

Neurale Linienselektion humaner embryonaler Stammzellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Nina Limbach

aus Bonn

Bonn 2011

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

1. Referent: Prof. Dr. Oliver Brüstle
2. Referent: Prof. Dr. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 10. Januar 2012

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2012

DAS SCHÖNSTE, WAS WIR ERLEBEN KÖNNEN,
IST DAS GEHEIMNISVOLLE.
ES IST DAS GRUNDGEFÜHL, DAS AN DER WIEGE
VON WAHRER KUNST UND WISSENSCHAFT STEHT.

(ALBERT EINSTEIN)

FÜR MEINE ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	11
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	13
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	15
1. EINLEITUNG	19
1.1 Stammzellen	19
1.1.1 Embryonale Stammzellen.....	21
1.1.2 Adulte Stammzellen	22
1.1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen.....	23
1.2 Neurale Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen	24
1.2.1 Gerichtete Differenzierung und Linienselektion	26
1.2.2 Therapeutische Anwendungen hESC-abgeleiteter neuronaler Populationen.....	27
1.3 Zytoskelett	29
1.3.1 Neurale Zytoskelettmoleküle	29
1.4 Zelladhäsion	30
1.4.1 Zelladhäsionsmoleküle (CAMs).....	31
1.4.2 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF).....	32
1.5 Ziel der Arbeit.....	36
1.5.1 T α 1-basierte Selektion hESC-abgeleiteter Neurone	37
1.5.2 L1-basierte Selektion hESC-abgeleiteter Neurone.....	37
2. MATERIAL UND METHODEN	39
2.1 Materialien	39
2.1.1 Allgemeines	39
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.3 Geräte	40
2.1.4 Chemikalien.....	43
2.1.5 Antikörper	46
2.1.5.1 Primäre Antikörper.....	46
2.1.5.2 Sekundäre Antikörper	48
2.1.6 Primer	49
2.1.6.1 PCR-Konditionen	52
2.1.7 Kits	52
2.1.8 Plasmide	53
2.1.9 Lösungen	53
2.1.9.1 Lösungen für die Zellkultur	53
2.1.9.1.1 Puffer.....	53
2.1.9.1.2 Zusätze.....	54
2.1.9.1.3 Medien.....	57
2.1.9.2 Lösungen für die Bakterienkultur	58
2.1.10 Lösungen für analytische Methoden	58
2.1.10.1 Immunzytochemie.....	58
2.1.10.2 Immunhistochemie	59
2.1.10.3 RNA-Isolierung, PCR und Gelelektrophorese	59
2.1.10.4 Western Blot.....	60
2.1.10.5 Karyotypisierung.....	61
2.1.10.6 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH).....	61
2.1.10.7 Elektrophysiologie	62
2.2 Zelllinien	62
2.3 Zellbiologische Methoden/ hESC-Kultur	62
2.3.1 Fibroblasten für die hESC-Kultur	62
2.3.1.1 Präparation primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF).....	62
2.3.1.2 Kultivierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF).....	63
2.3.1.3 Mitotische Inaktivierung muriner embryonaler Fibroblasten durch γ -Bestrahlung.....	63

2.3.1.4 Auftauen von γ MEF	64
2.3.1.5 Gewinnung konditionierten Mediums von γ MEF	64
2.3.2 Kultivierung von hESCs	65
2.3.2.1 Auftauen von hESCs	65
2.3.2.2 Passagieren von hESCs	65
2.3.2.3 Entfernen differenzierter Kolonien aus hESC-Kulture	66
2.3.2.4 Feeder-freie Kultivierung der hESCs	66
2.3.2.5 Einfrieren von hESCs	66
2.3.2.6 Adhärente neurale Differenzierung von hESCs	67
2.3.3 Herstellung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSC)	67
2.3.3.1 Herstellung von Embryoidkörpern	67
2.3.3.2 Plattieren der EBs und Transfer zu ITSFn	68
2.3.3.3 Manuelle Isolierung der neuralen Zellstrukturen	69
2.3.3.4 Neurosphärenkultur	69
2.3.3.5 Adhärente neurale Kultur und Transfer in N2FEB	69
2.3.4 Kultivierung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSC)	71
2.3.4.1 Auftauen der hESC-NSCs	71
2.3.4.2 Passagieren der hESC-NSCs	71
2.3.4.3 Einfrieren der hESC-NSCs	72
2.3.4.4 Differenzierung der hESC-NSCs	72
2.3.4.5 Einfrieren der über FACS aufgereinigten neuronalen Zellen	72
2.3.4.6 Auftauen der über FACS aufgereinigten neuronalen Zellen	73
2.3.4.7 Lentivirale Transduktion von hESC-NSCs mit EF1 α -mRFP oder EF1 α -EGFP	73
2.3.5 Transfektion	74
2.3.5.1 Lipofektion	74
2.3.5.2 Nukleofektion	74
2.4 Analytische Methoden	75
2.4.1 Zellzahlbestimmung	75
2.4.1.1 Bestimmung der Zellviabilität	75
2.4.2 Immunzyto- und Immunhistochemie	75
2.4.2.1 Allgemeines	75
2.4.2.2 Fluoreszenzfärbung	76
2.4.2.2.1 Nachweis von Oberflächenantigenen	76
2.4.2.2.2 Nachweis von zytoplasmatischen Markern	76
2.4.2.2.3 Nachweis von Kernmarkern	76
2.4.2.2.4 Proliferationsassay	77
2.4.3 Western Blot Analyse und Immunodetektion	77
2.4.3.1 Herstellung von Proteinlysaten	77
2.4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	78
2.4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	78
2.4.3.4 Western Blot und Immunodetektion	79
2.4.4 Durchflusszytometrie	80
2.4.5 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	81
2.4.5.1 Präparation der hESC-NSCs	81
2.4.5.2 Zellsortierung	82
2.4.6 Plasmidpräparation	83
2.4.7 Herstellung hippocampaler Schnittkulturen	84
2.4.8 In vitro Transplantation und Aufarbeitung der hippocampalen Schnittkulturen	84
2.4.9 RT-PCR-Analyse	85
2.4.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA	85
2.4.9.2 Reverse Transkription	85
2.4.9.3 Semi-quantitative RT-PCR (semi-qRT-PCR)	86
2.4.9.4 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	86
2.4.10 Karyotypisierung	86
2.4.11 Fluoreszenz- <i>In-Situ</i> -Hybridisierung (FISH)	87
2.4.12 Elektrophysiologie	88
2.5 Statistische Analyse	90
3. ERGEBNISSE	93
3.1 Gewinnung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSCs)	93

3.2 Selektion hESC-abgeleiteter Neurone.....	98
3.2.1 Promotor-basierte Linienselektion hESC-abgeleiteter Neurone.....	99
3.2.1.1 Generierung und Charakterisierung T α 1-EGFP-exprimierender Zellen.....	99
3.2.1.1.1 Zeitverlauf der T α 1-EGFP-Expression.....	99
3.2.1.1.2 Promotorspezifität des T α 1-EGFP-Konstrukts.....	101
3.2.1.1.3 Charakterisierung der T α 1-EGFP-positiven Population.....	103
3.2.1.2 Linienselektion der T α 1-EGFP-positiven Zellen.....	104
3.2.1.3 Phänotypische Charakterisierung der T α 1-EGFP selektierten Population.....	106
3.2.2 Immuno-basierte Selektion hESC-abgeleiteter Neurone.....	108
3.2.2.1 Charakterisierung L1-exprimierender Zellen.....	108
3.2.2.1.1 Zeitverlauf der L1-Expression.....	108
3.2.2.1.2 Charakterisierung der L1-positiven Population.....	109
3.2.2.2 Linienselektion der L1-positiven Zellpopulation.....	110
3.2.2.3 Neuronale Identität L1-selektierter Zellen.....	114
3.2.2.4 Entwicklung eines Kryokonservierungsprotokolls für L1-positiv Neurone.....	118
3.2.2.5 Elektrophysiologische Untersuchungen der L1-immunisolierten Neurone.....	121
3.2.2.5.1 Physiologische Untersuchungen der L1-positiven Zellpopulation in Kokultur mit murinen Astrozyten.....	121
3.2.2.5.2 Differenzierung und Ausbildung von Synapsen L1-positiver Zellen nach <i>in vitro</i> Transplantation auf hippocampale Schnittkulturen.....	126
3.3 Direkte neurale Konvertierung von hESCs.....	128
3.3.1 Charakterisierung direkt konvertierter hESCs.....	129
4. DISKUSSION.....	135
4.1 Gewinnung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSCs).....	135
4.2 Promotor-basierte Linienselektion hESC-abgeleiteter Neurone.....	138
4.2.1. Verwendbarkeit des T α 1-EGFP-Transgens als selektierbarer Marker für die neuronale Linienselektion.....	138
4.2.2 Charakterisierung T α 1-EGFP-positiver Zellen.....	142
4.2.3 Effizienz der T α 1-EGFP-basierten Linienselektion.....	144
4.3 Immuno-basierte Linienselektion hESC-abgeleiteter Neurone.....	146
4.3.1 Das Zelladhäsionsmolekül L1 als Marker für die neuronale Linienselektion.....	147
4.3.2 Effizienz der L1-immuno-basierten Linienselektion.....	150
4.3.3 Charakterisierung der L1-positiv-sortierten Zellen.....	153
4.3.4 Kryokonservierung von L1-immunisolierten Neuronen.....	157
4.3.5 Vergleich mit anderen Linienselektionsverfahren.....	160
4.4 Direkte neurale Konvertierung von hESCs.....	163
4.4.1 Charakterisierung direkt neural konvertierter hESCs unter Berücksichtigung der Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1.....	163
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	169
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	173
7. ERKLÄRUNG.....	211

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Verwendete primäre Antikörper.....	48
Tab. 2.2: Verwendete sekundäre Antikörper.....	48
Tab. 2.3: Verwendete Primer für die quantitative und semi-quantitative RT-PCR.	51
Tab. 3.1: Übersicht der getesteten Kryomedien und Apoptose-Inhibitoren.....	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Selbsterneuerung von Stammzellen.....	19
Abb. 1.2: Stammzellhierarchie.....	20
Abb. 1.3: Gewinnung von ESCs aus der Blastozyste.....	21
Abb. 1.4: Neurale Stammzellen (NSCs) und ihr Differenzierungspotenzial.....	25
Abb. 1.5: In vitro Differenzierung von hESCs.....	26
Abb. 1.6: Zelladhäsionsmoleküle, die Zellen untereinander und mit der EZM verbinden.....	31
Abb. 1.7: Die wichtigsten Familien von Zelladhäsionsproteinen (CAMs).....	32
Abb. 1.8: Übersicht der Subfamilien neuraler Zelladhäsionsmoleküle der IgSF.....	33
Abb. 1.9: Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1.....	34
Abb. 1.10: L1 als adhäsives Molekül und signaltransduzierender Rezeptor.....	35
Abb. 1.11: Lösliche Fragmente des Moleküls L1.....	36
Abb. 2.1: Übersicht verwendeter Plasmide.....	53
Abb. 2.2: Mikroskopische Aufnahmen der neuralen Differenzierung von hESCs.....	68
Abb. 2.3: Übersicht der $T\alpha 1$ - und L1-basierten Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS).....	82
Abb. 3.1: Darstellung der schrittweisen Generierung von hESC-NSCs.....	93
Abb. 3.2: Charakterisierung proliferativer hESC-NSCs.....	94
Abb. 3.3: Semi-qRT-PCR Analysen proliferativer hESC-NSCs.....	96
Abb. 3.4: Neuronale Identität der hESC-NSCs nach Wachstumsfaktorentzug.....	97
Abb. 3.5: Promotor- und immuno-basierte Selektion hESC-NSC-abgeleiteter Neurone.....	98
Abb. 3.6: Expression von $T\alpha 1$ -EGFP und βIII -Tubulin während der <i>in vitro</i> Differenzierung von hESC-NSCs.....	100
Abb. 3.7: $T\alpha 1$ -EGFP- und βIII -Tubulin-Expression differenzierender hESC-NSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion.....	101
Abb. 3.8: Transfektion nicht-neuronaler Zelllinien mit dem $T\alpha 1$ -EGFP-Konstrukt.....	102
Abb. 3.9: Charakterisierung der $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen in 5 Tage differenzierten hESC-NSCs.....	104
Abb. 3.10: Charakterisierung $T\alpha 1$ -EGFP-sortierter Zellen 4 h nach FACS.....	105
Abb. 3.11: Charakterisierung $T\alpha 1$ -EGFP-sortierter Zellen 3 und 8 Tage nach FACS.....	107
Abb. 3.12: Expression von L1 und βIII -Tubulin während der <i>in vitro</i> Differenzierung von hESC-NSCs.....	108
Abb. 3.13: Charakterisierung der L1-positiven Population während der <i>in vitro</i> Differenzierung von hESC-NSCs.....	110
Abb. 3.14: Charakterisierung L1-sortierter Zellen 24 h nach FACS.....	112
Abb. 3.15: Expression Differenzierungs-assoziiierter Gene der L1-sortierten Population 24 h nach FACS.....	113
Abb. 3.16: Immunzytochemische Charakterisierung L1-sortierter Zellen 6 Tage nach FACS.....	115
Abb. 3.17: Quantifizierung der Immunzytochemie L1-sortierter Zellen 6 Tage nach FACS.....	116
Abb. 3.18: Charakterisierung L1-positiv-sortierte Zellen über qRT-PCR 6 Tage nach FACS.....	117
Abb. 3.19: Kryokonservierung L1-positiv-sortierter Neurone.....	120
Abb. 3.20: Membraneigenschaften L1-positiv-selektierter Neurone nach 5 und 9 Wochen Differenzierung auf murinen Astrozyten.....	123

Abb. 3.21: Charakterisierung der Aktionspotentiale L1-positiv-selektierter Neurone nach 5 und 9 Wochen Kokultur mit murinen Astrozyten.....	124
Abb. 3.22: Spannungsabhängige und Transmitter-induzierte Ströme L1-positiv-sortierter Zellen.	125
Abb. 3.23: Morphologie L1-positiver Neurone auf hippocampale Schnittkulturen.....	126
Abb. 3.24: Physiologie L1-positiver Neurone auf hippocampalen Schnittkulturen.....	127
Abb. 3.25: Übersicht der direkten neuronalen Konvertierung von hESCs.	129
Abb. 3.26: Immunzytochemische Charaktersierung adhärent neural differenzierter hESCs.....	130
Abb. 3.27: Expression von L1- und β III-Tubulin in adhärent neural differenzierten hESCs.	131
Abb. 3.28: Charakterisierung der adhärent neural differenzierten hESCs über qRT-PCR und Western Blot	133
Abb. 3.29: Expression des Zelladhäsionsmolekül L1 in hESCs.	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A ₂₆₀	Absorption bei 260nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280nm
Abb.	Abbildung
AP	Aktionspotential
BLBP	Brain-lipid-binding Protein
BrdU	5'-Bromo-2'-Deoxyuridin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Deoxyribonucleic Acid
CAM	Cell Adhesion Molecule
CM	Conditioned Medium
CMV	Cytomegalo-Virus
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diaminidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium /F12 nutrient mixture
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Deoxy-Nukleotidtriphosphate
EB	Embryoid Body
EC	entorhinaler Cortex
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
EF	Embryonaler Fibroblast
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green-Fluorescent Protein
ESC	Embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FCS	Fetal Calf Serum
Fn	Fibronectin
FSC	Forward Scatter
γ EF	Gamma-bestrahlte embryonale Fibroblasten
GABA	Gamma-Amino Butyric Acid
GAD67	Glutamic Acid Decarboxylase, Isoform 67kDa
GD	Gyrus Dentatus
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
hESC	humane Embryonale Stammzelle (human Embryonic Stem Cell)
hESC-NSC	humane Embryonale Stammzell-abgeleitete Neurale Stammzelle
hiPSC	humane indizierte pluripotente Stammzelle
ICM	Innere Zellmasse
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
I_A	inaktivierende Auswärts- K^+ -Ströme
I_K	langsam aktivierende Auswärts- K^+ -Ströme
I_{NaT}	transiente Einwärts- Na^+ -Ströme
ITSFn	DMEM/F12-Medium unter Zusatz von Insulin, Transferrin, Natriumselenit und Fibronectin (Selektionsmedium)
IVF	In Vitro Fertilisation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Knockout-DMEM	Knockout- Dulbecco's Modified Eagle Medium
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Ln	Laminin
MAP2ab	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2ab
MEF	Muriner Embryonaler Fibroblast
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger Ribonucleic Acid

NCAM	N eural C ell A dhesion M olecule
N2FEB	N 2 Medium, F GF2, E GF, B 27 (Proliferationsmedium)
NaHCO ₃	N atrium h ydrogencarbonat
NGS	N ormal G oat S erum
NSC	Neurale Stammzelle (N eural S tem C ell)
OD	O ptische D ichte
Olig2	O ligodendrocyte lineage transkriptionsfaktor 2
Pax	P aired B ox (Transkriptionsfaktor)
PBS	P hosphate- B uffered S aline
PCR	P olymerase C hain R eaction
Pen/Strep	P enicillin/ S treptomycin
PFA	P araformaldehyd
PI	P ropidiumiodid
PSA	P olysialic A cid
PO	P olyornithin
PNS	P eripheres N ervensystem
PSA-NCAM	P olysialic A cid - N eural C ell A dhesion M olecule
PZ	P iramidal- Z ellschicht
q	q uantitativ
RA	R etinoic A cid
RNA	R ibonucleic A cid
rpm	revolutions p er m inute
RT	R everse T ranskription
RNase	R ibonuclease
SR	S erum R eplacement
SSC	S ideward S catter
SSEA-1	S tage-specific E mbryonic A ntigen 1
Taq	T hermophilus a quaticus
TC	T emporaler C ortex
TH	T yrosin- H ydroxylase
U	U nits
VGluT1	vesikulärer G lutamat- T ransporter 1
VGluT2	vesikulärer G lutamat- T ransporter 2
ZNS	Z entral n ervensystem

1. EINLEITUNG

Embryonale Stammzellen (ESCs) besitzen drei einzigartige Fähigkeiten: sie sind pluripotent, sie sind zur Selbsterneuerung befähigt, und damit unbegrenzt vermehrbar und sie sind relativ einfach genetisch zu manipulieren. Diese Fähigkeiten lassen ESCs daher als Spenderquelle für Zellersatzstrategien im Zentralnervensystem (ZNS) sehr attraktiv erscheinen. Wichtige Grundvoraussetzungen für die Verwendung von ESCs und den davon abgeleiteten Populationen sind eine hohe Reinheit der verwendeten gewebespezifischen Zellpopulationen und deren Fähigkeit, funktionell in das Empfängergewebe zu integrieren.

1.1 Stammzellen

Durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung sind Stammzellen eine wesentliche Grundlage sowohl für die Entwicklung von Geweben und Organen als auch für die Regenerationsfähigkeit zahlreicher Organe. Der Selbsterneuerung kann eine asymmetrische Zellteilung oder eine symmetrische Zellteilung zugrunde liegen (Abb. 1.1).

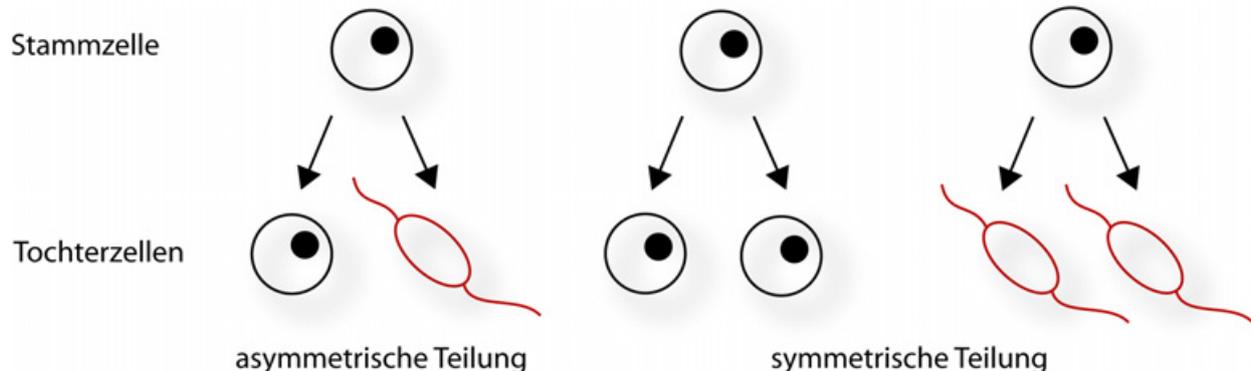


Abb. 1.1: Selbsterneuerung von Stammzellen.

Stammzellen sind in der Lage sich asymmetrisch und symmetrisch zu teilen. Bei der asymmetrischen Zellteilung entsteht eine Stammzelle sowie eine differenzierte Tochterzelle. Die symmetrische Zellteilung kann zu zwei neuen Stammzellen oder zu zwei differenzierten Tochterzellen führen, wobei bei Letzteren das Selbsterneuerungspotential verloren geht.

Bei der asymmetrischen Teilung kommt es zur Generierung einer Tochterzelle mit Stammzeleigenschaften sowie einer differenzierten Tochterzelle, die symmetrische Teilung hingegen bringt zwei Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften hervor (Molofsky *et al.*, 2004). Die symmetrische Teilung einer Stammzelle in zwei differenzierte Tochterzellen führt zum Verlust des Selbsterneuerungspotentials.

Die Befähigung zur Differenzierung ist ein weiteres entscheidendes Kennzeichen einer Stammzelle. Als totipotent wird eine Zelle bezeichnet, die das Potential besitzt, auf der Grundlage von Selbsterneuerung und Differenzierung einen vollständigen Organismus zu generieren. Dazu sind nur die befruchtete Eizelle (Zygote), sowie der frühe Embryo bis hin zum 8-Zell-Stadium (Blastomere) befähigt. Pluripotente Stammzellen hingegen sind ausschließlich in der Lage, in Zellen aller drei Keimblätter, demnach in alle somatischen Zelltypen, zu differenzieren (Abb. 1.2).

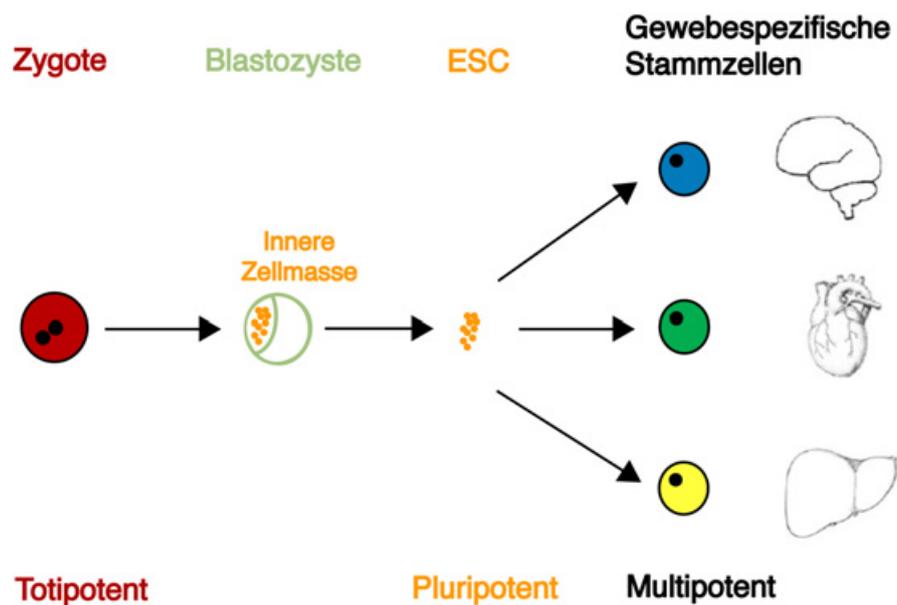


Abb. 1.2: Stammzellhierarchie.

Totipotente Zellen sind in der Lage, einen vollständigen Organismus hervorzubringen. Pluripotente Zellen können sich zu allen somatischen Zelltypen entwickeln, während multipotente Zellen nur noch zu Zelltypen eines bestimmten Organs ausdifferenzieren können.

Das Differenzierungspotential somatischer Stammzellen hingegen ist noch weiter eingeschränkt. Solche multipotenten Zellen können nur in Zelltypen des Keimblatts differenzieren, dem sie selbst zugehören. ESCs sind pluripotent (Bradley *et al.*, 1984) und leicht für genetische Veränderungen zugänglich. Im Jahre 1981 wurden ESCs erstmals aus der Maus isoliert (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Mittlerweile liegen ESCs aus einer Reihe von Spezies vor (Graves *et al.*, 1993; Iannaccone *et al.*, 1994; Pain *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 1995; Wheeler, 1994). James A. Thomson gelang es im Jahre 1998 als erster humane ESCs (hESCs) zu gewinnen (Thomson *et al.*, 1998).

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Pluripotente ESCs werden aus der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste gewonnen (Solter *et al.*, 1978), die sich etwa 5 Tage nach der Befruchtung aus der Zygote bildet (Gilbert, 2003) (Abb. 1.3). Die isolierte Zellmasse wird in Gegenwart sogenannter Feeder-Zellen kultiviert. Bei den Feeder-Zellen handelt es sich meist um primäre, mitotisch inaktivierte embryonale Fibroblasten der Maus, die über die Sekretion von Wachstumsfaktoren und den Zell-Zell-Kontakt das Überleben und die Proliferation der ESCs ermöglichen (Thomson *et al.*, 1998) (Abb. 1.3).

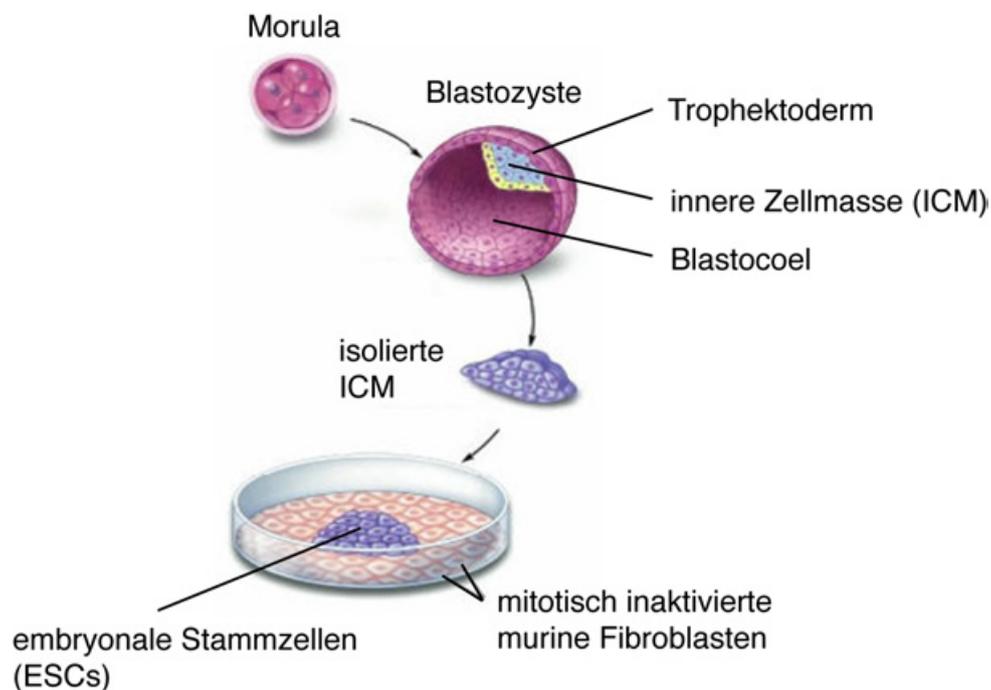


Abb. 1.3: Gewinnung von ESCs aus der Blastozyste

Zur Gewinnung von ESCs wird die innere Zellmasse einer Blastozyste isoliert. Dabei wird das Trophektoderm des Embryos mit einer Kombination aus Antikörpern und Komplement lysiert (Immunosurgery; Solter und Knowles, 1975). Die innere Zellmasse bleibt dabei intakt und wird anschließend auf mitotisch inaktiven Mausfibroblasten kultiviert (verändert nach: National Institutes of Health, 2001).

Da hESCs eine unlimitierte Quelle für die Gewinnung aller Zelltypen des adulten Organismus darstellen, bieten sie eine vielversprechende Grundlage für den Einsatz in der regenerativen Medizin. Im Hinblick auf spätere Transplantationen der generierten hESCs weist die oben beschriebene Methode ein wesentliches Manko auf. Würden die aus diesen hESCs differenzierten Zelltypen auf einen immunologisch nicht identischen Empfänger übertragen, was einer allogenen Transplantation der Zellen entspricht, würde dies zu immunologischen Abwehrreaktionen führen. Diese Abwehrreaktionen könnten zwar über Immunsuppression unterbunden werden, allerdings wäre eine weitaus elegantere Methode die Generierung von

immunologisch gleichen, sog. autologen Zelltypen. Eine Möglichkeit autologe ESCs zu gewinnen, ist der Kerntransfer. Der Nukleus einer somatischen Zelle wird hierbei in eine entkernte Oozyte transferiert. Aus der ICM der sich entwickelnden Blastozyste könnten nun ESCs generiert werden, deren Kerngenom mit dem des Donors übereinstimmt (Stojkovic *et al.*, 2005). Dadurch würden die immunologischen Abwehrreaktionen, die normalerweise bei der Transplantation fremder somatischen Zellen auftreten, umgangen. Das sog. therapeutische Klonen ist jedoch ethisch umstritten. Eine weitere ethisch unbedenkliche Methode zur Gewinnung von autologen und patientenspezifischen ESCs ist die Generierung sog. induzierter pluripotenter Stammzellen (iPSCs; siehe 1.1.3). Auch die Gewinnung pluripotenter Stammzellen aus adulten spermatogonialen Stammzellen könnte ein alternatives Verfahren sein (Guan *et al.*, 2006; Seandel *et al.*, 2007; Conrad *et al.*, 2008; Golestaneh *et al.*, 2008; Kossack *et al.*, 2009).

1.1.2 Adulte Stammzellen

Hoch regenerative Gewebe wie die Haut oder der Darm erfordern die Existenz von Stammzellen im adulten Organismus, damit während der gesamten Lebensspanne die Gewebefunktionen aufrechterhalten werden können. Auch aus Geweben wie dem ZNS, von dem lange angenommen wurde, dass es keinerlei Selbsterneuerungsfähigkeit besitzt, konnten adulte Stammzellen isoliert werden (Gage *et al.*, 1995a; Uchida *et al.*, 2000). Somatische oder gewebespezifische Stammzellen wurden für lange Zeit in der Literatur mit einem nur geringen Differenzierungspotential beschrieben. In jüngerer Zeit wurde jedoch die Meinung, dass somatische Stammzellen in ihrer Differenzierung die Keimblattgrenze nicht überschreiten können, in Frage gestellt (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2002). Die Differenzierung über die Keimblattgrenze hinaus bezeichnet man als Transdifferenzierung (Tsai *et al.*, 2002). So wurde in der Literatur berichtet, dass Zellen des adulten ZNS sowie Zellen der Skelettmuskulatur in hämatopoetische Zellen transdifferenzieren können. Hierbei muss aber angemerkt werden, dass diese Zellen möglicherweise aus einer Zellfusion resultieren, bei der tetraploide, chimäre Zellen entstanden sein könnten, die spezifische Marker der beiden Zelltypen exprimieren, aus denen sie hervorgegangen sind (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003; Terada *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002). Daher ist es nicht möglich, die tatsächliche Plastizität somatischer Stammzellen eindeutig zu definieren.

1.1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass wie die Ontogenese, d.h. die vollständige Entwicklung eines Organismus aus einer befruchteten Eizelle, auch die Differenzierung einer Zelle nicht umkehrbar sei. Dieses Dogma wurde jedoch im Jahre 2006 durch die Reprogrammierung somatischer Zellen widerlegt. Im Labor von Yamanaka wurden die ersten sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) hergestellt (Takahashi *et al.*, 2006). Durch die ektopische Expression von vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, c-myc und Klf4) unter Verwendung retroviraler Vektoren wurden Fibroblasten der Maus reprogrammiert. Solche Zellen befinden sich nach der Reprogrammierung in einem ähnlichen Zustand wie während der frühen Embryonalentwicklung und haben die Fähigkeit wiedererlangt, sich in jeden Zelltyp zu differenzieren. Sie ähneln den ESCs in vielen Eigenschaften, aber in wie weit die iPSCs in allen Eigenschaften mit natürlichen Stammzellen übereinstimmen, gilt noch zu klären. Erste Studien bezüglich des Genexpressionsprofils von iPSCs machen deutlich, dass sie sich von ESCs unterscheiden und als eine Subpopulation von pluripotenten Zellen betrachtet werden müssen (Chin *et al.*, 2009). So konnten Stadtfeld *et al.* (2010) erst kürzlich zeigen, dass sich das Genexpressionsprofil muriner iPSCs von dem muriner ESCs dahingegen unterscheidet, dass der Dlk1-Dio3 Gencluster abweichend stillgelegt war. Übereinstimmend mit der Rolle des Genclusters während der Entwicklung waren die aus diesen iPSCs gebildeten Chimären in ihrer Entwicklung gestört. Durch die Verwendung eines Histondeacetylase-Inhibitors zur Reaktivierung dieses Genlokus konnte dieser Effekt aufgehoben werden. Weitere vergleichende Studien stehen jedoch noch aus. Die ersten generierten iPSCs waren nicht in der Lage, nach der Injektion in die Blastozyste eines Mausembryos eine lebende Chimäre zu erzeugen. Dies gelang der Arbeitsgruppe um Yamanaka erst Mitte 2007 zeitgleich mit zwei weiteren Arbeitsgruppen (Okita *et al.*, 2007; Maherali *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007). Schließlich gelang es mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, humane somatische Zellen zu reprogrammieren (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007), die in der Lage waren, Zellen aller drei Keimblätter zu bilden. Während Yamanaka und sein Team eine retrovirale Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, c-myc und Klf4 verwendeten (Takahashi *et al.*, 2007), gelang Yu *et al.* eine Reprogrammierung von somatische Zellen durch die lentivirale Expression von Oct4, Sox2, Nanog und Lin28 (Yu *et al.*, 2007). Die Effizienz der Reprogrammierung wurde durch den Verzicht auf das Onkogen c-myc deutlich herabgesetzt. Momentan lassen sich Zellen aus unterschiedlichen Geweben erfolgreich zur Pluripotenz umprogrammieren (Aasen *et al.*, 2008; Aoi *et al.*, 2008; Eminli *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*,

2008; Hanna *et al.*, 2008). Die Effizienz der auf Retroviren basierenden Reprogrammierung konnte durch die Zugabe von chemischen Faktoren deutlich erhöht werden (Huangfu *et al.*, 2008; Shi *et al.* 2008).

In Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit von iPSCs ist es jedoch notwendig humane iPSCs (hiPSC) ohne den Einsatz von Vektoren retroviralen Ursprungs herzustellen. Die rasante Forschung an iPSCs führte zunächst dazu, dass Adenoviren statt Retroviren als Vektoren zum Einsatz kamen (Stadtfeld *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden einfache Plasmide verwendet um die zur Reprogrammierung erforderlichen Gene in die Zelle einzubringen, ohne das Genom der Empfängerzelle zu verändern (Okita *et al.*, 2008). Erst vor kurzem gelang es Forschern iPSCs durch das Einbringen von rekombinanten Proteinen zu erzeugen (Zhou *et al.*, 2009). Ein Nachteil dieser alternativen Methoden ist jedoch die weitaus geringere Effizienz im Vergleich zur ursprünglichen Methode der retroviralen Transduktion der Pluripotenzgene.

Die iPSCs weisen zwei wesentliche Vorteile im Vergleich zu ESCs auf: zum einen treten bei ihrer Herstellung ethische Konflikte in den Hintergrund und zum anderen können mit ihrer Hilfe Patienten-spezifische Zellen hergestellt werden (Park *et al.*, 2008). Solche Patienten-spezifische Stammzellen haben über ihr regeneratives Potenzial hinaus noch eine besondere Bedeutung für die Erforschung menschlicher Krankheiten. So ermöglicht die *in vitro* Kultur von Patienten-spezifischen iPSCs krankmachende Prozesse zu untersuchen und systematisch Substanzen zu testen, die solche Prozesse beeinflussen oder blockieren können. In Hinblick auf die medizinische Forschung und die therapeutische Anwendung ist es bereits gelungen iPSCs von Patienten mit verschiedenen genetischen Erkrankungen wie Amyotropher Lateralsklerose (Dimos *et al.*, 2008) oder Spinaler Muskelatrophie (Ebert *et al.*, 2009) zu gewinnen und diese zu Neuronen zu differenzieren. Des Weiteren konnte die Sichelzellenanämie in Kombination mit der Gentherapie (Hanna *et al.*, 2007) und Symptome der Parkinson-Krankheit (Wernig *et al.*, 2008) durch Transplantation iPSC-abgeleiteter Donorzellen bei Mäusen gelindert werden. Trotz aller Vorteile der iPSCs sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass iPSCs zum gegenwärtigen Zeitpunkt die ESCs nicht ersetzen können, die zum Identitätsnachweis bei der Forschung an iPSCs weiterhin unverzichtbar sind.

1.2 Neurale Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen

Neurale Stammzellen (NSCs) sind multipotente Zellen, die zur Selbsterneuerung befähigt sind (Bull *et al.*, 2005). NSCs können in alle drei Zelltypen des Nervensystems, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten, differenzieren. Die ersten Studien zum Konzept der

gemeinsamen NSCs für Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Abb. 1.4) basiert auf isolierten Stammzellen aus dem embryonalen Gehirn der Maus (Johe *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1994; Kilpatrick *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 1992; Temple, 1989). Multipotente NSCs sind sowohl im embryonalen als auch im adulten ZNS zu finden. Multipotente neurale Vorläuferzellen können aus dem embryonalen und adulten Gehirn isoliert werden (Roy *et al.*, 2000a und 2000b; Eriksson *et al.*, 1998; Gritti *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1996; Gage *et al.*, 1995b; Reynolds und Weiss, 1992). Ebenso gelang es NSCs aus dem fetalen und adulten menschlichen Gehirn zu isolieren (Palmer *et al.*, 2001; Brüstle *et al.*, 1998; Flax *et al.*, 1998, Kirschenbaum *et al.*, 1994).

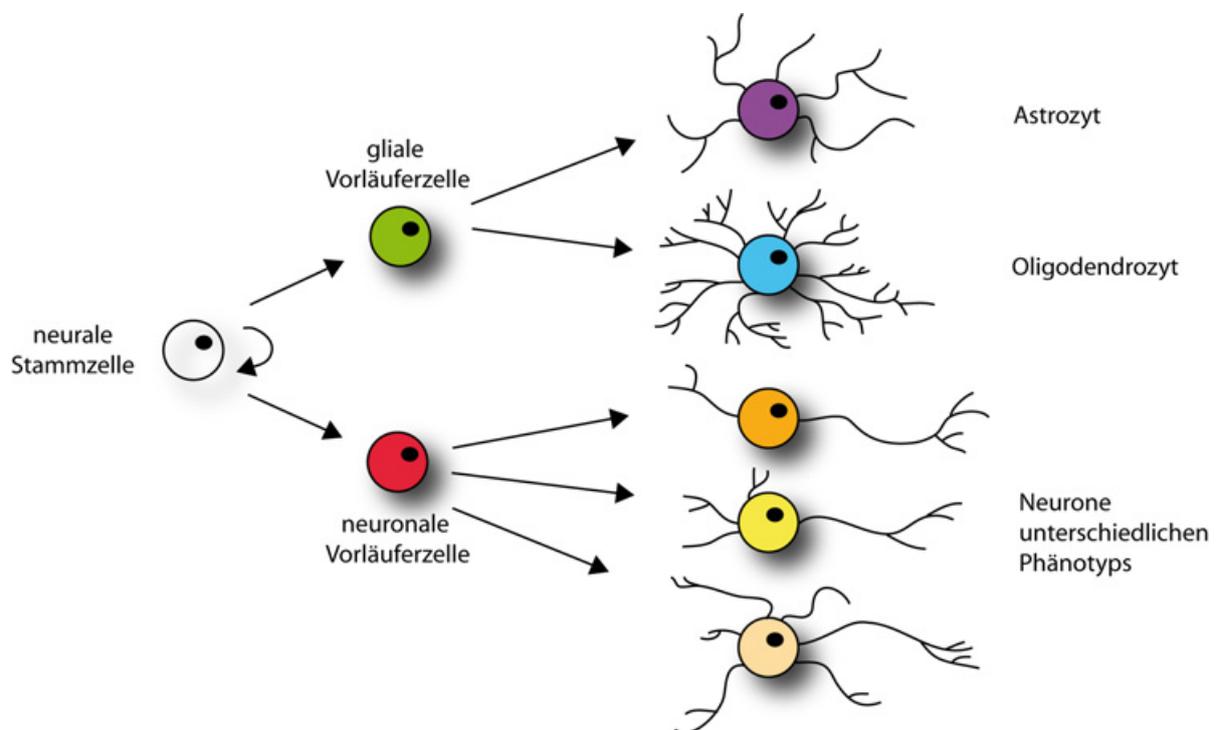


Abb. 1.4: Neurale Stammzellen (NSCs) und ihr Differenzierungspotenzial.

NSCs sind multipotent. Sie können sich entweder selbst erneuern und/oder in Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen ausreifen. Die unreifen Vorläuferzellen besitzen im Vergleich zur Stammzelle ein eingeschränktes Differenzierungspotential.

Für die Gewinnung ESC-abgeleiteter Populationen werden verschiedene Differenzierungsmethoden eingesetzt. Die Bildung von sog. Embryoid-Körperchen (EBs; Keller, 1995), die Kokultur mit anderen Zelllinien (Barberi *et al.*, 2003) und die adhärenente Differenzierung (Ying *et al.*, 2003) sind Beispiele hierfür. In EBs differenzieren sich ESCs spontan in Derivate aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm). Eine gezielte neurale Differenzierung kann durch bestimmte Kultivierungsbedingungen erreicht werden. So konnten neurale Vorläuferzellen aus hESCs *in vitro* gewonnen, weiter kultiviert

und in die drei Hauptzelltypen des Nervensystems differenziert werden (Zhang *et al.*, 2001; Reubinoff *et al.*, 2001; Elkabetz *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2009). Die direkte adhärenzte Differenzierung ist ein alternatives Verfahren, welches es ermöglicht, neurale Zellen aus hESCs ohne EB-Bildung zu erhalten (Perrier *et al.*, 2004). Die hESCs werden hierbei als adhärenz wachsende Kolonien direkt in ein frühes Vorläuferstadium umgewandelt (Gerrard *et al.*, 2005; Benzing *et al.*; 2006; Dhara *et al.*, 2008; Chambers *et al.*, 2009).

1.2.1 Gerichtete Differenzierung und Linienselektion

Im Hinblick auf biomedizinische Applikationen ist es erforderlich, die Differenzierung der hESCs so zu steuern, dass möglichst nur der gewünschte Zelltyp entsteht bzw. es möglich ist, diesen gewünschten Zelltyp von anderen Zellen abzutrennen. Die unter 1.2 beschriebenen Differenzierungsmethoden führen in der Regel zu neuronalen Vorläuferzellen, die in neuronale und gliale Zelltypen ausreifen können. Reine neuronale Subpopulationen können zum einen über die sequentielle Gabe von Wachstumsfaktoren (Brüstle *et al.*, 1999) oder mit Hilfe eines selektierbaren Markers aufgereinigt werden (Wernig *et al.*, 2002; Glaser *et al.*, 2005; Schmandt *et al.*, 2005; Pruszek *et al.*, 2009) (Abb. 1.5).

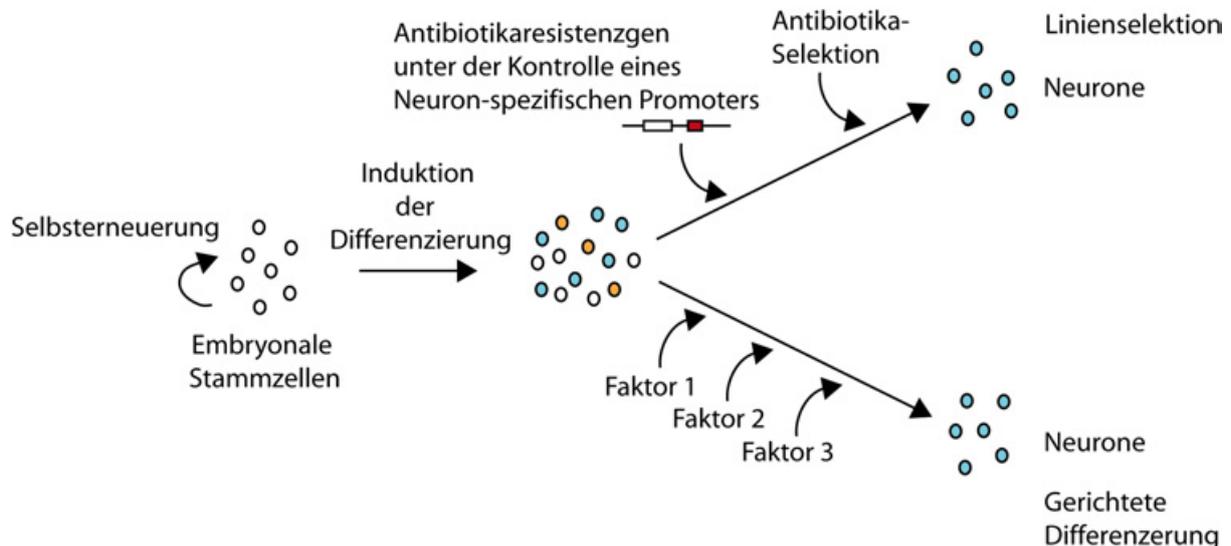


Abb. 1.5: In vitro Differenzierung von hESCs.

Über Verfahren der Linienselektion oder der gerichteten Differenzierung können aufgereinigte hESC-abgeleitete somatische Zellpopulationen gewonnen werden.

Bei der gerichteten Differenzierung werden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie bestimmte Entwicklungsprozesse induzieren bzw. beeinflussen, einzeln oder in Kombination zu kultivierten hESCs hinzugegeben (Abb. 1.5). Beispielsweise werden für die Induktion von spinalen Motorneuronen posteriorisierende und ventralisierende

Faktoren verwendet (Li *et al.*, 2005 und 2008). Eine alternative Methode hierzu ist das Einbringen Zelltyp-spezifischer Transkriptionsfaktoren mithilfe von Vektoren in die Zellen. Für die gerichtete Differenzierung von hESCs in eine Reihe neuraler Subpopulationen gibt es zahlreiche Beispiele (Yan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005 und 2008; Lamba *et al.*, 2006; Izrael *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007).

Die sog. Linienselektion stellt eine alternative Strategie zur Gewinnung eines bestimmten Zelltyps aus hESCs dar. Anhand spezifischer Eigenschaften können so Zellen von unerwünschten Begleitzellen getrennt und in reiner Form isoliert werden. Das grün fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein; EGFP) kodierende Gen kann z.B. in hESCs unter Kontrolle eines gewebe- oder regionalspezifischen Promotors eingebracht werden (Abb. 1.5). Nach Differenzierung der hESCs wird das EGFP-Protein nur in dem gewünschten Zelltyp exprimiert und ermöglicht dessen Selektion über eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS). Charakteristische Oberflächenantigene können ebenfalls verwendet werden, um eine reine Zellpopulation zu erhalten. Eine Zielpopulation kann so mit Antikörpern markiert werden, die wiederum an Fluoreszenzmoleküle oder an magnetische Partikel gekoppelt werden können. Die Aufreinigung erfolgt dann ebenfalls über FACS oder mittels magnetischer Zellsortierung (MACS). Da gegenwärtig nur wenige zelltypspezifische Promotoren bzw. Oberflächenantigene humaner neuraler Subpopulationen bekannt sind, wurde das Verfahren der Linienselektion bisher selten angewandt (Roy *et al.*, 2005; Pruszk *et al.*, 2007).

1.2.2 Therapeutische Anwendungen hESC-abgeleiteter neuraler Populationen

Für das Verständnis der molekularen Grundlagen menschlicher Erkrankungen und für die Wirkstoff- und Arzneimittelentwicklung sind zelluläre Modellsysteme von großer Bedeutung. In Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen des Menschen, die sich auf genomischer, biochemischer und metabolischer Ebene stark von den an tierischen Zellen erhobenen Befunden unterscheiden können, eröffnen ESCs und iPSCs des Menschen, sowie die von ihnen abgeleiteten Populationen Möglichkeiten, aussagekräftige humane Zellmodelle zu etablieren.

Für jeden zelltherapeutischen Ansatz stellt die enorme Komplexität des ZNS eine große Herausforderung dar. Aufgrund der Vielzahl der neuronalen und glialen Zelltypen und ihrer vielfältigen Verbindungen erscheint die Transplantation bereits ausgereifter Zellen wenig sinnvoll. Vielmehr müssen unreife, noch migrationsfähige Vorläuferzellen in das geschädigte Gewebe transplantiert und zur Ausreifung gebracht werden. Für biomedizinische Zwecke ist

es daher erforderlich, die Differenzierung von hESCs so zu steuern, dass möglichst nur der gewünschte Zelltyp entsteht. Die Gewinnung neuraler Subtypen aus hESCs ist daher von großer Bedeutung (vgl. 1.2.1).

Für neurale Transplantationsstrategien wurde bislang fetales Spendergewebe eingesetzt. Die aus dem embryonalen Gehirn isolierten Stammzellen können sowohl in Neurone als auch in Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren (Johe *et al.*, 1996). Bei Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Morbus Parkinson befinden sich solche Transplantationsstrategien bereits im klinischen Einsatz (Bachoud-Levi *et al.*, 2006; Freed *et al.*, 2001, Dunnett *et al.*, 2001). Die aus dem ventralen Mesencephalon humaner Feten gewonnenen Vorläufer überlebten mehrere Jahre und konnten eine Verminderung der Bewegungsstörungen herbeiführen (Lindvall *et al.*, 1994). Dabei wird für einen Patienten das Gewebe von sechs oder mehr menschlichen Feten benötigt (Kordower *et al.*, 1996). Fetales Spendergewebe ist jedoch aufgrund der rechtlichen Lage nur begrenzt verfügbar. HESC-abgeleitete NSCs (hESC-NSCs) stehen dagegen in nahezu unlimitierter Zahl zur Verfügung. Über ihr regeneratives Potenzial hinaus können HESC-NSCs zur Analyse grundlegender entwicklungsbiologischer und pathologischer Prozesse herangezogen werden. Des Weiteren könnte die Verfügbarkeit dieser Zellen die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe für die Behandlung von neurologischen Erkrankungen beschleunigen. Neurale Zellen aus pluripotenten Stammzellen könnten auch für den zellvermittelten Gentransfer zum Einsatz kommen, z.B. für zellbasierte Enzymsubstitution bei metabolischen Erkrankungen wie der metachromatischen Leukodystrophie und dem Morbus Krabbe. Aussichtsreiche tierexperimentelle Befunde dafür liegen schon vor (Klein *et al.*, 2006). Verschiedene hESC-abgeleitete neurale Subtypen konnten bereits *in vitro* generiert werden. So wurden dopaminerge Neurone aus hESCs gewonnen (Yan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005 und 2008; Lee *et al.*, 2007) und im Tiermodell getestet (Schulz *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2008).

Die Generierung von Gliazellen, insbesondere die von Oligodendrozyten, sind für die Behandlung dysmyelinisierender Krankheiten, wie der Pelizaeus-Merzbacherschen-Erkrankung, von besonderer Bedeutung. Myelinisierende Oligodendrozyten wurden erstmals im Jahre 1999 aus ESCs der Maus abgeleitet (Brüstle *et al.*, 1999). Erst 2005 gelang die Isolierung oligodendrogialer Vorläufer aus hESCs (Nistor *et al.*, 2005; Keirstead *et al.*, 2005). Durch Transplantation dieser Zellen in myelindefiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass die transplantierten Zellen in der Lage waren Myelin zu bilden (Nistor *et al.*, 2005). Keirstead *et al.* (2005) konnten nach Transplantation der hESC-abgeleiteten

Oligodendrozyten in Kontusionsläsionen des Rückenmarks von Ratten eine verbesserte Remyelinisierung und einen Rückgang der motorischen Symptome nachweisen. Nahezu zeitgleich veröffentlichten Kang *et al.* und Izrael *et al.* im Jahre 2007 weitere Protokolle zur Gewinnung von Oligodendrozyten aus hESCs (Kang *et al.*, 2007; Izrael *et al.*, 2007). Diese Protokolle zeichnen sich jedoch dadurch aus, dass hierbei zur oligodendroglialen Differenzierung von hESC die pluripotenten Stammzellen direkt in oligodendrogliale Zellen überführt werden, ohne dass dabei eine stabile neurale oder gliale Population gebildet wird (sog. „run-through“ Protokolle). Dieser Prozess ist sehr langwierig, und damit auch mit starken batch-to-batch Variationen verbunden. Zudem ist die Effizienz mit der die oligodendroglialen Zellen gewonnen werden gering.

1.3 Zytoskelett

1.3.1 Neurale Zytoskelettmoleküle

Mikrotubuli sind einer der Hauptkomponenten des Zytoskeletts und in diverse zytosolische Funktionen involviert, wie der Erhaltung der Zellmorphologie, dem Transport von Organellen innerhalb der Zelle und der Zellteilung (Lodish *et al.*, 2001). Mikrotubuli setzen sich aus Dimeren von α - und β -Tubulin zusammen. Posttranslationale Modifikationen können die Struktur und die Funktionen von Mikrotubuli beeinflussen (Luduena, 1998; MacRae, 1997; Rosenbaum, 2000). Tubuline gehören zur Gruppe der sogenannten Multigenfamilie. Zur Tubulin Superfamilie gehören neben α - und β -Tubulin noch weitere Proteine, wie γ , δ , ϵ und η (Oakley *et al.*, 1989 und 2000; Dutcher *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2000). Die meisten dieser Tubuline zeigen eine distinkte subzelluläre Lokalisation und weisen unterschiedliche Funktionen auf (McKean *et al.*, 2001). Eukaryotische Zellen exprimieren multiple Isotypen von $\alpha\beta$ -Tubulin (Luduena, 1998). Im Säugetier-Gehirn wurde die Expression von fünf α -Tubulin-Isotypen (Villasante *et al.*, 1986) und fünf β -Tubulin-Isotypen (Sullivan, 1988) nachgewiesen. Das β III-Tubulin wird als einziges phosphoryliert und ausschließlich von Neuronen exprimiert (Burgoyne *et al.*, 1988; Sullivan *et al.*, 1986 und 1988; Lee *et al.*, 1990a, b; Kameda *et al.*, 1994). Jiang *et al.* (1992) konnten zeigen, dass sich die Expression von Tubulin-Genen, insbesondere die der β -Tubulin-Gene, während der postnatalen Entwicklung im peripheren und zentralen neuronalem Gewebe von Säugetieren unterscheiden. Diese und andere Hybridisierungsstudien konnten zudem nachweisen, dass der Isoctype α 1-Tubulin vornehmlich in Neuronen des Gehirns exprimiert wird (Mikucki *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1992; Kost *et al.*, 1993). Auch im humanen

Organismus wurden eine α -Tubulin ($\alpha 1$) und eine β -Tubulin Isoform (βIII) identifiziert, die auf Zellen neurologischen Ursprungs begrenzt zu sein scheinen (Cowan *et al.*, 1983; Hall *et al.*, 1985; Lewis *et al.*, 1985). Studien mit neugeborenen und adulten Ratten weisen darauf hin, dass die Expression von neuronalen Tubulin-Isoformen in sich entwickelnden und reifen Neuronen unterschiedlich ist (Gozes *et al.*, 1978; Wolff *et al.*, 1982; Audebert *et al.*, 1994; Farina *et al.*, 1999). Dabei war die Expression von $\alpha 1$ -Tubulin im sich entwickelnden Nervensystem dort am Höchsten, wo Neurone ein extremes morphologisches Wachstum zeigten (Miller *et al.*, 1987; Gloster *et al.*, 1994). Während der Ausreifung zum postmitotischen Neuron hingegen wurde die Expression von $\alpha 1$ -Tubulin wieder herunterreguliert (Miller *et al.*, 1987; Gloster *et al.*, 1994 und 1999). $\alpha 1$ -Tubulin scheint demnach ein früher neuronaler Marker zu sein. Studien zeigen, dass sich der Promoter von $\alpha 1$ -Tubulin zur Anreicherung einer neuronalen Zellpopulation eignet (Wang *et al.*, 1997). Hierbei wurde das Gen für EGFP unter die Kontrolle des $\alpha 1$ -Tubulin-Promoters in embryonale Zellen des Vorderhirns der Ratte eingebracht. Die anschließende Selektion über FACS ermöglichte die Isolierung von neuronalen Vorläuferzellen. Zur Selektion und Anreicherung von neuronalen Vorläuferzellen aus dem humanen Hippocampus und der humanen Ventrikularzone konnte $\alpha 1$ -Tubulin ebenfalls als gewebespezifischer Promotor verwendet werden (Roy *et al.*, 2000a und 2000b).

1.4 Zelladhäsion

Eine Schlüsselfunktion bei der Evolution vielzelliger Organismen ist die Fähigkeit von Zellen, untereinander spezifische und feste Kontakte ausbilden zu können. So nehmen zahlreiche Zelladhäsionsvorgänge nicht nur entscheidend an der Bildung von Geweben und Organen in sich entwickelnden Embryonen sondern auch an der Reparatur von Verletzungen in ausdifferenzierten Geweben teil. Diese Vorgänge spielen eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie der Proliferation, Differenzierung, Zellaggregation und Zellmigration. Im adulten Organismus ist die Dynamik von Adhäsionsprozessen im Gegensatz zu embryonalen Geweben essentiell für viele physiologische Vorgänge, wobei der Wundheilungsprozess als nur ein Beispiel genannt werden soll.

Die Zelladhäsion erfolgt mittels verschiedener integraler Membranproteine, die unter dem Begriff Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) zusammengefasst werden (siehe 1.4.1). Die Zell-Zell-Adhäsion ist eine Kontaktaufnahme zwischen Adhäsionsmolekülen unmittelbar benachbarter Zellen. Hierbei wird wiederum zwischen homophiler Adhäsion von Zellen

(Adhäsion zwischen Zellen des gleichen Typs) und heterophiler Adhäsion zwischen unterschiedlichen Zelltypen unterschieden. Die Kontaktaufnahme, bei der Adhäsionsproteine mit Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM) interagieren, wird hingegen als Zell-Matrix-Adhäsion bezeichnet. Eine einzelne Zelle verwendet beide Mechanismen, um an andere Zellen und an die EZM zu binden (Abb. 1.6).

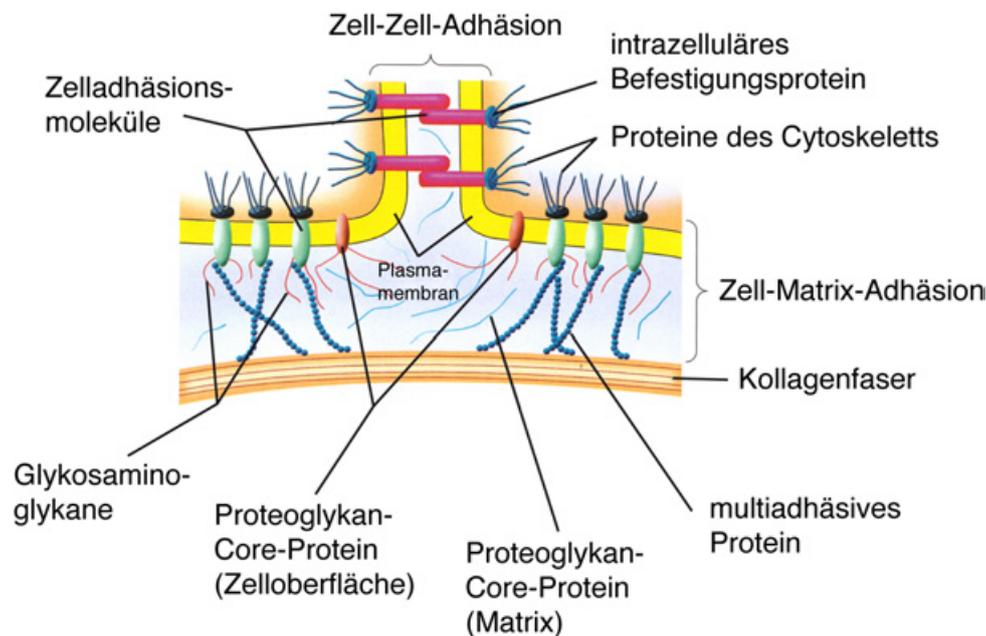


Abb. 1.6: Zelladhäsionsmoleküle, die Zellen untereinander und mit der EZM verbinden.

Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) sind integrale Membranproteine, die sowohl Zell-Zell-Adhäsion als auch Zell-Matrix-Adhäsion vermitteln können, und die über intrazelluläre Anheftungsproteine eine Verankerung für Proteine des Cytoskeletts bilden. Die Gesamtheit der Wechselwirkungen ermöglicht eine Anheftung und Interaktion von Zellen untereinander; zudem verleihen sie dem Gewebe Festigkeit und Widerstand gegen Scherkräfte (verändert nach: Lodish, 2001).

1.4.1 Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)

Funktionell und strukturell werden die CAMs von den Substratadhäsionsmolekülen (SAMs) und den Zellverbindungsmolekülen (CJMs) abgegrenzt. Bei den SAMs handelt es sich um Proteine der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. Dazu gehören Proteoglykane, Kollagene, Fibronectin, Tenascin und Laminin. CJMs bilden im Gegensatz dazu feste intrazelluläre Brücken in Form von Desmosomen, Tight- oder Gap-Junctions. CAMs bilden dahingegen eher lockere Verbindungen. Durch sie erkennen Zellen ihre Umgebung, beispielsweise benachbarte Zellen. Bei den CAMs handelt es sich häufig um Transmembran-Glykoproteine, die auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite eine Domäne von variabler Länge besitzen. Einige der CAMs durchspannen jedoch nicht die Zellmembran, sondern sind über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI-)Anker an der Membran befestigt.

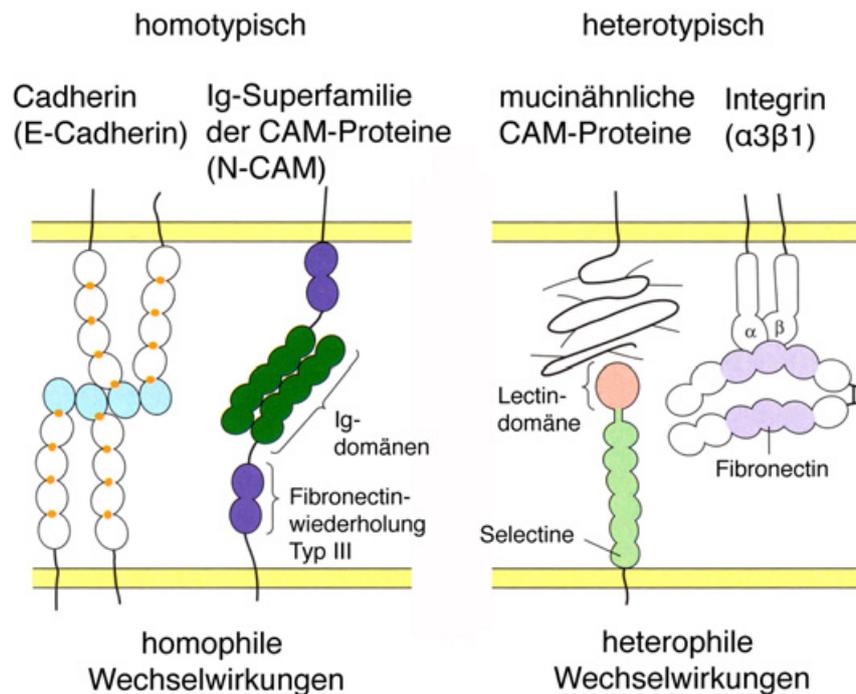


Abb. 1.7: Die wichtigsten Familien von Zelladhäsionsproteinen (CAMs).

Integrale Membranproteine sind aus verschiedenen Domänen zusammengesetzt. Homotypische Wechselwirkungen zwischen den Zellen werden von den Cadherinen und den Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie von Zelladhäsionsproteinen vermittelt. Selectine und Integrine gehen hingegen heterotypische Wechselwirkungen ein. Das Integrin ist das wichtigste Anheftungsprotein zwischen Zelle und Matrix (verändert nach: Lodish, 2001).

Aufgrund verschiedener struktureller Gemeinsamkeiten lassen sich bei den CAMs fünf Hauptklassen unterscheiden (Abb. 1.7): Cadherine, die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), Selectine, Mucine und Integrine.

1.4.2 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)

Neurale Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) vermitteln sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Nervensystem kalziumunabhängige homo- und heterophile Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Williams *et al.*, 1988; Brummendorf *et al.*, 1995; Crossin *et al.*, 2000). Die IgSF ist die größte bisher identifizierte Proteinfamilie mit mehr als 100 Mitgliedern (Williams *et al.*, 1988). Moleküle dieser Superfamilie werden durch drei gemeinsame Struktur motive charakterisiert (Abb. 1.8). Dabei erfolgt die Kategorisierung anhand der Anzahl vorhandener Immunglobulindomänen (Ig-Domänen), der Zahl an Fibronectin-artigen Typ-III-Domänen (Fn-Domäne) sowie mittels ihrer Cytoplasma-assoziierten Katalyse-Domäne (Cunningham, 1995; Crossin *et al.*, 2000). Die Ig-Domäne im extrazellulären Proteinbereich besteht aus 70 bis 100 Aminosäuren. Die Aminosäuren bilden dabei zwei antiparallele β -Faltblätter, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Vaughn *et al.*, 1996). Das zweite Strukturmotiv, die Fn-Domäne, ist in den meisten, obgleich nicht allen

IgSF-Mitgliedern vertreten (Crossin *et al.*, 2000). Die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle beim Auswachsen von Neuriten, sowie bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuraler Verbindungen (Baldwin *et al.*, 1996). Zu den Mitgliedern der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle zählen NCAM (neural cell adhesion molecule), L1 sowie NgCAM (neuron glia cell adhesion molecule).

