagern

#### LB-Medium

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- 1 ml 1 N NaOH

→ mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen, 20 min bei 120°C autoklavieren und bei +4°C lagern

#### Tris-Acetat-Puffer 50x (TAE)

- 242 g Tris-Base
- 57,1 ml Essigsäure (100%)

→ mit 5,0 M EDTA auf 100 ml auffüllen und pH auf 8,0 einstellen

#### Agarosegel (1%)

- 0,5 g Agarosegel
- 1 ml 50x TAE

→ in 49 ml ddH<sub>2</sub>O lösen und erhitzen

- 2 µl Ethidiumbromid

→ nach Abkühlung hinzufügen und auf Agarosegelkammer blasenfrei ausgießen

### 2.3.2 Zellkultur

#### 2.3.2.1 Puffer

##### HANKS 1x

- 1,9 g Natrium-Bicarbonat

→ in 450 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml 10xHBSS (Hanks balanced salt solution) lösen, pH auf 7,2 einstellen, steril filtrieren (0,2 µm) und bei +4°C lagern

##### HANKS 1x + Hepes

- 1,9 g Natrium-Bicarbonat
- 1,9 g Hepes

→ in 450 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml HBSS lösen, pH auf 7,2 einstellen, steril filtrieren (0,2 µm) und bei +4°C lagern

**HANKS/EDTA (0,04%)**

- 200 mg EDTA
- in 450 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml HBSS lösen, pH auf 7,2 einstellen, steril filtrieren (0,2 µm) und bei +4°C lagern

**Hepespuffer (1M)**

- 26 g Hepes Natrium Salz
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen, pH auf 7,4 einstellen und bei +4°C lagern

**2.3.2.2 Supplemente****DMSO-Einfriermedium 2x**

- 5 ml FKS
  - 3,6 ml DMSO
- in 22,8 ml DMEM-ES lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

**DNase I (1%)**

- 100 mg DNase I
- in 10 ml 1x HANKS lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80°C lagern

**Fibronectin (Fn; 1 µg/µl)**

- 1 mg Fibronectin
- in 1 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80°C lagern

**Gelatine (0,1%)**

- 0,5 g Gelatine
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen, 20 min bei 120°C autoklavieren und bei +4°C lagern

**Glutamin Stocklösung**

- 1,46 g Glutamin
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -20°C lagern

**Insulin Stocklösung (5 mg/ml)**

- 1 g Insulin
- in 200 ml 10 mM NaOH lösen, aliquotieren und bei -80°C lagern

**Natrium-Selenit Stocklösung (500 µM)**

- 0,0865 g Natrium-Selenit
- in 10 ml ddH<sub>2</sub>O lösen und bei -20°C lagern (100x)  
→ 150 µl Stammlösung in 15 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, aliquotieren und bei +4°C lagern

**Nucleosid Stocklösung**

- 40 mg Adenosin
  - 42,5 mg Guanosin
  - 36,5 mg Cytosin
  - 36,5 mg Uridin
  - 12 mg Thymidin
- in 50 ml vorgewärmten ddH<sub>2</sub>O lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

**Paraformaldehyd/PBS (4%)**

- 40 g Paraformaldehyd
- in 1000 ml vorgewärmten 1x PBS lösen, auf Eis abkühlen, mit 0,4 µm Filter filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

**Polyornithin (PO; 1,5 mg/ml)**

- 100 mg PO
- in 67 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern (100x)  
→ 5 ml 100x PO in 495 ml in ddH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren, aliquotieren und bei +4°C lagern

**Progesteron Stocklösung (20 µM)**

- 0,032 g Progesteron
- in 50 ml EtOH abs. lösen und bei -80°C lagern (100x)  
→ 30 µl auf 3 ml EtOH abs. geben, aliquotieren und bei -80°C lagern

**Putrescin Stocklösung (0,1 M)**

- 0,16 g Putrescin
- in 10 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, aliquotieren und bei -80°C lagern

**Transferrin Stocklösung (10 mg/ml)**

- 1 g Transferrin
- in 100 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80°C lagern

**Trypsin/EDTA 1x (0,125%)**

- 1 ml 10x Trypsin/EDTA
- in 9 ml 1x HANKS lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

**Trypsin-Inhibitor (25 mg/ml)**

- 500 mg Trypsin-Inhibitor
- in 20 ml PBS lösen und bei -20°C lagern (100x)  
→ 1 ml 100x Trypsin-Inhibitor in 100 ml PBS, steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

**2.3.2.3 Medien****DMEM**

- 2,25 g Glucose
  - 0,06 g Pyruvat
- in 18 ml DMEM lösen, steril filtrieren (0,2 µm), auf 500 ml DMEM auffüllen und bei +4°C lagern

**DMEM + 10% FKS**

- 5,5 ml FKS (Fötales Kälber Serum)
- zu 500 ml DMEM dazugeben und bei +4°C lagern

**DMEM-ES**

- 5 ml Non-essential Amino Acids
  - 5 ml Nucleosid Stocklösung
  - 13 ml 1 M Hespuffer
  - 3,5 µl β-Mercaptoethanol
- in 18 ml DMEM lösen, steril filtrieren (0,2 µm), auf 500 ml DMEM auffüllen und bei +4°C lagern

**DMEM-ES-PROL**

- 10 ml FKS
  - 5 µl LIF
- zu 40 ml DMEM-ES dazugeben und bei +4°C lagern

**DMEM-ES-DIFF**

- 55 ml FKS
  - 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)
- zu 500 ml DMEM-ES dazugeben und bei +4°C lagern

**ITS Medium**

- 500 µl Insulin Stocklösung
  - 30 µl Natrium-Selenit Stocklösung
- in 15 ml DMEM/F12 lösen, steril filtrieren (0,2 µm) und auf 500 ml DMEM auffüllen; 2,5 ml Transferrin Stocklösung und 5 ml Pen/Strep dazugeben und bei +4°C lagern

**N3 Medium**

- 2,5 ml Insulin Stocklösung
  - 30 µl Natrium-Selenit Stocklösung
  - 500 µl Progesteron Stocklösung
  - 500 µl Putrescin Stocklösung
- in 15 ml DMEM/F12 lösen, steril filtrieren (0,2 µm) und auf 500 ml DMEM/F12 auffüllen; 2,5 ml Transferrin Stocklösung und 5 ml Pen/Strep dazugeben und bei +4°C lagern

**N2 Medium**

- 36 mg Glutamin
  - 0,77 g Glucose
  - 2,5 ml Insulin Stocklösung
  - 30 µl Natrium-Selenit Stocklösung
  - 500 µl Progesteron Stocklösung
  - 500 µl Putrescin Stocklösung
- in 15 ml DMEM/F12 lösen, steril filtrieren (0,2 µm) und auf 500 ml DMEM/F12 auffüllen; 5 ml Transferrin Stocklösung und 5 ml Pen/Strep dazugeben und bei +4°C lagern

### 2.3.3 Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung

#### 2.3.3.1 *Immuncytochemie*

##### Antikörper-Verdünnungs-Lösung (AKV)

- 1% NGS (Normal Goat Serum) oder NDS (Normal Donkey Serum) in PBS
- 0,1% Natrium-Azid
- 0,1% Triton-X (optional)

##### Blocker-Lösung

- 5% NGS oder NDS in PBS
- 0,1% Triton-X (optional)

##### Hepes

- 10 mM Hepes
  - 0,15 M NaCl
- in ddH<sub>2</sub>O lösen und pH auf 7,5 einstellen

##### Hoechstpuffer

- 10 mM NaHCO<sub>3</sub>
- in ddH<sub>2</sub>O lösen und pH auf 8,2 einstellen

#### 2.3.3.2 *Immunhistochemie*

##### AKV für primäre Antikörper

- 5% NGS in PBS
- 0,1% Natrium-Azid
- 0,1% Triton-X

##### AKV für sekundäre Antikörper

- 5% NGS und 3% NRS (Normal Rat Serum) in PBS
- 0,1% Triton-X

##### Blocker-Lösung

- 10% NGS in PBS
- 0,1% Triton-X

#### 2.3.3.3 *In situ* Hybridisierung

##### AKV

- 1% NGS in Puffer I
- 3% NRS
- 0,1% Triton-X

**Blocker-Lösung**

- 2% NGS in Puffer I
- 0,2% Triton-X

**Formamidlösung I**

- 5 ml 20x SSC
  - 10 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 35 ml deionisiertes Formamid
- zusammengeben und pH auf 7,0 einstellen

**Formamidlösung II**

- 5 ml 20x SSC
  - 20 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 25 ml Formamid
- zusammengeben und pH auf 7,0 einstellen

**Hybridisierungspuffer**

- 1 ml Salmon sperm DNA (250 µg/ml)
  - 3,8 ml 20x SSC
  - 24,7 ml Formamid
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 38 ml auffüllen und pH auf 7,0 einstellen

**Puffer I**

- 100 ml 0,5M Tris pH 7,5
  - 15 ml 5M NaCl
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen und 20 min bei 120°C autoklavieren

**SSC Puffer (20x)**

- 175,3 g NaCl
  - 88,2 g Sodiumcitrat
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,0 einstellen und 20 min bei 120°C autoklavieren

**SSC Puffer (0,5x)**

- 1,25 ml 20x SSC
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

**SSC Puffer (2x)**

- 5 ml 20x SSC
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

**SSC Puffer (2x) + EDTA**

- 5 ml 20x SSC
  - 0,5 ml 0,5 M EDTA
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

## 2.4 Plasmidpräparation

*Bakterien (Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells; Invitrogen/Life Technologies) wurden mit den jeweiligen Konstrukten transformiert, um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zur Verfügung zu haben. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten selektioniert und einzelne Klone kultiviert. Zur Kontrolle wurden eine Minipräparation durchgeführt und positive Klone über Gelelektrophorese identifiziert. Diese positiven Bakterienklone wurden erneut kultiviert und einer Endotoxin-freien Maxipräparation zugeführt.*

Die Bakterien wurden vor Beginn der Transformation auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden je 50 µl der kompetenten DH5α Bakterien in sterile Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Es wurden 1-2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA hinzugefügt, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden 20 s bei 37°C Hitze inkubiert und sofort 2 min auf Eis gestellt. Dieser Hitzeschock bewirkt, dass die Bakterienmembran permeabel wird und die DNA aufgenommen werden kann. In jeden Transformationsansatz wurden 0,95 ml vorgewärmtes LB-Medium (37°C) pipettiert und die Bakterien 1 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden 100 µl des Transformationsgemisches 1:10 verdünnt auf Ampicillin-haltige (50 µg/ml; Sigma) LB Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Öse in jeweils 8 ml LB-Medium überführt. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Zur Überprüfung der Plasmid-Aufnahme wurden 6 ml dieser Vorkultur für eine Minipräparation verwendet. Die restlichen 2 ml wurden bei 4°C aufbewahrt und konnten bei Bedarf weiter kultiviert werden. Handelte es sich bei der untersuchten Kolonie um Plasmid-haltige Bakterien, so wurden 1 ml der aufbewahrten Kultur in 8 ml einer weiteren Vorkultur überführt, über Tag bei 37°C und 225 rpm inkubiert, in 250 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Diese Hauptkultur konnte für die Präparation größerer DNA-Mengen, einer Maxipräparation, verwendet werden. Die Mini- und die Maxipräparation wurden unter Verwendung der entsprechenden Kits von Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Positive Klone wurden durch Agarosegelelektrophorese und Verwendung der pUC19 DNA-Leiter (MBI) auf einem 1%igem Agarosegel (Biozyme) identifiziert. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der isolierten DNA wurden photometrisch bestimmt. Die Konzentration an DNA wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wie folgt berechnet:

$$\mu\text{g DNA/ml} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

## 2.5 ES Zellkultur

### 2.5.1 Auftauen von $\gamma$ EF

*Die mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten ( $\gamma$ EF; auch die Neomycin-resistenten) werden zwei Tage vor den ES Zellen aufgetaut, um eine konfluente Verteilung der Zellen zu erreichen. Kokultur mit Feederzellen ist für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums der verwendeten ES Zelllinien notwendig.*

Ein Kryoröhrchen mit  $\gamma$ EFs wurde zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 6 ml DMEM + 10% FKS überführt. Das Kryoröhrchen wurde mit 1 ml Medium gespült. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 6 ml DMEM + 10% FKS resuspendiert. Je 3 ml dieser Suspension wurden auf eine 6 cm Schale überführt. Alle Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

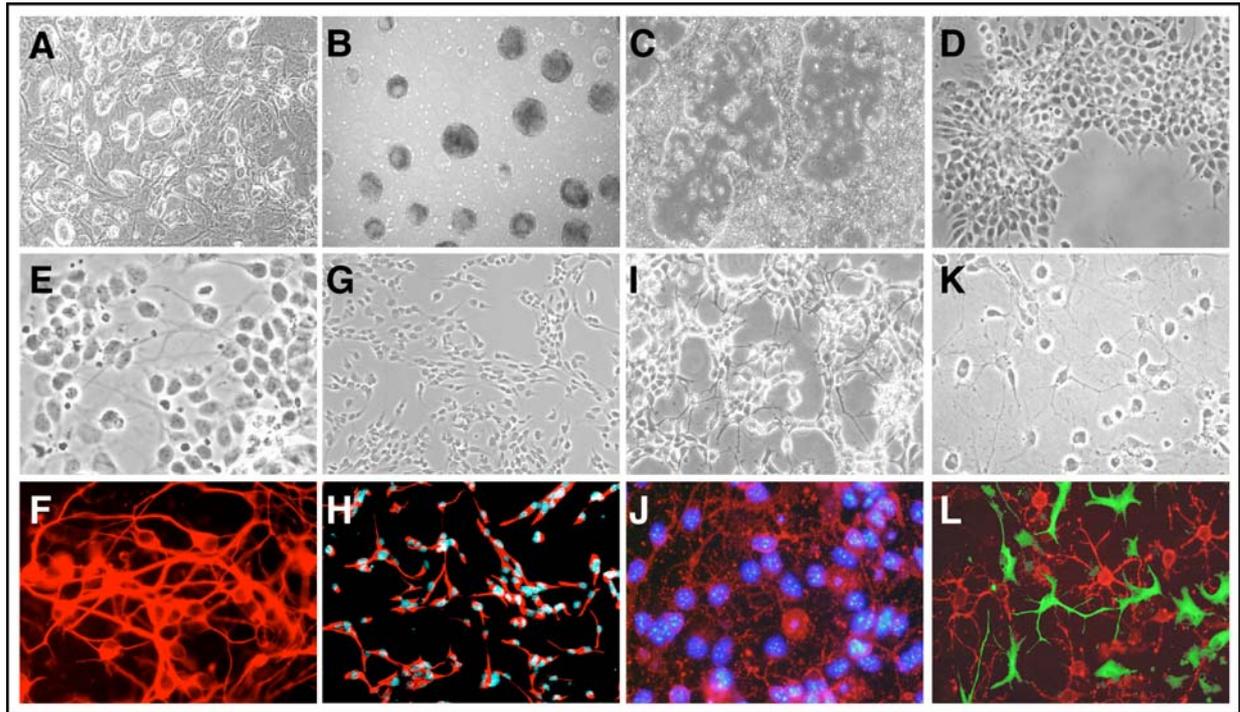
### 2.5.2 Auftauen von ES Zellen

Ein Kryoröhrchen mit ES Zellen (CJ7 oder J1) wurde zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 6 ml DMEM-ES-PROL überführt. Das Kryoröhrchen wurde mit 1 ml Medium gespült. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 6 ml DMEM-ES resuspendiert und die Suspension auf zwei 6 cm Schalen mit  $\gamma$ EFs überführt.

### 2.5.3 Passage auf Gelatine

*Die Zellen wurden auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen überführt, um die Differenzierung zu starten und die  $\gamma$ EFs aus der Kultur zu entfernen. Die Passage erfolgte zwei bis drei Tage nach Auftauen der ES Zellen. Hierbei ist es wichtig, nur undifferenzierte ES Zellen zu überführen. Undifferenzierte ES Zellen sind hell, klein und die Zellcluster sind abgerundet und stark abgegrenzt (Abb. 5A).*

Kulturschalen (6 cm) wurden für 20 min bei Raumtemperatur (RT) mit 0,1% Gelatine inkubiert. Die ES Zellkulturen wurden dreimal mit HANKS/EDTA gewaschen und trypsiniert (1,5 ml pro Schale). Sobald sich die Zellen vom Untergrund lösten, wurden die Zellen mit einer geflämten Pasteurpipette vereinzelt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit DMEM + 10% FKS überführt. Die Schalen wurden mit DMEM +



**Abb. 5:** Mikroskopische Aufnahmen differenzierender ES Zellen in verschiedenen Stadien der neuralen Entwicklung. (A) Undifferenzierte ES Zellen wachsen als Cluster auf einem Rasen mitotisch inaktiver embryonaler Fibroblasten (so genannte „Feeder-Zellen“). (B) Durch Aggregation undifferenzierter ES Zellen entstandene Embryoidkörper. (C) Selektion neuraler Vorläufer nach Plattierung der Embryoidkörper in serumfreiem Medium. (D) Proliferation Nestin-exprimierender multipotenter neuraler Vorläufer in FGF2. Nach Entzug von FGF2 differenzieren die Zellen in postmitotische Neurone und Gliazellen aus. (E) Phasenkontrastaufnahme vier Tage nach FGF2-Entzug; die korrespondierende Immunfluoreszenzdarstellung in (F) zeigt  $\beta$ -III Tubulin in ES Zell-abgeleiteten Neuronen (rot). (G-L) ES Zell-abgeleitete Gliazellen. Die weitere Proliferation multipotenter neuraler Vorläuferzellen in FGF2 und EGF (G, H) und nachfolgend FGF2 und PDGF (I, J) ermöglicht die Gewinnung hoch aufgereinigter bipotenter glialer Vorläufer. (K, L) Diese differenzieren nach Entzug der Wachstumsfaktoren in GFAP-positive Astrozyten (grün) und 04-positive Oligodendrozyten (rot). (G, I, K) Phasenkontrastaufnahmen. (H, J, L) Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen Nestin (H), A2B5 (J), GFAP (L, grün) und 04 (L, rot). Die mit Hoechst-Farbstoff markierten Zellkerne sind blau dargestellt.

10% FKS dreimal gewaschen und die Zellen bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer unter Verwendung von Trypan Blau bestimmt. 2-2,5 Mio. Zellen wurden in 3 ml DMEM-ES-PROL resuspendiert und auf einer mit Gelatine beschichteten 6 cm Schale plattiert. Überzählige Zellen wurden in einer Konzentration von 1,25 Mio. Zellen/ml in 1:2 verdünntem DMSO-Einfriermedium (2x) zuerst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer Styroporkammer eingefroren und am nächsten Tag in Flüssig-Stickstoff-Tanks überführt.

#### 2.5.4 Herstellung von Embryoidkörpern

*Die Differenzierungsinduktion erfolgt durch Entzug von LIF und der Bildung von Embryoidkörpern (EBs). EBs sind durch Aggregation von ES Zellen entstandene Sphäroide, in denen die Zellen spontan in Derivate aller drei Keimblätter differenzieren (Abb. 5B). Die Differenzierung ist ungerichtet. Für die Aggregation zu EBs sollten die ES Zellen subkonfluent sein.*

Nach ein bis zwei Tagen auf Gelatine wurden aus den ES Zellen EBs gebildet. Es wurden pro ES Zell-Schale jeweils 3 ml DMEM-ES-DIFF in acht unbeschichtete 6 cm Bakterialschalen (Nunc) vorgelegt. Die ES Zellen wurden dreimal mit HANKS/EDTA gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin/EDTA von der Schale gelöst. Zur Bildung der EBs dürfen die Zellen nicht vereinzelt werden, sondern sie müssen als Zellaggregate von der Schale gespült werden. Dazu wurden 6,5 ml DMEM-ES-DIFF in eine 10 ml Pipette aufgezogen, die Zellen in einem Fluss abgespült, das Medium vorsichtig wieder aufgenommen und je 1 ml auf die acht Schalen verteilt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um tote Zellen entfernen zu können. Dazu wurden die EBs mit einer 10 ml Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zur Sedimentation gebracht. Das Medium wurde bis auf 5 ml abgesaugt und 27 ml frisches DMEM-ES-DIFF hinzugefügt. Die EBs wurden vorsichtig resuspendiert und je 4 ml auf eine EB-Schale gegeben.

### 2.5.5 Plattieren der EBs und Transfer zu ITSFn

*Durch Plattieren der EBs können Zellen aus den Zellaggregaten auswandern. Auf diese Weise sind sie leichter zu selektionieren. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich bereits neurale Vorläuferzellen unter den Zellen. Durch die Verwendung eines speziellen serumfreien Mediums wird das Überleben der neuronalen Vorläuferzellen gefördert und das Wachstum anderer Zellen inhibiert. Dadurch kommt es zur Selektion neuraler Vorläuferzellen (Abb. 5C).*

Für diesen Schritt wurden drei Tage alte EBs verwendet. Die Zellaggregate wurden wie beim Mediumwechsel (2.5.4) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen und zur Sedimentation gebracht. Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgesaugt. Die EBs wurden vorsichtig in 15 ml DMEM-ES-DIFF resuspendiert. Insgesamt wurden EBs aus acht Schalen auf ein bis zwei 10 cm Zellkulturschalen gleichmäßig verteilt. Am nächsten Tag wurden die plattierten Zellen dreimal mit HANKS gewaschen, um das FKS zu entfernen. Die neurale Selektion wurden durch die Überführung der Zellen zu ITSFn Medium gestartet (Endkonzentration<sub>Fn</sub> = 2,5 µg/ml). Aufgrund des starken Zelltodes erfolgte ein Mediumwechsel alle zwei Tage.

### 2.5.6 Transfer in N3FL Medium

*Die neurale Zellpopulation soll in diesem Stadium zur Proliferation angeregt werden. Dazu werden die Zellen in N3 Medium überführt und in Anwesenheit von FGF2 inkubiert (Abb. 5D). FGF2 fördert das Wachstum der multipotenten neuronalen Vorläuferzellen. Für diesen Schritt ist ein Vereinzeln der Zellen unerlässlich. Als Ausgangspunkt dienen vier Tage in ITSFn kultivierte Zellen.*

Zwei Stunden vor dem Ernten der Zellen wurden 6 cm Schalen mit Polyornithin (PO) beschichtet. Kurz vor Gebrauch wurden diese Schalen dreimal mit HANKS gewaschen. Vier Tage alte ITSFn Kulturen wurden ebenfalls dreimal mit HANKS gewaschen, die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA enzymatisch von der Schale abgelöst und das Trypsin mit 5 ml DMEM + 10% FKS neutralisiert. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und nach einem weiteren Spülen der Schale bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 3 ml einer 0,1%igen DNase-Lösung (in HANKS) resuspendiert. Die DNase-Lösung soll ein Verklumpen der Zellen durch die freigesetzte DNA verhindern. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und vorsichtig unter Verwendung von drei geflämmten Pasteurpipetten, deren Öffnungen graduell verkleinert wurden, zu einer Einzelzellsuspension trituriert. Unter dem Mikroskop wurde der Prozess des Vereinzeln kontrolliert. Die Zellsuspension wurde dann durch ein 40 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und das Sieb mit 7 ml HANKS gespült. Der Filtrationsschritt entfernte alle verbliebenen Zellklümpchen. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden anschließend bei 1000 rpm für 7 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in N3 Medium resuspendiert. Es wurden  $3-4 \times 10^6$  Zellen pro PO-beschichtete 10 cm Schale plattiert. Zellen des T $\alpha$ 1-EGFP Klons mussten jedoch aufgrund einer schlechten Plattiereffizienz in einer Dichte von  $4-5 \times 10^6$  Zellen auf eine PO-beschichtete 6 cm Schale ausgesät werden. Zu dem Medium wurden FGF2 in einer Konzentration von 10 ng/ml und Laminin in einer Konzentration von 1 ng/ml dazugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Jeden Tag wurde FGF2 hinzugefügt und alle zwei Tage das Medium gewechselt. Nach vier Tagen Proliferation in FGF2 wurde durch Wachstumsfaktorentzug die Differenzierung eingeleitet (**Abb. 5E, F**). Nach zwei Tagen Wachstumsfaktorentzug wurden die Zellen, wie in 2.6.1 beschrieben, mit HANKS/EDTA von der Schale abgelöst, neu plattiert und einen Tag später in 4% Paraformaldehyd/PBS für 10 min fixiert.

### 2.5.7 Transfer in N3EFL Medium

*Durch Überführung in ein FGF2/EGF-haltiges Medium können aus den multipotenten Vorläuferzellen gliale Vorläufer angereichert werden (**Abb. 5G, H**). Dieser Schritt erfolgt vier Tage nach Proliferation in N3FL Medium.*

80-90% konfluente N3FL Kulturen wurden dreimal mit HANKS gewaschen. Es wurden 3 ml einer 0,1%igen DNase-Lösung zu der Schale hinzugefügt. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen mechanisch von der Schale gelöst und mit einer geflämmten Pasteurpipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb gegeben, um Zellklümpchen zu entfernen. Die Schale

und das Sieb wurden mit 7 ml HANKS gespült und die Zellen bei 1000 rpm für 7 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in N3 Medium unter Zugabe von 10 ng/ml FGF2, 20 ng/ml EGF und 1 ng/ml Laminin resuspendiert und die Zellsuspension auf einer PO-beschichteten Schale replattiert. Die Wachstumsfaktoren wurden alle 24 h erneut hinzugefügt und das Medium alle zwei Tage gewechselt.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreichten, wurden sie 1:3 passagiert. Dazu wurden die Zellen dreimal mit HANKS gewaschen und in einer 0,1%igen DNase-Lösung von der Schale abgeschabt. Die Zellen wurden mit einer geflämmten Pasteurpipette vereinzelt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Schale wurde mit 5 ml HANKS gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 7 min zentrifugiert und das Pellet in N3 Medium resuspendiert. Unter Zugabe von FGF2 (10 ng/ml), EGF (20 ng/ml) und Laminin (1 ng/ml) wurden die Zellen erneut auf PO-beschichtete Schalen plattiert. Überzählige Zellen wurden in 1x Gefriermedium (Sigma) kryokonserviert. Nach ca. zwei Wochen in Kultur wurde die *in vitro* Differenzierung zu Astrozyten und Oligodendrozyten durch Wachstumsfaktorentzug eingeleitet (**Abb. 5K, L**). Für weitergehende Untersuchungen wurden Zellen sowohl im proliferierenden Zustand als auch vier und acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug in 4% Paraformaldehyd/PBS für 10 min fixiert.

### 2.5.8 Transfer in N2FP Medium

*In diesem Stadium werden die Zellen in ein FGF2/PDGF-abhängiges, bipotentes, gliales Vorläuferzellstadium überführt. Wie Zellen des N3EFL-Stadiums können Zellen des N2FP-Stadiums in Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenzieren, besitzen aber im Vergleich zu N3EFL Kulturen die Fähigkeit, einen größeren Prozentsatz an Oligodendrozyten hervorzubringen. Der Transfer in N2 Medium, das die Wachstumsfaktoren FGF2 und PDGF enthält, erfolgt nach ca. zwei Wochen Kultivierung in N3EFL Medium (**Abb. 5I, J**).*

Die Zellen im N3EFL Medium wurden 1:3 passagiert und neu ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Konvertierung zu N2FP. Die Zellen wurden dreimal mit HANKS gewaschen und in N2 Medium überführt. Den Zellen wurde 10 ng/ml FGF2 und 10 ng/ml PDGF hinzugefügt. Die Wachstumsfaktoren wurden jeden Tag dazugegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die *in vitro* Differenzierung wurde durch Wachstumsfaktorentzug eingeleitet (**Abb. 5K, L**).

