

In vitro Differenzierung und Aufreinigung
ES-Zell-abgeleiteter neuronaler Vorläuferzellen
der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von Eybe Feeke Sebastian Meents
aus Bonn

2006

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver Brüstle
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Gieselmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2005

Institut für Rekonstruktive Neurobiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Oliver Brüstle

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

Widmung

In Dankbarkeit für eine lehrreiche und schöne Zeit in der Pädiatrie am Krankenhaus Düren, widme ich diese Arbeit meiner derzeitigen Chefin Frau Elisabeth Keller-Röttger (kommissarische Leitung der Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde des Krankenhauses Düren).

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung in das Thema	7
1.1	Neuronaler Zellersatz.....	7
1.2	Embryonale Stammzellen als Ressource für den neuronalen Zellersatz	9
1.3	In vitro Differenzierung pluripotenter Stammzellen	9
1.3.1	Gewinnung neuronaler Vorläuferzellen aus ES-Zellen	10
1.3.2	Schlüsselprobleme bei der therapeutischen Nutzung ES-Zell abgeleiteter Vorläuferzellen	12
1.3.3	Methoden für die Gewinnung aufgereinigter Vorläuferzellen aus ES-Zellen	13
1.4	PSA-NCAM – ein Oberflächenmarker neuronaler Zellen	16
1.5	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Zusammensetzung der hergestellten Medien und Stammlösungen	21
2.1.2	Verwendete Medien	21
2.1.3	Pufferlösungen	22
2.1.4	Enzyme, Faktoren und Oberflächenbeschichtungen.....	22
2.1.5	Verwendete Antikörper.....	23
2.1.6	Kunststoffmaterial.....	24
2.1.7	Verwendete Laborgeräte	24
2.2	In vitro Differenzierung embryonaler Stammzellen.....	24
2.2.1	Zellkalender.....	31
2.2.2	Immunopanning	31
2.2.3	Fixieren der Zellkulturen.....	33
2.2.4	Immunfluoreszenzfärbungen.....	34
2.3	Pilotversuche zur stereotaktischen Transplantation in das Gehirn neonataler Ratten	36
2.3.1	Vorbereitung der Zellen für die Transplantation	37
2.3.2	Transplantationstechnik	37
2.3.3	Histologische Aufarbeitung der Empfängergehirne.....	37
2.3.4	Histologische und immunhistochemische Gewebefärbungen	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Vorarbeiten zur Optimierung der Bedingungen des Immunopannings.....	40
3.2	PSA-NCAM Immunopanning im N3L-Stadium	42
3.2.1	Charakterisierung der über Immunopanning von N3L-Kulturen erhaltenen Zellpopulationen.....	43
3.3	Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin in N3FL-Kulturen	45
3.4	PSA-NCAM Immunopanning von N3FL-Kulturen	47
3.4.1	Charakterisierung der über PSA-NCAM-Immunopanning von N3FL-Kulturen erhaltenen Zellpopulationen	49
3.5	Versuche zur Proliferation der aus N3FL-Kulturen selektierten PSA-NCAM-positiven neuronalen Zellen	54
3.6	Pilotexperimente zur Transplantation aus N3FL-Kulturen selektierter PSA-NCAM- positiver Vorläuferzellen	54
3.6.1	Histopathologische Untersuchung der Transplantate.....	55
3.6.2	Inkorporation und Differenzierung der transplantierten Zellen.....	55
4	Diskussion.....	58

4.1	Aufreinigung PSA-NCAM-positiver Zellen aus ES-Zell-abgeleiteten neuronalen Kulturen	58
4.2	PSA-NCAM und A2B5 - bipotentes Differenzierungsmodell neuraler Stammzellen	62
4.3	<i>Lineage Selection</i> -Verfahren zur Gewinnung ES Zell-abgeleiteter neuronaler Zellen	63
4.4	Pilotexperimente zur Transplantation selektionierter PSA-NCAM-positiver Vorläuferzellen	65
4.5	Mögliche Perspektive: Medizinische Anwendung ES-Zell-abgeleiteter Neurone beim Menschen	66
5	<i>Fazit und Ausblick</i>	68
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	70
7	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	76
8	<i>Tabellenverzeichnis</i>	76
	<i>Danksagung</i>	78
	<i>Lebenslauf</i>	79

1 Einführung in das Thema

1.1 Neuronaler Zellersatz

Neurone stellen den erregungsleitenden Grundbestandteil des menschlichen Zentralnervensystems dar. Bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen und bei traumatischen oder vaskulären Läsionen kommt es in Gehirn und Rückenmark zum Verlust von Neuronen. Dieser Verlust ist weitestgehend irreversibel. Nach Abschluss der Entwicklung können verloren gegangene Nervenzellen vom Körper nicht wieder ersetzt werden. Bei größeren Zelluntergängen des Gehirns kann durch umfangreiche Rehabilitationsmaßnahmen der aufgetretene Schaden reduziert werden, der Therapie sind jedoch durch den Wegfall von Neuronen Grenzen gesetzt. Zwar beschrieben Eriksson et al. (1998), dass auch bei Erwachsenen eine Neurogenese stattfindet, diese ist jedoch lokal begrenzt und nicht sehr umfangreich. Inwieweit solch eine körpereigene Regeneration stimulierbar ist, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Da derzeit die Ätiologie der meisten neurodegenerativen Erkrankungen unbekannt ist, beschränkt sich die medikamentöse Therapie auf die Symptomatik.

Eine ganz neue Therapiestrategie stellt der Zellersatz dar. Das Einbringen von Zellen in das Gehirn eines Patienten verspricht beim jetzigen Forschungsstand die besten Perspektiven für die Behandlung solcher Erkrankungen. Das Hauptproblem für den Zellersatz im Zentralnervensystem stellt die limitierte Verfügbarkeit von Spenderzellen dar. Transplantate in das Gehirn erfordern unreife Zellen. Solche Zellen bieten die besten Voraussetzungen, durch das bereits vorhandene Gewebe zu migrieren und die unterschiedlichen Funktionen verloren gegangener Neurone neu zu besetzen. Eine ausreichend große Menge an unreifen neuronalen Zellen konnte bislang nur aus fetalem Gewebe isoliert werden. Bei den durchgeführten Transplantationen zur Behandlung des M. Parkinson beim Menschen war bislang Gewebe von mehreren abortierten Feten erforderlich (Kilpatrick und Bartlett, 1993; Kordower et al. 1995).

Seit geraumer Zeit werden Verfahren erprobt, die es erlauben, einmal gewonnene unreife Vorläuferzellen in großer Zahl zu vermehren. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, die Zahl einmal isolierter Vorläuferzellen in klinisch signifikantem Ausmaß zu steigern. Zudem begrenzt die Proliferation der Vorläuferzellen unter Zusatz von Wachstumsfaktoren ihr Differenzierungsspektrum. Einige Zelltypen sind zahlenmäßig unterrepräsentiert oder fehlen gänzlich. Die Immortalisierung der Zellen durch Einschleusung von Onkogenen erhöht die

Proliferationsrate der Zellen, so dass große Zellmengen generiert werden können. Allerdings wird durch das Einschleusen eines Onkogens auch die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Malignomen gesteigert (Brüstle und McKay 1996), so dass eine therapeutische Anwendung beim Menschen aller Voraussicht nach nicht sinnvoll ist. Xenotransplantate wie die Transplantation von porcinen dopaminergen Neuronen in Parkinsonpatienten (Armstrong et al. 2002; Jacoby et al. 2002) bergen das Risiko, tierische Pathogene auf den Menschen zu übertragen. Diese Befürchtungen sind im Kontext der BSE-Krise besonders ernstzunehmen.