Das Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 200 kDa, welches zu Beginn der 80er Jahre im Nervensystem entdeckt wurde (Salton *et al.*, 1983; Lindner *et al.*, 1983; Grumet *et al.*, 1984; Rathjen *et al.*, 1984). Das L1-Molekül ist Begründer einer Untergruppe der IgSF, der L1-Familie, die aus vier Mitgliedern besteht: L1, NrCAM (**n**euron-**g**lia cell adhesion molecule **r**elated cell **a**dhesion **m**olecule), Neurofascin, CHL1 (**c**lose **h**omologue of **L1**) und Neuroglian (Abb. 1.9). Diese Moleküle spielen ebenso wie NCAM eine wesentliche Rolle bei der Axonfaszikulierung und beim Neuritenwachstum, sowie bei der neuronalen Migration und bei der synaptischen Plastizität.

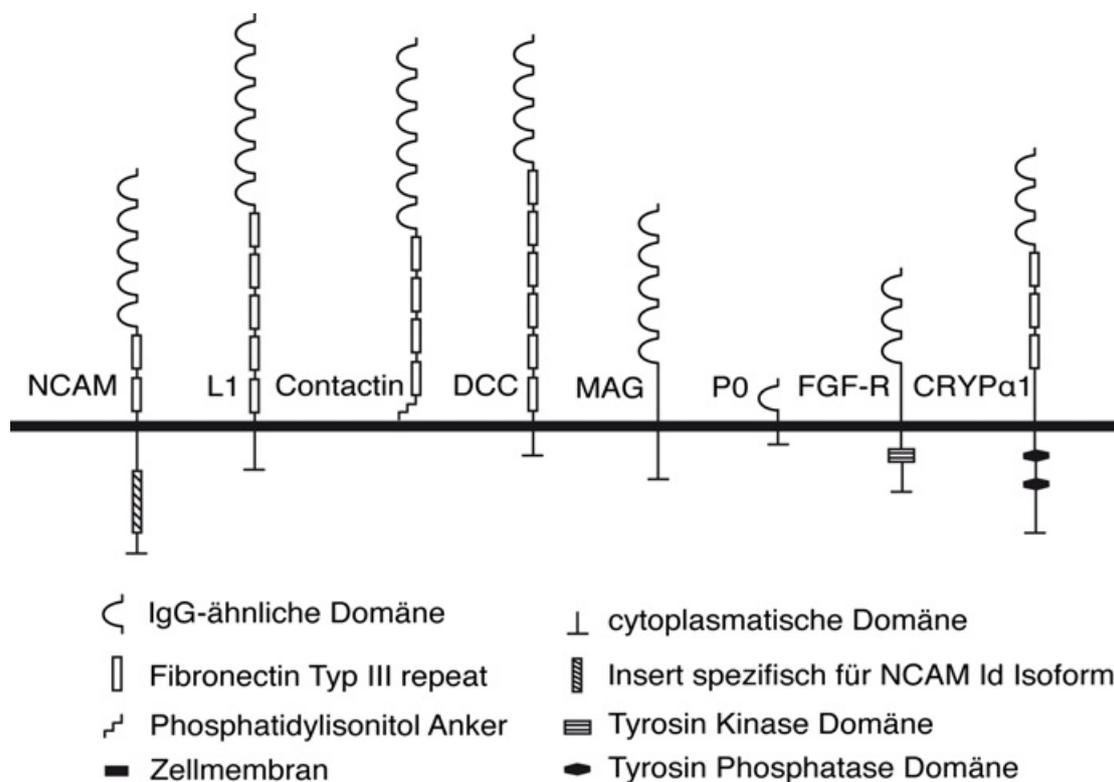


Abb. 1.8: Übersicht der Subfamilien neuronaler Zelladhäsionsmoleküle der IgSF.

Die Unterteilung der verschiedenen Untergruppen dieser Superfamilie erfolgt anhand der Anzahl ihrer Ig- und Fn-Domänen, der Art der Verankerung des Moleküls in der Membran, sowie der Eigenschaft der zytoplasmatischen Domäne, eine enzymatische Reaktion durchführen zu können (verändert nach: Crossin *et al.*, 2000).

L1 ist in zahlreiche Prozesse des sich entwickelnden und adulten Nervensystems involviert, wie Zellmigration (Lindner *et al.*, 1983; Asou *et al.*, 1992; Thelen *et al.*, 2002), Axonwachstum (Fischer *et al.*, 1986; Lagenaur *et al.*, 1987), Axonfaszikulierung (Chang *et al.*, 1987; Kunz *et al.*, 1996), Synaptogenese und Myelinisierung (Wood *et al.*, 1990). Darüber hinaus greift L1 in Prozesse wie die Regeneration von Nervenzellen (Martini *et al.*, 1988) und das Zellüberleben ein. Bei Lern- und Gedächtnisleistungen wird L1 ebenfalls eine Rolle zugeschrieben (Rose, 1995; Luthi *et al.*, 1996). Die Funktionen von L1 scheinen vor allem durch homo- und heterophile Interaktionen vermittelt zu werden (vgl. Abb. 1.10).

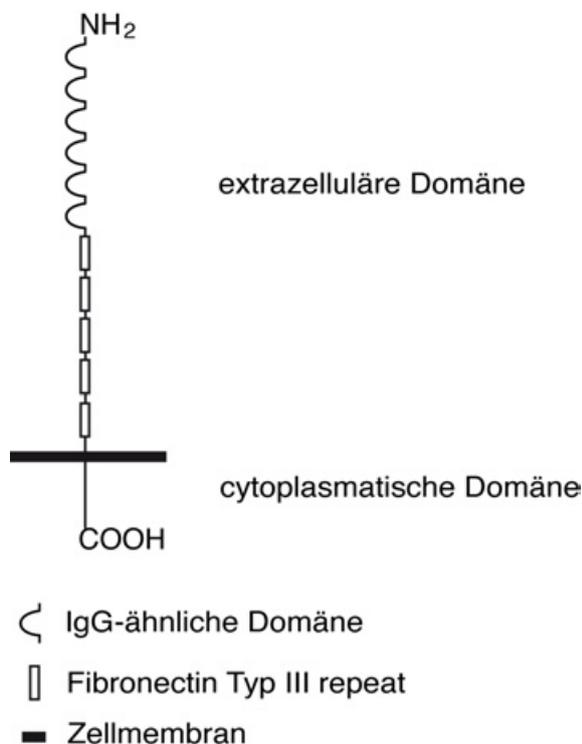


Abb. 1.9: Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1. Die Mitglieder der L1-Familie besitzen sechs Ig-Domänen, sowie mindestens vier Fn-Domänen, die mit einer Transmembrandomäne verbunden sind, gefolgt von einer phylogenetisch stark konservierten cytoplasmatischen Domäne.

Verschiedene Formen der Integrine, sowie Komponenten der EZM wie Laminin und zahlreiche Proteoglykane, wie Neurocan und Phosphacan zählen zu den Bindungspartnern des L1-Moleküls (Friedlander *et al.*, 1994; Brummendorf *et al.*, 1996; Felding-Habermann *et al.*, 1997; Kadmon *et al.*, 1997; Kamiguchi *et al.*, 1997; Thelen *et al.*, 2002; Ruppert *et al.*, 1995; Ebeling *et al.*, 1996). Des Weiteren interagiert L1 mit Liganden wie Contactin (F3/F11) (Brummendorf *et al.*, 1993), DM1-GRASP (DeBernardo *et al.*, 1996), und TAG-1 (Axonin-1) (Kuhn *et al.*, 1991; Kunz *et al.*, 1996). Ebenfalls beschrieben sind Interaktionen von L1 mit NCAM (Kadmon *et al.*, 1990), CD9 (Schmidt *et al.*, 1996) sowie mit CD24 (Nectadrin) (Kadmon *et al.*, 1995; Sammar *et al.*, 1997). L1 scheint wie NCAM und andere Transmembranproteine auch, als Rezeptor an zahlreichen Signaltransduktionsprozessen beteiligt zu sein (Abb 1.10; Kalus *et al.*, 2003).

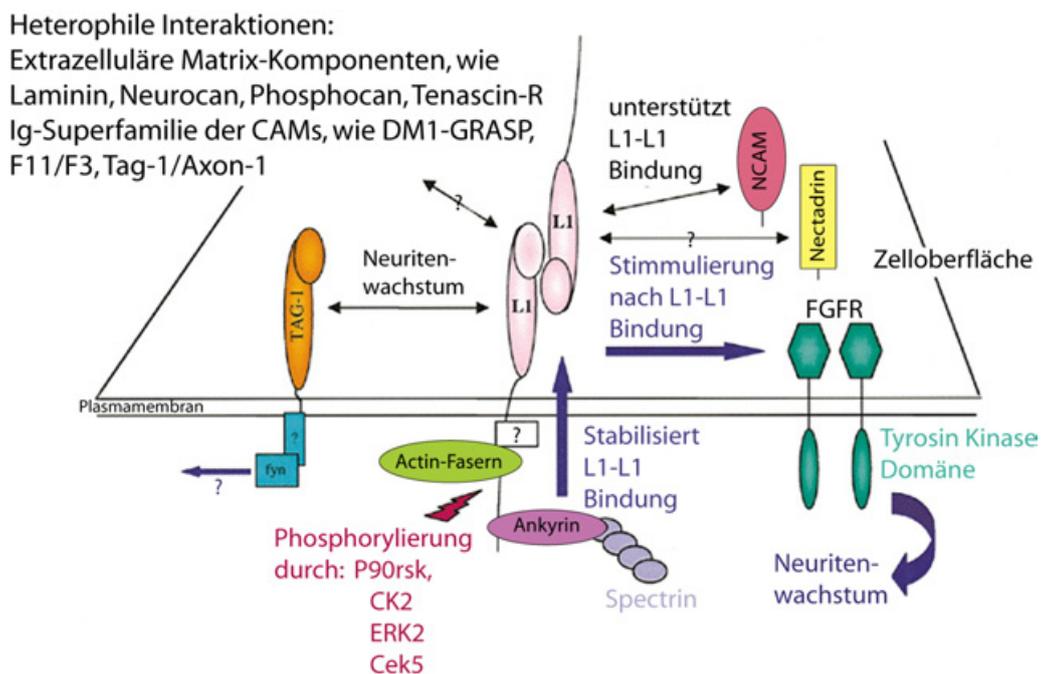


Abb. 1.10: L1 als adhäsives Molekül und signaltransduzierender Rezeptor

L1-abhängiges Neuritenwachstum durch die Aktivierung von FGF-Rezeptoren wird durch die homophile Interaktion zweier L1-Moleküle initiiert (Doherty *et al.*, 1996; Saffell *et al.*, 1997; Brittis *et al.*, 1996). Die zytoplasmatische Domäne interagiert darüber hinaus mit dem Zytoskelett und unterstützt so Vorgänge wie die Zelladhäsion, die essentiell für die Faszikulierung von Axonen und das Neuritenwachstum sind (Dahlin-Huppe *et al.*, 1997). Diese Zytoskelett-Interaktion wird über eine Ankyrin-Bindungsdomäne in der zytoplasmatischen Domäne vermittelt (Davis *et al.*, 1994). Desweiteren konnte für L1 eine Interaktion mit Aktin- und Myosin-Stressfasern beschrieben werden. Durch verschiedene Kinasen, wie Casein-Kinase II, p90rsk (Wong *et al.*, 1996) und Eph-Kinase Cdk5 (Zisch *et al.*, 1997) kann die zytoplasmatische Domäne phosphoryliert werden (verändert nach: Kenwick *et al.*, 2000).

Durch die regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne des Moleküls entstehen neben der membrangebundenen 200 kDa Form L1-200 weitere L1-Formen (Richter-Landsberg *et al.*, 1984; Montgomery *et al.*, 1996). Die Abbildung 1.11 gibt einen Überblick über die durch Proteolyse entstehenden, nach ihrem Molekulargewicht benannten, löslichen L1-Fragmente. Nachgewiesen werden konnten die löslichen Formen des L1 Moleküls in den Überständen von Gehirnhomogenaten der Maus (Rathjen und Schachner, 1984; Faissner *et al.*, 1985; Sadoul *et al.*, 1988), der Ratte (Liljelund *et al.*, 1994) und des humanen Kleinhirns (Wolff *et al.*, 1988). Eine Disregulation der Spaltung des Zelladhäsionsmoleküls scheint in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen involviert zu sein. So wurden lösliche L1-Fragmente in Zellkulturüberständen von murinen und humanen Tumorzelllinien detektiert (Montgomery *et al.*, 1996; Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2000). Außerdem wurden erhöhte Mengen löslicher L1-Fragmente im Serum von an Ovar- oder Uteruskarzinomen, an Nierentumoren (Meli *et al.*, 1999) und an Neuroblastomen (Hoefnagel *et al.*, 2001) erkrankten Patienten,

sowie in der Zerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten (Nybroe *et al.*, 1989) gefunden.

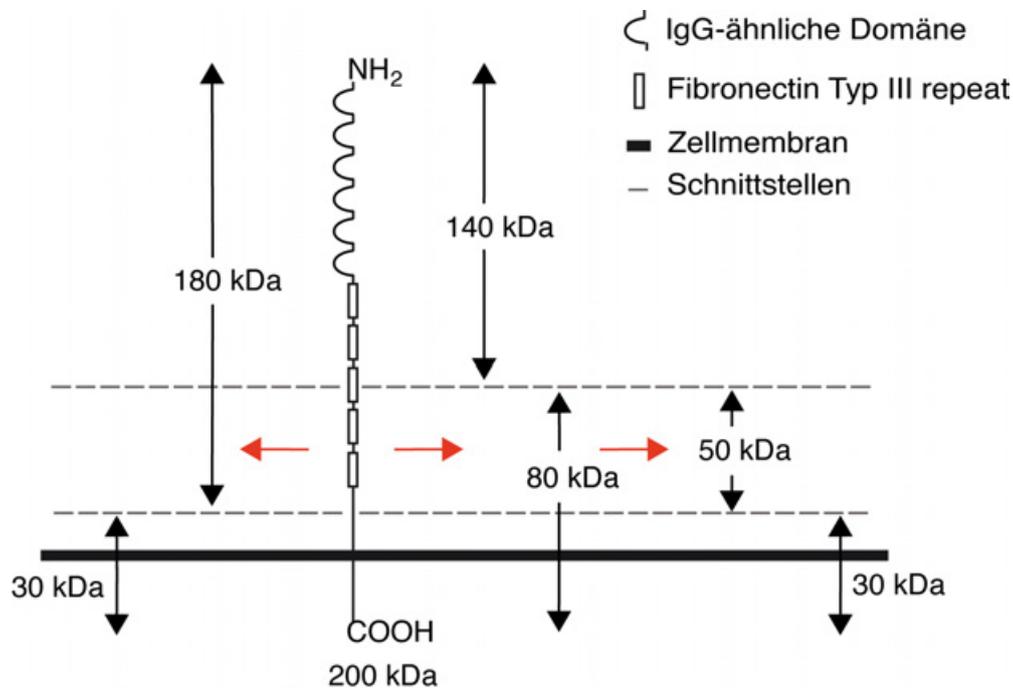


Abb. 1.11: Lösliche Fragmente des Moleküls L1.

Durch die regulierte Proteolyse der extrazellulären Domäne entstehen lösliche Fragmente des Moleküls L1. Zu der Entstehung eines löslichen 140 kDa-Fragmentes (L1-140) und eines membranengebundenen 80 kDa-Fragmentes (L1-80) kommt es durch eine Spaltung in der dritten Fibronectindomäne. In der Nähe der Transmembrandomäne ist eine weitere Spaltstelle lokalisiert. Zwei weitere lösliche Fragmente mit einem Molekulargewicht von 180 kDa und 50 kDa (L1-50), sowie ein membranständiges 30 kDa-Fragment (L1-30) werden durch die Spaltung des 200 kDa Moleküls (L1-200) und des 80 kDa-Fragmentes in der Nähe des Membranankers generiert (verändert nach: Kalus *et al.*, 2003).

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten Verfahren zur Gewinnung hochaufgereinigter neuronaler Zellen aus hESCs entwickelt und die daraus resultierenden Populationen charakterisiert werden. Zum einen sollte geklärt werden, ob α 1-Tubulin als selektierbarer Marker für die Gewinnung von humanen neuronalen Zellen eingesetzt werden kann. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass α 1-Tubulin spezifisch in sich entwickelnden Neuronen exprimiert wird (Gloster *et al.*, 1999 und 1994; Miller *et al.*, 1989; Hieber *et al.*, 1998; Przyborski *et al.*, 1996). α 1-Tubulin wurde bereits als Marker zur Selektion von frühen Neuronen aus murinen ESCs eingesetzt (Schmandt *et al.*, 2005). Zum anderen sollten hochaufgereinigte hESC-abgeleitete neuronale Zellen über eine Linienselektion gewonnen, angereichert und charakterisiert werden. Es sollte ein Selektionsverfahren zum Einsatz kommen, das ohne genetische Modifikationen der Zellpopulation auskommt. Es wurde

geprüft, ob und in wie weit das Oberflächenmolekül L1 dafür geeignet ist. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass das Zelladhäsionsmolekül L1 im ZNS auf einer Gruppe von sich entwickelnden Neuronen, aber auch auf Axonen zahlreicher Nervenzellen des adulten Nervensystems exprimiert wird (Rathjen *et al.*, 1984; Jüngling *et al.*, 2003).

1.5.1 T α 1-basierte Selektion hESC-abgeleiteter Neurone

Die Kombination von gerichteter Differenzierung und Linienselektion sollte eingesetzt werden, um hochaufgereinigte hESC-abgeleitete Neurone zu generieren. Insbesondere wurde die Verwendbarkeit des T α 1-Tubulin Promotors für die Linienselektion von Neuronen untersucht werden. HESC-abgeleitete NSCs wurden hierfür vordifferenziert und mit einem Konstrukt transient transfiziert, das EGFP unter der Kontrolle des T α 1-Tubulin Promotors exprimiert. Die T α 1-EGFP-positiven Zellen sollten in einem weiteren Schritt anhand der Expression verschiedener neuronaler Marker näher charakterisiert werden. Zur Gewinnung einer reinen neuronalen Population sollten die T α 1-EGFP-positiven Zellen durch FACS-Sortierung isoliert und charakterisiert werden.

1.5.2 L1-basierte Selektion hESC-abgeleiteter Neurone

Für den zweiten Teil der Arbeit sollte die Verwendbarkeit des Zelladhäsionsmoleküls L1 für die Linienselektion von Neuronen untersucht werden. Zur Gewinnung einer reinen neuronalen Population sollten vordifferenzierte hESC-abgeleitete NSCs unter Verwendung eines L1-Antikörpers durch FACS isoliert und anhand der Expression verschiedener neuronaler Marker näher charakterisiert werden. Die funktionale Ausreifung und die synaptische Plastizität der L1-positiven Zellen sollten durch *in vitro* sowohl in Ko-Kultur mit murinen Astrozyten als auch im Gewebe anhand organotypischer Schnittkulturen des Hippocampus untersucht werden. Des Weiteren sollte ein effektives Kryokonservierungsprotokoll für Neurone entwickelt werden. Da die Generierung von hESC-NSCs eine zeitaufwendige Methode darstellt, sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob Neurone auch direkt aus adhärent neural differenzierten hESCs gewonnen und über das Zelladhäsionsmolekül L1 aufgereinigt werden können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeines

Alle Arbeiten mit hESCs wurden im Einklang mit dem deutschen Stammzellgesetz und im Rahmen von Projekten, die durch das Robert-Koch Institut genehmigt wurden, durchgeführt. Für die Zellkultur verwendete Geräte, Materialien und Lösungen wurden vor der Verwendung auf geeignete Weise (Autoklavieren, Hitzesterilisation, Sterilfiltrieren) sterilisiert oder bereits steril vom Hersteller bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Gewebekulturschalen, 4, 12- und 24-well Platten, Chamber Slides und Falcon-Röhrchen wurden überwiegend von den Firmen BioRad Laboratories GmbH (München), Corning (New York, USA), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Nürtingen) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
3,5 cm, 6 cm Zellkulturschalen	BD Bioscience (Heidelberg)
15 cm Zellkulturschalen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
1 ml Injektionsnadeln	BD Bioscience (Heidelberg)
96 well qPCR-Platte	peqLab (Erlangen)
Adhäsiv PCR-Film	peqLab (Erlangen)
Chamber Slides	Nunc (Wiesbaden)
Deckgläser	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Einmal-Pipetten	Falcon (Heidelberg)
Einmal-Pipettenspitzen	ART (San Diego, USA)
Falcon-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Filtereinheit (0,2 µm)	Nalgene (Hereford, UK), Pall Corporation Life Science (Dreieich)
Gummilösung (Fixogum)	Marabuwerke (Tamm)
Kanülen Microlance 3	BD Bioscience (Heidelberg)
Kryoröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Nitrocellulose-Membran	BioRad (München)

Nylonzellsieb (40 µm)	BD Bioscience (Heidelberg)
Objektträger	Menzel (Braunschweig)
Parafilm	American National Can (über Brand, Wertheim)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Reaktionsgefäßstreifen für die qPCR	Biozym Scientific (Oldendorf)
Sechs-Well-Zellkulturplatten	Nunc (Wiesbaden)
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	BD Bioscience (Heidelberg)
Stericup-Filtereinheit (0,22 µm)	Millipore (Schwalbach)
T175 Flaschen	BD Falcon (Heidelberg)
Thermanox Plastik Deckgläser	Nunc (Wiesbaden)
Vier-Well-Zellkulturplatten	Nunc (Wiesbaden)
Vierundzwanzig-Well-Zellkulturplatten	BD Bioscience (Heidelberg)
Zellsiebe (40 µm)	BD Bioscience (Heidelberg)
Zwölf-Well-Zellkulturplatten	BD Bioscience (Heidelberg)

2.1.3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
A/D Wandler Elektrophysiologie (Sunnydale, USA)	Digidata 1320A	Molecular Devices
Bildbearbeitung (San Jose, USA)	Photoshop CS3	Adobe Systems Inc.
	Openlab 4.01	Improvision (Coventry, GB)
	Zeiss	Carl Zeiss (Jena)
	CytoVision Ultra	Applied Imaging Inc. (San Jose, USA)
	PClamp Software 9	Molecular Devices (Synnyvale, USA)
Binokular	SMZ 1500	Nikon (Düsseldorf)
Bühler Schüttler	EB KS-15 Control	Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Brutschränke	HERAcell	Heraeus Instruments (Hanau)
	HERAcell	Thermo Electron (Waltham, USA)
CCD-Kamera	KP-M2RP	Hitachi (Düsseldorf)
Datenauswertung		
Durchflusszytometrie	Flowjo	Tree Star Inc (Ashland, USA)

Digital Kamera	C 5050 Zoom	Olympus Optical (Hamburg)
	Canon Power	Canon (Krefeld)
Shot G5		
Durchflusszytomter	LSRII	Becton Dickinson (Heidelberg)
Einfriereinheit	Cryo 1 °C Freezing	Nalgene (Hereford, UK)
Container		
Elektrophorese-Apparatur	Agargel Mini	Biometra (Göttingen)
Färbe-Küvetten		Sigma (München)
Fluoreszenz-aktivierter		
Zellsortierer (FACS)	DiVa	Becton Dickinson (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskope	Axioskop 2	Carl Zeiss (Göttingen)
	Axiovert 135	Carl Zeiss (Göttingen)
	Axiovert 200M	Carl Zeiss (Göttingen)
Gel Dokumentation	Geldoc2000	BioRad (München)
Glasmikroelektroden	GC150TF	Modulom (Aarhus, DK)
Heizblock	UNITEK HB-130/E	Jepson Bolton & Co (Watford, UK)
Hybridisierungsöfen	OV3	Biometra (Göttingen)
Hybrite		Abbott/Vysis (Wiesbaden)
Inverses Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss (Göttingen)
Laminar-Air-flow Werkbank	Herasafe	Heraeus Instruments (Hanau)
Linearbeschleuniger	MEVATRON MD2	Siemens (München)
Festkörperphantom	RW3	PTW (Freiburg)
Mikromanipulator		Luigs & Neumann (Ratingen)
Mikropipetten-Puller	PC-10	Narishige (Tokio, J)
Mikroskop	Leica	Leica (Wetzlar)
	LSM-510	Carl Zeiss (Göttingen)
Mikroskop Elektrophysiologie	Axioskop FS2	Carl Zeiss (Göttingen)
Mikroskop Karyotypisierung	Diaplan 68236	Leitz (Wetzlar)
Nukleofektor	Nucleofector™ II	Lonza Cologne AG/
Amaza Biosystems (Köln)		
Patch-Clamp-Verstärker (Sunnydale, USA)	Axopatch 200B	Molecular Devices
pH-Meter	CG840	Schott (Mainz)

Photometer	Biophotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
	Nanodrop ND-1000	Fisher Scientific (Schwerte)
Pipetten	2 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettier-Hilfe	Pipette-Boy	Brand (Wertheim)
qPCR Cycler	Cycler und Software iCycler	Bio-Rad (München)
Reinstwasseranlage	milliQ Synthesis A10	Millipore (Schwalbach)
Sterile Werkbank (horizontal)	HERAGuard	Thermo Electron, Heraeus Instruments (Hanau)
Sterile Werkbank (vertikal)	Holten Safe 2000	Thermo Electron, Heraeus Instruments (Hanau)
Thermocycler	T3	Biometra (Göttingen)
Thermomixer	Compact	Eppendorf (Hamburg)
Waagen	Analysewaage LA310S	Sartorius (Göttingen)
	Grobwaage BL610	Sartorius (Göttingen)
Wärmeplatte	OTS40	Medite (Burgdorf)
Wasserbad	1008	GFL (Burgwedel)
Vakuum-Absaugpumpe	BVC21 + BVC01	Vacuubrand GmbH und Co (Wertheim)
Videokamera (Elektrophysiologie)	CCD-Kamera KP-M2RP	Hitachi (Düsseldorf)
Vortexer (New York, USA)	Genie 2	Scientific Industries
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Faust (Halle)
Zentrifugen	Megafuge 1.OR 5415 R RC5B Plus	Heraeus Instruments (Hanau) Eppendorf (Hamburg) Sorvall Heraeus Instruments (Hanau)
	Biofuge Pico	Thermo Electron, Heraeus Instruments (Hanau)

2.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien für die Pufferlösungen und Medien wurden überwiegend von folgenden Firmen bezogen: BioRad Laboratories GmbH (München), Chemicon (Hofheim), Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München), VWR (Lohmar) und Vector Laboratories (Burlingame, USA).

Chemikalie	Hersteller, Ort
100 bp peqLab Gold DNA Marker	peqLab (Erlangen)
1 kb peqLab Gold DNA Marker	peqLab (Erlangen)
2-Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe)
4-Aminopyridine	Sigma (München)
6x DNA Ladepuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
30 % Acrylamid-Gemisch	BioRad (München)
Agarose PeqGold Universal	PeqLab (Erlangen)
Antimitotikum	Invitrogen (Karlsruhe)
APS	Sigma (München)
B27	Gibco (Invitrogen)
Bactotrypsin	BD Bioscience (Heidelberg)
Borax	Sigma (München)
Bradford Reagenz	BioRad (München)
BrdU	Sigma (München)
Bromphenol blau	Sigma (München)
BSA	Sigma (München)
Calciumchlorid	Sigma (München)
Colcemid (10 µg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
cyclisches AMP	Sigma (München)
DAPI	Sigma (München)
DEPC	Fluka (Seelze)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM/F12	Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO	Sigma (München)
DNase	Sigma (München)
dNTP	peqLab (Erlangen)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
EGF	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
EGTA	Sigma (München)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (München)
FCS	Invitrogen (Karlsruhe)
FCS, definiert	Hyclone (Logan, USA)
FGF-2	Invitrogen (Karlsruhe)
Fibronectin	MP Biomedicals (Eschwege)
Fluorescein	Sigma (München)
Gelatine Typ A	Sigma (München)
General Caspase Inhibitor (Z-VAD-FMK)	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Glucose	Sigma (München)
Glutaraldehyde	Sigma (München)
Glycin	Sigma (München)
Glycerol	Sigma (München)
Go Taq® Flexi DNA Polymerase	Promega (Madison, USA)
HCl	Sigma (München)
HBSS (10x)	Sigma (München)
HEPES Natriumsalz	Sigma (München)
Hoechst 33258	Sigma (München)
Igepal Ca-630 (NP-40)	ICN Biomedicals (Frankfurt am Main)
Insulin	Sigma (München)
Isopropanol	Sigma (München)
Kainsäure	Tocris (über Biotrend, Köln)
Kaliumchlorid	Sigma (München)
Kaliumgluconat	Sigma (München)
Knockout-DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
Knockout-Serum Replacement	Invitrogen (Karlsruhe)
Kollagenase Typ IV	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamine	Invitrogen (Karlsruhe)
Lipofectamine	Roche Diagnostics (Mannheim)

MgATP	Sigma (München)
Magnesiumchlorid	Invitrogen (Karlsruhe)
Matrigel	BD Bioscience (Heidelberg)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Mowiol	Sigma (München)
Muscimol	Sigma (München)
Mycoplasma Plus PCR Primer Kit	Stratagene (Amsterdam, NL)
Myo-Inositol	Sigma (München)
N ₂	Gibco (Invitrogen)
NaGTP	Sigma (München)
Natriumbicarbonat	Sigma (München)
Natriumchlorid	Sigma (München)
Natrium-Guanosin-triphosphat (NaGTP)	Sigma (München)
Natriumhydrogencarbonat	Sigma (München)
Natriumpyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumselenit	Sigma (München)
Neurobasalmedium	Gibco (Invitrogen; Karlsruhe)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Metabion (Karlsruhe)
Oligo-(dt)-Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Sigma (München)
Penicillium/Steptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Invitrogen (Karlsruhe)
ROCK-Inhibitor Y-27632	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Polyvinylalkohol	Merk & Co (New York, USA)
Prestained Protein Marker (7-175 kDa)	BioLabs/NEB (Frankfurt am Main)
Protein Standard (Novex® Sharp)	Invitrogen (Karlsruhe)
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
SDS	Roth (Karlsruhe)
SYBR Green I	Sigma (München)
Taq-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
TEMED	Sigma (München)
Transferrin	Sigma (München)
Trehalose	Sigma (München)

Tris-HCl	ICN Biomedicals (Frankfurt am Main)
Triton-X100	Sigma (München)
Trypan-Blau	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen (Karlsruhe)
TTx	Alomone (Jerusalem)
Tween 20	Sigma (München)
Vectashield	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Zentromer-spezifische DNA-Sonden (CEP 12 und CEP 17)	Abbott/Vysis (Wiesbaden)

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Antigen	Beschreibung	Verdünnung	Art	Besonderheit	Hersteller
A2B5	Epitop von Silaogangliosiden und Sulfatiden auf der Plasmamembran von Neuronen, Neuroendokrinen und Gliazellen	1:1000	Maus IgM		Chemicon (Hofheim)
CD 133-APC	Wird auf der Oberfläche von humanen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert	1:20	Maus IgG	direkt gekoppelt	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
β III-Tubulin (Tuj1)	Neuron-spezifischer Zytoskelett-Bestandteil; früher neuronaler Marker	1 α :2000	Maus IgG Kaninchen IgG	Triton-X 100	Covance (USA)
BrdU	Uridin-Derivat, das anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut werden kann	1:33	Maus IgG	Triton-X 100; Denaturierung der DNA	Becton Dickinson (San Jose, USA)
GABA	Gamma amino butyric acid; inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS	1:1000	Kaninchen IgG	Triton-X 100	Sigma (München)
GAD 65/67	Glutamat-Decarboxylase (Isoform 65 + 67 kDa) katalysiert die Produktion von GABA im ZNS	1:500	Kaninchen IgG	Triton-X 100	Chemicon (Hofheim)

GAD 67	Glutamat-Decarboxylase (Isoform 67 kDa)katalysiert die Produktion von GABA im ZNS	1:500	Maus IgG	Triton-X 100	Chemicon (Hofheim)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein; Intermediärfilament in reifen Astrozyten	1:500 1:1000	Maus IgG Kaninchen IgG	Triton-X 100	ICN (Costa Mesa, USA) DAKO (Hamburg)
GFP	Green fluorescent protein	1:3000	Kaninchen IgG	Triton-X 100	Abcam (Cambridge, USA)
L1	Zelladhäsionsmolekül, welches überwiegend auf Neuronen exprimiert wird	1:400	Kaninchen IgG		Geschenk (M. Schachner)
MAP2ab	Mikrotubuli-assoziiertes Protein; Isoformen a und b werden in Dendriten reifer Neurone gefunden	1:200	Maus IgG	Triton-X 100	Sigma (München)
Nestin	Zytoskelett-Bestandteil u.a. neuraler Vorläuferzellen	1:100	Maus IgG	Triton-X 100	Chemicon (Hofheim)
O4	Sulfatide und Glykolipide, die in Preoligodendrozyten und reifen Oligodendrozyten zu finden sind	1:100	Maus IgM		R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Olig 2	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2; essentieller Regulator des ventralen neuroektodermalen Vorläuferschicksals	1:500	Kaninchen IgG	Triton-X 100	Chemicon (Hofheim)
Pax 6	Paired Box (Pax) Transkriptionsfactor 6	1:500	Maus IgG	Triton-X 100	Chemicon (Hofheim)
PSA-NCAM	Polysyalinisiertes Neutrales Zelladhäsionsmolekül, welches auf der Oberfläche von Neuronen und neuralen Vorläufern exprimiert wird	1:1000	Maus IgM		Chemicon (Hofheim)
Sox2	Transkriptionsfaktor aus der Sox8/SRY-ähnlichen HMG box9 Familie; wird von neuralen Vorläuferzellen exprimiert	1:200	Maus IgG	Triton X 100	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)

SSEA1	Stage-Specific Embryonic Antigen 1 Differenzierungsassoziertes Oberflächenantigen (humane ES- Zellen)	1:500	Maus IgM		DSHB (Iowa City, USA)
Tra-1-60	Pluripotenz-assoziertes Oberflächenantigen (humane ES Zellen)	1:500	Maus IgM	Lebend- färbung	Chemicon (Temecula, USA)
VGluT1	Vesikulärer Glutamat-Transporter 1; wird von glutamatergen Neuronen exprimiert	1:1000	GP IgG Kaninchen IgG	Triton-X 100	Chemicon (Hofheim) SySy (Göttingen)

Tab. 2.1: Verwendete primäre Antikörper

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Konjugat	Typ	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor™ 488	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:500	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor™ 488	Ziege anti- Meerschweinchen IgG	1:500	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor™ 555	Kaninchen anti-Maus IgG	1:500	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa Fluor™ 647	Ziege anti-Maus IgM	1:500	Invitrogen (Karlsruhe)
Cy3	Ziege anti- Meerschweinchen IgG	1:300	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Cy3	Ziege anti-Maus IgM + IgG	1:300	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Cy3	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:300	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
FITC	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
FITC	Ziege anti-Maus IgM + IgG	1:250	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
HRP	Anti-Kaninchen; Anti-Maus	1:500	Chemicon (Hofheim)

Tab. 2.2: Verwendete sekundäre Antikörper

2.1.6 Primer

Wenn es nicht anders vermerkt ist, wurde die quantitative RT-PCR für 38 Zyklen und bei einer Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) Konzentration von 3 mM durchgeführt. Für die semi-quantitative RT-PCR wurden 35 Zyklen und eine Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) Konzentration von 3 mM gewählt.

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur [°C]	Schmelz-Temperatur Produkte [°C]	Produkt-Länge [bp]
18S	TTCCTTGGACCGGCGCAAG GCCGCATCGCCGGTCGG	58-69	88,5	143
BLBP*	CCAGCTGGGAGAAGAGTTTG CTCATAGTGGCGAACAGCAA	63	/	196
CD133*	TCAGTGAGAAAGTGGCATCG TGTTGTGATGGGCTTGTCAT	63	/	313
Emx1	AGTCCGAGCAGAAGAAGAAGG CAGCAGCAAGCAGCACTC	64	91	146
Emx2	TCCTCAACGGCTTCCACTC TCGGCGAACACCAAGTCC	63	91	78
En1*	GACTCGCAGCAGCCTCTC GCCTGGA ACTCCGCCTTG (Koch <i>et al.</i> , 2009)	60	/	179
FoxG1	CCCTCCCATTTCTGTACGTTT CTGGCGGCTCTTAGAGAT	65	86	203
GAD 67	CCATCTTCGTCCGCAACC GCAAACAGATTAGAGAAGTCAGTC	60	91,5	284
GATA6	TTCCCATGACTCCA ACTTCC ACTTGAGCTCGCTGTTCTCG	60	89	150
Gbx2	TGGAGAGCGATGTGGACTAC CCTGTCTTGGAATTGGCATTG	62	89	342
GFAP	ATCAACTCACCGCCAACAGCGCC CTCATACTGCGTGCGGATCTCTT	63	92	346

HoxA1*	GGGTGTCCTACTCCCACTCA GGACCATGGGAGATGAGAGA (Koch <i>et al.</i> , 2009)	60	/	162
HoxA2	GAAGTGTACACCAACAC TTCCTCGTCCTCCTCTAC	63	89	253
HoxB1*	TCAGAAGGAGACGGAGGCTA GTGGGGGTGTTAGGTTCTGA (Koch <i>et al.</i> , 2009)	60	/	218
HoxB2*	TTTAGCCGTTTCGCTTAGAGG CGGATAGCTGGAGACAGGAG (Koch <i>et al.</i> , 2009)	60	/	173
HoxB6*	GAAGTGTGAGCGGACTCAC CTGGGATCAGGGAGTCTTCA (Koch <i>et al.</i> , 2009)	60	/	153
L1	GAGAGTGACAACGAGGAG GCCAATGAACGAACCATC	60	91,5	144
L27	GGTGGTTGCTGCCGAAATG ATCTCTGAAGACATCCTTATTGACG	58-69	92	325
Nanog	GCTTGCCTTGCTTTGAAGCA TTCTTGACTGGGACCTTGTC	63	86,5	255
Nestin	GGAGAAGGACCAAGAAGTGTG ACCTCCTCTGTGGCATTTC	63	91	152
Nkx2.1*	CGCATCCAATCTCAAGGAAT TGTGCCAGAGTGAAGTTTG (Koch <i>et al.</i> , 2009)	60	/	170
Nkx2.2*	TGCCTCTCCTTCTGAACCTTGG GCGAAATCTGCCACCAGTTG (Izrael <i>et al.</i> , 2007)	63	/	320
Oct-3/4	AGAACAATGAGAACCTTCAGGAGA CTGGCGCCGGTTACAGAACCAA	60	89	286
Olig2	CAGAAGCGCTGATGGTCATA TCGGCAGTTTTGGGTTATTTC	63	90	207

Otx2*	TGCAGGGGTTCTTCTGTGAT AGGGTCAGAGCAATTGACCA (Koch <i>et al.</i> , 2009)	60	/	234
Pax2*	GGCTGTGTCAGCAAATCCT CTGGGCACTGTGTCATTGTC	60	/	210
Pax6	TACCAACGATAACATACCAAGC AGCCTCATCTGAATCTTCTCC	63	90	264
Sox1*	CACAACTCGGAGATCAGCAA GTCCTTCTTGAGCAGCAGCGTCT (Izrael <i>et al.</i> , 2007)	63	/	171
Sox2	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGTC CTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC (Babaie <i>et al.</i> , 2007)	60	/	78
Telo- merase	TGGCTGCGTGGTGAACCTG GCGGTTGAAGGTGAGACTGG	68	95	205
TH	CAGTTCTCGCAGGACATTG CGTCTGGTCTTGGTAGGG	63	89	243
Tubb3 (β III- Tubulin)	CCGAAGCCAGCAGTGTCTAAACC GCAATAGATTTATTAAGTATCCC	63	92	237
VGluT1	ACCTCCATTCCACTCATCTC TTTGGGTATCCTTGAAACTGTC	62	89	179
VGluT2	AACCGCATCTACCCAAATACC TGAGAATGAGAATACAACAGAATAGC	62	89	199

Tab. 2.3: Verwendete Primer für die quantitative und semi-quantitative RT-PCR.

Die mit Stern (*) gekennzeichneten Primer wurden nur für die semi-quantitative RT-PCR eingesetzt. Alle Primer wurden human-spezifisch entwickelt.

2.1.6.1 PCR-Konditionen

Semi-quantitative/quantitative RT-PCR

Zeit (min)	Temperatur (°C)	Wiederholungen
3.00	95.5	
0.20	94.5	
0.20	Variabel	
0.50	72.0	
1.00	95.0	
1.00	55.0	35/38
10	55.0	

qPCR Mastermix (10 ml, Invitrogen)

2000 µl PCR Puffer (10x), 1200 µl MgCl (50 mM), 40 µl je dNTP (100 nM), 15 µl SYBR Green (1:10 000), 2 µl Fluorescein (100 µM), 6623 µl ddH₂O

qPCR Mastermix (10 ml, Promega)

4000 µl Colorless Flexi Puffer (5x), 1200 µl MgCl (25 mM), 40 µl je dNTP (100 nM), 15 µl SYBR Green (1:10 000), 2 µl Fluorescein (100 µM), 4623 µl ddH₂O

semi-qPCR Mastermix (10 ml, Invitrogen)

2000 µl PCR Puffer (10x), 600 µl MgCl (50 mM), 40 µl je dNTP (100 nM), 7240 µl ddH₂O

semi-qPCR Mastermix (10 ml, Promega)

4000 µl Green Flexi Puffer (5x), 1200 µl MgCl (25 mM), 40 µl je dNTP (100 nM), 4640 µl ddH₂O

2.1.7 Kits

Endofree Maxi Plasmid Purification Kit	Qiagen (Düsseldorf)
FuGENE™ 6 Roche	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nucleofection™ Kit	Lonza Cologne AG, Amara Biosystems (Köln)
RNase-Free DNase Kit	Qiagen (Düsseldorf)
Iscrip RT Kit	BioRad Laboratories (München)
RNeasy Kit	Qiagen (Düsseldorf)

Super Signal West Pico Kit

Pierce (Thermo Scientific, Wiesbaden)

Super Signal West Femto Kit

Pierce (Thermo Scientific, Wiesbaden)

2.1.8 Plasmide

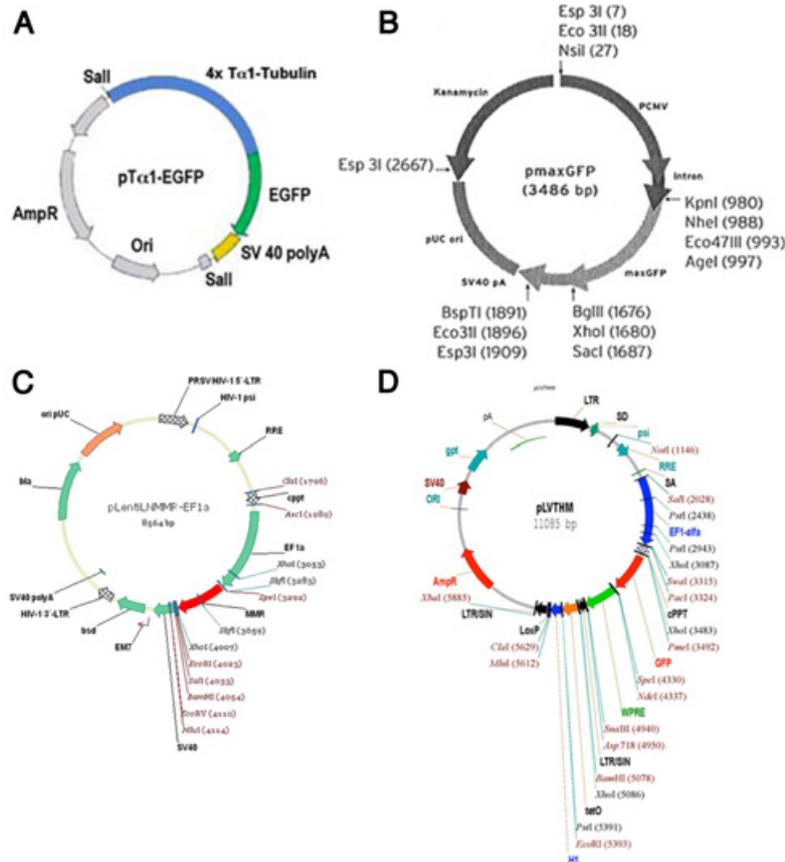


Abb. 2.1: Übersicht verwendeter Plasmide.

(A) pTα1-EGFP: In ein pUC Backbone wurde unter Verwendung der Restriktions-schnittstellen *HindIII* und *XhoI* eine vierfache Tα-1 Tubulin Promotorsequenz eingebracht. Die EGFP-cDNA wurde mit Hilfe einer *NotI* Schnittstelle in das Plasmid subkloniert (Geschenk von S. Okabe). (B) pmaxGFP: In diesem Plasmid steht EGFP unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (PCMV)-Promotor (Lonza Cologne AG). (C) pLentiLNMMR-EF1α-mRFP: Die Kodierungssequenz von Monomeric Red steht hier unter der Kontrolle des humanen Elongation Factor-1-α Promotor. (D) pLentiVTHM-EF1α-GFP: Die Koderingssequenz von EGFP steht hier unter der Kontrolle des humanen Elongation Factor-1-α Promotor.

2.1.9 Lösungen

2.1.9.1 Lösungen für die Zellkultur

2.1.9.1.1 Puffer

HANKS (1x)

1,9 g Natrium-Bicarbonat in 450 ml ddH₂O und 50 ml 10xHBSS (Hanks balanced salt solution) lösen, pH auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren (0,2 µm) und bei 4 °C lagern.

HEPES-Puffer (1 M)

26 g Hepes Natrium Salz mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen, pH auf 7,4 einstellen und bei 4 °C lagern.

FACS-Puffer

1x HBSS, 2,5 mM Hepes (pH 7,4), 30 mM D-Glucose, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 4 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA, 1x Penicillin/Streptomycin und 1x Antimitotikum, auf 500 ml ddH₂O auffüllen, steril filtrieren (0,2 µm) und bei 4 °C lagern.

2.1.9.1.2 Zusätze

cAMP (100 µg/ml)

10 mg cAMP in 10 ml ddH₂O lösen, steril filtrieren (0,2 µm), 1:10 verdünnen, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (20 mM)

1mg Caspase-Inhibitor in 170 µl DMSO lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern, vor Gebrauch 1:20 in entsprechendem Zellkulturmedium und 10 % FCS verdünnen (2 mM).

DAPT (2,5 mM)

5 mg DAPT in 4,625 ml DMSO lösen, steril filtrieren (0,2 µm), 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 -20 °C lagern.

EGF (10 ng/ml)

1 mg EGF in 10 ml 0,1 % BSA/PBS lösen (40 mg BSA in 40 ml ddH₂O lösen, 23 µl Eisessig dazugeben und steril filtrieren), aliquotieren und bei -20 °C lagern; diese Lösung (c = 100 µg/ml) vor Gebrauch 1:10 verdünnen.

FGF-2 (10 ng/ml)

100 µg bFGF in 10 ml 0,1 % BSA/PBS (vorher steril filtrieren) lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Fibronectin (Fn; 1µg/µl)

1 mg Fibronectin in 1 ml ddH₂O lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80 °C lagern.

Gelatine (0,1 %)

0,5 g Gelatine (Typ A) mit ddH₂O auf 500 ml auffüllen, 1 h bei 121 °C autoklavieren und bei 4 °C lagern; zur Beschichtung wurden die Schalen für mindestens 20 min inkubiert.

Glucose (0,1 g/ml)

50 g Glucose in 500 ml DMEM/F12 lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei 4 °C lagern.

hESC-Kryomedium

70 % Knockout-DMEM, 20 % Hyclone FBS (Fetal Bovine Serum), 10 % DMSO, immer frisch ansetzen und bei 4 °C lagern.

hESC-NSC-Kryomedium

90 % N2-Medium, 10 % DMSO, immer frisch ansetzen und bei 4 °C lagern oder serumfreies, gebrauchsfertiges Gefriermedium der Firma Sigma, bei -20 °C lagern.

hESC-NSC-Kryomedium für Neurone

Standard-Kryomedium (KM): 10 % Differenzierungsmedium, 10 % DMSO, 80 % SR

Trehalose-Kryomedium (TKM): 21,1 % 1 M Trehalose, 10,5 % DMSO, 68,4 % SR

Kryomedium (KM-L): 20 % 500 mM Myo-Inositol, 0,25 V% Polyvinylalkohol, 10 % DMSO, 65 % SR (Ladewig *et al.*, 2008)

hESC-NSC-Kryomedien für Neurone immer frisch ansetzen und bei 4 °C lagern.

Insulin (25 mg/ml)

1 g Insulin in 30 ml 10 mM NaOH lösen, tropfenweise 1 M NaOH zugeben bis alles gelöst ist, auf 40 ml mit ddH₂O auffüllen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Kollagenase

1 mg/ml Collagenase Typ IV in Knockout DMEM lösen, steril filtrieren (0,2 µm) und bei 4 °C bis zu 2 Wochen lagern.

Laminin

2 µg/ml in PBS ansetzten (gebrauchsfertig von Sigma), zur Beschichtung wurden die Zellkulturschalen für mindestens 3 h inkubiert.

Natrium-Selenit Stocklösung (500 µM)

86,5 mg Natrium-Selenit in 10 ml ddH₂O lösen und bei -20 °C lagern (100x); 150 µl Stammlösung in 15 ml ddH₂O lösen, aliquotieren und bei 4 °C lagern.

Matrigel

3,3 % Matrigel in Knockout-DMEM, zur Beschichtung wurden die Schalen 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

MEF-Kryomedium

20 % DMSO, 20 % FCS, in DMEM immer frisch ansetzten und bei 4 °C lagern.

Noggin (10 µg/ml)

50 µg Noggin in 5 ml 0,1 % BSA/PBS (vorher steril filtrieren) lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Nucleosid-Lösung

40 mg Adenosin, 42,5 mg Guanosen, 36,5 mg Cytosin, 36,5 mg Uridin, 12 mg Thymidin, in 50 ml vorgewärmten ddH₂O lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Propidiumiodid (PI; 0,5 µg/ml)

1 mg/ml Stocklösung (gebrauchsfertig von Invitrogen), unmittelbar vor Gebrauch 1:2000 in FACS-Puffer verdünnen.

Polyornithin-Stocklösung (PO; 1,5 mg/ml)

100 mg PO in 67 ml ddH₂O lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern (100x); für 1x PO: 5 ml 100x PO-Stocklösung in 495 ml ddH₂O (Millipore) ansetzten, sterilfiltrieren (0,2 µm) und bei 4 °C lagern, Beschichtung der Zellkulturschalen für mindestens 2 h.

ROCK-Inhibitor Y27632 (10 mM)

1 mg ROCK-Inhibitor in 296 µl ddH₂O lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Transferrin Stocklösung (10 mg/ml)

1 g Transferrin in 100 ml ddH₂O lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80 °C lagern.

Trypsin/EDTA (1x)

5 ml 10x Trypsin/EDTA in 45 ml PBS lösen und bei 4 °C lagern.

Trypsin-Inhibitor (25 mg/ml)

1 g Trypsin-Inhibitor in 20 ml PBS lösen (c = 50 mg/ml), aliquotieren und bei -20 °C lagern (100x); 1 ml 100x Trypsin-Inhibitor in 100 ml PBS lösen (c = 0,5 mg/ml), steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -20 °C lagern.

2.1.9.1.3 Medien

CM (Conditioned Medium)

50 ml hES Zellmedium ohne FGF-2 für 10⁶ mitotisch inaktivierte Fibroblasten, Inkubation über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂, Lagerung bei -20 °C, 4 ng/ml FGF-2 vor Gebrauch hinzufügen und bei 4 °C lagern.

EB-Medium

20 % Serum-Replacement, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM L-Glutamin, in Knockout DMEM ansetzen und bei 4 °C lagern.

hESC-Medium

20 % Knockout Serum Replacement, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM L-Glutamin, 0,1 mM 2-Mercapthoethanol, 4 ng/ml FGF-2, 80 % Knockout-DMEM, bei 4 °C lagern.

ITSFn-Medium

25 µg/ml Insulin, 100 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Natriumselenit, 2,5 µg/ml Fibronectin, 20 ng/ml FGF-2, in DMEM/F12 ansetzen und bei 4 °C lagern.

MEF-Medium

10 % FCS, 1 % Natriumpyruvate, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren, in DMEM ansetzen und bei 4 °C lagern.

N2-Medium

5 ml N2 supplement, 1,6 µg/ml Glucose, 20 µg/ml Insulin, 500 ml DMEM-F12, bei 4 °C lagern.

N2FEB-Medium

N2-Medium und 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml EGF and 1:1000 B27 vor Gebrauch hinzufügen, bei 4 °C lagern.

Differenzierungsmedium

50 % N2 Medium , 50 % Neurobasalmedium, 1:50 B27, 100 ng/ml cyclisches AMP, bei 4 °C lagern.

N2B27-Medium

50 % N2 Medium, 50 % Neurobasalmedium, 1:50 B27, bei 4 °C lagern.

2.1.9.2 Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Agar

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 7 g Agar, mit ddH₂O 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 ddH₂O auf 1 l auffüllen, 20 min bei 120 °C autoklavieren und bei 4 °C lagern.

2.1.10 Lösungen für analytische Methoden

2.1.10.1 Immunzytochemie

Blockierungslösung 1

10 % NGS (Normal Goat Serum) oder FCS (Fetal Calf Serum) in PBS.

Blockierungslösung 2

10 % NGS oder FCS, 0,1 % Triton-X 100 (optional) in PBS.

Blockierungslösung 3

10 % NGS oder FCS, 0,2 % Triton-X 100 (optional) in PBS.

Boratpuffer (pH 7,5)

0,1 M Borax in ddH₂O (Millipore, steril).

DAPI-Puffer

10 mM NaHCO₃ in ddH₂O lösen und pH auf 8,2 einstellen.

Mowiol

6 g Glycerol, 2,49 g Mowiol, 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5), in 6ml ddH₂O (Millipore, steril).

Natriumazid

1 mg/ml Natriumazid in PBS lösen.

Paraformaldehyd/PBS

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

2.1.10.2 Immunhistochemie

Blockierungslösung I

10 % FCS, 1 % Natrium-Azid, 0,1 % Triton-X 100 in PBS.

Blockierungslösung II (für Oberflächenantigene)

10 % FCS, 0,1 % Natrium-Azid in PBS.

2.1.10.3 RNA-Isolierung, PCR und Gelelektrophorese

Agarosegel (1 %)

0,5 g Agarosegel, 1 ml 50x TAE, in 49 ml ddH₂O lösen und erhitzen; 10 µg/ml Ethidiumbromid nach Abkühlung hinzufügen und auf Agarosegelkammer blasenfrei ausgießen.

DEPC-Wasser

0,2 % DEPC in ddH₂O (Millipore, steril) über Nacht geöffnet unter den Abzug stellen, am Folgetag autoklavieren.

Proben-Ladepuffer

0,1 M EDTA, 60 % Sucrose, 0,04 % Bromphenol Blue, 0,04 % Xylene Cyanole, 2 % Ficole, in ddH₂O lösen.

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.

2.1.10.4 Western Blot

Antikörper-Blocklösung

5 % Milchpulver in TBS-T.

Blocklösung

10 % Milchpulver in TBS-T.

Laemmli Probenpuffer (2x)

4 % SDS, 20 % Glycerol, 0,004 % Bromphenol blau, 0,125 M Tris-HCl, vor Gebrauch 20 % 2-Mercaptoethanol hinzufügen.

RIPA-Puffer (Stocklösungen)

5xBuffer (Tris-EDTA):	250 mM Tris-HCl (pH 7,5) , 5 mM EDTA
5xNaCl:	750 mM NaCl
5xDOC:	2,5 % Deoxycholicsäure, Natrium Salz in ddH ₂ O
5xSDS:	0,5 % Laurylsulfat, Natrium Salz in ddH ₂ O
5xIgepal:	5 % Igepal in ddH ₂ O

Für 1 ml Lysis-Puffer (RIPA-Puffer) werden 200 µl jeder Stocklösung mit 10 µl Protease Inhibitor Cocktail (1:100) gemischt.

5x Running buffer

25 mM Tris, 956 mM Glycin, 0,5 % SDS mit H₂O auf 1000 ml.

Sammelgel

1,15 ml ddH₂O, 0,33 ml 30%iges Acrylamidgemisch, 0,5 ml 0,5M Tris HCl, 0,02 ml 10%iges SDS, 0,02 ml 10 % APS, 0,002 ml TEMED.

SDS-PAGE Trenngel (10 %)

2 ml ddH₂O, 1,7 ml 30%iges Acrylamidgemisch, 1,3 ml 1,5 M Tris HCl, 0,05 ml 10%iges SDS, 0,05 ml 10%iges APS, 0,002 ml TEMED.

TBS-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl.

TBS-Tween-Puffer (TBS-T)

20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween20.

10x Transfer-Puffer

25 mM Tris HCl, 192 mM Glycin mit H₂O auf 1000 ml, vor Gebrauch 20 % Methanol hinzufügen.

1 x Transfer-Puffer

1050 ml H₂O, 300 ml, Methanol, 150 ml, 10x Western Transferpuffer.

2.1.10.5 Karyotypisierung

Bactro-Trypsin

200 µl Bactro-Trypsin in ddH₂O (Millipore).

Fixativ

75 % Methanol, 25 % Eissessig, unmittelbar vor Gebrauch zusammenmischen und bei 4 °C lagern.

Giensa-Lösung

5 % Accustain in ddH₂O (Millipore).

KCl (0,075 M)

5,6 g/l KCl in ddH₂O (Millipore).

2.1.10.6 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

Waschlösung I

0,7xSSC, 0,3 % NP-40, auf pH 7,0 - 7,5 einstellen.

Waschlösung II

2xSSC 0,1 % NP-40, auf pH 7,0 - 7,5 einstellen.

2.1.10.7 Elektrophysiologie

Patch-Pipetten-Lösung

120 mM Kaliumgluconat, 20 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM EGTA, 1 mM CaCl₂, 4 mM MgATP, 0,4 mM NaGTP, 10 mM HEPES/KOH (pH 7,2).

Extrazelluläre-Lösung

140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM D-Glukose, 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,35).

2.2 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden neurale Stammzellen verwendet, die nach dem in 2.3.4 beschriebenen Protokoll (Zhang *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2009) aus den hESC-Linien H9.2 und I3 abgeleitet wurden. Für die direkte neurale Induktion adhärenter Kulturen wurde die hESC-Linie H9 eingesetzt. Zur Kokultur und zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurden durch γ -Bestrahlung mitotisch inaktivierte primäre embryonale Fibroblasten der Maus (MEFs; gewonnen aus dem Stamm CD1, Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die hESC-Linien wurden von Joseph Itskovitz-Eldor, Haifa, Israel (Amit *et al.*, 2000) bezogen.

2.3 Zellbiologische Methoden/ hESC-Kultur

2.3.1 Fibroblasten für die hESC-Kultur

2.3.1.1 Präparation primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz der verwendeten hESC-Linien ist die Kokultur mit mitotisch inaktivierten murinen Fibroblasten notwendig. Diese MEFs werden einen Tage vor den hESCs aufgetaut, um eine möglichst konfluente Verteilung der Zellen zu erreichen.

Am Tag 13,5 oder 14,5 der Embryonalentwicklung wurden Mäuse des Stammes CD1 präpariert. Nachdem der Kopf entfernt und die inneren Organe entnommen wurden, wurde das verbleibende Bindegewebe mit frischen PBS gewaschen und mit einer Schere fein zerkleinert. Anschließend wurden diese Gewebestücke in 50 ml 1,5x Trypsin/EDTA resuspendiert und in einen Erlenmeyerkolben mit Glaskugeln (\varnothing 4 mm) überführt. Nach

30-minütigem Rühren auf einem Magnetrührer (50 rpm) bei 37 °C wurde das Trypsin durch Zugabe von 50 ml FCS-haltigem MEF-Medium inaktiviert. Zur Entfernung der Glaskugeln und verbleibender Gewebestücke, wurde die Zellsuspension gesiebt und bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Nach Resuspendieren des Pellets wurden die vereinzelt Zellen in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 15 cm Zellkulturschale ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 bis 4 Tagen wurde ein Mycoplasmen-Test durchgeführt. Dazu wurde etwas Medium der subkonfluenten Schalen abgenommen und das Mycoplasma Plus PCR Primer Set nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Bei Erreichen der Konfluenz und einem negativem Mycoplasma-Testergebnis wurden die Zellen eingefroren. Dafür wurden die Schalen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, für 5 min mit 1x Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert, nachfolgend mit FCS-haltigem MEF-Medium abgespült und für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Pro 15 cm Zellkulturschale wurde das Pellet in 1 ml MEF-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Kryoröhrchen à 1 ml Zellsuspension nach der Zugabe DMSO-haltigem MEF-Gefriermediums im Verhältnis 1:1 eingefroren. Hierzu wurden die Kryoröhrchen zunächst in Styroporboxen für 1 h bei -20 °C und anschließend über Nacht bei -80 °C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte hingegen in flüssigem Stickstoff.

2.3.1.2 Kultivierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Das Auftauen der sich in Röhrchen befindlichen kryokonservierten MEFs erfolgte zügig bei 37° C im Wasserbad. Nach dem Überführen in 5 ml vorgelegtes MEF-Medium pro Kryoröhrchen wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert, in MEF-Medium resuspendiert und auf eine 15 cm Zellkulturschale pro Kryoröhrchen ausplattiert. Bis zur Konfluenz wurden die Schalen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie unter 2.3.1.1 abtrypsiniert und im Verhältnis 1:3 erneut ausplattiert. Das Propagieren der Zellen erfolgte maximal bis zur vierten Passage.

2.3.1.3 Mitotische Inaktivierung muriner embryonaler Fibroblasten durch γ -Bestrahlung

Damit die murinen Fibroblasten mit ihrer schnelleren Wachstumsrate die hESC-Kultur nicht überwachsen, wurden diese durch γ -Bestrahlung mitotisch inaktiviert.

Die Zellen wurden wie bereits beschrieben abtrypsiniert (vgl. 2.3.1.1). Anschließend wurde das Zellpellet von 25 15 cm Zellkulturschalen in 35 ml MEF-Medium resuspendiert und in eine T125-Zellkulturflasche überführt. Die γ -Bestrahlung fand in der Funktionseinheit

Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik Bonn statt. Sie erfolgte an einem medizinischen Linearbeschleuniger (MEVATRON MD2, Siemens) mit 6 MV Photonen im Dosismaximum (17 mm) oder alternativ in einem gewebeäquivalenten Festkörperphantom (RW3, PTW Freiburg) bei einem Fokus-Haut-Abstand von 100 cm. Die Fibroblasten wurden mit 15 Gy Einzeldosis bestrahlt. Das nachfolgende Einfrieren der γ -bestrahlten MEFs erfolgte wie bereits unter 2.3.1.1 beschrieben, wobei die Zellzahl auf $2,4 \times 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen eingestellt wurde.

2.3.1.4 Auftauen von γ MEF

Das serumfreie Medium, welches hier für die hESC-Kultur verwendet wurde, ist nur bedingt zur Kultivierung von Fibroblasten geeignet. Die Fibroblasten nehmen unter diesen Bedingungen eine spindelförmige Struktur an und lösen sich nach etwa 1 Woche von der Zellkulturschale ab. Daher wurden die γ MEFs zuerst in serumhaltigem Medium ausgesät und nur wenige Tage nach dem Plattieren für die hESC-Kultur verwendet.

Für das Auftauen der γ MEF wurden zunächst Sechs-Well-Zellkulturplatten für 20 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % Gelatine beschichtet. Kryoröhrchen mit γ MEFs wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml MEF-Medium pro Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden mit 1 ml Medium gespült. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Pellet in 6 ml MEF-Medium pro Kryoröhrchen resuspendiert und jeweils auf zwei Gelatinebeschichtete Sechs-Well-Zellkulturplatten ausplattiert. Vor dem Aussäen von hESCs darauf, wurden die Fibroblasten mindestens über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für die hESC-Kulturen wurden diese γ MEFs für höchstens 3 Tage nach dem Ausplattieren verwendet.

2.3.1.5 Gewinnung konditionierten Mediums von γ MEF

HESCs können alternativ zur Kokultur mit γ MEFs auch in Gegenwart von Fibroblastenkonditioniertem Medium (CM, conditioned medium) auf Matrigel®-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert werden.

Zur Gewinnung konditionierten Mediums wurden zunächst 15 cm Zellkulturschalen für 20 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % Gelatine beschichtet. Wie bereits unter 2.3.1.4 beschrieben wurden kryokonservierte γ MEFs zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in vorgelegtes MEF-Medium überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert und in MEF-Medium resuspendiert. Nachfolgend wurden $7,2 \times 10^6$

Fibroblasten pro Gelatine-beschichteter 15 cm Zellkulturschale ausplattiert. Die Schalen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor das MEF-Medium durch 50 ml hESC-Medium mit 4 ng/ml FGF-2 ersetzt wurde. Das CM wurde dann alle 24 h geerntet, über eine 0,22 µm Filtereinheit sterilfiltriert und für bis zu 4 Wochen bei -20 °C gelagert. Die Fibroblasten wurden spätestens nach 7 Tagen verworfen.

2.3.2 Kultivierung von hESCs

2.3.2.1 Auftauen von hESCs

Da hESCs eine relativ niedrige Einfrier- und Auftau-effizienz aufweisen und neben einer geringen Überlebensrate auch die Spontandifferenzierung nach dem Auftauen zunächst hoch ist, werden hESCs möglichst in Dauerkultur gehalten und nur so selten wie möglich aufgetaut.