## 2.5.9 Transfektion

### 2.5.9.1 Elektroporation

*Die ES Zelllinie CJ7 wurde mit den Konstrukten pGEM7-KJ1 und pT $\alpha$ 1-EGFP kotransfiziert. pGEM7-KJ1 enthält als Resistenzgen Neomycin, daher wurde die Selektion mit 0,4 mg/ml Neomycin (G418; Sigma) durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation. Die Elektroporation permeabilisiert durch einen elektrischen Impuls kurzfristig die Zellmembran und ermöglicht eine Diffusion der DNA in die Zellen.*

ES Zellen wurden auf  $\gamma$ -bestrahlten Fibroblasten in DMEM-ES-PROL kultiviert (2.5.1 und 2.5.2). Hierbei wurden ca. 80% dichte ES Zell-Kulturen verwendet, die einen morphologisch undifferenzierten Phänotyp besaßen. Eine Stunde vor der Elektroporation wurde das Medium gewechselt. Die ES Zellen wurden mit Trypsin/EDTA von der Schale abgelöst, mit einer geflämten Pasteurpipette vereinzelt, mit DMEM + 10% FKS neutralisiert und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert (2.5.3). Nach Bestimmung der Zellzahl (s.o.) wurden die Zellen in kaltem PBS in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Es wurden 800  $\mu$ l dieser Suspension in eine Elektroporationsküvette überführt. Zu jedem Ansatz wurde zirkuläre Plasmid-DNA ( $C_{pT\alpha1-GFP} = 100 \mu$ g;  $C_{pGEM7-KJ1} = 10 \mu$ g) hinzugefügt. Die Zellen wurden 5 min bei RT inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 230 V und 490  $\mu$ F mit dem Gene Pulser II® (BioRad Laboratories GmbH). Danach wurden die Zellen weitere 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in 2 ml frisches DMEM-ES-PROL transferiert. Die elektroporierten Zellen wurden auf zwei mit  $\gamma$ -bestrahlten Neomycin-resistenten Fibroblasten ( $\gamma$ neoEF) beschichteten 10 cm Gewebekulturschalen verteilt und in DMEM-ES-PROL kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag. Zwei Tage nach der Elektroporation wurde die Selektion durch Zugabe von 0,4 mg/ml gestartet. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach neun bis 15 Tagen wurden einzelne Zellcluster isoliert und getrennt weiter kultiviert (klonale Selektion; 2.5.10.1). Die auf diese Weise erhaltenen, stabil transfizierten Zelllinien wurden zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks einige Wochen weiterhin mit 0,4 mg/ml G418 in DMEM-ES-PROL expandiert.

### 2.5.9.2 Lipofektion

*Die Lipofektion basiert auf kationischen Lipiden (FuGENE™6, Roche), die durch ionische Wechselwirkungen mit der DNA kondensieren. Die entstehenden Lipid-DNA-Komplexe werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Mit dieser Methode wurde das EGFP-Expressionsplasmid pEGFP-N1 (Clontech) in aus J1 ES Zellen hergestellte gliale Vorläuferzellen transfiziert (2.5.7).*

Für diese Transfektion wurden 80% dichte ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen aus den N3EFL-Stadien eingesetzt. Zunächst wurden 6  $\mu$ l FuGENE™ und 94  $\mu$ l N3 für 5 min bei RT inkubiert. Das Medium einer 6 cm Schale mit Zellen wurde abgesaugt und durch neues Medium und Wachstumsfaktoren ersetzt. In ein Eppendorf-Röhrchen wurden 4  $\mu$ g des pEGFP-N1 Plasmids vorgelegt und das verdünnte FuGENE™ Transfektionsreagenz tropfenweise zur Bildung eines Komplexes hinzugefügt. Das Röhrchen wurde angetippt und 15 min bei RT inkubiert (Verhältnis FuGENE™:DNA = 3:2). Der Komplex wurde dann tropfenweise über eine zuvor mit 2,9 ml neuem Medium bestückte 6 cm Schale gleichmäßig verteilt. Die Schale wurde nach vorsichtigem Schwenken im Inkubator propagiert. Am zweiten Tag nach Lipofektion begann die Selektion mit 0,5 mg/ml G418 in konditioniertem N3 Medium. Für die Herstellung von konditioniertem Medium wurden gliale Vorläuferkulturen mit hoher Zelldichte verwendet. Die Zellen wurden in N3 Medium unter Zugabe von FGF2 und EGF kultiviert. Erfolgte ein Mediumwechsel, wurde das Medium der dichten Kulturen aufgefangen und steril filtriert. Dieses konditionierte Medium wurde mit frischem N3 Medium 1:3 verdünnt.

## 2.5.10 Klonale Selektion

### 2.5.10.1 $T\alpha$ 1-EGFP Klone

Neun bis 15 Tage nach Transfektion der ES Zellen wurden einzelne Klone isoliert. Hierzu wurden die Zellkulturschalen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden an einem inversen Zellkulturmikroskop einzelne Klone unter PBS mit Hilfe einer Mikropipette isoliert und jeweils in einem Volumen von ca. 10  $\mu$ l PBS in eine Kammer einer 96-well Platte überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur einzeln liegende, morphologisch undifferenzierte Zellcluster isoliert wurden. Zu jedem Klon wurden 25  $\mu$ l Trypsin/EDTA gegeben und die Platte für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit 25  $\mu$ l DMEM-ES-PROL versetzt. Die Zellsuspension wurde trituriert und in eine mit  $\gamma$ neoEF beschichtete 96-well Platte überführt, deren Kammern bereits mit je 150  $\mu$ l DMEM-ES-PROL und 0,4 mg/ml G418 bestückt worden waren. Ein Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag. Die Klone wurden separat expandiert und auf eine 24-well Platte transferiert. Während dieser Expansionsphase wurden bei jeder Passage Zellaliquots tiefgefroren. Nur morphologisch undifferenzierte ES Zell-Klone wurden weiter expandiert.

### 2.5.10.2 CMV-EGFP Klone

24 Tage nach Lipofektion wurden einzelne Klone isoliert, von denen mindestens 50% der Zellen EGFP-Expression zeigten. Dazu wurde die Schale zweimal mit HANKS gewaschen und anschließend mit 3 ml

HANKS bedeckt. Unter einem inversen Zellkulturmikroskop wurden einzelne Klone unter PBS mit Hilfe einer Mikropipette isoliert und jeweils in einem Volumen von ca. 10  $\mu$ l PBS in eine PO-beschichtete Kammer einer 24-well Platte überführt. Die Zellen wurden in konditioniertem Medium expandiert, das mit frischem N3 Medium 1:3 verdünnt (s.o.) und mit 0,5 mg/ml G418, 10ng/ml FGF2, 20 ng/ml EGF und 1 ng/ml Laminin versetzt wurde. Einzelne Klone wurden aufgrund ihrer Morphologie und EGFP-Fluoreszenz ausgewählt und weiter expandiert. Zur weitergehenden Charakterisierung wurden die Zellen sowohl im proliferierenden Zustand als auch vier und acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug in 4% Paraformaldehyd/PBS für 10 min fixiert.

### 2.5.11 Untersuchung der T $\alpha$ 1-EGFP Klone

*Da sich das EGFP-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des Promotors des neuronal exprimierten T $\alpha$ 1-Tubulin-Gens befand, ist eine Expression von EGFP erst nach erfolgter neuronaler Differenzierung der ES Zellen zu erwarten. Zur raschen Identifizierung positiver Klone wurde das Protokoll von Strübing et al. (1995) verwendet. Dies erlaubt durch die Zugabe von all-trans Retinsäure zu EBs – auf Kosten der Reinheit – eine schnelle Differenzierung zu neuronalen Zellen. Die EBs wurden nach vier Tagen auf Gelatine plattiert und nach weiteren neun Tagen fixiert.*

Erreichten die Klone eine Dichte von ca. 80%, wurden die Zellen mit HANKS/EDTA abgelöst und in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Zellen wurden zwei Tage auf Gelatine in Anwesenheit von 0,4 mg/ml G418 kultiviert (2.5.3) und anschließend zu EBs aggregiert (2.5.4). Während der ersten beiden Tage des EB-Stadiums wurde  $1 \times 10^{-7}$  M all-trans Retinsäure (Sigma) dazugegeben. Nach weiteren zwei Tagen wurden die EBs auf mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturschalen plattiert. Ein Mediumwechsel erfolgte wegen der starken Proliferation jeden Tag. Nach neun Tagen wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -III Tubulin, einem Marker für Neurone, immunocytochemisch gefärbt und an einem Zeiss Axioskop 2 analysiert (2.11.1).

### 2.5.12 Präparation der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellkulturen für die Transplantation

Etwa 90% dichte N3EFL Kulturen wurden dreimal mit HANKS gewaschen. Die Zellen wurden in einer 0,1%igen DNase/HANKS-Lösung von der Schale abgeschabt. Mit einer geflämten Pasteurpipette wurden die Zellen vereinzelt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Schale wurde mit 5 ml HANKS gewaschen und die Lösung ebenfalls in das Röhrchen überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 1000 rpm für 7 min zentrifugiert. Für die Transplantation auf die hippocampalen

Schnittkulturen wurden die Zellen in Form einer dichten Suspension auf die Schnitte aufgebracht. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet resuspendiert. Für die *in vitro* Transplantation in hippocampale Schnittkulturen wurden die Zellen in DMEM/F12 Medium auf  $1-2,5 \times 10^4$  konzentriert. Für die Transplantation in den Ratten-Hippocampus wurde eine Konzentration von 100.000 Zellen/ $\mu$ l verwendet. Die Zellen wurden für die *in vivo* Transplantation in einer 0,1%igen DNase/HANKS + HEPES Lösung bis zur Transplantation auf Eis gelagert.

## 2.6 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

### 2.6.1 Präparation der ES Zell-abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellkulturen für die FACS-Sortierung

*Für die FACS-Sortierung ist es unerlässlich, dass die Zellen vereinzelt vorliegen. N3FL Kulturen des  $T\alpha 1$ -EGFP Klons wurden nach einem zweitägigen Wachstumsfaktorentzug von der Schale abgelöst und in eine Einzelzellsuspension überführt.*

Nach Abnahme des Mediums wurden 2 ml HANKS/EDTA zu den Zellen hinzugegeben, was ein klümpchenfreies Ablösen der Zellen ermöglichte. Die Zellen wurden mit einer geflämten Pasteurpipette von der Schale abgespült und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. In dieses Röhrchen wurden 2 ml HANKS vorgelegt. Die Zellen wurden leicht trituriert und durch ein 40  $\mu$ m Sieb gegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 1200 rpm für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in HANKS + HEPES resuspendiert. Der Suspension wurde 0,1% DNase zugesetzt, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden auf Eis gelagert.

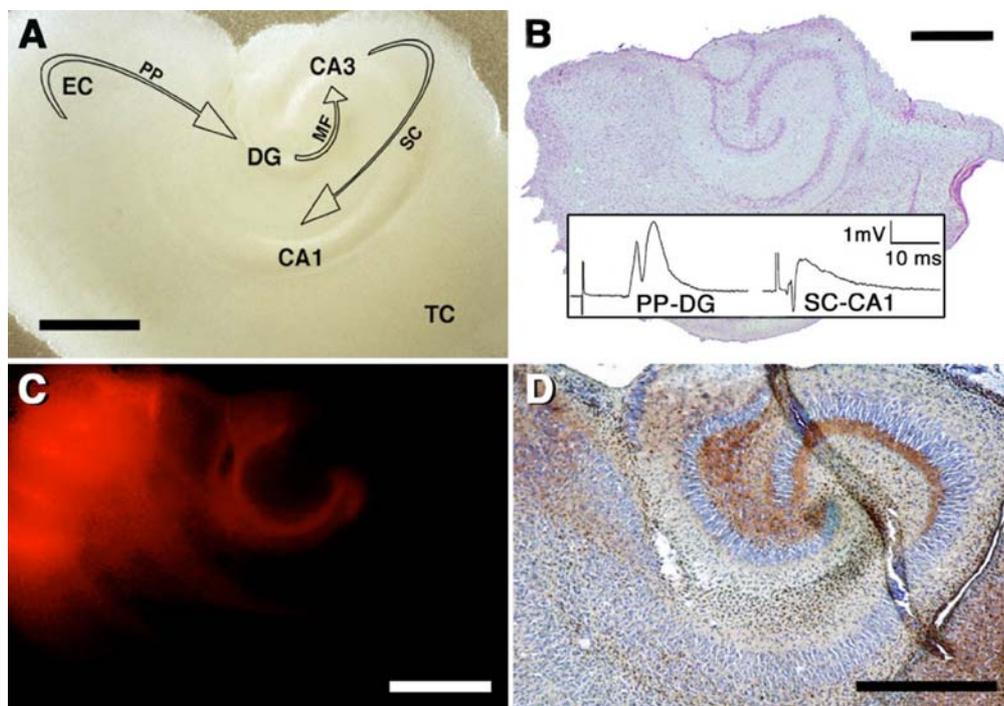
### 2.6.2 Zellsortierung

Die präparative FACS-Sortierung wurde in Kooperation mit Herrn Volker Gornik (Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universität Bonn) durchgeführt. Es wurde der FACStar Plus von Becton Dickinson verwendet. Die Zellen wurden anhand des 'light forward' und des 'side scatter' mit einem 488 nm Laserstrahl analysiert. Das Sortierverfahren basierte nur auf der Fluoreszenzintensität und wurde bei einer Flussrate von 1.500 Ereignissen/Sekunde durchgeführt. Die aufgefangenen Zellen wurden bis zum Ende der FACS-Sortierung auf Eis gehalten und dann auf PO-beschichtete 24-well Platten in N3L

Medium (Konzentration<sub>Laminin</sub> = 1 ng/ml) replattiert. Nach 17 h wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert.

## 2.7 Herstellung hippocampaler Schnittkulturen

Die Schnittkulturen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Björn Scheffler angefertigt (Institut für Neuropathologie, Universität Bonn). Mit einem Vibroslicer (VSLM1; Campden Instruments; Sileby; GB) wurden von postnatalen Wistar Ratten (P9; Charles River, Sulzfeld) 400  $\mu\text{m}$  Schnitte unter Erhalt des Gyrus dentatus, des entorhinalen und temporalen Cortex hergestellt (**Abb. 6A**). Durch diese Prozedur wurden mindestens sechs Schnitte pro Tier erhalten. Die Schnittkulturen wurden als ‚interface‘ Kulturen auf Polyestermembranen (Transwell-Clear, Corning; Bodenheim) bei 35°C und 5% CO<sub>2</sub> propagiert (Stoppini *et al.* 1991). Das Medium wurde an Tag 1 nach Explantation und danach jeden zweiten Tag gewechselt. Die Schnittkulturen wurden in Pferdeserum-haltigem Medium kultiviert, das graduell bis zum



**Abb. 6:** Morphologische und funktionelle Integrität der hippocampalen Schnittkulturen. (A) Ein 400  $\mu\text{m}$  dicker Schnitt ein Tag nach Explantation. Der Gyrus dentatus (GD), die Pyramidal-Zellschicht (CA3-CA1), der entorhinale Cortex (EC) und die sich anschließende Region des temporalen Cortex (TC) sind gut zu erkennen. SC, Schaffer-Kollateralen, MF, Moosfasern, PP Tractus perforans. (B) Cryostat-Schnitt (10  $\mu\text{m}$ ) durch eine 31 Tage alte Schnittkultur. Die HE (Hämatoxylin und Eosin) Färbung zeigt den morphologischen Erhalt der anatomischen Strukturen. Der Einschub zeigt typische Feldpotentiale, die nach orthodromer Stimulation des Tractus perforans (PP-GD) und der Schaffer-Kollateralen (SC-CA1) am Ende der Kulturzeit erhalten wurden (Stimulationsartefakte wurden entfernt). (C) Anterogrades Tracing mit Rhodamin-konjugiertem Dextran (Micro-Ruby®) bestätigt die Integrität des Tractus perforans am Tag 33 in Kultur. (D) Die TIMM Färbung (Zimmer und Gähwiler 1984) demonstriert den histologischen Erhalt des MF Systems eines Schnittes, der für 33 Tage (20  $\mu\text{m}$  Cryostat-Schnitt) in Kultur gehalten wurde. Skalierung, 1mm. Aus Scheffler, Schmandt *et al.* 2003.

Tag 5 nach Explantation durch serumfreies Medium ersetzt wurde (DMEM/F12 + N2 und B27 Supplemente; Cytogen, Sinn). Die Mehrheit der Schnittkulturen (>75%) zeigte einen beeindruckenden Erhalt der Histoarchitektur bis zu fünf Wochen nach Explantation (**Abb. 6B**). Elektrophysiologische Untersuchungen, die von Dr. Heinz Beck (Experimentelle Epileptologie, Klinik für Epileptologie, Universität Bonn) durchgeführt wurden, bestätigten einen Erhalt der in dieser Präparation vorhandenen Fasertrakte (Tractus perforans, Moosfasern und Schaffer-Kollateralen) bis zu 33 Tagen nach Explantation (Einschub in **Abb. 6B**). Anterogrades vitales Tracing mit Rhodamin-konjugiertem Dextran (Micro-Ruby®; Moleculare Probes, Eugene, USA; nach Kluge *et al.* 1998) bestätigte die Integrität des Tractus perforans (**Abb. 6C**). Eine durchgeführte TIMM Färbung zeigte eine gut erhaltene Organisation des Moosfaser-Systems (**Abb. 6D**) bis zum Ende der Kulturzeit.

## 2.8 *In vitro* Transplantation und Aufarbeitung der hippocampalen Schnittkulturen

Die *in vitro* Transplantation wurde in Kooperation mit Dr. Björn Scheffler an Tag 10±2 in Kultur durchgeführt. Es wurden 1-2,5x10<sup>4</sup> proliferierende ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen zu einem Volumen von 0,2 µl konzentriert. Mit Hilfe einer Glas-Mikropipette, die an einen stereotaktischen Rahmen (Stoelting, Wood Dale, USA) angeschlossen war, wurden die Zellen auf die Oberfläche der Schnittkulturen aufgebracht. Transplantationen erfolgten auf den Hilus des Gyrus dentatus (GD), den entorhinalen Cortex (EC) und den temporalen Cortex (TC). Zwei Tage nach Transplantation wurde das Medium gewechselt. Alle weiteren zwei Tage wurden die Schnitte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop evaluiert, um die Verteilung und Morphologie der transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen zu verfolgen und zu dokumentieren. Für die morphologische Analyse wurden die Schnittkulturen in 4% Paraformaldehyd/PBS, 15% Picrinsäure und 0,1% Glutaraldehyd (GA) für 15 min fixiert und in 4% Paraformaldehyd/PBS und 15% Picrinsäure über Nacht bei 4°C postfixiert. Die Schnittkulturen wurden in PBS gewaschen und in einer 30%igen Sucrose-Lösung in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Von jeder fixierten Schnittkultur wurden serielle, horizontale Cryostat-Schnitte angefertigt, die auf Gelatine- oder Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und bis zur Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung bei 4°C gelagert.

## 2.9 *In vivo* Transplantate in den Hippocampus der Ratte und deren Aufarbeitung

Die *in vivo* Transplantation wurde an weiblichen Sprague-Dawley Ratten (P28; Charles River, Sulzfeld) in Zusammenarbeit mit Dr. Alberto Perez-Bouza durchgeführt. Die Ratten wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin-HCl (Ketanest®, 80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompum®, 10 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. 2 µl der Zellsuspension, die 200.000 ES Zell-abgeleitete Vorläuferzellen enthielt, wurden langsam durch eine Glas-Mikropipette mit einem inneren Durchmesser von 75 µm stereotaktisch in den Hippocampus beider Hemisphären injiziert. Als Koordinaten wurden verwendet: Bregma -2,8 mm, 2,8 mm lateral und 2,8 mm unterhalb der Dura (Frontzahnfixierung bei -2,5 mm). Die Pipette wurde 5 min an Ort und Stelle gelassen, damit sich die Suspension gut verteilen konnte und ein Rückfluss verhindert wurde. Postoperativ erhielten die Tiere täglich intraperitoneale Injektionen von Cyclosporin (10mg/kg Körpergewicht; Sandimmun, Novartis; beginnend 24 h vor Transplantation). Die Empfängertiere wurden sieben, 14 und 21 Tage nach Transplantation elektrophysiologischen und morphologischen Untersuchungen zugeführt. Für morphologische Untersuchungen wurden die Tiere anästhesiert und mit 4% Paraformaldehyd/PBS intracardial perfusionsfixiert. Die Gehirne wurden isoliert, in 4% Paraformaldehyd/PBS über Nacht postfixiert, in PBS gewaschen und in PBS + 0,1% Natrium-Azid bei 4°C gelagert. Am Vibratom wurden 50 µm dicke coronale Serienschritte angefertigt. Für die Immunhistochemie wurden frei schwimmende Schnitte bevorzugt, die in PBS + 0,1% Natrium-Azid bei 4°C gelagert wurden. Schnitte, die einer *in situ* Hybridisierung zugeführt werden sollten, wurden auf SuperFrost®Plus Objektträger (Meinzel-Glaeser) aufgezogen. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und bei -20°C gelagert.

## 2.10 Dye Coupling an hippocampalen Schnittkulturen

Diese Daten wurden in Kooperation mit Dr. Björn Scheffler erhoben. Die Schnitte wurden in eine Perfusions-Kammer überführt (Luigs&Neumann, Neuss) und begast (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 35°C). Unter Verwendung einer Mikroelektrode (Widerstand 10-25 MΩ) wurde 0,1% LY iontophoretisch über einen Zeitraum von 30 min in die Zelle injiziert (Konietzko und Müller 1994). Die Ausbreitung des Farbstoffs wurde nach einer Sekunde und dann weiter nach 1, 5, 7, 10, 15, 20, 25 und 30 min dokumentiert. Die Auswertung der Verbreitung von LY, deren dreidimensionalen Rekonstruktion und weitere Immunfluoreszenzanalysen wurden am konfokalen Mikroskop (Leica, Pulheim) an fixierten Zellen vorgenommen.

## 2.11 Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung

### 2.11.1 Immuncyto- und Immunhistochemie

Schnitte, die mit Antikörpern gegen NG2 und MBP gefärbt werden sollten, wurden zuerst mit 100% Ethanol für 10 min vorbehandelt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Fixierte Zellen wurden 15 min, Gehirnschnitte 30 min bei RT in Blockierungslösung (2.3.3) geblockt. Die Vibratomschnitte wurden, wenn sie nicht zuvor einer *in situ* Hybridisierung zugeführt wurden, frei flottierend gefärbt. Primäre Antikörper wurden in der Antikörper-Verdünnungs-Lösung (AKV; 2.3.3) entsprechend der Tabelle in 2.1.5.1 verdünnt und ein bis zwei Stunden (Zellen) oder über Nacht (Schnitte) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die primären Antikörper mit den entsprechenden sekundären Antikörpern in AKV detektiert (2.1.5.2). Nach 1 h wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Bei der Verwendung eines biotinylierten Antikörpers (2.1.5.2), erfolgte eine dritte Inkubation für eine Stunde mit einem Avidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff in Hepespufer. Die Kernfärbung wurde mit Hoechst (1:1000 in NaHCO<sub>3</sub>) durchgeführt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden mit Vectashield (Vector Laboratories) bedeckt und mit einem Deckglaschen versehen. Eine Auflistung der primären Antikörper, ihre Beschreibung und Verdünnung sowie Besonderheit der Färbungen (z.B. für die Blockierung verwendete Seren) sind in 2.1.5.1 erläutert.

### 2.11.2 Tyramid

*Einige Antigene werden durch den Verdauschritt bei der in situ Hybridisierung zerstört und müssen daher vor der in situ Hybridisierung belegt werden. Dies erfolgt durch das TSA™ Plus Fluoreszenz System (Tyramide Signal Amplification). Dieses System benötigt die Anwesenheit einer Peroxidase. Die Schnitte wurden zuerst mit den primären Antikörpern (GFP, NeuN,  $\beta$ -III Tubulin oder Nestin) und anschließend mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Die Enzymaktivität der Peroxidase ermöglichte die Spaltung des Substrates Tyramid, was zur Ablagerung von unlöslichen, fluoreszierenden FITC-Derivaten führt.*

Frei flottierende Schnitte wurden 30 min in einer Peroxidase-Lösung (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS) inkubiert und dann gründlich fünfmal in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden 20 min (2.3.3.2) geblockt und über Nacht mit dem jeweiligen Antikörper in der primären AKV inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und zwei bis drei Stunden bei RT mit einem Peroxidase-

gekoppelten sekundären Antikörper (2.1.5.2) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und 10 min mit Tyramid-FITC 1:50 in 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entwickelt. Die Schnitte wurden wiederum dreimal in PBS + 0,1% Triton-X und zweimal mit PBS gewaschen. Auf SuperFrost®Plus Objektträger aufgezogen, mussten die Schnitte mindestens zwei Stunden trocknen, bevor sie einer *in situ* Hybridisierung zugeführt werden konnten.

### 2.11.3 Kopplungsuntersuchungen *in vivo*

*Die in den Ratten-Hippocampus transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen wurden von Kerstin Hüttmann und Dr. Claudia Krebs (Experimentelle Neurobiologie, Neurochirurgie, Universität Bonn) elektrophysiologisch untersucht. Während der Patch-clamp Aufzeichnung wurde in die Zelle eine Lösung injiziert, die Dextran und Biocytin enthielt. Dieses Dextran (3.000 kDa) kann nicht durch die Gap Junctions diffundieren, wodurch die Texas-Red Markierung auf die untersuchte Zelle beschränkt bleibt. Das Biocytin kann hingegen durch die Gap Junctions diffundieren und wird so von gekoppelten Zellen aufgenommen. Biocytin kann durch ein Cy5-gekoppeltes Streptavidin D nachgewiesen werden.*

Gewebeschnitte, die elektrophysiologisch untersucht wurden und Texas Red-injizierte Zellen enthielten, wurden an einem Zeiss Axioskop 2 dokumentiert. Die Schnitte wurden drei Tage bei 4°C mit einer Lösung inkubiert, die aus 3% NGS, 3% NRS, 0,5% Triton-X und 1:200 Cy5 Avidin D bestand und anschließend dreimal mit PBS + 0,5% Triton-X gewaschen. Sie wurden dann auf SuperFrost®Plus Objektträger aufgezogen, mit Vectashield bedeckt und mit einem Deckgläschen versehen. Die mikroskopische Analyse der gekoppelten Zellcluster erfolgte an einem Zeiss LSM-510.

### 2.11.4 *In situ* Hybridisierung

*Zur EGFP-unabhängigen Detektion der transplantierten Zellen wurde die Methode der *in situ* Hybridisierung verwendet. Da es sich bei den transplantierten Zellen um Maus-Zellen handelt, die in Rattengewebe transplantiert wurden, konnten die Zellen mit einer Probe für Maus-Satelliten DNA nachgewiesen werden (Brüstle et al. 1995). Hierbei handelt es sich um hoch repetitive Tandem Sequenzen, die im centromerischen Heterochromatin lokalisiert sind (Hörz und Altenburger 1981).*

Die aufgetauten und getrockneten (gegebenenfalls Tyramid-gefärbten) Schnitte wurden in eine Küvette mit 50 ml 2x SSC + EDTA gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden in die Pronase-Lösung überführt und bei 37°C für 20 min verdaut. Als nächstes wurden die Schnitte 3 min bei RT in 2x

SSC inkubiert und anschließend je 4 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (70%, 80%, 90% und 100%). Danach wurden die Schnitte ca. 20 min luftgetrocknet. Zur DNA-Denaturierung wurden die Schnitte 12 min in Formamidlösung I bei 90°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut je 4 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe auf Eis dehydriert. Nach dem letzten Alkoholschritt wurden die Schnitte sofort auf die 37°C warme Heizplatte überführt. Der Alkohol wurde abgesaugt, und pro Objektträger wurden 30-60 µl Hybridisierungslösung auf den Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden mit einem Deckgläschen versehen, mit Fixogumm versiegelt und 3 min bei 90°C und anschließend in einer Feuchtkammer über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine zweimalige Inkubation für je 10 min bei 37°C in Formamidlösung II. Anschließend wurden die Schnitte 15 min in 0,5x SSC bei 37°C und dann 5 min bei RT in Puffer I inkubiert. Die Schnitte wurden danach 15 min in der Blockierungslösung inkubiert. Währenddessen wurde der Rhodamin-konjugierte anti-Digoxigenin Antikörper 1:500 in AKV verdünnt. Nach Block wurden je 300 µl Antikörper-Lösung auf jeden Objektträger pipettiert, die Schnitte mit Deckgläschen versehen und über Nacht bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden am nächsten Tag dreimal in PBS gewaschen. Nun konnten die Schnitte mit Vectashield und einem Deckgläschen versehen oder weiteren Färbungen zugeführt werden. (Lösungen siehe 2.3.3.3)

## 2.12 Statistische Analyse

Für die Charakterisierung der T $\alpha$ 1-EGFP und CMV-EGFP Zelllinien und ihrer Derivate wurden in jedem Experiment 20 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SEM (standard error of the mean, Standardfehler) ausgedrückt und resultierten aus einem Minimum von 3 unabhängigen Experimenten für jeden Marker.