Unklar ist derzeit noch das Potential, aus adulten Stammzellen im großen Maßstab neuronale Gewebe für den Zellersatz im Nervensystem zu bilden. Jiang et al. (2002) isolierten sogenannte *multipotent adult progenitor cells (MAPCs)* aus dem Knochenmark von Mäusen. Aus diesen MAPCs konnten Derivate der drei Keimblätter abgeleitet werden. Nach 70 Zellverdoppelungen *in vitro* konnten Zellen differenziert werden, die in Morphologie und Phänotyp Endothel, Neuronen, Gliazellen und Hepatozyten entsprachen (Schwartz et al., 2002). Bicknese et al. (2002) beschrieben Stammzellen aus dem Nabelschnurblut, sogenannte „*umbilical cord multipotent stem cells (UC-MC)*“, die imstande waren, neuronale und gliale Marker zu exprimieren. Aufgrund der einfachen Zugänglichkeit wären adulte Stammzellen aus der Haut besonders geeignet, um sie *in vitro* neural zu differenzieren. Toma et al. (2001) entwickelten aus Hautzellen Zellen, die Marker von Neuronen, Glia, glatter Muskulatur und Fettzellen exprimierten. Die als „*skin-derived precursors (SKP)*“ bezeichneten Zellen konnten *in vitro* proliferiert werden und könnten eine autologe Quelle für den Ersatz von Körperzellen darstellen. Sie hätten damit den Vorteil, nicht einer immunologischen Abstoßungsreaktion des Empfängers ausgesetzt zu sein.

Allerdings stellt die Immunkompatibilität bei der Übertragung von Nervenzellen im Vergleich zur Transplantation in anderen Geweben ohnehin ein geringeres Problem dar. Der immunologischen Abwehrreaktion kommt im Zentralen Nervensystem (ZNS) eine Sonderstellung zu, da die Blut-Hirn-Schranke nur begrenzt eine Abstoßungsreaktion zulässt. Eine immunsupprimierende Therapie scheint bei der Transplantation neuraler Zellen deshalb nur temporär erforderlich (Larsson et al. 2001).

1.2 Embryonale Stammzellen als Ressource für den neuronalen Zellersatz

Die Anwendung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) bietet interessante Perspektiven, das Problem der limitierten Verfügbarkeit von Spenderzellen zu umgehen. Embryonale Stammzellen lassen sich aus der inneren Zellmasse (Embryoblast) des Embryo im Blastozysten-Stadium gewinnen (Evans und Kaufmann, 1981). Dieses innere Zellkompartiment, bestehend aus wenigen Zellen, wird von einer Hülle aus Trophektodermzellen umsäumt, die später fötale Bestandteile der Plazenta bilden. ES-Zellen werden einmalig aus Blastozysten über eine sogenannte „*Immunosurgery*“ isoliert und anschließend *in vitro* weiter vermehrt (siehe Abb.4). Zwei wesentliche Eigenschaften machen sie als Spenderquelle für Zelltransplantate so interessant:

- Pluripotenz
- Uneingeschränkte Vermehrbarkeit

Die Pluripotenz erlaubt es, aus ihnen Derivate aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu entwickeln. Murine ES-Zellen lassen sich in Anwesenheit von LIF (*leukemia inhibitory factor*) in diesem undifferenzierten Stadium nahezu unbegrenzt vermehren (Smith et al., 1988). LIF ist ein Faktor, der die spontane Differenzierung von ES-Zellen inhibiert und es ermöglicht, manche ES-Zelllinien auch ohne sogenannte Feederzellen zu kultivieren. ES-Zellen stellen demnach eine Quelle dar, um nahezu beliebige Mengen verschiedenster Zelltypen *in vitro* zu erzeugen. Diese kontinuierliche Erzeugung von Spenderzellen hätte den großen Vorteil, nicht immer wieder erneut auf embryonales Material zurückgreifen zu müssen. Die Aufgabe der nächsten Jahre wird es sein, zu erforschen, unter welchen Bedingungen sich die ES-Zellen in bestimmte Gewebe differenzieren lassen.

1.3 *In vitro* Differenzierung pluripotenter Stammzellen

McKay (1997) definiert eine Stammzelle über die Eigenschaft der Selbsterneuerung, die eine ausreichende Vermehrbarkeit der Zelle gewährleistet, und das Potential, in reifere Tochterzellen auszureifen. Eine Vorläuferzelle hingegen ist im Vergleich zur Stammzelle weiter in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt. Der Begriff der Vorläuferzelle ist also weniger streng gefasst und bedeutet lediglich, dass eine Zelle in der Entwicklung vor einer anderen, bereits reiferen Zelle steht.

Die Differenzierung pluripotenter Stammzellen erfolgt in sehr kleinen Schritten. Viele Stammzellen legen sich nicht direkt auf ihr endgültiges Gewebe fest, sondern durchlaufen mehrere Stadien von Vorläuferzellen. Das wohl am besten charakterisierte Modell der Stammzellendifferenzierung stellt die Hämatopoese dar. Zellen des Mesoderms entwickeln sich zu einer pluripotenten Stammzelle, die noch alle Blutzellen zu bilden vermag. Diese entwickelt sich nun entweder in eine lymphoide oder myeloide Stammzelle, wodurch die künftige Funktion eingeschränkt wird. Die myeloide Stammzelle kann sich nun zu einem Promyelozyten oder einem Erythroblasten differenzieren, sich also weiter spezialisieren. Aus dem Promyelozyten entsteht dann schließlich eine Zelle der drei verschiedenen Typen von Granulozyten (Weiss, 1997).

1.3.1 Gewinnung neuronaler Vorläuferzellen aus ES-Zellen

Für die Entwicklung des ZNS existieren bereits ähnliche Stammbäume mit verschiedenen Vorläuferzellen. Dieser Vorgang präsentiert sich komplexer als zunächst angenommen. Zunächst erscheint es wichtig, einige Begriffe zu definieren. Die Bezeichnung "neural" leitet sich vom Neuralrohr ab und gibt Auskunft über das Differenzierungspotential einer Zelle. Eine neurale Vorläuferzelle kann sich noch in alle drei prinzipalen Zelllinien des Nervensystems, Neurone, Glia und Oligodendrozyten, entwickeln. Ist ein Zellvorläufer bereits für die Entwicklung zu einer Nervenzelle determiniert, wird er als "neuronal" bezeichnet. Man geht davon aus, dass sich aus solchen Zellen keine Gliazellen mehr bilden können.

Für die Differenzierung von ES-Zellen in neurale und neuronale Phänotypen wurden bereits unterschiedliche Strategien entwickelt. Bain et al. kultivierten ES-Zellen der Maus in Aggregaten und konnten zeigen, dass nach Behandlung mit Retinsäure zahlreiche neuronale Phänotypen induzierbar sind (Bain et al., 1995). Die Zellen exprimierten das für neuronale Zellen typische β -III-Tubulin und bildeten lange Zellfortsätze. Finley et al. beschrieben die Ausbildung von exzitatorischen Synapsen und neuronaler Polarität bei diesen mit Retinsäure behandelten Zellen (Finley et al., 1996). Die immunhistochemischen und die elektrophysiologischen Eigenschaften entsprachen denen nativer Neurone, allerdings enthielten diese Kulturen noch andere, z.T. undifferenzierte Zellen.