Hierzu wurde ein Kryoröhrchen mit hESCs zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml vorgelegtem hESC-Medium überführt. Während der Zentrifugation der Zellen bei 800 rpm für 3 min, wurde das Medium eines mit γ MEFs beschichteten Wells einer Sechs-Well-Zellkulturplatte abgesaugt und durch 1 ml hESC-Medium ersetzt. Anschließend wurde das Zellpellet vorsichtig in 1 ml hESC-Medium resuspendiert, wobei darauf geachtet wurde, Zellaggregate nicht zu stark zu zerkleinern. Nachfolgend wurden die Zellen gleichmäßig auf das γ MEF-beschichtete Well ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.3.2.2 Passagieren von hESCs

Um eine gute Plattierungseffizienz zu erhalten und Spontandifferenzierung sowie Karyotyp-Veränderungen zu verhindern, werden hESCs möglichst in kleinen Zellverbänden/Kolonien passagiert. Zur Passagierung der hESCs wird daher Kollagenase IV in Kombination mit mechanischen Verfahren verwendet, und nicht das zum Passagieren gängige Trypsin, da es Zellverbände auflöst.

Bei den hESCs wurde das Kulturmedium täglich erneuert und die Zellen wurden alle 3 bis 6 Tage passagiert. Das Medium wurde dafür zunächst abgenommen und die Zellen für 45 min mit 1 mg/ml Kollagenase IV (0,5 ml pro Well) bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde daraufhin mit 1 ml hESC-Medium pro Well abgestoppt. Die Kolonien wurden dann von der Zellkulturplatte abgespült oder vorsichtig mit der Spitze einer 5 ml Zellkulturpipette abgekratzt und für 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml hESC-Medium aufgenommen, wobei die hESC-Aggregate mit einer 1000 µl

Eppendorfpipette resuspendiert wurden. Nachfolgend wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 bis 1:6 in hESC-Medium auf mit γ MEF-beschichteten Sechs-Well-Zellkulturplatten ausplattiert. Die hESCs wurden spätestens nach 8 Tagen auf frische Fibroblasten umgesetzt.

2.3.2.3 Entfernen differenzierter Kolonien aus hESC-Kulture

hESCs weisen auch in Gegenwart von Feederzellen eine gewisse Spontandifferenzierungsrate auf, wobei die differenzierten Zellen meist schon beim Passagieren verloren gehen. Ist der Anteil an differenzierten Kolonien dennoch zu hoch, müssen diese Kolonien manuell entfernt werden. Verlust einer klaren Umgrenzung der Kolonie und Bildung von Strukturen innerhalb der Kolonie sind Anzeichen von Differenzierung.

Die manuelle Entfernung differenzierter Kolonien erfolgte unter Einsatz eines Binokulars in einer horizontalen Sterilbank. Differenzierte Kolonien wurden mittels einer mit einer Kanüle (26g 3/8, 0.45x10) versehenen 1 ml Injektionsspritze aus der Kultur entfernt. Nachfolgend wurde die Kultur wie unter 2.3.2.2 beschrieben passagiert.

2.3.2.4 Feeder-freie Kultivierung der hESCs

Die Feeder-freie Kultivierung erfolgte unter Verwendung von Matrigel®, welches über Nacht bei 4° C auf Eis aufgetaut und in eiskaltem Knockout-DMEM 1:30 verdünnt wurde. Damit wurden Sechs-Well-Zellkulturplatten oder 3,5 cm Zellschalen über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei Raumtemperatur beschichtet. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Matrigel® von den Zellkulturplatten oder Schalen entfernt. Anschließend konnten hESCs wie unter 2.3.2.2 beschrieben auf die beschichteten Schalen passagiert werden. Als Kulturmedium wurde Fibroblasten-konditioniertes Medium (CM) verwendet.

2.3.2.5 Einfrieren von hESCs

Beim Einfrieren wurden hESCs mit Kollagenase IV von den Zellkulturplatten abgelöst und abzentrifugiert (vgl. 2.3.2.2). In Abhängigkeit von der Dichte der Kultur wurden ein bis drei Wells pro Kryoröhrchen eingefroren. Das Zellpellet wurde zur Erhaltung der Zellaggregate nur mit einer 5 ml Zellkulturpipette in 0,5 ml hESC-Medium pro Kryoröhrchen vorsichtig und langsam resuspendiert. Anschließend wurde tropfenweise hESC-Kryomedium, welches 0,5 ml DMSO enthielt, pro Kryoröhrchen dazugegeben und je 1 ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen aliquotiert. Dann erfolgte das kontrollierte Einfrieren der Zellen in einem Gefrierbehälter bei -80 °C, wobei die Zellen hierbei um 1 °C/min heruntergekühlt wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff.

2.3.2.6 Adhärenente neurale Differenzierung von hESCs

Die direkte neurale Konvertierung der hESCs erfolgte auf mit Matrigel®-beschichteten Sechs-Well-Zellkulturplatten (vgl. 2.3.2.4). Zunächst wurden zu 80 % konfluente hESCs im Verhältnis 1:5 (vgl. 2.3.2.2) auf Matrigel®-beschichtete Schalen passagiert. Am nächsten Tag wurde die neurale Induktion durch die Überführung der Zellen in N2B27-Medium (DMEF/12 mit N2 und Neurobasal mit B27 im Verhältnis 1:1) in Gegenwart von Noggin gestartet (20 ng/ml). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Die Zugabe von Noggin erfolgte ebenfalls alle 2 Tage beim Mediumwechsel. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen in Gegenwart von Noggin kultiviert. Zusätzlich zu Noggin erhielt ein Teil der Zellen am 4. Tag der Differenzierung für 3 Tage den Notch-Inhibitor N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-[L-alanyl-2-phenyl]-glycine-1,1-dimethylethyl-ester (DAPT; 2,5 µM). Nach der anfänglichen neuralen Induktion in Gegenwart von Noggin soll die Zugabe von DAPT die Differenzierung der neuronalen Zellpopulation in Neurone fördern.

2.3.3 Herstellung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSC)

Die hier angewendete Differenzierungsmethode zur Gewinnung von hESC-NSCs basiert auf den Differenzierungsprotokollen von Zhang *et al.* (2001) und Koch *et al.* (2009).

2.3.3.1 Herstellung von Embryoidkörpern

Unter geeigneten Kulturbedingungen bilden ESCs (Abb. 2.2 A) sog. Embryoidkörper (EBs). Diese Sphäroide entstehen durch Aggregation von ESCs, wobei die darin enthaltenen Zellen spontan in Derivate aller drei Keimblätter differenzieren (Abb. 2.2 B).

Nach 3-4 Tagen auf Fibroblasten wurden aus den hESCs EBs gebildet. Pro Zellkulturplatte wurde jeweils 3 ml EB-Medium in drei unbeschichtete 6 cm Petrischalen vorgelegt. Anschließend wurden hESCs mit Kollagenase abgelöst (vgl. 2.3.2.2) und abzentrifugiert, wobei die Zellen nicht vereinzelt wurden, sondern als Zellaggregate von der Schale gespült wurden. Nachfolgend wurde das Pellet vorsichtig in 3 ml EB-Medium resuspendiert und die Zellaggregate auf Petrischalen in Suspensionskultur gebracht. Daraufhin erfolgte jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel, indem jeweils die EBs von drei Petrischalen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zur Sedimentation gebracht wurden. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die EBs wurden vorsichtig resuspendiert und auf die Petrischalen zurückgegeben. Nach 4 Tagen in Suspension wurden die EBs auf Zellkulturschalen plattiert (vgl. 2.3.3.2).

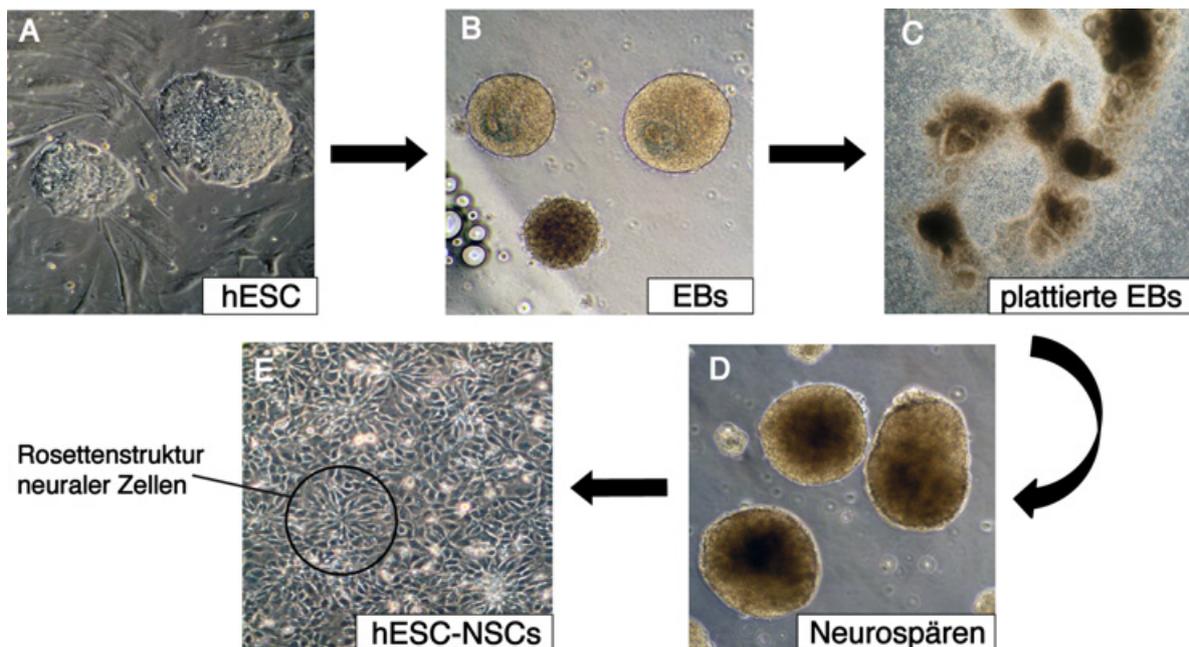


Abb. 2.2: Mikroskopische Aufnahmen der neuralen Differenzierung von hESCs.

(A) Undifferenzierte hESCs wachsen als Kolonien auf einem Rasen mitotisch inaktiver muriner embryonaler Fibroblasten. (B) Durch Aggregation undifferenzierter hESCs entstandene Embryoidkörper (EBs). (C) Bildung von Neuralrohr-ähnlichen Strukturen (Rosetten) nach Plattieren auf Polyornithin. (D) Aggregation der manuell gepickten Rosetten-Strukturen zu Neurosphären. (E) Phasenkontrastaufnahme einer nahezu konfluentgewachsenen homogenen Monolayerkultur der durch Einzelzellsuspension aus den Neurosphären erhaltenen neuralen Zellen. Diese Zellen zeigen eine rosettenartige Anordnung in der adhärenenten Monolayerkultur (E, markierter Bereich).

2.3.3.2 Plattieren der EBs und Transfer zu ITSFn

Um die Selektion von bestimmten Zelltypen zu erleichtern, werden die EBs plattiert, wodurch Zellen aus den Zellaggregaten auswandern können (Abb. 2.2 C). Das Überleben neuraler Vorläuferzellen wird durch die Verwendung eines speziellen serumfreien Mediums gefördert und das Wachstum anderer Zellen inhibiert.

Für diesen Schritt wurden 4 Tage alte EBs verwendet. Wie beim Mediumwechsel (vgl. 2.3.3.1) wurden die Zellaggregate in 15 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Nach dem Absinken der EBs wurde der Überstand bis auf 1,5 ml abgesaugt und die Zellaggregate wieder vorsichtig in EB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden EBs aus insgesamt drei Petrischalen auf vier bis sechs Polyornithin (PO)-beschichtete 6cm Zellkulturschalen gleichmäßig verteilt. Zwei Tage später wurde die neurale Selektion durch die Überführung der Zellen in ITSFn-Medium in Gegenwart von FGF-2 gestartet (Endkonzentration hFn = 2,5 µg/ml und FGF-2 = 2 µg/ml). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Die Zellen wurden über einem Zeitraum von 8 Tagen in ITSFn kultiviert.

2.3.3.3 Manuelle Isolierung der neuralen Zellstrukturen

Unter den gegebenen selektiven Kulturbedingungen in Gegenwart von FGF-2 wandern nach 5 Tagen flache Zellen aus den plattierten EBs aus. Etwa zur gleichen Zeit beginnt die Bildung der sog. Rosetten-Strukturen. Dabei handelt es sich um Zellcluster, die eine Neuralrohr-ähnliche Struktur aufweisen (Abb. 2.2 C). Nach etwa 8 - 10 Tagen weist die Mehrheit der plattierten EBs solche Strukturen auf. Diese neuralen Zellcluster werden nun manuell gepickt und in Suspensionskultur gebracht. Als Ausgangspunkt dienen 8 - 10 Tage in ITSFn kultivierte Zellen.

Die manuelle Isolierung dieser neuralen Zellcluster erfolgte unter Einsatz eines Binokulars in einer horizontalen Sterilbank. Die Neuralrohr-ähnlichen Zellcluster wurden mittels einer mit einer Kanüle (26g 3/8, 0.45x10) versehenen 1ml-Injektionsspritze von der Schale gepickt und als Zellaggregate aus der Kultur isoliert.

2.3.3.4 Neurosphärenkultur

Die manuell isolierten neuralen Zellcluster sollen in diesem Stadium selektiv angereichert und zur Proliferation gebracht werden. Dazu werden die Zellaggregate in N2-Medium überführt und in Anwesenheit von FGF-2 und Heparin kultiviert (Abb. 2.2 D). FGF-2 fördert das Wachstum der multipotenten neuralen Vorläuferzellen bzw. Stammzellen, wohingegen Heparin den Erhalt der Zellaggregate unterstützen soll.

Für die Neurosphärenkultur wurden die isolierten neuralen Zellcluster von jeweils drei Zellkulturschalen in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 300 rpm für 1 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellaggregate in 3 ml N2-Medium zweimal vorsichtig resuspendiert und auf 10 cm Petrischalen mit 7 ml N2-Medium in Suspensionskultur gebracht. Dem Medium wurden FGF-2 in einer Konzentration von 20 ng/ml und Heparin in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt. Das Medium wurde wie bei den EB-Kulturen (vgl. 2.3.3.1) alle 2 Tage gewechselt. Ebenso wurden FGF-2 und Heparin alle 2 Tage beim Mediumwechsel hinzugegeben. Die Kulturen wurden einmal die Woche 1:2 passagiert, indem die Neurosphären mit einer 1000 µl Pipette klein trituriert wurden. Die Kultivierung der Neurosphären erfolgte über einen Zeitraum von 2 Wochen.

2.3.3.5 Adhärenente neurale Kultur und Transfer in N2FEB

Die Neurosphären sollen in diesem Stadium in eine adhärenente und proliferative Kultur überführt werden. Für diesen Schritt ist ein Vereinzeln der Zellen unerlässlich. Hierbei werden die Zellen weiterhin in N2-Medium kultiviert und neben FGF-2 auch in Gegenwart

von EGF und B27 inkubiert (Abb. 2.2 E). Durch Überführung in ein FGF-2/EGF-haltiges Medium können multipotente neurale Vorläuferzellen bzw. Stammzellen (NSCs) angereichert werden. B27 unterstützt Proliferation und Überleben der neuronalen Zellen. Als Ausgangspunkt hierfür dienen ein bis 2 Wochen alte Neurosphärenkulturen.

Vor der Vereinzelung der Neurosphären wurden zunächst 3,5 cm Schalen mit 1x PO beschichtet. Nach einer Inkubation von mindestens 3 h wurden die Zellkulturschalen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Laminin (Ln; 2 µg/ml) bei 37 °C oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Für die Einzelzellsuspension wurden die 2 - 3 Wochen alten Neurosphären einer 10 cm Petrischale wie beim Mediumwechsel (vgl. 2.3.3.5) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und anschließend zur Sedimentation gebracht. Das Medium abgesaugt und die Zellaggregate 5 - 10 min bei 37 °C mit Trypsin/EDTA inkubiert. Das Trypsin wurde daraufhin durch Zugabe des Trypsin-Inhibitors neutralisiert. Durch Zugabe einer 0,1%igen DNase-Lösung (in HANKS) wurde ein Verklumpen der Zellen durch die freigesetzte DNA verhindert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig unter Verwendung von drei geflämten Pasteurpipetten, deren Öffnungen graduell verkleinert wurden, oder durch die Verwendung einer 1000 µl Pipette zu einer Einzelzellsuspension trituriert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und das Sieb mit 5 ml N2-Medium gespült. Durch die Filtration wurden alle verbliebenen Zellklümpchen entfernt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in N2-Medium resuspendiert. FGF-2 und B27 wurden in einer Konzentration von 10 ng/ml bzw. 1 µl/ml dem Medium hinzugefügt. Aufgrund des relativ hohen Zelltods wurde am darauf folgenden Tag das Medium gewechselt. Die Wachstumsfaktoren wurden alle 24 h erneut hinzugefügt und das Medium alle 2 Tage gewechselt.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90-100 % erreicht hatten, wurden sie 1:2 passagiert. Die Zellen wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA enzymatisch von der Schale gelöst. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen wurde die Schale mit 2 ml N2-Medium nachgespült. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in N2-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von FGF-2 (10 ng/ml) und B27 (1 µl/ml) erneut auf PO/Ln-beschichtete Schalen ausplattiert. Ab Passage drei erfolgte die weitere Kultivierung dieser Zellen in N2-Medium in Gegenwart von FGF-2 (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml) und B27 (1 µl/ml) (N2FEB-Medium). Überzählige Zellen wurden in Gefriermedium kryokonserviert (vgl. 2.3.4.3).

2.3.4 Kultivierung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSC)

2.3.4.1 Auftauen der hESC-NSCs

Die Lagerung der kryokonservierten hESC-NSCs erfolgte im flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen mit hESC-NSCs zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml vorgelegtem N2-Medium überführt. Während der Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm für 5 min, wurde je 1,5 ml N2-Medium sowie die Faktoren FGF-2 (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml) und B27 (1 µl/ml) auf zwei Wells einer mit PO/Ln beschichteten Sechs-Well-Zellkulturplatte vorgelegt (N2FEB-Medium). Das Zellpellet wurde dann vorsichtig in 1 ml N2FEB-Medium resuspendiert. Nachfolgend wurden die Zellen gleichmäßig ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte auf mit PO/Ln beschichteten Sechswellplatten oder auf 10 cm Schalen.

2.3.4.2 Passagieren der hESC-NSCs

Zur Passagierung der hESC-NSCs wird das Zellverband-auflösende Trypsin/EDTA verwendet. Um eine gute Plattierungseffizienz zu erreichen und Spontandifferenzierung sowie Karyotyp-Veränderungen zu verhindern, werden die hESC-NSCs nur für kurze Zeit mit Trypsin behandelt.

Um die Multipotenz und die Proliferation der hESC-NSCs zu erhalten wurde täglich FGF-2, EGF und B27 in einer Konzentration von 10 ng/ml bzw. 1 µl/ml ins Medium gegeben. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage erneuert, wobei die hESC-NSCs alle 3-4 Tage passagiert wurden. Dafür wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und 1 min mit Trypsin/EDTA (0,5 ml pro Well) bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde daraufhin mit dem gleichen Volumen Trypsin-Inhibitor (TI) pro Well abgestoppt. Die Zellen wurden dann mit einer 5 ml Pipette von der Zellkulturplatte abgespült, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einem entsprechenden Volumen N2FEB-Medium aufgenommen, wobei die hESC-NSCs mit einer 5 ml Pipette resuspendiert wurden (vgl. 2.3.4.1). Nachfolgend wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 oder 1:3 in N2FEB-Medium auf mit PO/Ln beschichteten Sechs-Well-Zellkulturplatten oder 10 cm Schalen ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen erneut passagiert. Dies erfolgte in der Regel alle 3 - 4 Tage.

2.3.4.3 Einfrieren der hESC-NSCs

Beim Einfrieren wurden hESC-NSCs wie beim Passagieren mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturplatten abgelöst und abzentrifugiert (vgl. 2.3.4.2). In Abhängigkeit von der Dichte der Kultur wurden drei bis sechs Wells pro Kryoröhrchen eingefroren. Das Zellpellet wurde dazu mit einer 5 ml Zellkulturpipette in 1 ml 1x Gefriermedium (Sigma) oder in mit 10 % DMSO versetzten N2-Medium pro Kryoröhrchen vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte das kontrollierte Einfrieren der Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80 °C, wobei die Zellen hierbei um 1 °C/min heruntergekühlt wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff.

2.3.4.4 Differenzierung der hESC-NSCs

Die *in vitro* Differenzierung der hESC-NSCs wurde durch Wachstumsfaktorentzug und Überführen in ein B27- und cAMP-haltiges Medium eingeleitet (Differenzierungsmedium). Die Zugabe von B27-Supplement fördert das Überleben und die Langzeitkultivierung der differenzierten Neuronen. Ein Mediumswechsel erfolgte alle 2 Tage. Die hESC-NSCs beginnen zuerst in neuronale und nach einer längeren Entzugszeit (> 14 Tage) auch in gliale Zellen zu differenzieren.

2.3.4.5 Einfrieren der über FACS aufgereinigten neuronalen Zellen

Da hESC-abgeleitete neuronale Zellen eine relativ niedrige Einfrier- und Auftau-effizienz aufweisen und zudem eine geringe Überlebensrate zeigen, sind konventionelle Gefriermedien für bereits vordifferenzierte Zellen meist ungeeignet. Um die Einfrier- und Auftau-effizienz, sowie die Überlebensrate der neuronalen Zellen zu erhöhen, wurden verschiedene Einfriermedien und der ROCK-Inhibitor Y27632 vor, während und nach dem Einfrierprozess getestet. Des Weiteren wurde der allgemeinen Caspase Inhibitor Carbobenzoxymethyl-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-Methyl]-fluoromethylketon (z-VAD-FMK) verwendet.

Die mittels FACS angereicherten, neuronalen L1-positive Zellpopulationen wurden zunächst bei 1000 rpm 4 min abzentrifugiert. In einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen wurde das Zellpellet in 300 µl Medium resuspendiert und vor dem Einfrieren 20 min mit oder ohne ROCK-Inhibitor Y27623 (10 µM) inkubiert. Der zellpermeable, selektive Inhibitor der Rho-assoziierten Kinase (ROCK-Inhibitor Y27623) wirkt Apoptose-hemmend und fördert die Überlebensrate von Einzelzellen (Watanabe *et al.*, 2007). Parallel wurden Zellen vor dem Einfrieren für 20 min mit 500 nM des allgemeinen Caspase Inhibitors z-VAD-FMK inkubiert (vgl. Ladewig, *et al.* 2008). Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet vorsichtig mit einer

1ml-Zellkulturpipette in 300 µl Gefriermedium vorsichtig resuspendiert und in ein 1 ml Kryoröhrchen überführt. Als Gefriermedien wurden entweder ein Standardkryomedium (KM), welches DMSO (10 %), Zellkulturmedium (10 %) und Serum-Replacement (SR; 80 %) enthielt oder ein Trehalose-haltiges Kryomedium (TKM: 10,5 % DMSO, 21,1 % 1 M Trehalose, 68,4 % SR) sowie ein von Ladewig *et al.* 2008 entwickeltes Kryomedium (KM-L: 10 % DMSO, 20 % 500 mM Myo-Isonitol, 0,25 V% Polyvinylalkohol) verwendet (vgl. Tab. 3.1). Anschließend erfolgte das kontrollierte Einfrieren der Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80 °C, wobei die Zellen hierbei um 1 °C/min heruntergekühlt wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff.

2.3.4.6 Auftauen der über FACS aufgereinigten neuronalen Zellen

Die Lagerung der kryokonservierten L1-positiven Neurone erfolgte im flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml vorgelegtem Differenzierungsmedium und ROCK-Inhibitor (10 µM) überführt. Während der Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm für 4 min, wurde je 500 µl Medium sowie der ROCK-Inhibitor (20 µM) auf einem Well einer mit PO/Ln beschichteten Zwölf-Well-Zellkulturplatte vorgelegt. Das Zellpellet wurde dann vorsichtig in 500 µl Medium resuspendiert. Nachfolgend wurden die Zellen ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.3.4.7 Lentivirale Transduktion von hESC-NSCs mit EF1α-mRFP oder EF1α-EGFP

Die Lentivirale Transduktion der hESCNP mit dem EF1α-mRFP- bzw. EF1α-EGFP-Konstrukt wurde in Zusammenarbeit mit Lodovica Borgese (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) durchgeführt (Stock *et al.*, 2010). Die konstitutive Expression eines roten (mRFP, monomeric red fluorescent protein) bzw. eines grünen Fluoreszenzfarbstoffes (EGFP, green fluorescent protein) wird hier durch den humanen Elongation Factor-1-alpha Promotor (EF1α) angetrieben. Nach mehrmaligen Passagieren der transduzierten Zellen (vgl. 2.3.4.2) erfolgte eine Anreicherung der rot bzw. grün fluoreszierenden hESC-NSCs durch Zellsortierung (vgl. 2.4.5). Dies ist notwendig, weil bei der Transduktion nur ca. 60-80 % der Zellen infiziert wurden. Die aufgereinigte rot bzw. grün

fluoreszierende Zellpopulation wurde ebenfalls mehrmals passagiert, eingefroren (vgl. 2.3.4.3) und für die Transplantation auf hippocampale Schnittkulturen verwendet (vgl. 2.4.6).

2.3.5 Transfektion

2.3.5.1 Lipofektion

Die Lipofektion basiert auf kationischen Lipiden (FuGENETM6, Roche), die durch ionische Wechselwirkungen mit der DNA kondensieren. Durch Endozytose werden die entstehenden Lipid-DNA-Komplexe in die Zelle aufgenommen. Mit dieser Methode wurden vordifferenzierte hESC-NSCs (vgl. 2.3.4.4) mit dem Expressionsplasmid pmaxGFP (Amara) und dem pT α 1-EGFP Expressionsplasmid transfiziert.

Zunächst wurden 60-70 % dichte hESC-NSCs über wenige Tage durch Wachstumsfaktorentzug und Überführen in ein spezielles Medium neuronal differenziert (vgl. 2.3.4.4). Für eine Transfektion wurden 3 μ l FuGENETM6 und 97 μ l N2 für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium einer 3,5 cm Schale mit andifferenzierten Zellen abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. In ein Eppendorf-Röhrchen wurden 2 μ g des pmaxGFP oder pT α 1-EGFP Plasmids vorgelegt und das verdünnte FuGENETM6- Transfektionsreagenz tropfenweise zur Bildung eines Komplexes hinzugefügt. Das Röhrchen wurde vorsichtig durch Antippen gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (Verhältnis FuGENETM6: DNA = 3:2). Der Komplex wurde dann tropfenweise über eine 3,5 cm Schale gleichmäßig verteilt. Die Schale wurde nach vorsichtigem Schwenken im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumswechsel.

2.3.5.2 Nukleofektion

Alternativ zur Lipofektion wurde ebenfalls eine Transfektion der differenzierten hESC-NSCs mittels Nukleofektion durchgeführt. Dafür wurde der Nucleofector und ein NucleofectorTM-Kit von Amara/Lonza verwendet. Die Methode ist gegenüber der Lipofektion weitaus effektiver, aber für die Zellen weniger schonend. Bei der Nukleofektion wird durch einen elektrischen Impuls kurzfristig die Zellmembran und die Membran des Zellkerns permeabilisiert, wodurch ein gezieltes Einbringen der DNA in den Zellkern der gewünschten Zelllinie ermöglicht wird.

Zunächst erfolgte die viertägige Differenzierung von 70 % konfluent gewachsenen hESC-NSCs durch Wachstumsfaktorentzug und Überführen in ein spezielles Medium. Die Nukleofektion wurde dann entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dafür

wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und 1 min mit Trypsin/EDTA (0,5 ml pro Well) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin mit dem gleichen Volumen TI pro Well abgestoppt. Die Zellen wurden dann mit einer 5 ml Pipette von der Zellkulturplatte abgespült, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben, ausgezählt (Zellkonzentration pro Nukleofektionsansatz: 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen/100 μ l NucleofectionTm-Solution) und für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einem entsprechenden Volumen NucleofectionTm-Solution aufgenommen und resuspendiert. Für einen Ansatz wurden 2 μ g des pmaxGFP als Positivkontrolle oder 3 μ g pT α 1-EGFP Plasmids mit 100 μ l der Zellsuspension gemischt, blasenfrei in eine Amaxa-Küvette überführt und mithilfe des entsprechenden Nucleofector-Programms (A27) nukleofiziert. Um mögliche Zellschäden zu vermeiden, wurden die Zellen direkt aus der Küvette auf mit PO/Ln beschichteten und mit Differenzierungsmedium versehenen 3,5 cm Schalen ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. 24 h später wurde die GFP Fluoreszenz und damit der Erfolg der Nukleofektion mikroskopisch untersucht.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Zellzahlbestimmung

2.4.1.1 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde über Trypanblau-Färbung ermittelt. Der Azofarbstoff Trypanblau kann die Membran toter Zellen permeieren, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Der Anteil lebender Zellen in der Zellkultur ergibt sich aus dem Quotienten lebender (ungefärbter) Zellen zur Gesamtzellzahl (ungefärbte und gefärbte Zellen). Die Zellsuspension wurde dazu 1:2 mit Trypanblau verdünnt und mittels eines Fuchs-Rosenthal Hämocytopeters ausgezählt.

2.4.2 Immunzyto- und Immunhistochemie

2.4.2.1 Allgemeines

Eine Auflistung der primären und sekundären Antikörper, Hersteller, Beschreibung, Verdünnung sowie Besonderheit der Färbungen (z.B. für die Blockierung verwendete Seren) sind unter 2.1.5.1, 2.1.5.2 und 2.1.10.1 sowie 2.1.10.2 aufgeführt. Mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgten an einem Zeiss Axioskop 2 sowie an einem Zeiss Axiovert 200M.

2.4.2.2 Fluoreszenzfärbung

2.4.2.2.1 Nachweis von Oberflächenantigenen

Zum Nachweis von Oberflächenmarkern, wie zum Beispiel L1, wurden die Zellkulturen bei Raumtemperatur für 10 min mit 4 % PFA fixiert und anschließend 3x für 10 min mit PBS gewaschen. Nach einem 1-stündigen Blockierungsschritt mit Blockierungslösung 1 wurden zur Vermeidung unspezifischer Bindung von Antikörpern die Zellen 3 h oder über Nacht mit dem entsprechenden primären Antikörper (Verdünnung siehe 2.1.5.1) in Blockierungslösung 1 inkubiert. Im Anschluss an drei Waschschrte mit PBS, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und so die Hintergrundfärbung zu vermindern, wurde das Antigen durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Cy3-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierungslösung 1 visualisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt, das Präparat dreimal gewaschen und mit Mowiol oder Vectashield eingedeckelt. Erfolgte eine Doppelmarkierung mit anderen Marker z.B. gegen ein zytoplasmatisches Epitop, wurde nach dem sekundären Antikörper wiederum 3x für 10 min gewaschen, mit Paraformaldehyd zwischenfixiert und wie unter 2.4.2.2.2 beschrieben fortgefahren.

2.4.2.2.2 Nachweis von zytoplasmatischen Markern

Die zu färbenden Zellen wurden mit 4%igem Paraformaldehyd für 10 min fixiert und anschließend 3x für 10 min mit PBS gewaschen. Nach einem 1-stündigen Blockierungsschritt mit Blockierungslösung 2 bei Raumtemperatur wurden die Zellen 3 h oder über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper (Verdünnungen siehe 2.1.5.1) in Blockierungslösung 2 inkubiert. Nach drei Waschschrten mit PBS wurden die primären Antikörper mit den entsprechenden sekundären Antikörpern in Blocklösung 2 detektiert. Nach 1 h wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Bei der Verwendung eines biotinylierten Antikörpers, erfolgte eine dritte Inkubation für 1 h mit einem Avidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff in Blocklösung 2.

Die Kernfärbung wurde mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Präparate mit Mowiol oder Vectashield (Vector Laboratories) eingedeckelt.

2.4.2.2.3 Nachweis von Kernmarkern

Zur Detektion von Kernmarkern wurden die Kulturen bei Raumtemperatur für 10 min mit 4 % PFA behandelt und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 10 min mit 0,5 %

Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Nach einem 1-stündigen Blockierungsschritt mit Blockierungslösung 3 bei Raumtemperatur wurden die Zellen über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper (Verdünnungen siehe 2.1.5.1) in Blockierungslösung 3 inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte, anschließend wurde das Antigen durch 1-stündige Inkubation mit einem geeigneten sekundären Antikörper in Blockierungslösung 3 visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol oder Vectashield eingedeckelt.

2.4.2.2.4 Proliferationsassay

Die Zellproliferation wird durch den Einbau von 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in die DNA verfolgt. Zur Quantifizierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus wurden die Kulturen in Abhängigkeit von der Zelldichte an Tag 2 oder 3 nach der Passagierung mit 10 µM 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) gepulst. Drei Stunden später wurden die Kulturen für 10 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 0,5 % Triton-X100 in PBS für 30 min permeabilisiert, anschließend wurde die DNA für 10 min mit 2N HCl denaturiert. Im Anschluss an eine 10-minütige Neutralisierung mit 0,1 M Boratpuffer (pH 9,5) wurden die Kulturen für 30 min mit Blockierungslösung 2 geblockt. Im Folgenden wurden die Zellen über Nacht mit dem primären anti-BrdU Antikörper in Blockierungslösung 2 inkubiert. Die Visualisierung erfolgte im Anschluss an einen Waschschrte durch eine 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Cy3-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierungslösung 2. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol oder Vectashield eingedeckelt.

2.4.3 Western Blot Analyse und Immunodetektion

2.4.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung der Proteinlysate wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers im kalten PBS von den Zellkulturschalen abgelöst, ausgezählt und anschließend bei 1200 rpm und 4 °C 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 µl Lysispuffer (inklusive Protein-Inhibitor 1:100) pro 1x10⁶ Zellen resuspendiert und 15 - 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 4 °C und 16000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung der Zellysate erfolgte nach der Bradford-Methode. Für die Proteinmessung wurden die Lysate 1:50 mit PBS verdünnt, in eine 96-well-Platte überführt und jeweils 150 µl einer 1:4 verdünnten Biorad-Färbereagenz hinzupipettiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte in einem Elisa-Reader bei 595 nm vermessen. Zur korrekten Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde auf derselben Platte ebenfalls eine Eichreihe mit einem BSA-Standard (0,1 mg/ml in PBS) im Bereich von 1 - 12 mg aufgetragen. Die Umrechnung der Proteinkonzentration anhand der Standard-Eichkurve erfolgte mittels der SoftmaxPro-Software. Für die SDS-PAGE wurden 40 µg jeder Probe mit dem gleichen Volumen von 5x SDS Ladungspuffer versetzt und 10 % Mercaptoethanol dazugegeben. Nach kurzem Abzentrifugieren erfolgte die Aufbewahrung der Proben bei -20 °C.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben langsam auf Eis aufgetaut, kurz zentrifugiert, bei 98 °C denaturiert, wieder kurz zentrifugiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert.

2.4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mit der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hierbei bindet SDS an die hydrophoben Regionen der Proteine, die dadurch einerseits denaturiert werden und andererseits eine negative Ladung proportional zu ihrem Molekulargewicht erhalten. Demnach überdeckt SDS die Eigenladung der Proteine, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld nur von der negativen Gesamtladung der Proteine, die proportional zum Molekulargewicht ist, und von der Porengröße der Gelmatrix abhängig ist. Die Porengröße einer Gelmatrix wird durch die Polyacrylamidkonzentration bestimmt. Je höher diese Konzentration ist, desto kleinere Proteine können voneinander getrennt werden. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) wird die Polymerisation des Polyacrylamids gestartet. Das zugegebene TEMED (N,N,N-Tetramethyldiamin) stabilisiert die Radikale bei der Kettenbildung, so dass ausreichend viele Startmoleküle bei Reaktionsbeginn der Polymerisation zu Verfügung stehen.

Bei der SDS-PAGE wird ein diskontinuierliches Gelsystem nach Lämmli verwendet, welches sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammensetzt. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine in einer schmalen Bande. Die Beweglichkeit der Proteine wird

durch die relativ geringe Polyacrylamidkonzentration nur bedingt eingeschränkt und es erfolgt keine Auftrennung aufgrund der Ladung.

Die Auftrennung der Proteine bezüglich ihres Molekulargewichts erfolgt im Trenngel. Die Acrylamidkonzentrationen des Trenngels betragen je nach Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 8 - 12%. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde darauf ein Sammelgel gegossen. Das fertige Gel wurde nach der Polymerisierung in die Elektrophoresekammer überführt und mit Elektrophorese- bzw. Laufpuffer benetzt. Anschließend wurden die Proteinproben in die Geltaschen pipettiert. Zur Sammlung der Proben an der Lauffront wird die Elektrophorese bei 100 V gestartet. Beim Erreichen des Trenngels wurde die Elektrophorese bei 200 V je nach Größe des zu untersuchenden Proteins eine bis 1,5 h durchgeführt.

2.4.3.4 Western Blot und Immunodetektion

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgt nach dem Prinzip des Elektroblobs. Für das Übertragen der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden das SDS-Gel und die Membran blasenfrei zwischen Filterpapieren gelegt und in eine Blotting-Kammer gespannt. Der Transfer erfolgte unter Kühlung bei 100 V für eine bis 1,5 h in Transferpuffer. Unmittelbar nach dem Transfer wurde die Membran zunächst mit ddH₂O gewaschen. Das Gesamtprotein auf der Membran wurde nun mit Ponceau-Rot-S-Färbelösung reversibel angefärbt, um die Effizienz des Transfers und die gleichmäßige Beladung der Proteinmengen zu kontrollieren.

Für die Immunodetektion der zu untersuchenden Proteine wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer (10 % Milchpulver in TBS-T) gesättigt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator. Nach drei mindestens 15-minütigen Waschschritten mit TBS-T wurde die Inkubation der Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Nach einer 1-stündigen Inkubationszeit wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T und einmaligem Waschen mit TBS sowie ddH₂O entfernt. Die Detektion erfolgte entweder mithilfe des SuperSignal®-West-Pico-Chemiluminescent-Substrat oder mit dem SuperSignal®-West-Femto-Chemi-luminescent-Substrat. Hierbei katalysiert die Peroxidase die Oxidation des im Substrat enthaltenen Luminols, wobei es zu einer Lichtemission kommt, die einen Röntgenfilm an der entsprechenden Stelle schwarz färbt.

2.4.4 Durchflusszytometrie

Aufgrund der kompakt wachsenden und morphologisch sehr heterogenen Zellpopulation und aufgrund der punktuellen Expression von Zelloberflächenantigenen ist es an den direkt konvertierten hESCs nur schwer möglich, eine visuelle Quantifizierung der für diese Antigene positiven Zellen durchzuführen. Aus diesem Grund wurden die Anteile an Tra-1-60-, SSEA-1-, PSA-NCAM-, A2B5-, CD133- und L1-positiven Zellen an den direkt konvertierten hESC-Kulturen durchflusszytometrisch bestimmt.

Durch eine 2-minütige Trypsin-Behandlung wurden Einzelzellsuspensionen der zu untersuchenden direkt konvertierten Zellen hergestellt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. In einem Volumen von 500 µl PBS/10 % FCS und einer Blockzeit von 15 min wurden 1×10^6 Zellen für 20 min mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Die Antigene, sofern sie nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren, wurden nach einem Waschschrift mit PBS durch eine 20-minütige Inkubation mit einem geeigneten sekundären Antikörper (Alexa 488 oder Alexa 647) visualisiert. Als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindung und Autofluoreszenz wurden Zellen mitgeführt bei denen auf eine Inkubation mit dem primären und/oder dem sekundären Antikörper verzichtet wurde.

Um tote Zellen nachzuweisen, wurden die Proben nach einem Waschschrift in 500 µl PBS mit 1,2 µg/ml Hoechst 33258 resuspendiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluorochrome wurden auf einem mit drei Lasern ausgestatteten analytischen Durchflusszytometer (LSRII) angeregt und ausgelesen. Für die Messung der Hoechst-Fluoreszenz wurden eine Anregungswellenlänge von 405 nm sowie ein 440/40 Bandpassfilter eingesetzt. Als Einstellungen für die Alexa 647-Messung wurden eine Anregungswellenlänge von 653 nm und ein 640/30 Bandpassfilter gewählt. Für die Alexa 488-Messung hingegen wurden eine Anregungswellenlänge von 493 nm und ein 485/20 Bandpassfilter gewählt. Mit Hilfe der Flowjo-Analyse-Software wurden die Daten analysiert und dargestellt. Bei der Auswertung wurden Feeder-Zellen, die in geringer Menge trotz der Kultivierung auf Matrigel vorhanden sind, über Vorwärtsstreulicht-(Forward Scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht-(Sideward Scatter, SSC) Eigenschaften und tote Zellen über Hoechst 33258-Fluoreszenz identifiziert und aus der zu analysierenden Zellpopulation eliminiert.

2.4.5 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

2.4.5.1 Präparation der hESC-NSCs

Für die FACS-Sortierung ist es unerlässlich, dass die Zellen vereinzelt vorliegen. HESC-NSCs (hESC-NSCs, T α 1-EGFP-nukleofizierte und EF1 α -mRFP-transduzierte hESC-NSCs) wurden nach mehrtägigem Wachstumsfaktorentzug von der Schale abgelöst und in eine Einzelzellsuspension überführt.

HESC-NSCs, die am Tag 4 der Differenzierung mit dem T α 1-EGFP-Plasmid nukleofiziert worden waren, wurden 2 Tage später für die Zellsortierung vorbereitet. Für die L1-basierte Zellsortierung wurden hESC-NSCs und EF1 α -mRFP oder EF1 α -EGFP transduzierte Zellen 7 Tage vordifferenziert. Nach Abnahme des Mediums wurden die vordifferenzierten T α 1-EGFP-Plasmid nukleofizierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 1 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor im Verhältnis 1:1. Die Zellen wurden dann mit einer 5 ml Pipette von der Zellkulturplatte abgespült und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Die für die L1-basierte Zellsortierung vorgesehenen Zellen wurden nach Möglichkeit nach Abnahme des Mediums und einmaligen Waschen mit PBS nicht-enzymatisch von der Schale abgespült und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Im Falle der T α 1-EGFP nukleofizierten Zellen wurde das Pellet in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml im FACS-Puffer resuspendiert. Der Suspension wurde 0,1 % DNase zugesetzt, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden bis zur Sortierung auf Eis gelagert.

Für die L1-basierte Zellsortierung wurden die nun folgenden Schritte auf Eis durchgeführt. In einem Volumen von 1 ml FACS-Puffer/10 % NGS und einer Blockzeit von 15 min wurden 5×10^6 Zellen für 20 min mit dem primären Antikörper L1 (1:400) inkubiert. Das Antigen wurde nach einem Waschschriff mit PBS durch eine 20-minütige Inkubation mit einem geeigneten sekundären Antikörper (Alexa 488; 1:500) visualisiert. Nach einem Waschschriff wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml FACS-Puffer resuspendiert. Um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden wurde der Suspension 0,1 % DNase zugesetzt. Die Lagerung bis zur Zellsortierung erfolgte auf Eis.

Als Autofluoreszenzkontrolle für die T α 1-EGFP-Zellsortierung wurden nicht-nukleofizierte Zellen verwendet. Für die L1-basierte Immunoselektion hingegen wurden als Kontrollen Zellen mitgeführt, bei denen auf eine Inkubation mit dem primären und/oder dem sekundären Antikörper verzichtet wurde. Dadurch konnten unspezifische Antikörperbindungen sowie Autofluoreszenz der Zellen ausgeschlossen werden.

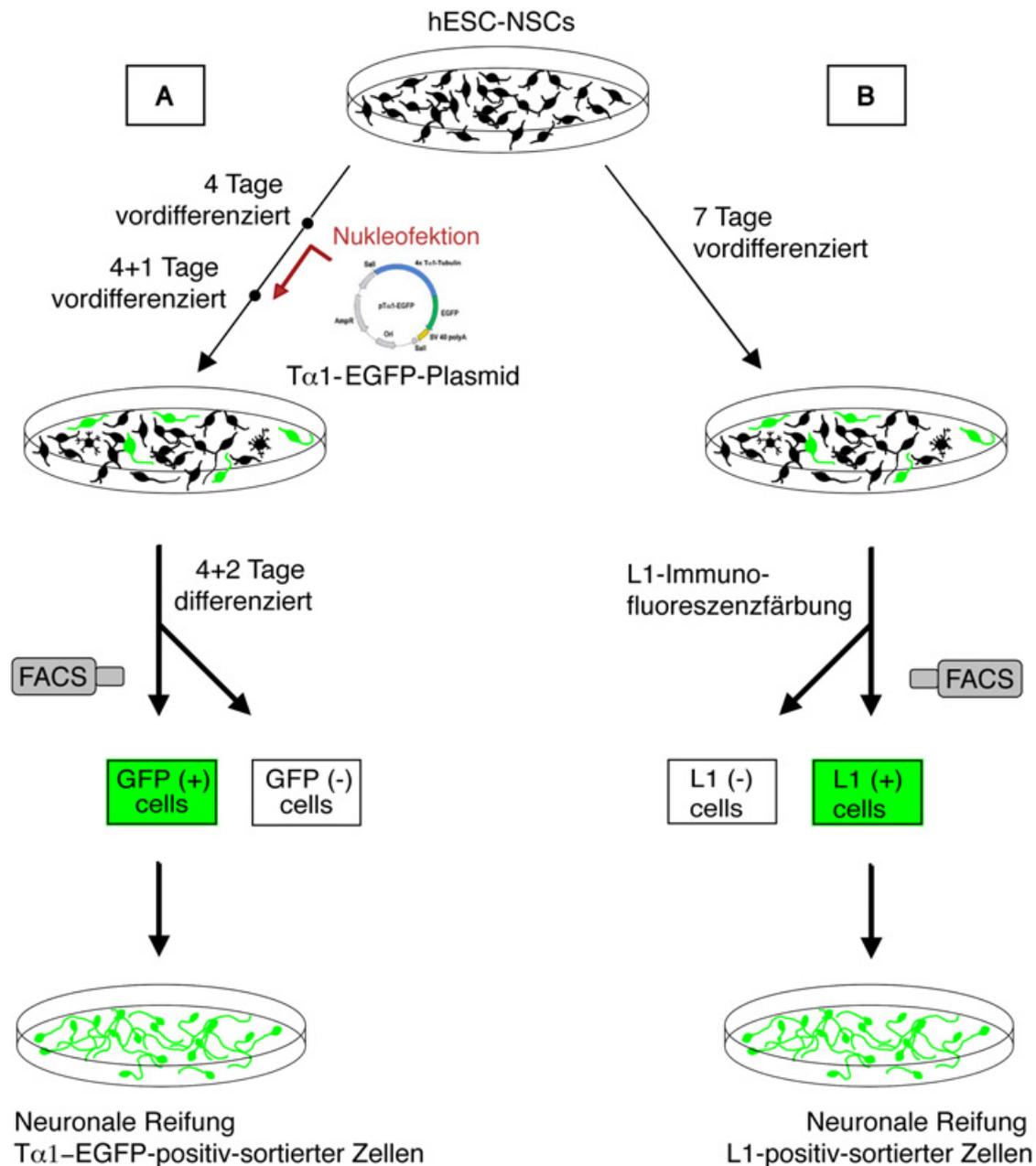


Abb. 2.3: Übersicht der Tα1- und L1-basierten Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS).

(A) Schematische Übersicht der Tα1-EGFP-basierten Linienselektion von hESC-NSCs. Die Zellen werden 4 Tage vordifferenziert, mit Tα1-EGFP transient transfiziert und über FACS aufgereinigt. (B) Darstellung der L1-basierten Linienselektion von hESC-NSCs. 7 Tage vordifferenzierte Zellen werden in Suspension mit dem Antikörper gegen das Oberflächenantigen L1 gefärbt und über die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers mittels FACS angereichert.

2.4.5.2 Zellsortierung

Die präparative FACS-Sortierung wurde in Kooperation mit Herrn Elmar Endl (Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie, Universität Bonn) durchgeführt. Es wurde die FACSDIVA von Becton Dickinson verwendet.

Unmittelbar vor der Sortierung wurden die Zellen durch einen Filter gegeben, um eine gute Vereinzelung zu erreichen. Um tote Zellen aus der sortierten Population auszuschließen, wurde der zu sortierenden Zellsuspension Propidiumiodid (PI, 0,5 µg/ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden anhand der Vorwärtsstreulicht- (Forward Scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht- (Sideward Scatter, SSC) Eigenschaften mit einem 488 nm Laserstrahl analysiert. Tote Zellen wurden über PI-Fluoreszenz identifiziert und aus der zu analysierenden Zellpopulation eliminiert. Das Sortierverfahren basierte auf der Fluoreszenzintensität und wurde bei einer Flussrate von 1.500 Ereignissen/s durchgeführt. Die aufgefangenen Zellen wurden bis zum Ende der FACS-Sortierung auf Eis gehalten und dann auf PO/Ln-beschichteten 24-well oder 12-well Platten sowie auf 4-well Chamber slides in Differenzierungsmedium replattiert. Die Zellen wurden nach 24 h mit 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert oder noch weitere 6 Tage kultiviert. Zu beiden Zeitpunkten wurde ebenfalls bei den L1-selektionierten Zellen RNA und Protein isoliert. Für die Messung der Propidiumiodid(PI)-Fluoreszenz und der EGFP-Fluoreszenz wurden eine Anregungswellenlänge von 488nm sowie ein 630/22 Bandpassfilter eingesetzt. Für die Alexa 488-Messung wurden eine Anregungswellenlänge von 488 nm und ein 530/30 Bandpassfilter gewählt. Zusätzlich dazu wurde im Falle der verwendeten hESC-NSCs H9.2 EF1 α mRFP Zelllinie für die monomeric Red Fluoreszenz eine Anregungswellenlänge von 488 nm und ein Bandpassfilter von 630/22 verwendet. Die Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Flowjo Analysesoftware.

2.4.6 Plasmidpräparation

Vor Beginn der Transformation wurden die DH5 α Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden für die Transformation je 50 µl der kompetenten DH5 α Bakterien in sterile Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Dazu wurden 1-2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA (pT α 1-EGFP) hinzugefügt, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien für 20 s bei 37 °C Hitze inkubiert und sofort für 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 mit einer sterilen Öse einzelne Kolonien in jeweils 8 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt.

Sechs Milliliter dieser Vorkultur wurden zur Überprüfung der Plasmid-Aufnahme für eine Minipräparation verwendet. Die restlichen 2 ml der Bakterienkultur 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 sog. 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%igen 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: $\mu\text{g DNA/ml} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

2.4.7 Herstellung hippocampaler Schnittkulturen

Die Schnittkulturen wurden in Zusammenarbeit mit Barbara Steinfarz (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) angefertigt. Mit einem Vibroslicer (VSLM1; Campden Instruments; Sibley; GB) wurden von postnatalen Wistar Ratten (P9; Charles River, Sulzfeld) 400 μm Schnitte unter Erhalt des Gyrus dentatus, des entorhinalen und temporalen Cortex hergestellt (Abb. 3.23 C). Durch diese Prozedur wurden mindestens sechs Schnitte pro Tier erstellt. Die Schnittkulturen wurden als sogenannte „interface“-Kulturen auf Polyestermembranen (Transwell-Clear, Corning; Bodenheim) bei 35 °C und 5 % CO_2 propagiert (Stoppini *et al.*, 1991). Das Medium wurde an Tag eins nach Explantation und danach jeden zweiten Tag gewechselt. Die Schnittkulturen wurden in Pferdeserum-haltigem Medium kultiviert, das graduell bis zum Tag 5 nach Explantation durch serumfreies Medium ersetzt wurde (DMEM/F12 + N2 und B27 Supplemente). Die Mehrheit der Schnittkulturen zeigte einen beeindruckenden Erhalt der Histoarchitektur bis zu 4 Wochen nach Explantation.

2.4.8 In vitro Transplantation und Aufarbeitung der hippocampalen Schnittkulturen

Die *in vitro* Transplantation wurde in Kooperation mit Barbara Steinfarz an Tag 10 ± 2 in Kultur durchgeführt. Es wurden $1-2 \times 10^4$ 7 Tage entzogene und auf L1-positiv-sortierte hESC-NSCs zu einem Volumen von 1 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. Nach 2 und 3 Wochen wurden elektrophysiologische Untersuchungen zur Analyse der synaptischen Integration von Dr. Thoralf Opitz (Experimentelle Epileptologie, Klinik für Epileptologie, Universität Bonn) durchgeführt (vgl. 2.4.12). Im Anschluss daran wurden die Schnittkulturen für morphologische Analysen in 4 % Paraformaldehyd/PBS/Azid und 0,1 % Glutaraldehyd (GA) über Nacht bei 4 °C fixiert. Die Schnitte wurden in PBS/Azid bis zur Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung bei 4 °C gelagert.

2.4.9 RT-PCR-Analyse

2.4.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Gefäße und Filterspitzen verwendet. Durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) wurde das eingesetzte Wasser von RNasen befreit.

Die Zellen wurden nach Abnahme des Mediums zunächst einmal mit PBS gewaschen und für 1 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor im Verhältnis 1:1. Die Zellen wurden dann mit einer 5 ml Pipette von der Zellkulturplatte abgespült, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei -80 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Dazu wurde das Pellet zunächst in 350 µl Lysispuffer (1 ml Lysispuffer + 10 µl Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend mit 1 Volumen 70 % Ethanol in DEPC-Wasser versetzt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy-Kit nach Angaben des Herstellers.

Kontaminierende DNA wurde durch Verwendung des RNase-free DNase Set eliminiert, das ebenfalls nach Anleitung des Herstellers eingesetzt wurde.

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert oder sofort in die Reverse Transkription eingesetzt.

2.4.9.2 Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription diente Gesamt-RNA. Um bei der Reversen Transkription lediglich mRNA zu erfassen, wurden oligo(dT)-Primer verwendet.

Die Reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des iScript RT-Kits (Biorad) nach Angaben des Herstellers. Zur Reversen Transkription (RT) wurden 0,8 µg Gesamt-RNA pro Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert. Die gebildete cDNA wurde bei -20 °C eingefroren oder sofort in die PCR eingesetzt.

2.4.9.3 Semi-quantitative RT-PCR (semi-qRT-PCR)

Die semi-quantitative RT-PCR wurde mit 1 µl cDNA pro Ansatz durchgeführt. Es wurden je 25 pmol der Primer, 200 µM je dNTP und 0,5 U Taq-Polymerase eingesetzt. Primer-Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Schmelztemperaturen des PCR-Produkts sowie Größe des PCR-Produkts sind der Tabelle 2.3 unter 2.1.6 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden auf 1,5%igen Agarosegelen analysiert und mit dem Geldokumentationssystem GelDoc2000 dokumentiert.

2.4.9.4 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative RT-PCR wurde die cDNA ebenfalls wie unter 2.4.9.1 und 2.4.9.2 beschrieben gewonnen. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten unter Verwendung der SYBR-Green-Methode an einem Biorad iCycler-System in 25 µl Reaktionen durchgeführt. Hierfür wurden 1 µl cDNA, je 30 pmol der Primer, 200 µM je dNTP, 3 mM MgCl₂, 1:2.000.000 SYBR Green I, 10 µM Fluorescein und 0,5 U Taq-Polymerase eingesetzt. Primer-Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Schmelztemperatur des PCR-Produkts sowie Größe des PCR-Produkts sind der Tabelle 2.3 unter 2.1.6 zu entnehmen. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde über Schmelzkurvenanalyse verifiziert.

Um das Expressionslevel der verschiedenen Gene vergleichen zu können, wurden alle erhaltenen Daten auf das Haushaltsgen 18S rRNA normalisiert, welches zu jedem Zeitpunkt in allen Zellen konstant exprimiert wird. Zur Berechnung der Genexpressionen auf der Grundlage der quantitativen PCR Daten wurde die Δ CP-Methode verwendet (vgl. 2.5).

2.4.10 Karyotypisierung

Im Laufe einer Langzeitkultivierung können hESCs und daraus generierte neurale Stammzellen Karyotypveränderungen erfahren. Daher werden hESCs und hESC-abgeleiteten Populationen regelmäßig auf chromosomale Aberrationen untersucht.

Für eine Karyotypisierung wurden hESC-NSCs zunächst auf einer 10 cm Schale bis zur Subkonfluenz kultiviert (vgl. 2.3.4.2). Nach Erreichen dieser Zelldichte wurde 0,2 µg/ml

Colcemid zugegeben. Nach 6 h wurde der Überstand der Zellen aufgefangen und die Zellen durch eine 2-minütige Trypsin-Behandlung geerntet und zusammen mit dem Überstand abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 1 ml 0,075 M KCl-Lösung resuspendiert, anschließend wurde mit KCl-Lösung auf 3 ml aufgefüllt und die Zellsuspension für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von drei Tropfen Fixativ (Methanol:Eisessig; 3:1) erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Darauf folgend wurde das Pellet zwei- bis dreimal mit Fixativ gewaschen, in 500 µl Fixativ aufgenommen und auf zuvor entfettete und bei -20 °C vorgekühlte Objektträger aufgetropft. Über einem 60 °C warmen Wasserbad wurden die Chromosomen für ca. 20 s gespreitet und die Objektträger anschließend auf einer Wärmeplatte (60 °C) getrocknet. Die Präparate wurden daraufhin über Nacht bei 60 °C im Wärmeschrank gealtert und am nächsten Tag einer G-Bänderung unterzogen.

Hierfür wurden die Präparate für 50 s in einer auf 37 °C angewärmten Küvette mit 2,5 µl Bactotrypsin pro ml PBS inkubiert. Nach zweimaligem kurzen Waschen in PBS wurden die Proben für 18 min in Giemsa-Lösung angefärbt und anschließend in Leitungswasser gespült und auf der Wärmeplatte bei 60 °C getrocknet. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Christina Ergang am Institut für Humangenetik der Universitätskliniken Bonn an einem Leitz Diaplan 68236 Mikroskop. Dabei wurde die Software CytoVision Ultra verwendet.

2.4.11 Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH)

Die *In-Situ*-Hybridisierung ist eine molekularzytogenetische Methode, die es ermöglicht, spezifische DNA-Zielsequenzen durch Hybridisierung mit markierten komplementären Nukleinsäuresonden direkt in biologischen Präparaten zu identifizieren (Pardue *et al.*, 1969). Bei der Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (FISH) werden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden zur Detektion komplementärer DNA-Sequenzen verwendet (Pinkel *et al.*, 1986).

Die Aufarbeitung der hESC-NSCs sowie das Auftropfen der Präparation auf Objektträger für die FISH erfolgte wie unter 2.4.10 beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei kommerziell erhältliche, direktmarkierte DNA-Zentromer-spezifische α -Satelitten-Proben (CEP 12 und 17) der Firma Vysis zur Anwendung.

Für die Hybridisierung wurden zunächst die einzelnen Komponenten nach Angaben des Herstellers bei Raumtemperatur zusammenpipettiert, gut gemischt und für 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Vor der Hybridisierung wurde ein Bereich auf dem Objektträger mit einer ausreichenden Anzahl von Zellkernen und/oder Metaphasechromosomen mit Hilfe eines Diamantstiftes markiert. Pro Ansatz wurde 2,4 µl des Hybridisierungsgemisches auf ein rundes Deckglas (\varnothing 12 mm) pipettiert und mit der Pinzette invertiert auf den mit Diamantstift

markierten Bereich aufgelegt. Im Anschluss daran wurden die Deckglasränder mit einer Gummilösung (Fixogum) luftdicht verschlossen. Die Objektträger wurden dann für die Denaturierung und die Hybridisierung in den Hybridisierungsofen (Hybrite) gelegt und das entsprechende Hybridisierungsprogramm (Denaturierung: 75 °C für 1 min; Hybridisierung: 42 °C für 1 h oder über Nacht) gestartet. Unter Bedingungen, bei denen sich unspezifisch gebundene Sonden-DNA ablöst und spezifische Hybridmoleküle erhalten bleiben, wurden die Objektträger nach der Hybridisierung in zwei verschiedenen Pufferlösungen gewaschen. Nachdem das Deckglas vom Objektträger entfernt wurde, wurden die Präparate sofort in der Waschlösung I für 6 - 7 min bei 73 °C inkubiert und anschließend für 50 - 60 s in der Waschlösung II bei Raumtemperatur gewaschen. Im Anschluss daran wurde der Objektträger zur Entfernung der Salzkristalle kurz in destilliertes Wasser getaucht, mit Kimwipe Tüchern abgetrocknet, wobei der markierte Bereich ausgespart blieb und mit DAPI-Antifade gegengefärbt. Unmittelbar danach konnte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Der Hybridisierungsofen (Hybrite) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Markus Montag (Klinik für Reproduktionsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie, Frauenklinik, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.4.12 Elektrophysiologie

Für diese funktionalen Analysen wurden zunächst durch Zellsortierung gewonnene L1-positive Zellen (vgl. 2.4.5) zum einen auf einen primären Maus-Astrozyten-Zellrasen (Plastik Deckgläser; Ø 13 mm) in einer Dichte von 10^5 Zellen pro 132 mm^2 oder auf hippokampalen Schnittkulturen der Ratte in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Schnitt ausgesät.

Nach 5 und 9 Wochen Differenzierung auf murinen Astrozyten bzw. nach 3 Wochen auf hippokampalen Gewebeschnitten wurden somatische Ganzzelleableitungen (Whole Patch-Clamp) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden für die einzelnen Messungen auf ihr Ruhepotential geklemmt (Neurone $\approx -65 \text{ mV}$). Für die Messungen wurde eine Messapparatur bestehend aus einem aufrechtem Mikroskop (Axioskop FS2, Zeiss, Oberkochen), Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann, Ratingen) mit Patch-Clamp-Verstärker (Axiopatch 200B, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) und Videokamera (CCD-Kamera KP-M2RP, Hitachi, Düsseldorf) benutzt. Alle elektrophysiologischen Experimente wurden auf einem schwingungsgedämpften, durch einen Faraday-Käfig abgeschirmten Tisch durchgeführt. Durch den Faraday-Käfig wurde der empfindliche Patch-Clamp Vorverstärker von elektromagnetischer Interferenz abgeschirmt. Alle intrazellulären Ableitungen des Membranpotentials wurden mit Glasmikroelektroden (Borosilikatglas, GC150 TF, Modulom,

Aarhus, DK) durchgeführt. Die Elektroden wurden mit einem Mikropipetten-Puller (PC-10, Narishige, Tokio, Japan) gezogen und die Spitze mit einer sog. Microforge verengt. Die erreichten Pipettenwiderstände lagen bei 3-5 M Ω .

Die Patch-Pipette enthielt eine Lösung aus 120 mM Kaliumgluconat, 20 mM Kaliumchlorid (KCl), 10 mM Natriumchlorid (NaCl), 10 mM EGTA, 1 mM Calciumchlorid (CaCl₂), 4 mM Magnesium-Adenosin-triphosphat (MgATP) sowie 0,4 mM Natrium-Guanosin-triphosphat (NaGTP) und 10 mM HEPES/KOH (pH 7,2, 280-290 mosmol/kg). Die extrazelluläre Lösung hingegen bestand aus 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM D-Glukose und 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,35, 305-315 mosmol/kg).

Die Patch-Pipette wurde zunächst luftdicht in den Pipettenhalter gespannt und mit Hilfe eines Mikromanipulators unter Sichtkontrolle in die Nähe der Oberfläche des Astrozytenzellrasen oder des Hirnschnittes geführt. Unter ständiger visueller Kontrolle wurde nun die Spitze der Pipette vorsichtig der Membran des gewählten Neurons angenähert. Durch einen Unterdruck wurde das Membranstück unterhalb der Pipettenöffnung angesaugt. Dadurch wurde ein so enger Kontakt zwischen Glas und Membranoberfläche aufgebaut, dass die Pipettenöffnung elektrisch vollständig von der extrazellulären Umgebung isoliert wurde und ein Stromfluss nur über die Membran möglich war. Nun wurde die Membran durch behutsames Saugen durchbrochen.

Die Ableitungen des Membranpotentials und damit die Aufnahme von Aktionspotentialen wurden im "current clamp" Modus (Stromklemmenmodus) durchgeführt. Aus den damit gewonnenen Daten lassen sich Rückschlüsse auf das physiologische Erregungsmuster der Zellen ziehen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit einer Abtastrate von 50 kHz, um schnelle Veränderungen des Membranpotentials, wie im Falle von Aktionspotentialen, möglichst hochauflösend zu erfassen. Zuerst wurde die Spontanaktivität der Neurone aufgezeichnet.

Die passiven und aktiven Membraneigenschaften der Zellen wurden durch Zugabe von Strompulsen unterschiedlicher Länge und Stärke untersucht. Im „voltage-clamp“ (Spannungsklemmenmodus) Modus wurden Na⁺- and K⁺-Ströme untersucht und durch die Verwendung von 300 nM TTx (Alomone, Jerusalem) and 3 mM 4-Aminopyridine (Sigma, München) separiert. GABA_A- and AMPA/Kainate Rezeptoren wurden selektiv durch die Zugabe von 100 μ M Muscimol (Sigma, München) bzw. 100 μ M Kainsäure (Tocris, über Biotrend, Köln) aktiviert.

Die Daten wurden unter Verwendung eines A/D-Wandlers (Digidata 1320A) und der PClamp Software aufgenommen (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Die elektrophysiologischen

Untersuchungen wurden von Dr. Thoralf Opitz (Klinik für Epileptologie, Universität Bonn) durchgeführt.

2.5 Statistische Analyse

Die Zellsortierungs-(FACS) und Nukleofektionsexperimente unter Verwendung des Tubulin- α -Plasmids basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Für die L1-basierte Zellsortierung wurden mindestens 6 unabhängige FACS-Experimente durchgeführt. Die resultierenden Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde der t-Test nach Student eingesetzt.