Für den Vergleich zwischen der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven und T $\alpha$ 1-EGFP-negativen Population wurde zur statistischen Analyse eine Vier-Feldertafel unter Verwendung des Chi<sup>2</sup>-Test verwendet. Zur Korrektur wurde gegebenenfalls ein Two-Tailed Fisher Test verwendet. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet und erhielten ein Sternchen (\*). p-Werte < 0,01 erhielten zwei Sternchen (\*\*).

Zur statistischen Analyse der hippocampalen Schnittkultur-Experimente wurde der Student-t-Test verwendet. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet und erhielten ein Sternchen (\*). Zur Bestimmung der Zelltyp-spezifischen Antigen-Expression wurden 19 hippocampale Schnittkulturen  $11\pm 4$

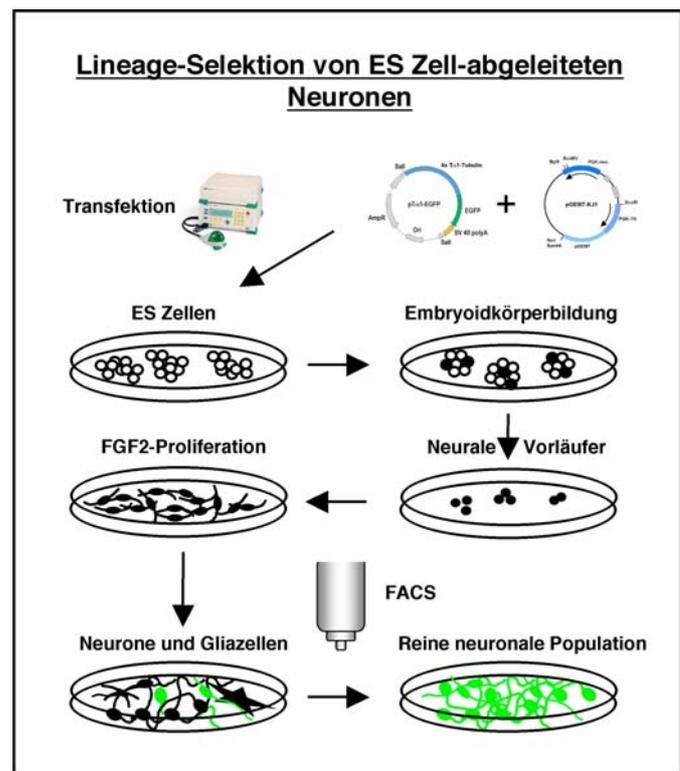
Tage nach Transplantation aus vier unabhängigen Experimenten ausgewertet. Für jedes Antigen erfolgte die Immunfluoreszenzanalyse der EGFP-positiven Zellen aus sieben bis neun zufällig ausgewählten Cryostatschnitten. Alle Daten wurden hier als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ausgedrückt. Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Björn Scheffler.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Selektion von ES Zell-abgeleiteten Neuronen

##### 3.1.1 Charakterisierung T $\alpha$ 1-EGFP ES Zell-abgeleiteter neuraler Vorläuferzellkulturen

Mittels Elektroporation wurden murine ES Zellen stabil mit einem T $\alpha$ 1-EGFP Konstrukt transfiziert (**Abb. 7**). Es wurden 234 Klone aus 12 Elektroporationen isoliert. Zur Expressionsanalyse wurden die ES Zellen zu EBs aggregiert und mit *all-trans* Retinsäure behandelt. Die plattierten EBs wurden für weitere neun Tage kultiviert und die differenzierten Zellen auf EGFP-Expression untersucht. Von der Gesamtzahl waren neun Klone T $\alpha$ 1-EGFP-positiv. Die *in vitro* Differenzierung der ES Zellen zu neuronalen Vorläuferzellen wurde ebenfalls durch Aggregation zu EBs induziert. Vier Tage alte EBs wurden plattiert und in einem chemisch definierten Medium kultiviert, welches das Überleben neuraler Vorläuferzellen favorisiert (Okabe *et al.*

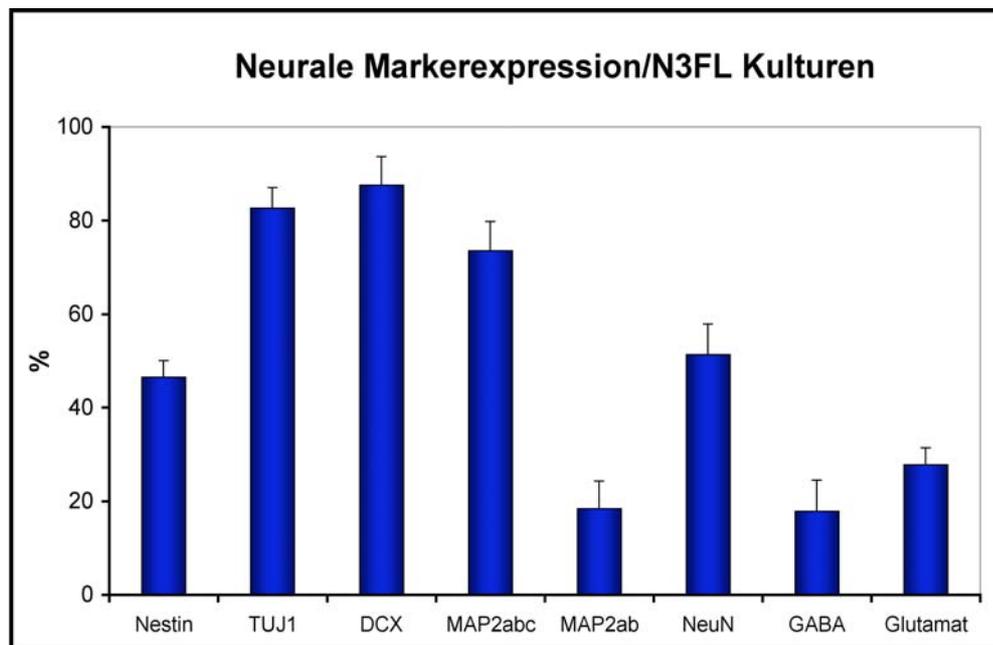


**Abb. 7:** Schematische Darstellung des verwendeten Protokolls für die Selektion von ES Zell-abgeleiteten Neuronen. Die ES Zellen werden mit den T $\alpha$ 1-EGFP und pGEM7-KJ1 Konstrukten stabil transfiziert. Nach Selektion und Identifizierung positiver ES Zellen folgt eine gezielte Differenzierung der Zellen zu neuronalen Vorläuferzellen. Zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug werden die Zellen basierend auf der EGFP-Fluoreszenz FACS sortiert, auf Zellkulturschalen replattiert und nach Fixierung auf die Expression von  $\beta$ -III Tubulin untersucht.

1996; **Abb. 3**). Die weitere Proliferation der neuralen Vorläuferzellen erfolgte in der Anwesenheit von FGF2 (N3FL Medium). Eine Differenzierung zu Neuronen wurde durch Wachstumsfaktorentzug induziert. Eine an Klon 65 durchgeführte Quantifizierung ergab, dass  $82,7 \pm 4,4\%$  der Zellen nach drei Tagen Wachstumsfaktorentzug den neuronalen Marker  $\beta$ -III Tubulin (**Abb. 8; Abb. 9A, B**) exprimierten. Die weiteren Experimente wurden an diesem Klon durchgeführt. Zur Charakterisierung der N3FL Kulturen und insbesondere der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone wurden die Zellen zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug vereinzelt und neu auf Polyornithin-beschichteten Schalen plattiert (2.6.1). Die

Zellen wurden am darauf folgenden Tag mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und analysiert. Das Vereinzeln der Zellen erfolgte aus mehreren Gründen:

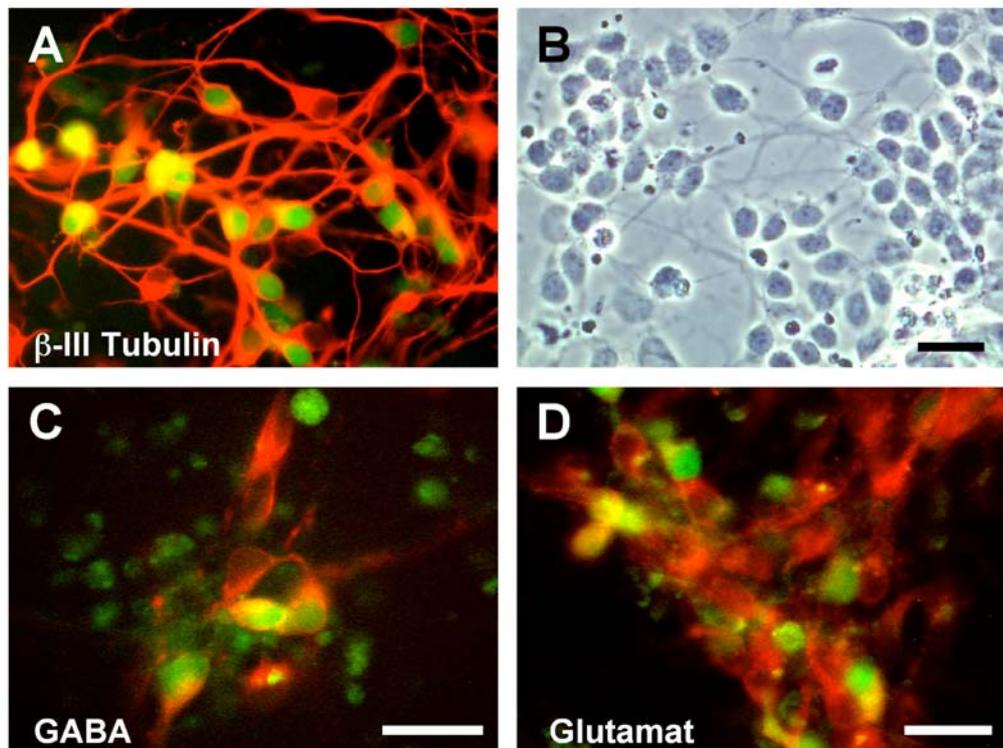
- 1) Es sollten ähnliche Kulturbedingungen wie bei den FACS-sortierten Zellen geschaffen werden.
- 2) Schwierig zu analysierende Zellcluster, die bei der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen entstehen, sollten einer einfacheren Analyse zugänglich gemacht werden.
- 3) Das Vereinzeln und Replattieren neuronaler Vorläufer begünstigt die neuronale Differenzierung.



**Abb. 8:** Charakterisierung von aus  $T\alpha 1$ -EGFP ES Zellen gewonnenen N3FL Kulturen drei Tage nach Wachstumsfaktorentzug. Die Mehrzahl der Zellen exprimiert die frühen neuronalen Marker  $\beta$ -III Tubulin (TUJ1), Doublecortin (DCX) und MAP2abc. Die Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen Neurotransmitter zeigt, dass die Zellen sowohl GABAerge als auch glutamaterge Phänotypen ausprägen. Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SEM ausgedrückt und resultieren aus einem Minimum von drei unabhängigen Experimenten für jeden Marker.

In nach Wachstumsfaktorentzug nicht mehr passagierten Kulturen waren  $44,3 \pm 9,3\%$  (**Abb. 10**) der Zellen  $\beta$ -III Tubulin-positiv, wohingegen in passagierten Kulturen bereits  $82,7 \pm 4,4\%$  der Zellen  $\beta$ -III Tubulin exprimierten (**Abb. 8**). Um eine Aussage über die tatsächliche Anreicherung der Neurone machen zu können, muss daher ein Differenzierungseffekt durch das Vereinzeln der Zellen mit einbezogen werden. Die nachfolgend aufgelisteten Werte beziehen sich auf passagierte Zellen. Drei Tage nach Wachstumsfaktorentzug (**Abb. 8**) exprimierten  $46,5 \pm 3,6\%$  der Zellen den frühen neuronalen Marker Nestin und  $73,6 \pm 6,3\%$  wiesen Immunreaktivität für den neuronalen Marker MAP2abc auf. Ebenfalls konnten die für differenzierte Neurone typischen Marker NeuN ( $51,3 \pm 6,5\%$ ) und MAP2ab ( $18,5 \pm 5,9\%$ ) in diesen Zellen nachgewiesen werden. Die Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen

Neurotransmitter zeigte, dass  $17,9\pm 6,7\%$  der Zellen GABAerge (Abb. 9C) und  $27,8\pm 3,7\%$  glutamaterge (Abb. 9D) Phänotypen annahmen.



**Abb. 9:** Neuron-spezifische EGFP-Fluoreszenz nach *in vitro* Differenzierung des  $T\alpha 1$ -EGFP ES Zell-Klons 65. Drei Tage nach Wachstumsfaktorentzug kann die EGFP-Fluoreszenz (grün) in Zellen mit neuronaler Morphologie detektiert werden. (A-B) Die Mehrheit der EGFP-positiven Zellen exprimiert  $\beta$ -III Tubulin (A rot, B, korrespondierendes Phasenkontrastbild; Klon 65). (C-D) EGFP-positive Neurone zeigen ebenfalls Immunreaktivität gegen GABA (C; Klon 59) und Glutamat (D; Klon 59). Es wurde keine EGFP-Expression in Gliazellen gefunden. Skalierung, 20  $\mu$ m

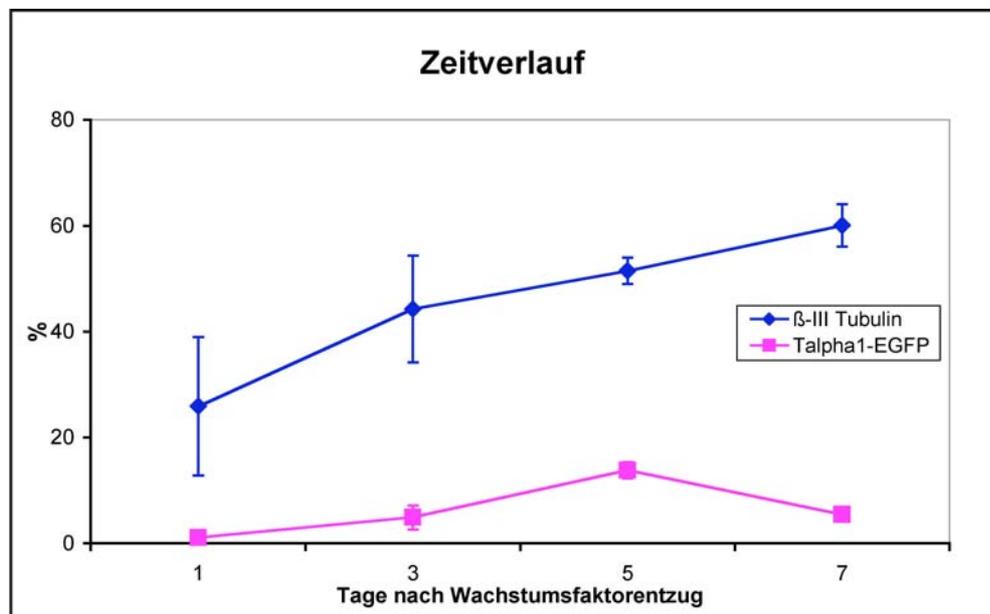
### 3.1.2 Charakterisierung der ES Zell-abgeleiteten $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Neurone

Zur Charakterisierung der  $T\alpha 1$ -Expression wurde die EGFP-Fluoreszenz auf verschiedenen Stufen der *in vitro* Differenzierung untersucht. Es wurde keine EGFP-Fluoreszenz in undifferenzierten ES Zellen, in EBs oder im ITSFn-Stadium gefunden. Die ersten EGFP-positiven Zellen konnten zwei Tage nach FGF2-induzierter Proliferation im N3FL-Stadium beobachtet werden. Die Anzahl EGFP-positiver Zellen nahm nach Wachstumsfaktorentzug-induzierter Differenzierung deutlich zu.

#### 3.1.2.1 Zeitverlauf der $T\alpha 1$ -EGFP-Expression

N3FL Kulturen wurden ein bis sieben Tage nach Wachstumsfaktorentzug untersucht, um den Zeitverlauf der  $T\alpha 1$ -EGFP-Expression und der neuronalen Differenzierung EGFP-positiver Zellen zu bestimmen. Die Untersuchungen, die an nicht passagierten Zellen vorgenommen wurden, zeigten, dass die Zahl der

EGFP-positiven Zellen sowie die  $\beta$ -III Tubulin mit der Zeit zunahm. Die maximale Expression von EGFP lag an Tag 5 nach Wachstumsfaktorentzug (Abb. 10). Zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug zeigten  $3,6 \pm 2,4\%$  der in N3FL kultivierten Zellen EGFP-Fluoreszenz. Die überwiegende Mehrheit der EGFP-positiven Zellen (91,1%) koexprimierte  $\beta$ -III Tubulin. Demgegenüber waren bezogen auf die Gesamtpopulation nur  $40,5 \pm 0,1\%$  der Zellen  $\beta$ -III Tubulin-positiv. Dies weist darauf hin, dass nur ein kleiner Anteil (8,1%) der Neurone das Transgen exprimierten. Fünf Tage nach Wachstumsfaktorentzug stieg der Prozentsatz an EGFP-positiven Zellen auf  $13,8 \pm 1,5\%$ . Dies kam einem Anteil von 26,0% der  $\beta$ -III Tubulin-positiven Neurone gleich. Sieben Tage nach Wachstumsfaktorentzug sank diese Fraktion auf  $5,5 \pm 0,7\%$  der Gesamtpopulation bzw. 9,1% der  $\beta$ -III Tubulin-positiven Subpopulation ab. Zu diesem Zeitpunkt waren  $60,1 \pm 4,0\%$  der Gesamtpopulation  $\beta$ -III Tubulin-positiv (Abb. 10).

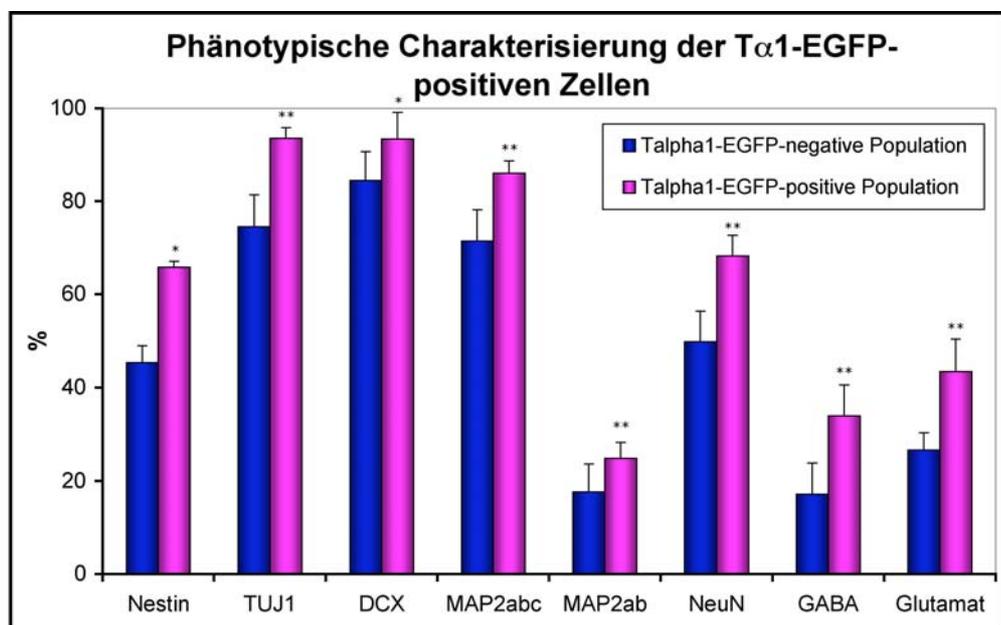


**Abb. 10:** Expression von  $\beta$ -III Tubulin und  $T\alpha 1$ -EGFP während der *in vitro* Differenzierung  $T\alpha 1$ -EGFP ES Zell-abgeleiteter N3FL Kulturen. Wie die  $\beta$ -III Tubulin Immunreaktivität nimmt auch die Zahl EGFP-positiver Zellen graduell mit der Zeit zu und zeigt ein Maximum an Tag 5 nach Wachstumsfaktorentzug. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM ausgedrückt und resultierten aus einem Minimum von drei unabhängigen Experimenten für jeden Marker.

### 3.1.2.2 Phänotypische Charakterisierung der $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Neurone

Während der *in vitro* Differenzierung prägten die  $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen komplexe Morphologien mit großen, runden Somata und langen Fortsätzen aus (Abb. 9A, B). Die Immunfluoreszenzanalyse der N3FL Kulturen drei Tage nach Wachstumsfaktorentzug zeigte, dass  $93,6 \pm 2,2\%$  der EGFP-positiven Zellen  $\beta$ -III Tubulin (Abb. 9A, Abb. 11) exprimierten.  $65,8 \pm 1,3\%$  der EGFP-positiven Zellen waren doppelmarkiert mit Nestin;  $86,0 \pm 2,7\%$  zeigten Immunreaktivität für MAP2abc.  $68,3 \pm 4,4\%$  der EGFP-

positiven Zellen waren positiv für NeuN, 24,9±3,7% für MAP2ab und nahezu alle Zellen zeigten Immunreaktivität für Doublecortin (93,4±5,7%). Doublecortin ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das während der neuronalen Migration exprimiert wird und dessen Expression in reifen Neuronen abnimmt (Francis *et al.* 1999; Gleeson *et al.* 1999). Die Expression des 68 kDa und 200 kDa Neurofilament-Proteins, welches in terminal-differenzierten Neuronen zu finden ist, lag unter 40%. T $\alpha$ 1-EGFP-positive Zellen zeigten ebenfalls Immunreaktivität für GABA (33,9±6,6%; **Abb. 9C**) und Glutamat (43,4±7,0%; **Abb. 9D**). Nur gelegentlich konnte eine Serotonin-positive Zelle gefunden werden. Tyrosin Hdroxylase-positive Zellen konnten nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 11:** Charakterisierung der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen drei Tage nach Wachstumsfaktorentzug einer ES Zell-abgeleiteten N3FL Kultur. Die T $\alpha$ 1-EGFP-exprimierende Fraktion beinhaltet vermehrt neuronale Phänotypen, repräsentiert jedoch insgesamt eine heterogene neuronale Population. Eine Anreicherung spezifischer neuronaler Subtypen etwa im Hinblick auf Neurotransmitter-Expression oder spezifische neuronale Ausreifungsgrade ist nicht zu verzeichnen. Beide Populationen wurden als unabhängig von einander betrachtet. Die Daten wurden als Mittelwert±SEM ausgedrückt und resultierten aus einem Minimum von drei unabhängigen Experimenten für jeden Marker. TUJ1,  $\beta$ -III Tubulin; DCX, Doublecortin

Die Ergebnisse dokumentieren, dass T $\alpha$ 1-EGFP-exprimierende Zellen eine heterogene neuronale Population bilden. Verglichen mit der EGFP-negativen Population weist die EGFP-positive Population eine signifikant erhöhte Expression von neuronalen Antigenen auf (**Abb. 11**).

### 3.1.2.3 Neuronale Spezifität der T $\alpha$ 1-EGFP-Expression

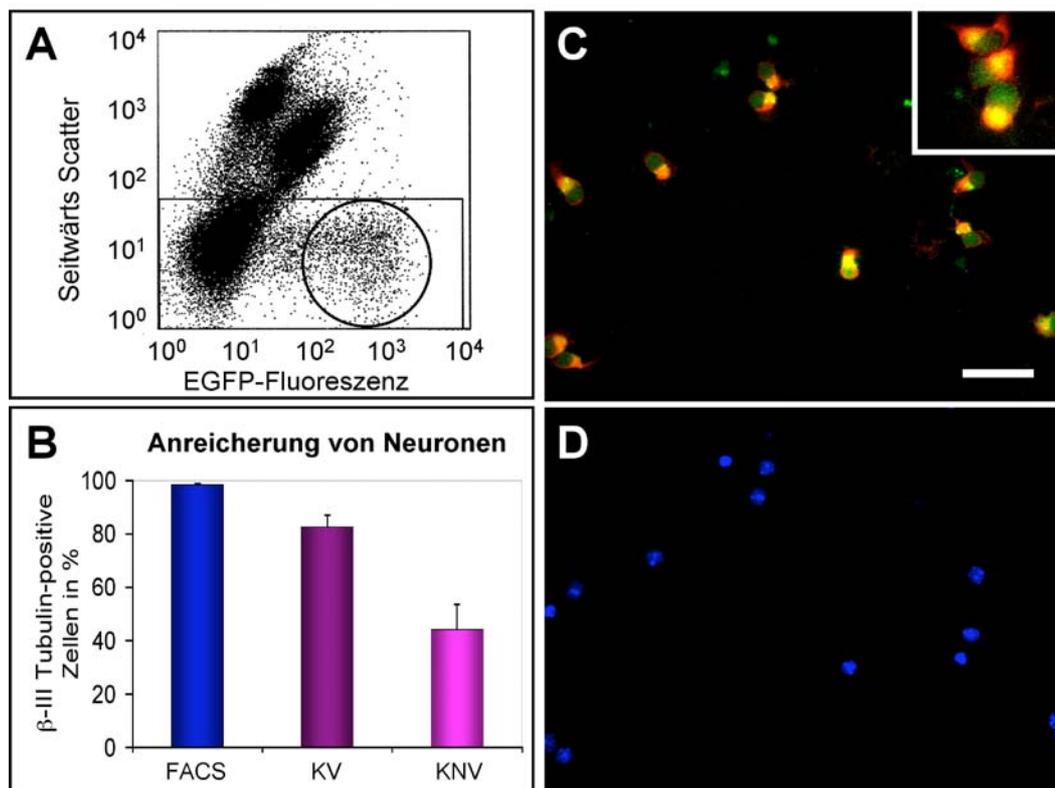
T $\alpha$ 1-Tubulin ist als neuronal-spezifisches Antigen bekannt (Gloster *et al.* 1999, 1994; Hieber *et al.* 1998; Przyborski und Cambray-Deakin 1996; Miller *et al.* 1989, 1987; Lewis *et al.* 1985). Dennoch wurden die EGFP-positiven Zellen auf eine mögliche Koexpression von glialen Markern untersucht. Dazu wurde aus

N3FL Kulturen durch zusätzliche mitogene Stimulation mit FGF2 und EGF eine hoch aufgereinigte gliale Vorläuferkultur hergestellt (N3EFL Kultur; Brüstle *et al.* 1999a; **Abb. 3**). Vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug wurde die Anwesenheit glialer Vorläuferzellen mit einem Antikörper gegen A2B5 untersucht. Die Präsenz von Astrozyten und Oligodendrozyten wurde durch den Astrozyten-spezifischen Marker GFAP beziehungsweise die Oligodendrozyten-spezifischen Marker O4 oder CNPase bestätigt. Dieses Protokoll brachte eine Population hervor, die zu  $17,4 \pm 1,5\%$  A2B5, zu  $46,9 \pm 2,5\%$  GFAP, zu  $11,2 \pm 1\%$  CNPase und zu  $5,5 \pm 0,5\%$  O4 exprimierte. Es konnte keine Kolo-kalisation von EGFP mit GFAP, O4 oder CNPase nachgewiesen werden. In weniger als 1% der Fälle konnte eine Doppelmarkierung mit A2B5 gefunden werden.