Okabe et al. (1996) generierten aus ES-Zellen zahlreiche, in ihrem Phänotyp sehr unterschiedliche Typen von Neuronen ohne Zusatz von Retinsäure. Hierbei wurden ES-Zellen

zunächst zu Embryoidkörpern aggregiert und formten anschließend unter Gegenwart von *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) Cluster proliferierender Vorläuferzellen. Dabei erlaubte die Expansion unter Zusatz von FGF-2 eine enorme Anreicherung neuroepithelialer Zellen. Aus diesen neuralen Vorläuferzellen differenzierten sich unter FGF-2-Entzug Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. Die weitere Kultivierung mit einem serumhaltigen Medium brachte eine große Vielfalt an Neuronen hervor, die zahlreiche neuronenspezifische Marker sowie exzitatorische und inhibitorische Neurotransmitter exprimierten. Dieses Verfahren scheint deshalb besonders geeignet, um ES-Zell-abgeleitete neurale Zellen mit großer Effizienz zu erhalten. Unter Verwendung dieses Protokolls konnten durch Lineage Selection-Verfahren Neurone in hoher Reinheit aus murinen ES Zellen gewonnen werden (Schmandt, Meents et al., 2005; Wernig et al., 2002)

Der erste immunhistochemisch fassbare Schritt einer Zelle hin zur Ausbildung eines neuralen Phänotyps ist die Expression von Nestin. Nestin ist ein Intermediärfilament, das charakteristischerweise in neuralen Vorläuferzellen exprimiert wird (Lendahl und McKay, 1990b), aber auch außerhalb des Nervensystems, z.B. in Muskelzellvorläufern vorkommt (Zimmerman et al., 1994). Nestin-positive neurale Vorläufer haben noch das Potential, sich in alle im Nervensystem vorkommende Zelltypen zu differenzieren. Aus diesen neuralen Stammzellen können sich Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten entwickeln (McKay, 1997; Reynolds et al., 1992). Im Verlauf der weiteren Ausreifung wird die Expression von Nestin durch andere, Zelltyp-spezifische Intermediärfilamente abgelöst.

Die Differenzierung zu Zellen des ZNS wird durch Wachstumsfaktoren (Vicario-Abejon et al., 1995) und die lokalen Einflüsse regionalspezifisch exprimierter Faktoren beeinflusst (Brüstle et al., 1995; Campbell et al., 1995). Durch Transplantation in verschiedene Gehirnregionen ist es möglich, neurale Vorläuferzellen unterschiedlichen Umgebungseinflüssen auszusetzen und die Plastizität ihres Differenzierungspotentials zu ergründen (Brüstle und McKay 1996; Wernig et al., 2004).

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass wesentliche Befunde, die an ES-Zellen der Maus erhoben wurden, auf menschliche Zellen übertragbar sind. Es ist möglich, aus humanen ES-Zellen neurale Vorläuferzellen zu differenzieren, die alle drei Zelltypen des ZNS zu bilden vermögen (Carpenter et al., 2001; Keirstead et al., 2005; Nistor et al., 2005; Reubinoff et al., 2001; Shin et al., 2005; Tabar et al., 2005; Zhang et al., 2001). Ebenfalls konnten gezielt neuronale Subpopulationen aus humanen ES-Zellen gewonnen werden. Besonders die bei der

Parkinsonschen Krankheit fehlenden dopaminergen (Buytaert-Hoefen et al., 2004; Park et al., 2005; Schulz et al., 2004; Zeng et al., 2004) Neurone standen dabei bisher im Interessenfokus.

Transplantiert man neuronale Vorläuferzellen in die Gehirnventrikel neonataler Mäuse, besitzen sie die Fähigkeit, in zahlreiche Regionen des ZNS zu migrieren und in Neurone und Gliazellen auszudifferenzieren (Zhang et al., 2001). Park et al. (2005) transplantierten ES-Zell-abgeleitete dopaminerge Neurone, die frei von undifferenzierten Zellen waren. Die Untersuchung der Transplantate zeigte, dass die Nervenzellen zwar überlebten, jedoch ohne das im Tiermodell zur Parkinson-Krankheit erwünschte Dopamin zu produzieren. Tabar et al. (2005) transplantierten neurale Vorläufer aus humanen ES-Zellen in das Striatum 3-Monate-alter Ratten und konnten nachweisen, dass die Spenderzellen wie die Empfängertierzellen in das Hirnparenchym migrierten und regionalspezifisch ausdifferenzierten.

1.3.2 Schlüsselprobleme bei der therapeutischen Nutzung ES-Zell abgeleiteter Vorläuferzellen

Eine therapeutische Nutzung embryonaler Stammzellen für den Zellersatz setzt voraus, dass die für die jeweilige Erkrankung erforderlichen Spenderzellen in der Zellkultur gezielt entwickelt werden können. Die in vitro hergestellten Zellen müssen nach Transplantation in der Lage sein, die Funktionen der defekten oder verloren gegangenen Zellen zu ersetzen. Diese gezielte Differenzierung bedarf komplexer Zellkulturverfahren, die gewährleisten, dass die erzeugten Spenderzellen stabil in dem jeweiligen Phänotyp verankert bleiben.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die therapeutische Nutzung ES-Zell-abgeleiteter Spenderzellen ist die Reinheit der Zellpräparation. Brüstle et al. (1997) transplantierten ES-Zell-abgeleitete neurale Vorläuferzellen in die Hirnventrikel embryonaler Ratten im Zeitraum des 16.-18. Embryonaltages (E16-18) und untersuchten diese zwischen dem 0.-15. Postanataltag (P0-P15). Neben einer Inkorporation der Zellen in unterschiedlichste Hirnareale verblieben einige Zellen im Ventrikellumen. Diese Zellen formten große Aggregate mit dicht nebeneinander stehenden Neuralrohr-artigen Strukturen, welche Nestin exprimierten. Die Zellen zeigten lumennah eine hohe mitotische Aktivität sowie in der Peripherie eine Expression von Markern, die auf eine weiter fortgeschrittene neuronale Differenzierung der Zellen hindeuteten.

Ein Teil der im Ventrikel verbliebenen Zellen exprimiert alkalische Phosphatase (AP), ein Enzym, das sich typischerweise in undifferenzierten ES-Zellen findet und sich im Laufe der fortschreitenden Differenzierung verliert (Bernstine et al., 1977). In den später postnatal untersuchten Hirnen (P15) exprimierten nur noch wenige Zellen AP, vereinzelt waren jedoch Inseln von Zellen mit adenoiden, chondroiden oder epidermalen Architekturen innerhalb der intraventrikulären Cluster sichtbar. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass unreife ES-Zellen der transplantierten Suspension Teratome bilden.

Die Entstehung von Teratomen aus transplantierten ES-Zellen wurde bereits für ES-Zell-abgeleitete Hepatozyten beschrieben, die sich in der Frühphase der Differenzierung befanden (Choi et al. 2002; Damjanov et al. 1993). Bei der Transplantation ES-Zell-abgeleiteter Hepatozyten in die Leber von Mäusen fanden Chinzei et al. eine Korrelation zwischen dem Differenzierungsstadium der in die Vena portae injizierten Zellen und dem Auftreten von Teratomen. Teratome entstanden nur bei Transplantation von ES-Zell-abgeleiteten Leberzellen, die sechs oder weniger Tage als Zellaggregate im Embryoidkörper-Stadium kultiviert wurden (Chinzei et al., 2002).

Daher wird deutlich, dass die Transplantatzellen eine hohe Reinheit und eine zuverlässige Differenzierung aufweisen müssen, um keine unerwünschten Gewebe im Körper des Empfängers zu bilden. Zu diesem Zweck muss nach geeigneten Aufreinigungsverfahren für ES-Zell-abgeleitete Zelltypen gesucht werden. Zellen, die unreif sind oder einen falschen Phänotyp besitzen, könnten sonst bei einer zukünftigen Anwendung am Menschen fatale Folgen für den Patienten haben.