Zur immunzytochemischen Charakterisierung wurden mindestens fünf Gesichtsfelder bzw. 800 Zellen pro Färbung ausgezählt. Diese Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils 30000 Ereignisse aufgenommen. Die dargestellten Daten basieren jeweils auf drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Zur Berechnung der relativen Genexpressionen auf Grundlage der aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten wurde die $\Delta\Delta$ CP-Methode verwendet, wobei der CP (Crossing Point)-Wert der Anzahl an PCR-Zyklen entspricht, die nötig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Die Expression des jeweiligen Zielgens wird auf die Expression eines homogen exprimierten Referenzgens bezogen: Δ CP = CP(Zielgen) - CP(Referenzgen). Nach dieser Normierung wird vom Δ CP-Wert der Proben der Δ CP-Wert der Kontrolle abgezogen: $\Delta\Delta$ CP = Δ CP(Probe) - Δ CP(Kontrolle). Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zur Kontrolle, normalisiert auf ein Referenzgen, ergibt sich aus der Formel $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$. Liegt der relative Expressionsunterschied unter 1, so ist das analysierte Gen in der Probe im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert, liegt er über 1, so ist das Gen im Vergleich zur Kontrolle heraufreguliert. Als Referenzgen wurde 18S rRNA verwendet. Diese Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bei der Karyotypisierung wurden mindestens zehn Metaphasen ausgezählt.

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FACS) wurden mindestens 50 Zellkerne gezählt.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen der L1 positiven Zellpopulation wurden für jedes Experiment mindestens sechs Zellen gepatcht. Diese Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Zur statistischen Analyse der Experimente wurde der t-Test nach Student eingesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Gewinnung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSCs)

Die Methode zur Gewinnung von hESC-NSCs ist unter 2.3.3 ausführlich beschrieben und soll hier nur kurz rekapituliert werden. Die hESCs wurden zunächst zu Embryoidkörpern (EBs) aggregiert (Abb. 3.1 A und B), in denen sie spontan in Derivate aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) differenzieren können. Durch Ausplattieren auf Polyornithin-beschichteten Zellkulturschalen wurde die neurale Differenzierung induziert. Es entstanden Zellcluster, sogenannte Rosetten-Strukturen, die eine Neuralrohr-ähnliche Struktur aufwiesen (Abb. 3.1 C). Um diese neuralen Zellcluster zunächst selektiv anzureichern und zur Proliferation zu bringen, wurden die Zellaggregate manuell gepickt und in Suspensionskultur (Neurosphärenkultur) gebracht (Abb. 3.1 D).

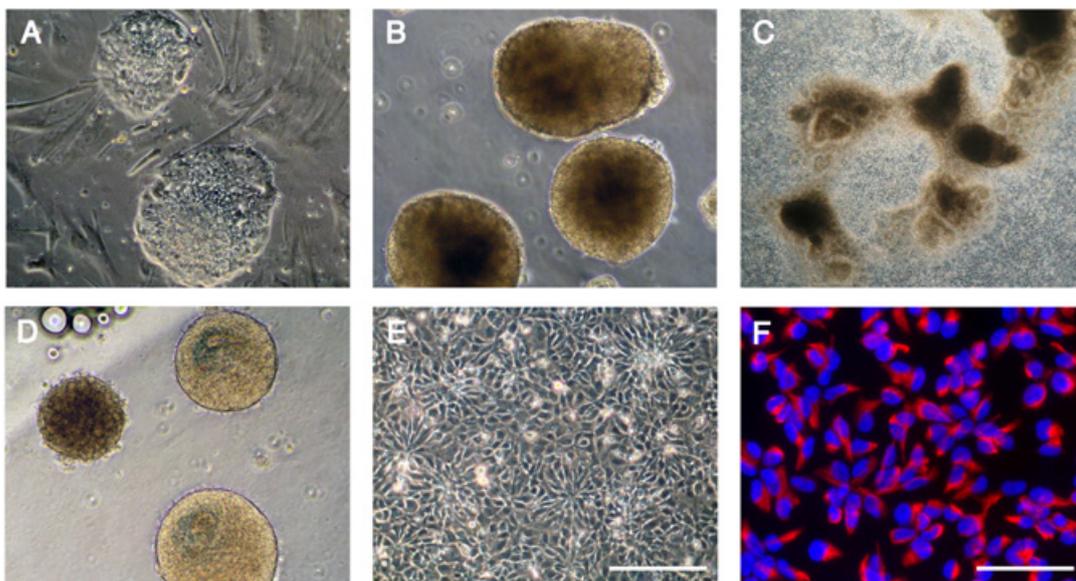


Abb. 3.1: Darstellung der schrittweisen Generierung von hESC-NSCs.

(A) Undifferenzierte hESCs wachsen als Kolonien auf einem Rasen mitotisch inaktiver embryonaler Mausfibroblasten. (B) Durch Aggregation undifferenzierter hESCs entstandene Embryoidkörper. (C) Bildung von Neuralrohr-ähnlichen Strukturen (Rosetten) nach Plattieren auf Polyornithin zur Selektion neuraler Vorläuferzellen. (D) Aggregation der manuell gepickten Rosetten-Strukturen zu Neurosphären. (E) Phasenkontrastaufnahme einer nahezu konfluenten homogenen Monolayerkultur der durch Einzelzellsuspension aus den Neurosphären erhaltenen neuralen Vorläuferzellen. Neuronale Zellen zeigen rosettenartige Anordnung in der adhären Monolayerkultur. (E). (F) Proliferation Nestin-expressierender neuraler Vorläuferzellen in FGF-2, EGF und B27. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Maßstabsbalken E: 100 µm; F: 50 µm.

Nach ausreichender Proliferation wurden diese Neurosphären in eine adhären Monolayerkultur überführt. Hiefür wurden die Zellen vereinzelt und in ein FGF-2, EGF und

B27 enthaltendes Proliferationsmedium (N2FEB-Medium) überführt (Abb 3.1 E). Unter diesen Bedingungen entstand eine homogene Zellpopulation, die adhärent in der Kulturschale Rosetten-ähnliche Muster formten (Abb. 3.1 E). Diese Zellen konnten extensiv propagiert werden (> 100 Passagen), wobei sie ihre morphologischen Eigenschaften und charakteristische Markerexpression (Abb. 3.2; siehe auch Koch *et al.*, 2009) beibehielten. Die Gewinnung der neuralen Vorläuferzellen aus hESCs (Zelllinie H9.2) wurde dreimal wiederholt. Zur Charakterisierung der Stammzeleigenschaften dieser Zellen siehe Koch *et al.* (2009).

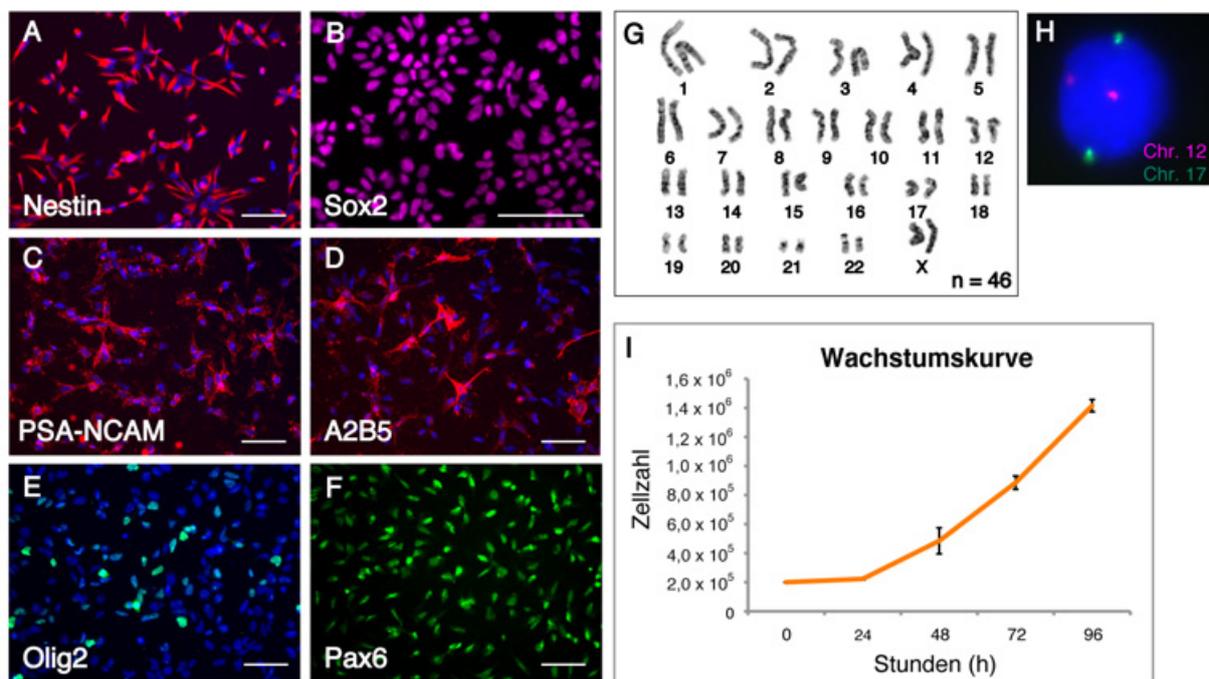


Abb. 3.2: Charakterisierung proliferativer hESC-NSCs.

(A-D) Mehrfach passagierte, proliferative hESC-NSCs exprimierten die neuralen Marker Nestin, Sox2, PSA-NCAM und A2B5. (E-F) Expression der neuroektodermalen Transkriptionsfaktoren Olig2 und Pax6 in hESC-NSCs Kulturen (G) Repräsentativer normaler weiblicher Karyotyp (n=46) der hESC-abgeleiteten NSCs (Zelllinie H9.2). (H) Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) von hESC-NSCs unter Verwendung von DNA-Sonden für die Chromosomen 12 und 17. (I) Wachstumsanalysen proliferierender hESC-NSC-Kulturen. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI-Farbstoff (blau). Immunfluoreszenzdaten zeigen repräsentative Bilder von hESC-NSCs (Passagen 19-69) der hESC-Zelllinie H9.2. Maßstabsbalken: 100 µm.

Die Charakterisierung der proliferierenden neuralen Zellpopulation ergab, dass die Zellen neben einer homogenen Expression der neuralen Marker Nestin ($99,5 \pm 0,9 \%$) und Sox2 ($98,6 \pm 0,7 \%$) auch eine ebenso starke Expression der Marker A2B5 ($86,5 \pm 5,4 \%$) und PSA-NCAM ($92,6 \pm 1,7 \%$) zeigten (Abb. 3.2 A-D). Des Weiteren wiesen diese Zellen eine homogene Expression des neuroepithelialen Markers Pax6 auf ($96,3 \pm 3,9 \%$; Abb. 3.2 F). Für den neuroektodermalen Transkriptionsfaktor Olig2 waren $26,2 \pm 6,1 \%$ der Zellen

immunoreaktiv (Abb. 3.2 E), der eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Motoneuronen und Oligodendrozyten spielt.

Die proliferativen Zellen zeigten eine spezifische Wachstumsrate mit einer mittleren Verdopplungszeit von 34 h (Abb. 3.2 I). Eine Veränderung der Zellmorphologie oder des Proliferationsverhaltens konnte nach Einfrieren und Auftauen, sowie durch eine Langzeitproliferation (> 100 Passagen) der Zellen nicht festgestellt werden. Ebenso konnten nur sporadische Veränderungen des Karyotyps nachgewiesen werden. G-Banding von Metaphase-Chromosomen neuraler Populationen zeigte, dass über 80 % der ausgewerteten Metaphasen einen normalen weiblichen Chromosomensatz (n=46) aufwiesen (Abb. 3.2 G). Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) wurden ebenfalls durchgeführt, um die Zellpopulation auf Trisomien der Chromosomen 12 und 17 zu untersuchen (Abb. 3.2 H). Dabei zeigte sich, dass etwa 12 % der ausgezählten Kerne eine Trisomie und 2 % der Kerne eine Monosomie für Chromosom 17 aufwiesen. Für Chromosom 12 konnte weder eine Trisomie noch eine Monosomie gefunden werden.

Auf mRNA-Ebene wurde über semi-qRT-PCR mit human-spezifischen Primern die Expression der neuralen Stammzell-assoziierten Marker Nestin, Sox2, BLBP und CD133 (Prominin-1) in den hESC-NSCs nachgewiesen (Abb. 3.3 A). Ebenso konnte ein hohes Expressionslevel der neuroepithelialen Marker Sox1 und Pax6 festgestellt werden. Die Expression der Transkriptionsfaktoren Olig2 und Nkx2.2 ließen sich ebenfalls über semi-qRT-PCR nachweisen. Eine wichtige Voraussetzung für die Erhaltung des Stammzellschicksals einer Zelle ist die Expression der Telomerase (TERT), die ebenfalls über RT-PCR nachgewiesen werden konnte.

Um festzustellen in welchen Bereichen des Gehirns die *in vitro* generierten hESC-NSCs anzusiedeln sind, erfolgte der Expressionsnachweis von regionalspezifischen Transkriptionsfaktoren auf mRNA-Ebene mittels semi-qRT-PCR mit human-spezifischen Primern (Abb. 3.3 B). In der anterior-posterioren Achse konnte eine starke Expression der Mesencephalon (Mittelhirn)-Marker En1, Otx2 und Pax2 sowie eine starke Expression der im Metencephalon (Hinterhirn) anterior gelegenen Marker Gbx2, HoxA2 und HoxB2 festgestellt werden. Die im Hinterhirn mehr posterior gelegenen Marker HoxA1 und HoxB1 wurden in geringeren Mengen nachgewiesen, ebenso der Transkriptionsfaktor HoxB6, der noch weiter posterior exprimiert wird.

Die semi-qRT-PCR Analysen für die Prosencephalon (Vorderhirn)-Marker, genauer gesagt die im Bereich des Telencephalon gelegenen Marker FoxG1, Emx1, Emx2, Nkx2.1 und Otx2, die repräsentativ für eine anteriore Identität stehen, zeigten schwächere PCR-Banden (Abb.

3.3 B). In der dorso-ventralen Achse, exprimierten die hESC-NSCs Transkriptionsfaktoren des Hinterhirns (Pax6, Olig2 und Nkx2.2) mit einer ventral gelegenen Identität (Abb. 3.3 B). Der dorsale Marker Pax7 konnte nicht nachgewiesen werden. Demnach zeigen die neuronalen Stammzellen ein breites Spektrum an regionalspezifischen Transkriptionsfaktoren, wobei die anterior-ventral gelegenen Marker des Hinterhirns stärker exprimiert wurden.

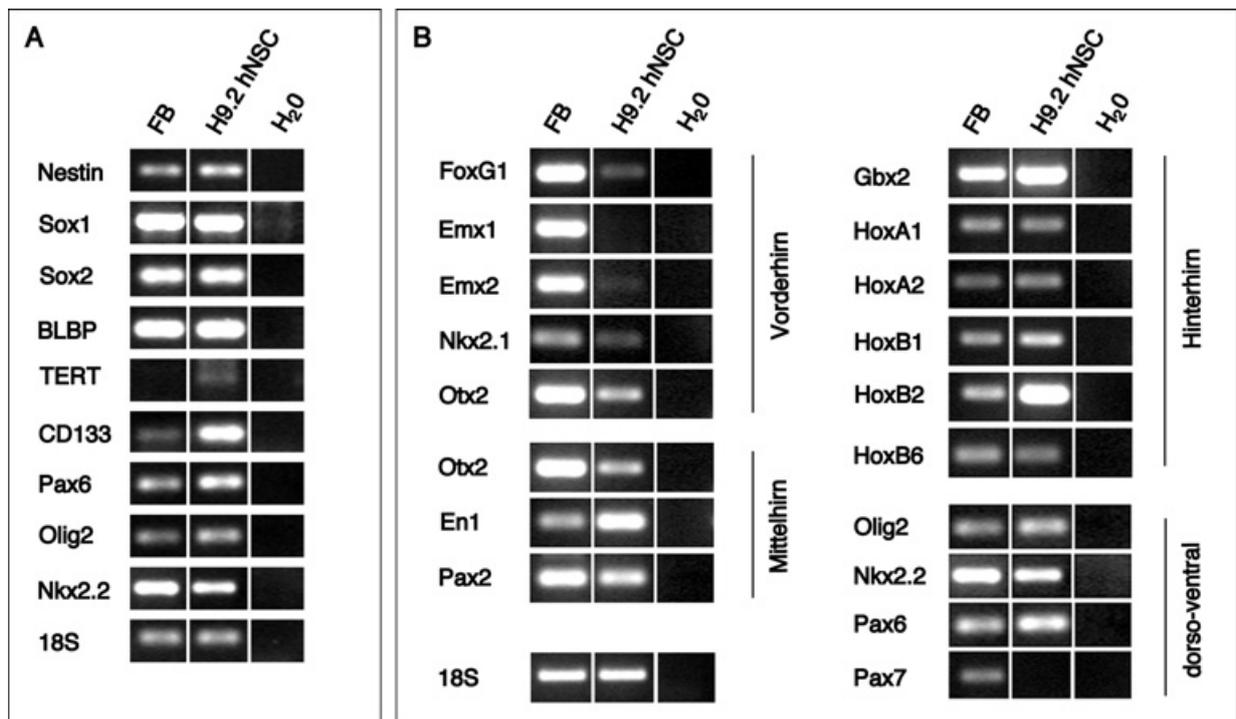


Abb. 3.3: Semi-qRT-PCR Analysen proliferativer hESC-NSCs.

(A) Proliferative hESC-NSCs exprimierten die neuronalen Marker Nestin, Sox2, BLBP und CD133 (Prominin-1), sowie die neuroepithelialen Marker Sox1 und Pax6, die neuroektodermalen Transkriptionsfaktoren Olig2 und Nkx2.2 und die für die Erhaltung des Stammzellschicksals wichtige Telomerase (TERT). (B) hESC-NSCs zeigten ein charakteristisches regionalspezifisches Transkriptionsprofil für das ventrale, anteriore Hinterhirn, während Marker des Telencephalons (Vorderhirn) in geringeren Mengen nachgewiesen wurden. hESC-NSCs zeigten eine starke Expression der im Hinterhirn anterior gelegenen Marker Gbx2, HoxA2 und HoxB2, während für die mehr posterior gelegenen Marker (HoxA1, HoxB1 und HoxB6) schwächere PCR-Banden detektiert wurden. Spezifisch für die dorso-ventrale Achse wurden die Marker Pax6, Olig2 und Nkx2.2, nicht aber Pax7 exprimiert (B). Als Positivkontrolle diente fetales Gehirngewebe (FB). Für die Bestimmung des Expressionsniveaus wurde 18S-rRNA (18S) als Referenzgen verwendet.

Zur Charakterisierung der neuronalen Differenzierung der hESC-NSCs wurden diese 14 und 28 Tage unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert (Abb. 3.4 A). Immunzytochemische Analysen zeigten, dass die hESC-NSCs in eine Fraktion von β III-Tubulin- (Abb. 3.4 B), L1- (Abb. 3.4 C), MAP2ab- (Abb. 3.4 D), VGluT1- (Abb. 3.4 E) und GABA- (Abb. 3.4 F) positiven Neuronen differenzierten. Während β III-Tubulin ein Marker für noch unreife Neurone ist, wird MAP2ab von reifen Neuronen exprimiert. VGluT1 und GABA sind Subtypspezifische Differenzierungsmarker für glutamaterge (exzitatorische) bzw. GABAerge (inhibitorische) Neurone. Die repräsentativen Phasenkontrast- und

Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen hESC-NSCs (Zelllinie H9.2) 14 Tage nach Wachstumsfaktorentzug (Abb. 3.4 A-F).

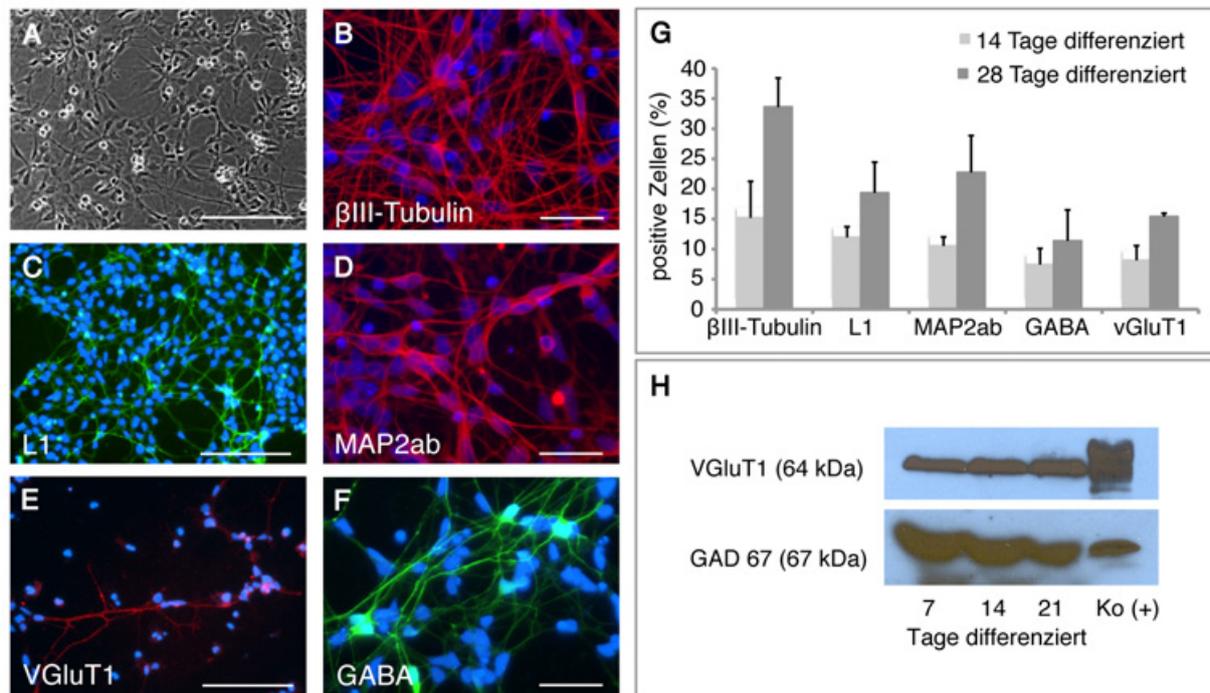


Abb. 3.4: Neuronale Identität der hESC-NSCs nach Wachstumsfaktorentzug.

Phasenkontrastaufnahme (A) und Immunfluoreszenzbilder (B-F) von 14 Tage differenzierten Zellkulturen. Nach Wachstumsfaktorentzug exprimierten die hESC-NSCs die neuronalen Marker βIII-Tubulin (B), L1 (C) und MAP2ab (D). Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). (G) Quantitative Auswertungen der Immunzytochemie zeigen eine Verdopplung der Neurone von Tag 14 auf Tag 28 der Differenzierung. Jeweils die Hälfte der Neurone zeigten einen GABAergen Phänotyp (F) bzw. einen glutamatergen Phänotyp (E). (H) Proteinlysate der für 7, 14 und 21 Tagen durch Wachstumsfaktorentzug differenzierten hESC-NSC-Kulturen zeigten im Western Blot deutlich positive Banden für GABAerge (GAD67) und glutamaterge (VGluT1) Neurone. Positive Kontrolle Ko (+): Gesamt-Protein aus adultem Mausgehirn. Maßstabsbalken: (A,C,E) 100 μm und (B,D,F) 50 μm.

Die quantitative Auswertung zeigte, dass sich die Anzahl der βIII-Tubulin und der MAP2ab-positiven Zellen von 14 zu 28 Tagen Differenzierungszeit verdoppelte (Abb. 3.4 G). Die Anzahl der βIII-Tubulin immunoreaktiven Neurone stieg von $15,2 \pm 6,1$ % nach 14 Tagen auf $33,6 \pm 4,8$ % nach 28 Tagen Wachstumsfaktorentzug. Die MAP2ab-positiven Zellen zeigten einen Anstieg von $10,5 \pm 1,5$ % nach 14 Tagen auf $22,8 \pm 6,1$ % nach 28 Tagen Differenzierung. 14 Tage nach Wachstumsfaktorentzug exprimierten insgesamt $11,9 \pm 1,7$ % der entzogenen Gesamtpopulation das Zelloberflächenprotein L1 (Abb. 3.4 G). Zu diesem Zeitpunkt zeigten, bezogen auf die Gesamtpopulation, $7,4 \pm 2,7$ % der Zellen einen GABAergen Phänotyp und $8,1 \pm 2,4$ % einen glutamatergen Phänotyp. Der Prozentsatz L1-exprimierender Zellen stieg 28 Tage nach Wachstumsfaktorentzug signifikant auf

19,3 ± 5,1 % an. Zu diesem Zeitpunkt waren 11,3 ± 5,1 % bzw. 15,4 ± 0,5 % der Gesamtpopulation GABA- bzw. VGluT1-positiv (Abb. 3.4 G).

Western Blot-Analysen von Proteinlysaten der für 7, 14 und 21 Tagen differenzierten hESC-NSC-Populationen bestätigten die Subtyp-spezifische Differenzierung sowohl in GABAerge als auch in glutamaterge (VGluT1) Neurone (Abb. 3.4 H). Gesamt-Protein aus adultem Mausgehirn wurde als positive Kontrolle (Ko (+)) verwendet.

3.2 Selektion hESC-abgeleiteter Neurone

Um ein effektives Verfahren zur Gewinnung aufgereinigter hESC-abgeleiteter neuronaler Populationen zu entwickeln, wurden zwei verschiedene Techniken eingesetzt: Bei der Promotor-basierten Strategie, wurde die Expression von EGFP unter der Kontrolle des potenziell neuronalspezifischen T α 1-Promotors eingesetzt, um die genetisch markierten Zellen zu isolieren. Bei der immuno-basierten Selektion wurde die endogene Expression des humanen Zelladhäsionsproteins L1 auf der Oberfläche neuronaler Zellen ausgenutzt (Abb. 3.5). Die Isolierung und Aufreinigung erfolgte jeweils über eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS).

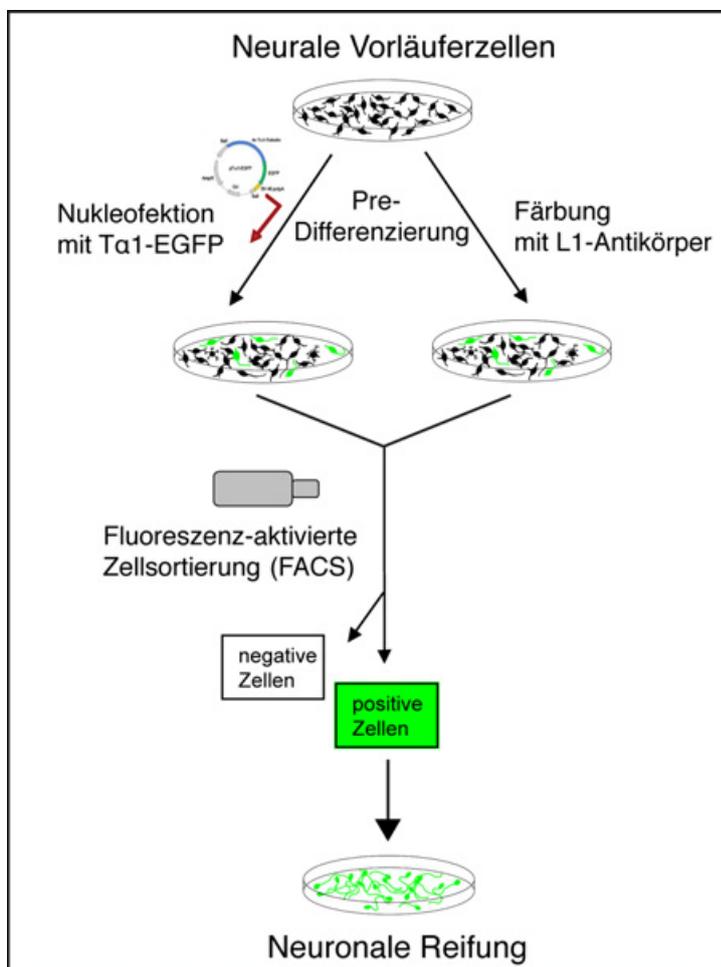


Abb. 3.5: Promotor- und immuno-basierte Selektion hESC-NSC-abgeleiteter Neurone.

Für die Promotor-basierte Selektion wurden hESC-NSCs 4 Tage unter Wachstumsfaktor- entzug vordifferenziert, anschließend mit dem T α 1-EGFP Konstrukt transient nukleofiziert und zwei weitere Tage differenziert. Bei der immuno-basierten Anreicherung wurden hESC-NSCs 7 Tage vordifferenziert, mit einem Antikörper spezifisch für das Zelloberflächenantigen L1 angefärbt und anhand eines Farbstoff-gekoppelten sekundären Antikörpers visualisiert. Die Selektion erfolgte über FACS basierend auf der EGFP-Fluoreszenz (T α 1) bzw. auf der Fluoreszenz des sekundären Antikörpers.

3.2.1 Promotor-basierte Linienselektion hESC-abgeleiteter Neurone

3.2.1.1 Generierung und Charakterisierung T α 1-EGFP-exprimierender Zellen

Mittels Lipofektion und Nuklofektion wurden hESC-NSCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6) in der *in vitro* Differenzierung mit einem T α 1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert. Zur Charakterisierung der T α 1-Expression wurde die transiente EGFP-Fluoreszenz dann zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) in der Differenzierung untersucht. Für immunzytochemische Untersuchungen wurden T α 1-EGFP-transfizierten Zellen zusätzlich zur besseren Visualisierung der EGFP-Fluoreszenz mit einem entsprechenden Antikörper gefärbt. Die ersten EGFP-positiven Zellen konnten einen Tag nach Wachstumsfaktorentzug-induzierter Differenzierung beobachtet werden. Die Anzahl der EGFP-positiven Zellen nahm entsprechend der Differenzierungsdauer zu.

3.2.1.1.1 Zeitverlauf der T α 1-EGFP-Expression

T α 1-EGFP-transfizierte hESC-NSCs wurden ein bis 7 Tage nach Wachstumsfaktorentzug untersucht, um den Zeitverlauf der T α 1-EGFP-Expression und der neuronalen Differenzierung (β III-Tubulin-Expression) zu bestimmen. Die unter Wachstumsfaktorentzug kultivierten neuronalen Zellen wurden dazu jeweils einen Tag vorher mit dem T α 1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert und am darauffolgenden Tag fixiert. Die EGFP- und β III-Tubulin-Expression wurde immunzytochemisch bestimmt und quantifiziert (Abb. 3.6).

Die repräsentativen Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzaufnahmen der EGFP-Fluoreszenz (grün) und der β III-Tubulin (rot) Immunoreaktivität zeigen hESC-NSCs 1 (B, C), 4 (D, E) und 7 (F, G) Tage nach Wachstumsfaktorentzug (Abb. 3.6). Es zeigte sich, dass die Anzahl der EGFP-positiven Zellen sowie die der β III-Tubulin-positiven Zellen mit der Zeit zunahm. Die maximale Expression von EGFP lag am Tag 4 nach Wachstumsfaktorentzug (Abb. 3.6 A). Zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug zeigten insgesamt $2,7 \pm 0,7$ % der differenzierten Zellen eine EGFP-Fluoreszenz, wobei nur ein geringer Anteil dieser EGFP-positiven Zellen β III-Tubulin koexprimierte ($7,6 \pm 3,6$ %). Demgegenüber waren bezogen auf die Gesamtpopulation $3,8 \pm 1,1$ % der Zellen β III-Tubulin-positiv. Nur ein kleiner Anteil von $7,5 \pm 4,2$ % der β III-Tubulin-positiven Neurone exprimierte das Transgen. Vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug stieg der Prozentsatz an EGFP-positiven Zellen auf ein Maximum von $5,3 \pm 2,9$ %. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten $10 \pm 3,5$ % der EGFP-positiven Zellen β III-Tubulin. Dies kam einem Anteil von $6,3 \pm 2$ % der β III-Tubulin-positiven Neurone gleich. Bezogen auf die Gesamtpopulation exprimierten $7,0 \pm 0,6$ % der Zellen β III-Tubulin.

Sechs und sieben Tage nach Wachstumsfaktorentzug sank die EGFP-positive Fraktion auf $1,5 \pm 0,6$ % bzw. $0,8 \pm 0,3$ % der Gesamtpopulation bzw. $2,0 \pm 0,9$ % bzw. $1,6 \pm 0,6$ % der β III-Tubulin-positiven Zellen ab. Zu diesem Zeitpunkt waren $10 \pm 0,9$ % bzw. $13,3 \pm 0,4$ % der Gesamtpopulation β III-Tubulin-positiv (Abb. 3.6 A).

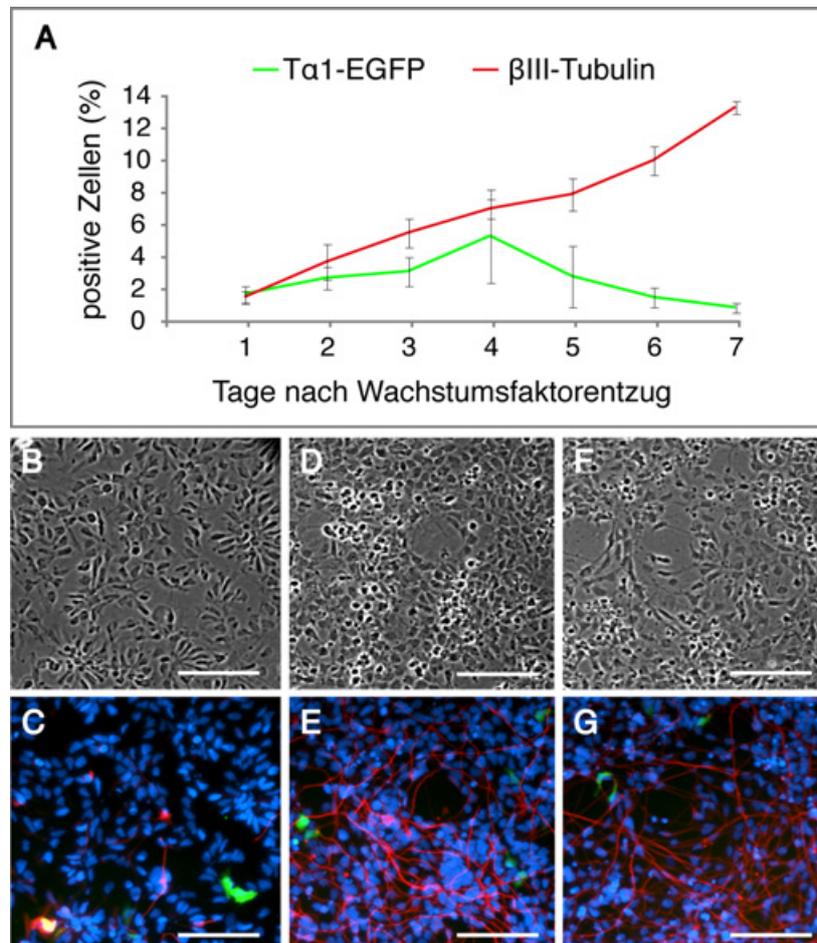


Abb. 3.6: Expression von Tα1-EGFP und βIII-Tubulin während der *in vitro* Differenzierung von hESC-NSCs.

Die unter Wachstumsfaktorentzug kultivierten hESC-NSCs wurden jeweils 1 Tag vor der Fixierung mit dem Tα1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert. Wie die neuronale βIII-Tubulin Immunoreaktivität nahm auch die Anzahl der EGFP-positiven Zellen zunächst zu, zeigte ein Maximum an Tag 4 nach Wachstumsfaktorentzug und nahm im weiteren Verlauf der Differenzierung im Gegensatz zur Anzahl der βIII-Tubulin-positiven Zellen wieder ab (A). Phasenkontrastbilder (B, D, F) und Immunfluoreszenzaufnahmen (C, E, G) der EGFP- (grün) und βIII-Tubulin-Expression (rot) zeigen differenzierende hESC-NSCs, 1 (B, C), 4 (D, E) und 7 (F, G) Tage nach Wachstumsfaktorentzug. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Maßstabsbalken: 50 μm.

Um den Verlauf der EGFP-Expression in 4 Tage differenzierten hESC-NSCs weiter zu bestimmen, wurden Expressionsanalysen der EGFP-Fluoreszenz 24, 48, 72, 96 und 120 h nach der transienten Transfektion von hESC-NSCs mit dem Tα1-EGFP-Konstrukt durchgeführt (Abb. 3.7). Die neurale Zellpopulation, die am Tag 4 der Differenzierung mit dem Tα1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert wurden, wies eine rapide Abnahme in der

Anzahl der EGFP-positiven Zellen in einem Zeitraum von 24 h bis 120 h nach der Transfektion (Abb. 3.7 A) auf. Während 24 h nach der Transfektion $4,1 \pm 0,2$ % der Zellen und 48 h nach der Transfektion $3,4 \pm 0,6$ % der Zellen eine EGFP-Fluoreszenz aufwiesen, sind 72 h danach nur noch $1,9 \pm 1,1$ % der Zellen EGFP positiv. Eine noch geringere Anzahl von $0,4 \pm 0,3$ % EGFP-positiver Zellen wurde 120 h nach der Transfektion festgestellt. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der β III-Tubulin positiven Zellen und damit die Anzahl der Neurone von $5,1 \pm 1,2$ % (24 h), über $8,4 \pm 1,7$ % (48 h), $10,3 \pm 4,6$ % (72 h), $12,2 \pm 2,8$ % (96 h) auf $18,2 \pm 2,9$ % (120 h) mit der Zeit stetig an.

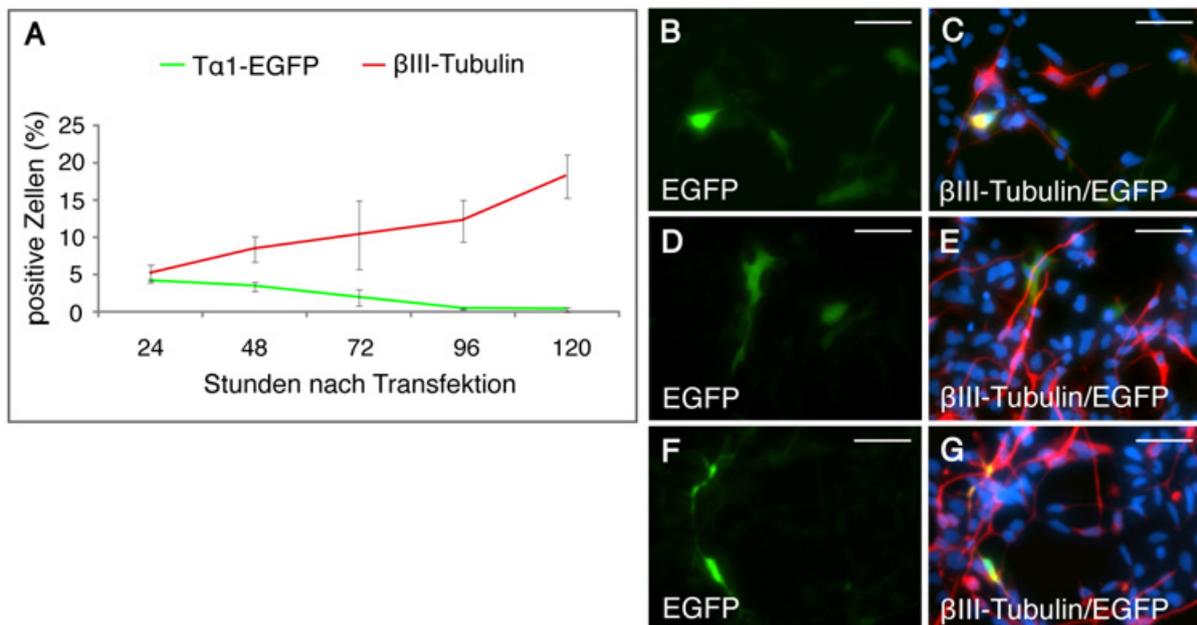


Abb. 3.7: Tα1-EGFP- und βIII-Tubulin-Expression differenzierender hESC-NSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion.

HESC-NSCs wurden unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert und am Tag 4 der Differenzierung mit dem Tα1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert. (A) Die Anzahl der EGFP-positiven Zellen nahm über einen Zeitraum von 120 h nach der Transfektion rapide ab, während die Anzahl der βIII-Tubulin positiven Zellen zunahm. (B-G) Immunfluoreszenzbilder zeigen differenzierende hESC-NSCs 24 h (B, C), 72 h (D, E) und 120 h (F, G) nach Tα1-EGFP Transfektion. 24 h nach der Transfektion zeigten deutlich mehr Zellen eine EGFP-Fluoreszenz (grün) als nach 72 h (D) und 120 h (F). Einige EGFP-positive Zellen nahmen eine neuronale Morphologie an (F) und koexprimierten βIII-Tubulin (G, rot). Die Visualisierung der Zellkerne erfolgt mit DAPI (blau). Maßstabsbalken: 50 μm.

3.2.1.1.2 Promotorspezifität des Tα1-EGFP-Konstrukts

Um einen Eindruck der Promotorspezifität von Tα1 zu erhalten, wurden verschiedene nicht-neuronale Zelllinien, wie LN-18 (Glioblastomzelllinie), 293-T (Nierenkarzinomzelllinie), NIH-3T3 (Maus-Fibroblastenzelllinie) und HeLa (Gebärmutterhalskarzinomzelllinie) mit dem Tα1-EGFP-Konstrukt oder einem CMV-EGFP-Kontrollplasmid, bei dem das EGFP-Gen unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierten CMV-Promotors steht, transient transfiziert.

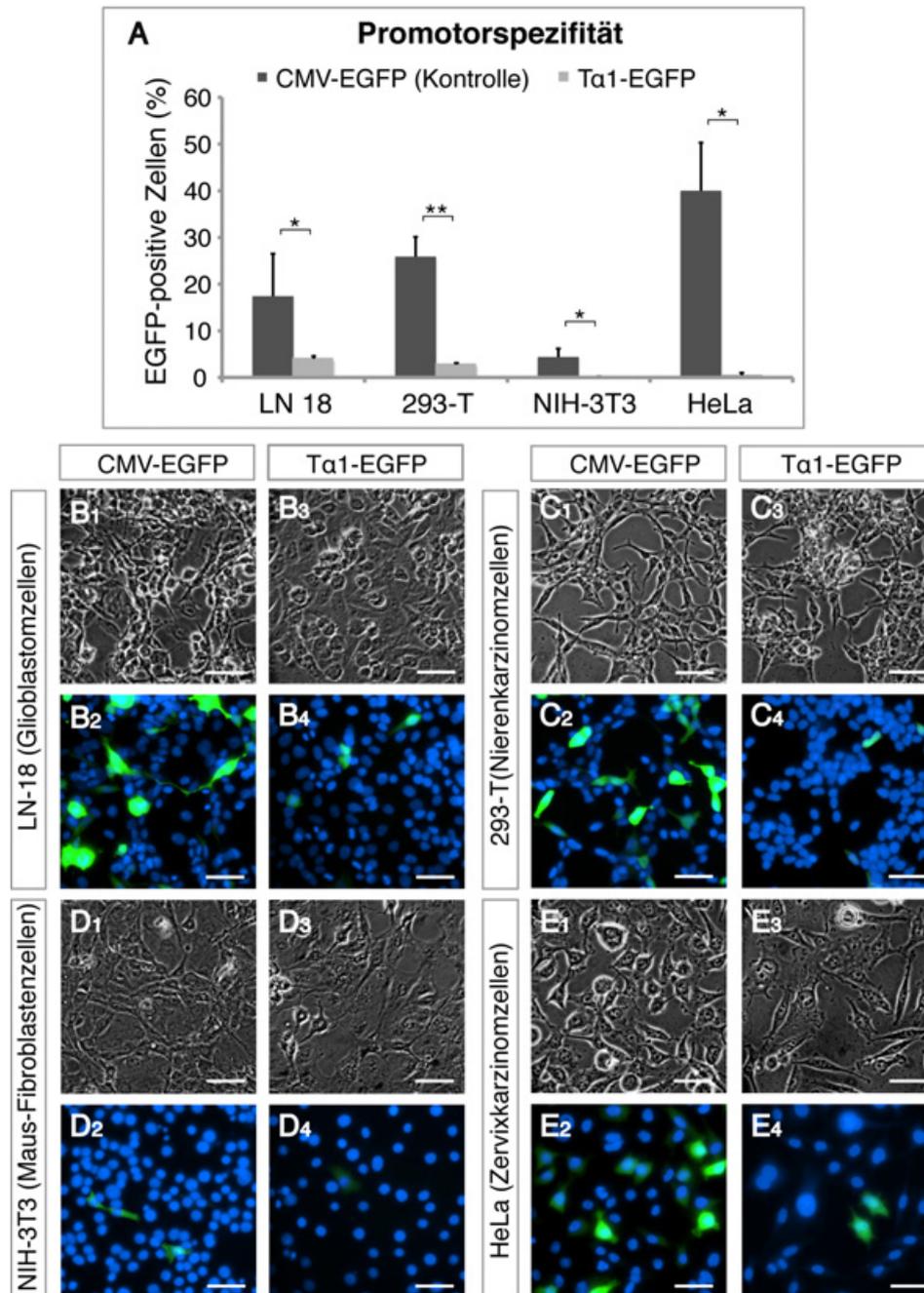


Abb. 3.8: Transfektion nicht-neuronaler Zelllinien mit dem Tα1-EGFP-Konstrukt.

Zur Bestimmung der Spezifität des Tα1-Promotors wurden die nicht-neuronalen Zelllinien LN-18 (Glioblastomzelllinie), 293-T (Nierenkarzinomzelllinie), NIH-3T3 (Maus-Fibroblastenzelllinie) und HeLa (Gebärmutterhalskarzinomzelllinie) mit einem Kontrollplasmid (CMV-EGFP) und dem Tα1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert. (A) Die Anzahl der EGFP-positiven Zellen in den mit dem Tα1-EGFP-Konstrukt transfizierten Zelllinien war signifikant kleiner als in den Zellen, die mit dem Kontrollplasmid CMV-EGFP transfiziert wurden. (B-E) Phasenkontrastaufnahmen und korrespondierende EGFP-Immunfluoreszenzbilder der CMV-EGFP und Tα1-EGFP transfizierten Zelllinien LN-18 (B₁-B₄), 293-T (C₁-C₄), NIH-3T3 (D₁-D₄) und HeLa (E₁-E₄). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken: 50 µm. * Signifikanz: $p \leq 0,05$; ** Signifikanz: $p \leq 0,01$; *** Signifikanz: $p \leq 0,001$.

Am darauffolgenden Tag wurde die Anzahl der Zellen, die jeweils das Kontrollplasmid CMV-EGFP und das Tα1-EGFP-Konstrukt exprimierten, anhand der EGFP-Fluoreszenz

bestimmt (Abb. 3.8). Dabei konnte festgestellt werden, dass bei allen vier Zelllinien nur ein geringer Anteil an EGFP-positiven Zellen detektiert werden konnte, die mit dem $T\alpha 1$ -EGFP-Konstrukt transfiziert wurden. Bei den LN-18 Zellen stehen mit $4,0 \pm 0,6$ % positiver EGFP-Zellen nach erfolgter $T\alpha 1$ -EGFP Transfektion, $17,4 \pm 9,1$ % positive Zellen nach CMV-EGFP Transfektion gegenüber (Abb. 3.8 A, B₁-B₄).

Ebenfalls signifikante Unterschiede bei der Anzahl der EGFP-fluoreszierenden Zellen konnte in Abhängigkeit vom Plasmid bei der Nierenkarzinomzelllinie 293-T mit $2,8 \pm 0,3$ % $T\alpha 1$ -EGFP-positiver Zellen versus $25,9 \pm 4,2$ % CMV-EGFP-fluoreszierender Zellen (Abb. 3.8 A, C₁-C₂), bei den Mausfibroblastenzellen NIH-3T3 mit $0,1 \pm 0,1$ % versus $4,4 \pm 1,8$ % (Abb. 3.3 A, D₁-D₃) und bei der HeLa-Zelllinie mit $0,5 \pm 0,5$ % versus $40 \pm 10,3$ % (Abb. 3.8 A, E₁-E₄) festgestellt werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass das gewählte $T\alpha 1$ -EGFP-Plasmid in nicht-neuronalen Zellen nur bedingt exprimiert wird, wodurch anzunehmen ist, dass es sich um einen gewebespezifischen Promotor handelt.

3.2.1.1.3 Charakterisierung der $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Population

Zur Charakterisierung der $T\alpha 1$ -EGFP positiven Population wurden hESC-NSCs 4 Tage unter Wachstumsfaktorentzug differenziert, mit dem $T\alpha 1$ -EGFP Konstrukt transient transfiziert und am darauffolgenden Tag immunzytochemisch analysiert. Die Immunfluoreszenzanalyse der neuronalen Vorläuferkulturen 5 Tage nach Wachstumsfaktorentzug zeigte, dass $30,9 \pm 7,0$ % der $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen (Abb. 3.9 A) den frühen neuronalen Marker β III-Tubulin exprimierten (Abb. 3.9 C₂; C₁ korrespondierende EGFP-Fluoreszenz). $71,7 \pm 9,7$ % der EGFP-positiven Zellen (Abb. 3.9 A) koexprimierten den neuronalen Marker Nestin (Abb. 3.5 B₂; B₁ korrespondierende EGFP-Fluoreszenz) und $63,6 \pm 3,4$ % zeigten Immunreaktivität für PSA-NCAM, einem Marker für neurale Vorläufer und Neurone (Abb. 3.9 D₂; D₁ korrespondierende EGFP-Fluoreszenz). In der EGFP-negativen Population exprimierten hingegen nur $6,8 \pm 1,2$ % der Zellen β III-Tubulin, aber $98,1 \pm 1,0$ % Nestin und $70,0 \pm 1,6$ % PSA-NCAM. Inkubation mit BrdU für 3 h und anschließender Immunfluoreszenzfärbung ergaben, dass nur ein geringer Anteil der $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen eine Immunreaktivität für den Proliferationsmarker BrdU ($10,4 \pm 5,9$ %; Abb. 3.9 A) zeigten. Demgegenüber konnten in der EGFP-negativen Population mit $41,8 \pm 1,3$ % viermal so viele BrdU-positive Zellen ausgezählt werden. Die Ergebnisse dokumentieren, dass $T\alpha 1$ -EGFP-exprimierende Zellen eine weitestgehend neuronale Population bilden, die nur bedingt proliferativ erscheint. Verglichen mit der EGFP-negativen Population weist die EGFP-positive Population eine

signifikant erhöhte Expression des neuronalen Antigens β III-Tubulin, sowie einen signifikant geringeren Anteil an Nestin und proliferierender BrdU-positiver Zellen auf (Abb. 3.9 A).

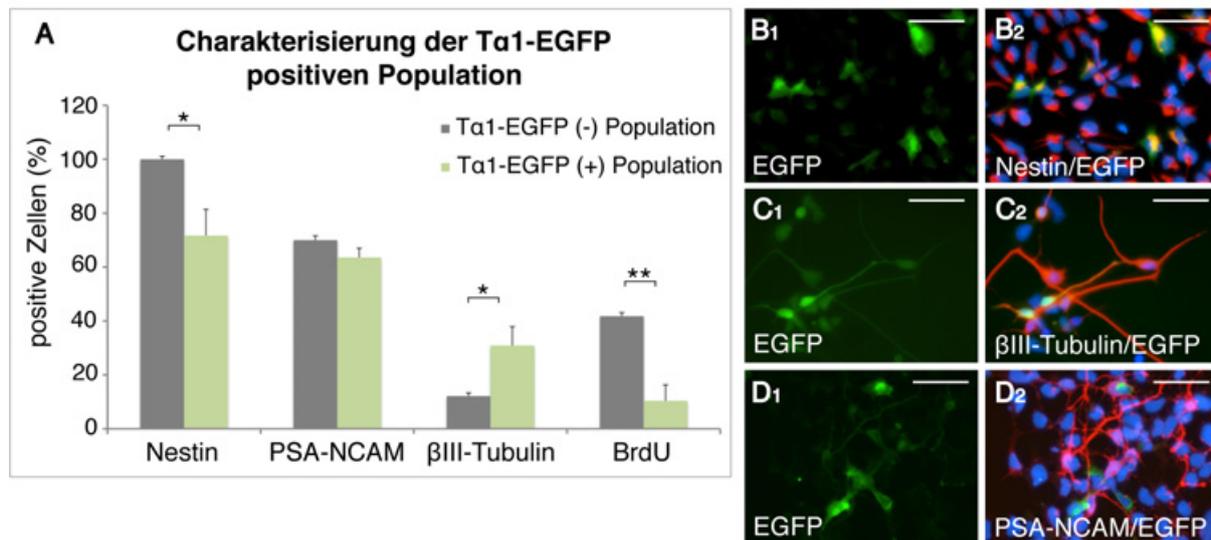


Abb. 3.9: Charakterisierung der $T\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen in 5 Tage differenzierten hESC-NSCs.

Unter Wachstumsfaktorentzug wurden hESC-NSCs 4 Tage vordifferenziert, mit dem $T\alpha$ 1-EGFP Konstrukt transient transfiziert und am darauffolgenden Tag immunzytochemisch analysiert. (A) Expression verschiedener neuraler Marker in $T\alpha$ 1-EGFP-positiven und negativen Zellen. Proliferationsassays konnten zeigen, dass die $T\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen signifikant weniger BrdU inkorporierten als die negativen Populationen. Verglichen mit der $T\alpha$ 1-EGFP-negativen Population wies die positive Population eine signifikant niedrigere Expression des neuronalen Markers Nestin (B2) auf, wohingegen bei der Expression von PSA-NCAM (D2) kein signifikanter Unterschied festzustellen war. Die $T\alpha$ 1-EGFP-positiv Population weist zudem eine signifikant erhöhte Expression des neuronalen β III-Tubulin Antigens (C2) auf. (B1-D1) Jeweils korrespondierende Fluoreszenzaufnahmen der EGFP-Expression. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Maßstabsbalken: 50 μ m. * Signifikanz: $p \leq 0,05$; ** Signifikanz: $p \leq 0,01$; *** Signifikanz: $p \leq 0,001$.

3.2.1.2 Linienselektion der $T\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen

Nachdem die Daten aus den *in vitro* Differenzierungsexperimenten auf eine erhöhte Expression von $T\alpha$ 1-EGFP in Neuronen hinwiesen (3.2.1.1), sollte unter Verwendung der FACS-Technik aus den mit dem $T\alpha$ 1-EGFP-Konstrukt transfizierten hESC-NSCs eine hochaufgereinigte neuronale Population isoliert werden (Abb. 3.10). Hierfür wurden die Zellen 4 Tage vordifferenziert, mit $T\alpha$ 1-EGFP transient transfiziert, zwei weitere Tage differenziert und anschließend mittels FACS isoliert. Dem Nachteil eines geringen prozentualen Anteils an EGFP-positiven Zellen ($5,7 \pm 1,2$ %, durchflusszytometrische Bestimmung), steht dabei der Vorteil gegenüber, dass eine Population für die Selektion verwendet wird, die noch nicht zu weit differenziert ist und noch keine komplexen Fortsätze aufweist. Um eine gute Vereinzelung zu erreichen, wurden die Zellen unmittelbar vor der Sortierung durch einen Filter gegeben. Tote Zellen wurden über Propidiumiodid (PI)-

Fluoreszenz identifiziert und aus der zu analysierenden Zellpopulation eliminiert (Abb. 3.10 A). Die Durchflusszytometrie zeigte eine gut detektierbare EGFP-positive Zellpopulation (Abb. 3.10; P2). EGFP-positive und negativ-sortierte Kontroll-Zellen aus derselben Präparation wurden separat auf Polyornithin/Laminin-beschichteten Schalen in Differenzierungsmedium plattiert und nach 4 h (Abb. 3.10 C-G), 3 Tagen und 8 Tagen (Abb. 3.11) mit 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert.

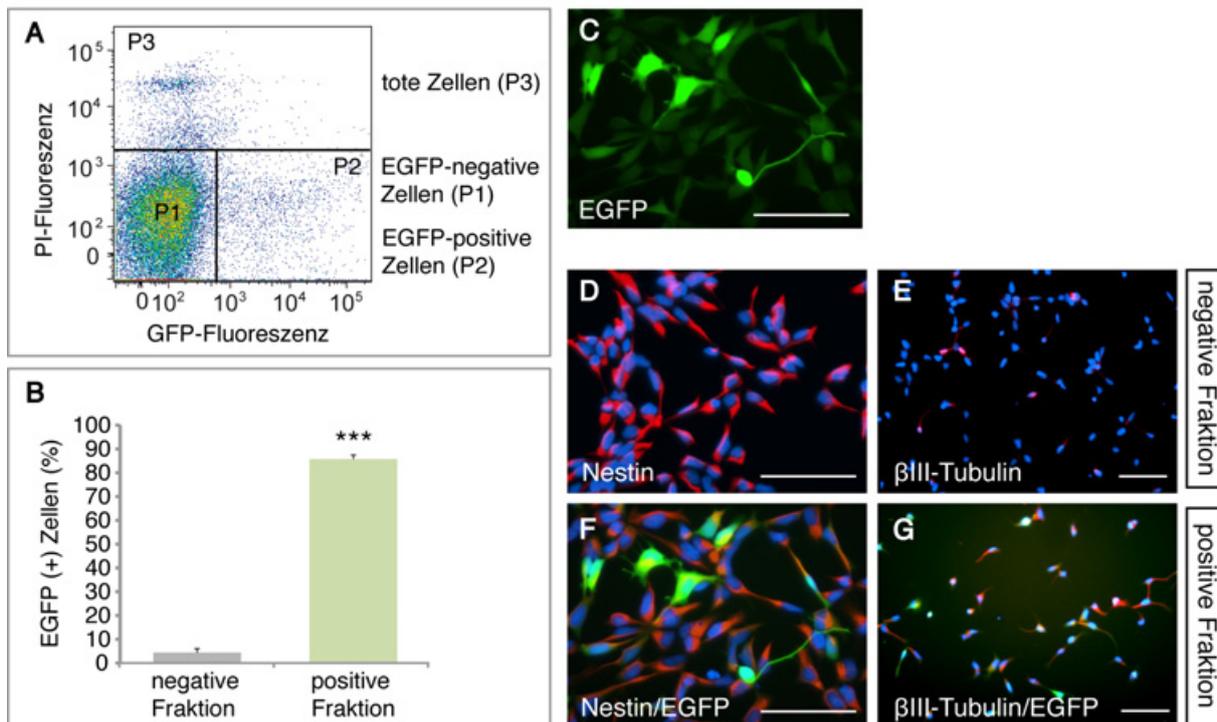


Abb. 3.10: Charakterisierung T α 1-EGFP-sortierter Zellen 4 h nach FACS.

Vier Tage vordifferenzierte hESC-NSCs wurden mit dem T α 1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert, 2 weitere Tage differenziert und anschließend mittels FACS isoliert. (A) 6 Tage nach Wachstumsfaktorentzug konnte eine deutliche Fraktion EGFP-fluoreszierender Zellen in hESC-NSC-Kulturen detektiert werden. Tote Zellen wurden über Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenz identifiziert und aus der zu analysierenden Zellpopulation eliminiert. Als Kontrolle (negative Fraktion) werden EGFP-negativen Zellen aufgefangen. (B) Die sortierten Populationen wiesen gegenüber den Kontrollen ($4,4 \pm 1,6$ %) eine hochgradige Anreicherung EGFP-positiver Zellen ($85,8 \pm 2,3$ %) auf. (C) EGFP-Expression der positiv-sortierten Zellfraktion. (D) Nestin- und β III-Tubulin-Expression (E) der EGFP-negativen Zellfraktion 4 h nach Plattieren. (F) Nestin- und β III-Tubulin-Expression (G) in sortierten EGFP-positiven Zellen (grün) 4 h nach Plattieren. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken: 100 μ m. *** Signifikanz: $p \leq 0,001$.

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden T α 1-EGFP-transfizierte und über FACS-angereicherten Zellen zusätzlich zur besseren Visualisierung der EGFP-Fluoreszenz mit einem entsprechenden Antikörper gefärbt. Die positiv-sortierten und anschließend plattierten Zellen zeigten 4 h nach FACS eine deutliche EGFP-Fluoreszenz (Abb. 3.10 C). Gegenüber der Kontrollen mit $4,4 \pm 1,6$ % EGFP-positiven Zellen, zeigten die sortierten Populationen mit $85,8 \pm 2,3$ % eine hochgradige Anreicherung EGFP-positiver Zellen.

Ausgehend von der Anzahl der EGFP-positiven Zellen in den Gesamtzellpopulationen am Tag der FACS-Isolierung ($5,7 \pm 1,2$ %; durchflusszytometrische Bestimmung), konnte damit eine 15-fache Anreicherung der EGFP-positiven Zellen erreicht werden. Ebenso wie die Zellen der negativen FACS-Fraktion (Abb. 3.10 D, E), exprimierten die Zellen der EGFP-positiven Fraktion überwiegend Nestin (Abb. 3.6, F) und zu einem geringeren Anteil β III-Tubulin (Abb. 3.10 G). Einige Zellen der positiv-sortierten Fraktion bildeten im weiteren Verlauf der Differenzierung in der Zellkulturschale kleine Fortsätze aus (siehe auch 3.2.1.3).

3.2.1.3 Phänotypische Charakterisierung der $T\alpha$ 1-EGFP selektierten Population

Zur Ausreifung wurden die 6 Tage vordifferenzierten EGFP-positiv- und negativ-sortierten Zellen als Kontrolle aus derselben Präparation separat auf Zellkulturschalen ausplattiert, für weitere 3 und 8 Tage differenziert und mit 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert (Abb. 3.11). Für die Charakterisierung wurde die EGFP-sortierte Population sowie die negative Zellpopulation als Kontrolle mit Antikörpern für den neuronalen Marker Nestin und die neuronalen Marker β III-Tubulin und MAP2ab gefärbt. Wie unter 3.2.1.1 beschrieben kann die Expression des $T\alpha$ 1-EGFP-Konstrukts, welches transient in die neuronalen Zellen eingebracht wurde, nur über einen kurzen Zeitraum beobachtet werden. Dementsprechend waren im gewählten Zeitraum von 3 und 8 Tagen nach FACS nur wenige GFP-positive Zellen in der sortierten Population nachweisbar.

Die neuronale Differenzierung der FACS-sortierten Population wurde durch Immunoreaktivität mit β III-Tubulin und MAP2ab ermittelt. Die Quantifizierung der β III-Tubulin-immunoreaktiven Zellen 3 Tage nach FACS ergab eine minimale Anreicherung von neuronalen Zellen in der EGFP-positiv-sortierten Fraktion (Abb. 3.11 A). $16,3 \pm 3,2$ % der EGFP-positiven Populationen exprimierten β III-Tubulin (Abb. 3.11 A, B₂). Im Vergleich dazu waren in der negativ-sortierten Fraktion (Kontrolle) $10,0 \pm 1,4$ % der Zellen β III-Tubulin-positiv (Abb. 3.11 A, B₁). Zu diesem Zeitpunkt wiesen nur 1,7 % der positiv-sortierten Zellfraktion eine EGFP-Expression auf, wobei 50 % dieser Zellen β III-Tubulin-positiv Neurone waren.

Die Quantifizierung der EGFP-positiv-sortierten Zellpopulation 8 Tage nach FACS zeigte ebenfalls nur eine minimale Anreicherung neuronaler Zellen (Abb. 3.11 C). Zu diesem Zeitpunkt war eine EGFP-Expression in den sortierten Zellen nicht mehr nachweisbar. $19,3 \pm 3,7$ % der EGFP-positiv-sortierten Populationen exprimierten β III-Tubulin (Abb. 3.11 C, E₂), wobei $14,1 \pm 3,1$ % der negativ-sortierten Zellen β III-Tubulin-positiv waren (Abb. 3.11, C, E₁).

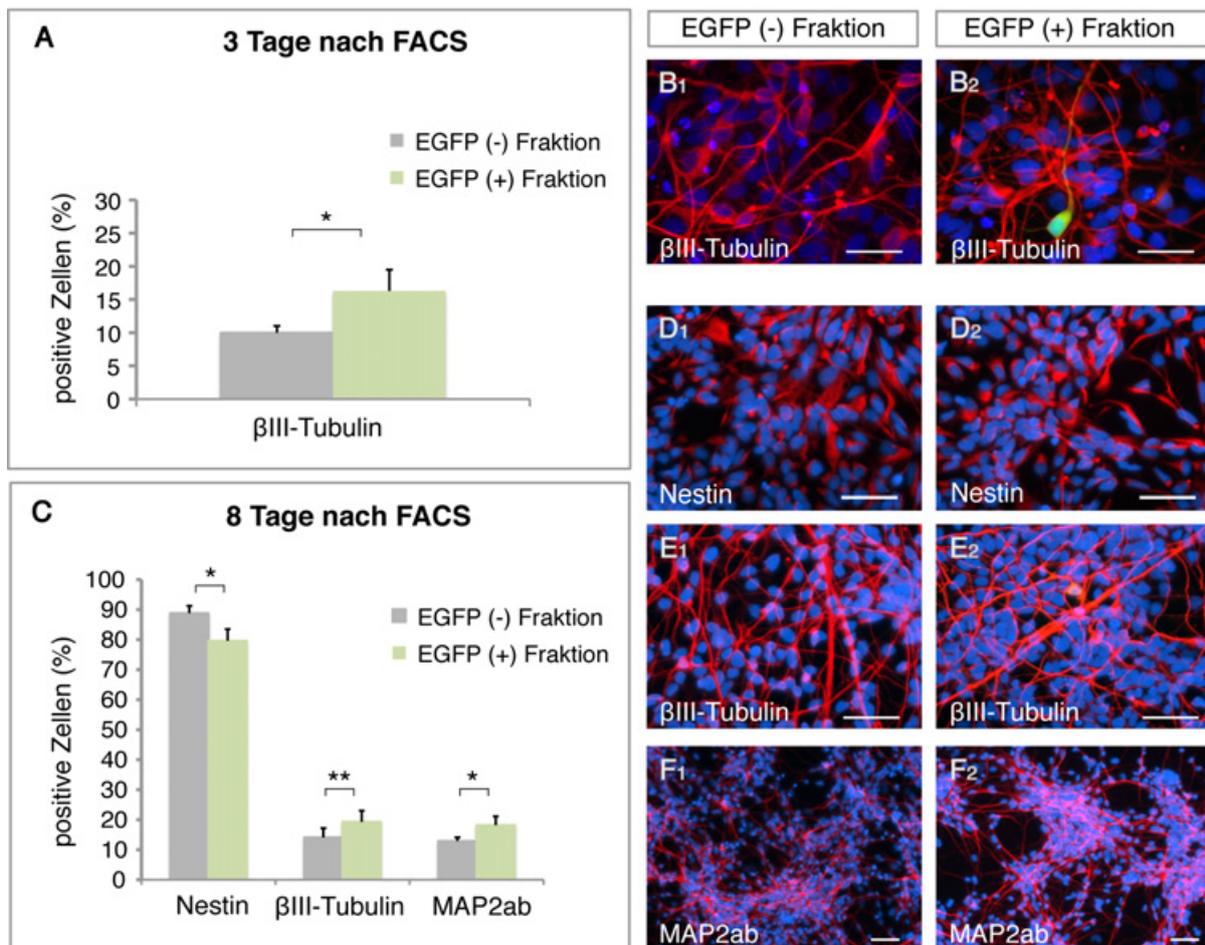


Abb. 3.11: Charakterisierung T α 1-EGFP-sortierter Zellen 3 und 8 Tage nach FACS.