### 3.1.3 Lineage-Selektion der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone

Eine Voraussetzung ES Zell-abgeleiteter Neurone für die Verwendung für Transplantations-Strategien ist die Generierung hoch aufgereinigter Zellpopulationen. Nachdem die Daten aus den *in vitro* Differenzierungsexperimenten auf eine spezifische Expression von T $\alpha$ 1-EGFP in Neuronen hinweisen (**3.1.2** und **3.1.2.3**), sollte unter Verwendung der FACS-Technik aus den T $\alpha$ 1-EGFP ES Zell-abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellen eine hoch aufgereinigte neuronale Population isoliert werden (**Abb. 7**). Die Zellen wurden nach zwei Tagen Wachstumsfaktorentzug sortiert. Dies hat den Nachteil eines geringen prozentualen Anteils an EGFP-positiven Zellen ( $3,6 \pm 2,4\%$ ). Der Vorteil ist jedoch, eine neuronale Population für die Selektion zur Verfügung zu haben, die noch nicht zu differenziert ist und noch keine komplexen Fortsätze aufweist. Die Durchflußcytometrie zeigte eine gut detektierbare EGFP-positive Zellpopulation (**Abb. 12A**; markiert mit Kreis). Zur Anreicherung der EGFP-positiven Zellen wurde eine präparative Sortierung in Zusammenarbeit mit Volker Gornik durchgeführt. Die Fluoreszenz stellte dabei das einzige Sortierkriterium dar. FACS-sortierte und nicht sortierte Zellen aus derselben Präparation wurden separat auf Polyornithin/Laminin-beschichteten Schalen in N3 Medium plattiert und nach 17 h mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Bei der Kontrolle handelte es sich um Zellen, welche vereinzelt, aber nicht sortiert wurden. Die FACS-sortierten und anschließend plattierten Zellen zeigten eine deutliche EGFP-Fluoreszenz und bildeten innerhalb der ersten Stunden in der Zellkulturschale kleine Fortsätze aus (**Abb. 12C**). Die Quantifizierung der  $\beta$ -III Tubulin-immunreaktiven Zellen ergab eine sehr hohe Anreicherung von neuronalen Zellen in der sortierten Fraktion (**Abb. 12B**).  $98,5 \pm 0,5\%$  der FACS-Population exprimierte  $\beta$ -III Tubulin (**Abb. 12B**). Im Vergleich dazu waren in der Kontrolle  $82,7 \pm 4,4\%$  der Zellen  $\beta$ -III Tubulin-positiv. Gegenüber nicht passagierten Kulturen (mit einem Anteil von  $44,3 \pm 9,3\%$   $\beta$ -III Tubulin-positiver Neurone) stellt diese eine 2,2-fach Zunahme dar. 17 h nach Plattieren waren  $4,5 \pm 2,0\%$

der nicht passagierten Zellen EGFP-positiv, wohingegen  $85,7 \pm 1,3\%$  in der sortierten Fraktion EGFP exprimierten. Dies kommt einer 19-fachen Anreicherung der EGFP-positiven Zellen gleich.

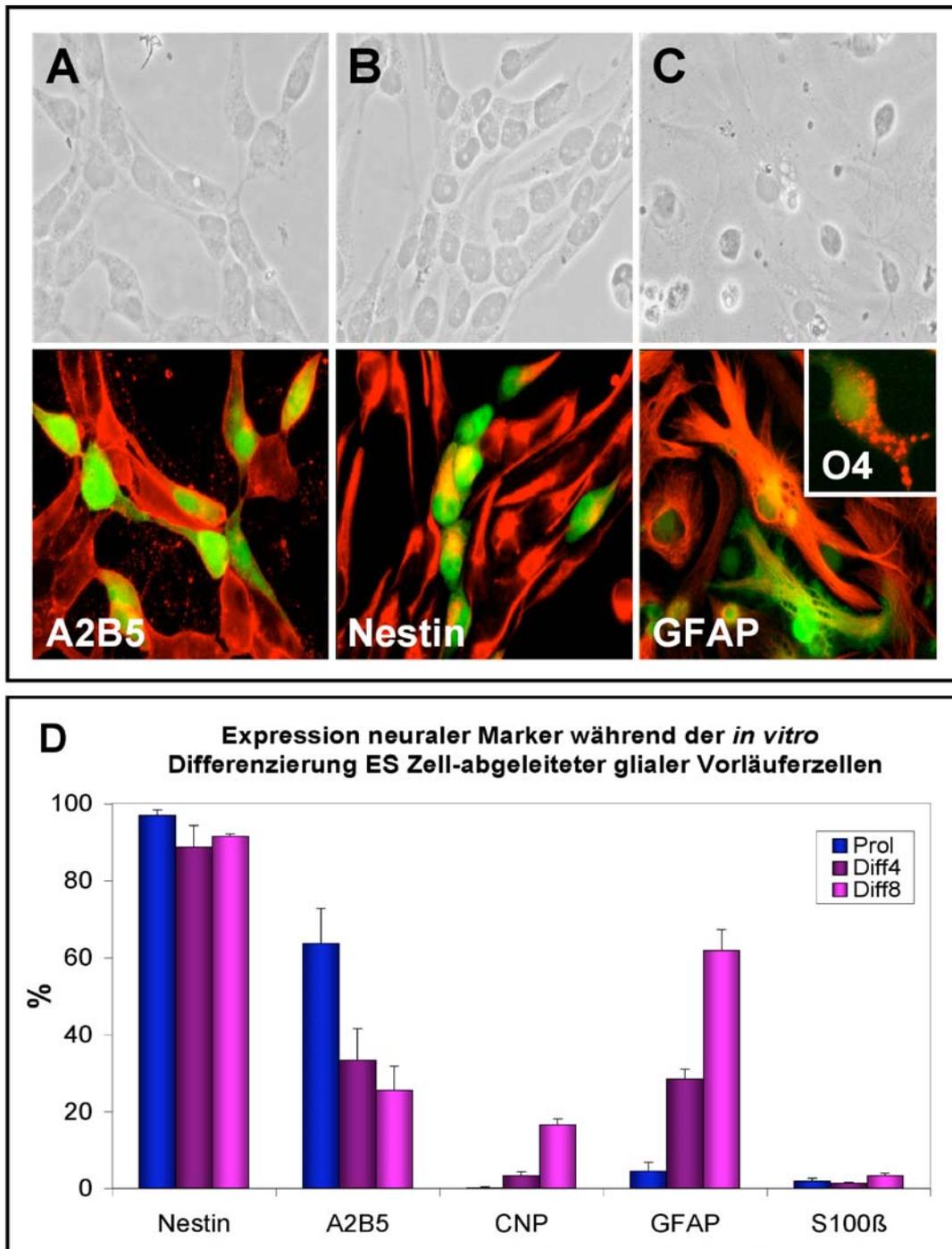


**Abb. 12:** FACS-basierte Lineage-Selektion  $T\alpha 1$ -EGFP-positiver Zellen. (A) Zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug kann eine deutliche Fraktion von fluoreszierenden Zellen in N3FL Kulturen detektiert werden. (B) Die Zellen wurden aufgrund der EGFP-Fluoreszenz-Intensität sortiert. 17 h nach FACS-Sortierung wurden die Zellen fixiert und mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -III Tubulin gefärbt. Die FACS-Sortierung resultiert in einer starken Anreicherung von neuronalen Zellen.  $98,5 \pm 0,5\%$  der sortierten Zellen sind  $\beta$ -III Tubulin-positiv (FACS; SEM aus fünf unabhängigen Versuchen). KNV repräsentiert eine Kontrolle, die zum gleichen Zeitpunkt fixiert, aber keiner FACS-Analyse unterzogen wurde. KV zeigt eine Population, die vor Quantifizierung trituriert und als Einzelzellsuspension replattiert wurde, um die neuronale Differenzierung zu stimulieren. Gegenüber beiden Kontrollen zeigt die sortierte Population eine hochgradige Anreicherung neuronaler Zellen. (C)  $\beta$ -III Tubulin-Expression (rot) in sortierten EGFP-positiven Zellen 17 h nach Plattieren. (D) Korrespondierende Höchstfärbung. Skalierung, 50  $\mu$ m

### 3.2 Gewinnung und Charakterisierung EGFP-transgener ES Zell-abgeleitete glialer Vorläuferzellkulturen

Mittels Lipofektion wurden in Anwesenheit von FGF2 und EGF proliferierende ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen stabil mit einem CMV-EGFP Konstrukt transfiziert. Es wurden 20 Klone isoliert und aufgrund ihrer Morphologie und EGFP-Expression ausgewählt. Alle nachfolgenden Experimente wurden mit Klon 20 durchgeführt, der sich durch eine besonders prominente EGFP-Expression auszeichnete und eine gliale Differenzierungsfähigkeit aufwies. Die Zellen wurden während der Proliferation sowie vier und

acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug und der dadurch induzierten Differenzierung einer immunocytochemischen Charakterisierung unterzogen.



**Abb. 13:** Immunocytochemische Charakterisierung von mit dem CMV-EGFP Konstrukt stabil transfizierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen. (A-B) Während der Proliferation in FGF2 und EGF zeigen EGFP-exprimierende Zellen eine unreife, spindelförmige Morphologie. Diese Zellen exprimieren A2B5 und Nestin (rote Signale in A und B). (C) Vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug differenzieren die Zellen in GFAP-exprimierende Astrozyten und O4-positive Oligodendrozyten aus (Einschub). (D) Quantifizierung des Immunphänotyps von proliferierenden (Prol) und über vier und acht Tage differenzierten (Diff4 und Diff8) ES Zell-abgeleiteten Gliazellen. Die Zahl der Nestin-positiven Zellen nimmt nur geringfügig ab, wohingegen die Fraktion an A2B5-positiven Zellen von 63,6% auf 25,5% fällt. Die Expression von reifen glialen Markern steigt langsam mit Dauer des Wachstumsfaktorentzuges an. Nach acht Tagen umfasst die Zahl GFAP-positiver Astrozyten 61,8% und die CNP-positiver Oligodendrozyten 16,6%.

Während der Proliferation zeigten die Zellen eine unreife, spindelförmige Morphologie und exprimierten A2B5 (**Abb. 13A**) und Nestin (**Abb. 13B**). Vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug differenzierten die Zellen in GFAP-exprimierende Astrozyten (**Abb. 13C**) und O4-positive Oligodendrozyten (Einschub in **Abb. 13C**). Astrozyten zeigten irreguläre Somata und sternförmige Fortsätze, wohingegen Oligodendrozyten große Somata und dünne multipolare Fortsätze besaßen. Eine Quantifizierung der Zellen ergab, dass die Zahl der Nestin-positiven Zellen während des Wachstumsfaktorentzuges kaum abnahm (von  $96,9 \pm 1,4\%$  auf  $91,5 \pm 0,6\%$ ; **Abb. 13D**). Hingegen fiel die Fraktion A2B5-positiver Zellen von  $63,6 \pm 9,2\%$  (proliferierend) auf  $25,5 \pm 6,3\%$  (Tag 8 nach Wachstumsfaktorentzug) ab. Die Expression von reifen glialen Markern stieg während des Wachstumsfaktorentzuges langsam an. Acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug war die Zahl GFAP-positiver Astrozyten von  $4,5 \pm 2,3\%$  auf  $61,8 \pm 5,5\%$  gestiegen. Der Anteil CNP-positiver Oligodendrozyten nahm von  $0,3 \pm 0,2\%$  auf  $16,6 \pm 1,5\%$  zu (**Abb. 13D**). Die Anzahl S100 $\beta$ -positiver Zellen blieb hingegen auch nach Differenzierung unter 5%.

### 3.3 Untersuchung der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in hippocampalen Schnittkulturen

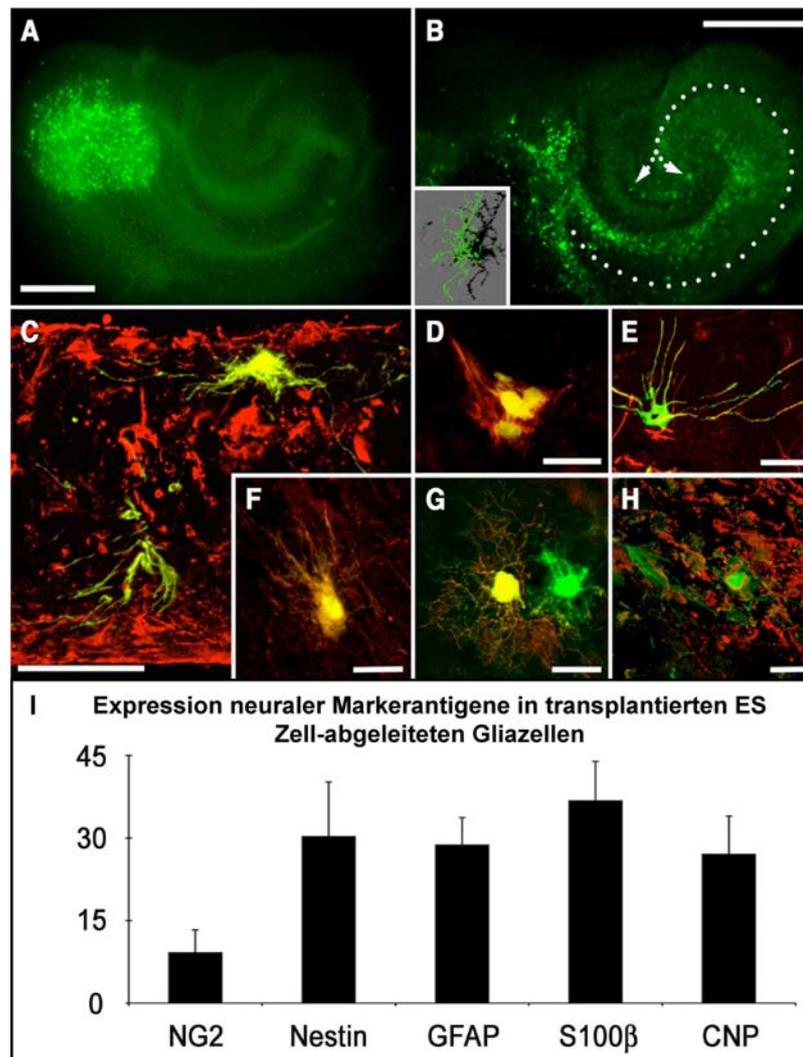
#### 3.3.1 Inkorporation und Differenzierung ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach *in vitro* Transplantation

Um ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen im Gewebekontext zu untersuchen, wurden EGFP-positiv, in FGF2 und EGF proliferierende Zellen auf der Schnittkultur deponiert. Nach Transplantation der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen auf die Schnittkulturen konnten drei Stadien der Integration beobachtet werden:

- 1) eine vertikale Invasion in den Gewebeschnitt,
- 2) eine horizontale Migration innerhalb des Wirtsgewebes und
- 3) eine Ausdifferenzierung der Zellen in unterschiedlichen anatomischen Regionen.

Die Spenderzell-Invasion wurde an den Tagen 1-2, 5-7, und 14-18 nach Deposition der Zellen dokumentiert (n=9 transplantierte Schnittkulturen pro Zeitpunkt). Diese Spenderzell-Invasion schien unabhängig von der Transplantationsstelle zu sein. Die Inkorporation in unterschiedliche Tiefen wurde in horizontalen und vertikalen Serienschnitten untersucht und bestätigt (**Abb. 14C**). 48 Stunden nach

Transplantation der Zellen waren EGFP-positive Zellen bis zu einer Tiefe von 90  $\mu\text{m}$  ( $71,1 \pm 16,9 \mu\text{m}$ ) in den Schnitt eingedrungen. Danach ließ die Migrationsaktivität der Zellen stufenweise nach. Zwei Wochen nach Transplantation wurden die Spenderzellen bis zu 130  $\mu\text{m}$  von der Oberfläche entfernt gefunden ( $90,0 \pm 0,0 \mu\text{m}$  bzw.  $96,7 \pm 15,8 \mu\text{m}$ ). Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Invasionstiefe zwischen Tag 5-7 und 14-18 festgestellt.



**Abb. 14:** *In vitro* Transplantation von ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in hippocampale Schnittkulturen. (A) Schnittkultur ein Tag nach Deposition von 20.000 EGFP-markierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen auf den entorhinalen Cortex. (B) 18 Tage nach Implantation sind die Spenderzellen entlang der Pyramidalzellschicht und der Schaffer-Kollateralen in den Hilusbereich und die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus eingewandert (gepunktete Linie). Dort bildeten sie komplexe dreidimensionale Morphologien aus (Einschub: digitale Rekonstruktion einer transplantierten EGFP-positiven Zelle). (C) Zum gleichen Zeitpunkt zeigt ein Querschnitt durch die gesamte Dicke des Schnittes inkorporierte Spenderzellen in verschiedenen Tiefen des Wirtsgewebes. (Doppelmarkierung mit einem Antikörper gegen GFAP (rot)). (D) Während einige transplantierte Zellen eine unreife Morphologie behalten und NG2 (rot) exprimieren, erlangt die Mehrheit in der zweiten Woche nach Transplantation einen differenzierten glialen Phänotyp. (E) Etwa 30% der ES Zell-abgeleiteten Gliazellen sind Nestin-positiv, inklusive Zellen mit astrozytärer Morphologie. (F) Zusätzlich zu GFAP exprimieren Spender-abgeleitete Astrozyten S100 $\beta$ . (G) ES Zell-abgeleitete Oligodendrozyten wurden mit einem Antikörper gegen CNP identifiziert (entorhinaler Cortex). (H) EGFP-positiver transplantiertes Oligodendrozyt, welcher eine Expression von MBP aufweist und röhrenförmige Fortsätze ausbildet, die auf Myelinbildung hinweisen (Stratum oriens, CA1). (I) Graphische Darstellung der Markerverteilung von EGFP-positiven Zellen zwei Wochen nach Transplantation. Skalierung: A-B, 1mm; C, 100  $\mu\text{m}$ ; D-H, 25  $\mu\text{m}$ . Aus Scheffler, Schmandt *et al.* 2003.

Weiter konnte eine extensive horizontale Verteilung der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen innerhalb der Schnittkultur beobachtet werden. Während der ersten Woche nach Transplantation migrierten die Spenderzellen bis zu mehreren 100  $\mu\text{m}$  (**Abb. 14A, B**). Die Migration erfolgte bevorzugt entlang vorhandener Fasertrakte. Besonders häufig wurde dies nach Transplantation der Zellen auf den entorhinalen Cortex (EC; n=25) beobachtet. Von hier aus verteilten sich die transplantierten Zellen entlang des Tractus perforans und der Schaffer-Kollateralen. Zellen, die über dem Gyrus dentatus (GD, n=16) deponiert wurden, verteilten sich über den gesamten Hilusbereich, assoziierten sich mit der Molekularzellschicht und verbreiteten sich entlang des Pyramidenzellbandes. Im Gegensatz dazu blieben Zellen, die über dem temporalen Cortex (TC; n=13) deponiert wurden, zum größten Teil an der Transplantationsstelle liegen.

Innerhalb der ersten Woche nach Transplantation zeigte die Mehrheit der EGFP-positiven Zellen einen bipolaren, migratorischen Phänotyp. In der zweiten Woche bildeten die Zellen vielfach multipolare, astrozytäre und oligodendrogliale Morphologien aus. Am Tag  $11 \pm 4$  nach Transplantation exprimierten  $9,4 \pm 5,6\%$  (n=212) der EGFP-markierten Zellen NG2 (**Abb. 14D**). NG2 wird insbesondere in glialen Vorläuferzellen gefunden (Diers-Fenger *et al.* 2001).  $30,4 \pm 9,3\%$  der Zellen waren weiterhin Nestin immunreaktiv (n=280). ES Zell-abgeleitete Astrozyten exprimierten GFAP ( $27,5 \pm 6,2\%$ ; n=251) und/oder S100 $\beta$  ( $40,5 \pm 7,7\%$ ) und besaßen eine nicht-polare Morphologie mit runden bis ovalen Zellkörpern, die zahlreiche prominente Fortsätze aufwiesen (**Abb. 14C, F**). Diese zweigten strahlenförmig vom Zellkörper in alle Richtungen ab. Auffallend war, dass Zellen mit astrozytärer Morphologie häufig weiterhin Nestin exprimierten (**Abb. 14E**). Spenderzell-abgeleitete CNP-positive Oligodendrozyten ( $30,3 \pm 9,8\%$ ; n=238) besaßen in der Mehrzahl schmale und runde Zellkörper mit fein verästelten Fortsätzen (**Abb. 14G**). Es konnte keine Korrelation zwischen der Differenzierung der Spenderzellen und der Assoziation hippocampaler Subregionen festgestellt werden. EGFP-positive Oligodendrozyten, die charakteristische röhrenförmige Fortsätze zeigten, wurden jedoch bevorzugt innerhalb von Faserbündeln des Wirtsgewebes gefunden. Auch MBP-exprimierende waren mit zunehmender Verweildauer der Zellen in der Schnittkultur vermehrt nachweisbar (**Abb. 14H**, konfokale Rekonstruktion). Die röhrenförmige Struktur der Zellfortsätze und die Expression von CNP und MBP lassen die Vermutung zu, dass einige Spenderzellen in myelinisierende Oligodendrozyten differenziert waren.

Zusammengefasst zeigen diese in Zusammenarbeit mit Dr. Björn Scheffler erhobenen morphologischen und immunhistologischen Daten, dass die Mehrzahl der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen zwei Wochen nach hippocampaler Transplantation in Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert waren.

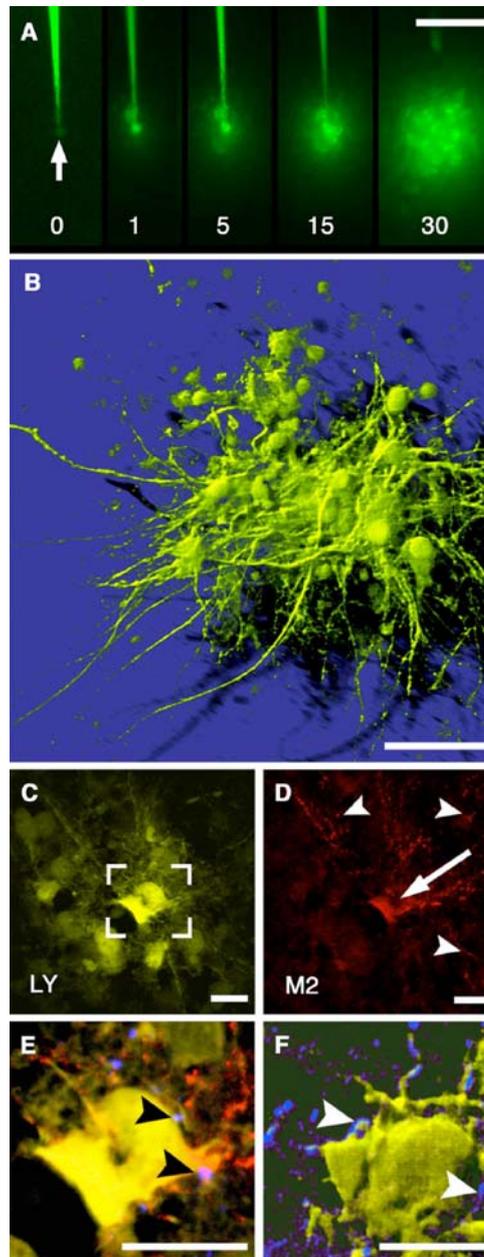
### 3.3.2 Kopplungsnachweis in hippocampalen Schnittkulturen

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob und in wie weit transplantierte ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen über Gap Junctions Kontakt mit endogenen Gliazellen aufnehmen können. Dazu wurden einzelne EGFP-positive Zellen mit Lucifer Yellow gefüllt und die Diffusion beobachtet. Diese Dye-Coupling Analysen wurden ebenfalls in Kooperation mit Dr. Björn Scheffler durchgeführt.

Ein einschneidendes Ereignis in der Astrozyten-Entwicklung *in vivo* ist die Bildung von Gap Junctions. Gap Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die den Austausch von kleinen Molekülen und Ionen zwischen den Cytosolen benachbarter Zellen ermöglichen (Lodish *et*

*al.* 2001; Giaume und McCarthy 1996; Wall 1992). Astrozyten sind an der Ionenpufferung und der funktionellen Synchronisation des glialen Netzwerkes maßgeblich beteiligt. Individuelle Astrozyten sind zu Dutzend mit benachbarten Zellen gekoppelt und bilden quasi ein Syncytium von miteinander verbundener Glia (Giaume und McCarthy 1996).

Zur Untersuchung der Integration wurden Spenderzellen über eine Dauer von 30 min iontophoretisch mit Lucifer Yellow (LY) gefüllt. Die analysierten Zellen wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine weitere EGFP-positive Zelle in der Nähe der injizierten Zelle



**Abb. 15:** Integration ES Zell-abgeleiteter Astrozyten in das endogene Gliazellnetzwerk. (A) Epifluoreszenz Mikroskopie während einer 30-minütigen iontophoretischen Injektion von LY in eine EGFP-positive Spenderzelle, die zwischen dem entorhinalen Cortex und dem Subiculum lokalisiert ist (Pfeil, 25 Tage nach Transplantation; LY und EGFP Signale wurden beide im FITC Kanal aufgenommen). Man beachte das extensive Dye Coupling mit den benachbarten Wirtszellen. (B) Konfokale Mikroskopie und 3D Rekonstruktion von (A) zeigen ein Cluster von 50 miteinander gekoppelten Zellen, die ein Gesamtvolumen von  $5,6 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$  einnehmen. Das Bild wurde nach Fixierung aufgenommen und bringt die dreidimensionale Natur des gekoppelten Zellclusters zur Darstellung. (C-D) Serienschritte dieses Cluster und Doppelmarkierung mit einem Antikörper gegen das Maus-spezifische Antigen M2 (rot) bestätigen die Spenderzell-Herkunft des in (A) dargestellten Astrozyten. Man beachte die extensive Verzweigung der Fortsätze (Pfeilspitze in D) und die von der Injektion herrührende Perforation des Zellkörpers (Pfeil in D). (E) Überlagerung von (C) und (D) (markierter Ausschnitt in (C)), dreifach markiert mit einem Antikörper gegen Cx43 (blau). Punkte von Cx43 Immunreaktivität (Pfeilspitzen) sind an den Kontaktzonen zwischen der LY/M2-positiven Spenderzelle und zwei benachbarten LY-gefüllten Wirtszell-Fortsätzen zu finden. (F) Prominente Cx43-Expression (blau) kann auch auf LY-gefüllten Fortsätzen von zwei sich kontaktierenden Wirtszellen detektiert werden (konfokale 3D Rekonstruktion). A-F repräsentieren Aufnahmen desselben Zellclusters. Skalierung: A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, 50  $\mu\text{m}$ ; C-F, 25  $\mu\text{m}$ . Aus Scheffler, Schmandt *et al.* 2003.

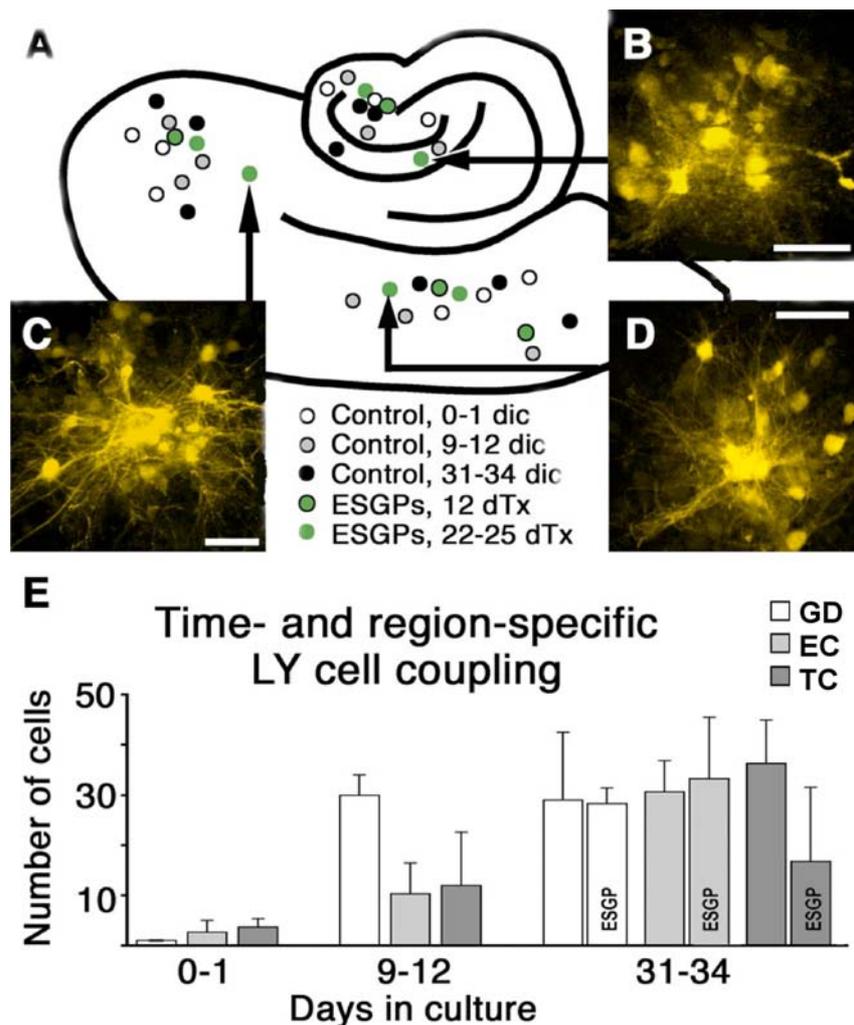
befand. LY breitete sich typischerweise von dem inkorporierten ES Zell-abgeleiteten Astrozyten in ein oder zwei benachbarte wirtseigene Gliazellen aus (**Abb. 15A**). Von dort aus diffundierte LY in alle drei Dimensionen und markierte weitere Astrozyten des wirtseigenen glialen Netzwerkes. Das resultierende LY-gefüllte Zellcluster ähnelte dem astroglialen Syncytium, das im nativen Nager-Hippocampus zu finden ist (Theis *et al.* 2003; Konietzko und Müller 1994). Die LY-gefüllten Zellcluster wurden nach Fixierung mittels konfokaler Mikroskopie und digitaler 3D Rekonstruktion quantifiziert (**Abb. 15B**). Drei Wochen nach Transplantation waren einzelne Spenderzellen mit bis zu 50 endogenen Astrozyten gekoppelt (Mittelwert=34±8). Seriencryostatschnitte des Hippocampus und Immunfluoreszenzanalysen mit dem Maus-spezifischen Antikörper M2 (Lagenaur und Schachner 1981) bestätigten die Anwesenheit eines einzelnen Spenderzell-abgeleiteten Astrozyten innerhalb eines jeden LY-gefüllten Zellclusters (**Abb. 15C, D**). Die benachbarten Zellen waren endogene Astrozyten, die entweder S100 $\beta$ , GFAP oder beide Marker exprimierten. Innerhalb des gekoppelten Zellclusters wurden keine LY-gefüllten Neurone gefunden.