1.3.3 Methoden für die Gewinnung aufgereinigter Vorläuferzellen aus ES-Zellen

Für die Erzeugung hoch aufgereinigter definierter Zellpopulationen aus ES-Zellen stehen prinzipiell zwei Verfahren zur Verfügung. Das Verfahren der *gerichteten Differenzierung* zielt darauf ab, die Entwicklung aller Zellen einer Kultur in Richtung einer bestimmten Zellpopulation zu lenken. Die Verwendung von auf bestimmte Zelltypen abgestimmten Medien, Wachstumsfaktoren und Oberflächenbeschichtungen sowie die enzymatische Behandlung der Zellen sind Mittel, die Richtung der Zelldifferenzierung zu beeinflussen (Brüstle et al., 1999).

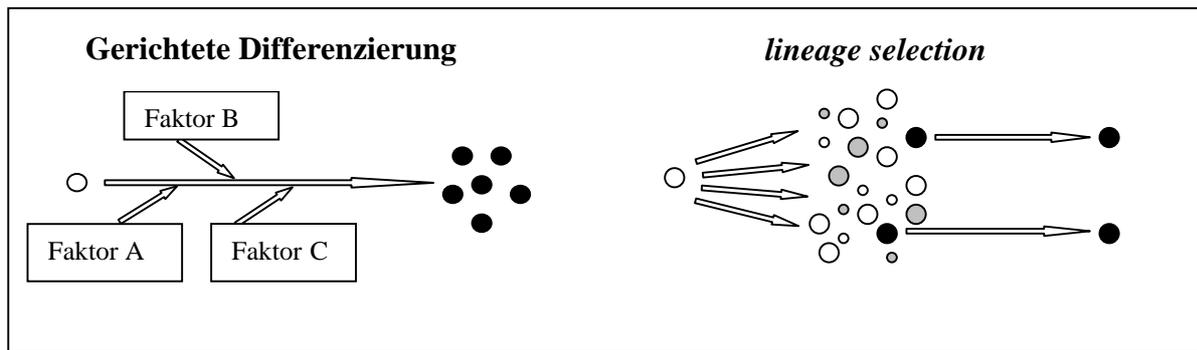


Abb. 1. Zwei Strategien für die Erzeugung angereicherter neuraler Zellkulturen aus embryonalen Stammzellen

Werden Zellen eines definierten Phänotyps aus einer Kultur unterschiedlich differenzierter Zellen isoliert, spricht man von „*lineage selection*“ (siehe Abb.1). Stehen für die Zielzellpopulation spezifische Oberflächenmarker zur Verfügung, kann diese *Lineage Selection* mit immunologischen Methoden durchgeführt werden (siehe unten).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, einen selektierbaren genetischen Marker, wie etwa ein Antibiotikaresistenzgen oder das Gen für das grüne fluoreszierende Protein, das „*enhanced green fluorescent protein*“ (*EGFP*), unter Kontrolle eines Zelltyp-spezifischen Promotors, bzw. durch Insertion in einen Zelltyp-spezifischen Locus zu exprimieren. Ein Beispiel für die letztere Variante sind ES-Zellen, in denen durch Insertion des GFP-Gens in den Tau-Locus eine neuronal-spezifische Expression dieses Markers erreicht wurde. Aus diesen ES-Zellen gewonnene Neurone lassen sich über Fluoreszenz-gestützte Sortierverfahren (FACS[®]) anreichern (Wernig et al., 2002).

„*Lineage Selektion*“ von Zellen mittels Oberflächenmarkern

Steht für die Zielzellpopulation ein geeigneter Oberflächenmarker zur Verfügung, kommen im Wesentlichen drei verschiedene Methoden für die Aufreinigung in Frage:

1. **FACS[®]** (*fluorescence-activated cell sorting*)
2. **MACS** (*magnetic-activated cell sorting*)
3. **Immunopanning**

Beim **FACS[®]** werden die zu isolierenden Zellen zunächst durch einen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markiert. Die einzelnen gefärbten Zellen werden durch einen Ultraschallzerstäuber in kleinen Tropfen durch einen Lichtstrahl geschickt. Durch diesen Lichtstrahl werden die

markierten Zellen zur Fluoreszenz angeregt. Ein Computer wertet das reflektierte Lichtsignal aus. Zellen mit Fluoreszenz wird mit hoher Geschwindigkeit durch einen Laser eine elektrische Ladung aufgezwungen. Zellen ohne Fluoreszenz werden gegenteilig geladen und Zellen, welche nicht von der Lichtquelle erfasst oder vom Laser verfehlt werden, erhalten keine Ladung. Die geladenen Zellen werden nun in einem magnetischen Feld ihrer Ladung entsprechend abgelenkt. Zellen ohne Ladung werden nicht abgelenkt. Nachteilig beim FACS[®] ist die nur schwer aufrecht zu erhaltende Sterilität der Zellen während der Sortierungsprozesse. Des Weiteren erfahren die Zellen eine gewisse mechanische Schädigung.

Das **Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)** basiert auf supramagnetischen Partikeln. Umhüllt sind diese Teilchen mit einer Polyesterol-Beschichtung, an deren Oberfläche Antikörper kovalent gebunden werden können, die dann die Oberflächenstrukturen der Zellmembranen besetzen. Die zu sortierenden Zellen werden mit den "*magnetic beads*" beladen, die an die gewünschte Zellpopulation binden. Im nächsten Arbeitsschritt werden die nun magnetischen Zellen durch eine Trennsäule gegeben. Diese enthält ein Material mit magnetisierbarem Kern, an dem die erwünschten Zellen haften bleiben. Wird die Trennsäule mit Medium gespült, werden unspezifisch haftende Zellen ausgeschwemmt. Anschließend werden die gewünschten Zellen aus der Trennsäule gelöst und stehen nach Verlassen des Magnetfelds aufgrund der nur passageren Magnetisierung wieder als Einzelzellsuspension zur Verfügung. Das Verfahren ist effizienter als das Immunopanning und schneller als das FACS[®]. Sehr hohe Aufreinigungsgrade lassen sich allerdings nur durch wiederholte Aufreinigungszyklen erreichen.

Das Verfahren des so genannten **Immunopannings** (siehe Abb.2) hat den Vorteil, dass sich sehr hohe Aufreinigungsgrade erreichen lassen. Hierzu wird zunächst ein sekundärer Antikörper (welcher gegen den zu verwendenden Antikörper gerichtet ist, z.B. anti-mouse) auf eine unbeschichtete Petrischale aufgebracht. Auf diese Schale wird nun der primäre Antikörper, der gegen das Oberflächenantigen gerichtet ist, gegeben. Nun gibt man die einzelnen zu trennenden Zellen in die Schale und wartet, bis sich die gewünschten Zellen an den Antikörper gebunden haben. Die unerwünschten Zellen werden durch mehrmaliges Abspülen der Schale mit Medium entfernt. Die gewünschten Zellen werden danach enzymatisch (z.B. mit Trypsin) abgelöst.