HESC-NSCs wurden für 4 Tage neuronal vordifferenziert, mit dem T α 1-EGFP Konstrukt transient transfiziert und 2 weitere Tage differenziert. Nach anschließender FACS Sortierung wurden die Zellen für weitere 3 bzw. 8 Tage differenziert. (A) 3 Tage nach FACS konnte eine minimale Anreicherung β III-Tubulin-exprimierender Zellen in EGFP-positiven Zellfraktionen im Vergleich zu Kontrollpopulationen beobachtet werden. Gegenüber der Kontrolle ($10,0 \pm 1,4$ %) zeigten $16,3 \pm 3,2$ % der EGFP-sortierten Zellen eine β III-Tubulin Expression. (B) β III-Tubulin-positive Zellen in der negativ-sortierten (B1) und EGFP-positiven Fraktion (B2) 3 Tage nach FACS. (C) Ausreifung der Zellen für 8 Tage nach FACS resultierte in einer Anreicherung von überwiegend Nestin-exprimierenden ($79,6 \pm 3,9$ %) Zellen. Eine β III-Tubulin Expression zeigten $19,3 \pm 3,7$ % der EGFP-positiv-sortierten Zellen und $18,2 \pm 2,9$ % exprimierten den neuronalen Marker MAP2ab. (D-F) Immunfluoreszenzen für Nestin (D1, D2), β III-Tubulin (E1, E2) und MAP2ab (F1, F2) in der EGFP-negativ-sortierten (D1, E1, F1) und EGFP-positiv-sortierten (D2, E2, F2) Zellpopulation 8 Tage nach FACS. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert (blau). Maßstabsbalken: 50 μ m. * Signifikanz: $p \leq 0,05$; ** Signifikanz: $p \leq 0,01$.

Zu diesem Zeitpunkt wiesen $18,2 \pm 2,9$ % der EGFP-positiv-sortierten Zellen bereits eine MAP2ab-Expression auf (Abb. 3.11 C, F2). Im Vergleich dazu konnten in den negativ-sortierten Populationen $12,9 \pm 1,2$ % MAP2ab-positive Neurone festgestellt werden (Abb. 3.11 C, F1). Acht Tage nach EGFP-FACS exprimierten noch $79,6 \pm 3,9$ % der EGFP-positiv-sortierten Zellen Nestin (Abb. 3.11 C, D2), während $88,8 \pm 2,4$ % der negativ-sortierten Zellen diesen neuronalen Marker exprimierten (Abb. 3.11 C, D1).

Insgesamt wiesen die Daten auf eine nur geringfügige Anreicherung neuronaler Zellen nach T α 1-EGFP-basierter Selektion hin.

3.2.2 Immuno-basierte Selektion hESC-abgeleiteter Neurone

3.2.2.1 Charakterisierung L1-exprimierender Zellen

Zur Charakterisierung der L1-Expression wurden hESC-NSCs (Zelllinie H9.2) zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der *in vitro* Differenzierung untersucht (Tag 2, 4, 6, 8 und 10). Die ersten L1-positiven Zellen konnten 2 Tage nach Wachstumsfaktorentzug-induzierter Differenzierung beobachtet werden. Die Anzahl der L1-positiven Zellen nahm mit steigender Differenzierungsdauer stetig zu.

3.2.2.1.1 Zeitverlauf der L1-Expression

HESC-NSCs (Zelllinie H9.2) wurden bis 10 Tage nach Wachstumsfaktorentzug-induzierter Differenzierung untersucht, um den zeitlichen Verlauf der L1-Expression und der neuronalen Differenzierung (β III-Tubulin-Expression) zu bestimmen. Die unter Wachstumsfaktorentzug kultivierten neuronalen Zellen wurden dazu am Tag 2, 4, 6, 8 und 10 der Differenzierung fixiert. Die L1- und β III-Tubulin-Expression wurde immunzytochemisch untersucht und quantifiziert (Abb. 3.12). Die repräsentativen Immunfluoreszenzaufnahmen der L1- (grün) und β III-Tubulin-Expression (rot) zeigen hESC-NSCs 4 und 8 Tage nach Wachstumsfaktorentzug (Abb. 3.12 B, C und D, E). Durch Quantifizierung L1- und β III-Tubulin-exprimierender Zellen über diesen Differenzierungszeitraum konnte ein stetiger Anstieg L1-positiver und β III-Tubulin-positiver Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.12 A).

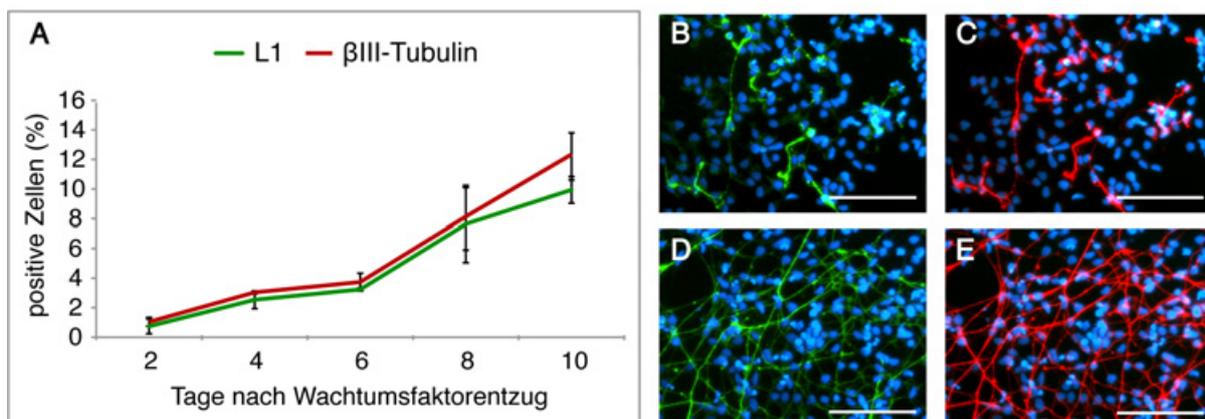


Abb. 3.12: Expression von L1 und β III-Tubulin während der *in vitro* Differenzierung von hESC-NSCs.

(A) Die unter Wachstumsfaktorentzug kultivierten hESC-NSCs wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Differenzierung untersucht. Die Anzahl der β III-Tubulin-positiven Zellen stieg ebenso wie die Anzahl der L1-positiven Zellen mit der Zeit an. L1-exprimierende Zellen wiesen wie β III-Tubulin-positiven Zellen eine neuronale Morphologie auf. (B-E) Immunfluoreszenzaufnahmen der L1- (grün) und β III-Tubulin-Expression (rot) differenzierender hESC-NSCs 4 (B, C) und 8 (D, E) Tage nach Wachstumsfaktorentzug. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Maßstabsbalken: 100 μ m.

Zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug zeigten insgesamt $0,6 \pm 0,5$ % der differenzierten Zellen eine L1-Expression (Abb. 3.12 A). Demgegenüber waren, bezogen auf die Gesamtpopulation, $0,9 \pm 0,3$ % der Zellen β III-Tubulin-positiv (Abb. 3.12 A). 66,7 % der β III-Tubulin-positiven Neurone koexprimierten das Zelladhäsionsprotein L1. Vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug stieg der Prozentsatz an L1-positiven Zellen auf $2,4 \pm 0,6$ % (Abb. 3.12 A). Zu diesem Zeitpunkt exprimierten, bezogen auf die Gesamtpopulation, $2,9 \pm 0,1$ % der Zellen β III-Tubulin (Abb. 3.12 A), wobei 82,7 % der Neurone eine L1-Immunoreaktivität zeigten. Zwei und vier Tage nach Differenzierung wiesen die Zellen eine bi- bis multipolare Zellmorphologie auf, ein Merkmal für noch junge, unreife Neurone. Sechs Tage nach Wachstumsfaktorentzug waren $3,1 \pm 0,1$ % der gesamten Zellpopulation L1 und $3,6 \pm 0,6$ % β III-Tubulin positiv (Abb. 3.12 A). Zu diesem Zeitpunkt exprimierten 86,1 % der β III-Tubulin-positiven Neurone das Zelloberflächenprotein L1. Acht Tage nach Wachstumsfaktorentzug stieg die Anzahl der L1- bzw. β III-Tubulin-positiven Zellen deutlich an. Zu diesem Zeitpunkt waren $7,5 \pm 2,6$ % bzw. $8 \pm 2,1$ % der Gesamtpopulation L1 bzw. β III-Tubulin-positiv (Abb. 3.12 A). Hiervon koexprimierten 93,7 % der β III-Tubulin-immunoreaktiven Zellen L1. Ab Tag 8 der Differenzierung zeigten die L1-positiven Zellen eine weitaus komplexere Zellmorphologie mit langen und verzweigten Fortsätzen. Nach 10 Tagen Wachstumsfaktorentzug konnte wiederum ein Anstieg L1-positiver und β III-Tubulin-positiver Zellen verzeichnet werden. Zu diesem Zeitpunkt in der Differenzierung waren $9,8 \pm 0,9$ % der Zellen L1- und $12,2 \pm 1,6$ % β III-Tubulin-positiv (Abb. 3.12 A). 80,3 % der β III-Tubulin-positiven Zellen koexprimierten L1. Zu jedem Zeitpunkt in der Differenzierung (Tag 2, 4, 6, 8 und 10) koexprimierten die L1-positiven Zellen zu 100 % β III-Tubulin.

3.2.2.1.2 Charakterisierung der L1-positiven Population

Zur Charakterisierung der L1-positiven Population wurden hESC-NSCs (Zelllinie H9.2) 14 Tage unter Wachstumsfaktorentzug differenziert und immunzytochemisch auf die Expression neuronaler Marker untersucht (Abb. 3.13). Die Immunfluoreszenzanalyse 14 Tage nach Wachstumsfaktorentzug zeigte, dass die L1-positive Zellpopulation in sowohl β III-Tubulin- als auch MAP2ab-positive Neurone differenzierte. Die Quantifizierung ergab, dass $99,4 \pm 1,1$ % der L1-positiven Zellen den allgemeinen neuronalen Marker β III-Tubulin und $89,1 \pm 8,4$ % der L1-positiven Zellen den für reife Neurone charakteristischen Marker MAP2ab exprimierten.

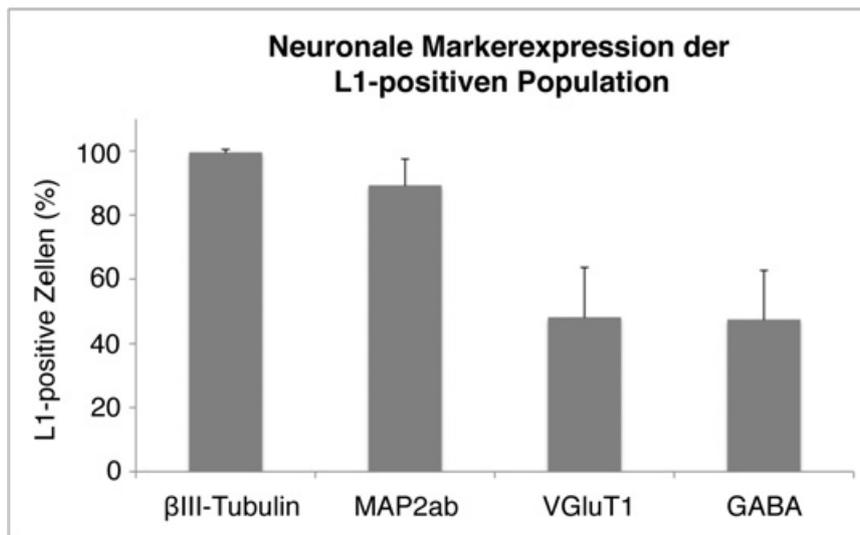


Abb. 3.13: Charakterisierung der L1-positiven Population während der *in vitro* Differenzierung von hESC-NSCs.

HESC-NSCs wurden 14 Tage unter Wachstumsfaktorentzug differenziert und die L1-positive Zellpopulation immunzytochemisch auf neuronale Marker untersucht. Die L1-positive Population differenzierte in eine Population von βIII-Tubulin- und MAP2ab-positiven Neuronen, die sowohl einen GABAergen (GABA) als auch einen glutamatergen (VGluT1) Phänotyp aufwiesen.

Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Zellen sowohl einen GABAergen als auch glutamatergen Phänotyp auf. Der Neurotransmitter GABA wurde von $47,7 \pm 15,3$ % der Zellen exprimiert, während $48,1 \pm 15,5$ % der Zellen immunopositiv für den vesikulären Glutamat-Transporter 1 (VGluT1) waren.

3.2.2.2 Linienselektion der L1-positiven Zellpopulation

Die *in vitro* Differenzierungsdaten von hESC-NSCs zeigten eine deutliche Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 in Neuronen (vgl. 3.2.2.1). Unter Verwendung der FACS-Technik sollte nun aus den hESC-NSCs der Zelllinien H9.2 und I3 eine hochaufgereinigte L1-positive Population isoliert werden (Abb. 3.14). Die Zellen wurden dafür 7 Tage unter Wachstumsfaktorentzug vordifferenziert und mittels FACS sortiert. Durch den frühen Zeitpunkt der Isolation wurde sichergestellt, dass eine Population für die Selektion verwendet wurde, die noch nicht zu weit differenziert war und noch keine komplexen Fortsätze aufwies. Demgegenüber stand zum gewählten Differenzierungszeitpunkt allerdings der geringe prozentuale Anteil an L1-positiven Zellen ($5,2 \pm 1,2$ %, durchflusszytometrische Bestimmung). Für eine gute Vereinzelnung wurden die Zellen unmittelbar vor der Sortierung durch einen Filter gegeben. Tote Zellen wurden über Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenz aus der zu analysierenden Zellpopulation eliminiert (Abb. 3.14 A; P3). Die Durchflusszytometrie zeigte eine gut detektierbare L1-positive Zellpopulation (Abb. 3.14 A; P2). Die differenzierten Zellen wurden aufgrund der Antikörper-basierten L1-Fluoreszenzintensität

isoliert. Die L1-positive Population sowie negativ-sortierte und nicht-sortierte Zellen als Kontrollen aus derselben Präparation wurden separat auf Polyornithin/Laminin-beschichteten Schalen in Differenzierungsmedium plattiert. Die positiv-sortierten Zellen zeigten 24 h nach FACS neben einer deutlichen L1-Immunfluoreszenz (Abb. 3.14 E, grün; F, Phasenkontrastaufnahme) auch eine Koexpression mit β III-Tubulin (Abb. 3.14 E, rot). Die Quantifizierung der Immunfluoreszenz ergab, dass $96,2 \pm 1,2$ % (H9.2) bzw. $77,2 \pm 5,3$ % (I3) der Zellen in der positiven Fraktion L1 exprimierten (Abb. 3.14 B), wohingegen in der negativen Zellfraktion nur $1,6 \pm 0,6$ % (H9.2) bzw. $8,2 \pm 4$ % (I3) L1-positiv waren (Abb. 3.14 B, C). In der nicht-sortierten Zellfraktion zeigten $5,7 \pm 0,8$ % (H9.2) bzw. $9,9 \pm 3,1$ % (I3) der Zellen eine L1-Expression (Abb. 3.14 B, D).

Dies kommt einer 17-fachen Anreicherung der L1-positiven Zellen für die Zelllinie H9.2 und einer 8-fachen Anreicherung für die Zelllinie I3 gleich. Demnach zeigte die L1-selektierte Population gegenüber den Kontrollen eine hochgradige und signifikante Anreicherung L1-positiver Zellen. Die L1-positiven Zellen koexprimierten den neuronalen Marker β III-Tubulin und bildeten im weiteren Verlauf der Differenzierung in der Zellkulturschale deutliche Fortsätze aus.

Die neuronale Identität der L1-selektierten Population konnte ebenfalls mittels Western Blot festgestellt werden (Abb. 3.14 G). Hierfür wurden Proteinlysate aus der positiv- und negativ-sortierten Zellfraktion sowie Proteinlysate aus humanem Gehirngewebe als Positiv-Kontrolle verwendet. Die Signalintensitäten wurden mithilfe der Software ImageJ ermittelt. In der L1-positiven Fraktion konnte im Gegensatz zur negativen Fraktion das Zelloberflächenprotein L1 detektiert werden. β III-Tubulin wurde in der L1-positiven Zellfraktion deutlich stärker exprimiert (relative Signalintensität: 1,9) als in der negativen Fraktion (relative Signalintensität: 0,5). Des Weiteren zeigten die Zellen der positiv-selektierten Fraktion eine stärkere VGluT1-Bande (relative Signalintensität der positiven Fraktion: 0,9 und die der negativen Fraktion: 0,4). Dies deutet drauf hin, dass es sich zumindest bei einem Teil der L1-positiven Zellen um glutamaterge Neurone handelt.

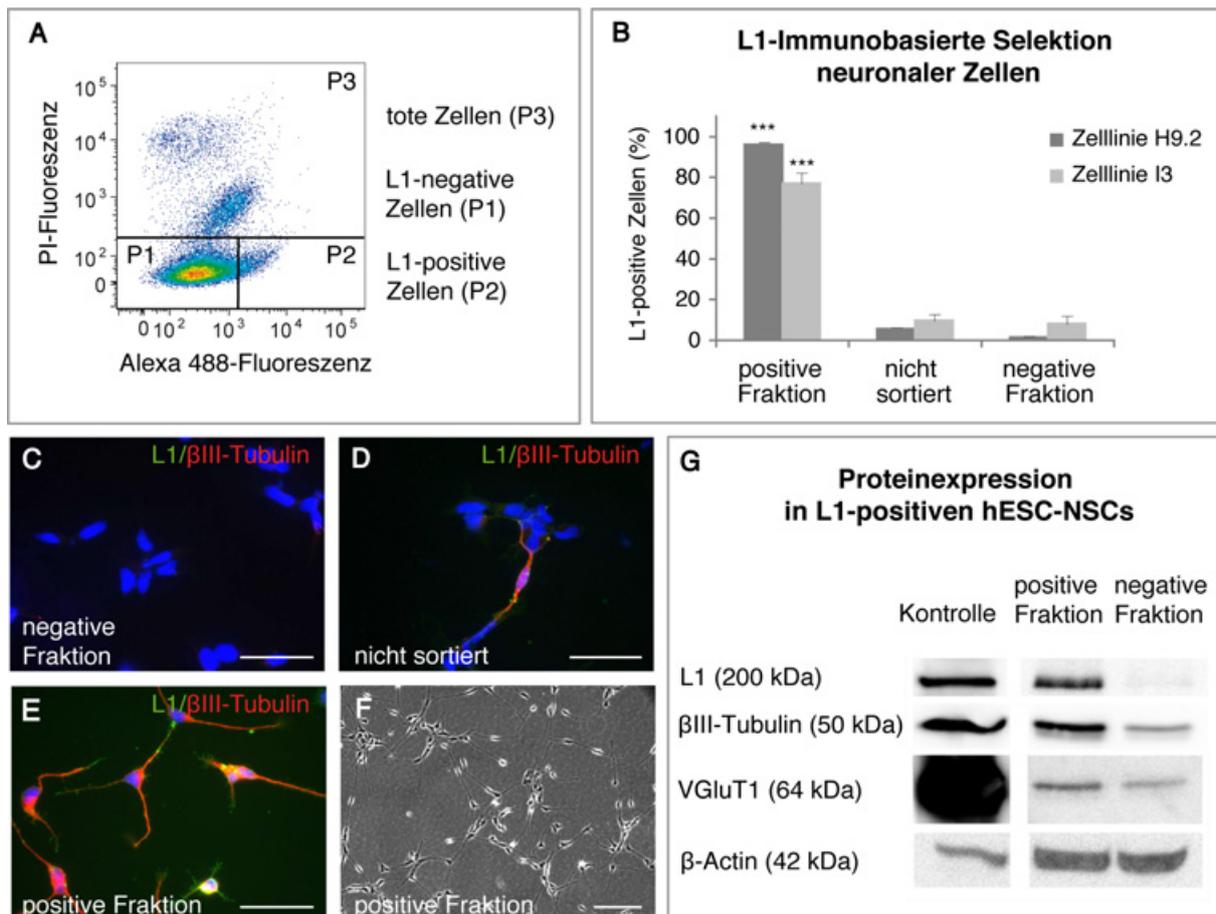


Abb. 3.14: Charakterisierung L1-sortierter Zellen 24 h nach FACS.

(A) 7 Tage nach Wachstumsfaktorentzug konnte eine deutliche Fraktion L1-exprimierender Zellen in hESC-NSC-Kulturen detektiert und über L1 sortiert werden. Tote Zellen wurden über PI-Fluoreszenz aus der Zellpopulation eliminiert. (B) Gegenüber den Kontrollen (nicht-sortierte und L1-negativ-sortierte Zellen) zeigte die positiv-sortierte Population 24 h nach FACS eine signifikante Anreicherung L1-positiver Zellen (Zelllinie H9.2: $96,2 \pm 1,2\%$; Zelllinie I3: $77,2 \pm 5,2\%$), die β III-Tubulin koexprimierten. (C) Immunfluoreszenzaufnahme der L1-negativen Zellfraktion 24 h nach FACS. (D) L1- (grün) und β III-Tubulin- (rot) exprimierende Zellen der nicht-sortierten Zellfraktion 24 h nach Plattieren. (E) L1- (grün) und β III-Tubulin- (rot) positive Zellen der L1-positiv-sortierten Fraktion nach 24 h. (F) Phasenkontrastaufnahme L1-positiv-selektierter Zellen nach 24 h. (G) Proteinlysate L1-positiv-sortierter Zellen zeigten stärkere Banden für L1, β III-Tubulin und VGluT1 als negativ-sortierte Zellen und bestätigten so die neuronale Identität der L1-positiv-sortierten Zellen. Humanes Gehirngewebe diente als Positivkontrolle und β -Actin diente als Ladekontrolle. Bei der L1-positiven und der L1-negativen Fraktion wurden $40\ \mu\text{g}$ Protein und bei der Positiv-Kontrolle $20\ \mu\text{g}$ Protein aufgetragen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken C-E: $50\ \mu\text{m}$; F: $100\ \mu\text{m}$. *** Signifikanz: $p \leq 0,001$.

Auch auf mRNA-Ebene ließ sich die Expressionen der neuronalen Marker β III-Tubulin, GAD67 und VGluT1/2 in L1-selektierten Zellen semi-quantitativ und quantitativ über RT-PCR nachweisen (Abb. 3.15). In der semi-qRT-PCR zeigten L1-positiv-sortierte Zellen eine starke Expression des L1-Gens, sowie eine starke Expression der neuronalen Marker β III-Tubulin und GAD67, ein Marker für inhibitorische, GABAerge Neurone (Abb. 3.15 A). Zugleich war bei diesen Zellen eine schwache Expression der neuronalen Gene VGluT1 und VGluT2, welche exzitatorische, glutamaterge Neurone kennzeichnen, festzustellen. Bei L1-negativ-sortierten Zellen, konnte weder eine L1- noch eine VGluT1-Expression nachgewiesen

werden. Zellen der L1-negativ-sortierten Fraktion exprimierten jedoch schwach β III-Tubulin und GAD67. Die Expression des Tyrosin-Hydroxylase Gens (TH), welches auf dopaminerge Neurone hinweist, wurde ebenso wie die Expression von GFAP, ein Astrozyten-assoziiertes Gen, in beiden Zellfraktionen nicht nachgewiesen.

Quantitative RT-PCR-Untersuchungen bestätigten Unterschiede in der Expression neuronaler Gene in L1-positiv-sortierten Zellen im Vergleich zu L1-negativ-sortierten Zellen (Abb. 3.15 B). So wurde eine erhöhte Expression des L1-Gens und der neuronalen Gene β III-Tubulin, GAD67 und VGluT1 nachgewiesen (nicht signifikant). Des Weiteren konnte ein niedrigeres Expressionsniveau für das Pax6-Gen sowie für das neurale Stammzellen-assoziierte Gen Nestin in L1-positiv-selektierten Zellpopulationen im Vergleich zu L1-negativ-sortierten Zellfraktion festgestellt werden (nicht signifikant).

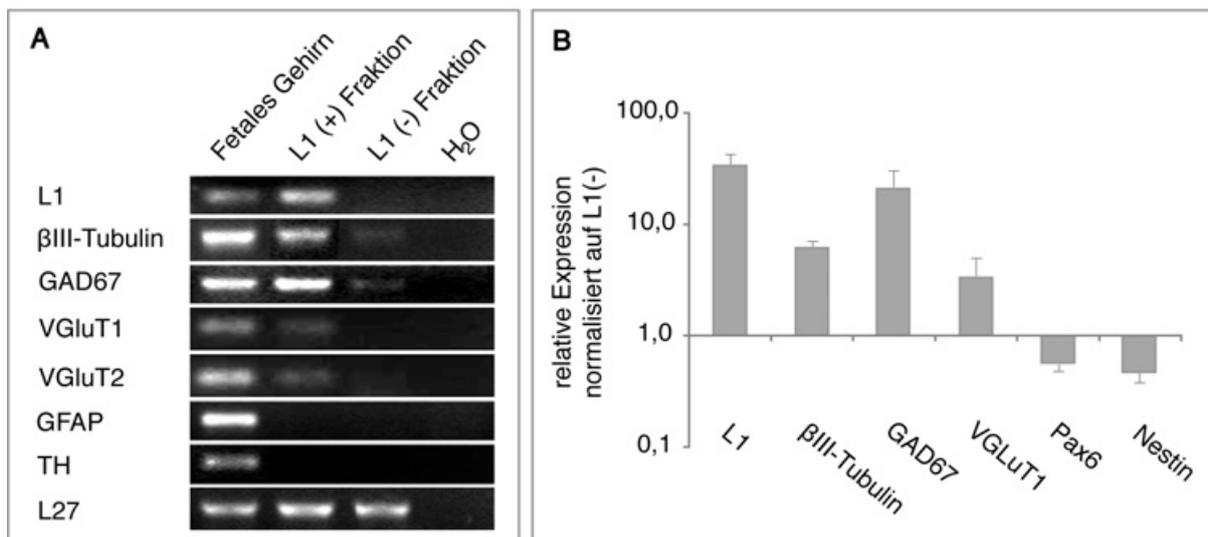


Abb. 3.15: Expression Differenzierungs-assoziiierter Gene der L1-sortierten Population 24 h nach FACS.

(A) Die Zellen der L1-positiv-sortierten Fraktion zeigten im Vergleich zur negativ-sortierten Zellfraktion in semi-qRT-PCR-Untersuchungen eine L1-Expression, sowie eine starke Expression der neuronalen Gene β III-Tubulin und GAD67. Die Marker für glutamaterge Neurone VGluT1 und VGluT2 wurden in L1-positiv-selektierten Zellen schwach exprimiert. Tyrosin-Hydroxylase (TH) und GFAP- wurden nicht nachgewiesen. Als interne Kontrolle wurde das Expressionsniveau des ribosomalen Proteins L27 bestimmt (B). Quantitative RT-PCR-Untersuchungen zeigen Expressionsunterschiede der Gene L1, β III-Tubulin, GAD67 und VGluT1, sowie der Gene Pax6 und Nestin in L1-positiv-sortierten Zellen im Vergleich zu L1-negativ-sortierten Zellen (nicht signifikant). Die für die qRT-PCR erhobenen Daten wurden nach der $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen (18S) sowie auf Daten, die für die L1-negativ-sortierten Zellen gewonnen wurden, bezogen.

Der Nachweis von neuronalen Markern auf mRNA- und Proteinebene weist darauf hin, dass L1-positiv-sortierte Zellen eine neuronale Zellpopulation darstellen. Diese Daten bestätigen, dass Neurone über das Zelladhäsionsmolekül L1 aus einer heterogen-differenzierten hESC-NSC-Population angereichert werden können.

3.2.2.3 Neuronale Identität L1-selektierter Zellen

Für die Charakterisierung des weiteren Differenzierungspotentials der L1-immunisolierten Population wurden L1-positive Zellen sowie negativ-sortierte und nicht-sortierte Zellen aus derselben Präparation zur neuronalen Ausreifung separat auf Zellkulturschalen ausplattiert und zusätzlich für 6 Tage kultiviert. Die Mehrheit der L1-positiven Zellen (Abb. 3.16 A₁, B₁, C₁ und D₁) koexprimierte die neuronalen Antigene β III-Tubulin und MAP2ab (Abb. 3.16, A₂-A₃ und B₂-B₃). Jeweils ein Teil der L1-positiven Zellen (Abb. 3.16 C₁ und D₁) exprimierten die Subtyp-spezifischen Neurotransmitter VGluT1 und GABA (Abb. 3.16, C₂-C₃ und D₂-D₃). Zellen der negativ-sortierten Fraktion und nicht-sortierte Zellen waren überwiegend L1-negativ und wiesen teilweise eine noch typische Rosetten-ähnliche Morphologie von undifferenzierten hESC-NSCs auf (Abb. 3.16 E und F; weiße Pfeilspitze). Nur wenige β III-Tubulin-immunoreaktive Zellen konnten in den Kontrollen nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung der neuronalen Markerexpression der L1-positiven Zellfraktionen, sowie die der negativ-sortierten und nicht-sortierten Zellen als Kontrollen 6 Tage nach FACS ergab eine hochsignifikante Anreicherung neuronaler Zellen in der L1-positiv-sortierten Fraktion (Abb. 3.17). Zu diesem Zeitpunkt wiesen $84,9 \pm 8,4$ % (Zelllinie H9.2) bzw. $68,6 \pm 6,5$ % (Zelllinie I3) der positiv-sortierten Zellen eine L1-Expression auf, wobei 100 % dieser Zellen β III-Tubulin-positiv waren. In der L1-positiven Fraktion waren $84,9 \pm 8,2$ % (H9.2) bzw. $70,9 \pm 6$ % (I3) der Zellen immunoreaktiv für β III-Tubulin. Im Vergleich dazu waren in der negativ-sortierten Fraktion nur $3,9 \pm 1,2$ % (H9.2) bzw. $9,6 \pm 0,9$ % (I3) der Zellen L1-positiv und in der nicht-sortierten Zellfraktion exprimierten $5,6 \pm 2,5$ % (H9.2) bzw. $12,2 \pm 3,1$ % (I3) der Zellen das Zelladhäsionsmolekül L1 (Abb. 3.17). Des Weiteren zeigten $5,5 \pm 2,4$ % (H9.2) bzw. $10,9 \pm 1,4$ % (I3) der Zellen der negativ-sortierten Population und $8,4 \pm 2$ % (H9.2) bzw. $13,2 \pm 2,9$ % (I3) der nicht-sortierten Zellpopulation eine Immunoreaktivität für β III-Tubulin.

In der L1-positiv-sortierten Gesamtpopulation exprimierten $76,9 \pm 9,2$ % (H9.2) bzw. $45,3 \pm 9,6$ % (I3) der Zellen den späten neuronalen Marker MAP2ab (Abb. 3.17). Doppelfärbungen mit L1 und MAP2ab konnten zeigen, dass 87 % (H9.2) bzw. 77 % (I3) der L1-positiven Zellen eine MAP2ab-Koexpression aufwiesen. Im Vergleich dazu waren bezogen auf die Gesamtpopulation in der negativ-sortierten Fraktion $6,0 \pm 2,3$ % (H9.2) bzw. $8,5 \pm 1,1$ % (I3) der Zellen MAP2ab-positiv und in der nicht-sortierten Zellpopulation zeigten $5,0 \pm 1,6$ % (H9.2) bzw. $9,6 \pm 2,7$ % (I3) eine Immunoreaktivität mit MAP2ab.

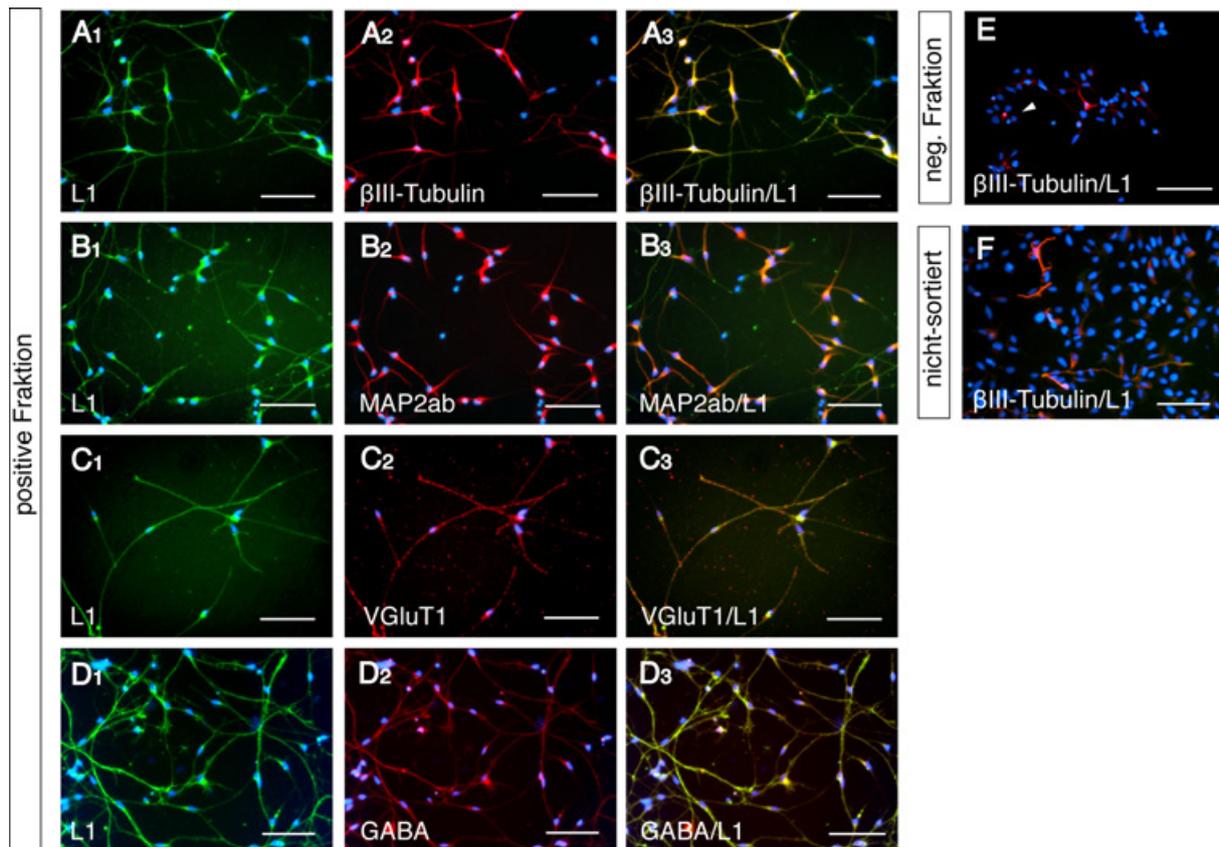


Abb. 3.16: Immunzytochemische Charakterisierung L1-sortierter Zellen 6 Tage nach FACS.

(A-B) Die Mehrheit der L1-positiven Zellen koexprimiert die neuronalen Antigene β III-Tubulin (A2, A3) und MAP2ab (B2, B3). (C-D) Ebenso koexprimierte jeweils ein Teil der L1-positiven Zellen VGluT1 (C2, C3) und GABA (D2, D3). Negativ-sortierte (E) und nicht-sortierte Zellen (F) waren überwiegend L1-negativ und wiesen teilweise eine typische Rosetten-ähnliche Morphologie von undifferenzierten hESC-NSCs auf (weiße Pfeilspitze). Nur ein kleiner Anteil dieser Zellen exprimierte β III-Tubulin. Phasenkontrastaufnahmen und Immunfluoreszenzbilder zeigen repräsentative Bilder der Zelllinie H9.2. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken: 100 μ m.

Um die neuronale Population in der L1-positiv-selektierten Zellpopulation näher zu charakterisieren, wurden die Zellen immunzytochemisch auf einen glutamatergen (VGluT1, exzitatorische Neurone) und GABAergen (inhibitorische Neurone) Phänotyp untersucht. Sechs Tage nach FACS-Isolierung waren $61,4 \pm 6,5$ % (H9.2) bzw. $26,7 \pm 4,8$ % (I3) der Zellen VGluT1-positiv und $66,5 \pm 3,2$ % (H9.2) bzw. $39,1 \pm 6,9$ % (I3) exprimierten GABA (Abb. 3.17). Demgegenüber exprimierten nur $1,1 \pm 0,6$ % (H9.2) bzw. $0,5 \pm 0,3$ % (I3) der negativ-sortierten Zellfraktion VGluT1 und $2,6 \pm 1,4$ % (H9.2) bzw. $3,6 \pm 2,1$ % (I3) GABA. Nicht-sortierte Zellen zeigten zu $1,6 \pm 0,7$ % (H9.2) bzw. $2,6 \pm 0,8$ % (I3) eine VGluT1-Expression und zu $4,7 \pm 0,2$ % (H9.2) bzw. $4,1 \pm 0,8$ % (I3) eine GABA-Immunreaktivität (Abb. 3.17). Bei beiden Zelllinien (H9.2 und I3) konnte demnach durch die L1-Immunoisolation eine signifikante Anreicherung GABAerger und glutamaterger Neurone im Vergleich zu den Kontrollen (negativ-sortierte und nicht-sortierte Zellfraktionen) erreicht werden (Abb. 3.17). Bei der Zelllinie H9.2 konnten über 60 % VGluT1- positive und über

60 % GABA-positive Zellen in der L1-positiven Zellfraktion ausgezählt werden. Dieser Befund deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der Neurone beide Neurotransmitter exprimiert.

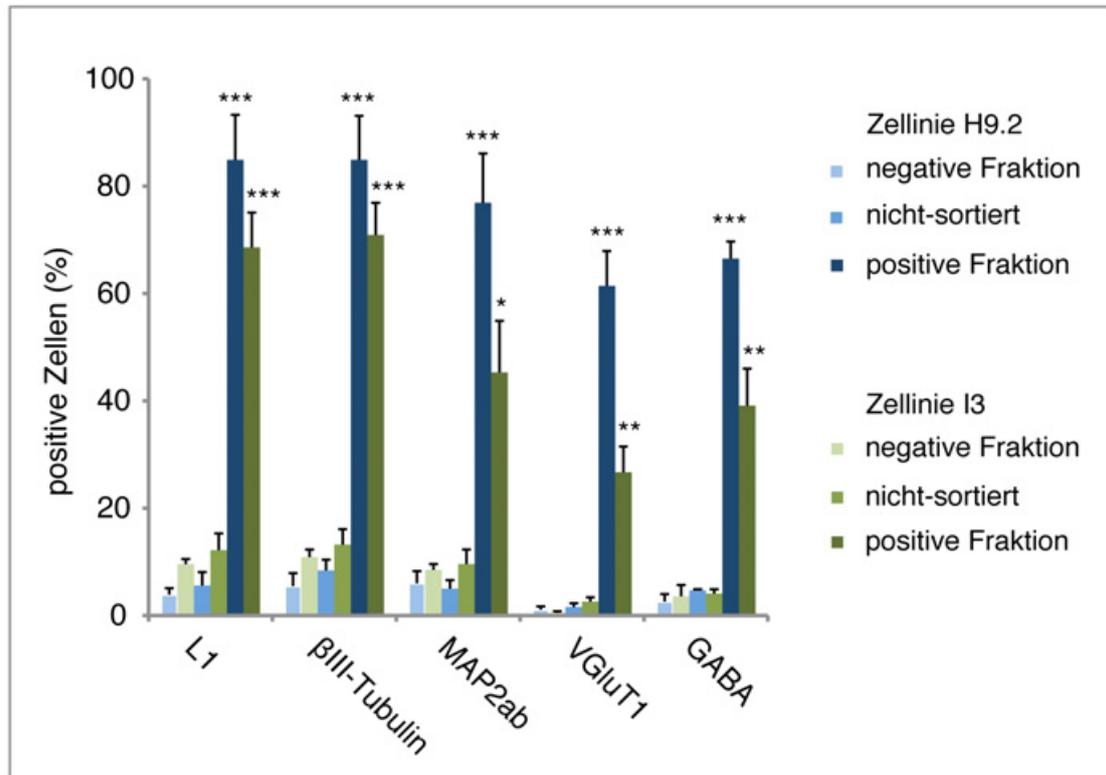


Abb. 3.17: Quantifizierung der Immunzytochemie L1-sortierter Zellen 6 Tage nach FACS.

Quantitative Auswertungen der Immunzytochemie L1-positiv- und negativ-sortierter sowie nicht-sortierter Zellpopulationen. Eine signifikante Anreicherung von L1-, β III-Tubulin-, MAP2ab-, GABA- und VGLuT1-exprimierender Zellen konnte in L1-positiven Zellfraktion nachgewiesen werden. * Signifikanz: $p \leq 0,05$; ** Signifikanz: $p \leq 0,01$; *** Signifikanz: $p \leq 0,001$.

Nach L1-immuno-basierter Selektion konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression des Zelloberflächenproteins L1 und des neuronalen Markers β III-Tubulin zwischen den beiden hESC-NSC-Linien H9.2 und I3 festgestellt werden. Die Expression des neuronalen Markers MAP2ab unterschied sich hingegen signifikant ($p \leq 0,05$). Ein hochsignifikanter Unterschied zeigte sich auch in der Subtyp-spezifischen neuronalen Differenzierung. Durch L1-basierte Selektion konnten ausgehend von hESC-NSCs der hESC-Linie H9.2 signifikant mehr VGLuT1- ($p \leq 0,001$) und GABA-positive ($p \leq 0,01$) Zellen in der L1-positiven Fraktion angereichert werden als bei hESC-NSCs der Zelllinie I3 (Abb. 3.17).

Auf mRNA Ebene konnte ebenfalls die Expression neuronaler Marker in L1-selektierten Zellen 6 Tage nach FACS nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Quantitative RT-PCR-Untersuchungen zeigten Unterschiede in der Expression neuronaler Gene in der L1-positiven

Zellfraktion im Vergleich zu L1-negativ-sortierten Zellen (nicht signifikant). Es konnte eine erhöhte Expression des L1-Gens und die der neuronalen Gene VGlut1 und GAD67 festgestellt werden. Die β III-Tubulin-Expression von L1-positiv-sortierten und L1-negativ-sortierten Populationen unterschied sich hingegen kaum. Die Genexpression von GAD67, ein Marker für inhibitorische Neurone, war schwächer als die von VGlut1, welches exzitatorische Neurone kennzeichnet. Das mit proliferativen neuronalen Stammzellen-assoziierte Gen Pax6 wurde in der L1-positiv-selektierten Population deutlich geringer exprimiert als in der L1-negativ-sortierten Zellfraktion. Die Nestin-Genexpression unterschied sich hingegen kaum von der in den negativ-sortierten Zellen.

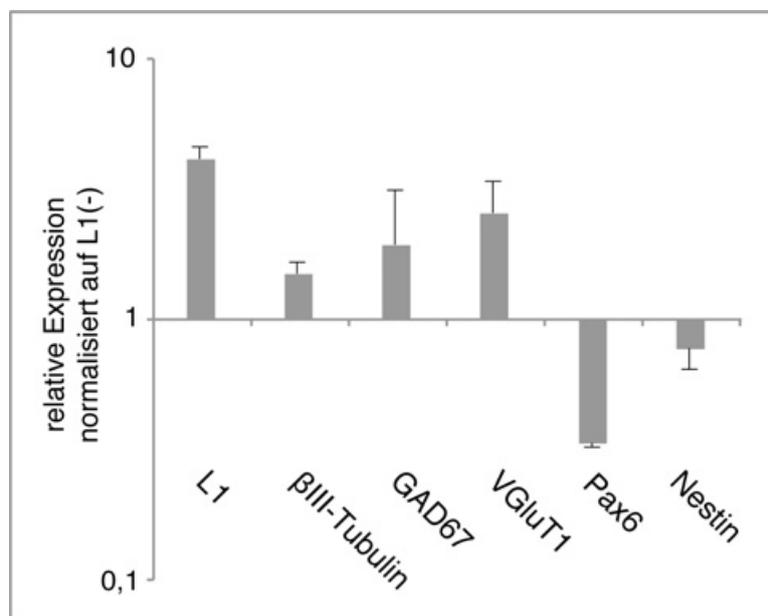


Abb. 3.18: Charakterisierung L1-positiv-sortierte Zellen über qRT-PCR 6 Tage nach FACS.

Quantitative RT-PCR-Untersuchungen zeigen Unterschiede in der Expression neuronal-spezifischer Gene in der L1-positiven Zellfraktion im Vergleich zu L1-negativ-sortierten Zellen. Die Zellen der L1-positiv-sortierten Fraktion zeigten eine erhöhte Expression der L1-, GAD67- und VGlut1-Gene. Die β III-Tubulin-Expression unterschied sich geringfügig. Pax6 wurde in L1-positiv-sortierten Zellen deutlich geringer exprimiert als in den negativ-sortierten Zellen. Die Expression des Nestin-Gens unterscheidet sich hingegen kaum. Die für die qRT-PCR erhobenen Daten wurden nach der $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen (18S) sowie auf Daten, die für die L1-negativ-sortierten Zellen gewonnen wurden, bezogen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die über das Zelladhäsionsmolekül L1 selektierten β III-Tubulin und MAP2ab positiven Neurone 6 Tage nach Selektion sowohl einen GABAergen als auch einen glutamatergen (VGlut1) Phänotyp aufweisen. Jedoch konnten zwischen den hESC-NSC-Linien H9.2 und I3 signifikante Unterschiede bezüglich des neuronalen Markers MAP2ab und der Subtyp-spezifischen neuronalen Differenzierung (GABA- und VGlut1-positive Zellen) festgestellt werden. Ausgehend von hESC-NSCs der

Linie H9.2 konnten weitaus mehr MAP2ab, VGLuT1- und GABA-positive Zellen in der L1-positiven Fraktion angereichert werden als bei hESC-NSCs der Linie I3.

3.2.2.4 Entwicklung eines Kryokonservierungsprotokolls für L1-positive Neurone

Die Daten unter 3.2.2.2 und 3.2.2.3 zeigten, dass eine hochaufgereinigte neuronale Zellpopulation aus hESC-NSCs über das Zelloberflächenmolekül L1 mittels der FACS-Methode gewonnen werden konnte. Unter Verwendung verschiedener Einfriermedien sollte nun ein effektives Kryokonservierungsprotokoll für L1-positive Neurone (Zelllinie H9.2) gefunden werden. Zur Verbesserung der Zellüberlebensrate wurden Apoptose-Inhibitoren (ROCK-Inhibitor Y27632 und der allgemeine Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK) vor, während und nach dem Kryokonservierungsprozess getestet (Tab. 3.1). Hierfür wurden jeweils 500.000 Zellen in 300 µl Einfriermedium direkt nach der FACS-Isolierung kryokonserviert. Das kontrollierte Einfrieren der Zellen erfolgte in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80° C, wobei die Zellen hierbei um 1 °C/s heruntergekühlt wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff.

Für die Kryokonservierung wurde zum einen ein Standardkryomedium (KM) für Zellen verwendet, welches DMSO (10 %), Zellkulturmedium (10 %) und Serum-Replacement (SR; 80 %) enthielt, und zum anderen kam ein Trehalose-haltiges Kryomedium (TKM: 10,5 % DMSO, 21,1 % 1 M Trehalose, 68,4 % SR) sowie ein von Ladewig *et al.* 2008 entwickeltes Kryomedium (KM-L: 10 % DMSO, 20 % 500 mM Myo-Isonitol, 0,25 V% Polyvinylalkohol) zum Einsatz. Des Weiteren erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Kryokonservierungsprozess die Zugabe der Apoptose-Inhibitoren (Tab. 3.1). Das Auftauen der L1-positiven Neurone erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellvitalität wurde mit Trypanblau direkt nach dem Auftauen bestimmt. Die Quantifizierung der Zellvitalität nach Auftauen zeigte, dass die L1-positiv-sortierten Neurone unter Verwendung des Standardeinfriermedium (KM) eine Zellvitalität von $55,4 \pm 6,1$ % aufwiesen (Abb. 3.19 A, B). Eine leichte Steigerung der Überlebensrate L1-positiver Zellen auf $60,7 \pm 1,3$ % konnte durch Verwendung eines Trehalose-haltigen Kryomediums (TKM) erreicht werden (Abb. 3.19 A, C).

		Zugabe von Apoptose-Inhibitoren		
		Vorinkubation (20 min)	Kryomedium	Auftaumedium
Einfrierbedingungen	KM	-	-	-
	TKM ROCK ^{-/-}	-	-	-
	TKM ROCK ^{+/-}	-	ROCK	ROCK
	TKM ROCK ^{+/+}	ROCK	ROCK	ROCK
	TKM ROCK ^{+/+} / Z-VAD-FMK	ROCK / Z-VAD-FMK	ROCK	ROCK
	TKM Z-VAD-FMK	Z-VAD-FMK	-	-
	KM-L Z-VAD-FMK	Z-VAD-FMK	-	-

Tab. 3.1: Übersicht der getesteten Kryomedien und Apoptose-Inhibitoren.

KM: Standardkryomedium; TKM: Trehalosehaltiges Kryomedium; ROCK: ROCK-Inhibitor; Z-VAD-FMK: allgemeiner Caspase-Inhibitor ; KM-L: Kryomedium-L (siehe Ladewig *et al.*, 2008).

Trehalose dient hier neben DMSO als zusätzliches Kryoprotektivum und soll verhindern, dass die Zellen beim Einfrieren und Auftauen von den sich dabei bildenden Eiskristallen Schaden erleiden. Um die Überlebensrate der L1-positiven Neurone weiter zu verbessern, wurden Apoptose-inhibierende Substanzen, wie der ROCK-Inhibitor (ROCK) und ein allgemeiner Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Kryokonservierungsprozesses getestet (Tab. 3.1). Bei der TKM ROCK^{+/-} Kryobedingung wurde ROCK dem Kryo- und Auftaumedium hinzugefügt. Zusätzlich dazu wurden bei TKM ROCK^{+/+} die Zellen vor dem Einfrieren für 20 min mit ROCK inkubiert. Bei TKM ROCK^{+/+} Z-VAD-FMK wurden die Zellen sowohl mit ROCK als auch mit Z-VAD-FMK vorinkubiert. TKM Z-VAD-FMK bezeichnet hingegen eine Kryobedingung, bei der die Zellen vor dem Einfrieren nur mit Z-VAD-FMK inkubiert wurden. Bei KM-L Z-VAD-FMK wurden die Zellen, wie unter Ladewig *et al.* (2008) beschrieben mit Z-VAD-FMK vorinkubiert und eingefroren.

Durch die Kryobedingung TKM ROCK^{-/-} konnte im Vergleich zu TKM ROCK^{-/-} eine weitere Erhöhung der Zellvitalität auf $64,2 \pm 0,3$ % erreicht werden (Abb. 3.19 A, D). Eine hochsignifikante Steigerung der Überlebensrate der L1-positiven Neurone nach Einfrieren und Wiederauftauen auf $79,8 \pm 2,9$ % konnte bei TKM ROCK^{+/+} festgestellt werden (Abb. 3.19 A, E), bei der die Zellen zusätzlich vor dem Einfrieren mit ROCK vorinkubiert wurden.

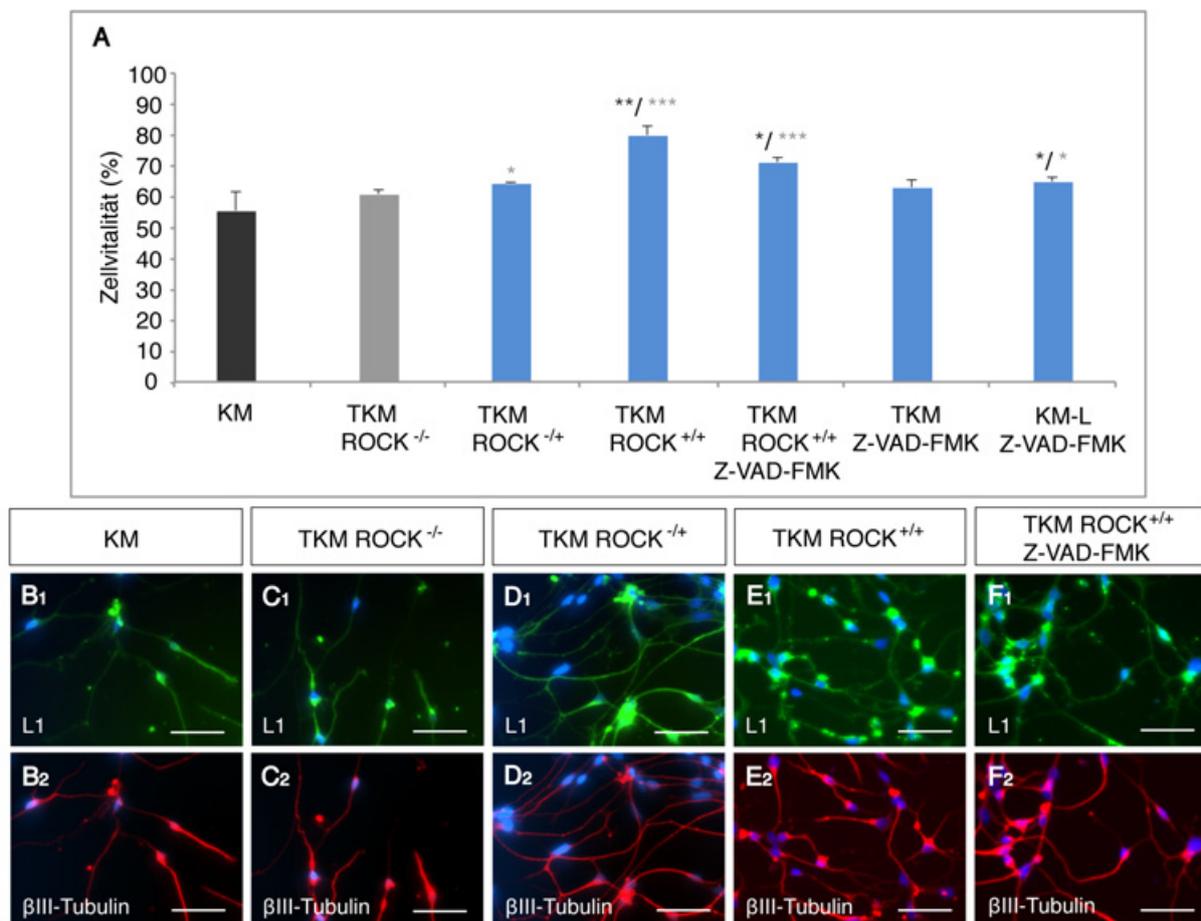


Abb. 3.19: Kryokonservierung L1-positiv-sortierter Neurone.

HESC-NSCs wurden 7 Tage vordifferenziert und über das Zelladhäsionsmolekül L1 mittels FACS sortiert. (A) Quantitative Auswertung der Überlebensrate kryokonservierter L1-positiver-sortierter Zellen. L1-positiv-selektierte Neurone wurden entweder direkt mit dem Standardkryomedium (KM), mit dem Trehalose-haltigen Kryomedium (TKM) oder dem Kryomedium KM-L (Ladewig *et al.*, 2008) kryokonserviert. Der ROCK-Inhibitor (ROCK) und ein allgemeiner Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Kryo- und Auftauprozesses zugefügt (siehe Tab. 3.1). Die Zellvitalität wurde mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. (B-F) Immunfluoreszenzbilder der unter verschiedenen Bedingungen kryokonservierten L1-positiv-sortierten Zellen 1 Tag nach Auftauen. Diese Zellen zeigten eine Koexpression von L1 (B₁-F₁, grün) und βIII-Tubulin (B₂-F₂, rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken: 50 μm. * Signifikanz: $p \leq 0,05$; ** Signifikanz $p \leq 0,01$; *** Signifikanz: $p \leq 0,001$ (schwarze Sternchen: bezogen auf KM; graue Sternchen: bezogen auf TKM).

Die Inkubation der neuronalen Zellen vor dem Einfrieren mit Z-VAD-FMK (TKM Z-VAD-FMK) führte zu einer kleinen, nicht signifikanten Verbesserung der Zellvitalität auf $62,9 \pm 2,3$ % (Abb. 3.19 A). Eine Inkubation L1-positiver Neurone vor dem Einfrieren mit

ROCK und Z-VAD-FMK (TKM ROCK^{+/+} Z-VAD-FMK) führte zu einer Überlebensrate von $71,1 \pm 0,5$ % (Abb. 3.19 A, F). Demnach konnte durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Z-VAD-FMK die Zellvitalität L1-positiven Neurone im Vergleich zur TKM ROCK^{+/+} nicht weiter gesteigert werden. Die Zellvitalität der L1-positiven Neurone war bei der KM-L Z-VAD-FMK Bedingung (siehe Ladewig *et al.*, 2008) mit $64,8 \pm 1,4$ % nur geringfügig höher als bei der Kryobedingung KM und TKM ROCK^{-/-}, jedoch im Vergleich zu TKM ROCK^{+/+} signifikant niedriger ($p=0,0002$; in Abb. 3.19 A nicht dargestellt).

Einen Tag nach Auftauen der L1-selektierten Zellen zeigte sich, dass die kryokonservierten Zellen eine eindeutig neuronale Morphologie aufwiesen und neben L1 (Abb. 3.19 B₁-F₁, grün) den frühen neuronalen Marker β III-Tubulin (Abb. 3.19 B₂-F₂) exprimierten.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Verwendung des ROCK-Inhibitors vor und während des Einfrierens, sowie beim Auftauprozess eine effektive Kryokonservierungsmethode für junge Neurone darstellt. Während das Trehalose-haltige Kryomedium (TKM) alleine nur eine geringe Verbesserung der Zellvitalität erbrachte, konnte durch die Zugabe des ROCK-Inhibitors, insbesondere vor dem Einfrieren, die Überlebensrate der L1-positiven Neurone deutlich gesteigert werden ($p=0,0006$). Die Verwendung von Z-VAD-FMK als Apoptose-Inhibitor, wie unter Ladewig *et al.* (2008) beschrieben, war weniger effektiv. Die Kryobedingung TKM ROCK^{+/+} erwies sich im Vergleich zu allen anderen Bedingungen als die am besten geeignete Methode zur Kryokonservierung L1-positiver Neurone ($p \leq 0,002$; in Abb. 3.19 nicht dargestellt).

3.2.2.5 Elektrophysiologische Untersuchungen der L1-immunoisolierten Neurone

Um die Funktionalität der L1-positiven Neurone zu untersuchen, wurden hESC-NSCs 7 Tage unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert und auf das Zelloberflächenmolekül L1 selektiert. Die über FACS angereicherte L1-positive Zellpopulation wurde daraufhin auf primäre murine Astrozyten ausplattiert, um 5 und 9 Wochen später ihre passiven und aktiven Membraneigenschaften elektrophysiologisch zu untersuchen.

3.2.2.5.1 Physiologische Untersuchungen der L1-positiven Zellpopulation in Kokultur mit murinen Astrozyten

L1-positiv selektierte Zellen wurden für elektrophysiologische Analysen in einer Zelldichte von 750 Zellen/mm² auf eine Monolayerkultur von primären Maus-Astrozyten plattiert und bis zu 9 Wochen kultiviert (Abb. 3.19 D). Elektrophysiologische Untersuchungen einzelner

Zellen mittels der Patch-Clamp Technik (somatic whole-cell patch-clamp) wurden in Kooperation mit Dr. Thoralf Opitz durchgeführt. Um eine selektive Messung der L1-positiven Zellen durchführen zu können (Reinheit von 100 % kann mittels FACS nicht erreicht werden), wurden diese hierfür mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen das L1-Antigen sichtbar gemacht.

Die Durchbrechung der Membran bei der Zelleitung führt unausweichlich zu einer kurzfristigen Verletzung der Zellmembran, deren Integrität jedoch Grundbedingung für die realistische Darstellung des Strommusters einer Zelle ist. Um einen möglichst einheitlichen Standard zu erzielen, wurde auf verschiedene Kriterien geachtet. Das Neuron sollte innerhalb weniger min nach der Penetration ein stabiles Ruhemembranpotential aufweisen. Die Stabilität der Ableitung (gemessen am Zugangswiderstand) sollte über mehrere Minuten aufrechterhalten sein. Bei allen zur Datenanalyse herangezogenen Messungen wurden diese Kriterien erreicht.

Es wurde zunächst untersucht, wie das Membranpotential der Zellen auf intrazelluläre Injektionen von hyper- und depolarisierenden Strömen reagiert. Anhand von Antworten auf hyperpolarisierende Strominjektionen konnten passive Membraneigenschaften abgeleitet werden. Das Ruhemembranpotential (RMP) von 5 Wochen kultivierten Zellen (n=6) lag bei $-61,9 \pm 0,9$ mV und das der 9 Wochen differenzierten Neurone (n=7) bei $-62,0 \pm 1,9$ mV (Abb. 3.20 A). Ein signifikanter Unterschied konnte demnach nicht festgestellt werden. Der Membranwiderstand (R_m) von Zellen nach einer 5-wöchigen Differenzierung (n=6) lag bei $2,2 \pm 0,3$ G Ω (Abb. 3.20 B). Die Messung von 9 Wochen kultivierten Neuronen (n=7) ergab einen leicht, aber nicht signifikant niedrigeren Membranwiderstand von $1,4 \pm 0,2$ G Ω (Abb. 3.20 B). Eine signifikante Erhöhung der Membrankapazität C_m von $25,6 \pm 6,9$ pF (5 Wochen; n=6) auf $51,9 \pm 6,5$ pF (9 Wochen; n=7) deutet auf eine größere Zellmembranfläche von 9 Wochen kultivierten Zellen hin (Abb. 3.20 C). Dies lässt den Schluss zu, dass diese Neurone elaborierte Verzweigungen und Fortsätze aufweisen und weitaus reifer sind als Neurone nach 5 Wochen Differenzierung.

Als nächstes wurde untersucht, wie das Membranpotential der Zellen auf lang anhaltende (1 s) depolarisierende Strominjektionen reagiert. In allen untersuchten Zellen konnte ein Aktionspotential (AP) ausgelöst werden. Fünf Wochen differenzierte Zellen zeigten in 5 von 6 Fällen ein einzelnes AP, das von einem Depolarisationsblock gefolgt wurde (Abb. 3.20 E). Dies deutet auf eine noch unzureichende Ausbildung von repolarisierenden Kalium-Kanälen hin. Neun Wochen differenzierte Zellen hingegen waren zumeist in der Lage mehrere AP (6 von 7 Zellen) bei langer Strominjektion zu generieren (Abb. 3.20 F). Dies unterschied sie

deutlich von 5 Wochen differenzierten Zellen. Allerdings nahm die Amplitude der APs im Laufe des repetitiven Feuerns stark ab, was auf eine sehr begrenzte Verfügbarkeit von Natrium-Kanälen hinweist.

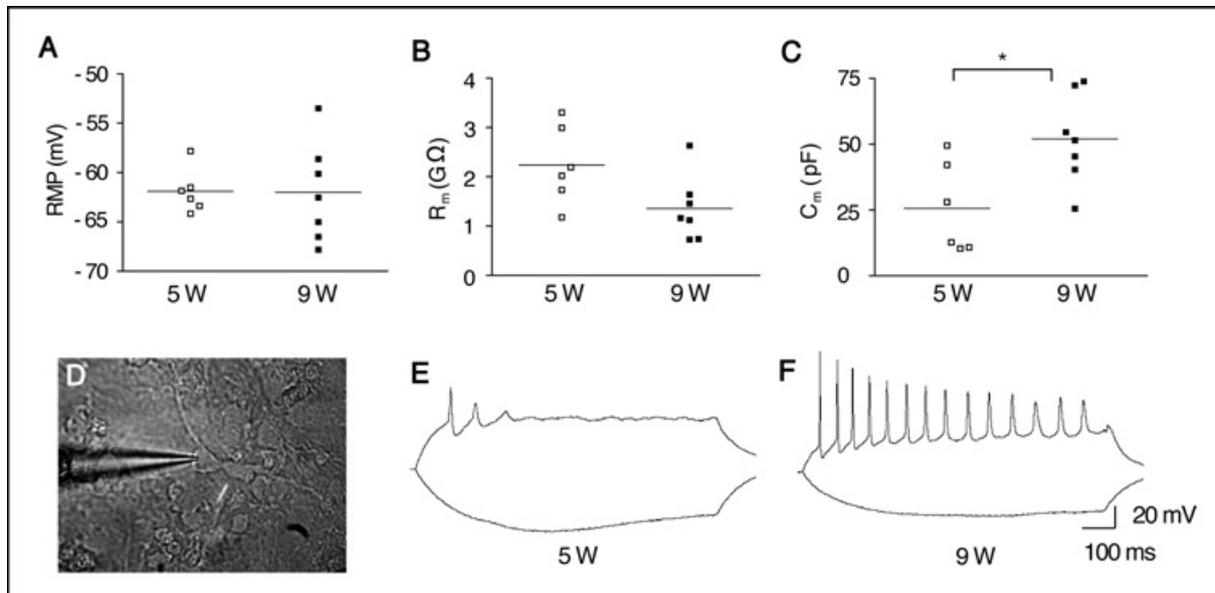


Abb. 3.20: Membraneigenschaften L1-positiv-selektierter Neurone nach 5 und 9 Wochen Differenzierung auf murinen Astrozyten.