Eine Schlüssel-Komponente astrozytärer Gap Junctions ist Connexin43 (Cx43; Theis *et al.* 2003; Rash *et al.* 2001). Daher wurde geprüft, ob die LY-gefüllten Zellen Cx43 exprimierten. Die Doppelmarkierung von M2-positiven und LY-gefüllten Zellen mit einem Antikörper gegen Cx43 zeigte tatsächlich Punkte von Immunreaktivität an Kontaktzonen zwischen Spenderzell- und Wirtszell-Fortsätzen (**Abb. 15E**). Auch an Kontaktstellen benachbarter wirtseigener LY-markierter Zellen wurde Immunreaktivität von Cx43 gefunden (**Abb. 15F**).

### 3.3.3 Zeitverlauf und Komplexität der Zell-Zell-Kopplung

Als nächstes wurde untersucht, ob und in wie weit das Ausmaß der Gap Junction-vermittelten Kopplung regionale Unterschiede zeigt (Kooperation mit Dr. Björn Scheffler). Weiter wurde analysiert, ob sich die Komplexität der Kopplung zwischen Wirtszellen von Donor-Wirtszellclustern unterschied. Es wurden transplantierte Zellen untersucht, die im temporalen Cortex (TC), im entorhinalen Cortex (EC) oder im Gyrus dentatus (GD) lokalisiert waren. Alle Spenderzellen, die zwischen Tag 22 und 25 nach Transplantation (n=6) untersucht wurden, zeigten eine extensive Kopplung mit der angrenzenden Wirtsglia (**Abb. 16A-D**). An Tag 12 nach Transplantation zeigten nur drei der vier untersuchten Zellen Kopplung (**Abb. 16A, E**). Die Ausbreitung von LY von diesen drei Zellen aus beschränkte sich im temporalen Cortex auf jeweils drei, im entorhinalen Cortex auf 21 und im Gyrus dentatus auf 24 gekoppelte Wirtszellen. Im temporalen Cortex zeigte eine Zelle keinen Kontakt zum endogenen Netzwerk. Diese Befunde zeigen, dass die Kopplungsfähigkeit innerhalb des Hippocampus keine regionalen Unterschiede aufweist. Jedoch fanden sich regionale Differenzen in der Anzahl der an der

Kopplung beteiligten Zellen. Um diese Beobachtung zu bestätigen, bedarf es allerdings einer detaillierteren Analyse von mehr Zellclustern. Aufgrund der bislang vorliegenden Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Differenzen einfach die dynamische Natur der Gap Junction-vermittelten Kopplung reflektieren, die für Astrozyten beschrieben wurde (Giaume und McCarthy 1996).



**Abb. 16:** Regionale Verteilung und Zeitverlauf der Zell-Zellkopplung. (A) Schematische Darstellung der Verteilung der untersuchten endogenen und inkorporierten ES Zell-abgeleiteten Astrozyten. (B-D) Beispiele von individuellen EGFP-positiven Spenderzellen, die mit wirtseigenen Astrozyten gekoppelt sind (konfokale Analyse; Überlagerung von jeweils 32 einzelnen Scans). 22-25 Tage nach Transplantation sind die Spenderzell-abgeleiteten Astrozyten genauso wie die endogenen Astrozyten in das gliale Netzwerk unterschiedlicher anatomischer Regionen des Empfängerschnittes eingebunden (B, Molekularzellschicht des Gyrus dentatus; C, entorhinaler Cortex/Subiculum; D, temporaler Cortex). LY und EGFP Signal wurden beide im FITC Kanal aufgenommen. (E) Zellkopplung von endogenen und transplantierten ES Zell-abgeleiteten Gliazellen in drei hippocampalen Subregionen im Zeitverlauf. Endogene Astrozyten weisen eine erhöhte Komplexität an Kopplung mit zunehmender Kulturzeit auf. Zwei bis drei Wochen nach Transplantation entspricht das Kopplungsverhältnis zwischen Spender- und Wirtszellen im Gyrus dentatus und entorhinalen Cortex dem endogener Astrozyten (transplantierte Schnitte wurden 12-25 Tage nach Deposition analysiert; siehe A). dic: days in culture, Alter der Schnittkultur; dTx, Tage nach Transplantation; GD, Gyrus dentatus; EC, entorhinaler Cortex; TC, temporaler Cortex. Skalierung: B-D, 50µm. Aus Scheffler, Schmandt *et al.* 2003.

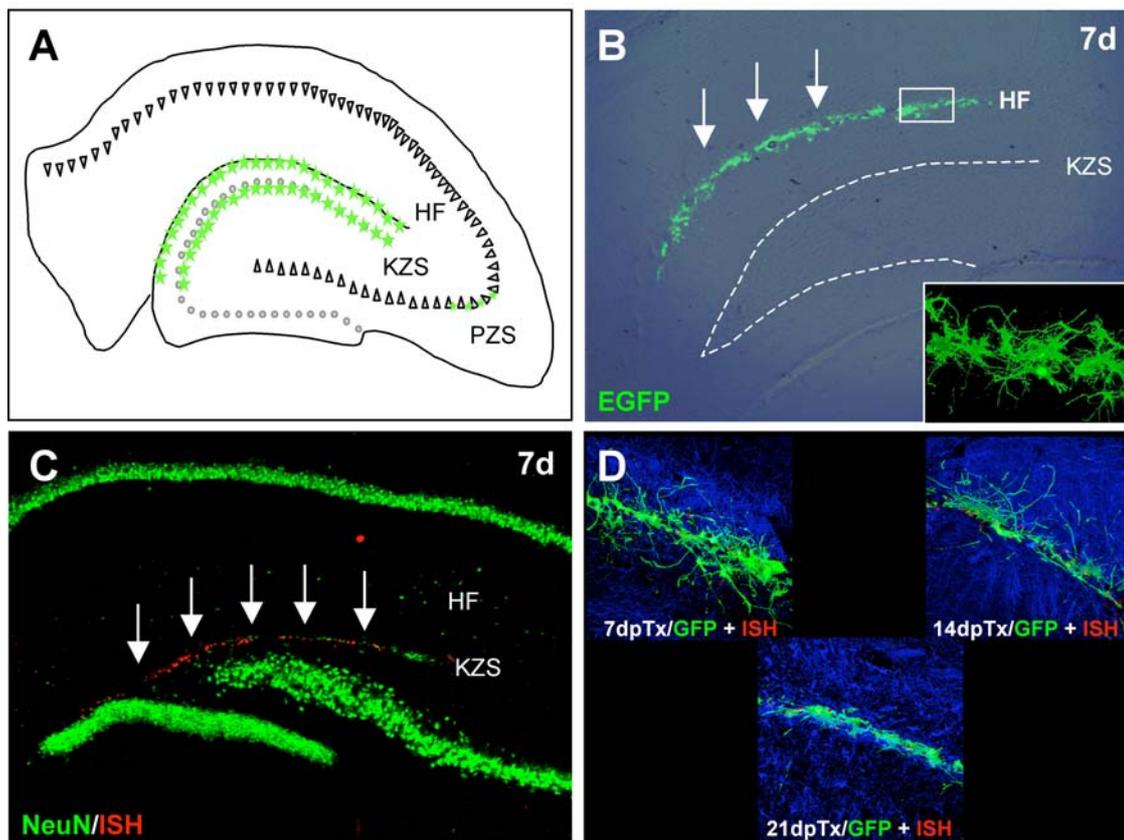
In einem nächsten Schritt wurde der zeitliche Verlauf der endogenen glialen Netzwerk-Bildung untersucht. Dabei lag ein Hauptaugenmerk auf der Fragestellung, ob die Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen Wirtszellen durch inkorporierte ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen beeinflusst wurde. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden an den Kulturtagen 0-1, 9-12 und 31-34 zunächst Dye Coupling Analysen an Schnitten durchgeführt, die keine transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen enthielten (neun Zellen pro Zeitpunkt in neun unterschiedlichen Schnitten; **Abb. 16A**). In Übereinstimmung mit den *in vivo* Studien im Nager-ZNS (Kressin *et al.* 1995; Binmöller und Müller 1992), stieg die Komplexität der Gap Junction-vermittelten Kopplung zwischen Wirts-Astrozyten während der Kulturzeit und Reifung des Gewebes. So waren an Kulturtag 0-1 weniger als fünf Zellen miteinander gekoppelt. Am Ende der Kulturzeit hingegen konnten Zellcluster von über 50 miteinander gekoppelten Zellen gefunden werden. Ein ähnliches Resultat zeigte sich bei der Untersuchung von transplantierten EGFP-positiven Zellen (**Abb. 16E**). Die Transplantation von ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen schien somit keinen Effekt auf die Entwicklung von Gap Junctions unter den Wirtszellen zu haben. Weiterhin konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen reinen Wirtszellclustern und Spender-Wirtszellclustern beobachtet werden, die eine Spenderzelle enthielten. Zusammengefasst konnte in neun von zehn injizierten Spenderzell-abgeleiteten Astrozyten Kopplung mit Wirtszellen nachgewiesen werden. Dies belegt die Integration der Mehrzahl der transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in das endogene Netzwerk. Der Anstieg der Komplexität der Kopplung während der Kulturzeit spricht dafür, dass die Rekrutierung der transplantierten Zellen in das endogene Netzwerk vom Differenzierungsgrad des Wirtsgewebes abhängt.

### 3.4 Inkorporation und Differenzierung transplantierte ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen *in vivo*

#### 3.4.1 Verteilung und morphologische Integration der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen

Zur Untersuchung der Differenzierung und Plastizität ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen *in vivo* wurden die Zellen in den Hippocampus adulter Ratten transplantiert. Die Empfängertiere wurden 7, 14 und 21 Tage nach Transplantation perfusionsfixiert, die Gehirne isoliert und 50 µm Vibratom-Schnitte angefertigt. Schnitte, die EGFP-positive Zellen enthielten, wurden gesammelt. Die hippocampale Formation wurde von den übrigen Bereichen abgetrennt. Da sich eine Doppelmarkierung der EGFP-positiven Zellen an Vibratomschnitten aufgrund einer geringen Penetrationstiefe der Antikörper als

schwierig erwies, wurden die transplantierten Maus-Zellen über eine *in situ* Hybridisierung mit einer Probe für Maus-spezifische Satelliten-DNA nachgewiesen. Da einige Antigene durch den Pronase-Verdau zerstört werden, wurden diese über ein stabiles Tyramid-Signal vor der *in situ* Hybridisierung detektiert. Das Tyramid-System wurde zur Detektion von  $\beta$ -III Tubulin, NeuN und Nestin verwendet. Auch das EGFP-Signal konnte nach *in situ* Hybridisierung nicht mehr detektiert werden. Daher wurde in einigen Versuchen EGFP mit einem Antikörper in Verbindung mit dem Tyramid-System nachgewiesen.



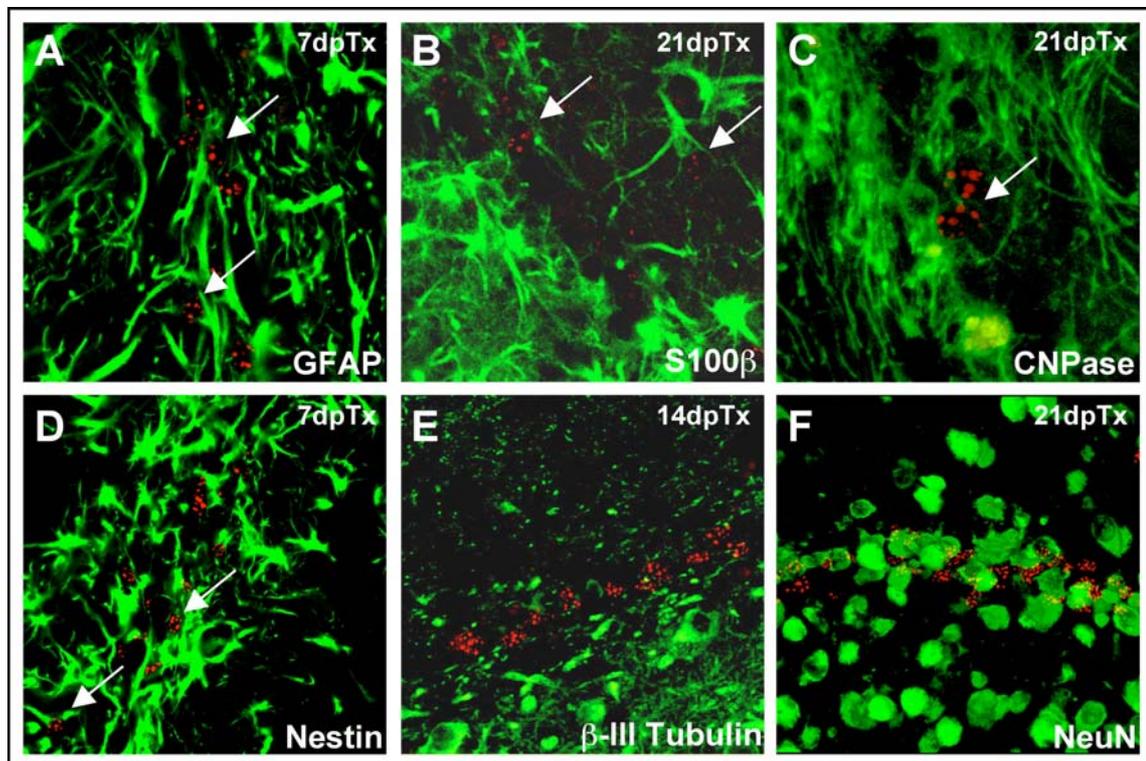
**Abb. 17:** (A) Schematische Darstellung der Verteilung der EGFP-positiven Zellen nach Transplantation in den adulten Hippocampus der Ratte (grüne Sterne). Die Zellen inkorporieren bevorzugt in die hippocampale Fissur (HF) und in die Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus dentatus. Wenige EGFP-positiv Zellen sind in der Pyramidalzellschicht (PZS) zu finden. (B) EGFP-positiv Spenderzellen (grün) in der hippocampalen Fissur (Pfeile). Die gestrichelte Linie zeigt die Körnerzellschicht. Der Einschub zeigt eine 3D Rekonstruktion eines EGFP-positiven Spenderzell-Clusters. Die Zellen zeichnen sich durch komplexe gliale Morphologien aus und zeigen lange Fortsätze. (C) Spenderzell-Integration in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, nachgewiesen durch DNA *in situ* Hybridisation (ISH; rote nukleäre Punkte; Pfeile). Doppelmarkierung mit einem Antikörper gegen NeuN (grün) zeigt, dass die transplantierten Zellen zum großen Teil die endogenen Körnerzellen verdrängt haben. (D) Mit zunehmender Zeit nach Transplantation bilden die EGFP-positiven Zellen ihre Fortsätze zurück. dpTx, Tage nach Transplantation

Die schematische Darstellung der hippocampalen Region zeigt die Inkorporationsstellen der Spenderzellen (grüne Sterne; **Abb. 17A**). EGFP-positiv Zellen inkorporierten bevorzugt in die hippocampale Fissur (HF; **Abb. 17B**) und in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (KZS). Darüber hinaus wurden einige wenige EGFP-positiv Zellen in der Pyramidalzellschicht gefunden. Eine konfokale Analyse der Zellen sieben Tage nach Transplantation zeigte ein Netzwerk von EGFP-positiven Zellen mit komplexen glialen Morphologien und verzweigten Fortsätzen (Einschub in **Abb. 17B**). Die Spenderzellen

wurden auch EGFP-unabhängig durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Eine Doppelmarkierung mit einem Antikörper gegen NeuN zeigte, dass die ortsansässigen Körnerzellen im Gyrus dentatus zum Großteil durch die inkorporierten Zellen verdrängt wurden (**Abb. 17C**). Sieben Tage nach Transplantation waren vitale Zellen mit langen Fortsätzen zu finden (Einschub in **Abb. 17B**, **Abb. 17D**), die im Zeitverlauf jedoch zurückgebildet wurden. 21 Tage nach Transplantation zeigten nur noch wenige Zellen ausgeprägte Fortsätze. Viele Zellen wiesen große und blasige Somata und andere degenerative Veränderungen auf.

### 3.4.2 Differenzierung der transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen

Nach Transplantation in den Hippocampus bildeten die ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen sowohl astrozytäre als auch oligodendrogliale Phänotypen aus. Die Mehrheit der Zellen exprimierte GFAP (**Abb. 18A**), eine große Zahl war S100 $\beta$ -positiv (**Abb. 18B**). In geringerem Ausmaß konnten auch CNPase-positive Zellen detektiert werden (**Abb. 18C**). Nur wenige Zellen zeigten Nestin Immunreaktivität (**Abb. 18D**). In keiner der inkorporierten Spenderzellen wurde eine Expression neuronaler Marker wie  $\beta$ -III Tubulin (**Abb. 18E**) oder NeuN (**Abb. 18F**) gefunden. Eine detaillierte Quantifizierung der



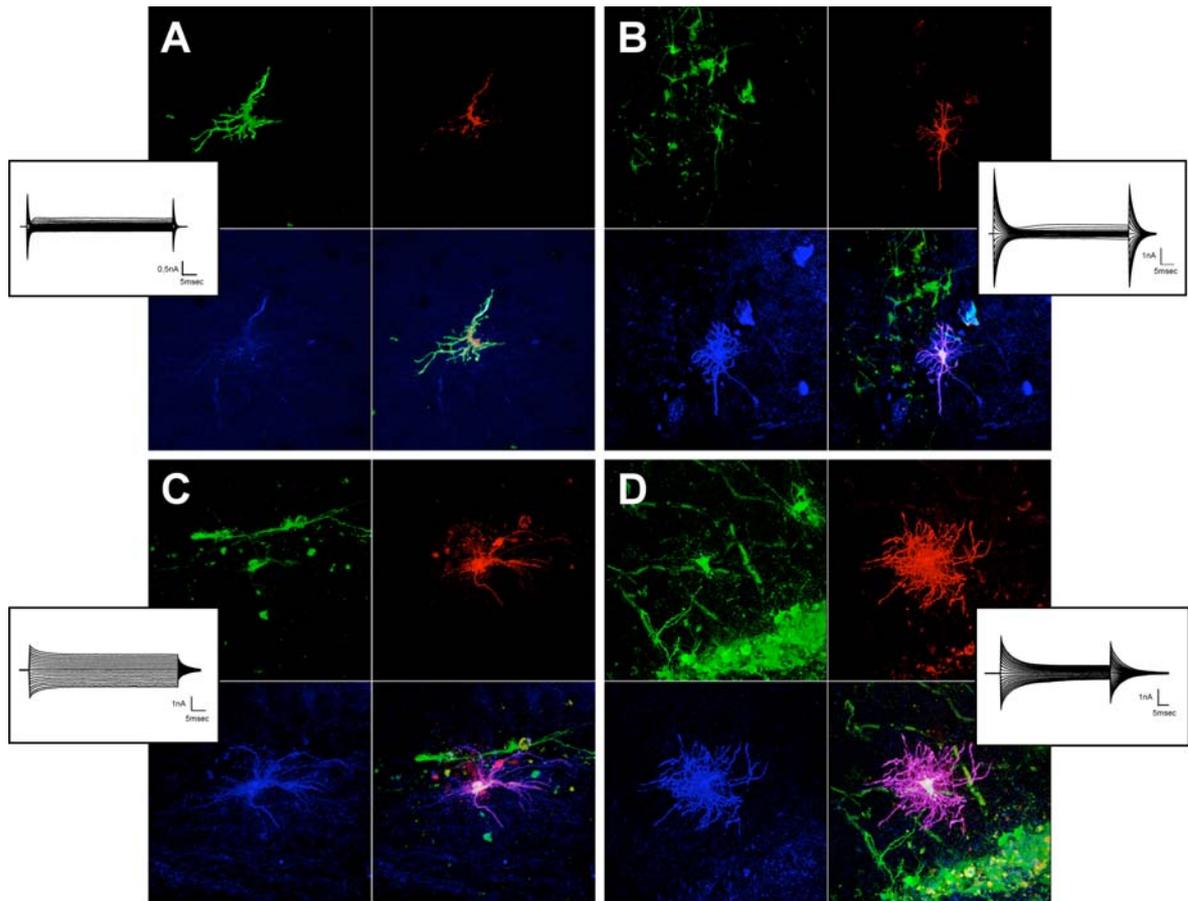
**Abb. 18:** Nach Transplantation in den Hippocampus differenzieren die ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen (über *in situ* Hybridisierung nachgewiesen) in einen astrozytären oder oligodendroglialen Phänotyp aus. Die Zellen exprimieren GFAP (A), S100 $\beta$  (B) und CNPase (C). Nur wenige Zellen behalten Nestin Immunreaktivität (D). Die Expression von neuronalen Markern wie  $\beta$ -III Tubulin (E) und NeuN (F) konnte in keiner der inkorporierten Spenderzellen gefunden werden (beide Pyramidalzellschicht). dpTx, Tage nach Transplantation

Markerverteilung war jedoch nicht möglich, da in den wenigsten Fällen eine eindeutige Zuordnung von Zellfortsätzen zu hybridisierten Zellkernen möglich war. Aufgrund der unterschiedlichen Penetration der Antikörper und der für die *in situ* Hybridisierung eingesetzten DNA-Probe wurden zudem nicht alle Schichten der 50  $\mu\text{m}$  dicken Vibratomschnitte gleichmäßig markiert.

### 3.4.3 Morphologische und elektrophysiologische Heterogenität der transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen

In einem weiteren Schritt sollte geprüft werden, ob ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen auch nach *in vivo* Transplantation die Fähigkeit besitzen, wie native Gliazellen in distinkte Subpopulationen zu segregieren. Mittels Patch-clamp Analysen sollten dabei auch die funktionellen Eigenschaften der transplantierten EGFP-positiven Zellen untersucht werden.

Eine Gesamtzahl von 29 EGFP-positiven Zellen wurden 7, 14 und 21 Tagen nach Transplantation untersucht und aufgrund ihrer Morphologie in drei Gruppen eingeteilt. Die Mehrheit der astrozytären Zellen besaß irreguläre Somata und Fortsätze, die sich entlang einer virtuellen Achse orientierten (**Abb. 19A, B**). Andere astrozytäre Zellen zeigten eine eher sternförmige Ausbreitung der Fortsätze (**Abb. 19C**). Oligodendrozyten-ähnliche Zellen wiesen hingegen große Somata auf und hatten stark verzweigte Fortsätze (**Abb. 19D**). Parallel an diesen Zellen von Kerstin Hüttmann und Dr. Claudia Krebs durchgeführte Patch-clamp Analysen zeigten, dass sich den drei unterschiedlichen Morphologien distinkte Strommuster zuordnen lassen. So zeigten die Zellen, deren Fortsätze sich entlang einer virtuellen Achse orientierten, zwei Arten von Strommustern. Ein Anteil zeigte ‚komplexe‘ Strommuster mit transienten und verzögert auswärts-gleichrichtenden ( $I_{K(A)}$  und  $I_{K(D)}$ ) sowie einwärts-gleichrichtenden  $K^+$ -Strömen ( $I_{Kir}$ ; **Abb. 19A**). Andere Zellen zeigten ein Strommuster, das diesem so genannten ‚komplexen‘ Typ ähnelte (**Abb. 19B**). Sternförmige Astrozyten zeigten prominente Zeit- und Spannungs-unabhängige ‚passive‘ Strommuster ( $I_{(P)}$ ; **Abb. 19C**). Oligodendrozyten-ähnliche Zellen zeigten fast symmetrische auswärts- und einwärts- $K^+$ -Ströme, die langsam mit den Spannungssprüngen abnahmen (**Abb. 19D**). Die Anzahl der Astrozyten mit ‚passiven‘ Strommustern nahm mit der Verweildauer im Gewebe zu. Es wurden in der gesamten Versuchsserie keine neuronalen Strommuster in EGFP-positiven Zellen gefunden. Diese Daten zeigen, dass transplantierte ES Zell-abgeleitete Gliazellen in distinkte morphologische und funktionelle Phänotypen segregieren.

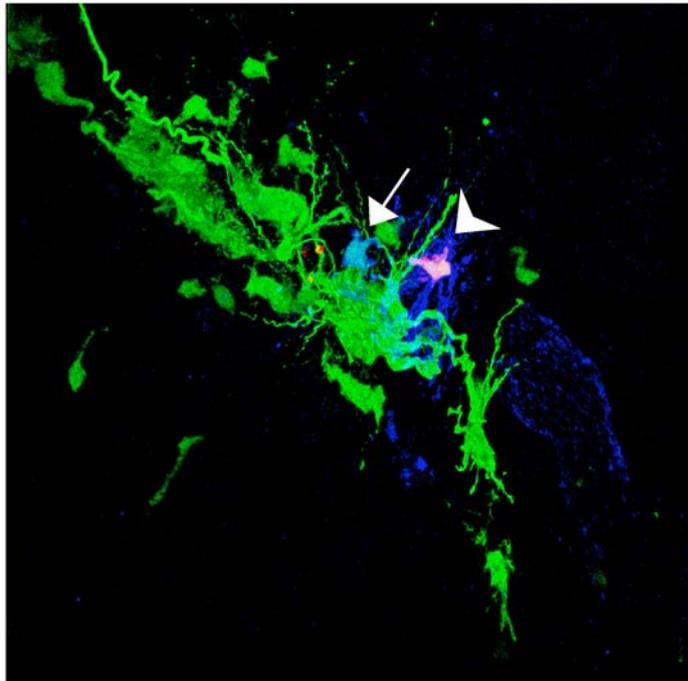


**Abb. 19:** Patch-clamp Analysen der EGFP-positiven Zellen in akuten Schnittpräparationen zeigen distinkte funktionelle und morphologische Phänotypen. EGFP-positive Zellen wurden mit Texas-red-Dextran (rot) und Biocytin (entwickelt mit Avidin Cy5, blau) markiert. Die Mehrheit der astrozytären Zellen besitzt irreguläre Somata und Fortsätze, die sich entlang einer virtuellen Achse orientieren. Diese Zellen zeigen so genannte ‚komplexe‘ Strommuster mit transienten und verzögert auswärts-gleichrichtenden sowie einwärts-gleichrichtenden  $K^+$ -Strömen (A, 7dpTx) oder variable Strommuster (B, 14dpTx), die diesen ‚komplexen‘ ähneln. Sternförmige Astrozyten besitzen prominente Zeit- und Spannungs-unabhängige ‚passive‘ Strommuster (C, 14dpTx). Oligodendrozyten-ähnliche Zellen mit großen Somata und verzweigten Fortsätzen zeigen fast symmetrische auswärts- und einwärts- $K^+$ -Ströme, die langsam mit den Spannungssprüngen abnehmen (D, 7dpTx). Es wurden keine neuronalen Strommuster detektiert.