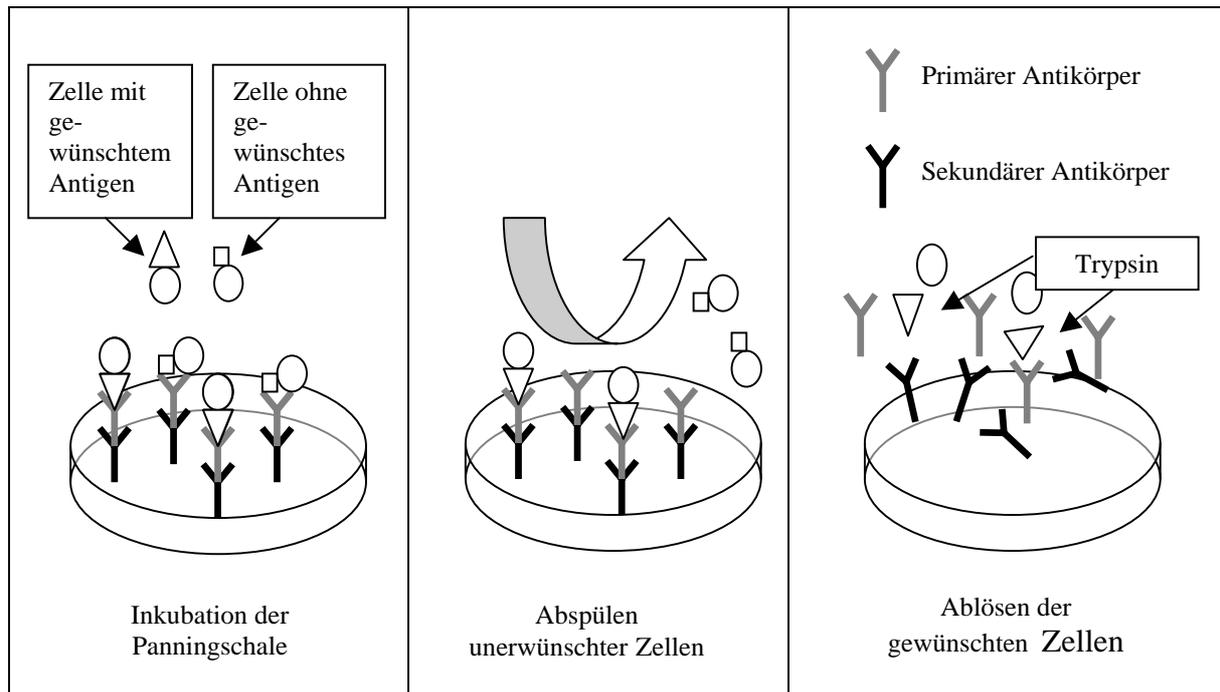


Abb. 2. Prinzip des Immunopanning.

Eine Petrischale wird mit einem sekundären Antikörper, der den Fc-Teil eines zweiten Antikörpers bindet, beschichtet. Der primäre Antikörper weist Bindungsstellen für das gewünschte Antigen der Zellmembran auf. Nach Entfernung nicht-spezifisch gebundener Zellen werden die gebundenen Zellen mit Trypsin abgelöst und stehen nun als aufgereinigte Population zur Verfügung.

1.4 PSA-NCAM – ein Oberflächenmarker neuronaler Zellen

Das *polysialic acid - neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM) wurde erstmals von Finne (1982) als Bestandteil des Säugergehirns beschrieben. Es besteht aus einem Proteingerüst und einer Kette von Kohlenhydraten. Das Protein NCAM gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Es beinhaltet mehrere Aminosäuresequenzen, die auch in Antikörpern vorkommen. NCAM wird in vielen Nervenzelltypen exprimiert und beeinflusst u.a. die Ausbildung von Zellkontakten (Butler et al., 1997; Uryu et al., 1999). Es ist zumeist in der Zellmembran verankert und weist einen großen extrazellulären Teil auf, an dem eine Kette aus Sialinsäuremolekülen binden kann – PSA. Dieses Homopolymer kann aus über hundert Sialinsäureeinheiten aufgebaut sein, welche ohne Verzweigungen direkt aneinander binden (siehe Abb.3). PSA modifiziert die Eigenschaften der Zellbindungen, welche durch NCAM vermittelt werden (Daston et al. 1996).

PSA-NCAM kommt in zwei verschiedenen Formen vor. Neben einer hochsialinisierten Form existiert eine mit nur kleinem Anteil PSA. Während der Embryogenese findet sich in vielen Geweben des Körpers die PSA-reiche Form von NCAM; sie wird daher oft auch als embryonale Variante von NCAM (eNCAM) bezeichnet. McClain und Edelman (1982) sowie Edelman und Chuong (1982) beschrieben, dass mit zunehmendem Alter des Gewebes der Gehalt an PSA abnimmt, weshalb die PSA-arme Form von NCAM auch als adulte Variante (aNCAM) bezeichnet wird. In dieser Arbeit wird der Begriff PSA-NCAM für die hochsialinisierte Form verwendet.

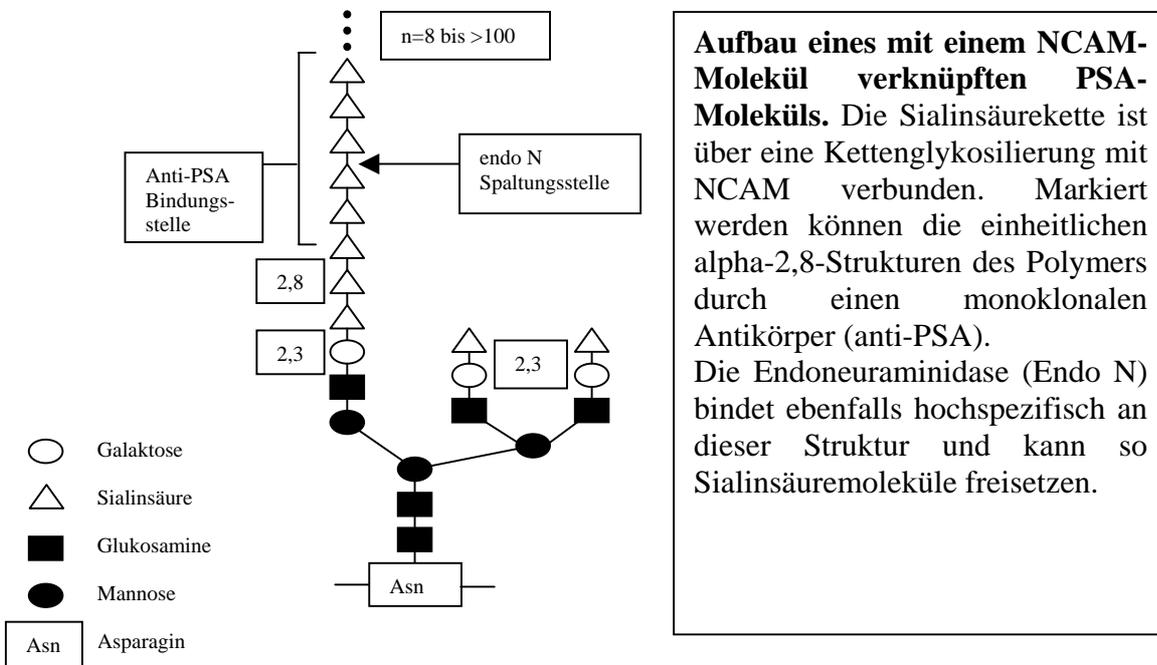
Unveröffentlichte Voruntersuchungen meiner Arbeitsgruppe haben in unreifen, aus ES-Zellen gewonnenen neuronalen Zellkulturen PSA-NCAM nachweisen können. Das Oberflächenprotein wird bereits während der frühen Phase der neuronalen Differenzierung von ES-Zellen beobachtet, wo es auf einem Großteil der neuronalen Zellmembranen exprimiert wird. Diese Befunde lassen vermuten, dass es sich bei diesen Zellen um eine unreife Form einer Nervenzelle handelt – eine neuronale Vorläuferzelle.