HESC-NSCs wurden 7 Tage vordifferenziert und über das Zelladhäsionsmolekül L1 mittels FACS angereichert. Die L1-positiv selektierten Zellen wurden direkt nach FACS auf primäre murine Astrozyten plattiert und für 5 und 9 Wochen differenziert. L1-sortierte Zellen waren elektrisch erregbar und wiesen physiologische Eigenschaften von Neuronen auf. (A-C) Vergleich passiver Membraneigenschaften, wie Ruhemembranpotential (RMP), Membranwiderstand (R_m) und Membrankapazität (C_m) der L1-immunisolierten Zellen während der Differenzierung. Hyperpolarisierende Strominjektionen wurden bei der Messung der passiven Eigenschaften eingesetzt. (D) Differenzialinterferenzkontrastaufnahme (DIC) zeigt ein hESC-NSC-abgeleitetes, L1-positives Neuron, welches für 9 Wochen auf murinen Astrozyten differenziert wurde. (E,F) Aktive Membraneigenschaften neuronaler Zellen. Nach Depolarisation der Zellmembran zeigten 5 und 9 Wochen differenzierte L1-positive Zellen Aktionspotentiale (A-C). * Signifikanz: $p \leq 0,05$.

Zur näheren Charakterisierung des Feuerverhaltens wurde das jeweils erste AP, welches durch überschwellige Strominjektion ausgelöst wurde, herangezogen. Hierbei zeigte sich, dass APs in 5 Wochen differenzierten Zellen deutlich breiter waren als in 9 Wochen differenzierten Zellen (Abb. 3.21 A₁, B₁). Durch Analyse der Depolarisations- und Repolarisationsraten konnte festgestellt werden, dass sowohl Anstieg als auch Repolarisation der APs von 5 Wochen differenzierten Zellen deutlich langsamer waren (Abb. 3.21 A₂, B₂). Dem Befund könnten geringere Natrium- und Kaliumkanaldichten zu Grunde liegen. Des Weiteren konnte eine zeitlich präzisere Auslösung von APs in länger differenzierten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.21 A₃, B₃).

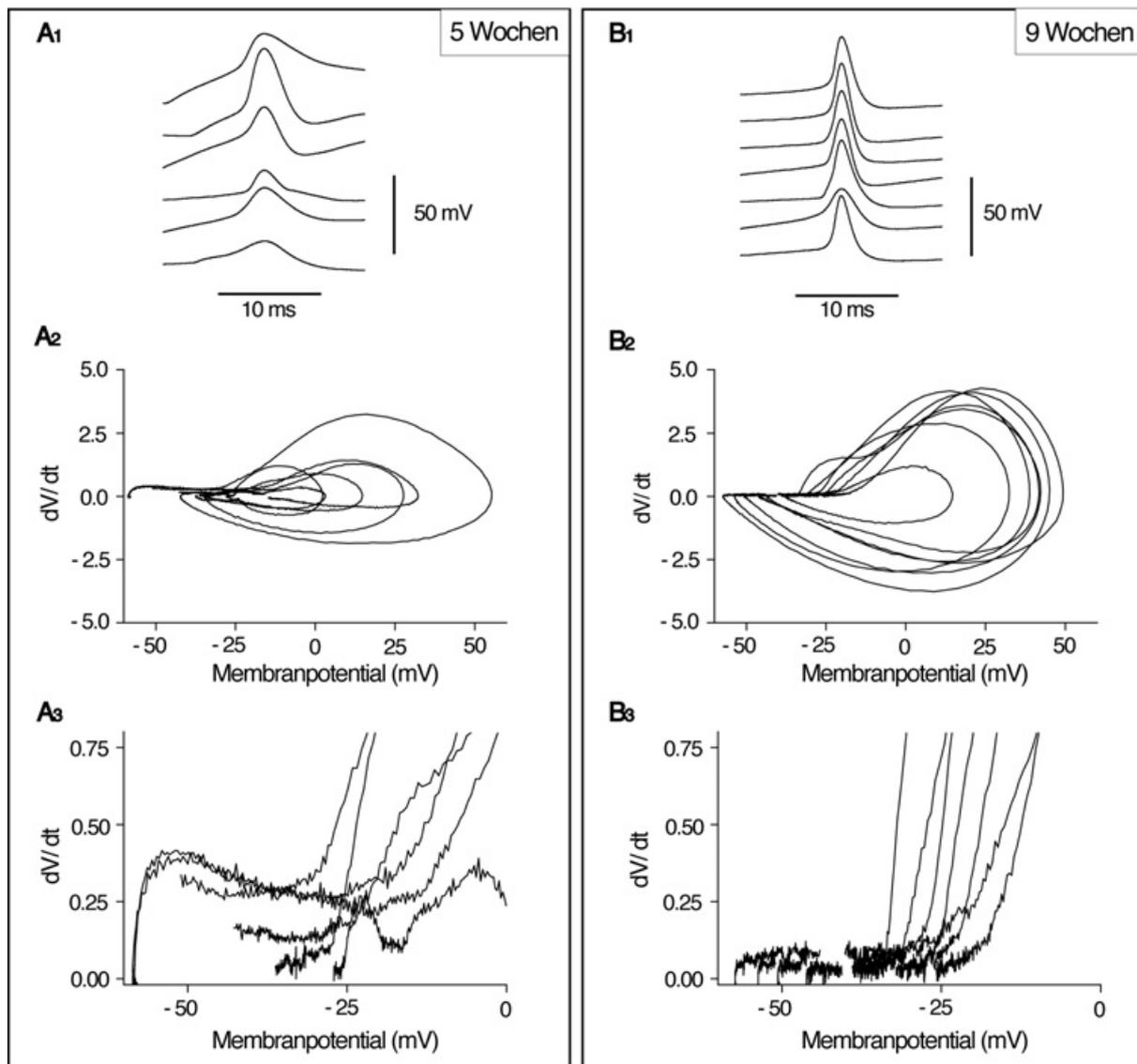


Abb. 3.21: Charakterisierung der Aktionspotentiale L1-positiv-selektierter Neurone nach 5 und 9 Wochen Kokultur mit murinen Astrozyten.

(A₁,B₁) Darstellung der APs 5 bzw. 9 Wochen differenzierter Zellen. (A₂,B₂) Darstellung der Geschwindigkeit der Membranpotentialänderung in Abhängigkeit vom instantanen Membranpotential (phase-plots). Aus diesen lässt sich sowohl die AP-Schwelle als auch die Depolarisations- und Repolarisationsrate ablesen. (A₃, B₃) Zur Verdeutlichung der definierten AP-Schwelle bei 5 und 9 Wochen differenzierten Zellen wurde der entsprechende Bereich in A₂ bzw. B₂ vergrößert.

Dem Auftreten repetitiven Feuerverhaltens in differenzierenden Neuronen liegt nicht nur die Zunahme der Natriumkanaldichte, sondern auch die Entwicklung eines effektiven Repolarisationssystems mit häufig mehreren Kaliumkanaltypen zu Grunde (Pasricha N., Masterarbeit 2007). Dahingehend wurden auch die L1-positiv-selektierten Zellen 9 Wochen nach Differenzierung auf primären murinen Astrozyten untersucht. Die Zellen zeigten sowohl einen schnellen transienten Einwärtsstrom als auch komplexe Auswärtsströme (Abb. 3.22 A), die pharmakologisch näher charakterisiert wurden. Der Einwärtsstrom konnte vollständig durch 300 nM TTx (ein Natriumkanal-Inhibitor) blockiert und somit eindeutig als

Natriumstrom (I_{NaT}) identifiziert werden (Abb. 3.22 B). Der verbliebene Auswärtsstrom wurde von 3 mM 4-AP (ein Kaliumkanal-Inhibitor) nur partiell inhibiert (Abb. 3.22 C). Anhand der digitalen Subtraktion konnte gezeigt werden, dass es sich bei der 4-AP-sensitiven Komponente um den transienten, vollständig inaktivierenden Anteil (I_A) handelt (Abb. 3.22 D). Bei der anderen Komponente, die langsam aktiviert und nicht inaktiviert, handelt es sich sehr wahrscheinlich um den sog. „Delayed Rectifier“ (I_K oder I_{DR}). In der Abb. 3.22 E sind die Strom-Spannungs-Abhängigkeit der beiden Auswärtsstromkomponenten gezeigt. Die Untersuchungen der passiven und aktiven Membraneigenschaften zeigte eine deutliche Entwicklung von L1-selektierten hESC-NSC-abgeleiteten Neuronen, die jedoch nach 9 Wochen in Kultur noch nicht abgeschlossen erscheint.

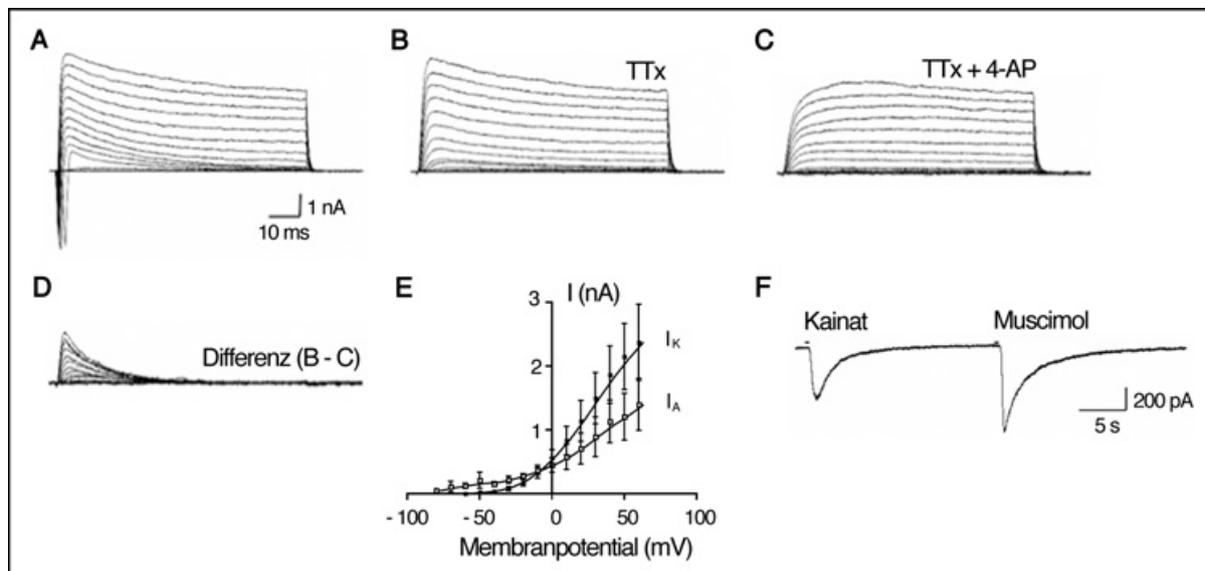


Abb. 3.22: Spannungsabhängige und Transmitter-induzierte Ströme L1-positiv-sortierter Zellen.

7 Tage vordifferenzierte und über das Zelladhäsionsmolekül L1 mittels FACS sortierte Zellen wurden direkt nach FACS auf primäre murine Astrozyten plattiert und für 9 Wochen unter Wachstumsfaktorentzug weiterkultiviert. (A-D) Ganzzellstrommuster eines 9 Wochen differenzierten L1-positiven Neurons. (A) Die Zellen zeigten schnelle transiente Einwärts- sowie große, nur teilweise inaktivierende Auswärtsströme. (B) Blockade des Einwärtsstroms durch 300 nM TTx. (C) Inhibition eines Teiles des Auswärtsstromes durch 3 mM 4-Aminopyridin (4-AP). (D) Die Subtraktion der Stromspuren in B und C zeigt, dass 4-AP die inaktivierende Komponente des Auswärtsstroms selektiv blockiert. (E) Strom-Spannungs-Abhängigkeit der beiden Auswärtsstromkomponenten. (F) Applikation von spezifischen Transmitter-Rezeptor-Agonisten Kainat und Muscimol zeigt eine Expression von funktionalen AMPA/Kainat- und $GABA_A$ -Rezeptoren auf L1-positiven Neuronen.

Neben den intrinsischen Eigenschaften ist die Fähigkeit zur Kommunikation eines Neurons mit anderen Nervenzellen, d.h. die Ausbildung synaptischer Verbindungen, von grundlegender Bedeutung. In den hier untersuchten neuronalen Kulturen konnten jedoch keinerlei synaptische Ströme detektiert werden. Um zumindest die Fähigkeit der Expression von Neurotransmitterrezeptoren zu untersuchen, wurden selektive Agonisten für

AMPA/Kainat- (100 μ M Kainat) und GABA_A-Rezeptoren (100 μ M Muscimol) lokal appliziert und die resultierenden Ströme aufgezeichnet (Abb. 3.22 F). Beide Agonisten waren in der Lage, in allen untersuchten Zellen einen signifikanten Einwärtsstrom auszulösen. Somit kann die Expression der entsprechenden Rezeptoren angenommen werden, deren Lokalisation jedoch nicht auf Synapsen beschränkt sein muss. Für dahingehende Untersuchungen wurde die Transplantation der L1-positiven Zellen auf hippocampale Schnittkulturen herangezogen.

3.2.2.5.2 Differenzierung und Ausbildung von Synapsen L1-positiver Zellen nach *in vitro* Transplantation auf hippocampale Schnittkulturen

Um L1-positive Zellen bezüglich der Ausbildung synaptischer Kontakte zu untersuchen, wurden hESC-NSCs mit einem mRFP- oder EGFP-Konstrukt transduziert und durch FACS angereichert (Abb. 3.23 A, B). EF1 α -mRFP transduzierte hESC-NSCs zeigten eine homogene mRFP-Fluoreszenz nach FACS-Anreicherung (Abb. 3.23 B, Lebendaufnahme).

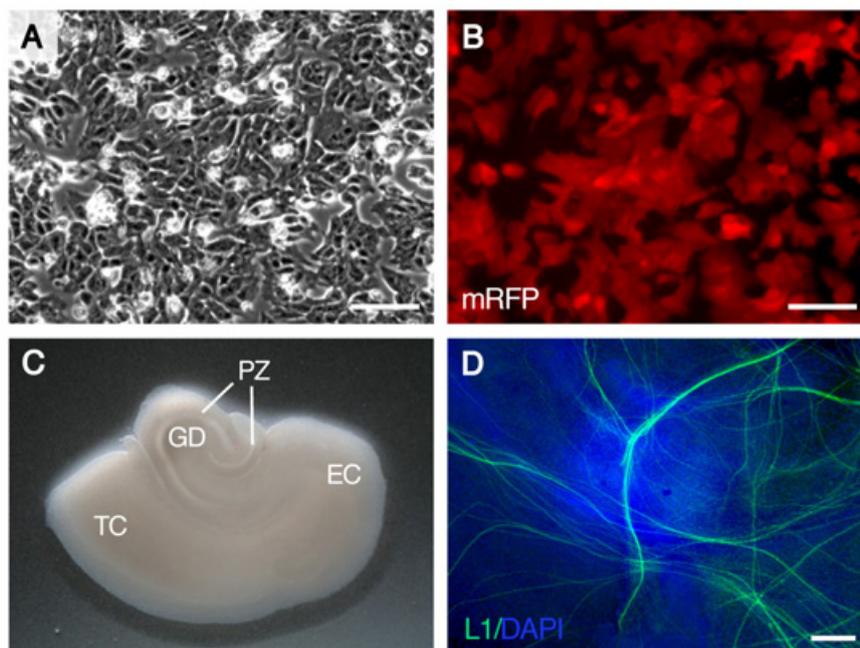


Abb. 3.23: Morphologie L1-positiver Neurone auf hippocampale Schnittkulturen.

EF1 α -mRFP-transduzierte hESC-NSCs wurden über FACS angereichert und 7 Tage unter Wachstumsfaktorentzug vordifferenziert. Nach L1-Immunoisolierung wurden die jungen Neurone auf hippocampale Ratten-Schnittkulturen transplantiert und nach 3 Wochen elektrophysiologisch untersucht. (A) Phasenkontrastbild von mRFP-transduzierten und FACS-angereicherten proliferativen hESC-NSCs. (B) Nach FACS-Anreicherung zeigten EF1 α -mRFP-transduzierte hESC-NSCs (Lebendaufnahme) eine homogene mRFP-Fluoreszenz. (C) Ein 400 μ m dicker Schnitt einen Tag nach Explantation. Der Gyros dentatus (GD), die Pyramidal-Zellschicht (PZ), der entorhinale Cortex (EC) und die sich anschließende Region des temporalen Cortex (TC) sind gut zu erkennen. (D) Neuronale Verzweigungen L1-exprimierender Zellen (grün) auf einem hippocampalen Gehirnschnitt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken A, B: 100 μ m; E: 200 μ m.

Nach L1-basierter Immunoisolierung 7 Tage nach Wachstumsfaktorentzug wurden die L1-positiv-sortierten Zellen auf hippocampale Ratten-Schnittkulturen transplantiert (Abb. 3.23 C). Durch Antigen-Färbung konnte gezeigt werden, dass L1-exprimierenden Zellen (grün) 3 Wochen nach Transplantation neuronale Verzweigungen auf hippocampalen Gehirnschnitten ausbildeten (Abb. 3.23 D). Elektrophysiologische Untersuchungen erfolgten ebenfalls 3 Wochen nach *in vitro* Transplantation.

Es zeigte sich, dass von den 5 untersuchten Zellen 4 in der Lage waren repetitive APs bei länger andauernder (1 s) Strominjektion zu feuern (Abb. 3.24 C). Die in Abbildung 3.24 C dargestellten Spuren stammen von einer einzelnen Zelle, die allerdings durch unterschiedlich große Strominjektionen ausgelöst wurden. Die Stimulation ist in der untersten Zeitlinie dargestellt. Das Feuerverhalten dieser auf hippocampale Ratten-Schnittkulturen transplantierten L1-positiv-sortierten Zellen ist fortgeschrittener als bei den L1-positiv-sortierten Zellen in Kokultur mit murinen Astrozyten (vgl. Abb. 3.20 E).

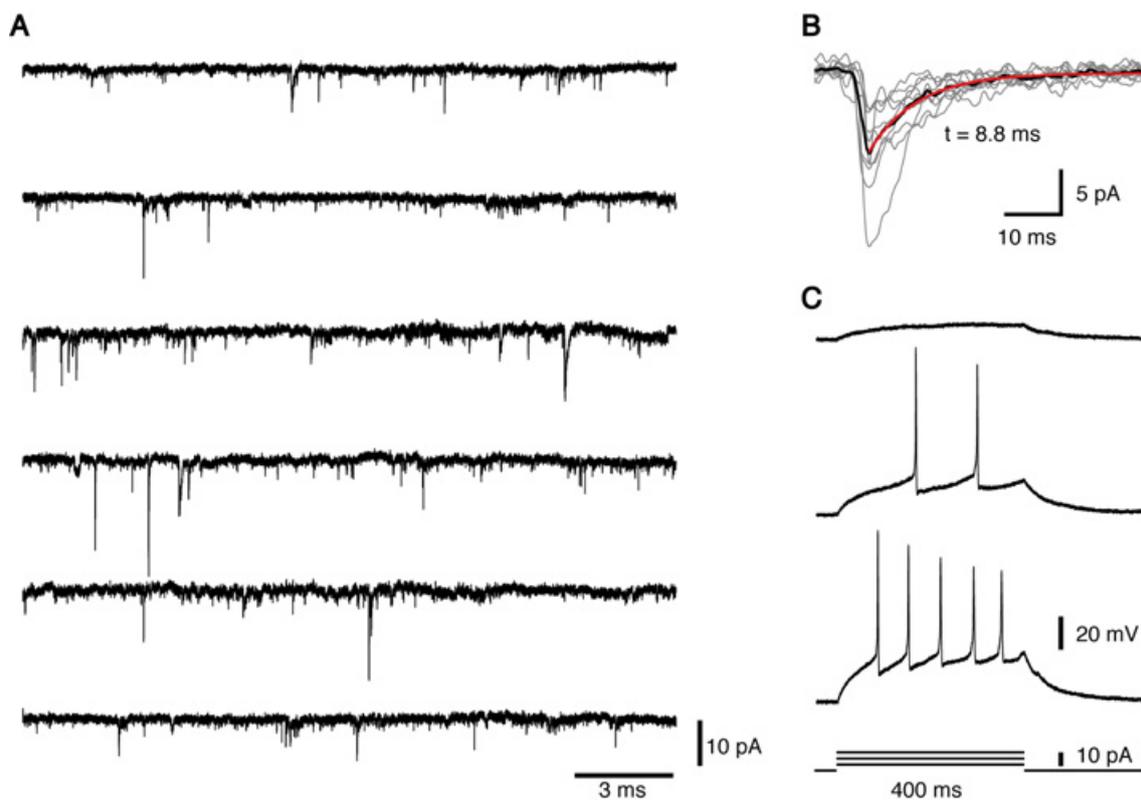


Abb. 3.24: Physiologie L1-positiver Neurone auf hippocampalen Schnittkulturen.

(A) Spontane postsynaptische Ströme (EPSCs) L1-positiv-sortierter Zellen 3 Woche nach Transplantation. (B) Vergrößerte Darstellung von 10 einzelnen EPSCs (grau) L1-positiv-sortierter Zellen, sowie eines Mittelwertes (schwarz) mit zugehörigem Exponential-Fit (rot) zur Ermittlung der Abklingzeitkonstante (τ), die typisch für glutamatergen Input ist. (C) 3 Wochen nach Transplantation feuern L1-positiv Neurone repetitive APs.

In 3 dieser Zellen konnten darüber hinaus spontane postsynaptische Ströme (EPSCs) bei einem Haltepotential von -70 mV detektiert werden (Abb. 3.24 A). Eine vergrößerte

Darstellung in Abbildung 3.24 B zeigt 10 einzelne EPSCs (grau), sowie einen Mittelwert (schwarz) mit zugehörigem Exponential-Fit (rot) zur Ermittlung der Abklingzeitkonstante (τ). Die Abklingzeitkonstante ist relativ Rezeptorspezifisch. So zeigte ein Großteil dieser Ströme eine schnelle Kinetik (8 ms), die für AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme typisch ist und damit für einen glutamatergen Eingang spricht. Weit seltener wurden langsamere Ströme detektiert, die möglicherweise durch NMDA-Rezeptoren vermittelt wurden.

3.3 Direkte neurale Konvertierung von hESCs

Die L1-immuno-basierte Selektion von hESC-NSCs führte zur erfolgreichen Anreicherung junger Neurone (vgl. 3.2.2). Die neurale Differenzierung hESCs und damit die Herstellung neuraler Vorläuferzellen erfolgt in der Regel über die Bildung von Emryoidkörpern (vgl. 2.3.3). Da es sich hierbei um eine zeitaufwendige Methode handelt, wurde untersucht, ob Neurone auch direkt aus adhärenz neural differenzierten hESCs gewonnen und über das Zelladhäsionsmolekül L1 aufgereinigt werden können. Die hESCs wurden dafür in einem Differenzierungsmedium (N2B27-Medium, 1:1 DMEM:F12 und Neurobasalmedium, sowie N2 und B27 Supplement) direkt und adhärenz in Gegenwart von Noggin in der Zellkulturschale neural differenziert (direkte neurale Konvertierung). Indem Noggin den BMP-Signalweg (BMP: Bone Morphogenic Protein) inhibiert, wird die Anreicherung neuraler Zellpopulationen gefördert (Gerrard *et al.*, 2005).

Wiederum für die Anreicherung neuronaler Zellen ist u.a. der Notch-Signaltransduktionsweg von Interesse. In vielen verschiedenen Zelltypen wird der Notch-Signaltransduktionsweg zur Kommunikation der Zellen untereinander und damit auch zur Regulation der Differenzierung verwendet. Notch unterstützt das Überleben und die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (Lowell *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2009). Um junge Neurone direkt aus hESCs über L1-basierte Immunoselektion zu gewinnen, wurde nach der anfänglichen neuronalen Induktion (Zugabe von Noggin) der Notch-Signalweg selektiv durch Zugabe des Notch-Signalweg-Inhibitors N-[(3,5-Difluorphenyl)acetyl]-[L-alanyl-2-phenyl]-glycine-1,1-dimethylethyl-ester (DAPT) blockiert, um die neuronale Differenzierung zu unterstützen (Abb. 3.25).

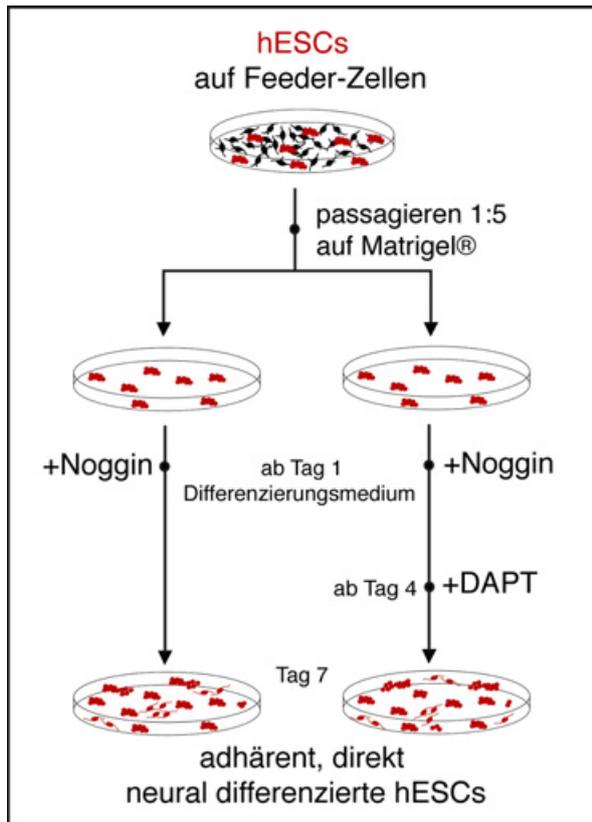


Abb. 3.25: Übersicht der direkten neuronalen Konvertierung von hESCs.

Die adhärenz, direkte neuronale Konvertierung von hESCs erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen. hESC-Kulturen wurden zunächst auf mit Matrigel® beschichteten Schalen plattiert. Am nächsten Tag wurden die hESCs in Gegenwart von Noggin in einem N2B27-Medium differenziert. Ein Teil der differenzierenden hESCs erhielten ab Tag 4 der neuronalen Konvertierung zusätzlich DAPT.

3.3.1 Charakterisierung direkt konvertierter hESCs

Für die direkte neuronale Konvertierung wurden hESCs (Zelllinie H9) auf einer Matrigel®-Beschichtung Feeder-frei kultiviert. Die unter Zugabe von Noggin und ohne Wachstumsfaktoren neural differenzierten hESCs (+Noggin/-DAPT) wurden nach 7 Tagen untersucht. Ein Teil der unter Wachstumsfaktorentzug und Noggin kultivierten hESCs wurde zusätzlich ab Tag 4 der Differenzierung für die verbliebenen 3 Tage mit DAPT (+Noggin/+DAPT) behandelt und ebenfalls analysiert (vgl. Abb. 3.25). Die Expression von Pluripotenz- und Differenzierungs-assoziierten Markern, sowie die L1-Expression wurden immunzytoschemisch untersucht und durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 3.26). Bei der Analyse der durchflusszytometrischen Daten konnten verbliebene Feederzellen, tote Zellen sowie Zellfragmente, die eine Autofluoreszenz aufwiesen, anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtparametern von den hESC-Populationen getrennt werden. Zwei repräsentative Histogramme durchflusszytometrischer Daten sind in der Abbildung 3.26 B und C zu sehen. Rote Histogramme entsprechen dabei Negativkontrollen, blaue Histogramme stellen Färbungen auf den neuronalen Differenzierungsmarker SSEA-1 dar.

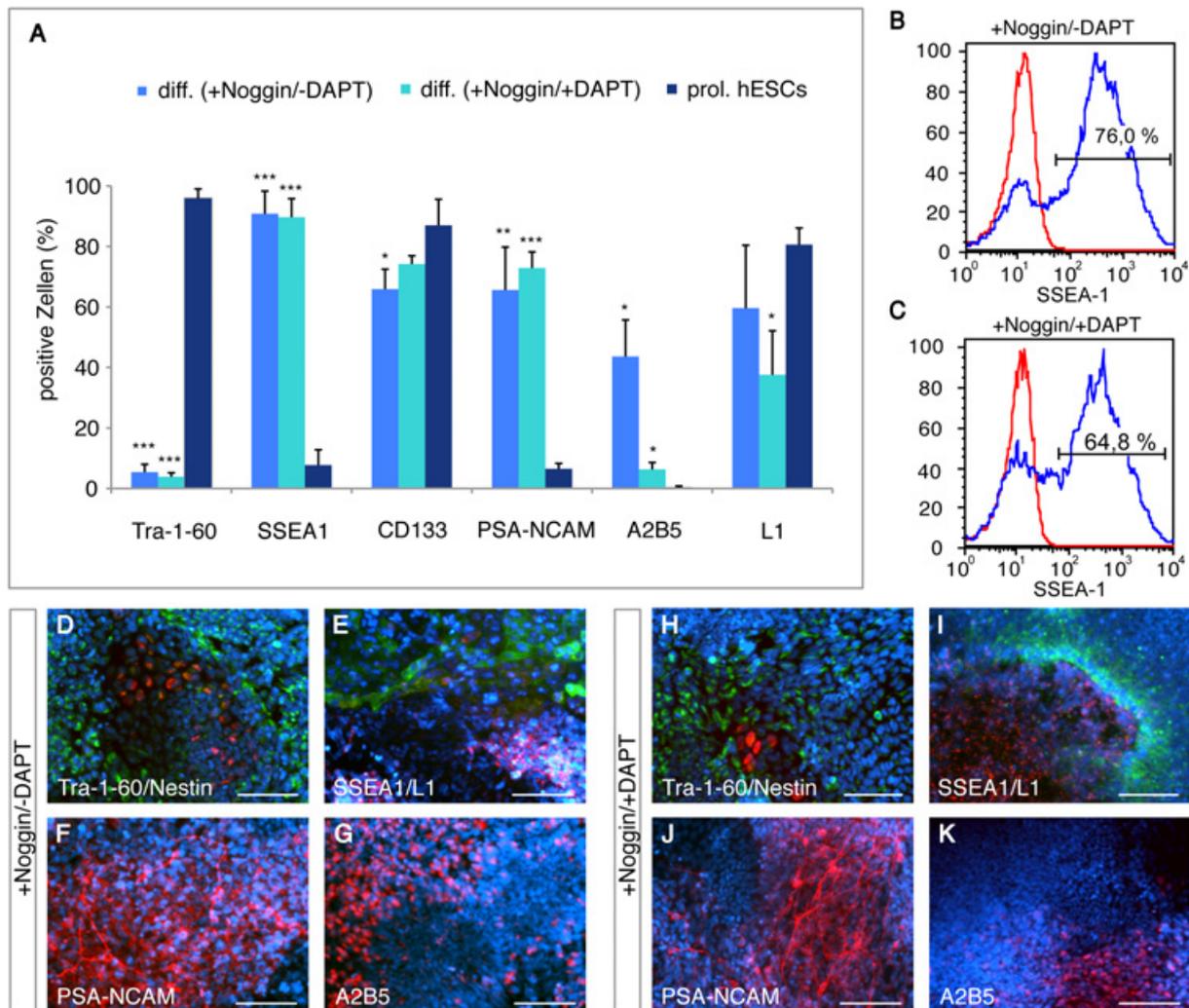


Abb. 3.26: Immunzytochemische Charakterisierung adhären neural differenzierter hESCs.

(A) Durchflusszytomtrische Quantifizierung der Tra-1-60-, SSEA1-, CD133-, PSA-NCAM, A2B5 und L1-Expression direkt konvertierter hESCs im Vergleich zu nicht-differenzierten hESCs. Zur Darstellung der durchflusszytomtrischen Daten wurden verbliebene Feederzellen und tote Zellen mittels Gating nach Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht-Eigenschaften sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. (B-C) Repräsentative durchflusszytomtrische Daten: rote Histogramme entsprechen Negativkontrollen, blaue Histogramme stellen Färbungen des SSEA-1 Markers dar. (D-K) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der direkt konvertierten hESC-Populationen für Tra-1-60 (D, H; rot), SSEA1- (E, I; rot), Nestin (D, H; grün), PSA-NCAM (F, J; rot), A2B5 (G, K; rot) und L1 (E, I; grün). Immunfluoreszenzbilder und durchflusszytomtrische Daten zeigen hESCs der Linie H9. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Maßstabsbalken: 100 μ m. * Signifikanz: $p \leq 0,05$; *** Signifikanz: $p \leq 0,001$.

In proliferierenden hESC-Populationen konnte für $95,9 \pm 3,1$ % der Zellen eine Tra-1-60 Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.26 A). Im Gegensatz dazu waren $5,4 \pm 2,7$ % (+Noggin/-DAPT) bzw. $4 \pm 1,3$ % (+Noggin/+DAPT) der 7 Tage adhären differenzierten hESCs positiv für den Pluripotenz-Marker Tra-1-60 (Abb. 3.26 A, D, H). Die mit Noggin behandelten hESCs exprimierten nach der 7-tägigen Differenzierung zu $90,8 \pm 7,5$ % SSEA-1 (Differenzierungsmarker für hESCs; Abb. 3.26 A, E) und zeigten eine hohe Nestin ($67,7 \pm 1,7$ %; Abb. 3.26 A, D), CD133 ($65,9 \pm 6,6$ %; Abb. 3.26 A), PSA-NCAM ($65,6 \pm 14,2$ %; Abb. 3.26 A, F), A2B5 ($43,6 \pm 12,1$ %; Abb. 3.26 A, G) sowie L1-Expression

($59,6 \pm 20,8$ %; Abb. 3.26 A, E), wobei Nestin, PSA-NCAM und A2B5 neurale Vorläufer-/Stammzellen und CD133 sowohl neurale Vorläufer-/Stammzellen als auch andere Stammzellen kennzeichnen.

Ein ähnliches Expressionsprofil wurde auch für die mit Noggin und DAPT behandelten Zellen festgestellt. Nach 7-tägiger Differenzierung exprimierten $89,7 \pm 6,1$ % dieser Zellen SSEA-1 (Abb. 3.26 A, I), $69,7 \pm 13,4$ % Nestin (Abb. 3.26 A, H), $74,2 \pm 2,7$ % CD133 (Abb. 3.26 A), $72,9 \pm 5,3$ % PSA-NCAM (Abb. 3.26 A, J), $6,3 \pm 2,3$ % A2B5 (Abb. 3.26 A, K) und $37,6 \pm 14,5$ % das Zelladhäsionsmolekül L1 (Abb. 3.26 A, I). Im Vergleich zu hESC-Kulturen, die mit Noggin differenziert wurden ($43,6 \pm 12,1$ % A2B5-positive Zellen), zeigten hESC-Populationen, die in Gegenwart von Noggin und DAPT differenziert wurden, eine signifikant geringere Anzahl A2B5-exprimierender Zellen ($6,3 \pm 2,3$ %). Bezüglich anderer untersuchter Marker konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Noggin behandelten Zellen sowie den mit Noggin und DAPT differenzierten hESC-Kulturen festgestellt werden.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zeigte, dass die proliferierenden hESCs (Kontrolle) im Vergleich zu den neural differenzierten Populationen mit $7,7 \pm 3,2$ % eine signifikant geringere Expression des Differenzierungs-assoziierten Markers SSEA-1 aufwies (Abb. 3.26 A). Des Weiteren exprimierten hESCs ebenso wie die differenzierten hESCs zu einem hohen Prozentsatz CD133 ($87 \pm 8,6$ %). PSA-NCAM ($6,5 \pm 1,8$ %) und A2B5 ($0,5 \pm 0,4$ %) wurden hingegen von nicht-differenzierten hESCs signifikant geringer exprimiert. Mit $80,6 \pm 5,5$ % war die Anzahl der L1-exprimierenden Zellen in proliferierenden hESC-Kulturen deutlich größer als in den neural differenzierten Zellpopulationen in Gegenwart von Noggin bzw. Noggin und DAPT (Abb. 3.26 A).

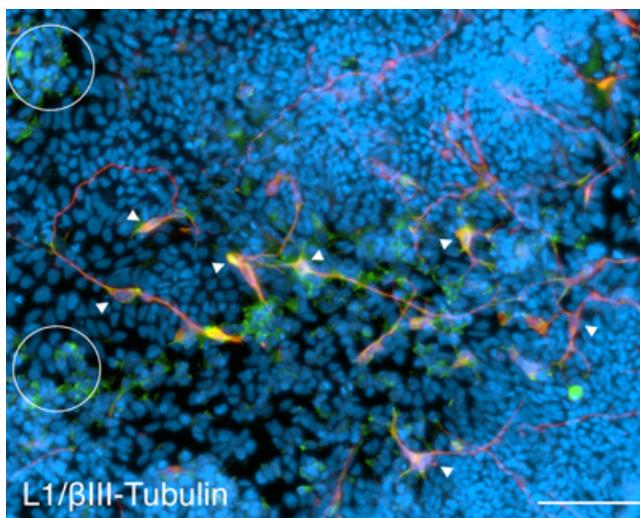


Abb. 3.27: Expression von L1- und β III-Tubulin in adhären neural differenzierten hESCs.

Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme der in Gegenwart von Noggin direkt konvertierten hESC-Populationen für β III-Tubulin (rot) und L1 (grün). Weiße Pfeilspitzen: L1- und β III-Tubulin-koexprimierende Zellen. Weiße Kreise: L1 exprimierende Zellen, die β III-Tubulin-negativ sind und keine neuronale Morphologie aufweisen. Maßstabsbalken: 100 μ m.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass differenzierte hESC-NSCs eine 100%ige Koexpression von L1 und dem neuronalen Marker β III-Tubulin aufwiesen (vgl. 3.2.2.1.2). In adhärenz differenzierten hESCs konnte hingegen immunzytochemisch festgestellt werden, dass einige der L1-positiven Zellen nicht β III-Tubulin-positiv waren (Abb. 3.27, weiße Kreise). Diese L1-positiven und β III-Tubulin-negativen Zellen wiesen auch keine neuronale Morphologie auf.

In 7 Tage differenzierten hESC-Kulturen (+Noggin/-DAPT bzw. +Noggin/+DAPT) wurde korrespondierend zu den immunzytochemischen (mittels Durchflusszytometrie) Daten mittels qRT-PCR eine signifikant geringere Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker Oct-4 und Nanog im Vergleich zu proliferierenden hESCs nachgewiesen (Abb. 3.28 A). Im Zuge der neuronalen Differenzierung konnte ebenfalls eine verminderte Expression des extraembryonalen endodermalen Markers GATA6 festgestellt werden. Die immunzytochemisch beobachtete geringere Expression von L1 nach Differenzierung konnte bestätigt werden. Demgegenüber wurde eine erhöhte Expression des Pax6-Gens, welches hESC-abgeleitete neurale Zellen kennzeichnet, in den differenzierten Kulturen nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Sox2-Genexpression neural differenzierter und proliferierender hESCs wurde nicht nachgewiesen. Von Sox2 ist bekannt, dass es sowohl von pluripotenten hESCs als auch von neuronalen Vorläufer-/Stammzellen exprimiert wird. Nach 7 Tagen konnte zwischen den mit Noggin behandelten direkt konvertierten hESCs und den in Gegenwart von Noggin und DAPT differenzierten hESCs kein signifikanter Unterschied in der Genexpression der untersuchten Marker festgestellt werden (Abb. 3.28 A). Die erhobenen Daten wurden nach der $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen (18S) sowie auf Daten, die für nicht-differenzierte, proliferierende hESCs gewonnen wurden, bezogen. Für die qRT-PCR wurden human-spezifische Primer verwendet, die hESC-Transkripte spezifisch amplifizieren. Neben durchflusszytometrischen und qRT-PCR-Analysen konnte die Reduktion der L1-Expression in neural differenzierten hESCs im Vergleich zu proliferierenden hESCs zusätzlich mittels Western Blot gezeigt werden. Proliferierende hESCs zeigten eine deutlich stärkere L1-Proteinexpression als differenzierte hESC-Kulturen (Abb. 3.28 B). Zwei L1-Fragmente von 180 und 200 kDa waren sowohl in proliferierenden hESCs als auch in den beiden neural konvertierten Zellproben detektierbar. In hESCs konnte ebenso wie in differenzierten hESCs eine leichte Expression von β III-Tubulin (60 kDa) nachgewiesen werden, was auf eine neuronale Spontandifferenzierung der Zelllinie H9 hindeutet. Auf Proteinebene konnte jedoch hinsichtlich der β III-Tubulin-Expression zwischen den mit

Noggin (diff. +Noggin/-DAPT) und den mit Noggin und DAPT (diff. +Noggin/+DAPT) neural differenzierten hESCs kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.28 B).

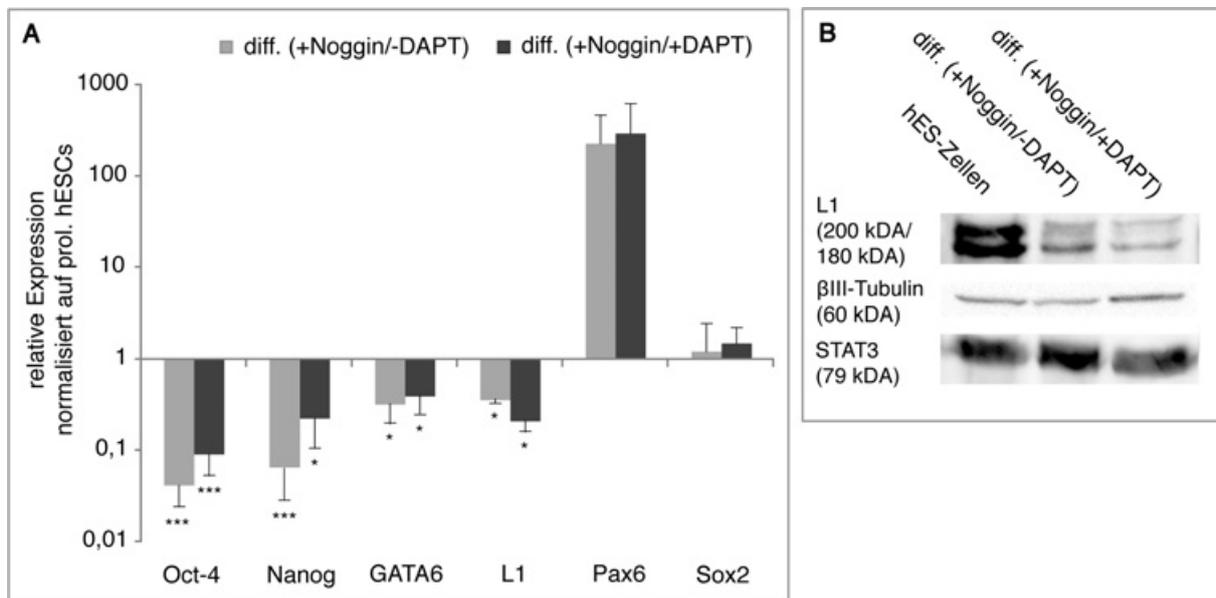


Abb. 3.28: Charakterisierung der adhären neural differenzierten hESCs über qRT-PCR und Western Blot.

(A) Quantitative RT-PCR-Untersuchungen adhären differenzierter hESCs zur Expression der Pluripotenzmarker Oct-4 und Nanog, des extraembryonalen Endoderm-Markers GATA6-Gens sowie L1, Pax6 und Sox2. Die differenzierten hESCs (+Noggin/-DAPT und +Noggin/+DAPT) zeigten eine signifikante Herunterregulierung von Oct-4, Nanog und GATA6 und L1. Der neurale Marker Pax6 wurde hingegen in beiden adhären neural differenzierten hESC-Populationen deutlich hochreguliert (nicht signifikant). Zwischen den mit Noggin behandelten neural konvertierten hESCs und den mit Noggin und DAPT differenzierten hESCs konnte hinsichtlich der untersuchten Marker kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die erhobenen Daten wurden nach der $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen (18S) sowie auf Daten, die für nicht-differenzierte, proliferierende hESCs (prol hESC) gewonnen wurden, bezogen. (B) Western Blot Analysen der Expression von L1 und βIII-Tubulin in hESC-Kulturen. 20 μg Protein aus humanem Gehirngewebe wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Für die Proben +Noggin/-DAPT und +Noggin/+DAPT wurde jeweils 40 μg Protein aufgetragen. Dargestellt sind Daten der hESC-Linie H9. * Signifikanz: $p \leq 0,05$; *** Signifikanz: $p \leq 0,001$.

Um die Expression von L1 in proliferierenden hESCs zu bestätigen, wurden weitere hESC-Linien (H9.2, I3 und I6) auf Matrigel® kultiviert und anschließend auf ihre L1-Expression untersucht. Western Blot Analysen zeigten eine L1-Proteinexpression in allen hESC-Linien (Abb. 3.29 B). Des Weiteren konnte eine schwache Expression des neuronalen Markers βIII-Tubulin in allen hESC-Linien festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass unter den gewählten Kulturbedingungen die hESC-Linien einer minimalen neuronalen Spontandifferenzierung unterliegen. Besonders ausgeprägt zeigte sich die spontane Differenzierung in βIII-Tubulin-exprimierende Neurone an der Zelllinie H9.2. Auch die L1-Expression war in der Zelllinie H9.2 deutlich stärker ausgeprägt (Abb. 3.29 A, B). Diese Daten lassen vermuten, dass die beobachtete Expression von L1 in proliferativen hESC-

Kulturen weitestgehend auf das Vorhandensein spontan differenzierter Neurone zurückzuführen ist.

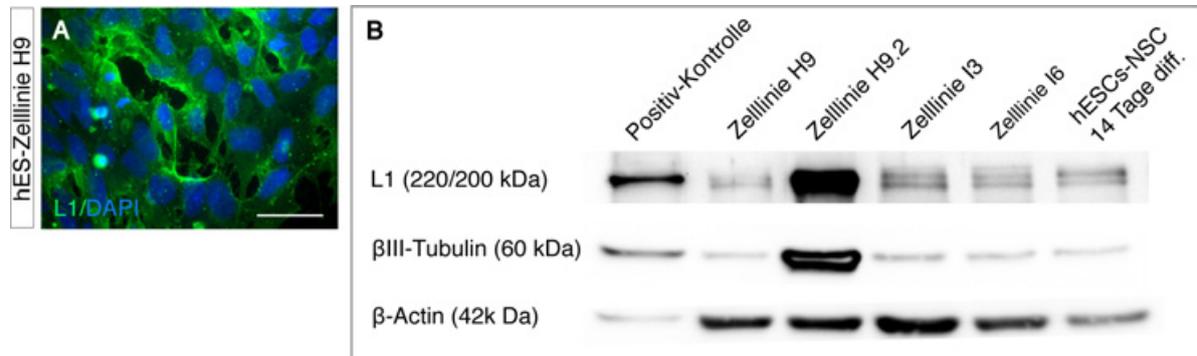


Abb. 3.29: Expression des Zelladhäsionsmolekül L1 in hESCs.

Immunzytochemie (A) und Western Blot Analysen (B) zur Expression von L1 und β III-Tubulin in den hESC-Linien H9, H9.2, I3 und I6. Als Positiv-Kontrollen wurde 20 μ g Protein aus humanem Gehirngewebe und 20 μ g neuronal differenzierter hESC-NSCs, die 14 Tage unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert worden waren, verwendet. Für die Proben +Noggin/-DAPT und +Noggin/+DAPT wurde jeweils 40 μ g Protein aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle wurde Proteinlysate aus humanem Gehirngewebe und 14 Tage differenzierte hESC-NSCs verwendet. (A) Repräsentativer immunzytochemischer Nachweis der L1-Expression in hESCs (Zelllinie H9). Maßstabsbalken A: 100 μ m.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die über Noggin und DAPT differenzierten hESCs eine Abnahme in der Expression von Pluripotenz-assoziierten Markern (Tra-1-60, OCT-4 und Nanog), eine erhöhte Expression des hESC-Differenzierungs-assoziierten Markers SSEA-1 sowie eine erhöhte Expression von Markern (Nestin, CD133, PSA-NCAM und A2B5) aufweisen, die neurale Vorläufer-/Stammzellen kennzeichnen. Das Zelladhäsionsmolekül L1 wird in unter proliferierenden Bedingungen kultivierten hESC-Kulturen stärker exprimiert als in den adhärenz neural differenzierten Kulturen. Daher scheint eine Aufreinigung von Neuronen aus direkt adhärenz differenzierten hESCs basierend auf dem Zelladhäsionsmolekül L1 nicht geeignet.

4. DISKUSSION

4.1 Gewinnung hESC-abgeleiteter neuraler Stammzellen (hESC-NSCs)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten hESC-abgeleitete neurale Stammzellen (hESC-NSCs) gewonnen, und bei Erhalt ihrer charakteristischen Marker-Expression stabil und über längere Zeiträume hinweg (> 100 Passagen) kultiviert werden. Hiermit wurde die Voraussetzung für eine effektive Linienselektion hESC-abgeleiteter Neurone geschaffen.

Eine Reihe verschiedener Differenzierungsmethoden, welche die Gewinnung hESC-abgeleiteter Populationen ermöglichen, wurden bereits publiziert (Keller, 1995; Ying *et al.*, 2003; Gerrard *et al.*, 2005; Benzing *et al.*, 2006; Dhara *et al.*, 2008). Sie basieren überwiegend auf der Bildung von sog. Embryoid-Körperchen (EBs), aber auch auf der Kokultur mit anderen Zelllinien oder auf der sogenannten adhärennten, direkten Konvertierung. Die Differenzierung von hESCs in neurale Zellpopulationen lässt sich durch bestimmte Kultivierungsbedingungen beeinflussen. Zhang *et al.* (2001), Reubinoff *et al.* (2001), Carpenter *et al.* (2001) und Li *et al.* (2006) konnten zeigen, dass es möglich ist, neurale Vorläuferzellen aus hESCs *in vitro* zu gewinnen, weiter zu kultivieren und in die drei Hauptzelltypen des Nervensystems (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) zu differenzieren. HESCs wurden auch hierfür zunächst zu EBs aggregiert, in denen sie spontan in Derivate aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) differenzieren können. Die Gewinnung neuraler Stammzellen (NSCs) aus hESCs konnten Elkabetz *et al.* (2008) und Koch *et al.* (2009) zeigen. Die NSCs konnten über einen längeren Zeitraum propagiert und in Neurone und Gliazellen differenziert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die neurale Differenzierung der hESCs und damit die Gewinnung von hESC-abgeleiteter NSCs (hESC-NSCs) unter Verwendung eines EB-basierten Differenzierungsprotokolls nach Zhang *et al.* (2001) und Koch *et al.* (2009). Die für diese Arbeit generierten hESC-NSCs wurden in einer adhärennten Monolayerkultur in Gegenwart von FGF-2, EGF und B27 (N2-haltiges Proliferationsmedium) propagiert (Koch *et al.*, 2009). Unter diesen Bedingungen entstand eine homogene Zellpopulation, die in der Kulturschale Rosetten-ähnliche Muster formte. Diese Zellen konnten extensiv (> 100 Passagen) bei Erhalt ihrer morphologischen Eigenschaften und charakteristischen Markerexpression propagiert und differenziert werden. Neurale Vorläuferzellen bzw. Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und durch ihr

multipotentes Differenzierungspotenzial in Neurone und Gliazellen aus (Carpenter *et al.*, 2001; Reubinoff *et al.*, 2001; Itsykson *et al.*, 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten hESC-NSCs zeigten auf mRNA-Ebene eine Telomerase-Expression, ein Merkmal für höchstproliferative Zellen mit Selbsterneuerungspotential und Stammzellcharakter. Die hESC-NSCs zeigten in Gegenwart von FGF-2 eine stabile Proliferationsrate. Flax *et al.* (1998) konnten zeigen, dass neurale Vorläuferzellen, die aus dem sich entwickelnden humanen Gehirn generiert wurden, eine starke Sensitivität zu FGF-2 aufwiesen. Der FGF-Signalweg scheint hinsichtlich der neuralen Spezifizierung während der frühen embryonalen Entwicklung zwei Rollen zu spielen: zum einen können FGF-Moleküle ein „Pro“- neurales Schicksal im frühen Entwicklungsstadium induzieren und zum anderen die neurale Identität stabilisieren, indem sie als Antagonisten des BMP-Signalweges agieren (Mason *et al.*, 2007). Hierbei sei erwähnt, dass mehrere Signalwege (EGF, WNT, TGF β , FGF) wichtig für die Proliferationserhaltung von neuronalen Vorläufer- und Stammzellen sind. Dass es möglich ist, hESC-abgeleitete neurale Population in Gegenwart von FGF-2 und EGF zu propagieren, wiesen Reubinoff *et al.* (2001) nach. So wurde FGF-2 routinemäßig bei der Isolierung und Erhaltung von neuronalen Vorläufer- und Stammzellen eingesetzt (Carpenter *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2006; Elkabetz *et al.*, 2008; Dhara *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten proliferativen hESC-NSC-Kulturen wiesen typische Marker neuraler Vorläufer- und Stammzellen, wie Nestin, Sox2, PSA-NCAM und A2B5, sowie die neuroektodermalen Transkriptionsfaktoren Pax6 und Olig2 auf (Zhang *et al.*, 2001; Reubinoff *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 2001; Elkabetz *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2009). Olig2 spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Entwicklung von Oligodendrozyten als auch Motoneuronen. (Li *et al.*, 2005; Wichterle *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Die hESC-NSCs zeigten ein ähnliches Markerexpressions- und Wachstumsverhalten wie die bei Koch *et al.* (2009) beschriebenen lt-hESNSCs.

Studien belegen, dass Langzeit-propagierete *in vitro* Zellkulturen, insbesondere hESCs sowie hESC-abgeleitete Populationen, chromosomalen Veränderungen, unterworfen sind, die ihnen einen Proliferationsvorteil verschaffen. Draper *et al.* (2004) wiesen nach, dass hESCs während der *in vitro* Kultivierung chromosomale Abberationen zeigen und zu einem hohen Prozentsatz Trisomien der Chromosomen 12 und 17 aufwiesen. Der Karyotyp der in dieser Arbeit gewonnenen hESC-NSC-Kulturen erwies sich jedoch als weitgehend stabil, weniger als 20 % der Zellen waren aneuploid.

Für die hier vorliegende Arbeit war das neuronale Differenzierungspotenzial der hESC-NSCs von besonderem Interesse, da mittels einer Linienselektionsstrategie aus hESC-NSCs eine hochaufgereinigte neuronale Population isoliert werden sollte. Unter Standardbedingungen differenzierten die hier generierten hESC-NSCs in eine Population von β III-Tubulin-, MAP2ab-, GABA- und VGlut1-positiven Neuronen. Der Anteil GABAerger und glutamaterger Neurone war dabei in etwa gleich groß. Hierbei sei allerdings erwähnt, dass bei höheren Passagen der hESC-NSC-Kulturen (> Passage 60) eine höhere Tendenz zur Differenzierung in GABAerge (inhibitorische) Neurone beobachtet werden konnte. Dementsprechend zeigten Koch *et al.* (2009), dass lt-hESNSCs überwiegend in GABAerge Neurone differenzierten und nur zu einem geringen Anteil einen glutamatergen Phänotyp aufwiesen. Unter Verwendung verschiedener Methoden (meist über EB-Bildung und Kokultur) und unterschiedlicher Wachstumsfaktorkonzentrationen konnten verschiedene Subtyp-spezifische Neurone (u.a. dopaminerge Neurone oder Motorneurone) aus ESCs generiert werden (Odorico *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2005; Perrier *et al.*, 2004). Neuronale Zellen, die *in vitro* aus neuronalen Vorläufer-/Stammzellen der Maus differenziert wurden (unabhängig davon, ob sie aus dem Kortex-, dem Striatumgewebe oder aus ESCs abgeleitet wurden), wiesen überwiegend einen GABAergen Phänotyp auf (Conti *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu konnten neurale Stamm-/Vorläuferzellen zu Beginn der *in vitro* Kultivierung meist in Neurone verschiedener Transmitterphänotypen (auch glutamaterge Neurone) differenziert werden (Erceg *et al.*, 2008; Zhang 2006; Studer *et al.*, 1998). Dies lässt zum einen die Vermutung zu, dass die *in vitro* Langzeit-Kultivierung neuraler Zellpopulationen mit Wachstumsfaktoren (FGF-2 und EGF) selektiv die Anreicherung GABAerger Vorläuferzellen fördert. Zum anderen könnte man vermuten, dass diese *in vitro* Kultivierungsbedingungen die regional-spezifische Identität der Vorläufer verändern könnte, wodurch wiederum das Differenzierungspotenzial beeinflusst würde. Daher ist es von besonderer Bedeutung, dass die Identität und das Potential der neuronalen Stamm-/Vorläuferzellen während der *in vitro* Kultur erhalten bleibt. So deuten Studien von Hitoshi *et al.* (2002) und Ostenfeld *et al.* (2002) darauf hin, dass *in vitro* kultivierte neurale Stamm-/Vorläuferzellen ihre regional-spezifische Identität entsprechend ihres Ursprungs (Gehirnregion) beibehalten. Kürzlich erschienene Daten weisen darauf hin, dass neurale Zellen, die in einem frühen Stadium der neuronalen Differenzierung isoliert wurden, einen anterioren Phänotyp aufweisen (Zhang *et al.*, 2006; Elkabetz *et al.*, 2008; Pankratz *et al.*, 2007). Auch die in dieser Arbeit generierten hESC-NSCs zeigten ein regionalspezifisches Transkriptionsprofil, welches für das ventrale, anteriore Hinterhirn

charakteristisch ist (vgl. Koch *et al.*, 2009). Der Mechanismus, welcher der Posteriorisierung der hESC-NSCs unterliegt, ist bisher noch nicht im Detail bekannt. Ein wesentlicher Einfluss könnte hier die Verwendung von FGF-2 für die *in vitro* Kultur der Zellen gewesen sein. Stern (2001) fand heraus, dass FGF-2 einen posteriorisierenden Effekt während der Entwicklung des Nervensystems hat. Die in dieser Arbeit generierten hESC-NSCs behielten jedoch ihre regional-spezifische Identität und ihr Differenzierungspotenzial während der Langzeit-*in vitro*-Kultivierung bei. Im Vergleich zu Koch *et al.* 2009 exprimierten die hESC-NSCs auch geringe Mengen von Vorderhirn-Markern (FoxG1, Emx2, Nkx2.1 und Otx2). Dieses Expressionsprofil könnte demnach dazu geführt haben, dass die hESC-NSCs unter Wachstumsfaktorentzug neben GABAergen auch einen Anteil von glutamatergen Neuronen hervorbrachten.

4.2 Promotor-basierte Linienselektion hESC-abgeleiteter Neurone

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine hochaufgereinigte neuronale Population mittels kontrollierter Differenzierung von hESCs zu NSCs und einem Linienselektions-Verfahren gewonnen werden. Zuerst wurde als selektierbarer Marker ein EGFP-Gen gewählt, welches durch den potentiell neuronal-spezifischen Promotor T α 1-Tubulin exprimiert wurde. Diese Strategie führte jedoch nur zu einer unzureichend aufgereinigten neuronalen Population. Daher wurde eine zweite Strategie entwickelt. Die dabei angewendete Selektion von Neuronen auf der Basis der Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 führte zu hochaufgereinigten neuronalen Populationen und wird in einem späteren Kapitel diskutiert (siehe 4.3).

4.2.1. Verwendbarkeit des T α 1-EGFP-Transgens als selektierbarer Marker für die neuronale Linienselektion

T α 1-Tubulin ist ein Bestandteil von Mikrotubuli, die sich aus Dimeren von α - und β -Tubulin zusammensetzen. Sie sind einer der Hauptkomponenten des Zytoskeletts und in diverse cytosolische Funktionen involviert (vgl. 1.3.1). Während der Entwicklung und Regeneration sind Mikrotubuli ein integraler Bestandteil von auswachsenden Neuriten. Eukaryotische Zellen exprimieren multiple Isotypen von α - und β -Tubulin (Luduena, 1998; Cleveland, 1987; Sullivan, 1988). Evolutionär gesehen sind die Kodierungsregionen der Tubulin-Gene extrem konserviert. Aber nicht alle Gewebe exprimieren die Tubulin-Gene gleichermaßen (Villasante *et al.*, 1986; Sullivan, 1988). Die Expression von Tubulin-Genen, insbesondere die

der β -Tubulin-Gene, unterscheiden sich während der postnatalen Entwicklung von Säugetieren im peripheren und zentralen neuronalen Gewebe (Jiang *et al.*, 1992). Durch Hybridisierungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass der Isotyp α 1-Tubulin vornehmlich in Neuronen des Gehirns exprimiert wird (Mikucki *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1992; Kost *et al.*, 1993). Auch im humanen Organismus wurde eine α -Tubulin (α 1) und eine β -Tubulin Isoform (β III) identifiziert, die nur in Zellen neurologischen Ursprungs vorkommt (Cowan *et al.*, 1983; Hall *et al.*, 1985; Lewis, 1985). Lewis *et al.* (1985) konnten nachweisen, dass die $T\alpha$ 1-Tubulin-mRNA-Expression während der Embryonalentwicklung der Maus sprunghaft ansteigt. So konnte in Northern Blot Untersuchungen an Gehirngewebe von Mäusen gezeigt werden, dass an Embryonaltag E8 keine $T\alpha$ 1-Tubulin-Expression zu finden war, wohingegen an E10 eine maximale Expression von $T\alpha$ 1-Tubulin festgestellt werden konnte. Die Expression von $T\alpha$ 1-Tubulin sank zudem zwischen dem postnatalen Tag P3 und P32 wieder drastisch ab. Miller *et al.* (1987) konnten ein ähnliches $T\alpha$ 1-Tubulin-Expressionsprofil im Gehirn der Ratte nachweisen. Studien mit neugeborenen und adulten Ratten zeigten, dass die Expression von neuronalen Tubulin-Isoformen in sich entwickelnden und reifen Neuronen unterschiedlich ist (Gozes *et al.*, 1978; Wolff *et al.*, 1982; Audebert *et al.*, 1994; Farina *et al.*, 1999). Späte Entwicklungsstadien des Embryos zeigten dabei die höchsten $T\alpha$ 1-Tubulin-Expressionlevel, wobei sich die Expression deutlich innerhalb von 3 Wochen nach der Geburt verminderte (Przyborski *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1987). Hieber *et al.* 1998 konnten zeigen, dass es auch während der Embryonalentwicklung von Fischen zu einer hohen $T\alpha$ 1-Tubulin-mRNA-Expression kam, die nach neuronaler Differenzierung wieder abnahm. Des Weiteren konnte in adulten Tieren unterschiedlicher Spezies gezeigt werden, dass nach Schädigung neuronalen Gewebes eine Induktion der $T\alpha$ 1-Tubulin-Expression erfolgte, die nach Reinnervation wieder absank (Hieber *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1989). Gloster *et al.* (1994 und 1999) lieferte durch Untersuchungen transgener Mäuse zusätzlich einen Einblick in die Dynamik der $T\alpha$ 1-Expression. Bei diesen Mäusen wurde LacZ unter der Kontrolle des $T\alpha$ 1-Tubulin-Promoters exprimiert, wodurch die selektive Expression von $T\alpha$ 1-Tubulin in Neuronen bestätigt werden konnte. Es konnte festgestellt werden, dass das Transgen ($T\alpha$ 1-LacZ-Expression) vermehrt im sich entwickelnden ZNS exprimiert wurde, also dort wo Neurone ein starkes morphologisches Wachstum zeigten (Miller *et al.*, 1987; Gloster *et al.*, 1994). Im Gehirn adulter Tiere hingegen, während es zur postmitotischen neuronalen Ausreifung kommt, wurde die Expression von $T\alpha$ 1-Tubulin wieder herunter reguliert (Miller *et al.*, 1987; Gloster *et al.*, 1994 und 1999). So konnte eine

T α 1-LacZ-Expression im adulten Tier nur noch an wenigen Stellen, wie z.B. im Hippocampus, nachgewiesen werden (Gloster *et al.*, 1994). Dieses Expressionsmuster ähnelte somit stark dem T α 1-Tubulin-mRNA-Expressionsprofil von Wildtyp-Mäusen.