### 3.4.4 Kopplungsuntersuchungen *in vivo*

In den Schnittkulturen konnte nachgewiesen werden, dass transplantierte ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen über Gap Junctions mit dem endogenen glialen Netzwerk gekoppelt waren. Nun sollte untersucht werden, ob die in den Ratten-Hippocampus transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen *in vivo* ebenfalls Gap Junctions mit endogenen Astrozyten bilden. Dazu wurden die Zellen während der elektrophysiologischen Untersuchung mit einer Texas-red-Dextran/Biocytin-Lösung gefüllt (Kooperation mit Kerstin Hüttmann und Dr. Claudia Krebs). Texas-red-Dextran kann aufgrund seiner Größe nicht durch die Gap Junctions gelangen und markiert lediglich die untersuchte Zelle. Biocytin ist ein kleines Molekül, das durch die Gap Junctions diffundieren kann und im Fall einer Kopplung von benachbarten Zellen aufgenommen wird. Das Biocytin wurde nach Fixierung der Schnitte mit Cy5-gekoppeltem Streptavidin D nachgewiesen (2.11.3). In keiner der 7, 14 und 21 Tage nach Transplantation durchgeführten Untersuchungen (n=29) konnte eine Kopplung zwischen Donor- und

Empfängerzellen nachgewiesen werden. Sehr vereinzelt konnten EGFP-positive Zellen gefunden werden, die mit einer ebenfalls EGFP-positiven Zelle gekoppelt waren (**Abb. 20**).



**Abb. 20:** Patch-clamp Analyse einer EGFP-positiven Zelle im akuten Schnittpräparat. EGFP-positive Zellen wurden während der Aufzeichnung mit einer Lösung gefüllt, die Texas-red-Dextran (rot) und Biocytin enthielt (mit Avidin Cy5 entwickelt, blau). Texas-red-Dextran markiert die gepatchte Zelle (Pfeilspitze). Biocytin erlaubt den Nachweis der Kopplung, da es durch Gap Junctions diffundieren kann. Morphologisch und funktionell handelt es sich bei der gepatchten Zelle um einen Oligodendrozyten. Eine benachbarte, ebenfalls EGFP-positive Zelle, hat das Biocytin aufgenommen (Pfeil).

## 4. Diskussion

### 4.1 Selektion von ES Zell-abgeleiteten Neuronen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die kontrollierte Differenzierung von ES Zellen zu neuronalen Vorläuferzellen, kombiniert mit einem Lineage-Selektions-Verfahren, zu einer hoch aufgereinigten neuronalen Population führt. Als selektierbarer Marker wurde ein über den Promotor des T $\alpha$ 1-Tubulin-Gens exprimiertes EGFP-Gen gewählt.

#### 4.1.1 Wertigkeit des T $\alpha$ 1-EGFP-Transgens als selektierbarer Marker für die neuronale Lineage-Selektion

T $\alpha$ 1-Tubulin ist ein Baustein von Mikrotubuli, die ein integraler Bestandteil von auswachsenden Neuriten während der Entwicklung und Regeneration sind. Lewis *et al.* (1985) konnten zeigen, dass in der Maus die Expression der T $\alpha$ 1-Tubulin mRNA (messenger ribonucleic acid) sprunghaft zwischen Embryonaltag (E) 8 und E10 ansteigt. So ist in Northern Blots an E8 keine T $\alpha$ 1-Tubulin-Expression zu finden, wohingegen an E10 eine maximale Expression von T $\alpha$ 1-Tubulin zu verzeichnen ist. Zwischen dem postnatalen Tag (P) 3 und P32 sinkt die Expression dann wieder drastisch ab. Ein ähnliches Expressionsprofil kann in der Ratte gefunden werden. Dort finden sich die höchsten Level der T $\alpha$ 1-Tubulin-Expression in späten Entwicklungsstadien des Embryos. Innerhalb von drei Wochen nach Geburt vermindert sich die Expression dann deutlich (Przyborski und Cambray-Deakin 1996; Miller *et al.* 1987). Auch Studien an Fischen konnten zeigen, dass es während der Embryonalentwicklung zu einer hohen T $\alpha$ 1-Tubulin mRNA-Expression kommt, die nach neuronaler Differenzierung wieder abnimmt (Hieber *et al.* 1998). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass in adulten Tieren unterschiedlicher Spezies nach einem axonalen Schaden eine Induktion der T $\alpha$ 1-Tubulin-Expression erfolgt (Hieber *et al.* 1998; Miller *et al.* 1989). Nach Reinnervation sinkt die T $\alpha$ 1-Tubulin-Expression dann wieder auf basale Level ab (Miller *et al.* 1989). In der adulten Ratte kann durch NGF die Expression von T $\alpha$ 1-Tubulin mRNA in intakten sympathischen Neuronen induziert werden (Mathew und Miller 1990). Eine erhöhte T $\alpha$ 1-Tubulin-Expression ist auch als Antwort auf einen gesteigerten exzitatorischen Input in Körnerzellen des Gyrus dentatus zu finden (Causing *et al.* 1996).

Transgene Mäuse, die LacZ unter der Kontrolle des  $T\alpha 1$ -Tubulin Promoters exprimieren, konnten zusätzlich Einblick in die Dynamik der  $T\alpha 1$ -Expression liefern (Gloster *et al.* 1994). Diese Daten bestätigen die selektive Expression von  $T\alpha 1$ -Tubulin in Neuronen. Das Transgen wird in diesen Tieren vermehrt im sich entwickelnden ZNS exprimiert. Die Expression beginnt an Tag E9.5 im Vorder- und Mittelhirn sowie im Rhombencephalon (Gloster *et al.* 1994). Innerhalb des sich entwickelnden Neocortex erscheint die erste  $\beta$ -Galactosidase-Expression nach E12.5 (Gloster *et al.* 1999). Am Tag E13.5 kann das Transgen in allen Bereichen des sich entwickelnden ZNS (Gehirn, Rückenmark und Retina) detektiert werden. Innerhalb des PNS wird das Transgen von sympathischen, parasympathischen und sensorischen Ganglienzellen exprimiert (Gloster *et al.* 1994). Im Gehirn von adulten Tieren wird die  $T\alpha 1$ -LacZ-Expression herunter reguliert und kann nur noch an wenigen Stellen, wie z.B. im Hippocampus, gefunden werden (Gloster *et al.* 1994). Dieses Expressionsmuster ähnelt stark dem  $T\alpha 1$ -Tubulin mRNA-Expressionsprofil, das in Wildtyp-Mäusen zu finden ist. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass  $T\alpha 1$ -Tubulin in sich entwickelnden Neuronen stark exprimiert und nach neuronaler Differenzierung und Zielkontakt wieder herunter reguliert wird. Im Rahmen reaktiver Veränderungen kommt es zu einer erneuten Induktion der  $T\alpha 1$ -Tubulin-Expression.

Wie in den vorangegangenen Studien an Primärzellen konnte in der vorliegenden Arbeit eine exklusive Expression von  $T\alpha 1$ -EGFP in ES Zell-abgeleiteten Neuronen nachgewiesen werden. So wurden in undifferenzierten,  $T\alpha 1$ -EGFP-transfizierten ES Zellen, EBs oder während der Anreicherung von neuronalen Vorläuferzellen im ITSFn-Stadium keine EGFP-positiven Zellen gefunden. Multipotente neurale Vorläuferzellen, die in FGF2 proliferierten, waren ebenfalls zum größten Teil EGFP-negativ. Erst nach *in vitro* Differenzierung, die durch Wachstumsfaktorentzug induziert wurde, stieg die Anzahl an  $T\alpha 1$ -EGFP-exprimierenden Zellen stark an. Eine maximale Expression von  $T\alpha 1$ -EGFP war an Tag 5 nach Wachstumsfaktorentzug zu verzeichnen. In Langzeitkulturen nahm die  $T\alpha 1$ -EGFP-Expression hingegen wieder ab (**Abb. 10**). Die hier gefundene Dynamik der  $T\alpha 1$ -EGFP-Expression differenzierender ES Zellen rekapituliert somit das Expressionsmuster von  $T\alpha 1$ -Tubulin *in vivo* (Gloster *et al.* 1999, 1994; Miller *et al.* 1989; Hieber *et al.* 1998; Przyborski und Cambrey-Deakin 1996).

Zur weiteren Überprüfung der neuronal-spezifischen Expression und zum Ausschluss der Expression des Transgens in glialen Zellen wurden die  $T\alpha 1$ -EGFP-positiven ES Zellen in ein gliales Vorläuferzell-Stadium überführt. Dazu wurden die neuronalen Vorläuferzellen (N3FL Kulturen) weiter in einem Medium mit FGF2 und EGF propagiert (N3EFL Kulturen) und durch anschließenden Wachstumsfaktorentzug zu Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert. Es konnte keine Immunreaktivität gegen GFAP oder O4 in

EGFP-positiven Zellen gefunden werden. Selten konnte eine Doppelmarkierung T $\alpha$ 1-EGFP-positiver Zellen mit A2B5, einem Marker der typischerweise in glialen Vorläuferzellen vorkommt, detektiert werden. Eisenbarth *et al.* (1979) haben jedoch beschrieben, dass A2B5 nicht nur in glialen Vorläuferzellen zu finden ist. In der Maus ist A2B5 ein Epitop, das ebenfalls auf neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird. So isolierten Mujtaba *et al.* (1999) A2B5-immunreaktive Mauszellen durch Immunopanning und konnten zeigen, dass eine kleine Fraktion dieser Zellen  $\beta$ -III Tubulin exprimiert. Die hier generierten Daten bestätigen daher insgesamt die im Vorfeld an Primärzellen erhobenen Befunde zur exklusiven Expression von T $\alpha$ 1-Tubulin in Neuronen.

#### 4.1.2 Charakterisierung der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone

Die T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone wurden unter Verwendung verschiedener neuronaler Marker näher charakterisiert. Das hohe Maß an Doppelmarkierung T $\alpha$ 1-EGFP-positiver Zellen mit Antikörpern gegen Doublecortin,  $\beta$ -III Tubulin, MAP2abc und NeuN unterstützt die These, dass T $\alpha$ 1-EGFP auch junge Neurone zuverlässig markiert. Es handelt sich bei Doublecortin,  $\beta$ -III Tubulin, MAP2abc und NeuN um Marker, die bereits früh während der neuronalen Differenzierung exprimiert werden (Gleeson *et al.* 1999; Francis *et al.* 1999; Przyborski und Cambray-Deakin 1995; Mullen *et al.* 1992; Lee *et al.* 1990; Matus 1990; Izant und McIntosh 1980). Der Vergleich der T $\alpha$ 1-EGFP-negativen mit der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Population zeigt, dass in der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Population eine signifikant erhöhte Expression aller neuronalen Marker zu verzeichnen war (**Abb. 11**), was ebenfalls auf die neuronale Identität der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen zurückzuführen ist. Eine selektive Anreicherung unreifer Doublecortin-positiver Neurone wurde jedoch nicht beobachtet.

Überraschenderweise zeigte auch an Tag 5 nach Wachstumsfaktorentzug, d.h. zum Zeitpunkt der maximalen T $\alpha$ 1-EGFP-Expression, nur eine kleine Fraktion der ES Zell-abgeleiteten Neurone EGFP-Fluoreszenz. Hierbei stellte sich die Frage, ob T $\alpha$ 1-EGFP nur von Neuronen eines bestimmten Entwicklungsstadiums exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung für den geringen Prozentsatz der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen wäre ein sehr kurzes Zeitfenster der Genexpression. Diese Erklärung würde auch von den *in vivo* Daten unterstützt werden, in denen es zur Abnahme der T $\alpha$ 1-Tubulin-Expression nach neuronaler Differenzierung kommt. In diesem Fall wäre T $\alpha$ 1-EGFP nur in Neuronen zu finden, die frühe neuronale Marker wie  $\beta$ -III Tubulin oder MAP2abc exprimieren. Jedoch zeigten die T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Neurone ebenfalls die Expression von reiferen neuronalen Markern, wie z.B. MAP2ab (**Abb. 11**).

Eine andere Erklärung für die geringe Zahl EGFP-markierter Neurone könnte sein, dass T $\alpha$ 1-EGFP nur von einer Subpopulation von Neuronen exprimiert wird. So könnte T $\alpha$ 1-EGFP bevorzugt in migratorisch aktiven Zellen oder Zellen eines bestimmten Neurotransmitter-Phänotyps, wie z. B. exzitatorischen oder inhibitorischen Neuronen, zu finden sein. Der Vergleich der T $\alpha$ 1-EGFP-negativen mit der T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Population konnte diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Wie bereits oben erwähnt, beinhaltete die T $\alpha$ 1-EGFP-positive Population insgesamt vermehrt Neurone. Ihr war jedoch keine spezifische Subpopulation zuzuordnen. Die EGFP-markierte Population umfasste sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Neurone, die im gleichen Verhältnis zueinander exprimiert wurden, wie dies in der EGFP-negativen Population der Fall war (**Abb. 11**). Auch für eine bevorzugte Expression von EGFP in Doublecortin-positiven Neuronen, welche einen unreifen, migratorischen Phänotyp repräsentierten, ergab sich kein Anhalt (**Abb. 11**). Zusammenfassend repräsentiert die T $\alpha$ 1-EGFP-positive Population ein breites Spektrum neuronaler Phänotypen. Eine Anreicherung spezifischer neuronaler Subtypen etwa im Hinblick auf Neurotransmitter-Expression oder bestimmte Reifungsstadien war nicht zu verzeichnen.

Prinzipiell könnte die geringe T $\alpha$ 1-EGFP-Expression innerhalb der neuronalen Population auch damit zusammenhängen, dass die hier verwendete T $\alpha$ 1-Tubulin Sequenz nicht alle regulatorischen Abschnitte enthält, die für die Expression von T $\alpha$ 1-Tubulin während der normalen Entwicklung notwendig und wichtig sind. Es könnten zusätzliche Enhancer-Regionen erforderlich sein, die ober- und unterhalb der verwendeten T $\alpha$ 1-Tubulin Sequenz liegen, um ein Wildtyp-ähnliches Expressionsmuster zu erhalten. Da die Integration ungerichtet erfolgte, könnte die Plasmid-DNA auch unter die Kontrolle eines stärkeren Promotors gelangt sein, der die Expression des T $\alpha$ 1-EGFP-Transgens negativ beeinflusst. Da die Anzahl T $\alpha$ 1-EGFP-positiver Zellen in mehreren Klonen nur einen Bruchteil der neuronalen Population darstellte, scheint diese Beobachtung nicht Klon-spezifisch und damit diese Interpretation eher unwahrscheinlich zu sein.

#### 4.1.3 Effizienz der T $\alpha$ 1-EGFP-basierten Lineage-Selektion

Obwohl das T $\alpha$ 1-EGFP-Transgen nur in einem kleinen Teil der ES Zell-abgeleiteten Neurone exprimiert wurde, war auf Grundlage der EGFP-Fluoreszenz eine effiziente Selektion von Neuronen möglich. Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass durch die Kombination von gerichteter Differenzierung und Lineage-Selektion neuronale Populationen in hoher Reinheit gewonnen werden können. Immunfluoreszenz-Analysen EGFP-positiver Zellen ergaben, dass  $98,5 \pm 0,5\%$  der FACS-sortierten Zellen den neuronalen Marker  $\beta$ -III Tubulin exprimierten (**Abb. 12B**). Parallel präparierte, aber nicht der FACS-Sortierung

unterworfenen Zellpopulationen wiesen hingegen nur  $82,7 \pm 4,4\%$   $\beta$ -III Tubulin-positive Zellen auf. Dies bedeutet einen Anstieg von 15,8%. Zuvor nicht passagierte und in eine Einzelzellsuspension überführte Kulturen wiesen sogar nur  $44,3 \pm 9,3\%$   $\beta$ -III Tubulin-positive Zellen auf. Letztere Beobachtung spricht dafür, dass das Vereinzeln in Clustern wachsender, noch unreifer Nestin-positiver Zellen einen starken Differenzierungsstimulus darstellt. Die Analyse der FACS-sortierten Zellen zeigte, dass bereits 17 h nach Plattieren die ersten kleinen Fortsätze ausgebildet wurden (**Abb. 12C**). Diese sortierten Zellen lassen sich somit für weitere Zellkulturexperimente einsetzen.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass  $T\alpha 1$ -EGFP einen robusten und vielseitigen Marker darstellt, um Neurone aus differenzierenden ES Zellkulturen zu isolieren. Die Selektion von  $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen bringt eine reine neuronale Population hervor, die noch unreif genug erscheint, um mit ihr weiterführende Zellkulturexperimente durchführen zu können.

Eine effiziente neuronale Anreicherung, basierend auf der Selektion  $T\alpha 1$ -EGFP-positiver Zellen, konnte in der Vergangenheit schon am Gehirngewebe demonstriert werden. Sawamoto *et al.* (2001) generierten transgene Mäuse, die EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) unter dem  $T\alpha 1$ -Tubulin Promotor exprimierten. Aus E12,5 transgenen Mäusen wurden Gehirnkulturen hergestellt. Nach Fluoreszenz-basierter Lineage-Selektion konnten neuronale Populationen in einer Reinheit von 94,2% gewonnen werden. Wang *et al.* (1998) transfizierten Zellen, die aus dem Vorderhirn von E14 Ratten gewonnen wurden, mit einem  $T\alpha 1$ -EGFP Konstrukt. Über 65% der Zellen exprimierten 16 h nach FACS-Sortierung den neuronalen Marker  $\beta$ -III Tubulin. Zellen, die aus der Subventrikularzone adulter Ratten gewonnen wurden, konnten nach FACS-Sortierung zu neuronalen Populationen in einer Reinheit von  $69,9 \pm 3,5\%$  angereichert werden (Wang *et al.* 2000). Auch aus Zellpopulationen, die aus adulten humanen Gehirngeweben wie dem Hippocampus und der Ventrikularzone hergestellt wurden, konnten neuronale Populationen mit hohen Reinheitsgraden isoliert werden (Roy *et al.* 2000a, 2000b). So exprimierten  $73,2 \pm 6,6\%$  der aus dem Hippocampus gewonnenen Zellen nach Transfektion mit einem  $T\alpha 1$ -EGFP-Expressionskonstrukt und anschließender FACS-Sortierung  $\beta$ -III Tubulin. Die hier vorgestellten Daten weiten die an Primärzellen erzielten Ergebnisse auf ES Zell-abgeleitete neuronale Vorläuferzellen aus. Wie an den mit Primärzellen durchgeführten Studien zeigte auch bei den ES Zell-abgeleiteten Neuronen nur eine kleine Fraktion eine EGFP-Fluoreszenz. Da die mit dem beschriebenen Verfahren gewonnenen neuronalen Populationen EGFP-markiert sind, stellen sie eine geeignete Spenderquelle dar, um die Integration von Neuronen nach Transplantation zu untersuchen.

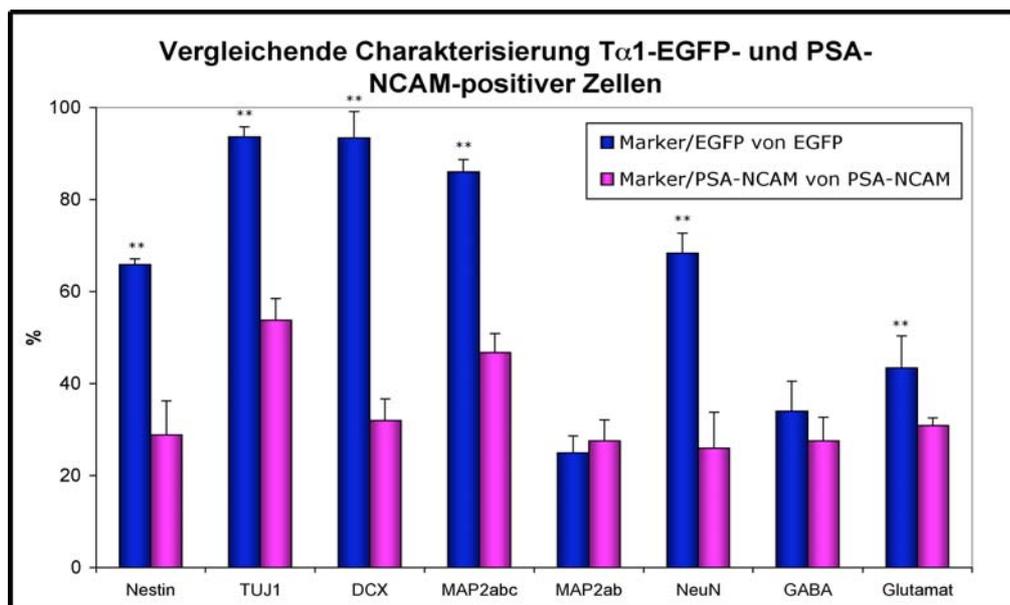
#### 4.1.4 Vergleich mit anderen Lineage-Selektions-Verfahren zur Gewinnung ES Zell-abgeleiteter Neurone

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Lineage-Selektions-Strategien vorgestellt, die die Anreicherung ES Zell-abgeleiteter Neurone mit unterschiedlichen selektierbaren Markern ermöglichten. Oberflächenmarker wie die polysialysierte Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM (polysialic acid - neural cell adhesion molecule; PSA-NCAM) wurden in der Vergangenheit benutzt, um Neurone aus gemischten neuronalen Populationen zu isolieren. Mujtaba *et al.* (1999) konnten neuronale Populationen über PSA-NCAM-Immunopanning aus ES Zellen der Maus gewinnen. Dazu wurden EBs zur Induktion der neuronalen Differenzierung mit Retinsäure behandelt. Carpenter *et al.* (2001) isolierten PSA-NCAM-positive Zellen über Immunopanning oder MACS (Magnetic-activated cell sorting) aus humanen ES Zellen. Dies resultierte in einer Anreicherung von neuronalen Vorläuferzellen. In der sortierten Fraktion zeigten  $86\pm 6\%$  der Zellen PSA-NCAM-Immunoreaktivität. Eine Subpopulation der PSA-NCAM-positiven Zellen ließ sich mit Antikörpern gegen  $\beta$ -III Tubulin oder MAP2 doppelmarkieren. Eine Zellzählung ergab, dass  $25\pm 4\%$  der Zellen MAP2-positiv waren.

Eigene in dieser Schrift nicht aufgeführte und in Zusammenarbeit mit Eybe Meents durchgeführte Arbeiten belegen, dass die Lineage-Selektion mit PSA-NCAM-Antikörpern ebenfalls eine Anreicherung ES Zell-abgeleiteter Neurone erlaubt. Hierbei wurden über Immunopanning-Verfahren neuronale Populationen in einer Reinheit von  $95,3\pm 0,9\%$  erzielt (Schmandt *et al.* 2004a, Manuskript in Vorbereitung). Zieht man das weite Expressionsspektrum von PSA-NCAM in Betracht, ist es verwunderlich, dass PSA-NCAM-Immunopanning zu einer hoch aufgereinigten neuronalen Population führt. Bekanntermaßen ist PSA-NCAM ein Antigen, das nicht nur in neuronalen Zellen zu finden ist (Muller-Rover *et al.* 1998; Gerety und Watanabe 1997; Husmann *et al.* 1989). Innerhalb des ZNS ist PSA-NCAM auf neuronalen wie auch glialen Zelltypen und deren Vorläuferzellen zu finden (Minana *et al.* 1998; Seki und Arai 1993). Die effiziente PSA-NCAM-basierte Aufreinigung beruhte auf der Verwendung eines spezifischen neuronalen Differenzierungsprotokolls und der Tatsache, dass in der frühen Phase der ES Zell-Differenzierung die PSA-NCAM-Expression fast ausschließlich auf neuronale Zellen beschränkt ist. In späteren Stadien der *in vitro* Differenzierung konnte eine PSA-NCAM-Expression in oligodendroglialen Vorläuferzellen gefunden werden (Glaser *et al.* 2004, Manuskript in Vorbereitung).

Ein Vergleich beider Lineage-Selektions-Strategien weist Vorteile für beide Methoden auf. So führt die Fluoreszenz-basierte Lineage-Selektion von  $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen zu höheren Reinheitsgraden als das PSA-NCAM-Immunopanning ( $98,5\pm 0,5\%$  versus  $95,3\pm 0,9\%$ ; Schmandt *et al.* 2004a, Manuskript in

Vorbereitung). Zudem sind die selektionierten  $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen noch unreif genug, um mit ihnen weiterführende Zellkulturexperimente durchführen zu können. Auch bietet die Markierung mit EGFP die Möglichkeit, die Integration und elektrophysiologischen Eigenschaften der ES Zell-abgeleiteten Neurone nach Transplantation zu untersuchen. Hingegen werden durch das PSA-NCAM-Immunopanning Neurone eines geringfügig früheren Entwicklungsstadiums isoliert (**Abb. 21**; Schmandt *et al.* 2004a, Manuskript in Vorbereitung). Des Weiteren müssen durch den hohen Anteil an PSA-NCAM-positiven Zellen zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug ( $70,2\pm 2,0\%$ ; Schmandt *et al.* 2004a, Manuskript in Vorbereitung) weniger Zellen eingesetzt werden, um ausreichend Zellen nach Selektion zur Verfügung zu haben. Da beim PSA-NCAM-Immunopanning die Zellen nur epigenetisch markiert werden, bergen sie ein geringeres Risiko in Bezug auf eine neoplastische Transformation. Dies ist besonders bedeutend, sollten die Zellen für weiterführende Transplantationen benutzt werden.



**Abb. 21:** Vergleichende Darstellung der Expression neuraler Marker in  $T\alpha 1$ -EGFP- (blau) und PSA-NCAM-positiven (magenta) Zellen in drei Tage differenzierten N3FL Kulturen. Die  $T\alpha 1$ -EGFP-positive Zellpopulation zeigt einen reiferen Phänotyp. Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SEM ausgedrückt und resultieren aus einem Minimum von drei unabhängigen Experimenten für jeden Marker. TUJ1,  $\beta$ -III Tubulin, DCX, Doublecortin

Wernig *et al.* (2002) wählten für die Lineage-Selektion von Neuronen Tau-EGFP Knock-in ES Zellen. Diese ES Zellen zeigten eine neuronal-spezifische Expression des EGFP-Proteins (Wernig *et al.* 2002; Tucker *et al.* 2001). Die Tau-EGFP Knock-in ES Zellen wurden zu multipotenten neuronalen Vorläuferzellen angereichert und durch Wachstumsfaktorentzug zu Neuronen differenziert. Anders als  $T\alpha 1$ -EGFP wird Tau-EGFP erst spät während der neuronalen Differenzierung exprimiert. So stieg die Tau-EGFP-Expression bis acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug kontinuierlich an. Acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug exprimierten 95% der Neurone das Tau-EGFP-Transgen. Ein BrdU-Assay, der

zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurde, zeigte, dass es sich bei den EGFP-markierten Zellen ausschließlich um postmitotische Neurone handelte. Über FACS-Sortierung war eine Selektion dieser postmitotischen Neurone möglich. Dies führte zu einer Reinheit von  $93,7 \pm 2,3\%$   $\beta$ -III Tubulin-positiver Zellen. Verglichen mit  $T\alpha 1$ -EGFP werden durch die Wahl dieses Markers reifere Neurone isoliert. Auch ist die Effizienz dieser Methode niedriger als die Selektion über  $T\alpha 1$ -EGFP.

Li *et al.* (1998) benutzten eine bifunktionale Selektionsstrategie, um neurale Vorläuferzellen zu isolieren. Sie integrierten durch homologe Rekombination das Marker/Reporter Gen  $\beta$ -geo ( $\beta$ -Galactosidase-Neomycin-Phosphotransferase) den Sox2 Locus. Sox2 ist vorwiegend in unreifen, undifferenzierten Zellen des Neuroepithels des gesamten ZNS exprimiert (Collignon *et al.* 1996; Uwanogho *et al.* 1995). Nach Retinsäure-induzierter Differenzierung der ES Zellen konnten Sox2-exprimierende neurale Vorläuferzellen effizient durch die Selektion mit G418 isoliert werden (Li *et al.* 1998). Nach Selektion zeigten  $91,0 \pm 2,6\%$  der Zellen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität und  $95,5 \pm 1,1\%$  Expression von Sox2. Nach 96 h ohne mitogene Stimulation hatten die selektionierten Zellen ein Netzwerk von Neuronen gebildet. Die Markierung dieser Zellen mit Antikörpern gegen Neurofilament, Synaptophysin, MAP2, Tau und  $\beta$ -III Tubulin ergab, dass 90% der isolierten Zellen Neurone waren. Gleichzeitig war eine Abnahme der Sox2-Expression zu verzeichnen. Anders als bei der Lineage-Selektion durch  $T\alpha 1$ -EGFP wurden mit dieser Methode nicht gezielt Neurone, sondern neurale Vorläuferzellen isoliert, die anschließend zu einem gewissen Prozentsatz in Neurone differenzierten.