Eine Expression von PSA-NCAM wurde in unterschiedlichen Stadien der neuronalen Differenzierung beschrieben. O'Leary und Terashima (1988) beschreiben PSA-NCAM auf unreifen migrierenden Nervenzellen. Es wird vermutet, dass PSA-NCAM hier die Kontakte zu den Zellen des zu durchquerenden Gewebes abschwächt. Neurone des Hippocampus, die ihre Feinarchitektur im Rahmen der Synaptogenese verändern, werden in den sich modifizierenden Bereichen des Axons und der Dendriten für PSA-NCAM positiv (Landmesser et al., 1990). Bei der Innervation des Rückenmarkes der Ratte durch Axone des corticospinalen Traktes (CST) bahnen sich die Nervenzellfortsätze den Weg von der Hirnrinde durch Capsula interna, Pons und das Rückenmark. Es wird angenommen, dass PSA-NCAM das Auswachsen der Axone und die zielgerichtete Innervation von Motorneuronen begünstigt (Landmesser et al., 1988 und 1990). Diese Befunde verdeutlichen, dass PSA-NCAM vor allem in unreifen und migrierenden neuronalen Zellen exprimiert wird.

Im Nervensystem ist die Expression von PSA-NCAM nicht auf neuronale Zellen beschränkt. Oligodendrozyten und Astrozyten exprimieren PSA-NCAM ebenfalls in der prä- und postnatalen Entwicklung des Nervengewebes sowie unter bestimmten Bedingungen im adulten ZNS. Ben-Hur et al. (1998) beschreiben eine PSA-NCAM-positive gliale Vorläuferzelle, die sich zu Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren kann. Auch in reaktiv veränderten Gliazellen

wurde PSA-NCAM-Expression beschrieben. Le Gal La Salle et al. (1992) erzeugten mit dem Glutamatanalogon Kainat einen Status epilepticus bei Ratten. Nach drei Tagen war eine PSA-

Abb. 3. Aufbau von PSA-NCAM



Aufbau eines mit einem NCAM-Molekül verknüpften PSA-Moleküls. Die Sialinsäurekette ist über eine Kettenglykosilierung mit NCAM verbunden. Markiert werden können die einheitlichen alpha-2,8-Strukturen des Polymers durch einen monoklonalen Antikörper (anti-PSA). Die Endoneuraminidase (Endo N) bindet ebenfalls hochspezifisch an dieser Struktur und kann so Sialinsäuremoleküle freisetzen.

NCAM-Expression in Zellen mit glialem Phänotyp, vor allem im Bereich des Hippocampus, nachweisbar. Diese Anfärbbarkeit hatte für mindestens 12 Wochen Bestand. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer reaktiven Gliose und dem Auftauchen von PSA-NCAM, so dass PSA-NCAM einen Hinweis auf eine bevorstehende Gliose geben kann. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass PSA-NCAM in verschiedenen neuronalen Zellpopulationen entwicklungs- und funktionsabhängig exprimiert wird.

Neuere klinische Forschungen haben gezeigt, dass PSA-NCAM nicht nur in gesunden, sich entwickelnden oder sich im Umbau befindlichen Geweben, sondern auch in neoplastisch veränderten Zellen vorkommt. Für Medulloblastome, Neuroblastome, Ependymome sowie Astrozytome wurde eine PSA-NCAM-Expression beschrieben (Dubois et al., 1998; Figarella-Branger et al., 1990; Mayanil et al., 2000). Außerhalb des ZNS findet sich PSA-NCAM in Pankreaskarzinomen (Kameda et al., 1999), kindlichen Rhabdomyosarkomen (Gluer et al., 1998) und insbesondere bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Lantuejoul et al., 1998). PSA-NCAM könnte möglicherweise, neben seiner Rolle als Differenzierungsmarker von Zellen des ZNS, in

der Onkologie auch Anwendung bei der Verlaufsprognose und der Therapie von Malignomen finden.

1.5 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, hochaufgereinigte neuronale Zellen aus Kulturen differenzierender ES-Zellen zu gewinnen. Aufbauend auf ersten Beobachtungen, wonach PSA-NCAM während der Frühphase der neuronalen Differenzierung in ES-Zell-Kulturen exprimiert wird, sollte der Phänotyp PSA-NCAM exprimierender Zellen in ES-Zell-abgeleiteten neuroepithelialen Kulturen untersucht werden. Weiterhin sollte der zeitliche Verlauf der PSA-NCAM-Expression dieser Zellen ermittelt werden.

Es sollte im Anschluss daran geprüft werden, inwieweit über eine Aufreinigung PSA-NCAM-positiver Zellen eine Anreicherung ES-Zell abgeleiteter Neurone möglich ist. Hierzu sollten ES-Zellen, die einem in der Arbeitsgruppe etabliertem Differenzierungsverfahren unterzogen wurden, einem Aufreinigungsverfahren für PSA-NCAM-positive Zellen zugeführt werden. Das hierfür eingesetzte Protokoll sieht vor, ES-Zell-Kulturen nach Vermehrung in einem undifferenzierten Stadium zu Embryoidkörpern zu aggregieren und im weiteren Verlauf neuronal zu differenzieren. Für diese neuroepithelialen Kulturen sollte ein optimaler Zeitpunkt für die Isolation PSA-NCAM-positiver Zellen ermittelt werden, an dem diese zeitlich früh in der Differenzierung stehende neuronale Zellen repräsentieren. Ziel war es, zu untersuchen, ob sich ein Immunopanning mit einem Antikörper gegen PSA-NCAM für diese Aufgabenstellung umsetzen lässt. Im Anschluss sollten die gewonnenen, aufgereinigten PSA-NCAM-positiven Zellen auf ihren Phänotyp hin untersucht werden. Dabei war insbesondere von Interesse, ob die PSA-NCAM-positive Fraktion ausschließlich neuronale Zellen umfasst und ob sie lediglich eine Subpopulation der sich in der Differenzierung befindlichen Neurone enthält. Zu klären war ferner, inwieweit die PSA-NCAM-positiven Zellen bereits in ihrer Differenzierung hin zu postmitotischen Neuronen fortgeschritten sind. Zudem stellte sich die Frage, ob es prinzipiell möglich ist, aus den PSA-NCAM-exprimierenden Zellen eine Zelllinie zu kultivieren, die lediglich Neurone, bzw. neuronale Vorläuferzellen enthält.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zusammensetzung der hergestellten Medien und Stammlösungen

DMEM (GIBCO) *Dulbecco`s modified Eagle`s medium*

DMEM / F₁₂ (GIBCO) DMEM / Nutrient Mix F₁₂

FKS (GIBCO) Fötale Kälber-Serum (ES-zertifiziert) im Wasserbad 30 min bei + 56 °C inaktivieren, in sterile Einheiten à 50 ml aliquotierten und bei - 30 °C lagern

Nukleotide (Stock): 40 mg Adenosin (SIGMA), 42,5 mg Guanin (SIGMA), 36,5 mg Cytosin (SIGMA), 36,5 mg Uracil (SIGMA) und 12 mg Thymin (SIGMA) werden in 50 ml ddH₂O (37 °C) gelöst, aliquotiert, und bei + 4 °C gelagert

Nicht-essentielle Aminosäuren, nicht-essentielle Aminosäure-Lösung (flüssig) 100 X (GIBCO) wird 1:100 in DMEM verdünnt und in Einheiten à 5 ml aliquotiert

Glutamin (SIGMA): 1,46 g Glutamin in 100 ml ddH₂O lösen, Aliquots à 5 ml erstellen und bei - 20 °C lagern

Insulin (INTERGEN): 5 mg pro ml in NaOH (M = 0,01) lösen und aliquotieren, bei - 80 °C lagern

Natriumselenit (Na.-Selenit) (SIGMA) mit ddH₂O eine 500 µM Lösung herstellen und bei - 20 °C lichtgeschützt lagern

Progesteron (SIGMA) mit 100 %igen Ethanol eine 20 µM Lösung herstellen und bei - 80 °C lagern

Putrescine (SIGMA) mit ddH₂O eine 0,1 M Lösung herstellen, aliquotieren und bei - 80 °C lagern.