Zusammenfassend zeigen diese publizierten Daten, dass sich entwickelnde Neuronen eine starke T α 1-Tubulin-Expression aufweisen, die nach neuronaler Differenzierung wieder herunter reguliert wird. Im Rahmen von Veränderungen, beispielsweise bei axonalen Schäden, kommt es dann wieder zu einer erneuten Induktion der T α 1-Tubulin-Expression. Diese Befunde lassen den T α 1-Tubulin-Promotor zu einem interessanten Marker für neuronale Linienselektionen werden. Studien zeigen, dass sich der Promotor von T α 1-Tubulin zur Anreicherung einer neuronalen Zellpopulation eignet (Wang *et al.*, 1997). Das grün fluoreszierende Protein (EGFP) kodierende Gen wurde hierbei unter der Kontrolle des T α 1-Tubulin-Promoters in embryonale Zellen des Vorderhirns der Ratte exprimiert. Die anschließende FACS-Selektion ermöglichte die Isolierung von neuronalen Vorläuferzellen. Schmandt *et al.* (2005) konnten durch die kontrollierte Differenzierung von murinen ESCs zu neuronalen Vorläuferzellen, kombiniert mit einem T α 1-EGFP-basierten Linienselektionsverfahren, eine hochaufgereinigte neuronale Population isolieren. Auch aus dem humanen Hippocampus und der humanen adulten Ventrikularzone (VZ) konnten ebenfalls durch die Verwendung von T α 1-Tubulin als gewebespezifischen Promotor neuronale Vorläuferzellen selektiert und angereichert werden (Roy *et al.*, 2000a und 2000b).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte, wie in den vorangegangenen Studien mit Primärzellen und murinen ESCs, eine Expression von T α 1-EGFP in hESC-NSC-abgeleiteten Neuronen nachgewiesen werden. Hierfür wurden vordifferenzierte hESC-NSCs mit dem T α 1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert. Der Vorteil einer transienten gegenüber einer stabilen Transfektion von Zellen ist, dass die Zellen dabei nicht auf Dauer genetisch verändert werden. Dies ist hinsichtlich einer möglichen späteren therapeutischen Anwendung besonders wichtig. Proliferative hESC-NSCs (vgl. 3.1), die transient transfiziert wurden, waren zum größten Teil EGFP-negativ. Erst nach *in vitro* Differenzierung, die durch Wachstumsfaktorentzug induziert wurde, stieg die Anzahl T α 1-EGFP exprimierender Zellen an. An Tag 4 nach Wachstumsfaktorentzug konnte eine maximale Expression von T α 1-EGFP festgestellt werden. In länger differenzierten Kulturen nahm die Anzahl T α 1-EGFP-exprimierender Zellen hingegen wieder ab (Abb. 3.6). Einen ähnlichen Verlauf zeigten die *in vivo* Expressionsdaten von T α 1-Tubulin (Gloster *et al.*, 1999 und 1994; Miller *et al.*, 1989; Hieber *et al.*, 1998). Diese Studien und die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit könnten somit

ein Hinweis darauf sein, dass die Expression von T α 1-EGFP spezifisch in hESC-NSC-Kulturen während der neuronalen Differenzierung reguliert wird. T α 1-Tubulin würde demnach nur in einer frühen Phase der neuronalen Differenzierung exprimiert werden. Die Beobachtung, dass die Anzahl der β III-Tubulin-positiven Neurone, die eine EGFP-Fluoreszenz auswiesen, ebenfalls im Laufe der Differenzierung abnimmt, könnte auch dafür sprechen. Die Abnahme sowie die geringe Anzahl EGFP-positiver Zellen könnte jedoch auch ein durch die transiente Transfektion bedingtes Artefakt sein. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die Anzahl β III-Tubulin-positiver Neurone, die EGFP-koexprimierten abnimmt. Denn bereits vordifferenzierte Zellen, wie β III-Tubulin-positive Neurone, lassen sich schwerer transfizieren als nicht-differenzierte, proliferierende Zellen. Die Anzahl der T α 1-EGFP-positiven Zellen, die β III-Tubulin-koexprimierten, fiel im gewählten Differenzierungszeitraum (1-7 Tage) insgesamt mit durchschnittlich $8,1 \pm 3,1$ % relativ gering aus. Der geringe Prozentsatz lässt zum einen die Vermutung zu, dass zu diesen frühen *in vitro* Differenzierungszeitpunkten T α 1-EGFP nicht exklusiv in bereits neuronal-differenzierten Zellen der hESC-NSC-Kulturen exprimiert wird (vgl. Abb. 3.9). Die Differenzierung von hESC-NSC-Kulturen erfolgt jedoch deutlich langsamer, als die von murinen ESC-abgeleiteten Zellpopulationen (vgl. Schmandt *et al.*, 2005). So kann es durchaus sein, dass die Zellen zwar T α 1-EGFP exprimierten, aber noch nicht β III-Tubulin-positiv waren, weil die T α 1-Expression der β III-Tubulin-Expression zeitlich vorausgeht. Prinzipiell könnte die geringe T α 1-EGFP-Expression innerhalb der neuronalen Population auch damit zusammenhängen, dass die hier verwendete T α 1-Tubulin-Sequenz aus der Ratte nicht alle regulatorischen Abschnitte enthält, die für die Expression von T α 1-Tubulin in humanen Zellen notwendig sind. Obwohl die Kodierungsregionen der Tubulin-Gene evolutionär gesehen extrem konserviert sind, fanden Hall *et al.* (1985) heraus, dass das humane α 1-Tubulin-Gen zwar eine sehr große Homologie zum Ratten α 1-Tubulin-Gen aufwies, die Promotorregionen jedoch sehr verschieden waren. So könnten zusätzliche Enhancer-Regionen erforderlich sein, die ober- und unterhalb der verwendeten T α 1-Tubulin Sequenz liegen, um ein entsprechendes Expressionsmuster in humanen Zellen zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit für die Abnahme der EGFP-Expression wäre, dass das T α 1-EGFP-Konstrukt von endogenen DNasen abgebaut wird. So zeigte sich, dass 48-120 h nach erfolgter Transfektion die Anzahl EGFP-exprimierender Zellen drastisch abnahm (Abb. 3.7). Eine präzise Aussage darüber zu treffen, ob T α 1-EGFP exprimierende Zellen exklusiv in neuronale Zellen differenzierten, erwies sich daher als schwierig. Die Bestimmung der endogenen T α 1-

Expression auf Proteinebene war nicht möglich, da kein α 1-Tubulin-Antikörper zur Verfügung stand, der spezifisch die neuronale Isoform in hESC-NSCs hätte erkennen können. Die hier in differenzierenden hESC-NSCs gefundene Dynamik der T α 1-EGFP-Expression rekapituliert daher aufgrund der transienten Transfektion der hESC-NSCs nur bedingt das *in vivo* Expressionsmuster von T α 1-Tubulin (Gloster *et al.* 1999 und 1994; Miller *et al.*, 1989; Hieber *et al.*, 1998).

Zur weiteren Überprüfung der neuronal-spezifischen Expression und zum Ausschluss der Expression des Transgens in nicht-neuronalen Zellen wurde das T α 1-EGFP-Konstrukt transient in verschiedene karzinogene Zelllinien (LN-18, 293-T, NIH-3T3 und Hela) eingebracht (Abb. 3.8). Diese Zellkulturen zeigten nach Transfektion mit dem T α 1-EGFP-Konstrukt im Vergleich zur Transfektion mit einem Kontrollplasmid, bei dem das EGFP-Gen unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierten CMV-Promotors steht, eine deutlich geringere Anzahl T α 1-EGFP-exprimierender Zellen. Demnach wird das T α 1-EGFP-Konstrukt auch zu einem geringen Teil in nicht-neuronalen Zelllinien exprimiert. Da der Prozentsatz an T α 1-EGFP-positiven Zellen gegenüber CMV-EGFP exprimierenden Zellen sehr gering ist, zeigen diese Daten dennoch, dass das T α 1-EGFP-Konstrukt bzw. der T α 1-Promotor gewebespezifisch (neuronal-spezifisch) exprimiert wird.

Die hier generierten Daten bestätigen daher insgesamt die im Vorfeld an murinen und humanen Primärzellen erhobenen Befunde zur Expression von T α 1-Tubulin in neuronalen Zellen. Eine exklusive Expression des T α 1-EGFP-Konstrukts in hESC-NSC-abgeleiteten neuronalen Zellen konnte aufgrund der transienten Transfektion jedoch nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 3.9).

4.2.2 Charakterisierung T α 1-EGFP-positiver Zellen

Unter Verwendung verschiedener neuraler (Nestin, PSA-NCAM) und neuronaler (PSA-NCAM, β III-Tubulin) Marker wurden die T α 1-EGFP-positiven Zellen einen Tag nach Transfektion und damit am Tag 5 der Differenzierung näher charakterisiert. Das hohe Maß an Doppelmarkierung T α 1-EGFP-positiver Zellen mit den Antikörpern gegen Nestin und PSA-NCAM zeigte, dass T α 1-EGFP nicht nur in bereits neuronal-differenzierten Zellen exprimiert wird. Nestin ist ein Marker, der von proliferierenden neuralen Vorläufer- und Stammzellen exprimiert wird. PSA-NCAM hingegen ist nicht nur in Neuronen sondern auch in neuronalen Vorläuferzellen zu finden (Seki *et al.*, 1993; Carpenter *et al.*, 2001; Bonfanti, 2006). Die von

Roy *et al.* (2000b) durchgeführten Versuche am dissoziierten Gewebe des humanen adulten Hippocampus zeigten, dass T α 1-EGFP sowohl von Vorläuferzellen als auch von sehr jungen Neuronen exprimiert wird. Dies zeigt, dass T α 1-Tubulin ein sehr früher neuronaler Marker ist. Etwa 10 % der T α 1-EGFP-positiven hESC-NSCs koexprimierten β III-Tubulin. Dies unterstützt die These, dass T α 1-EGFP auch junge Neurone markiert. Es handelt sich bei β III-Tubulin um einen Marker, der bereits früh während der neuronalen Differenzierung exprimiert wird (Lee *et al.*, 1990b). Der Vergleich der T α 1-EGFP-negativen mit der T α 1-EGFP-positiven Population zeigte, dass in der T α 1-EGFP-positiven Population eine signifikant erhöhte Expression des neuronalen Markers β III-Tubulin zu verzeichnen war (Abb. 3.9), was auf eine erhöhte neuronale Identität der T α 1-EGFP-positiven Zellen schließen lässt. Des Weiteren konnte eine signifikant geringere Anzahl BrdU-positiver und damit proliferierender Zellen nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass sich T α 1-EGFP-exprimierende Zellen in einem frühen differenzierten Zustand befinden.

Am Tag 4 nach Wachstumsfaktorentzug, d.h. zum Zeitpunkt der maximalen T α 1-EGFP-Expression, zeigten $9,9 \pm 3,4$ % der T α 1-EGFP-positiven Zellen eine β III-Tubulin-Expression. Außerdem wies zu diesem Zeitpunkt nur eine kleine Fraktion der gesamten hESC-NSC-abgeleiteten Neurone eine EGFP-Fluoreszenz auf ($5,7 \pm 1,2$ %; durchflusszytometrische Bestimmung). Zum einen zeigt dieser Befund, dass das T α 1-EGFP zu diesem Zeitpunkt nicht wie bei von murinen ESC-abgeleiteten Populationen (siehe Schmandt *et al.*, 2005), exklusiv in Neuronen exprimiert wird und zum anderen stellte sich auch die Frage, ob T α 1-EGFP nur von Neuronen eines bestimmten Entwicklungsstadiums exprimiert wird. Ein möglicher Erklärungsansatz für den geringen Prozentsatz der T α 1-EGFP-positiven Zellen wäre zum einen der transiente Transfektionansatz (s.o.) und zum anderen die Annahme, dass nur ein sehr kurzes Zeitfenster für die Genexpression existiert. Letztere würde von den bereits publizierten *in vivo* Daten unterstützt werden, in denen es zur Abnahme der T α 1-Tubulin-Expression nach neuronaler Differenzierung kommt (Miller *et al.*, 1987; Gloster *et al.*, 1994 und 1999). In diesem Fall wäre T α 1-EGFP nur in Neuronen zu finden, die den frühen neuronalen Marker β III-Tubulin exprimieren. Jedoch zeigten die T α 1-EGFP-positiven Neurone nach FACS-Anreicherung ebenfalls die Expression des reiferen neuronalen Markers MAP2ab (Abb. 3.11; EGFP/MAP2ab-Koexpression: $18,2 \pm 2,9$ %). Wie bereits erwähnt, könnte die geringe T α 1-EGFP-Expression innerhalb der neuronalen Population auch mit der T α 1-Tubulin-Sequenz des verwendeten Plasmids zusammenhängen. Die T α 1-Sequenz aus der Ratte enthält möglicherweise nicht alle regulatorischen Abschnitte, die für die Expression

von T α 1-Tubulin wichtig sind, um ein Expressionsmuster zu erhalten, welches in humanem Gewebe beobachtet werden kann.

4.2.3 Effizienz der T α 1-EGFP-basierten Linienselektion

Obwohl das T α 1-EGFP-Transgen nur in einem kleinen Teil der hESC-NSCs exprimiert wurde, war auf Grundlage der EGFP-Fluoreszenz eine effiziente Selektion von T α 1-EGFP-positiven Zellen möglich. Über FACS-basierte Linienselektion konnte eine hohe Reinheit von $85,8 \pm 2,3$ % T α 1-EGFP-positiver Zellen erreicht werden. Ausgehend von der T α 1-EGFP-Population von nicht-sortierten Zellen ($5,7 \pm 1,2$ %; durchflusszytometrische Bestimmung) kommt dies einer 15-fachen Anreicherung EGFP-positiver Zellen gleich. Immunfluoreszenz-Analysen EGFP-positiver Zellen 4 h nach Plattieren ergaben, dass nur ein geringer Anteil der FACS-positiv-sortierten Zellen den neuronalen Marker β III-Tubulin exprimierten, wohingegen die meisten Nestin exprimierten (Abb. 3.10 F, G). Negativ-sortierte Zellpopulationen wiesen ebenfalls nur wenige β III-Tubulin-positive sowie einen großen Anteil Nestin-positiver Zellen auf (Abb. 3.10 D, E). Die Analyse der FACS-sortierten Zellen zeigte, dass einige Zellen 4 h nach Plattieren kleine Fortsätze ausgebildet (Abb. 3.10 F, G). Im Gegensatz zu T α 1-EGFP-sortierten Zellen aus murinen ESC-abgeleiteten Populationen (Schmandt *et al.*, 2005) zeigten die aus hESC-NSC-Populationen FACS-angereicherten T α 1-EGFP-positiven Zellen nur eine geringe Koexpression mit β III-Tubulin und waren 4 h nach Plattieren überwiegend Nestin-positiv.

Da hESC-NSC-Populationen jedoch weitaus langsamer differenzieren als murine ESC-abgeleitete Populationen, wurden die Zellen nach FACS für weitere 3 und 8 Tage zur Ausreifung auf Zellkulturschalen differenziert (Abb. 3.11). Da die EGFP-Fluoreszenz in den Zellen nicht lange erhalten blieb (Abb. 3.7), waren am Ende der gewählten Ausdifferenzierungszeiträume nur sehr wenig EGFP-positive Zellen nachweisbar, weshalb die neuronale Identität der T α 1-EGFP-sortierten Zellen über die Immunoreaktivität mit β III-Tubulin bestimmt wurde. Drei Tage nach FACS zeigte sich jedoch, dass die T α 1-EGFP-positiv-sortierten Zellfraktionen gegenüber den negativ-sortierten Zellfraktionen nur ~ 6 % mehr β III-Tubulin-positive Zellen aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen von wenigen noch nachweisbaren EGFP-positiven Zellen (1,7 %) der positiv-sortierten Fraktion nur 50 % eine β III-Tubulin-Expression auf. Diese Daten zeigen, dass zu diesem Zeitpunkt nur ein Teil der T α 1-EGFP-positiven Zellen in Neurone differenzierte. Ähnliches wurde auch 8 Tage nach

FACS beobachtet. Auch hier konnte nur eine minimale Anreicherung neuronaler Zellen in $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellfraktionen im Vergleich zu negativ-sortierten Populationen festgestellt werden (~5 % mehr β III-Tubulin-positive und Map2ab-positive Zellen). Der überwiegende Anteil der Zellen war Nestin-positiv (~80 %) und damit nicht-neuronal differenziert. Auch die Zugabe von BDNF (brain-derived neurotrophic factor) zum Zellkulturmedium, welches die neuronale Differenzierung unterstützt, konnte den Anteil an β III-Tubulin-positiven Zellen nicht wesentlich beeinflussen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass $T\alpha 1$ -EGFP, welches transient in die hESC-NSC-Kulturen eingebracht wurde, nur zu einer geringen Anreicherung neuronaler Zellen beitrug. So brachte die Selektion von $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen unter diesen Bedingungen keine reine neuronale Population, sondern eine noch überwiegend Nestin-positiv Population hervor.

Es stellt sich die Frage, ob eine stabile Transfektion der hESC-NSC-Zellkulturen mit dem $T\alpha 1$ -EGFP-Konstrukt eine bessere Voraussetzung gewesen wäre. Eine effiziente neuronale Anreicherung, basierend auf der Selektion $T\alpha 1$ -EGFP-positiver Zellen, konnte in der Vergangenheit schon mehrfach am Gehirngewebe von Nagetieren demonstriert werden. So generierten Sawamoto *et al.* (2001) transgene Mäuse, die EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) unter dem $T\alpha 1$ -Tubulin Promotor exprimierten. Nach Fluoreszenz-basierter Selektion konnten neuronale Populationen aus den Gehirnkulturen der transgenen Tiere in einer Reinheit von 94,2 % gewonnen werden. Wang *et al.* (1998) konnten zeigen, dass $T\alpha 1$ -EGFP transient transfizierte Zellen aus dem Vorderhirn von E14 Ratten 16 h nach FACS-Sortierung zu 65 % den neuronalen Marker β III-Tubulin exprimierten. Neuronale Populationen in einer Reinheit von ~70 % konnten aus Zellen der Subventrikularzone adulter Ratten gewonnen werden (Wang *et al.*, 2000). Schmandt *et al.* (2005) konnten die an Primärzellen erzielten Daten auf ESC-abgeleitete neurale Vorläuferzellen übertragen. So zeigten 98 % der $T\alpha 1$ -EGFP-sortierten Zellen eine β III-Tubulin-Expression. Die hier vorgestellten Daten können nur zum Teil auf humane Zellen übertragen werden. Denn obwohl Nagetierzellen und humane Zellen sich in vielen Punkten ähneln, differenzieren humane Primärzellen und hESC-abgeleitete Zellpopulation weitaus langsamer. Dennoch konnten auch aus Zellpopulationen, die aus adulten humanen Gehirngeweben wie aus dem Hippocampus und der Ventrikularzone präpariert wurden, mittels transienter $T\alpha 1$ -EGFP-Expression neuronale Populationen mit hohen Reinheitsgraden isoliert werden (Roy *et al.*, 2000a, 2000b). Nach Transfektion mit einem $T\alpha 1$ -EGFP-Expressionskonstrukt und anschließender FACS-Sortierung exprimierten 73 % der aus dem Hippocampus gewonnenen

Zellen β III-Tubulin. Im Gegensatz dazu, zeigten die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten hESC-NSC-Populationen nach $T\alpha 1$ -EGFP-basierter FACS-Anreicherung jedoch nur zu 16 % eine β III-Tubulin-Expression.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten konnten demnach die an humanen Primärzellen erzielten Ergebnisse auf hESC-NSC-Populationen nicht bestätigen. Wie an den mit Primärzellen durchgeführten Studien zeigte sich zwar auch hier eine erhöhte Expression des $T\alpha 1$ -EGFP in hESC-NSC-abgeleiteten Neuronen, jedoch führte die FACS-basierte Selektion der $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen nicht zu einer zufriedenstellenden Anreicherung reiner, neuronaler Zellpopulationen. Ein geeigneter Antikörper gegen das humane neuronal-spezifische $T\alpha 1$ -Tubulin hätte die Charakterisierung der transient transfizierten hESC-NSCs sicherlich erleichtert und optimiert. Ein geeigneter Antikörper stand jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung.

Da sich das $T\alpha 1$ -EGFP-Konstrukt nicht als eine geeignete Methode zur Anreicherung einer hochaufgereinigten Population von Neuronen erwies, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer alternativen Strategie gesucht. Das Zelladhäsionsmolekül L1, welches im ZNS auf einer Gruppe von sich entwickelnden Neuronen, aber auch auf Axonen zahlreicher Nervenzellen des adulten Nervensystems exprimiert wird (Salton *et al.*, 1983; Lindner *et al.*, 1983; Grumet *et al.*, 1984; Rathjen *et al.*, 1984), stellte sich hingegen als gut geeigneter Kandidat heraus. Die Daten der L1-immuno-basierten Selektion von Neuronen aus hESC-NSCs (vgl. 3.2.2) werden im Folgenden diskutiert.

4.3 Immuno-basierte Linienselektion hESC-abgeleiteter Neurone

Wie oben beschrieben, führte die Promotor-basierte Selektion von Neuronen unter Verwendung des $T\alpha 1$ -EGFP-Konstruktes nicht zum gewünschten Erfolg. Eine alternative und vor allem effizientere Strategie der neuronalen Linienselektion von hESC-NSCs war hingegen durch die Verwendung eines Antikörpers gegen das Zelladhäsionsmoleküls L1 möglich.

Das Molekül L1 ist in zahlreiche Prozesse des sich entwickelnden und adulten Nervensystems, wie z.B. Zellmigration (Lindner *et al.*, 1983; Asou *et al.*, 1992; Thelen *et al.*, 2002), Axonwachstum (Fischer *et al.*, 1986; Lagenaur *et al.*, 1987), Axonfaszikulierung (Chang *et al.*, 1987; Kunz *et al.*, 1996), Synaptogenese und Myelinisierung involviert (Wood *et al.*, 1990). Die L1-basierte Selektionsstrategie führte zu hochaufgereinigten neuronalen Zellpopulationen, die sich erfolgreich kryokonservieren ließen und die physiologische Eigenschaften von Neuronen aufwiesen. Ein wesentlicher Vorteil der L1-immuno-basierten

Selektion war, dass die Zellen dabei keiner genetischen Modifikation unterworfen werden mussten, was für biomedizinische Anwendungen von besonderem Interesse ist.

4.3.1 Das Zelladhäsionsmoleküls L1 als Marker für die neuronale Linienselektion

Moleküle auf der Zelloberfläche und in der EZM können Prozesse, wie das Überleben, das Neuritenwachstum und die Ausbildung von Synapsen, nicht nur während der Entwicklung sondern auch im adulten Organismus, beispielsweise nach Verletzungen, begünstigen (Seilheimer *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1999; Bernreuther *et al.*, 2006). Dazu gehören neurale Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), wie die Zelladhäsionsmoleküle NCAM (neural cell adhesion molecule), L1 sowie NgCAM (neuron glia cell adhesion molecule). Die Wichtigkeit der Mitglieder der IgSF sowohl während der Entwicklung des Nervensystems als auch im adulten Organismus wurde durch die Untersuchungen von Mäusen und Menschen deutlich, die Defizite in diesen Molekülen aufwiesen (Luthi *et al.*, 1996; Fransen *et al.*, 1998a; Wolfer *et al.*, 1998; Demyanenko *et al.*, 1999). L1-Mutationen wurden im Zusammenhang mit X-chromosomal-gekoppelter mentaler Retardierung gefunden (Kenwick *et al.*, 2000). So wurden Mutationen im L1 kodierenden Gen bei Menschen im Zusammenhang mit X-chromosomal-gekoppelten neurologischen Erkrankung, wie dem CRASH-Syndrom (Fransen *et al.*, 1995; Fransen *et al.*, 1997; Kenwick *et al.*, 1998) entdeckt.

Das Zelladhäsionsmolekül L1, welches für die vorliegende Arbeit als Marker für eine neuronale Linienselektion von besonderem Interesse war, ist ein transmembranes Glykoprotein und vermittelt sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Nervensystem kalziumunabhängige homo- und heterophile Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Brummendorf *et al.*, 1995; Crossin *et al.*, 2000). Es wurde im ZNS auf sich entwickelnden Neuronen, auf Axonen zahlreicher Nervenzellen des adulten Nervensystems aber nicht in Astrozyten oder Oligodendrozyten nachgewiesen (Lindner *et al.*, 1983; Rathjen *et al.*, 1984; Moos *et al.*, 1988; Appel *et al.*, 1993; Kamiguchi *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird L1 auch von Neuronen und Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems exprimiert (Seilheimer *et al.*, 1988; Martini *et al.*, 1994). Das L1-Molekül spielt eine wesentliche Rolle beim Überleben neuronaler Zellen, bei der Axonfaszikulierung und beim Neuritenwachstum, sowie bei der neuronalen Migration und bei der synaptischen Plastizität (Lemmon *et al.*, 1989; Appel *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1999; Kleene *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2003). Um den Effekt von L1 hinsichtlich des Neuritenwachstums, des neuronalen Zellüberlebens und der Funktion als

signaltransduzierender Rezeptor *in vitro* zu untersuchen, wurden L1-Antikörper eingesetzt (Appel *et al.*, 1995; Hulley *et al.*, 1998; von Bohlen und Halbach *et al.*, 1992). Dong *et al.* (2003) konnte zeigen, dass L1-Antikörper als Substrate das Neuritenwachstum des Dorsalwurzelganglions des Kleinhirns (DRG, dorsal root ganglion) und das von Motoneuronen in einer dosisabhängigen Weise stimulieren können. Auch Dihné *et al.* (2003) konnten zeigen, dass L1 die Proliferation und die neuronale Differenzierung von murinen NSCs *in vitro* beeinflusst. Hierbei wurden NSCs verwendet, die aus L1-defizienten und Wildtyp-Mäusen gewonnen wurden. L1 reduzierte im Vergleich zu anderen Substraten (Laminin und Poly-L-lysin) die Proliferation von NSCs in einer dosisabhängigen Weise, erhöhte die neuronale Differenzierung und führte gleichzeitig zu einer verringerten astrozytären Differenzierung. Ähnliches konnte durch die Überexpression von L1 in murinen neuronalen Vorläuferzellen beobachtet werden (Bernreuther *et al.*, 2006). L1 scheint als Zelladhäsionsmolekül auch am Regenerationsprozess von Geweben nach einer Schädigung beteiligt zu sein. Studien zeigen, dass L1 in adulten Ratten eine funktionelle Besserung nach einer induzierten Rückenmarksverletzung (Roonprapunt *et al.*, 2003) oder nach einer Verletzung des optischen Nerven (Xu *et al.*, 2004) unterstützt. Die Transplantation von L1-überexprimierenden murinen ESC-abgeleiteten Zellen in das geschädigte Striatum von Mäusen führte ebenfalls zu einer funktionellen Besserung (Bernreuther *et al.*, 2006). Die L1-Überexpression resultierte hierbei in einer erhöhten Anzahl von GABAergen Neuronen und einer verstärkten Migration von ESC-abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellen in das geschädigte Gewebe.

Zusammenfassend zeigen diese publizierten Daten, dass sowohl Neurone des ZNS als auch die des peripheren Nervensystems (PNS) eine L1-Expression aufweisen. So exprimierten nicht nur sich entwickelnde Neurone und Axone zahlreicher Nervenzellen des adulten Nervensystems, sondern auch Schwann-Zellen das Zelladhäsionsmolekül L1. Es konnte gezeigt werden, dass L1 die Migration und das Überleben neuronaler Zellen sowie das Neuritenwachstum beeinflusst. Im Rahmen von Regenerationsprozessen nach axonalen Schäden, scheint L1 ebenfalls eine wesentliche Rolle zu spielen. Diese Befunde lassen das Zelladhäsionsmolekül zu einem interessanten Marker für neuronale Linienselektionen werden. Jüngling *et al.* (2003) konnte zeigen, dass sich das Zelladhäsionsmolekül L1 zur Anreicherung einer neuronalen Zellpopulation aus murinen ESCs eignet. Die Aufreinigung von Neuronen erfolgte hierbei über eine Immunoisolierungsstrategie, bei der ein Antikörper gegen das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 verwendet wurde. Dies führte zu einer reinen

Population von differenzierten Neuronen, die elektrophysiologisch erregbar waren und exzitatorische, glutamaterge und inhibitorische, GABAerge Synapsen bildeten.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Expression von L1 in hESC-NSC-abgeleiteten Neuronen nachgewiesen werden. Dafür wurden hESC-NSCs über einen Zeitraum von 10 Tagen unter Wachstumsfaktorentzug differenziert und die Expression von L1 und dem neuronalen Marker β III-Tubulin zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen) bestimmt. HESC-NSCs, die in Gegenwart von FGF-2, EGF und B27 proliferierten, waren abgesehen von spontan differenzierten Neuronen überwiegend L1- und β III-Tubulin-negativ. Erst nach *in vitro* Differenzierung, die durch Wachstumsfaktorentzug induziert wurde, stieg die Anzahl L1-exprimierender Zellen zeitgleich mit dem Erscheinen von β III-Tubulin-positiven Neuronen stetig an (Abb. 3.12 A). Es konnte beobachtet werden, dass die Anzahl L1-positiver Zellen zu jedem Zeitpunkt der Differenzierung leicht unterhalb der Anzahl der β III-Tubulin-positiven Zellen lag. Dieser Befund und die Beobachtung, dass alle L1-positiven Zellen β III-Tubulin koexprimierten, aber nicht alle β III-Tubulin-positiven Neurone auch L1 exprimierten, lässt zum einen den Schluss zu, dass L1 exklusiv in hESC-NSC-abgeleiteten neuronalen Zellen exprimiert wird (Lindner *et al.*, 1983; Rathjen *et al.*, 1984) und zum anderen, dass das Zeitfenster der L1-Expression eine leichte Abweichung zur Expression des frühen neuronalen Markers β III-Tubulin aufweist. Da L1 schon früh während der neuronalen Differenzierung von hESC-NSCs auf β III-Tubulin-positiven Neuronen exprimiert wird, eignet es sich als Selektionsmarker für junge, unreife Neurone. Zu Beginn der Differenzierung (2, 4 und 6 Tage nach Wachstumsfaktorentzug) zeigten die L1-positiven Neurone eine bi- bis multipolare Zellmorphologie. Diese für junge, unreife Neurone typische Morphologie änderte sich mit zunehmender Differenzierungsdauer. Bereits 8 Tage nach Wachstumsfaktorentzug wiesen die L1-positiven Zellen eine für reifere Neurone typische Morphologie mit langen und verzweigten Fortsätzen auf. Daraufhin wurde der Zeitpunkt für die L1-immuno-basierte Selektion auf Tag 7 nach Wachstumsfaktorentzug festgelegt, weil zu diesem Zeitpunkt genug L1-positive Zellen vorhanden waren, und weil zum anderen die Zellen noch nicht so weit differenziert waren und sich nach der Selektion gut replattieren ließen.

Zu einem späteren Differenzierungszeitpunkt (14 Tage nach Wachstumsfaktorentzug) wurden die L1-positiven Neurone unter Verwendung verschiedener neuronaler Marker (β III-Tubulin, MAP2ab, VGluT1 und GABA) näher charakterisiert (Abb. 3.13). Das hohe Maß an Doppelmarkierung L1-positiver Zellen mit dem Antikörper gegen β III-Tubulin unterstützt die

These, dass L1 auch junge Neurone zuverlässig markiert. Denn bei β III-Tubulin handelt es sich um einen Marker, der bereits früh während der neuronalen Differenzierung exprimiert wird (Lee *et al.*, 1990b). L1-positive Neurone waren ebenfalls im hohen Maße MAP2ab positiv. MAP2ab wird zu einem späteren Entwicklungsstadium exprimiert und ist ein Marker für reifere neuronale Zellen (Abb. 3.13). Es stellte sich die Frage, ob L1 möglicherweise nur von einer Subpopulation von Neuronen exprimiert wird und damit z.B. bevorzugt in Zellen eines bestimmten Neurotransmitter-Phänotyps, wie exzitatorischen oder inhibitorischen Neuronen, zu finden ist. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass die L1-markierte Population sowohl inhibitorische (GABA) als auch exzitatorische (VGluT1) Neurone umfasste (Abb. 3.13). Jüngling *et al.* (2003) konnten ebenfalls zeigen, dass L1-selektierte murine Zellen exzitatorische, glutamaterge und inhibitorische, GABAerge Synapsen bildeten. Bei der weiteren Überprüfung der neuronal-spezifischen Expression von L1 in differenzierten hESC-NSCs konnte eine Koexpression von L1 und glialen Markern, wie GFAP und O4, nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten die an murinen Primärzellen und ESC-abgeleiteten Zellpopulationen erhobenen Befunde zur exklusiven Expression von L1 in Neuronen bestätigten. Das Zelladhäsionsmolekül L1 eignete sich zur selektiven Anreicherung von Neuronen. L1-positive Zellen repräsentieren eine neuronale Zellpopulation, die sowohl aus inhibitorischen, GABAergen als auch aus exzitatorischen, glutamatergen Neuronen besteht.

4.3.2 Effizienz der L1-immuno-basierten Linienselektion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kontrollierte Differenzierung von hESCs zu NSCs, kombiniert mit einem L1-basierten Linienselektionsverfahren, zu einer effizient aufgereinigten neuronalen Zellpopulation führt. Obwohl der Prozentsatz an L1-positiven Zellen in 7 Tage unter Wachstumsfaktorentzug differenzierten hESC-NSCs mit 6 % (H9.2) bzw. 10 % (I3) nicht besonders groß war, gelang eine effiziente Selektion von Neuronen (Abb. 3.14 A). Aufgrund ihres noch frühen, unreifen Differenzierungsstadiums waren L1-positive Neurone robust genug, die mit der FACSortierung einhergehenden belastenden Einflüsse, wie den langen Aufenthalt im kalten FACS-Puffer sowie den mechanischen Druck während der Sortierungsprozedur, zu überleben. Länger differenzierte, reifere Neurone hingegen würden eine solche Prozedur nicht tolerieren. So führte die Linienselektionsstrategie von Pruszek *et al.* (2007), bei der Promotorelemente von Genen

(Synapsin) weiter differenzierter Neurone verwendet wurden, zu einer vergleichsweise schlechten Zellüberlebensrate.

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass durch die Kombination von gerichteter Differenzierung und Linienselektion neuronale Populationen in hoher Reinheit gewonnen werden können. Immunfluoreszenzanalysen 24 h nach der L1-Selektion ergaben, dass $96,2 \pm 1,2$ % (H9.2) bzw. $77,2 \pm 5,3$ % (I3) der FACS-sortierten Zellen L1 exprimierten und dabei den neuronalen Marker β III-Tubulin zu 100 % koexprimierten (Abb. 3.14 B). Parallel präparierte, aber nicht der FACS-Sortierung unterworfenen Kontrollpopulationen wiesen hingegen nur zu $5,7 \pm 0,8$ % (H9.2) bzw. $9,9 \pm 3,1$ % (I3) L1-positive Zellen auf, die ebenfalls β III-Tubulin koexprimierten. Dies bedeutet eine 90,5%ige (H9.2) bzw. 67,3%ige (I3) Anreicherung von L1-positiven Neuronen. Negativ-sortierte Zellen wiesen nur $1,6 \pm 0,6$ % (H9.2) bzw. $8,2 \pm 4$ % (I3) L1- bzw. β III-Tubulin-positive Zellen auf. Die Analyse der FACS-sortierten Zellen zeigte, dass bereits 24 h nach Plattieren die ersten Fortsätze ausgebildet wurden (Abb. 3.14 E, F). Obwohl für beide Zelllinien (H9.2 und I3) optimierte und stringente FACS-Bedingungen verwendet wurden, konnten Unterschiede in der Reinheit in der Isolierung von Neuronen 24 h nach FACS beobachtet werden (H9.2: 96 %; I3: 77 %). Bei der FACS-basierten Selektion der hESC-NSCs der Zelllinie I3 sind deutlich mehr unerwünschte, d.h. L1-negative Zellen in die positive Fraktion gelangt als bei der hESC-NSC-Fraktion der Linie H9.2. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass der Sortierstrahl von I3-Zellen häufiger als bei H9.2-Zellen streute statt gezielt zum negativen bzw. positiven Auffanggefäß gelenkt zu werden. Normalerweise sollte das Auftreten eines solchen „Streustrahls“ durch die Applikation von DNase verhindert werden, welche genomische DNA zerstörter Zellen verdauen soll, um eine möglichst niedrige Viskosität des Sortierstrahls aufrecht zu erhalten. Möglicherweise war die Menge an freigesetzter genomischer DNA bei den I3-Zellen relativ groß im Vergleich zur eingesetzten DNase-Konzentration. Zusätzlich dazu konnten bei den replattierten I3-Kulturen 24 h nach FACS deutlich mehr tote Zellen beobachtet werden als in den replattierten H9.2-Kulturen. Die differenzierten hESC-NSCs der Zelllinie H9.2 scheinen demnach robuster zu sein als die der Zelllinie I3 und können demnach die mit der FACS-Sortierung einhergehenden belastenden Einflüsse, wie z.B. den mechanische Druck, besser überstehen.

Western Blot Analysen bestätigten die Expression von L1, β III-Tubulin und VGluT1 24 h nach Selektion (Abb. 3.14 G). Damit konnte gezeigt werden, dass zumindest ein Teil der L1-positiv-sortierten Zellen 24 h nach Selektion einen exzitatorischen, glutamatergen neuronalen Phänotyp (vgl. Abb. 3.13) aufwies. Der neuronale Phänotyp L1-positiv-sortierter Zellen

wurde ebenfalls auf mRNA-Ebene mittels PCR-Analysen bestätigt (Abb. 3.15). Neben der Expression von VGluT1 konnte eine Expression von GAD67 auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Selektion von L1-positiven Zellen eine Anreicherung von sowohl exzitatorischen als auch inhibitorischen Neuronen bewirkt. Die von Jüngling *et al.* (2003) erhobenen Daten zur Selektion von Neuronen aus murinen ESCs über L1-basierte Immunoisolierung führte ebenfalls zu einer Population aus exzitatorischen, glutamatergen und inhibitorischen, GABAergen Neuronen.

Für die Aufreinigung ESC-abgeleiteter neuraler Populationen wurden bereits in der Vergangenheit verschiedene Marker verwendet. Die Immunoisolierung wurde sowohl im murinen als auch humanen Zellkultursystem erfolgreich zur Selektion von Neuronen (Schmandt *et al.*, 2005; Carpenter *et al.*, 2001) und Glia-Zellen (Windrem *et al.*, 2004; Glaser *et al.*, 2005) eingesetzt. Eine effiziente neuronale Anreicherung, basierend auf der Selektion L1-positiver Zellen, konnte schon an murinen ESCs demonstriert werden. Jüngling *et al.* (2003) konnte zeigen, dass die Differenzierung von ESCs zu EBs und die anschließende L1-basierte Immunoisolation neuronale Populationen in einer Reinheit von $93,4 \pm 3,4$ % hervorbrachte. Auch aus hESC-NSC-Populationen, die mit einem Doublecortin (DCX)-EGFP-Konstrukt stabil transfiziert wurden, konnten β III-Tubulin-positive Neurone mit hohem Reinheitsgrad ($92,3 \pm 2,5$ %) isoliert werden (Ladewig *et al.*, 2008). Bei Linienselektionsverfahren, die auf Konstrukten basieren, die Gene für fluoreszierende Proteine (z.B. T α 1-EGFP) oder Antibiotikaresistenzen beinhalten, werden die Zellen in der Regel dauerhaft genetisch verändert. Ein wesentlicher Nachteil dabei ist, dass die Integration des eingebrachten Genkonstruktes meist ungerichtet in das Genom der Zelle erfolgt. Für spätere biomedizinische Anwendungen eignen sich daher solche genetischen Linienselektionsverfahren nicht. Die Selektionsstrategien, die auf Oberflächenantigenen basieren, bieten daher einen wesentlichen Vorteil, da die selektierten Zellen frei von genetischen Modifikationen sind.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich das Zelladhäsionsmolekül L1 als ein robuster Marker herausstellte, um Neurone aus differenzierenden hESC-NSC-Kulturen zu isolieren. Die Selektion von L1-positiven Zellen bringt eine reine neuronale Population hervor, die noch unreif genug erscheint, um mit ihr weiterführende Zellkulturexperimente durchführen zu können. Die hier vorgestellten Daten weiten somit die an murinen ESCs erzielten Ergebnisse (Jüngling *et al.*, 2003) auf hESC-abgeleitete NSCs aus. Die Markierung der hESC-NSC und damit der hESC-NSC-abgeleiteten L1-positiven Neurone

mit einem EGFP- oder mRFP-Konstrukt (vgl. 3.2.2.5.2) ließen das oben beschriebene Verfahren zur Gewinnung reiner neuronaler Populationen zu einer geeigneten Methode werden, um zusätzlich das Ausreifungspotential und die synaptische Plastizität von Neuronen nach Transplantation zu untersuchen.

4.3.3 Charakterisierung der L1-positiv-sortierten Zellen

Die L1-positiv-sortierten Zellen wurden unter Verwendung verschiedener neuronaler Marker (β III-Tubulin, MAP2ab, VGluT1 und GABA) näher charakterisiert. Bereits 24 h nach der FACS-basierten Selektion zeigten die L1-positiven Zellen eine meist bi- bis multipolare neuronale Morphologie und waren β III-Tubulin-positiv (Abb. 3.14 E). Für die neuronale Ausreifung und weitere immunzytochemische Charakterisierung wurden L1-positiven Neurone für weitere 6 Tage differenziert (Abb. 3.16; Abb. 3.17). Die L1-positiven Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt nicht nur ein hohes Maß an Doppelmarkierungen für β III-Tubulin (Abb. 3.16 A₂), sondern auch für MAP2ab, einen Marker, der reifere Neurone kennzeichnet (Abb. 3.16 B₂). Der Anteil MAP2ab-positiver Neurone fiel in den gesamten L1-positiv-sortierten hESC-NSC-Populationen der Zelllinie I3 ($45,3 \pm 9,6$ %) im Vergleich zur Zelllinie H9.2 ($76,9 \pm 9,2$ %) deutlich geringer aus. Bezieht man den Anteil MAP2ab-exprimierender Zellen jedoch nur auf die Anzahl L1-positiver Zellen in den I3 und H9.2 Kulturen, so ist die Menge an MAP2ab-positiven Zellen vergleichbar (I3: 77 %, H9.2: 87 %; Daten nicht gezeigt). Der Anteil L1-negativer Zellen in der L1-positiv-sortierten Fraktion war bei den I3 Populationen 24 h nach FACS deutlich höher als bei den H9.2 Populationen. Der Unterschied in der Gesamtpopulation hinsichtlich des neuronalen Markers MAP2ab beruht wahrscheinlich auf dem niedrigeren Reinheitsgrad der bei der Selektion der hESC-NSCs der Zelllinie I3 erreicht wurde (I3: 77,2 %, H9.2: 96,2 %).

Die L1-positiven Populationen beider Zelllinien wiesen im Vergleich zu L1-negativen Populationen eine signifikant erhöhte Expression der neuronalen Marker β III-Tubulin, MAP2ab, VGluT1 und GABA auf (Abb. 3.17; Abb. 3.18). Beide Zelllinien zeigten eine Differenzierung in glutamaterge (VGluT1) und GABAerge Neurone (Abb. 3.16 C₂, D₂). Die L1-markierte Population umfasste demnach sowohl inhibitorische (GABA) als auch exzitatorische (VGluT1) Neurone, die etwa im gleichen Verhältnis zueinander exprimiert wurden (Abb. 3.17). Dies bestätigte die im Vorfeld erhobenen immunzytochemischen Daten (vgl. Abb. 3.13), ebenso wie die in der Vergangenheit von Jüngling *et al.* (2003) publizierten Daten.

In der Subtyp-spezifischen neuronalen Differenzierung (VGluT1- und GABA-positive Zellen) konnte jedoch ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien (H9.2 und I3) festgestellt werden. So wiesen L1-positive Zellfraktionen der Zelllinie I3 eine signifikant geringere Anzahl VGluT1- bzw. GABA-exprimierender Zellen auf als die der Zelllinie H9.2 (Abb. 3.17). Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf die geringere Aufreinigungseffizienz der I3-Zelllinie zurückzuführen.

Die Daten zur Expression von neuronalen Markern in L1-positiv-sortierten Zellfraktionen 6 Tage nach FACS zeigten, dass die hESC-NSCs der Zelllinie I3 generell ein geringeres neuronales Differenzierungspotential aufwiesen als die hESC-NSCs der Zelllinie H9.2. Unter Bedingungen die eine neuronale Differenzierung begünstigen, exprimierten in der hier vorliegenden Arbeit weniger Zellen der hESC-NSC Linie I3 neuronal-spezifische Marker (β III-Tubulin, MAP2ab, VGluT1 und GABA) als die der hESC-NSCs Linie H9.2 (Abb. 3.17). Einerseits kann dies durch den niedrigeren Reinheitsgrad der L1-positiv-sortierten Zellpopulationen der I3-Zellen begründet werden (s.o.) und andererseits ist bekannt, dass die neurale Differenzierungsfähigkeit von verschiedenen Zelllinien variieren kann. Mehrere Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass hESC-Linien Unterschiede im Proliferations- und Differenzierungspotential zeigen (Allegrucci *et al.*, 2007; Ware *et al.*, 2006; Tavakoli *et al.*, 2009). Das Selbsterneuerungspotential und die Fähigkeit zur spontanen und gerichteten Differenzierung kann demnach im Vergleich zwischen hESC-Linien verschieden sein (Tavakoli *et al.*, 2009). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass immanente Differenzierungseigenschaften pluripotenter Stammzellen durch Modulation intrazellulärer Signalwege überwunden werden können (Kim *et al.*, 2010). Also scheint die H9.2 Zelllinie ein stärkeres neurales/neuronales Differenzierungspotential zu besitzen als die Zelllinie I3.

Des Weiteren zeigten L1-positiv-sortierte Populationen der Zelllinie H9.2 eine VGluT1- und GABA-Expression in über 60 % der quantifizierten Zellen. Auf der Basis von Immunfluoreszenzanalysen konnten Kao *et al.* (2004) und Gómez-Lira *et al.* (2005) die Kolokalisation von VGluT1 und VGAT nachweisen. Weitere Studien an aus adultem Rattengehirn isolierten Synaptosomen konnten ebenfalls eine Koexistenz von VGluT- und GABA-Transportern zeigen (Zander *et al.*, 2010). Daher deutet der in dieser Arbeit vorliegende Befund ebenfalls auf eine Koexpression der vesikulären Transporter für exzitatorische und inhibitorische Transmitter innerhalb der selben Synapse hin. VGluT1 und GABA scheinen demnach zumindest in einigen Nervenendigungen von L1-positiven Zellen (Zelllinie H9.2) gleichzeitig vorzukommen. Dieses Phänomen tritt wahrscheinlich während der neuronalen Entwicklung als eine Art Übergangsstadium auf (Zander *et al.*, 2010). Weiterführende

Studien sind allerdings notwendig, um das Phänomen in L1-positiven Neuronen genauer zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die über das Zelladhäsionsmolekül L1 isolierten β III-Tubulin- und MAP2ab-positiven Neurone 6 Tage nach Selektion unabhängig von der Zelllinie sowohl einen GABAergen als auch einen glutamatergen Phänotyp aufweisen. Die hier gewählte FACS-basierte Methode zur Selektion L1-positiver Zellen hat demnach keinen Einfluss auf die neuronale Identität der Zellen (vgl. Abb. 3.13).

Das Zelladhäsionsmolekül L1 ermöglicht als Oberflächenmarker die FACS-basierte Linienselektion von unreifen hESC-NSC-abgeleiteten Neuronen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass FACS-selektierte L1-positive Neurone mit einer Reinheit von über 96 % gewonnen werden konnten. Durch elektrophysiologische Untersuchungen der L1-positiv-sortierten Zellen wurde festgestellt, dass diese Zellen funktionelle Eigenschaften von reifen Neuronen aufwiesen, da sie fähig waren, repetitive Aktionspotentiale zu feuern und synaptische Kontakte auszubilden. Die im Vorfeld durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen an L1-positiven Zellen in differenzierten, nicht-sortierten hESC-NSC-Populationen (Daten nicht gezeigt), konnten an L1-positiv-sortierten Zellpopulation nach FACS ebenfalls erzielt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die FACS-basierte Selektionsstrategie die funktionelle Ausreifung der Neurone nicht beeinträchtigte.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden L1-positiv-sortierte Zellen in Kokultur mit murinen Astrozyten kultiviert. Glia-Zellen können das Überleben von Neuronen, die neuronale Ausreifung und das Neuritenwachstum positiv beeinflussen (Liesi *et al.*, 1983; Fallon, 1985a und 1985b; Bekkers *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2007). So konnten Jüngling *et al.* (2003) zeigen, dass auf Glia-Zellen kultivierte L1-immunoisolierte murine ESC-abgeleitete Neurone funktionell ausreifen und Synapsen formten. Die Analyse der passiven und aktiven Membraneigenschaften (Abb. 3.20) zeigte eine deutliche Entwicklung von L1-selektierten hESC-NSC-abgeleiteten Neuronen, die jedoch nach 9 Wochen in Kultur noch nicht abgeschlossen erschien. Die signifikante Erhöhung der Membrankapazität (C_m) in 9 Wochen alten Kulturen (Abb. 3.20 C) und der Befund, dass die Zellen repetitive Aktionspotentiale (APs) feuern konnten (Abb. 3.20 F), lässt den Schluss zu, dass diese Neurone komplexe Verzweigungen aufwiesen und einen reiferen Status erreicht hatten, als die für 5 Wochen kultivierten Neurone. Vergleichbare elektrophysiologische Befunde mit hESC-NSC-abgeleiteten Neuronen wurde hinsichtlich der passiven und aktiven

Membraneigenschaften (wie Na⁺- und K⁺-Ströme) von Pasricha in ihrer Masterarbeit (2007) erzielt.

Nach 9-wöchiger Kokultur mit murinen Astrozyten konnten in den untersuchten L1-positiven Zellen keine postsynaptischen Ströme (EPSCs) detektiert werden. Die Daten dieser Arbeit sind mit bereits publizierten Daten im Einklang, die zeigen konnten, dass hESC-abgeleitete Neurone in der *in vitro* Kultur meist keine vollständige funktionelle Reifung durchlaufen (Carpenter *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2009). Durch die Verabreichung von Agonisten für AMPA/Kainat- und GABA_A-Rezeptoren konnten jedoch Ströme aufgezeichnet werden, die auf die Expression von Neurotransmitterrezeptoren hindeuten (Abb. 3.22 F).

Die Fähigkeit zur Kommunikation eines Neurons mit anderen Nervenzellen, d.h. die Ausbildung funktioneller Synapsen und neuronaler Netzwerke, ist von grundlegender Bedeutung. Hippokampale Schnittkulturen können das Überleben und die funktionelle Ausreifung von ESC-abgeleiteten Neuronen deutlich unterstützen (Benninger *et al.*, 2003). So stellen organotypische, hippokampale Schnittkulturen ein dreidimensionales Modellsystem des ZNS-Gewebes dar, das zur Untersuchung einer Vielzahl entwicklungsbiologischer und Krankheits-assoziiierter Fragestellungen herangezogen werden kann (Gähwiler *et al.*, 1997; McKinney *et al.*, 1997). Scheffler *et al.* (2003) konnten eine Methode zur Kultivierung von vitalen und funktionell aktiven hippokampalen Schnittkulturen unter serumfreien Bedingungen entwickeln. Dieses Kultursystem erlaubt beispielsweise die genaue Untersuchung der Differenzierung und funktionellen Integration von transplantierten hESC-NSCs. Im Gegensatz zu *in vivo* Transplantationen erlauben *in vitro* Transplantationsmodelle, wie organotypische Schnittkulturen, durch den direkten experimentellen Zugriff die Beobachtung der Integration und Funktionalität der transplantierten Zellen. So können kleine Zellmengen präzise unter dem Mikroskop in eine gewünschte Region platziert werden. L1-positiv-sortierte Neurone aus EF1 α -mRFP- oder EF1 α -EGFP-transduzierten hESC-NSCs bildeten 3 Wochen nach Transplantation auf hippocampalen Schnittkulturen weitläufige, neuronale Verzweigungen aus (Abb. 3.23 D). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das Feuerverhalten (APs) auf hippocampalen Ratten-Schnittkulturen fortgeschrittener war im Vergleich zu den Kokulturen mit murinen Astrozyten. So wurden 3 Wochen nach Transplantation spontane postsynaptische Ströme (EPSCs) bei L1-positiven Neuronen detektiert (Abb. 3.24 A). Ladewig *et al.* (2008) konnten ähnliche Ergebnisse durch die Selektion von DCX-EGFP-positiven Neuronen erzielen. Im Gegensatz dazu zeigten lt-hESNSC-abgeleitete Neurone erst 18 Wochen nach Transplantation in das Gehirn einer 1 Tag

alten Maus EPSCs (Koch *et al.*, 2009). Dies lässt die Vermutung zu, dass reine neuronale Populationen ein besseres Reifungspotenzial aufweisen als nicht-angereicherte Zellpopulationen. Denkbar wäre auch, dass die humanen Zellen *in vitro* besser ausreifen als *in vivo*. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung der L1-positiv-selektierten Zellen konnte festgestellt werden (siehe 3.2.2.5, Abb. 3.24 B), dass die gemessenen Ströme überwiegend eine schnelle Kinetik aufwiesen, die für AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme typisch ist und damit für einen glutamatergen Eingang spricht. Weit seltener wurden langsamere Ströme detektiert, die möglicherweise durch NMDA-Rezeptoren vermittelt wurden. Dies untermauert die immunzytochemischen und molekularbiologischen Befunde, dass durch die L1-Selektion sowohl exzitatorische, glutamaterge als auch inhibitorische, GABAerge Neurone aufgereinigt wurden.

Zusammenfassend konnte demnach gezeigt werden, dass hESC-NSC-abgeleitete L1-positiv-selektionierte Neurone in der Lage waren, ein funktionales Netzwerk nach *in vitro* Transplantation auszubilden.

4.3.4 Kryokonservierung von L1-immunoisolierten Neuronen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kryokonservierungsprotokoll entwickelt, welches die Lagerung von aufgereinigten L1-positiven Zellen mit einer durchschnittlichen Post-Auftau-Überlebensrate von 79,8 % erlaubt (Abb. 3.19 A; TKM ROCK^{+/+}). Da die Selektion von L1-positiven Neuronen eine zeitaufwendige Prozedur darstellt, ermöglicht es die Kryokonservierung, differenzierte und hochaufgereinigte Neurone in größeren Mengen bereits im Voraus zu gewinnen, damit sie für spätere Anwendungen direkt zur Verfügung stehen. Eine wichtige Voraussetzung für die Kryokonservierung war der noch unreife Status der L1-positiv-selektierten Neurone zum Zeitpunkt des Einfrierens. Um die Überlebensrate der Zellen zu optimieren, wurde das verwendete Standardeinfriermedium (KM) leicht modifiziert und mit Trehalose versetzt (TKM). Trehalose verhindert dabei als zusätzliches Kryoprotektivum, dass die Zellen beim Einfrieren und Auftauen von den sich dabei bildenden Eiskristallen beschädigt werden (Leslie *et al.*, 1995; Yoon *et al.*, 1998; Lillford *et al.*, 2002). Während des Auftauens wachsen diese Eiskristalle, und zwar umso mehr, je langsamer die Auftaurate ist. Um daher das Risiko für Zellschäden so gering wie möglich zu halten, müssen die Zellen zum einen schnell aufgetaut (Sherman, *et al.* 1973; Walter, *et al.* 1999) und zusätzlich mit sogenannten Kryoprotektiva geschützt werden. Eine Reihe verschiedener Spezies, wie die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), können ein extremes Austrocknen überleben (Crowe, *et al.* 1992; de-Araujo, 1996). Der Bäckerhefe und einigen Bakterien und

Pilzen ist die Eigenschaft gemein, in bestimmten Stresssituationen das Disaccharid Trehalose produzieren zu können (Crowe, *et al.* 1992). Zahlreiche Untersuchungen, insbesondere zu *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass die Fähigkeit Trehalose zu produzieren, wie auch die Zugabe von externer Trehalose positiv mit den Überlebensraten nach Tiefkühlen bzw. nach Dehydratation korrelieren (Diniz-Mendes, *et al.* 1999; Cerrutti *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 1994). Trehalose wurde als Kryoprotektivum für verschiedene Organismen, Gewebe und Zellen getestet (Beattie *et al.*, 1997; Brockbank *et al.*, 2010). Beattie *et al.* (1997) konnten die Überlegenheit eines Trehalose-DMSO-Gemisches als Kryoprotektivum gegenüber reinem DMSO für humane Pankreasinzellen zeigen. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung eines Trehalose-DMSO-haltigen (TKM) Mediums die Vitalitätsrate der L1-positiven Neurone gegenüber einem DMSO-haltigen Kryomediums (KM) um mehr als 5 % gesteigert werden.

Bereits publizierte Daten zeigen, dass der Verlust der Zellvitalität während des Einfrier- und Auftauprozesses von hESCs mit konventionellen Kryoprotokollen eher durch Apoptose als durch Nekrose verursacht wird (Heng *et al.*, 2006). Durch die spezifische Inhibierung der Apoptose konnte die Einfrier-Auftau-Überlebensrate von hESCs (Martin-Ibañez *et al.*, 2009; Mollamohammadi *et al.*, 2009), hESC-abgeleiteten Kardiomyozyten (Kim *et al.*, 2010) und von Stammzellen aus der Whartonschen Sulze der humanen Nabelschnur (hWJSCs; Gauthaman *et al.*, 2010) deutlich gesteigert werden. Watanabe *et al.* (2007) zeigten, dass die Verwendung des ROCK-Inhibitors die Dissoziations-induzierte Apoptose verringern und damit die Überlebensrate von hESCs deutlich erhöhen konnte. In Gegenwart des ROCK-Inhibitors konnte die Kryokonservierungsmethode von dissoziierten hESCs verbessert werden (Martin-Ibañez *et al.*, 2008) und führte zu einer deutlichen Steigerung des Wachstums von kryokonservierten hESCs nach dem Auftauen (Claasen *et al.*, 2009). Eine effektive Steigerung der Überlebensrate der differenzierten L1-positiven Zellen nach dem Auftauen auf 79,8 % konnte durch die Vorinkubation mit dem ROCK-Inhibitor Y27632 und durch die Zugabe desselben in das Kryomedium und das Auftaumedium erreicht werden (TKM ROCK^{+/+}, Abb. 3.19 A). Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die alleinige Zugabe des ROCK-Inhibitors zum Kryo- und Auftaumedium (TKM ROCK^{-/+}) zu einer Steigerung der Zellvitalität auf 64,2 % nach dem Auftauen führte, wobei diese im Vergleich zur TKM ROCK^{+/+} Bedingung jedoch deutlich geringer ausfiel. Heng *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die alleinige Zugabe eines Apoptose-Inhibitors (Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK) zum Kryomedium nur einen kleinen Effekt auf die Zellüberlebensrate hatte. Ebenso hier,

denn eine Vorinkubation mit dem ROCK-Inhibitor hatte einen deutlicheren positiven Effekt auf die Zellvitalität, als die Zugabe in die entsprechenden Medien alleine.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als zweiter Apoptose-Inhibitor der allgemeine Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK getestet. Heng *et al.* (2006 und 2007) konnten feststellen, dass Caspase 3 eine entscheidende Rolle bei der durch die Kryokonservierung bedingten Apoptose spielt. Als Vergleich wurde ein Kryoprotokoll für junge Neurone verwendet, welches eine Vorinkubation der Zellen mit dem allgemeinen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK vorsah (Ladewig *et al.*, 2008). Das dort vorgestellte Einfriermedium enthielt die Kryoprotektiva Myo-Inositol und Polyvinylalkohol (Yancey *et al.*, 2005; Asada *et al.* 2002) und obwohl der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK eine *in vivo* Halblebezeit von weniger als 24 h hat (Alessandri *et al.*, 2006), schien dies ausreichend zu sein, die DCX-EGFP-angereicherten Neurone während des Einfrierprozesses, sowie in den ersten Stunden nach dem Auftauen und Plattieren zu schützen. Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit verwendete Kombination aus Trehalose-haltigem Kryomedium und Z-VAD-FMK-Vorinkubation (TKM Z-VAD-FMK) erzielte eine Vitalität von 62,9 %. Diese Zellüberlebensrate lag damit deutlich unter dem Trehalose- und ROCK-Inhibitor-haltigem Einfriermedium in Kombination mit der ROCK-Vorinkubation (TKM ROCK^{+/+}; 79,8 %). Die Zellvitalitätsbestimmung L1-selektionierter Neurone, die mit dem von Ladewig *et al.* (2008) entwickelten Kryoprotokoll eingefroren wurden (KM-L Z-VAD-FMK), ergab lediglich eine Überlebensrate von 64,8 % und war damit vergleichbar mit dem Trehalose- und ROCK-Inhibitor-haltigem Einfriermedium ohne ROCK-Inhibitor-Vorinkubation (TKM ROCK^{-/+}; 64,2 %). Die Überlebensrate fiel damit deutlich geringer aus, als beim ROCK-Inhibitor- und Trehalose-haltigen Kryomedium mit ROCK-Inhibitor-Vorinkubation (TKM ROCK^{+/+}). Dadurch, dass der verwendete Caspase-Inhibitor keinen so deutlichen Effekt herbeiführen konnte (TKM Z-VAD-FMK), ist es verständlich, dass die Vorinkubation mit beiden Inhibitoren keine weitere Steigerung der Überlebensrate (TKM ROCK^{+/+}/Z-VAD-FMK; 71,1 %) im Vergleich zur alleinigen ROCK-Inhibitor-Vorinkubation (TKM ROCK^{+/+}; 79,8 %,) herbeiführte. Die Zellvitalität fiel sogar etwas geringer aus. Bei der Steigerung der Zellüberlebensrate von jungen Neuronen scheinen die Apoptose-Inhibitoren ausschlaggebend zu sein. Aus den hier vorliegenden Daten lässt sich für die Kryokonservierung verhältnismäßig geringer neuronaler Zellmengen schlussfolgern, dass der ROCK-Inhibitor besser geeignet ist als der Caspase-Inhibitor. Weiterführende vergleichende Experimente sollten jedoch noch in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das hier entwickelte Kryokonservierungsprotokoll die effektive Kryokonservierung der L1-immunisolierten

Neurone ermöglicht. Durch Verwendung des ROCK-Inhibitors konnte eine signifikante Verbesserung gegenüber bereits publizierten Protokollen erreicht werden.

4.3.5 Vergleich mit anderen Linienselektionsverfahren

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Linienselektionsstrategien vorgestellt, die eine Anreicherung ESC-abgeleiteter Neurone mit unterschiedlichen selektierbaren Markern ermöglichten. Dabei kamen sowohl Oberflächenmarker als auch Konstrukte, die Gene für fluoreszierende Proteine oder Antibiotikaresistenzen tragen, zum Einsatz. Die polysialisierte Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM (polysialic acid neural cell adhesion molecule; PSA-NCAM) wurde in der Vergangenheit schon mehrfach als Oberflächenmarker zur Isolation von Neuronen aus gemischten neuronalen Populationen verwendet. Mujtaba *et al.* (1999) konnten neuronale Populationen über PSA-NCAM-Immunopanning aus murinen ESCs gewinnen. Carpenter *et al.* (2001) isolierten PSA-NCAM-positive Zellen über MACS (Magnetic-activated cell sorting) oder Immunopanning aus differenzierten hESC-Kulturen. Diese Anreicherung resultierte in einer Population von neuronalen Vorläuferzellen, die zu $86 \pm 6\%$ eine PSA-NCAM-Immunoreaktivität aufwies. Eine Subpopulation der PSA-NCAM-positiven Zellen exprimiert Neuronen-spezifische Antigene (β III-Tubulin oder MAP2). Schmandt *et al.* (2005) konnten eine Linienselektion mit PSA-NCAM-Antikörpern ebenfalls zur Anreicherung muriner ESC-abgeleiteter Neurone heranziehen. Die über Immunopanning gewonnenen neuronalen Populationen erzielten hierbei eine Reinheit von $95,3 \pm 0,9\%$. Allerdings ist es unter Berücksichtigung des Expressionsspektrums von PSA-NCAM verwunderlich, dass durch PSA-NCAM-Immunopanning eine hochaufgereinigte neuronale Population gewonnen werden konnte, denn PSA-NCAM wird nicht ausschließlich von neuronalen Zellen exprimiert (Husmann *et al.*, 1989; Gerety *et al.*, 1997; Müller-Röver *et al.*, 1998). Im ZNS von Nagetieren ist PSA-NCAM sowohl auf neuronalen wie auch glialen Zelltypen und deren Vorläuferzellen zu finden (Seki *et al.*, 1993; Minana *et al.*, 1998). Eine PSA-NCAM-Expression konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit in proliferierenden hESC-NSC-Populationen gefunden werden (vgl. 3.1, Abb. 3.2), weshalb eine neuronale, PSA-NCAM-basierte Linienselektion an humanen Zellen nicht sinnvoll war. Die oben beschriebenen effizienten Aufreinigungsstrategien mittels PSA-NCAM beruhten daher zum einen auf der Verwendung eines spezifischen neuronalen Differenzierungsprotokolls und auf der Tatsache, dass die PSA-NCAM-Expression in der frühen Phase der ESC-Differenzierung fast ausschließlich auf neuronalen Zellen zu finden ist. Glaser *et al.*, (2007) konnten zeigen, dass in späteren Stadien der *in vitro* Differenzierung die PSA-NCAM-Expression auch in

oligodendroglialen Vorläuferzellen zu finden ist. Ein Vergleich der hier vorgestellten PSA-NCAM-basierten Linienselektionsstrategien, insbesondere mit der an hESC durchgeführten PSA-NCAM-basierten Isolation von Neuronen nach Carpenter *et al.* (2001), zeigt, dass die in dieser Arbeit beschriebene L1-basierte Linienselektion zu einer effektiveren Anreicherung (> 96 %) humaner neuronaler Zellen führte (Limbach *et al.*, 2011, Manuskript in Vorbereitung). Zudem sind die selektierten L1-positiven Neurone unreif genug, um weiterführende Zellkulturexperimente durchführen zu können. Eine L1-basierte Linienselektion mit murinen ESCs wurde von Jüngling *et al.* (2003) vorgestellt. Hierbei wurden L1-positive Zellen über Immunopanning aus differenzierten EBs angereichert. Die L1-selektierte Zellpopulation zeigte zu $93,4 \pm 3,4$ % eine Koexpression mit Neurofilament 200 und wies eine eindeutig neuronale Morphologie auf. Dies ist vergleichbar mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode der L1-basierten Linienselektion von hESC-NSCs. Nach L1-basierter Selektion aus hESC-NSCs exprimierten Zelllinienabhängig bis zu $96,2 \pm 1,2$ % der replattierten Zellen den frühen neuronalen Marker β III-Tubulin. Die genetische Linienselektion, bei der Konstrukte eingesetzt werden, die Gene für fluoreszierende Proteine oder Antibiotikaresistenzen tragen, ist eine weitere gebräuchliche Methode. Transgene murine ESCs wurden verwendet, um erfolgreich verschiedene Zelltypen wie Neurone und neuronale Subtypen zu isolieren (Wernig *et al.*, 2002; Wichterle *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2006). Die von Schmandt *et al.* (2005) vorgestellte Fluoreszenz-basierte Linienselektion von $T\alpha$ 1-EGFP-positiven Zellen aus murinen ESCs führte zu einer beachtlichen Reinheit von $98,5 \pm 0,5$ %. Die $T\alpha$ 1-EGFP-selektierten Zellen zeigten eine eindeutig neuronale Morphologie. Wernig *et al.* (2002) wählten für die neuronale Linienselektion murine Tau-EGFP Knock-in ESCs. Diese Zellen zeigten eine neuronal-spezifische Expression des EGFP Proteins. Die Tau-EGFP Knock-in ESCs wurden zu multipotenten neuralen Vorläuferzellen angereichert und durch Wachstumsfaktorentzug zu postmitotischen Neuronen differenziert. Über FACS-Sortierung war eine Selektion dieser Neurone möglich und führte zu einer Reinheit von $93,7 \pm 2,3$ % β III-Tubulin-positiven Zellen. Verglichen mit der L1-basierten Selektion wurden durch die Wahl des Tau-EGFP-Markers reifere Neurone isoliert, die für weiterführende Zellkulturexperimente eher ungeeignet waren. Li *et al.* (1998) setzten eine bifunktionale Selektionsstrategie ein, um neurale Vorläuferzellen zu isolieren. Durch homologe Rekombination integrierten sie das Marker/Reporter Gen β -geo (β -Galactosidase-Neomycin-Phosphotransferase) in den Sox2-Lokus. Unreife, undifferenzierte Zellen des Neuroepithels des gesamten ZNS exprimieren vorwiegend Sox2 (Collignon *et al.*, 1996; Uwanogho *et al.*, 1995). Durch die Selektion mit

G418 konnten nach Retinsäure-induzierter Differenzierung der ESCs Sox2-exprimierende neurale Vorläuferzellen effizient isoliert werden (Li *et al.*, 1998). Nach Wachstumsfaktorentzug zeigten 90 % der isolierten Zellen Neuronen-spezifische Antigene. Anders als bei der Linienselektion durch das Zelladhäsionsmolekül L1 wurden mit dieser Methode nicht gezielt Neurone, sondern neurale Vorläuferzellen isoliert, die anschließend zu einem gewissen Prozentsatz in Neurone differenzierten. Die Expression von EGFP unter der Kontrolle des humanen DCX-Promotors erlaubte eine Selektion von unreifen hESC-abgeleiteten Neuronen mit einer Reinheit von $92,3 \pm 2,5$ % (Ladewig *et al.*, 2008). Hierfür wurden hESC-abgeleitete neurale Stammzellen zunächst stabil mit einem DCX-EGFP-Konstrukt transfiziert. Nach Wachstumsfaktorentzug zeigte sich eine exklusive Expression des EGFPs in Neuronen, die nach FACS-basierter Anreicherung in funktionell aktive Neurone differenzierten. Mit der L1-immuno-basierter Selektion konnten sehr ähnliche Resultate erzielt werden, wobei der Reinheitsgrad bei L1-selektionierten Zellen mit bis zu $96,2 \pm 1,2$ % besser ausfiel. Ein wesentlicher Vorteil bei der genetischen Linienselektion ist, dass die Markierung mit einem fluoreszierenden Protein (z.B. EGFP) die Möglichkeit eröffnet, die Integration und elektrophysiologischen Eigenschaften von ESC-abgeleiteten Neuronen nach Transplantation zu untersuchen. Für diese Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit hESC-NSCs mit einem EGFP- bzw. mRFP-Konstrukt transfiziert, um daraus angereicherte L1-positive Zellen in hippocampalen Schnittkulturen physiologisch zu untersuchen. Ein wesentlicher Nachteil bei der genetischen Modifikation von Zellen ist jedoch zum einen, dass es sich um eine sehr zeitaufwendige Methode handelt, und zum anderen wird das Konstrukt meist ungerichtet in das Genom der Zellen eingebaut. Bei der L1-immuno-basierter Selektion wurden die Zellen hingegen nur für kurze Zeit mit einem Antikörper markiert (ausgenommen die Zellen, die für die elektrophysiologische Charakterisierung herangezogen wurden) und bergen daher kein Risiko in Bezug auf eine neoplastische Transformation. Dies ist besonders bedeutend, sollten die Zellen für weiterführende biomedizinische Anwendungen, wie z.B. Transplantationen, eingesetzt werden. Obwohl die immuno-basierte Selektion von Zellen einige Nachteile mit sich bringt, wie z.B. die Möglichkeit einer Unspezifität einzelner Antikörper oder eine mögliche heterotopische Expression des Zielepitops in unerwünschten Zelltypen (Real *et al.*, 1985; Seldeslagh *et al.*, 1997; Kobari *et al.*, 2001), ist die Aufreinigung von Neuronen auf der Basis endogener, Neuronen-spezifischer Zelloberflächenmoleküle eine attraktive Alternative zu genetisch modifizierten hESC-NSCs. Die immuno-basierte Selektionstrategie ist auch deshalb attraktiv, weil sie auf einer Vielzahl verschiedener Zelllinien Anwendung finden kann. Im

Prinzip kann diese Strategie auf hiPCS Linien, die durch Transkriptor-basierte Reprogrammierung von somatischen Zellen gewonnen wurden (Yu *et al.* 2007, Park *et al.* 2008, Ebert *et al.* 2009), angewendet werden und ermöglicht so Patienten- und Krankheits-spezifische Zelltypen zu isolieren.