Zusammengefasst stellt die in dieser Arbeit beschriebene  $T\alpha 1$ -EGFP-basierte Lineage-Selektion im Vergleich zu anderen Strategien eine sehr effiziente Methode dar, um Neurone aus differenzierenden ES Zellkulturen zu isolieren.

## 4.2 Untersuchung von ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in hippocampalen Schnittkulturen

### 4.2.1 Organotypische Schnittkulturen als *in vitro* Modell für die neurale Transplantation

Organotypische, hippocampale Schnittkulturen stellen ein dreidimensionales Modellsystem des ZNS Gewebes dar, das in den letzten Jahren vermehrt zur Untersuchung einer Vielzahl von entwicklungsbiologischer und Krankheits-assoziierten Fragestellungen herangezogen wurde (Ullrich *et al.*

2001; Gähwiler *et al.* 1997; McKinney *et al.* 1997). Mittlerweile erlaubt diese Methode die Kultivierung von vitalen und funktionell aktiven hippocampalen Schnittkulturen unter serumfreien Bedingungen (Scheffler, Schmandt *et al.* 2003). Auch nach fünf Wochen bleiben die Histologie des Gewebes und insbesondere die darin enthaltenen neuronalen Zellverbände erhalten (Scheffler, Schmandt *et al.* 2003; **Abb. 6B**; Einschub in **Abb. 6B**; **Abb. 6C, D**). Eingesetzt als Empfängergewebe, erlaubt dieses Kultursystem die genaue Untersuchung der Inkorporation, Differenzierung und Funktionalität von transplantierten neuronalen Vorläuferzellen. ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen, die auf die Oberfläche der Schnittkultur deponiert wurden, wanderten schnell in die Präparation ein und migrierten horizontal im Gewebe (**Abb. 14A, B**). Zwei Wochen nach Transplantation ließ die Migrationsaktivität nach und postmitotische Spenderzellen mit komplexen dreidimensionalen Morphologien konnten in unterschiedlichen Tiefen der Schnittpräparation gefunden werden (Einschub **Abb. 14B**; **Abb. 14C**). Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass die inkorporierten bipotenten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in astrogliale und oligodendrogliale Phänotypen ausreifen (**Abb. 14C-G**). Somit lieferte dieses Modell die optimalen Voraussetzungen für die funktionelle Analyse von transplantierten Vorläuferzellen.

#### 4.2.2 Funktionelle Ausreifung der transplantierten ES Zell-abgeleiteten Gliazellen

Brüstle *et al.* (1999a) konnten bipotente gliale Vorläuferzellen mit hoher Effizienz aus murinen ES Zellen gewinnen. Diese Zellen proliferieren in der Gegenwart von FGF2 und EGF und differenzieren nach Wachstumsfaktorentzug in Astrozyten und Oligodendrozyten aus. Dies konnte auch für die mit dem CMV-EGFP Konstrukt stabil transfizierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen dokumentiert werden (**Abb. 13**). Für ES Zell-abgeleitete Oligodendrozyten wurde im Vorfeld gezeigt, dass sie nach Transplantation in Myelin-defiziente Ratten morphologisch Myelin bilden können (Brüstle *et al.* 1999a). Hingegen blieben die funktionellen Eigenschaften von transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen ungeklärt. Während der normalen Entwicklung machen differenzierende Astrozyten eine charakteristische Wandlung in der Expression von Ionenkanälen durch (Kressin *et al.* 1995). In unreifen Astrozyten sind vorwiegend spannungsabhängige  $K^+$ -Ströme zu finden, wohingegen einwärts-gerichtete  $K^+$ -Ströme ( $I_{Kir}$ ) und Hintergrund Ströme ( $I_{(P)}$ ) in reiferer Glia exprimiert werden (Bordey *et al.* 2001; Verkhratsky und Steinhäuser 2000). Daten von Dr. Wolfgang Schröder belegen, dass ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen aus Monolayer-Kulturen nur spannungsabhängige  $K^+$ -Ströme aufweisen. Auch nach *in vitro* Differenzierung durch Wachstumsfaktorentzug konnten keine  $I_{Kir}$  und  $I_{(P)}$  hervorgerufen werden. Erst nach Inkorporation in die hippocampale Schnittkultur exprimierte die Mehrheit der EGFP-markierten Spenderzell-abgeleiteten Astrozyten prominente  $I_{Kir}$  oder  $I_{(P)}$  (Scheffler, Schmandt *et al.* 2003). Diese Daten weisen auf eine funktionelle Reifung von transplantierten glialen Vorläuferzellen

im Empfängergewebe hin. Sie zeigen, dass ES Zell-abgeleitete Astrozyten sequentiell verschiedene funktionelle Phänotypen annehmen, wie sie auch *in vivo* existieren (Matthias *et al.* 2003). Die Abwesenheit von I<sub>Kir</sub> und I<sub>(P)</sub> während der *in vitro* Kultivierung verdeutlicht, dass eine volle funktionelle Ausreifung der ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen von zusätzlichen Umgebungsfaktoren innerhalb des Empfängergewebes abhängt. Diese Hypothese wird auch durch Befunde zur Expression oligodendrogialer Marker gestützt. So fanden sich in Monolayer-Kulturen acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug  $16,6 \pm 1,5\%$  CNPase-positive Zellen. Dahingegen exprimierten zwei Wochen nach Transplantation in die Schnittkultur  $30,3 \pm 9,8\%$  der transplantierten Zellen CNPase.

#### 4.2.3 Integration der transplantierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in das endogene Gliazellnetzwerk

*In vivo* sind Astrozyten durch Gap Junctions miteinander verbunden und bilden so ein ausgedehntes Netzwerk (Giaume und McCarthy 1996). Die Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen hippocampalen Astrozyten wird graduell während der postnatalen Entwicklung angelegt (Konietzko und Müller 1994; Binmöller und Müller 1992). Dieses Phänomen ist auch in der hippocampalen Schnittkultur zu finden, in der endogene Astrozyten während der Kulturzeit mit einer größeren Anzahl weiterer Astrozyten Gap Junctions ausbilden. Überraschend ist, dass in verschiedene Regionen des hippocampalen Gewebes eingebrachte ES Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen eine erstaunliche Kapazität besaßen, in diese Netzwerkstruktur zu integrieren (Scheffler, Schmandt *et al.* 2003). Die funktionelle Kopplung zwischen Spender- und Wirtszellen wurde durch Injektion von LY in einzelne Spenderzell-abgeleitete Astrozyten nachgewiesen (Scheffler, Schmandt *et al.* 2003; **Abb. 15A, B**) Während der Injektion einer einzelnen Spenderzelle verteilte sich LY üblicherweise zuerst in ein bis zwei benachbarte Wirtszellen, bevor es in räumlich weiter entfernte Glia vordrang. Dies legt den Schluss nahe, dass die Kopplung mit ein oder zwei Wirtszellen ausreicht, um die Spenderzelle in das bereits bestehende Wirts-Glia Netzwerk zu integrieren. Die Komplexität der Kopplung zwischen Spenderzellen und Wirtsgewebe war vergleichbar mit der zwischen endogenen Zellen beobachteten (Scheffler, Schmandt *et al.* 2003). Ein wesentlicher Bestandteil von astrozytären Gap Junctions ist Connexin43 (Cx43; Theis *et al.* 2003; Rash *et al.* 2001). In der Tat konnte Cx43 Immunreaktivität an Kontaktzonen zwischen inkorporierten Spenderzell- und benachbarten Wirtszell-Fortsätzen detektiert werden (**Abb. 15C-F**; Scheffler, Schmandt *et al.* 2003). Eine Kopplung zwischen ES Zell-abgeleiteten Astrozyten und Neuronen des Wirtsgewebes, wie bei Rash *et al.* (2001) und Alvarez-Maubecin *et al.* (2000) beschrieben, ließ sich hingegen nicht nachweisen. Dennoch ist die Spekulation berechtigt, dass die transplantierten Glia-Vorläuferzellen auch mit ortsständigen Neuronen kommunizieren. Diese Kommunikation erfolgt aber

womöglich auf anderen Wegen als über Gap Junctions. Es ist zurzeit noch völlig unklar, ob und in welchem Ausmaß die integrierten ES Zell-abgeleiteten Astrozyten funktionelle Veränderungen in den endogenen Gliazellen induzieren und ob sie die Funktion von Wirts-Neuronen beeinflussen.

Die Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen Spenderzelle und Wirts-Glia eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung Transplantations-basierter Therapiestrategien. Die Einführung von transgenen Astrozyten in das Netzwerk des Wirtsgewebes könnte es erlauben, kleine, fremde Moleküle in große Areale des ZNS einzuschleusen. Durch die Manipulation des glialen Netzwerkes könnten damit langfristig auch neuronale Funktionen modifiziert werden.

#### 4.2.4 Vor- und Nachteile der organotypischen Schnittkultur

Der Einsatz von organotypischen Schnittkulturen als ‚*in vitro* Transplantationsmodell‘ eröffnet eine Reihe von Vorteilen. Im Gegensatz zu *in vivo* Transplantationen erlauben organotypische Schnittkulturen Beobachtungen und den direkten experimentellen Zugriff auf Migration und Integration der Spenderzellen. Auch kleine Zellzahlen können präzise unter dem Mikroskop in die gewünschte Region platziert werden. Durch den *ex vivo* Ansatz ist es möglich, immunologische Probleme zu umgehen. Dadurch wird die Analyse von allogenen und xenogenen Spenderzellen erleichtert. Des Weiteren können in diesem Modell Spenderzellen und Wirtsgewebe aus verschiedenen genetischen Hintergründen konfrontiert werden. Als reduktionistisches Modell hat dieses Paradigma jedoch auch Grenzen. Da die Spenderzellen lediglich auf der Oberfläche der Schnittkultur deponiert werden, reduziert sich die Analyse auf die Zellen, die innerhalb von 48 h in die Schnittkultur einwandern. Daher könnten unter Umständen mehr differenzierte Zellen mit reduziertem Migrationspotential der Analyse entgehen.

In den durchgeführten Schnittkultur-Versuchen wurden vorwiegend die Eigenschaften von ES Zell-abgeleiteten Astrozyten untersucht. Die morphologischen Daten und die Expression von MBP durch inkorporierte Spenderzellen weisen jedoch darauf hin, dass dieses Modell prinzipiell auch für Untersuchungen von Oligodendrozyten-Axon-Interaktionen sowie für die funktionelle Analyse von durch Spenderzellen myelinisierten Axonen herangezogen werden kann. Da der postnatale Hippocampus jedoch nur spärlich myelinisierte Faserbahnen enthält (die auch unter diesen Kulturbedingungen zu finden sind; siehe auch Berger und Frotscher 1994), wären Schnittkulturen aus anderen Gehirnregionen wie dem Cerebellum eher geeignet, diese Fragestellungen zu beantworten (Dusart *et al.* 1997; Seil 1989).

Trotz des guten Gewebeerhalts und der funktionellen Integrität des Schnittkulturgewebes können die an diesem Modell gewonnenen Daten nicht auf *in vivo* Bedingungen übertragen werden. So können z.B. Faktoren, die von reaktiven oder proliferierenden Astro- oder Mikrogliazellen gebildet werden, die Interpretation der in Schnittkulturen gewonnenen Daten erschweren. Eine weitere Variable stellt die Reorganisation neuronaler Subpopulationen dar (Hailer *et al.* 1996; Derouiche *et al.* 1993; Caesar und Aertsen 1991; Del Rio *et al.* 1991). Aus diesen Gründen können an Schnittkulturen gewonnene Befunde nur als Annäherung an die *in vivo* Situation interpretiert werden.

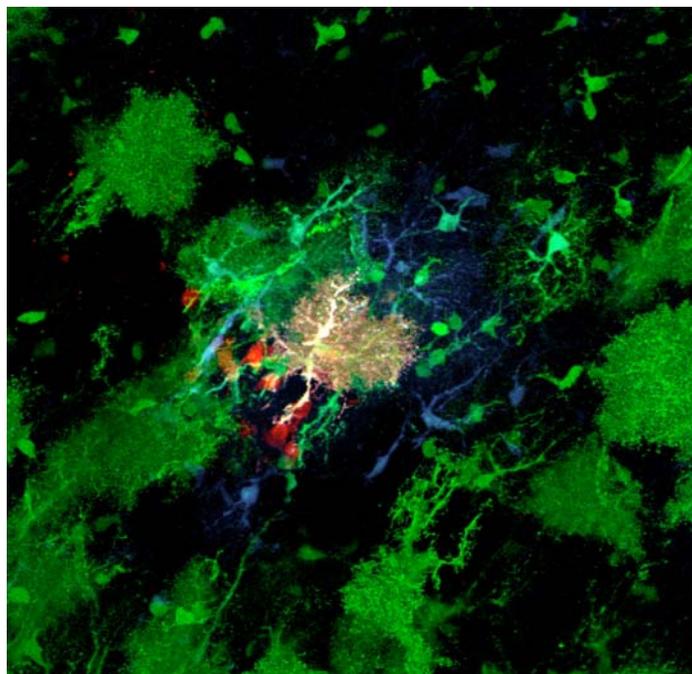
### 4.3 Untersuchung von ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläufern nach *in vivo* Transplantation

Die morphologischen und funktionellen Eigenschaften von ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen wurden nach Transplantation in den Hippocampus von vier Wochen alten Ratten untersucht. Die ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen inkorporierten bevorzugt im Bereich der hippocampalen Fissur und der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, in der sie ortsansässige Neurone verdrängten (**Abb. 17A-C**). Die Zellen überlebten bis zu drei Wochen nach Transplantation (**Abb. 17D**) und differenzierten in Astrozyten und Oligodendrozyten aus (**Abb. 18A-C**). Nur wenige Zellen blieben Nestin-positiv (**Abb. 18D**). Obwohl die Zellen bevorzugt in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus einwanderten, einem Ort, an dem adulte Neurogenese stattfindet, konnte keine Induktion neuronaler Marker gefunden werden (**Abb. 18E, F**). Eine wichtige Beobachtung ist, dass in den Transplantaten keine Tumorinduktion beobachtet werden konnte. Dies und die ausschließliche gliale Differenzierung bestätigen den hohen Reinheitsgrad dieser Population.

In Kooperation mit Kerstin Hüttmann und Dr. Claudia Krebs durchgeführte elektrophysiologische Ableitungen ergaben, dass die inkorporierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen in distinkte funktionelle Phänotypen segregierten, wie sie auch zum Teil in nativer Glia zu finden sind (Matthias *et al.* 2003). So konnten Astrozyten mit transienten und verzögerten auswärts-gleichrichtenden wie einwärts-gleichrichtenden K<sup>+</sup>-Strömen (‚komplexen‘ Strommustern) gefunden werden (**Abb. 19A**); darüber hinaus Strommuster, die diesen ‚komplexen‘ Strommustern ähnelten (**Abb. 19B**). Bei den Zellen, die diese ‚komplex-ähnlichen‘ Strommuster aufwiesen, könnte es sich um Zellen eines geringeren Reifestadiums handeln. Allerdings waren diese Strommuster auch am Ende des Untersuchungszeitraums zu finden. Prominente Zeit- und Spannungs-unabhängige ‚passive‘ Strommuster konnten vermehrt zu späteren

Untersuchungszeitpunkten gefunden werden (**Abb. 19C**). Oligodendrozyten-ähnliche Zellen mit fast symmetrischen auswärts- und einwärts-K<sup>+</sup>-Strömen waren zu frühen und späten Untersuchungszeitpunkten (7 bis 21 Tage nach Transplantation) nachweisbar (**Abb. 19D**).

Zum Nachweis der Kopplung wurden die Zellen bei der Patch-clamp Analyse mit einem Texas-red-Dextran/Biocytin-Cocktail gefüllt. Dabei fiel auf, dass die überwiegende Zahl der Spenderzellen keine Kopplung zeigte. Um einen methodischen Fehler bei den Kopplungsuntersuchungen auszuschließen, wurde Gehirngewebe von GFAP-EGFP-transgenen Mäusen isoliert (Nolte *et al.* 2001; Brenner und Messing 1996) und EGFP-positive Astrozyten elektrophysiologisch untersucht und Texas-red-Dextran/Biocytin gefüllt. Nach Detektion des Biocytins mit einem an Cy5-gekoppelten Streptavidin D wurden diese Zellen konfokal analysiert und dreidimensional rekonstruiert. In **Abb. 22** ist deutlich die Kopplung der Texas-red-Dextran-gefüllten Zelle mit mehreren endogenen Zellen des Gehirngewebes zu erkennen. Diese Befunde zeigen die Validität dieser Methode. Eine immunhistologische Analyse mit einem Antikörper gegen Cx43 ergab ferner, dass transplantierte Zellen eine prominente Cx43-Expression aufweisen (Daten nicht gezeigt). Dies schließt auch die Möglichkeit aus, dass die fehlende Kopplung Folge einer mangelnden Cx43-Expression war. Die fehlende Kopplung könnte auch auf die eingeschränkte Inkorporation der Zellen zurückzuführen sein. So war die überwiegende Anzahl der



**Abb. 22:** Technik des Kopplungsnachweises. In akuten Schnittpräparaten aus dem Gehirn von GFAP-EGFP-transgenen Mäusen wurde als Kontrolle eine GFAP-EGFP-positive Zelle mit Texas-red-Dextran (rot) und Biocytin (mit Avidin Cy5 entwickelt, blau) gefüllt. Deutlich sind angrenzende gekoppelte Zellen zu finden, die Biocytin über Gap Junctions aufgenommen haben.

Zellen in der hippocampalen Fissur oder der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus zu finden. Eine limitierte Fähigkeit des ausgereiften nicht-läsionierten Hippocampus, transplantierte Zellen zu inkorporieren, könnte auch degenerative Veränderungen der Spenderzellen und die Retraktion deren Fortsätze erklären.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass die gekoppelten Zellen nicht mehr detektierbar sind. *In vivo* sind vorwiegend Astrozyten mit ‚passiven‘ Strommustern an der Kopplung beteiligt. Untersuchungen an Monolayer-Kulturen haben ergeben, dass acht Tage nach Wachstumsfaktorenzug nur noch  $7,8 \pm 0,8\%$  der Zellen EGFP exprimierten (Daten nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass die EGFP-Expression in reifen Astrozyten mit ‚passiven‘ Strommustern herunter reguliert wird und diese Zellen somit einer Analyse entgehen. Da die Zellen durch klonale Selektion generiert und über hohe Passagezahlen in Kultur gehalten wurden, ist es darüber hinaus möglich, dass genetische Aberrationen die Eigenschaften dieser Zellen verändert haben.

Im Gegensatz zu den *in vivo* Beobachtungen war die Kopplung zwischen Spender- und Empfängerzellen in der Schnittkultur sehr effizient. Ein Grund hierfür kann das frühere Entwicklungsstadium der Schnittkultur darstellen, das eine bessere Integration der transplantierten Zellen erlaubt. Zum anderen sind Schnittkulturen reaktiv verändert und daher unter Umständen eher geeignet, neue Zellen in den Verband zu integrieren.

Zukünftige Studien werden prüfen müssen, ob die Transplantation in den sich entwickelnden Hippocampus von neonatalen Ratten oder in ein Läsionsmodell bessere Voraussetzungen für die Integration ES Zell-abgeleiteter Vorläuferzellen bietet.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurde aus pluripotenten ES Zellen durch die Kombination von gerichteter Differenzierung und anschließender FACS-basierter Lineage-Selektion T $\alpha$ 1-EGFP-positiver Zellen hoch aufgereinigte neuronale Zellen gewonnen. Hierzu wurden ES Zellen stabil mit einem neuronal-spezifischen T $\alpha$ 1-EGFP Selektionskonstrukt transfiziert. Die ES Zellen wurden dann mit Hilfe eines speziellen Differenzierungsprotokolls in neurale Vorläuferzellen überführt. Zwei Tage nach Proliferation in einem Medium mit FGF2 konnten die ersten T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen identifiziert werden. Doppelmarkierungen mit neuronalen Markern drei Tage nach Wachstumsfaktorentzug ergaben, dass T $\alpha$ 1-EGFP-positive Zellen eine breite Palette an neuronalen Phänotypen bilden. So exprimierten T $\alpha$ 1-EGFP-positive Zellen reife und unreife neuronale Marker und zeigten eine Expression sowohl inhibitorischer als auch excitatorischer Neurotransmitter. Die *in vitro* Differenzierung zu glialen Vorläuferzellen machte deutlich, dass EGFP weder von Oligodendrozyten noch von Astrozyten exprimiert wurde. Mit Hilfe der FACS-Sortierung gelang es, EGFP- und  $\beta$ -III Tubulin-positiv Neurone bis zu einer Reinheit von  $98,5 \pm 0,5\%$  anzureichern. Diese Daten zeigen, dass T $\alpha$ 1-EGFP ein geeigneter Marker ist, um Neurone aus differenzierenden ES Zellkulturen zu isolieren. Die Selektion von T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen bringt eine reine neuronale Population hervor, die noch unreif genug ist, um weiterführende Zellkulturexperimente anschließen zu können. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde weiten die an Primärzellen erzielten Ergebnisse zur T $\alpha$ 1-EGFP-basierten neuronalen Lineage-Selektion auf ES Zellen aus. Die Markierung derart selektionierter Neurone mit EGFP bietet interessante Perspektiven, die Integration und die elektrophysiologischen Eigenschaften von ES Zell-abgeleiteten Neuronen nach Transplantation im Vitalzustand zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurden Migration, Differenzierung und Integration von proliferierenden glialen Vorläuferzellen im ZNS-Gewebe untersucht. Hierzu wurden hoch aufgereinigte gliale Vorläuferzellen aus ES Zellen hergestellt und zur Visualisierung nach Transplantation mit einem CMV-EGFP Konstrukt stabil transfiziert. Nach Verifizierung des astroglialen und oligodendroglialen Differenzierungspotentials wurden die Zellen auf hippocampalen Schnittkulturen deponiert. Dieses reduktionistische Modell erlaubt eine Echtzeit-Beobachtung und Manipulation der inkorporierten Gliazellen.

Nach Transplantation in hippocampale Schnittkulturen wanderten die auf die Oberfläche deponierten ES Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen zunächst vertikal in das Gewebe ein und verteilten sich danach horizontal über weite Abschnitte der Schnittpräparation. Ein Großteil der Zellen war 14 Tage nach Transplantation in Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert. Dye Coupling Analysen ergaben, dass die Zellen in großem Umfang Gap Junctions zu benachbarten Astrozyten aufbauten und so in das endogene Netzwerk integrierten. Gekoppelte Zellcluster, die aus endogenen und transplantierten Zellen bestanden, wiesen die gleiche Komplexität auf wie Zellcluster, die nur aus endogenen Zellen bestanden (Scheffler, Schmandt *et al.* 2003). In Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Neurobiologie (Prof. Steinhäuser) durchgeführte funktionelle Analysen ergaben, dass anders als in Monolayerkulturen die transplantierten ES Zell-abgeleiteten Astrozyten in der Schnittkultur ‚passive‘ und ‚komplexe‘ Strommuster aufwiesen, wie sie auch in nativen Gliazellen zu finden sind.

Die Ausreifung transplantierte ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in Astrozyten und Oligodendrozyten wurde im weiteren im adulten Hippocampus der Ratte *in vivo* bestätigt. Hierzu wurden die Zellen stereotaktisch in den Hippocampus adulter Ratten transplantiert. Die Zellen bildeten ein komplexes Netzwerk und überlebten mindestens 21 Tage. Sie reiften in Astrozyten und Oligodendrozyten aus, wobei die Astrozyten wie in den Schnittkulturen Subpopulationen mit distinkten morphologischen und elektrophysiologischen Merkmalen ausprägten. Allerdings konnte unter diesen Transplantationsbedingungen keine Gap Junction-vermittelte Kopplung der transplantierten ES Zell-abgeleiteten Astrozyten mit endogenen Gliazellen nachgewiesen werden. Trotz der Integration in das Körnerzellband des Gyrus dentatus, wo auch im adulten Organismus noch Neurogenese beobachtet wird, differenzierten die transplantierten Zellen ausschließlich in Gliazellen aus. Dies und die Tatsache, dass in keinem Transplantat eine Tumorbildung zu verzeichnen war, sprechen für die hohe Reinheit der verwendeten glialen Population.

Insgesamt demonstriert diese Arbeit, dass durch die Kombination einer gerichteten neuronalen Differenzierung mit einer T $\alpha$ 1-EGFP-basierten Lineage-Selektion eine Anreicherung von ES Zell-abgeleiteten *Neuronen* bis zu einer Reinheit von 98,5 $\pm$ 0,5% möglich ist. ES Zell-abgeleitete *gliale* Vorläuferzellen können durch gezielte Differenzierung gewonnen werden und integrieren nach Transplantation in das endogene Netzwerk.

Für zukünftige Untersuchungen stellen die T $\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen ein attraktives Instrument für die funktionelle Untersuchung von Neuronen nach Transplantation dar. Durch die EGFP-Markierung sollte es möglich sein, transplantierte Zellen im Empfängergewebe zu lokalisieren und sie einer intravitalem

---

Untersuchung zuzuführen. Die an hippocampalen Schnittkulturen durch Dye Coupling nachgewiesene Fähigkeit zur Integration in das endogene Gliazellnetzwerk könnte dazu genutzt werden, ES Zell-abgeleitete Gliazellen für den Zell-vermittelten Gentransfer heranzuziehen. Niedermolekulare Substanzen, die von wenigen transplantierten Zellen produziert werden, könnten über Gap Junctions über weite Abschnitte des endogenen Gliazellnetzwerkes verteilt werden. Dies könnte es langfristig ermöglichen, wichtige Funktionen des glialen Netzwerkes, wie z.B. die Ionenpufferung, zu modulieren und damit auch neuronale Funktionen zu beeinflussen.

## 6. Literaturverzeichnis

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* *137*, 433-458

Altman, J. and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* *124*, 319-335

Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 287-293

Alvarez-Maubecin, V., Garcia-Hernandez, F., Williams, J.T., Van Bockstaele, E.J. (2000). Functional coupling between neurons and glia. *J. Neurosci.* *20*, 4091-5008.

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.-P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* *227*, 271-278

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L., Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* *50*, 1691-1697

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev. Biol.* *168*, 342-357

Benninger, Y., Marina, S., Hardegger, R., Weissmann, C., Aguzzi, A., Brandner, S. (2000). Differentiation and histological analysis of embryonic stem cell-derived neural transplants in mice. *Brain Pathol.* *10*, 330-341

Berger, T. and Frotscher, M. (1994). Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus *in situ* and *in vitro*. An immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J. Neurocytol.* *23*, 61-74.

- Binmöller, F.J. and Müller, C.M. (1992). Postnatal development of dye-coupling among astrocytes in rat visual cortex. *Glia* 6, 127-137
- Bjornson, C.R.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C., Vescovi, A.L. (1999). Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283, 534-537
- Blush, J.H., Patience, C., Martin, U. (2002). Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9, 242-251
- Bogler, O., Wren, D., Barnett, S.C., Land, H., Noble, M. (1990). Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2-astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6368-6372
- Bordey, A., Lyons, S.A., Hablitz, J.J., Sontheimer, H. (2001). Electrophysiological characteristics of reactive astrocytes in experimental cortical dysplasia. *J. Neurophysiol.* 85, 1719-1731
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M.V., Keshet, G.I., Blau, H.M. (2000). From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice from adult bone marrow-derived cells. *Science* 290, 1775-1779
- Brenner, M. and Messing, A. (1996). GFAP transgenic mice. *Methods* 10, 351-364.
- Brinster, R.L. (1993). Stem cells and transgenic mice in the study of development. *Int. J. Dev. Biol.* 37, 89-99
- Brüstle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., McKay, R.D.G. (1999a). Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* 285, 754-756
- Brüstle, O. (1999b). Building brains: Neural chimeras in the study of nervous system development and repair. *Brain Pathol.* 9, 527-545
- Brüstle, O., Spiro, A.C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S., McKay, R.D.G. (1997). *In vitro*-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14809-14814

- Brüstle, O., Choudhary, K., Karram, K., Huttner, A., Murray, K., Dubois-Dalcq, M., McKay, R.D.G. (1998). Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nat. Biotech.* *16*, 1040-1044
- Brüstle, O. and McKay, R.D.G. (1996). Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* *6*, 688-695
- Brüstle, O., Maskos, U., McKay, R.D.G. (1995). Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. *Neuron* *15*, 1275-1285
- Caeser, M. and Aertsen, A. (1991). Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *J. Comp. Neurol.* *307*, 87-106.
- Campbell, K., Olsson, M., Bjorklund, A. (1995). Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* *15*, 1259-1273
- Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C.-P., Rao, M.S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp. Neurol.* *172*, 383-397
- Cassidy, R. and Frisen, J. (2001). Neurobiology: Stem cells on the brain. *Nature* *412*, 690-691
- Cattaneo, E. and McKay, R.D.G. (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* *347*, 762-765
- Causing, C.G., Makus, K.D., Ma, Y.L., Miller, F.D., Colmers, W.F. (1996). Selective upregulation of T $\alpha$ 1 a-tubulin and neuropeptide Y mRNAs after intermittent excitatory stimulation in adult rat hippocampus *in vivo*. *J. Comp. Neurol.* *367*, 132-146.
- Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* *288*, 1660-1663
- Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P.N., Lovell-Badge, R. (1996). A comparison of the properties of *Sox-3* with *Sry* and two related genes, *Sox-1* and *Sox-2*. *Development* *122*, 509-20.