2.1.2 Verwendete Medien

DMEM + 10 % Serum: Zu DMEM 10 % inaktiviertes ES-zertifiziertes FKS hinzufügen.

DMEM + (angereichert): der 500 ml DMEM-Flasche 18 ml entnehmen, hierin 2,25 g Glukose und 0,06 g Pyruvat lösen und zurück in die DMEM-Flasche filtern.

DMEM-ES: 5 ml Nukleotide, 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 13 ml Hepes-Puffer und

3,5 µl β-Mercaptoethanol in ein 50 ml Gefäß geben, filtrieren und der 500 ml DMEM-Flasche hinzufügen.

DMEM-ES-Diff: 50 ml ES-zertifiziertes FKS und 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stock in 445 ml DMEM-ES geben.

DMEM-ES-PROL: 10 ml ES-zertifiziertes FKS und 5 µl LIF (entspricht 1000 U/ml) in 40 ml DMEM-ES geben.

DMSO-Gefriermedium: 5 ml ES-zertifiziertes FKS und 3,6 ml DMSO in 22,8 ml DMEM-ES geben.

ITS: 500 µl Insulin und 30 µl Na-Selenit in 18 von insgesamt 500 ml DMEM / F12 geben und in die Flasche zurückfiltrieren. 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stock und 2,5 ml Transferrin-Lösung hinzufügen.

N3 Medium: 2,5 ml Insulin, 500 µl Progesteron, 500 µl Putrescin und 30 µl Na-Selenit werden in 18 von insgesamt 500 ml DMEM/F12 gegeben und in die Flasche zurückgefiltert. 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stock und 2,5 ml Transferrin-Stock werden hinzugefügt.

2.1.3 Pufferlösungen

PBS *phosphate buffered saline* (BIOCHROM) ohne Calcium und Magnesium

Hepespuffer M = 1 (SIGMA), 26 g Hepes-Sodium-Salt in 60 ml ddH₂O lösen, mit HCl auf pH = 7,4 titrieren und auf 100 ml auffüllen.

HBSS (10X) (GIBCO) *Hank`s balanced salt solution* – Hanks gepufferte Salzlösung

Hanks-Puffer: 50 ml HBSS (10X) und 1,9 g Natrium-Bikarbonat in 450 ml ddH₂O geben und mit HCl auf pH = 7 titrieren.

Hanks-EDTA: 50 ml HBSS (10x) und 200 mg *ethylen-diamin-tetra-acetic-acid* (EDTA) in 450 ml ddH₂O geben und mit HCl auf pH = 7,2 titrieren.

2.1.4 Enzyme, Faktoren und Oberflächenbeschichtungen

DNase (CELL-SYSTEMS)

Trypsin (GIBCO) 10 X-Lösung 1:10 mit Hanks-Puffer verdünnen und bei – 20 °C lagern

LIF *leukemia inhibitory faktor* (GIBCO) 10⁷ U/ml

Embryonaler-Hühner-Extrakt (GIBCO)

Laminin (GIBCO)

Fibronektin (GIBCO) in 1 ml ddH₂O lösen und in Aliquots a 10 µl abfüllen, bei - 80 °C lagern

Polyornithin (SIGMA)

2.1.5 Verwendete Antikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Konzentration	Firma
β-III-Tubulin (TUJ-1)	IgG-mouse monoclonal	1/500	Babco
PSA-NCAM	IgM-mouse monoclonal	1/400	G. Rougon, Marseille
A2B5	IgG-mouse monoclonal	1/200	Bohringer
O4	IgG-mouse monoclonal	1/005	Bohringer
Nestin	IgG-rabbit polyclonal	1/050	Ron McKay NIH, USA
GFAP	IgG-rabbit polyclonal	1/100	Dako
GFAP	IgG-mouse monoclonal	1/100	ICN
MAP2abc	IgG-mouse monoclonal	1/300	Sigma
NeuN	IgG-mouse monoclonal	1/050	Chemicon

Tab. 1. Primäre Antikörper

Antikörper-Typ	Konzentration	Firma
FITC-conjugated fab fragment goat anti-mouse IgG	1/100	Dianova
FITC-conjugated goat anti-mouse IgG	1/100	ICN
Rhodamin-conjugated fab fragment goat anti-mouse IgG	1/100	Dianova
Rhodamin-conjugated goat anti-rabbit IgG	1/100	ICN
Biotinylated anti-mouse IgG	Kit	DPC
Biotinylated anti-rabbit IgG	Kit	DPC
Biotinylated anti-mouse IgM	1/100	Alexis
Streptavidin-Peroxidase	Kit	DPC
Texas-Red-Avidine	1/125	Alexis
AEC (rot) Substratkit	Kit	Zymed
4-(Diethylamino)-benzaldehyd (DAB)	Kit	Sigma
Höchst-Zellkernblau	1/500	Sigma

Tab. 2. Sekundäre Antikörper und Substrate

2.1.6 Kunststoffmaterial

Zellkulturschalen (FALCON), Kunststoffpipetten (BECTON DICKINSON), Filter (BECTON DICKINSON), 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen (GREINER), Zellschaber (GREINER)

2.1.7 Verwendete Laborgeräte

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, Pasteur-Pipetten, Pipetierhilfe („Pipettus Akku“ von HIRSCHMANN), Zellkulturinkubator (HERAEUS), Zentrifuge („Megafuge 1.0R“ von KENDRO), Sterilwerkbank (KENDRO), Fluoreszenzmikroskop (ZEISS), Zellkulturmikroskop („Axiovert-25“ von ZEISS)

2.2 In vitro Differenzierung embryonaler Stammzellen

Kulturbedingungen

Für die Experimente werden ES-Zellen der Linie J1 (Li et al., 1992) eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgen bei sterilen Bedingungen unter einer Werkbank. Die Zellen werden auf Kunststoff-Petrischalen im Zellkulturinkubator bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 5 % gezüchtet.