Zusammengefasst stellt die in dieser Arbeit beschriebene L1-basierte Linienselektion im Vergleich zu anderen Methoden eine sehr effiziente Strategie dar, um Neurone aus differenzierenden hESC-NSC-Zellkulturen zu isolieren. Ein wesentlicher Vorteil dieser immuno-basierten Methode im Vergleich zu genetischen Linienselektionsstrategien ist, dass sie ohne genetische Modifikation der Zellen auskommt und bei einer Vielzahl von Zelllinien zur Isolierung bestimmter Zelltypen Anwendung finden kann.

4.4 Direkte neurale Konvertierung von hESCs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erfolgreiche Anreicherung junger Neurone aus hESC-NSC-Populationen basierend auf der Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 durchgeführt (vgl. 3.2.2). Diese effiziente Selektionsmethode sollte nun auch zur Gewinnung junger Neurone aus direkt, d.h. adhärent neural differenzierenden hESCs herangezogen werden. Dabei stellte sich heraus, dass hESC-Populationen eine Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 sowohl im proliferierenden Zustand als auch im differenzierten Zustand aufwiesen.

4.4.1 Charakterisierung direkt neural konvertierter hESCs unter Berücksichtigung der Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1

Die meisten der neuronalen Differenzierungsprotokolle für hESCs basieren auf der anfänglichen Bildung von EBs in Gegenwart von Serum/Serumersatz oder auf der Kokultur mit Stromazellen (Zhang *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 2001, Perrier *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; vgl. auch 2.3.3.1). Inzwischen sind eine Reihe von Protokollen bekannt, bei der die neurale Induktion der hESCs direkt und adhärent in der Zellkulturschale erfolgt (Gerrard *et al.*, 2005; Chambers *et al.*, 2009). Diese direkte neurale Konvertierung der hESCs erfolgte dabei durch die gezielte Inhibierung des BMP/SMAD-Signalweges. Gerrard *et al.* (2005) konnten zeigen, dass die Zugabe des BMP-Antagonisten Noggin ausreichend ist, um das Wachstum von extraembryonalen Zellstrukturen zu blockieren und gleichzeitig die Bildung von neuronalen Vorläuferzellen zu fördern. Die Selektion von neuronalen Zellpopulationen wird dabei zum einen durch die Verwendung eines speziellen serumfreien Mediums und zum anderen durch die Zugabe von Noggin gefördert. Chambers *et al.* (2009) hingegen erzielten eine effiziente

neurale Konvertierung von hESCs und hiPSCs durch die Verwendung von Noggin und SB431542, wobei letzterer eine Inhibierung des Lefty/Activin/TGF β -Signalweges durch Blockierung der Phosphorylierung der ALK4-, ALK5- und ALK7-Rezeptoren bewirkt.

Bei der gezielten Anreicherung neuronaler Zellen aus direkt differenzierenden hESCs in dieser Arbeit wurde außerdem der Notch-Signalweg berücksichtigt. Im sich entwickelnden Nervensystem hat Notch eine Schlüsselfunktion bei der Erhaltung des Selbsterneuerungspotentials von NSCs (Yoon *et al.*, 2005; Louvi *et al.*, 2006). Die Notch-Signaltransduktion spielt eine Rolle bei der Kommunikation der Zellen untereinander und damit auch bei der Regulierung der Proliferation und der Differenzierung. Während der Embryonalentwicklung unterstützt die Notch-Signaltransduktion das Überleben und die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (Ohtsuka *et al.*, 2001; Lowell *et al.*, 2006). Die selektive Blockierung des Notch-Signalweges durch den Inhibitor DAPT nach neuraler Induktion (Noggin-Zugabe) sollte demzufolge eine Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen in Neuronen bewirken. Borghese *et al.* (2010) konnten zeigen, dass Komponenten des Notch-Signalweges in sich selbsterneuernden hESC-NSC-Kulturen exprimiert und durch Zugabe von DAPT reguliert werden. Des Weiteren führte die durch DAPT hervorgerufene Notch-Inhibierung, in Kombination mit Wachstumsfaktorentzug zu einer verstärkten neuronalen Differenzierung der hESC-NSCs. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nach der anfänglichen neuronalen Induktion durch adhärenzte Differenzierung in Gegenwart von Noggin zusätzlich zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung der Notch-Signalweg selektiv durch Zugabe des Inhibitors DAPT blockiert, um eine Anreicherung junger Neurone direkt aus hESCs zu erreichen.

Bei der auf Protein- und mRNA-Ebene durchgeführten Analyse der direkt neural konvertierten Zellen zeigte sich, dass es in Gegenwart von Noggin sowie Noggin und DAPT zu einer signifikanten Verringerung der Expression von Pluripotenz-assoziierten Markern (Tra-1-60, Oct-4 und Nanog) und gleichzeitig zu einer verstärkten Expression von neuronalen Markern (Nestin, PSA-NCAM, A2B5 und Pax6) kam (Abb. 3.26 und 3.28). Ebenso konnte eine Verringerung des extraembryonalen endodermalen Markers GATA6 beobachtet werden. Bei der Expression der Marker Sox2 und CD133 konnte im Vergleich zu den nicht-differenzierten hESCs kein Unterschied festgestellt werden. Von Sox2 und CD133 ist bekannt, dass sie sowohl von pluripotenten hESCs als auch von neuronalen Vorläufer-/Stammzellen exprimiert werden (Graham *et al.*, 2003; Sundberg *et al.*, 2009; Pruszek *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 2000). CD133 wurde zudem in einer Subpopulation von Zellen in

Gehirntumoren (Singh *et al.*, 2003), auf Lymphozyten, Melanozyten und hämatopoetischen Zellen (Real *et al.*, 1985; Kobari *et al.*, 2001) nachgewiesen.

Gerrard *et al.* (2005) und Chambers *et al.* (2009) konnten durch die Noggin-Behandlung von differenzierenden hESC-Kulturen eine verminderte Expression von Pluripotenz-assoziierten Markern (Oct-4 und Nanog), eine erhöhte Expression von neuroektodermalen Markern (Nestin, Sox1 und Pax6), und eine Verringerung der Expression von GATA6 sowie eine Expression von neuronalen Markern (β III-Tubulin und MAP2) erreichen. Ähnliches wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet. Hier sei jedoch erwähnt, dass der Fokus dieser Arbeit auf der Gewinnung von L1-positiven Neuronen aus direkt differenzierenden hESC-Populationen lag. Im Vergleich zu den beiden oben genannten Publikationen wurden daher weniger Marker untersucht. Eine vergleichende Analyse zur Effizienz der direkten Konvertierung von hESCs wurde im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied der oben erwähnten Marker konnte, außer für A2B5, zwischen den in Gegenwart von Noggin sowie Noggin und DAPT differenzierten Zellen, nicht festgestellt werden. Der Marker A2B5 wurde von mit Noggin und DAPT behandelten hESCs deutlich geringer exprimiert im Vergleich zu Kulturen, die nur in Gegenwart von Noggin differenziert wurden. Das Epitop A2B5 wird nicht nur auf glialen, sondern auch auf neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Eisenbarth *et al.*, 1979).

Unerwartet war, dass die hier erhaltenen Daten der direkten neuralen Konvertierung von hESCs auf eine geringere Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 in sich differenzierenden hESC-Kulturen hinwiesen im Vergleich zu nicht-differenzierten hESCs (Abb. 3.26 und Ab. 3.28). Durchflusszyometrisch zeigten $80,6 \pm 5,5$ % der untersuchten nicht-differenzierten hESCs (H9) eine L1-Expression, wohingegen nur $59,6 \pm 20,8$ % bzw. $37,6 \pm 14,5$ % der mit Noggin bzw. mit Noggin und DAPT differenzierten hESCs eine L1-Expression aufwiesen. Der überwiegende Teil der L1-positiven Zellen wies keine neuronale Morphologie auf (Abb. 3.26 E und I; Abb. 3.27; Abb. 3.29 A). Eine Abnahme der L1- Expression im Zuge der Differenzierung konnte durch mRNA- und Western Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 3.28 A und B). Eine L1-Proteinexpression bereits im proliferativen Zustand konnte in allen untersuchten hESC-Linien nachgewiesen werden (Abb. 3.29 B), wobei keine neuronale Morphologie der L1-positiven Zellen beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten die ebenfalls in dieser Arbeit an hESC-abgeleiteten NSCs erhaltenen Daten (vgl. 3.2.2) sowie bisher veröffentlichte Studien eine exklusive Expression von L1 auf Neuronen (Rathjen *et al.*, 1984; Appel *et al.* 1993). Bisher sind noch keine Studien bzgl. der Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 in proliferierenden hESCs veröffentlicht. Im Proteinblot von

differenzierten und nicht-differenzierten hESCs waren zwei spezifische Banden für L1 (200 kDa und 180 kDa) zu sehen (Abb. 3.28 B). Durch die regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne des L1-Moleküls können neben der membrangebundenen 200 kDa Form weitere L1-Formen entstehen (Richter-Landsberg *et al.*, 1984; Montgomery *et al.*, 1996; vgl. 1.4.2, siehe Abb. 1.11). Des Weiteren wurden die hESCs für die Proteinisolierung mit Trypsin abgelöst, was ebenfalls eine Spaltung von L1 zur Folge haben kann (Sadoul *et al.*, 1988). Eine β III-Tubulin-Expression konnte sowohl in nicht-differenzierten als auch in beiden differenzierten hESC-Kulturen nachgewiesen werden (Abb. 3.28 B). Der Nachweis des neuronalen Markers β III-Tubulin in nicht-differenzierten hESCs weist darauf hin, dass die unter proliferierenden Bedingungen kultivierten hESCs bereits eine gewisse Spontandifferenzierung aufwiesen. Auf Proteinebene wird L1 in weitaus größeren Mengen von proliferierenden hESCs exprimiert als β III-Tubulin (Abb. 3.28 B). Demnach kann die hohe L1-Expression in proliferierenden hESCs nicht ausschließlich auf die spontane Differenzierung in β III-Tubulin-positiven Neurone zurückgeführt werden. Ein deutlicher Unterschied in der β III-Tubulin-Expression zwischen den mit Noggin (diff. +Noggin/-DAPT) und mit Noggin und DAPT (diff. +Noggin/-DAPT) kultivierten hESCs konnte im Western Blot nicht festgestellt werden. Daher konnte eine DAPT-unterstützte Differenzierung in Neurone, wie es von Borghese *et al.* (2010) bei hESC-NSCs nachgewiesen wurde, nicht gezeigt werden. Auch war kein deutlicher Anstieg der Expression von β III-Tubulin unter proliferierenden Bedingungen und nach adhärenter Differenzierung festzustellen. Eine Koexpression von β III-Tubulin und L1 bei direkt neural konvertierten hESCs sowie eine neuronale Morphologie L1-positiver Zellen konnte mittels immunzytochemischer Färbungen nur für einen Teil der L1-positiven Zellen festgestellt werden (Abb. 3.27).

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Daten, dass alle aus hESC-NSCs differenzierten L1-positiven Zellen eine β III-Tubulin-Expression aufwiesen (vgl. 3.2.2.1) und der Befunde zur DAPT-induzierten neuronalen Differenzierung von hNSCs (Borghese *et al.*, 2010), war zunächst erwartet worden, dass es im Zuge der direkten Differenzierung von hESCs in Gegenwart von DAPT zu einer Anreicherung von Neuronen und damit zu einer verstärkten L1-Expression kommen würde. Demzufolge wurde auch erwartet, dass mehr L1-positive Zellen in der mit Noggin und DAPT behandelten hESC-Population zu finden gewesen wären, als in den nur mit Noggin differenzierten hESC-Kulturen bzw. in den nicht-differenzierten hESC-Populationen. Die hier vorgelegten Daten zeigen jedoch, dass hESCs in Gegenwart von Noggin und DAPT eine geringere Anzahl L1-positiver Zellen aufwiesen als nur mit Noggin differenzierte hESCs. Dies ist jedoch hinsichtlich der Befunde, dass bereits proliferierende,

nicht-differenzierte hESCs eine L1-Expression aufwiesen, schwierig zu bewerten. Die L1-Expression scheint zunächst während der adhären, direkten neuronalen Differenzierung herunterreguliert zu werden. Zudem führte die gewählte Strategie zur direkten Differenzierung der hESCs zu einem sehr geringen Anteil neuronaler Zellen. Eine Aufreinigung von Neuronen aus direkt adhären differenzierten hESCs basierend auf dem Zelladhäsionsmolekül L1, ist daher unter den gewählten Bedingungen nicht möglich. L1-positive Zellen, die nach der 7-tägigen Differenzierung aus hESCs (Daten nicht gezeigt) mittels FACS isoliert wurden, ließen sich nicht erfolgreich replattieren. Um jedoch die L1-Expression in hESCs und in sich differenzierenden hESCs näher zu charakterisieren, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Dissertation konnten hESC-abgeleitete neurale Stammzellen (hESC-NSCs) gewonnen und bei Erhalt ihrer charakteristischen Marker-Expression stabil und über längere Zeiträume (> 100 Passagen) hinweg kultiviert werden. Die neurale Differenzierung der hESCs (Zelllinie H9.2) zu hESC-abgeleiteten NSCs erfolgte unter Verwendung eines EB-basierten Differenzierungsprotokolls. Die proliferativen hESC-NSCs zeigten eine mittlere Verdopplungszeit von 34h. Der Karyotyp der Langzeit-kultivierten hESC-NSCs blieb stabil. Die hESC-NSCs exprimierten eine Reihe von Stammzell-assoziierten Markern, wie Nestin, Sox1, Sox2, Pax6, CD133 und BLBP. Das Expressionsprofil regionalspezifischer Transkriptions-faktoren wies auf eine anteriore und ventral gelegene Identität der *in vitro* generierten hESC-NSCs hin. Unter Wachstumsfaktorentzug differenzierten die hESC-NSCs in β III-Tubulin- und MAP2ab-positive Neurone. Die neural differenzierten Kulturen exprimierten die Subtyp-spezifischen Differenzierungsmarker für glutamaterge, exzitatorische (VGluT1) bzw. GABAerge, inhibitorische (GABA) Neurone.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein effektives Verfahren zur Gewinnung aufgereinigter hESC-abgeleiteter neuronaler Populationen entwickelt werden. Hierfür wurden zwei Strategien eingesetzt. Bei der Promotor-basierten Selektion, wurde die Expression von EGFP unter der Kontrolle des potenziell neuronalspezifischen $T\alpha 1$ -Promotors verwendet, um die genetisch markierten Zellen zu isolieren. Die Immunoselektion basierte hingegen auf der endogenen Expression des humanen Zelladhäsionsproteins L1 auf der Oberfläche neuronaler Zellen. Die Isolierung und Aufreinigung erfolgte jeweils über eine Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS).

Für die Promotor-basierte Selektion wurden hESC-NSCs transient mit dem $T\alpha 1$ -EGFP Konstrukt transfiziert. Die ersten EGFP-positiven Zellen konnten einen Tag nach Wachstumsfaktorentzug-induzierter Differenzierung beobachtet werden. Die Anzahl der EGFP-positiven Zellen nahm entsprechend der Differenzierungsdauer zu, die maximale Expression von EGFP lag am Tag 4 nach Wachstumsfaktorentzug. Die transiente Transfektion von nicht-neuronalen Zelllinien mit dem $T\alpha 1$ -EGFP-Konstrukt wies auf eine überwiegend neuronalspezifische Expression von $T\alpha 1$ hin. Doppelmarkierungen der $T\alpha 1$ -EGFP-transfizierten hESC-NSCs 5 Tage nach Wachstumsfaktorentzug zeigten eine im Vergleich zu $T\alpha 1$ -EGFP-negativen Zellen erhöhte Koexpression der $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen mit dem neuronalen Marker β III-Tubulin. Mit Hilfe der FACS-Sortierung gelang es,

EGFP-positive Zellen bis zu einer Reinheit von $85,8 \pm 2,3\%$ anzureichern. Nach einer weiteren Differenzierungszeit von 3 bzw. 8 Tagen zeigte sich jedoch, dass die aus hESC-NSC-Populationen angereicherten $\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen nur eine geringe Koexpression mit β III-Tubulin aufwiesen und noch überwiegend Nestin-positiv waren. Insgesamt wiesen die Daten auf eine nicht zufriedenstellende Anreicherung einer reinen, neuronalen Zellpopulation hin.

Die immuno-basierte Aufreinigung von Neuronen erfolgte über die Expression des neuronalen Zelladhäsionsmolekül L1. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus neuronaler Differenzierung und L1-basierter Linienselektion eine effiziente Aufreinigung hESC-NSC-abgeleiteter Neurone ermöglichte. Zwei Tage nach Wachstumsfaktorentzug-induzierter Differenzierung der hESC-NSC konnten die ersten L1-positiven Zellen beobachtet werden. Doppelmarkierungen mit neuronalen Markern (β III-Tubulin und MAP2ab) 14 Tage nach Wachstumsfaktorentzug ergaben, dass die L1-positive Zellpopulation einen neuronalen Phänotyp aufwies und die Subtyp-spezifischen Differenzierungsmarker für glutamaterge, exzitatorische (VGluT1) bzw. GABAerge, inhibitorische (GABA) Neurone exprimierten. Unter Verwendung der FACS-Technik wurden hochaufgereinigte Populationen (Zelllinie H9.2: $96,2 \pm 1,2\%$; Zelllinie I3: $77,2 \pm 5,3\%$) von L1-positiven Neuronen aus 7 Tage vordifferenzierten hESC-NSC-Kulturen isoliert. Die isolierten Zellen ließen sich erfolgreich kryokonservieren, waren elektrophysiologisch erregbar und bildeten exzitatorische, glutamaterge und inhibitorische, GABAerge Synapsen. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Kryokonservierungsprotokoll ermöglichte eine durchschnittliche Post-Auftau-Überlebensrate der L1-immunisolierten Neuronen von 80 %. Durch Verwendung des ROCK-Inhibitors konnte eine signifikante Verbesserung gegenüber bereits publizierten Protokollen erreicht werden. Die Markierung der hESC-NSC durch Lentivirale Transduktion fluoreszierender Reportergene (EGFP bzw. mRFP) ermöglichte zudem die Untersuchung von Integration, Migration und synaptischer Plastizität L1-immunoselektionierter Neurone nach Transplantation.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht, ob Neurone auch direkt aus adhärenent neural differenzierten hESCs gewonnen und über das Zelladhäsionsmolekül L1 aufgereinigt werden können. Die hESC-Kulturen (Zelllinie H9) wurden dafür direkt und adhärenent in Gegenwart von Noggin (BMP-Inhibitor) bzw. Noggin und DAPT (Notch-Inhibitor) neural differenziert (sog. direkte neurale Konvertierung). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die über Noggin bzw. Noggin und DAPT differenzierten hESCs eine Abnahme in der Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker (Tra-

1-60, OCT-4 und Nanog), eine erhöhte Expression des hESC-Differenzierungs-assoziierten Markers SSEA-1 sowie eine erhöhte Expression neuraler Marker (Nestin, CD133, PSA-NCAM und A2B5) im Vergleich zu proliferierenden, undifferenzierten hESCs aufwiesen. Allerdings zeigten die unter proliferierenden Bedingungen kultivierten hESC-Kulturen eine stärkere Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 auf Protein- und Transkriptionsebene verglichen mit den adhärent neural differenzierten Kulturen. Die Aufreinigung von Neuronen aus direkt adhärent differenzierten hESCs basierend auf dem Zelladhäsionsmolekül L1 erschien daher keine geeignete Methode zu sein.

Insgesamt demonstriert die vorliegende Arbeit, dass es möglich ist, hESC-abgeleitete Neurone über die endogene Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 bei Erhalt ihrer charakteristischen Eigenschaften mittels der FACS-Technik effektiv anzureichern. Ein wesentlicher Vorteil der L1-immuno-basierten Selektion besteht darin, dass hier keine genetische Modifikation der Zellen vorgenommen wurde. Dadurch sind die L1-immunoisolierten Neurone vor allem auch für biomedizinische Anwendungen, wie Transplantationen oder pharmakologische und toxikologische Untersuchungen von besonderem Interesse.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boué, S., Izpisua Belmonte, J.C. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.

Alessandri, B., Nishioka, T., Heimann, A., Bullock, R.M., Kempinski, O. (2006). Caspase-dependent cell death involved in brain damage after acute subdural hematoma in rats. *Brain Res* 1111, 196-202.

Allegrucci, C., Young, L.E. (2007). Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update* 13, 103-120.

Alvarez-Dolado, M., Pardo, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973.

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and 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.

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699-702.

Appel, F., Holm, J., Conscience, J.F., Schachner, M. (1993). Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J Neurosci* 13, 4764-4775.

Appel, F., Holm, J., Conscience, J.F., von Bohlen und Halbach, F., Faissner, A., James, P., Schachner, M. (1995). Identification of the border between fibronectin type III homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain. *J Neurobiol* 28, 297-312.

de Araujo, P.S. (1996). The role of trehalose in cell stress. *Braz J Med Biol Res* 29, 873-875.
Asada, M., Ishibashi, S., Ikumi, S., Fukui, Y. (2002). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology* 58, 1199-1208.

Asou, H., Miura, M., Kobayashi, M., Uyemura, K., Itoh, K. (1992). Cell adhesion molecule L1 guides cell migration in primary reaggregation cultures of mouse cerebellar cells. *Neurosci Lett* 144, 221-224.

Audebert, S., Koulakoff, A., Berwald-Netter, Y., Gros, F., Denoulet, P., Eddé, B. (1994). Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci* 107, 2313-2322.

Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., Adjaye, J. (2007). Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 500-510.

Bachoud-Levi, A.C., Gaura, V., Brugieres, P., Lefaucheur, J.P., Boisse, M.F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M.J., Bourdet, C., Remy, P., Cesaro, P., Hantraye, P., Peschanski, M. (2006). Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 5, 303-309.

Baldwin T.J., Fazeli M.S., Doherty, P., Walsh, F.S. (1996). Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J Cell Biochem* 61, 502-513.

Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N.Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M.E., Topf, N., Tabar, V., Harrison, N.L., Beal, M.F., Moore, M.A., Studer, L. (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21, 1200-1207.

Beattie, G.M., Crowe, J.H., Lopez, A.D., Cirulli, V., Ricordi, C., Hayek, A. (1997). Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. *Diabetes* 46, 519-523.

Beer, S., Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C., Altevogt, P. (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* 112, 2667-2675.

Bekkers, J.M., Stevens C.F. (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7834-7838.

Benninger, F., Beck, H., Wernig, M., Tucker, K.L., Brüstle, O., Scheffler, B. (2003). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 23, 7075-7083.

Benzing, C., Segschneider, M., Leinhaas, A., Itskovitz-Eldor J., Brüstle O. (2006). Neural conversion of human embryonic stem cell colonies in the presence of fibroblast growth factor-2. *Neuroreport* 17, 1675-1681.

Bernreuther, C., Dihné, M., Johann, V., Schiefer, J., Cui, Y., Hargus, G., Schmid, J.S., Xu, J., Kosinski, C.M., Schachner, M. (2006). Neural Cell Adhesion Molecule L1-Transfected Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery after Excitotoxic Lesion of the Mouse Striatum. *J Neurosci*, 26, 11532-11539.

Bhat, S., Silberberg, D.H. (1988). NCAM-180, the largest component of the neural cell adhesion molecule, is reduced in dysmyelinating quaking mutant mouse brain. *Brain Res* 452, 373-377.

Bonfanti, L. (2006). PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* 80; 129-164.

Borghese, L., Dolezalova, D., Opitz, T., Haupt, S., Leinhaas, A., Steinfarz, B., Koch, P., Edenhofer, F., Hampl, A., Brüstle, O. (2010). Inhibition of Notch Signaling in Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Delays G1/S Phase Transition and Accelerates Neuronal Differentiation In Vitro and In Vivo. *Stem Cells* 28, 955-964.

Brackenbury, R., Thiery, J.P., Rutishauser, U., Edelman, G.M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J Biol Chem* 252, 6835-6840.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., und Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.

Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I., und Blau, H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.

Brittis, P.A., Silver, J., Walsh, F.S., Doherty, P. (1996). Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina. *Mol Cell Neurosci* 8, 120-128.

Brockbank, K.G., Campbell, L.H., Greene, E.D., Brockbank, M.C., Duman, J.G. (2010). Lessons from nature for preservation of mammalian cells, tissues, and organs. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47, 210-217.

Brummendorf, T., Hubert, M., Treubert, U., Leuschner, R., Tarnok, A., Rathjen, F.G. (1993). The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10, 711-727.

Brummendorf, T., Rathjen, F.G. (1995). Cell adhesion molecules1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 2, 963-1108.

Brummendorf, T., Rathjen, F.G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6, 584-593.

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., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., und McKay, R.D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285, 754-756.

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.

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 U S A* 94, 14809-14814.

Bull, N.D., Bartlett, P.F. (2005). The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* 25, 10815-10821.

Burgoyne, R.D., Cambray-Deakin, M.A., Lewis, S.A., Sarkar, S., Cowan, N.J. (1988). Differential distribution of beta-tubulin isotypes in cerebellum. *EMBO J* 7, 2311-2319.

Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Denham, J., Mujtaba, T., Chui, C.P., Rao, M.S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 172, 383-397.

Cerrutti, P., Segovia de Huergo, M., Galvagno, M., Schebor, C., del Pilar Buera, M. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 575-80.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.

Chang, P., Stearns, T. (2000). Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat Cell Biol* 2, 30-35.

Chang, S., Rathjen, F.G., Raper, J.A. (1987). Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* 104, 355-362.

Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C.M., Clark, A.T., Baxter, T., Pyle, A.D., Teitell, M.A., Pelegri, M., Plath, K., Lowry, W.E. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111-123.

Chen, S., Mantei, N., Dong, L., Schachner, M. (1999). Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J Neurobiol* 38, 428-439.

Cho, M.S., Lee, Y.E., Kim, J.Y., Chung, S., Cho, Y.H., Kim, D.S., Kang, S.M., Lee, H., Kim, M.H., Kim, J.H., Leem, J.W., Oh, S.K., Choi, Y.M., Hwang, D.Y., Chang, J.W., Kim, D.W. (2008). Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3392-3397.

Claasen, D., Desler, M.M., Rizzino, A. (2009). ROCK Inhibition Enhances the Recovery and Growth of Cryopreserved Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Reprod Dev* 76, 722-732.

Cleveland, D.W. (1987). The multitubulin hypothesis revisited: what have we learned? *J Cell Biol.* 104, 381-383.

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, 509-520.

Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Bühring, H.J., Mattheus, U., Mack, A., Wagner, H.J., Minger, S., Matzkies, M., Reppel, M., Hescheler, J., Sievert, K.D., Stenzl, A., Skutella, T. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344-349.

Conti, L., Pollard S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., Smith, A. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3, e283.

Cowan, N.J., Dobner, P.R., Fuchs, E.V., Cleveland, D.W. (1983). Expression of human alpha-tubulin genes: interspecies conservation of 3' untranslated regions. *Mol Cell Biol* 3, 1738-1745.

Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., Represa, A. (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 8, 323-335.

Crossin, K.L. Krushel, L.A. (2000). Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 218, 260-279.

Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54, 579-599.

Cunningham, B.A. (1995). Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr Opin Cell Biol* 7, 628-633.

Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., Edelman, G.M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236, 799-806.

Dahlin-Huppe, K., Berglund, E.O., Ranscht, B., Stallcup, W.B. (1997). Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol Cell Neurosci* 9, 144-156.

Daudet, N., Lewis, J. (2005). Two contrasting roles for Notch activity in chick inner ear development: specification of prosensory patches and lateral inhibition of hair-cell differentiation. *Development* 132, 541-551.

Davis, A.A., Temple, S. (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372, 263-266.

Davis, J.Q., Bennett, V. (1994). Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 269, 27163-27166.

DeBernardo, A.P., Chang, S. (1996). Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J Cell Biol* 133, 657-666.

Demyanenko, G.P., Tsai, A.Y., Maness, P.F. (1999). Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knock-out mice. *J Neurosci* 19, 4907-4920.

Dhara, S.K., Stice, S.L. (2008). Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 105, 633-640.

Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E., Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.

Dihne, M., Bernreuther, C., Sibbe, M., Paulus, W., Schachner, M. (2003) A New Role for the Cell Adhesion Molecule L1 in Neural Precursor Cell Proliferation, Differentiation, and Transmitter-Specific Subtype Generation. *J Neurosci*, 23, 6638-6650.

Diniz-Mendes, L., Bernardes, E., de Araujo, P.S., Panek, A.D., Paschoalin, V.M. (1999). Preservation of frozen yeast cells by trehalose. *Biotechnol Bioeng* 65, 572-578.

Doherty, P., Fruns, M., Seaton, P., Dickson, G., Barton, C.H., Sears, T.A. Walsh, F.S. (1990). A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 343, 464-466.

Doherty, P., Walsh, F.S. (1992). Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 2, 595-601.

Doherty, P., Walsh, F.S. (1996). CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth. *Mol Cell Neurosci* 8, 99-111.

Dong, L., Chen, S., Schachner, M. (2003). Single chain Fv antibodies against neural cell adhesion molecule L1 trigger L1 functions in cultured neurons. *Mol Cell Neurosci* 22, 234-247.

Du, Z.W., Zhang, S.C. (2004). Neural differentiation from embryonic stem cells: which way? *Stem Cells Dev* 13, 372-381.

Dunnett S.B., Björklund, A., Lindvall, O. (2001). Cell therapy in Parkinson's disease - stop and go? *Nat Rev Neurosci* 2, 365-369.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., Andrews, P. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 22, 53-54.

Dutcher, S.K., Trabuco, E.C. (1998). The UNI3 gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes delta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Mol Biol Cell* 9, 1293-1308.

Ebeling, O., Duczmal, A., Aigner, S., Geiger, C., Schollhammer, S., Kemshead, J.T., Moller, P., Schwartz-Albiez, R., Altevogt, P. (1996). L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol* 26, 2508-2516.

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F. Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277-280.

Edelman, G.M. (1987). Epigenetic rules for expression of cell adhesion molecules during morphogenesis. *Ciba Found Symp* 125, 192-216.

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.

Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22, 152-165.

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 26, 2467-2474.

Erceg, S., Láinez, S., Ronaghi, M., Stojkovic, P., Pérez-Aragó, M.A., Moreno-Manzano, V., Moreno-Palamques, R., Planells-Cases, R., Stojkovic, M. (2008). Differentiation of human embryonic stem cells to regional specific neural precursors in chemically defined medium condition. *PLoS ONE* 3, e2122.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-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., und Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 154-156.

Faissner, A., Teplow, D.B., Kubler, D., Keilhauer, G., Kinzel, V., Schachner, M. (1985). Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *EMBO J* 4, 3105-3113.

Fallon, J.R. (1985a). Preferential outgrowth of central nervous system neurites on astrocytes and Schwann cells as compared with nonglial cells in vitro. *Z Cell Biol* 100, 198-207.

Fallon, J.R. (1985b). Neurite guidance by non-neuronal cells in culture: preferential outgrowth of peripheral neurites on glia as compared to non-glial cell surfaces. *J Neurosci* 5, 3169-3177.

Farina, V., Zedda, M., Bianchi, M., Marongiu, P., De Riu, P.L. (1999). Tubulin isoforms are differently expressed in developing and mature neurons: a study on the cerebral cortex of newborn and adult rats. *Eur J Histochem* 43, 285-291.

Felding-Habermann, B., Silletti, S., Mei, F., Siu, C.H., Yip, P.M., Brooks, P.C., Cheresch, D.A., O'Toole, T.E., Ginsberg, M.H., Montgomery, A.M. (1997). A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J Cell Biol* 139, 1567-1581.

Fields, R.D., Itoh, K. (1996). Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19, 473-480.

Fischer, G., Kunemund, V., Schachner, M. (1986). Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J Neurosci* 6, 605-612.

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.

Fransen, E., Lemmon, V., Van Camp, G., Vits, L., Coucke, P., Willems, P.J. (1995). CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet* 3, 273-284.

Fransen, E., Van Camp, G., Vits, L., Willems, P.J. (1997). L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet* 6, 1625-1632.

Fransen, E., Van Camp, G., D'Hooge, R., Vits, L., Willems, P.J. (1998a). Genotype-phenotype correlation in L1 associated diseases. *J Med Genet* 35, 399-404.

Fransen, E., D'Hooge, R., Van Camp, G., Verhoye, M., Sijbers, J., Reyniers, E., Soriano, P., Kamiguchi, H., Willemsen, R., Koekkoek, S.K., De Zeeuw, C.I., De Deyn, P.P., Van der Linden, A., Lemmon, V., Kooy, R.F., Willems, P.J. (1998b). L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7, 999-1009.

Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn, S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344, 710-719.

Friedlander, D.R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U., Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 125, 669-680.

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. (1995a). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11879-11883.

Gage, F.H., Ray, J., Fisher, L.J. (1995b). Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18, 159-192.

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.

Gauthaman, K., Fong, C.Y., Subramanian, A., Biswas, A., Bongso, A. (2010). ROCK inhibitor Y-27632 increases thaw-survival rates and preserves stemness and differentiation potential of human Wharton's jelly stem cells after cryopreservation. *Stem Cell Rev* 6, 665-676.

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

Gerrard, L., Rodgers, L., Cui, W. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem Cells*. 23, 1234-1241.

Gilbert, S. F. (2003). *Developmental biology*, 7th edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland.

Glaser, T., Brose, C., Franceschini, I., Hamann, K., Smorodchenko, A., Zipp, F., Dubois-Dalcq, M., Brüstle, O. (2007). Neural cell adhesion molecule polysialylation enhances the sensitivity of embryonic stem cell-derived neural precursors to migration guidance cues. *Stem Cells* 25, 3016-3025.

Glaser, T., Perez-Bouza, A., Klein, K., Brüstle, O. (2005). Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. *FASEB J* 19, 112-114.

Gloster, A., El-Bizri, H., Bamji, S.X., Rogers, D., Miller, F.D. (1999). Early induction of T α 1 α -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 promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J Neurosci* 14, 7319-7330.

Golestaneh, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., DeStefano, D., Fernandez-Bueno, C., Rone, J.D., Haddad, B.R., Gallicano, G.I., Dym, M. (2008). Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev* 18, 1115-1126.

Gómez-Lira, G., Lamas, M., Romo-Parra, H., Gutiérrez, R. (2005) Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci* 25, 6939-6946.

Gozes, I., Littauer, U.Z. (1978). Tubulin microheterogeneity increases with rat brain maturation. *Nature* 27, 411-413.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749-765.

Graves, K.H., Moreadith, R.W. (1993). Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 36, 424-433.

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.

Grumet, M., Edelman, G.M. (1984). Heterotypic binding between neuronal membrane vesicles and glial cells is mediated by a specific cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 98, 1746-1756.

Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., Hasenfuss, G. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440, 1199-1203.

Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechttersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K., Altevogt, P. (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem* 275, 15490-15497.

Hall, J.L., Cowan, N.J. (1985). Structural features and restricted expression of a human alpha-tubulin gene. *Nucleic Acids Res* 13, 207-223.

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., Lengner, C.J., Dausman, J.A., Jaenisch, R. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923.

Heng, B.C., Clement, M.V., Cao, T. (2007). Caspase inhibitor Z-VAD-FMK enhances the freeze-thaw survival rate of human embryonic stem cells. *Biosci Rep* 27, 257-264.

Heng, B.C., Ye, C.P., Liu, H., Toh, W.S., Rufaihah, A.J., Yang, Z., Bay, B.H., Ge, Z., Ouyang, H.W., Lee, E.H., Cao, T. (2006). Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *J Biomed Sci* 13, 433-445.

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.

Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M., van der Kooy, D. (2002). Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* 129, 233-244.

Hoefnagel, C.A., Rutgers, M., Buitenhuis, C.K., Smets, L.A., de Kraker, J., Meli, M., Carrel, F., Amstutz, H., Schubiger, P.A., Novak-Hofer, I. (2001). A comparison of targeting of neuroblastoma with mIBG and anti L1-CAM antibody mAb chCE7: therapeutic efficacy in a neuroblastoma xenograft model and imaging of neuroblastoma patients. *Eur J Nucl Med* 28, 359-368.

Hoffman, S., Sorkin, B.C., White, P.C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. (1982). Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem* 257, 7720-7729.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275.

Hulley, P., Schachner, M., Lubbert, H. (1998). L1 neural cell adhesion molecule is a survival factor for fetal dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 53, 129-134.

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.

Itoh, K., Stevens, B., Schachner, M., Fields, R.D. (1995). Regulated expression of the neural cell adhesion molecule L1 by specific patterns of neural impulses. *Science* 270, 1369-1372.

Itsykson, P., Ilouz, N., Turetsky, T., Goldstein, R.S., Pera, M.F., Fishbein, I., Segal, M., Reubinoff, B.E. (2005). Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci* 30, 24-36.

Izrael, M., Zhang, P., Kaufmann, R., Shinder, V., Ella, R., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Chebath, J., Revel, M. (2007). Human oligodendrocytes derived from human embryonic stem cells: Effect of Noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo. *Mol Cell Neurosci* 34, 310-323.

Jiang, Y.Q., Oblinger, M.M. (1992). Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development. *J Cell Sci* 103, 643-651.

Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., McKay, R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10, 3129-3140.

Johnson, M.A., Weick, J.P., Pearce, R.A., Zhang, S.C. (2007). Functional neural development from human embryonic stem cells: Accelerated synaptic activity via astrocyte coculture. *J Neurosci* 27, 3069-3077.

Jorgensen, O.S. (1995). Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem Res* 20, 533-547.

Jüngling, K., Nägler, K., Pfrieder, F.W., Gottmann, K. (2003). Purification of embryonic stem cell-derived neurons by immunoisolation. *FASEB J* 17, 2100-2102.

Kadmon, G., Altevogt, P. (1997). The cell adhesion molecule L1: species- and cell-typedependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* 61, 143-150.

Kadmon, G., Imhof, B.A., Altevogt, P., Schachner, M. (1995). Adhesive hierarchy involving the cell adhesion molecules L1, CD24, and alpha 6 integrin in murine neuroblastoma N2A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 94-101.

Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., Schachner, M. (1990). The neural cell adhesion molecule NCAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 110, 193-208.

Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N.G., Kleene, R., Schachner, M. (2003). The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 278, 10381-10388.

Kameda, Y., Yamatsu, Y., Kameya, T., Frankfurter, A. (1994). Glomus cell differentiation in the carotid body region of chick embryos studied by neuron-specific class III beta-tubulin isotype and Leu-7 monoclonal antibodies. *J Comp Neurol* 348, 531-543.

Kamiguchi, H., Lemmon, V. (1997). Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J Neurosci Res* 49, 1-8.

Kamiguchi, H., Yoshihara, F. (2001). The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of growth cones. *J Neurosci* 21, 9194-9203.

Kang S.M., Cho, M.S., Seo, H., Yoon, C.J., Oh, S.K., Choi, Y.M., Kim, D.W. (2007). Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 419-424.

Kao, Y.H., Lassová, L., Bar-Yehuda, T., Edwards, R.H., Sterling, P., Vardi, N. (2004). Evidence that certain bipolar cells use both glutamate and GABA. *J Comp Neurol* 478, 207-218.

Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y. Nakanishi, S., Nishikawa, S.I., Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40.

Keirstead H.S., Nistor G., Bernal G., Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25, 4697-4705.

Keller, G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 7, 862-869.

Kenwrick, S., Doherty, P. (1998). Neural cell adhesion molecule L1: relating disease to function. *Bioessays* 20, 668-675.

Kenwrick, S., Watkins, A., De Angelis, E. (2000). Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9, 879-886.

Kilpatrick, T.J., Bartlett, P.F. (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: Requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* 10, 255-265.

Kim, D.S., Lee, J.S., Leem, J.W., Huh, Y.J., Kim, J.Y., Kim, H.S., Park, I.H., Daley, G.Q., Hwang, D.Y., Kim, D.W. (2010). Robust Enhancement of Neural Differentiation from Human ES and iPS Cells Regardless of their Innate Difference in Differentiation Propensity. *Stem Cell Rev* 6, 270-281.

Kim, Y.Y., Ku, S.Y., Liu, H.C., Cho, H.J., Oh, S.K., Moon, S.Y., Choi, Y.M. (2011). Cryopreservation of human embryonic stem cells derived-cardiomyocytes induced by BMP2 in serum-free condition. *Reprod Sci* 18, 252-260.

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.

Kleene, R., Yang, H.B., Kutsche, M., Schachner, M. (2001). The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem* 276, 21656-21663.

Klein, D., Schmandt, T., Muth-Köhne, E., Perez-Bouza, A., Segschneider, M., Gieselmann, V., Brüstle, O. (2006). Embryonic stem cell-based reduction of central nervous system sulfatide storage in an animal model of metachromatic leukodystrophy. *Gene Ther* 13, 1686-1695.

Ko J.Y., Park C.H., Koh H.C., Cho, Y.H., Kyhm, J.H., Kim, Y.S., Lee, I., Lee, Y.S., Lee, S.H. (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable and on-demand source for human dopamine neurons. *J Neurochem* 103, 1417-1429.

Kobari, L., Giarratana, M.C., Pflumio, F., Izac, B., Coulombel, L., Douay, L. (2001). CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 273-281.

Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., Brüstle, O. (2009). A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3225-3230.

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.

Kossack, N., Meneses, J., Shefi, S., Nguyen, H.N., Chavez, S., Nicholas, C., Gromoll, J., Turek, P.J., Reijo-Pera, R.A. (2009). Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 27, 138-149.

Kost, S.A., Oblinger, M.M. (1993). Immature corticospinal neurons respond to axotomy with changes in tubulin gene expression. *Brain Res Bull* 30, 469-475.

Kuhn, T.B., Stoeckli, E.T., Condrau, M.A, Rathjen, F.G., Sonderegger, P. (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115, 1113-1126.

Kunz, S., Ziegler, U., Kunz, B., Sonderegger, P. (1996). Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NgCAM during neurite fasciculation. *J Cell Biol* 135, 253-267.

Ladewig, J., Koch, P., Endl, E., Meiners, B., Opitz, T., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Brüstle, O. (2008). Lineage Selection of Functional and Cryopreservable Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. *Stem Cells* 26, 1705-1712.

Lagenaur, C., Lemmon, V. (1987). An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7753-7757.

Lamba, D.A., Karl, M.O., Ware, C.B., Reh, T.A. (2006). Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12769-12774.

Lee, H., Shamy, G.A., Elkabetz, Y., Schofield, C.M., Harrision, N.L., Panagiotakos, G., Socci, N.D., Tabar, V., Studer, L. (2007). Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells* 25, 1931-1939.

Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Bioechnol* 25, 1468-1475.

Lee, M.K., Rebhun, L.I., Frankfurter, A. (1990a). Posttranslational modification of class III beta-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7195-7199.

Lee, M.K., Tuttle, J.B., Rebhun, L.I., Cleveland, D.W., Frankfurter, A. (1990b). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 17, 118-132.

Lemmon, V., Farr, K.L., Lagenaur, C. (1989). L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603.

Lewis, S.A., Lee, M.G., Cowan, N.J. (1985). Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J Cell Biol* 101, 852-861.

Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., Crowe, L.M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* 61, 3592-3597.

Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M., Crowe, J.H. (1994). Trehalose lowers membrane phase transition in dry yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1192, 7-13.

Lewis, S.A., Gilmartin, M.E., Hall, J.L., Cowan, N.J. (1985). Three expressed sequences within the human beta-tubulin multigene family each define a distinct isotype. *J Mol Biol* 182, 11-20.

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.

Li, X.J., Du, Z.W., Zarnowska, E.D., Pankratz, M., Hansen, L.O., Pearce, R.A., Zhang, S.C. (2005). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 215-221.

Li, X.J., Hu, B.Y., Jones, S.A., Zhang, Y.S., Lavaute, T., Du, Z.W., Zhang, S.C. (2008). Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. *Stem Cells* 26, 886-893.

- Li, X.J., Zhang, S.C. (2006). In vitro differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells. *Methods Mol Bio* 331, 169-177.
- Liesi, P., Dahl, D., Vaheri, A. (1983). Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J Cell Biol* 96, 920-924.
- Liljelund, P., Ghosh, P., van den Pol, A.N. (1994). Expression of the neural axon adhesion molecule L1 in the developing and adult rat brain. *J Biol Chem* 269, 32886-32895.
- Lillford, P.J., Holt, C.B. (2002). In vitro uses of biological cryoprotectants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 945-951.
- Limbach, N., Quandt, T., Opitz, T., Brüstle O. (2011). L1-Based Immunoisolation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. Manuskript in Vorbereitung.
- Lindner, J., Rathjen, F.G., Schachner, M. (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305, 427-430.
- Lindvall, O., Sawle, G., Widner, H., Rothwell, J.C., Björklund, 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* 35, 172-180.
- Lodish, H., Ber, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. (2001). *Zellbiologie*, Spektrum, Akad. Verl., 4. Auflage, 861-912 und 1047-1073.
- Louvi, A., Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7, 93-102.
- Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B., Smith A.G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol* 4, e121.
- Luduena, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 178, 207-275.

Luthi, A., Mohajeri, H., Schachner, M., Laurent, J.P. (1996). Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *J Neurosci Res* 46, 1-6.

MacRae, T.H. (1997). Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 244, 265-278.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., Hochedlinger, K. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55-70.

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 U S A* 78, 7634-7638.

Martini, R., Schachner, M. (1988). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106, 1735-1746.

Martini, R., Xin, Y., Schachner, M. (1994). Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and neurites in culture. *Glia* 10, 70-74.

Martin-Ibañez, R., Unger, C., Strömberg, A., Baker, D., Canals, J.M. and Hovatta, O. (2008). Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Human Reproduction* 23, 2744-2754.

Martin-Ibañez, R., Strömberg, A.M., Hovatta, O., Canals, J.M. (2009). Cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells in the presence of ROCK inhibitor. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 1, Unit 1C.8.

Mason, I. (2007). Initiation to end point: The multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nat Rev Neurosci* 8, 583-596.

McKean, P.G., Vaughan, S., Gull, K. (2001). The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci* 114, 2723-2733.

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.

Meli, M.L., Carrel, F., Waibel, R., Amstutz, H., Crompton, N., Jaussi, R., Moch, H., Schubiger, P.A., Novak-Hofer, I. (1999). Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* 83, 401-408.

Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A., und McKecher, S.R. (2000). Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.

Mikucki, S.A., Oblinger, M.M. (1991). Corticospinal neurons exhibit a novel pattern of cytoskeletal gene expression after injury. *J Neurosci Res* 30, 213-225.

Miller, F.D., Tetzlaff, W., Bisby, M.A., Fawcett, J.W., Milner, R.J. (1989). Rapid induction of the major embryonic α -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.

Mollamohammadi, S., Taei, A., Pakzad, M., Totonchi, M., Seifinejad, A., Masoudi, N., Baharvand, H. (2009). A simple and efficient cryopreservation method for feeder-free dissociated human induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 24, 2468-76.

Molofsky, A.V., Pardal, R., Morrison, S.J. (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 16, 700-707.

Montgomery, A.M., Becker, J.C., Siu, C.H., Lemmon, V.P., Cheresch, D.A., Pancook, J.D., Zhao, X., Reisfeld, R.A. (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* 132, 475-485.

Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K., Schachner, M. (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334, 701-703.

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.

Müller-Röver, 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.

National Institutes of Health (2001). Stem cells: Scientific progress and future research directions. National Institutes of Health, Department of Health and Human Services.

Nelson R.W., Bates P.A., Rutishauser U. (1995). Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 270, 17171-17179.

Nistor, G.I., Totoiu, M.O., Haque, N., Carpenter, M.K., Keirstead, H.S. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* 49, 385-396.

Nolden, L., Brüstle, O. (2008). Humane embryonale Stammzellen; Perspektiven für die Erforschung und Therapie neurologischer Erkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt* 51, 1026-1032.

Nybroe, O., Albrechtsen, M., Dahlin, J., Linnemann, D., Lyles, J.M., Moller, C.J., Bock, E. (1985). Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: characterization of polypeptide C. *J Cell Biol* 101, 2310-2315.

Nybroe, O., Linnemann, D., Bock, E. (1989). Heterogeneity of soluble neural cell adhesion molecule. *J Neurochem* 53, 1372-1378.

Oakley, B.R. (2000). An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol* 10, 537-542.

Oakley, C.E., Oakley, B.R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338, 662-664.

Odorico, J.S., Kaufman, D.S., Thomson, J.A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19, 193-204.

Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F., Kageyama, R. (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* 276, 30467-30474.

Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.

Ostenfeld, T., Joly, E., Tai, Y.T., Peters, A., Caldwell, M., Jauniaux, E., Svendsen, C.N. (2002). Regional specification of rodent and human neurospheres. *Brain Res Dev Brain Res* 134, 43-55.

Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A. (1987). Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 294-298.

- Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., und Etches, R.J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122, 2339-2348.
- 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.
- Pankratz, M.T., Li, X.J., Lavaute, T.M., Lyons, E.A., Chen, X., Zhang, S.C. (2007). Directed neural differentiation of hESCs via an obligated primitive anterior stage. *Stem Cells* 25, 1511-1520.
- Pardue, M.L., Gall, J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64, 600-604.
- Park, I.H., Lerou, P.H., Zhao, R., Huo, H., Daley, G.Q. (2008). Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 3, 1180-1186.
- Pasricha, N. (2007). Impact of voltage-dependent ion channels on neuronal physiology assessed by patch-clamp recordings and computational modeling. Masterarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12543-12548.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2934-2938.
- Probstmeier, R., Fahrig, T., Spiess, E., Schachner, M. (1992). Interactions of the neural cell adhesion molecule and the myelin-associated glycoprotein with collagen type I: involvement in fibrillogenesis. *J Cell Biol* 116, 1063-1070.

Pruszek, J., Sonntag, K.C., Aung, M.H., Sanchez-Pernaute, R., Isacson, O. (2007). Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived cell populations. *Stem Cells* 25, 2257-2268.

Pruszek, J., Ludwig, W., Blak, A., Alavian, K., Isacson, O. (2009). CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells* 27, 2928-2940.

Przyborski, S.A., Cambray-Deakin, M.A. (1996). Developmental regulation of α -tubulin mRNAs during the differentiation of cultured cerebellar granule cells. *Mol Brain Res* 36, 179-183.

Rathjen, F.G., Schachner, M. (1984). Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J* 3, 1-10.

Real, F.X., Houghton, A.N., Albino, A.P., Cordon-Cardo, C., Melamed, M.R., Oettgen, H.F., Old, L.J. (1985). Surface antigens of melanomas and melanocytes defined by mouse monoclonal antibodies: Specificity analysis and comparison of antigen expression in cultured cells and tissues. *Cancer Res* 45, 4401-4411.

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 Biotechnol* 19, 1134-1140.

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

Richter-Landsberg, C., Lee, V.M., Salton, S.R., Shelanski, M.L., Greene, L.A. (1984). Release of the NILE and other glycoproteins from cultured PC12 rat pheochromocytoma cells and sympathetic neurons. *J Neurochem* 43, 841-848.

Roonprapunt, C., Huang, W., Grill, R., Friedlander, D., Grumet, M., Chen, S., Schachner, M., Young, W. (2003). Soluble cell adhesion molecule L1-Fc promotes locomotor recovery in rats after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 20, 871- 882.

Rosenbaum, J. (2000). Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr Biol* 10, R801-R803.

Rose, S.P. (1995). Glycoproteins and memory formation. *Behav Brain Res* 66, 73-78.

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

Roy, N.S., Cleren, C., Singh, S.K., Yang, L., Beal, M.F., Goldman, S.A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12, 1259-1268.

Roy, N.S., Nakano, T., Xuing, L., Kang, J., Nedergaard, M., Goldman, S.A. (2005). Enhancer-specified GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells. *Exp Neurol* 196, 224-234.

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

Ruiz, F., Krzywicka, A., Klotz, C., Keller, A., Cohen, J., Koll, F., Balavoine, G., Beisson, J. (2000). The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, eta-tubulin. *Curr Biol* 10, 1451-1454.

Ruppert, M., Aigner, S., Hubbe, M., Yagita, H., Altevogt, P. (1995). The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol* 131, 1881-1891.

Sadoul, K., Sadoul, R., Faissner, A., Schachner, M. (1988). Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 50, 510-521.

Saffell, J.L., Williams, E.J., Mason, I.J., Walsh, F.S., Doherty, P. (1997). Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18, 231-242.

Salton, S.R., Shelanski, M.L., Greene, L.A. (1983). Biochemical properties of the nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein. *J Neurosci* 3, 2420-2430.

Sammar, M., Aigner, S., Altevogt, P. (1997). Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys Acta* 1337, 287-294.

Sawamoto, K., Yamamoto, A., Kawaguchi, A., Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A., Okano, H. (2001). 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.

Schachner, M. (1991). Cell surface recognition and neuron-glia interactions. *Ann N Y Acad Sci* 633, 105-112.

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.

Schmandt, T., Meents, E., Gossrau, G., Gornik, V., Okabe, S., Brüstle O. (2005). High-purity lineage selection of embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells Dev* 14, 55-64.

Schmidt, C., Kunemund, V., Wintergerst, E.S., Schmitz, B., Schachner, M. (1996). CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 43, 12-31.

Schulz, T.C., Noggle, S.A., Palmarini, G.M., Weiler, D.A., Lyons, I.G., Pensa, K.A., Meedeniya, A.C., Davidson, B.P., Lambert, N.A., Condie, B.G. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. *Stem Cells* 22, 1218-1238.

Seandel, M., James, D., Shmelkov, S.V., Falciatori, I., Kim, J., Chavala, S., Scherr, D.S., Zhang, F., Torres, R., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Murphy, A., Valenzuela, D.M., Hobbs, R.M., Pandolfi, P.P., Rafii, S. (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 449, 346-350.

Seilheimer, B., Schachner, M. (1988). Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J Cell Biol* 107, 341-351.

Seki, T., Arai, Y. (1993). Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 17, 265-290.

Seldeslagh, K.A., Lauweryns, J.M. (1997). NCAM expression in the pulmonary neural and diffuse neuroendocrine cell system. *Microsc Res Tech* 37, 69 -76.

Sherman, J.K., Liu, K.C. (1973). Ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of rough endoplasmatic reticulum. *Cryobiology* 10, 104-118.

Shi, Y., Do, J.T., Despons, C., Hahm, H.S., Schüler, H.R., Ding, S. (2008). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 525-528.

Shin, S., Dalton, S., Stice, S.L. (2005). Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 14, 266-269.

Shin, S., Mitalipova, M., Noggle, S., Tibbitts, D., Venable, A., Rao, R., Stice, S.L. (2006). Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem Cells* 24, 125-138.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.

Solter, D., Knowles, B.B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5565-5569.

Sporns, O., Edelman, G.M., Crossin, K.L. (1995). The neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 542-546.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.

Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., Hochedlinger, K. (2010). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nat* 465, 175-178.

Stern, C.D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci* 2, 92-98.

Stock, K., Nolden, L., Edenhofer, F., Quandt, T., Brüstle, O. (2010). Transcription factor-based modulation of neural stem cell differentiation using direct protein transduction. *Cell Mol Life Sci* 67, 2439-2449.

Stojkovic, M., Stojkovic, P., Leary, C., Hall, V.J., Armstrong, L., Herbert, M., Nesbitt, M., Lako, M., Murdoch, A. (2005). Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 11, 226-231.

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

Studer, L., Tabar, V., McKay, R.D. (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1, 290-295.

Sullivan, K.F. (1988). Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol* 4, 687-716.

Sullivan, K.F., Cleveland, D.W. (1986). Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4327-4331.

Sundberg, M., Jansson, L., Ketolainen, J., Pihlajamäki, H., Suuronen, R., Skottman, H., Inzunza, J., Hovatta, O., Narkilahti, S. (2009). CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2, 113-124.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Tavakoli, T., Xu, X., Derby, E., Serebryakova, Y., Reid, Y., Rao, M.S., Mattson, M.P., Ma, W. (2009). Self-renewal and differentiation capabilities are variable between human embryonic stem cell lines I3, I6 and BG01V. *BMC Cell Biol* 10, 44.

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., und Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.

Thelen, K., Kedar, V., Panicker, A.K., Schmid, R.S., Midkiff, B.R., Maness, P.F. (2002). The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci* 22, 4918-4931.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshal, V.S., und 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-7848.

Thompson, L.H., Andersson, E., Jensen, J.B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., Björklund, A. (2006). Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp Neurol* 198, 183-198.

Tsai, R.Y., Kittappa, R., McKay, R.D. (2002). Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2, 707-712.

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 U S A* 97, 14720-14725.

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.

Vaughan, S., Attwood, T., Navarro, M., Scott, V., McKean, P., Gull, K. (2000). New tubulins in protozoal parasites. *Curr Biol* 10, R258-R259.

Vaughn, D.E., Bjorkman, P.J. (1996). The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 16, 261-273.

Villasante, A., Wang, D., Dobner, P., Dolph, P., Lewis, S.A., Cowan, N.J. (1986). Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. *Mol Cell Biol* 6, 2409-2419.

von Bohlen und Halbach, F., Taylor, J., Schachner, M. (1992). Cell typespecific effects of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM on diverse second messenger systems. *Eur J Neurosci* 4, 896-909.

Walter, Z., Szostek, M., Weglarska, D., Raguszevska, D., Jablonski, M., Lorenz, F., Skotnicki, A.B. (1999). Methods for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. *Przeegl Lek* 56, 34-39.

Wang, S., Roy, N.S., Benraiss, A., Goldman, S.A. (2000). Promoter-based isolation and fluorescenceactivated 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. (1997). Isolation of neuronal precursors by sorting embryonic forebrain transfected with GFP regulated by the Talpa tubulin promoter. *Nat Biotechnol* 16, 196-201.

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 T1 tubulin promoter. *Nat Biotech* 16, 196-201.

Ware, C.B., Nelson, A.M., Blau, C.A. (2006). A comparison of NIH-approved human ESC lines. *Stem Cells* 24, 2677-2684.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T, Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotech* 25, 681-686.

Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescovi, A.L., Morshead, C., Craig, C.G., van der Kooy, D. (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 19, 387-393.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblast into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.

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.

Wernig, M., Zhao, J.P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5856-5861.

Wheeler, M.B. (1994). Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 6, 563-568.

Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A., Jessel, T.M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110, 385-397.

Williams, A.F., Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6, 381-405.

Windrem, M.S., Nunes, M.C., Rashbaum, W.K., Schwartz, T.H., Goodman, R.A., McKhann, G. 2nd, Roy, N.S., Goldman, S.A. (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 10, 93-97.

Wolfer, D.P., Mohajeri, H.M., Lipp, H.P., Schachner, M. (1998). Increased flexibility and selectivity in spatial learning of transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *Eur J Neurosci* 10, 708-717.

Wolff, A., Denoulet, P., Jeantet, C. (1982). High level of tubulin microheterogeneity in the mouse brain. *Neurosci Lett* 31, 323-328.

Wolff, J.M., Frank, R., Mujoo, K., Spiro, R.C., Reisfeld, R.A., Rathjen, F.G. (1988). A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 263, 11943-11947.

Wong, E.V., Schaefer, A.W., Landreth, G., Lemmon, V. (1996). Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 66, 779-786.

Wood, P.M., Schachner, M., Bunge, R.P. (1990). Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci* 10, 3635-3645.

Woo, S.M., Kim, J., Han, H.W., Chae, J.I., Son, M.Y., Cho, S., Chung, H.M., Han, Y.M., Kang, Y.K. (2009). Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells. *BMC Neurosci* 10, 97.

Xu, G., Nie, D.Y., Wang, W.Z., Zhang, P.H., Shen, J., Ang, B.T., Liu, G.H., Luo, X.G., Chen, N.L., Xiao, Z.C. (2004). Optic nerve regeneration in polyglycolic acidchitosan conduits coated with recombinant L1-Fc. *NeuroReport* 15, 2167-2172.

Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E.D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R.A., Thomson, J.A., Zhang, S.C. (2005). Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 781-790.

Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* 208, 2819-2830.

Yang, D., Zhang, Z.J., Oldenburg, M., Ayala, M., Zhang, S.C. (2008). Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells* 26, 55-63.

Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.

Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21, 183-186.

Yoon, Y.H., Pope, J.M., Wolfe, J. (1998). The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases. *Biophysical journal* 74, 1949-1965.

Yoon, K., Gaiano, N. (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: Insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8, 709-715.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

Zander, J.F., Münster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gómez-Lira, G., Heinemann, U., Gutiérrez, R., Laube, G., Ahnert-Hilger, G. (2010). Synaptic and vesicular coexistence of VGluT and VGAT in selected excitatory and inhibitory Synapses. *J Neurosci* 30, 7634-7645.

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 Biotechnol* 19, 1129-1133.

Zhang, S.C. (2006). Neural subtype specification from embryonic stem cells. *Brain Pathol* 16, 132-142.

Zhou, Q., Anderson, D.J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109, 61-73.

Zhou, W., Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2667-2674.

Zisch, A.H., Stallcup, W.B., Chong, L.D., Dahlin-Huppe, K., Voshol, J., Schachner, M., Pasquale, E.B. (1997). Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cck5. *J Neurosci Res* 47, 655-665.

7. 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. Ferner versichere ich, dass die vorliegende Arbeit bei keiner anderen Hochschule als Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form eingereicht wurde. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Diese Dissertation wird unter dem nachstehend aufgeführten Titel auszugsweise veröffentlicht.

Limbach N., Quandt T., Opitz T. and Brüstle O. (2012). L1-Based Immuno-Isolation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. In Vorbereitung

Bonn, im September 2011

Nina Limbach