- Condorelli, G., Borello, U., De Angelis, L., Latronico, M., Sirabella, D., Coletta, M., Galli, R., Balconi, G., Follenzi, A., Frati, G., Cusella-De Angelis, M.G., Gioglio, L., Amuchastegui, S., Adorini, L., Naldini, L., Vescovi, A., Dejana, E., Cossu, G. (2001). Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 10733-10738
- Damjanov, I. (1993). Teratocarcinoma: Neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *37*, 39-46
- Davies, S.J., Field, P.M., Raisman, G. (1994). Long interfascicular axon growth from embryonic neurons transplanted into adult myelinated tracts. *J. Neurosci.* *14*, 1596-1612
- Davis, A.A. and Temple, S. (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* *372*, 263-266
- Deacon, T., Dinsmore, J., Costantini, L.C., Ratliff, J., Isacson, O. (1998). Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp. Neurol.* *149*, 28-41
- De Angelis, L., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Cusella-De Angelis, M.G., Ponzetto, C., Cossu, G. (1999). Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol.* *147*, 869-878
- Del Rio, J.A., Heimrich, B., Soriano, E., Schwegler, H., Frotscher, M. (1991). Proliferation and differentiation of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive glial cells in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* *43*, 335-347.
- Derouiche, A., Heimrich, B., Frotscher, M. (1993). Loss of layer-specific astrocytic glutamine synthetase immunoreactivity in slice cultures of hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *5*, 122-127
- Diers-Fenger, M., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., Levine, J.M., Trotter, J. (2001). AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: Isolation, differentiation, and association with radial glia. *Glia* *34*, 213-228

Dinsmore, J., Ratliff, J., Deacon, T., Pakzaban, P., Jacoby, D., Galpern, W., Isacson, O. (1996). Embryonic stem cells differentiated *in vitro* as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transpl.* *5*, 131-143

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* *97*, 1-20

Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R. (1985). The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *87*, 27-45

Dusart, I., Airaksinen, M. S., Sotelo, C. (1997). Purkinje cell survival and axonal regeneration are age dependent: An *in vitro* study. *J. Neurosci.* *17*, 3710-3726

Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S., Nirenberg, M. (1979). Monoclonal antibody to plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *76*, 4913-4917

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* *4*, 1313-1317

Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154-156

Fink, J.S., Schumacher, J.M. Elias, S.L., Palmer, E.P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H.S., Dempsey, P.K., Fischman, A.J., Raineri, R., Manhart, C., Dinsmore, J., Isacson, O. (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: Preliminary results. *Cell Transpl.* *9*, 273-278

Finley, M.F., Kulkarni, N., Huettner, J.E. (1996). Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J. Neurosci.* *16*, 1056-1065

Fishell, G. (1995). Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues. *Development* *121*, 803-812

Flax, J.D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A.M., Billingham, L.L., Jendoubi, M., Sidman, R.L., Wolfe, J.H., Kim, S.U., Snyder, E.Y. (1998). Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat. Biotech.* *16*, 1033-1039

Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., Samarut, J. (1995). *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* *108*, 3181-3188

Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Venet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S.K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* *23*, 247-256

Franklin, R.J. and Blakemore, W.F. (1995). Glial-cell transplantation and plasticity in the O-2A lineage—implications for CNS repair. *Trends Neurosci.* *18*, 151-156

Fuchs, E. and Segre, J.A. (2000). Stem cells: A new lease on life. *Cell* *100*, 143-155

Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr, S.T., Ray, J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 11879-11883

Gähwiler, B.H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R.A., Thompson, S.M. (1997). Organotypic slice cultures: A technique has come of age. *Trends Neurosci.* *20*, 471-477.

Gates, M.A., Olsson, M., Bjerregaard, K., Bjorklund, A. (1998). Region-specific migration of embryonic glia grafted to the neonatal brain. *Neuroscience* *84*, 1013-1023

Gerety, M. and Watanabe, M. (1997). Polysialylated NCAM expression on endocardial cells of the chick primary atrial septum. *Anat. Rec.* *7*, 71-84

Ghosh, A. and Greenberg, M.E. (1995). Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* *15*, 89-103

- Giaume, C. and McCarthy, K.D. (1996). Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci.* *19*, 319-325
- Gilbert F.G. (2000). *Developmental biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, *6<sup>th</sup> edition*, Chapter 4, 11
- Glaser, T., Franceschini, I.A., Perez-Bouza, A., Klein K., Rougon, G., Dubois-Dalcq, M., Brüstle, O. (2004). Migration and myelination of PSA-NCAM-overexpressing ES cell-derived glial precursors. Manuskript in Vorbereitung
- Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., Walsh, C.A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely in migrating neurons. *Neuron* *23*, 257-271
- Gloster, A., El-Bizri, H., Bamji, S.X., Rogers, D., Miller, F.D. (1999). Early induction of T $\alpha$ 1  $\alpha$ -tubulin transcription in neurons of the developing nervous system. *J. Comp. Neurol.* *405*, 45-60
- Gloster, A., Wu, W., Speelman, A., Weiss, S., Causing, C., Pozniak, C., Reynolds, B., Chang, E., Toma, J.G., Miller, F.D. (1994). The T $\alpha$ 1  $\alpha$ -tubulin promotor specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J. Neurosci.* *14*, 7319-7330
- Goldman, S.A., Zukhar, A., Barami, K., Mikawa, T., Niedzwiecki, D. (1996). Ependymal/subependymal cells of the postnatal and adult songbird brain generate both neurons and non-neuronal siblings, *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurobiol.* *30*, 505-520
- Gritti, A., Parati, E.A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D., Vescovi, A.L. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* *16*, 1091-1100
- Gutierrez-Ramos, J.C. and Palacios, R. (1992). *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 9171-9175
- Hailer, N.P., Jarhult, J.D., Nitsch, R. (1996). Resting microglial cells *in vitro*: Analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* *18*, 319-331.

- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M., A., Chapouton, P., Barde, Y.-A., Götz, M. (2002). Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* *5*, 308-315
- Hescheler, J., Fleischmann, B.K., Lentini, S., Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Wobus, A.M., Addicks, K. (1997). Embryonic stem cells: A model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc. Res.* *36*, 149-162
- Hieber, V., Dai, X., Foreman, M., Goldman, D. (1998). Induction of T $\alpha$ 1-tubulin gene expression during development and regeneration of the fish central nervous system. *J. Neurobiol.* *37*, 429-440
- Hörz, W. and Altenburger, W. (1981). Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. *Nucl. Acids Res.* *9*, 683-696
- Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De la Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F. 3<sup>rd</sup>, Boiani, M., Scholer, H.R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* *300*, 1251-1256
- Husmann, M., Pietsch, T., Fleischer, B., Weisgerber, C., Bitter-Suermann, D. (1989). Embryonic neural cell adhesion molecules on human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* *19*, 1761-1763
- Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D., Brenin, D.R. (1994). Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.* *163*, 288-292
- Isacson, O., Deacon, T.W., Pakzaban, P., Galpern, W.R., Dinsmore, J., Burns, L.H. (1995). Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of fibres. *Nat. Med.* *1*, 1189-1194
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* *6*, 88-95
- Izant, J.G. and McIntosh, J.R. (1980). Microtubule-associated proteins: A monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *77*, 4741-4745

- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* *418*, 41-49
- Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., McKay, R.D.G. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* *10*, 3129-3140
- Jones, J.M. and Thomson, J.A. (2000). Human embryonic stem cell technology. *Semin. Reprod. Med.* *18*, 219-223
- Kawaguchi, A., Miyata, T., Sawamoto, K., Takashita, N., Murayama, A., Akamatsu, W., Ogawa, M., Okabe, M., Tano, Y., Goldman, S.A., Okano, H. (2001). Nestin-EGFP transgenic mice: Visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol. Cell Neurosci.* *17*, 259-273
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* *108*, 407-414
- Keyoung, H.M., Roy, N.S., Benraiss, A., Louissaint, A.Jr., Suzuki, A., Hashimoto, M., Rashbaum, W.K., Okano, H., Goldman, S.A. (2001). High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. *Nat. Biotech.* *19*, 843-850
- Kilpatrick, T.J. and Bartlett, P.F. (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: Requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* *10*, 255-265
- Kirschenbaum, B., Nedergaard, M., Preuss, A., Barami, K., Fraser, R.A., Goldman, S.A. (1994). *In vitro* neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb. Cortex* *4*, 576-589
- Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Young Koh, G., Field, L.J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.* *98*, 216-224

- Kluge, A., Hailer, N.P., Horvath, T.L., Bechmann, I., Nitsch, R. (1998). Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway *in vitro*. *Hippocampus* 8, 57-68
- Konietzko, U. and Müller, C.M. (1994). Astrocytic dye coupling in rat hippocampus: Topography, developmental onset, and modulation by protein kinase C. *Hippocampus* 4, 297-306
- Kordower, J.H., Rosenstein, J.M., Collier, T.J., Burke, M.A., Chen, E.Y., Li, J.M., Martel, L., Levey, A.E., Mufson, E.J., Freeman, T.B., Olanow, C.W. (1996). Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: Chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J. Comp. Neurol.* 370, 203-230
- Kressin, K., Kuprijanova, E., Jabs, R., Seifert, G., Steinhäuser, C. (1995). Developmental regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia* 15, 173-187
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033
- Lacorazza, H.D., Flax, J.D., Snyder, E.Y., Jendoubi, M. (1996). Expression of human beta-hexosaminidase alpha-subunit gene (the gene defect of tay-sachs disease) in mouse brains upon engraftment of transduced progenitor cells. *Nat. Med.* 2, 424-429
- Lagenaur, C. and Schachner, M. (1981). Monoclonal antibody (M2) to glial and neuronal cell surfaces. *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.* 15, 335-346
- Learish, R.D., Brüstle, O., Zhang, S.-C., Duncan, I.D. (1999). Intraventricular transplantation of oligodendrocyte progenitors into a fetal myelin mutant results in widespread formation of myelin. *Ann. Neurol.* 46, 716-722
- Lee, J.M., Tu, C.F., Yang, P.W., Lee, K.H., Tsuji, K., Tsai, M.K., Chen, R.J., Hu, C.Y., Hsieh, R.P., Tai, H.C., Chiang, B.L., Weng, C.N., Lee, Y.C., Lee, C.J. (2002). Reduction of human-to-pig cellular response by alteration of porcine MHC with human HLA DPW0401 exogenes. *Transplantation* 73, 193-197

- Lee, M.K., Tuttle, J.B., Rebhun, L.I., Cleveland, D.W., Frankfurter, A. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil. Cytoskel.* *17*, 118-132
- Lee, S.-H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., McKay, R.D.G. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotech.* *18*, 675-679
- Lewis, S.A., Lee, M.G.-S., Cowan, N.J. (1985). Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J. Cell Biol.* *101*, 852-859
- Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., Smith, A. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr. Biol.* *8*, 971-974
- Linvall, O., Sawle, G., Widner, H., Rothwell, J.C., Bjorklund, A., Brooks, D., Brundin, P., Frackowiak, R., Marsden, C.D., Odin, P., *et al.* (1994). Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *37*, 155-165
- Lodish, H., Ber, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2001). *Zellbiologie Spektrum, Akad. Verl., 4. Auflage*, 654, 659, 1053-1055
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R.D.G. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* *292*, 1389-1394
- Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: Regional differences in radial glia fate. *Neuron* *37*, 751-764
- Malatesta, P., Hartfuss, E., Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* *127*, 5253-5263
- Maltsev, V.A., Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M., Hescheler, J. (1994). Cardiomyocytes differentiate *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ. Res.* *75*, 233-244

- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *78*, 7634-7638
- Martinez-Serrano, A., Lundberg, C., Horellou, P., Fischer, W., Bentlage, C., Campbell, K., McKay, R.D.G., Mallet, J., Bjorklund, A. (1995). CNS-derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult rat brain: Complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation into the septum. *J. Neurosci.* *15*, 5668-5680
- Mathew, T.C. and Miller, F.D. (1990). Increased expression of T $\alpha$ 1  $\alpha$ -tubulin mRNA during collateral and NGF-induced sprouting of sympathetic neurons. *Dev. Biol.* *141*, 84-92.
- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Huttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H., Steinhauser, C. (2003). Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* *23*, 1750-1758
- Matus, A. (1990). Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J. Physiol. (Paris)* *84*, 134-137
- Mayer-Proschel, M., Kalyani, A.J., Mujtaba, T., Rao, M.S. (1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* *19*, 773-785
- McDonald, J.W., Liu, X.-Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I., Choi, D.W. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* *5*, 1410-1412
- McKay, R.D.G. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* *276*, 66-71
- McKinney, R.A., Debanne, D., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M. (1997). Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus *in vitro*: Implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. *Nat. Med.* *3*, 990-996.
- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A., McKecher, S.R. (2000). From blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* *290*, 1779-1782

- Miller, F.D., Tetzlaff, W., Bisby, M.A., Fawcett, J.W., Milner, R.J. (1989). Rapid induction of the major embryonic  $\alpha$ -tubulin mRNA, T $\alpha$ 1, during nerve regeneration in adult rats. *J. Neurosci.* *9*, 1452-1463
- Miller, F.D., Naus, C.C., Durand, M., Bloom, F.E., Milner, R.J. (1987). Isotypes of alpha-tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. *J. Cell Biol.* *105*, 3065-3073
- Minana, R., Sancho-Tello, M., Climent, E., Segui, J.M., Renau-Piqueras, J., Guerri, C. (1998). Intracellular location, temporal expression, and polysialylation of neural cell adhesion molecule in astrocytes in primary culture. *Glia* *24*, 415-427
- Mujtaba, T., Piper, D.R., Kallyani, A., Groves, A.K., Lucero, M.T., Rao, M.S. (1999). Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Dev. Biol.* *214*, 113-127
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* *116*, 201-211
- Muller-Rover, S., Peters, E.J., Botchkarev, V.A., Panteleyev, A., Paus, R. (1998). Distinct patterns of NCAM expression are associated with defined stages of murine hair follicle morphogenesis and regression. *J. Histochem. Cytochem.* *46*, 1401-1410
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* *33*, 72-86.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S., Thomson, J.A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* *19*, 193-204
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M., McKay, R.D.G. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mech. Dev.* *59*, 89-102

- Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., Etches, R.J. (1996). Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* *122*, 2339-2348
- Palacios, R., Golunski, E., Samaridis, J. (1995). *In vitro* generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 7530-7534
- Palmer, T.D., Schwartz, P.H., Taupin, P., Kaspar, B., Stein, S.A., Gage, F.H. (2001). Cell Culture. Progenitor Cells from human brain after death. *Nature* *411*, 42-43
- Pasumarthi, K.B. and Field, L.J. (2002). Cardiomyocyte enrichment in differentiating ES cell cultures: Strategies and applications. *Methods Mol. Biol.* *185*, 157-168
- Pera, M.F., Reubinoff, B., Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* *113*, 5-10
- Priller, J., Persons, D.A., Klett, F.F., Kempermann, G., Kreutzberg, G.W., Dirnagl, U. (2001). Neurogenesis of cerebellar purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells *in vivo*. *J. Cell Biol.* *155*, 733-738
- Przyborski, S.A. and Cambray-Deakin, M.A. (1996). Developmental regulation of  $\alpha$ -tubulin mRNAs during the differentiation of cultured cerebellar granule cells. *Mol. Brain Res.* *36*, 179-183
- Przyborski, S.A. and Cambray-Deakin, M.A. (1995). Developmental regulation of MAP2 variants during neuronal differentiation *in vitro*. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *89*, 187-201
- Rao, M.S. and Mayer-Proschel, M. (1997). Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev. Biol.* *188*, 48-63
- Rash, J.E., Yasumura, T., Dudek, F.E., Nagy, J.I. (2001). Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J. Neurosci.* *21*, 1983-2000
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotech.* *19*, 1134-1140

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.-Y., Trounson, A., Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. *Nat. Biotech.* *18*, 399-404

Reynolds, B.A. and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* *255*, 1707-1710

Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* *12*, 4565-4574

Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., Bartlett, P.F. (1992). *De novo* generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 8591-8595

Rietze, R.L., Valcanis, H., Brooker, G.F., Thomas, T., Voss, A.K., Bartlett, P.F. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* *412*, 736-739

Roy, N.S., Wang, S., Jiang, L., Kang, J., Benraiss, A., Harrison-Restelli, C., Fraser, R.A.R., Couldwell, W.T., Kawaguchi, A., Okano, H., Nedergaard, M., Goldman, S.A. (2000a). *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat. Med.* *6*, 271-277

Roy, N.S., Benraiss, A., Wang, S., Fraser, R.A.R., Goodman, R., Couldwell, W.T., Nedergaard, M., Kawaguchi, A., Okano, H., Goldman, S.A. (2000b). Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J. Neurosci. Res.* *59*, 321-331

Roy, N.S., Wang, S., Harrison-Restelli, C., Benraiss, A., Fraser, R.A.R., Gravel, M., Braun, P.E., Goldman, S.A. (1999). Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J. Neurosci.* *15*, 9986-9995

Sawamoto, K., Yamamoto, A., Kawaguchi, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A., Okano, H. (2001a). Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters. *J. Neurosci. Res.* *65*, 220-227

- Sawamoto, K., Nakao, N., Kakishita, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Yamamoto, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A., Itakura, T., Okano, H. (2001b). Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J. Neurosci.* *21*, 3895-3903
- Scheffler, B., Schmandt, T., Schröder, W., Steinfarz, B., Hussein, L., Wellmer, J., Seifert, G., Karam, K., Beck, H., Blümcke, I., Wiestler, O.D., Steinhäuser, C., Brüstle, O. (2003). Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures. *Development* *130*, 5533-5541
- Schmandt, T., Meents, E., Goßrau, G., Gornik, V., Okabe, S., Brüstle, O. (2004). Generation of highly purified neurons derived from ES cells using genetic and epigenetic strategies. Manuskript in Vorbereitung
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 11307-11312
- Schumacher, J.M., Elias, S.A., Palmer, E.P., Kott, H.S., Dinsmore, J., Dempsey, P.K., Fischman, A.J., Thomas, C., Feldman, R.G., Kassissieh, S., Raineri, R., Manhart, C., Penney, D., Fink, J.S., Isacson, O. (2000). Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology* *54*, 1042-1050
- Seil, F.J. (1989). Tissue culture models of myelination after oligodendrocyte transplantation. *J. Neural Transpl.* *7*, 49-55.
- Seki, T. and Arai, Y. (1993). Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult nervous system. *Neurosci. Res.* *17*, 265-290
- Shihabuddin, L.S., Hertz, J.A., Holets, v.R., Whittemore, S.R. (1995). The adult CNS retains the potential to direct region-specific differentiation of a transplanted neuronal precursor cell line. *J. Neurosci.* *15*, 6666-6678
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* *336*, 688-690

Snyder, E.Y., Yoon, C., Flax, J.D., Macklis, J.D. (1997). Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 11663-11668

Snyder, E.Y., Taylor, R.M., Wolfe, J.H. (1995). Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* *374*, 367-370

Song, H.J., Stevens, C.F., Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* *417*, 39-44

Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J.A., Martin, F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* *49*, 157-162

Steffel, J., Wernig, M., Knauf, U., Kumar, S., Wiestler, O.D., Wernig, A., Brüstle, O. (2003). Migration and differentiation of myogenic precursors following transplantation into the developing rat brain. *Stem Cells* *21*, 181-189

Stoppini, L., Buchs, P.A., Müller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* *37*, 173-182

Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedenmann, B., Hescheler, J., Wobus, A.M. (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mec. Dev.* *53*, 275-287

Svendsen, C.N. and Smith, A.G. (1999). New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system. *Trends Neurosci.* *22*, 357-364

Temple, S. (1989). Devision and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* *340*, 471-473

Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* *416*, 542-545

- Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Döring, B., Frisch, C., Söhl, G., Teubner, B., Euwens, C., Huston, J., Steinhäuser, C., Messing, A., Heinemann, U., Willecke, K. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J. Neurosci.* *23*, 766-776
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 7844-7848
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *100*, 11457-11462
- Tucker, K.L., Meyer, M., Barde, Y.A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat. Neurosci.* *4*, 29-37
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 14720-14725
- Ullrich, O., Diestel, A., Eyüpoglu, I. Y., Nitsch, R. (2001). Regulation of microglial expression of integrins by poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1035-1042.
- Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E.J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P.J., Sharpe, P.T. (1995). Embryonic expression of the chicken *Sox2*, *Sox3* and *Sox11* genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech. Dev.* *49*, 23-36.
- Van der Laan, L.J., Lockey, C., Griffeth, B.C., Frasuer, F.S., Wilson, C.A., Onions, D.E., Hering, B.J., Long, Z., Otto, E., Torbett, B.E., Salomon, D.R. (2000). Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* *407*, 90-94
- Verkhatsky, A. and Steinhäuser, C. (2000). Ion channels in glial cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *32*, 380-412

- Wall, Z.W. (1992). An introduction to molecular neurobiology. Sinauer Associates, Inc, 86
- Wang, S., Roy, N.S., Benraiss, A., Goldman, S.A. (2000). Promoter-based isolation and fluorescence-activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependymal zone. *Dev. Neurosci.* *22*, 167-176
- Wang, S., Wu, H., Jiang, J., Delohery, T.M., Isdell, F., Goldman, S.A. (1998). Isolation of neuronal precursors by sorting embryonic forebrain transfected with GFP regulated by the T $\alpha$ 1 tubulin promoter. *Nat. Biotech.* *16*, 196-201
- Weimann, J.M., Charlton, C.A., Brazelton, T.R., Hackman, R.C., Blau, H.M. (2003). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 2088-2093
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., Reynolds, B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* *16*, 7599-7609
- Wernig, M., Benninger, F., Schmandt, T., Rade, M., Tucker, K., Büssow, H., Beck, H., Brüstle, O. (2004). Functional integration of ES cell-derived neurons *in vivo*. Submitted to *J. Neurosci.*
- Wernig, M., Scheffler, B., Brüstle, O. (2003). Medizinische Perspektiven der Stammzellforschung. Molekular- und zellbiologische Grundlagen der Molekularen Medizin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, *2. Auflage*, 679-709
- Wernig, M., Tucker, K.L., Gornik, V., Schneiders, A., Buschwald, R., Wiestler, O.D., Barde, Y.A., Brüstle, O. (2002). Tau EGFP embryonic stem cells: An efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation. *J. Neurosci. Res.* *69*, 918-924
- Wheeler, M.B. (1994). Development and validation of swine embryonic stem cells: A review. *Reproduction, Fertility and Development* *6*, 563-568
- Victorin, K., Brudin, P., Gustavii, B., Lindvall, O., Bjorklund, A. (1990). Reformation of long axon pathways in adult rat central nervous system by human forebrain neuroblasts. *Nature* *347*, 556-558

- Wiles, M.V. and Keller, G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111, 259-267
- Wobus, A.M., Guan, K., Yang, H.T., Boheler, K.R. (2002). Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol. Biol.* 185, 127-156
- Wobus, A.M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M.C., Rohwedel, J., Ji Guanju, Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J., Franz, W.M. (1997). Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29, 1525-1539
- Yandava, B.D., Billingham, L.L., Snyder, E.Y. (1999). 'Global' cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: Evidence from the dysmyelinated shivered mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7029-7034
- Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548
- Young, L.E., Sinclair, K.D., Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 3, 155-163
- Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brüstle, O., Thomson, J.A. (2001). *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotech.* 19, 1129-1133
- Zhou, H. and Lund, R.D. (1993). Effects of the age of donor or host tissue on astrocyte migration from intracerebral xenografts of corpus callosum. *Exp. Neurol.* 122, 155-164
- Zimmer, A. (1992). Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 115-137
- Zimmer, J. and Gähwiler, B.H. (1984). Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 228, 432-446.

## PUBLIKATIONSLISTE

Schmandt, T., Meents, E., Goßrau, G., Gornik, V., Okabe, S., Brüstle, O. (2004a). Generation of highly purified neurons derived from ES cells using genetic and epigenetic strategies. Manuskript in Vorbereitung

Schmandt, T., Hüttmann, K., Krebs, C., Perez-Bouza, A., Steinhäuser, C., Brüstle, O. (2004b). Morphological and electrophysiological heterogeneity of transplanted ES cell-derived glial precursors. Manuskript in Vorbereitung

Scheffler, B., Schmandt, T., Schröder, W., Steinfarz, B., Hussein, L., Wellmer, J., Seifert, G., Karram, K., Beck, H., Blümcke, I., Wiestler, O.D., Steinhäuser, C., Brüstle, O. (2003). Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures. *Development* 130, 5533-5541

Hussein, L., Schmandt, T., Scheffler, B., Seifert, G., O.D., Brüstle, O., Steinhäuser, C. (2004). Functional analysis of ES cell-derived glial cells after integration into hippocampal slice cultures. Manuskript in Vorbereitung

Wernig, M., Benninger, F., Schmandt, T., Rade, M., Tucker, K., Büssow, H., Beck, H., Brüstle, O. (2004). Functional integration of ES cell-derived neurons *in vivo*. Submitted to *J. Neurosci.*

## 7. Danksagung

Prof. Dr. med. Oliver Brüstle möchte ich für die Bereitstellung des Themas, für die wertvolle Unterstützung durch zahlreiche Anregungen bei problematischen Fragestellungen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit herzlich danken.

Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Scheidtmann möchte ich nachdrücklich für seine Bereitschaft und sein Interesse danken, diese Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

Dr. med. Björn Scheffler, vet. med. Kerstin Hüttmann und Dr. med. Claudia Krebs möchte ich meinen Dank für die Bereitstellung der im Rahmen der Kooperationen generierten Daten aussprechen. Volker Gornik danke ich herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der präparativen FACS-Sortierung.

Dr. rer. nat. Tamara Glaser, Dr. med. Gudrun Goßrau und Dr. med. Alberto Perez-Bouza danke ich besonders für die Unterstützung durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen, die an der Entstehung dieser Arbeit einen maßgeblichen Anteil hatten. Weiterhin möchte ich mich für die tatkräftige Hilfe von Rachel Konang, Barbara Steinfarz, Anke Leinhaas, Katja Klein und Michaela Segschneider bedanken. Herzlich möchte ich mich ebenfalls bei Beate Pörsch und Karin Frangenberg bedanken. Allen Mitarbeitern des Institutes für Rekonstruktive Neurobiologie danke ich für die angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Friederike Kappel, Dr. med. Christine Buck, Heidrun Schmandt und Dr. rer. nat. Tamara Glaser danke ich herzlich für die hilfsbereite Unterstützung beim Korrekturlesen.

Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium der Biologie ermöglicht und somit den Grundstein für diese Doktorarbeit gelegt haben. Meiner Familie und Familie Kappel, ganz besonders aber Andreas Kappel möchte ich herzlich für die anregenden Diskussionen, ihr Interesse und die vielen aufmunternden Worte danken.

## 8. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir persönlich, selbständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die Daten, die im Rahmen einer Kooperation gewonnen wurden, sind ausnahmslos gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen. Diese Dissertation wurde an der nachstehend aufgeführten Stelle auszugsweise veröffentlicht.

Scheffler, B., Schmandt, T., Schröder, W., Steinfarz, B., Hussein, L., Wellmer, J., Seifert, G., Karam, K., Beck, H., Blümcke, I., Wiestler, O.D., Steinhäuser, C., Brüstle, O. (2003). Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures. *Development* 130, 5533-5541

Bonn, 14. April 2004

Tanja Schmandt