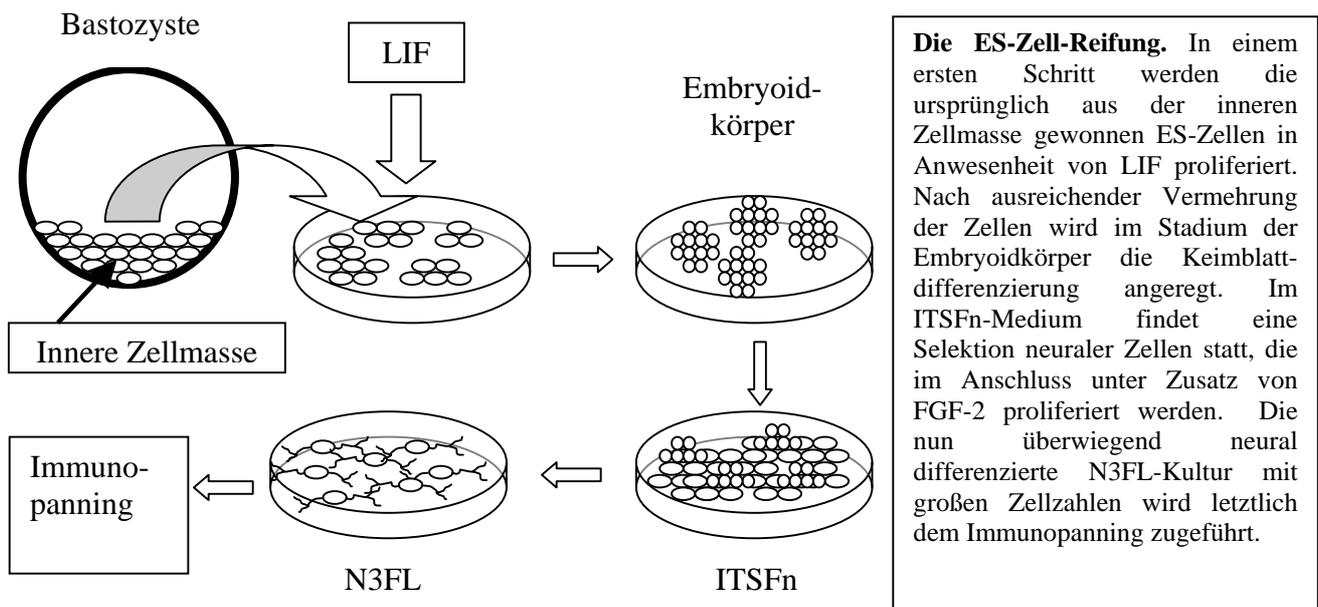


Abb. 4. Schema der neuronalen Differenzierung embryonaler Stammzellen

Proliferation von embryonalen Stammzellen

Die ES-Zellen werden zunächst in Kokultur mit mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten (Feederzellen) proliferiert (siehe Abb.5a). Um die Feederzellen abzutrennen, werden die ES-Zellen anschließend auf Gelatine-beschichtete Petrischalen überführt.

Vorbereitung der Feederzell-Platten

ES-Zellen sind nur unter sehr aufwändigen Bedingungen zu kultivieren. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie ist für ein gutes Wachstum auf die Anwesenheit von Ammen- oder Feederzellen angewiesen, die sie mit Nährstoffen versorgen und ihnen eine Kontaktfläche bieten. Diese Aufgabe erfüllen embryonale Fibroblasten, die aus den Rümpfen von Mäuse-Embryonen gewonnen werden. Im Anschluss an die Präparation werden die Zellen durch Gamma-Strahlung oder durch Zusatz von Mitomycin teilungsunfähig gemacht, andernfalls würden sie durch ihr enormes Proliferationspotential die ES-Zellkultur überwuchern. Diese bereits fertig präparierten Zellen werden, wie die ES-Zellen, in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein kleines Gefrierrohrchen (1 ml) mit $0,5 \times 10^6$ embryonalen Fibroblasten wird im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Die Fibroblasten sind in einem Medium gefroren, das DMSO (*dimethyl sulfoxide*) enthält. Dieser Stoff schützt die Zellen vor Schäden beim Einfrieren, wirkt jedoch im flüssigen Milieu toxisch. Sobald das Medium aufgetaut ist, wird der Inhalt des Röhrchens mit 5 ml DMEM + 10 % Serum aufgespült und so das DMSO verdünnt. Die Zellen werden in einem 15 ml Röhrchen für fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird in 8 ml DMEM + 10 % Serum resuspendiert und schließlich auf zwei Zellkulturschalen mit 6 cm Durchmesser pipettiert.

Das Serum enthält zahlreiche Nährstoffe und Wachstumsfaktoren. Die Fibroblasten bilden innerhalb von zwei Tagen einen einschichtigen Zellrasen. Es sind Zellen von großem Durchmesser und flacher Morphologie. Sie entsenden einige Fortsätze, und ihre großen Zellkerne enthalten mehrere Nukleoli. Die embryonalen Fibroblasten reifen zwei Tage im Brutschrank und dienen nun als Feederzellen.

Ausplattierung der ES-Zellen

Auch die ES-Zellen sind in Medium mit DMSO-Zusatz gefroren und werden ebenfalls zügig aufgetaut. Ein kleines Gefrierrohrchen mit $1,25 \times 10^6$ Zellen wird zunächst im Wasserbad

aufgetaut und dann mit 5 ml DMEM-ES-PROL aufgespült. Die Lösung mit den Zellen wird in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Unterdessen wird das Medium der zwei Feederzellschalen verworfen. Den Schalen wird jeweils 2 ml DMEM-ES-PROL zugegeben. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand entfernt und das Zellpellet in 4 ml DMEM-ES-PROL gelöst. Die ES-Zellen befinden sich nun zumeist als einzelne Zellen in der Lösung. Sie werden jetzt je zur Hälfte auf die zwei vorbereiteten Feederzellschalen gegeben. Nach einigen Stunden lassen sich die ES-Zellen auf der Feeder-Zellschicht nieder. In den folgenden drei Tagen wachsen die ES-Zellen in Kokultur mit den Fibroblasten. Aus den zunächst vereinzelt liegenden Zellen wachsen zunächst kleine, helle Kolonien. Sie bestehen aus Zellen mit klarem Zytoplasma, die Zellgrenzen sind nur schwer auszumachen. Ein geringer Teil der ES-Zellen differenziert zu etwas flacheren Zellen mit deutlichen Zellgrenzen. LIF hält die ES-Zellen in einem undifferenzierten Stadium. Die Zelldichte hat maßgeblichen Einfluss auf die Qualität der Zellen. Werden die Zellen in zu hoher Dichte ausgesät, wird die Differenzierung eingeleitet oder es findet keine Proliferation statt. Eine sorgfältige Bestimmung der Zellzahl ist daher erforderlich. Nach drei Tagen sind die ES-Zellen in der Regel subkonfluent. Sie werden passagiert, da sie sonst spontan ausdifferenzieren würden.

Transfer auf mit Gelatine beschichtete Zellkulturschalen

In den folgenden zwei Tagen in Kultur werden die ES-Zellen auf Gelatine-Beschichtung vermehrt. Zwei Schalen werden mit je 3 ml 0,1 %iger Gelatine-Lösung (in PBS) beschickt. Die Zellschalen werden dreimal mit 4 ml Hanks-EDTA gefüllt. Es werden 1,5 ml Trypsin je Schale zugegeben. Nach 2 Minuten lösen sich die Zellen vom Boden. Sie werden mit einer zuvor durch Flämmung an der Spitze verjüngten Pasteur-Pipette in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wird solange mit der Pasteur-Pipette aufgesogen und wieder ausgespült, bis mikroskopisch keine Zellkonglomerate mehr sichtbar sind. Durch Lösen der interzellulären Kontakte wird den Zellen ein Differenzierungsreiz genommen, der in einem größeren Zellverbund entsteht. Liegen fast ausschließlich einzelne Zellen vor, wird das Trypsin mit 5 ml DMEM + 10 % Serum neutralisiert. Nun werden die Zellen gezählt und zentrifugiert (1000 U/min; 5 min; RT) Das Zellpellet wird resuspendiert. Es wird mit DMEM-ES-PROL eine Suspension von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml hergestellt. Aus den beschichteten Schalen wird die Gelatine-Lösung abgesogen. Den Schalen wird jeweils 3 ml DMEM-ES-PROL und 1 ml der Zelllösung zugegeben. Überzählige Zellen werden für spätere Versuche eingefroren. Die Zelllösung wird

hierfür 1:1 mit Gefriermedium gemischt und dann langsam eingefroren. Das Gefrierrohrchen wird in einer Styropor-Gefrierbox gelagert und zunächst auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, erst dann kommen die Zellen in den Flüssig-Stickstoff-Tank. Nur so ist gewährleistet, dass die Zellen, deren Passagenummer sich nun um einen Zähler erhöht hat, nicht zu Schaden kommen. Auf den Gelatine-Schalen wachsen die ES-Zellen zu großen Zellzahlen heran. Sie bilden dabei runde Zellnester.

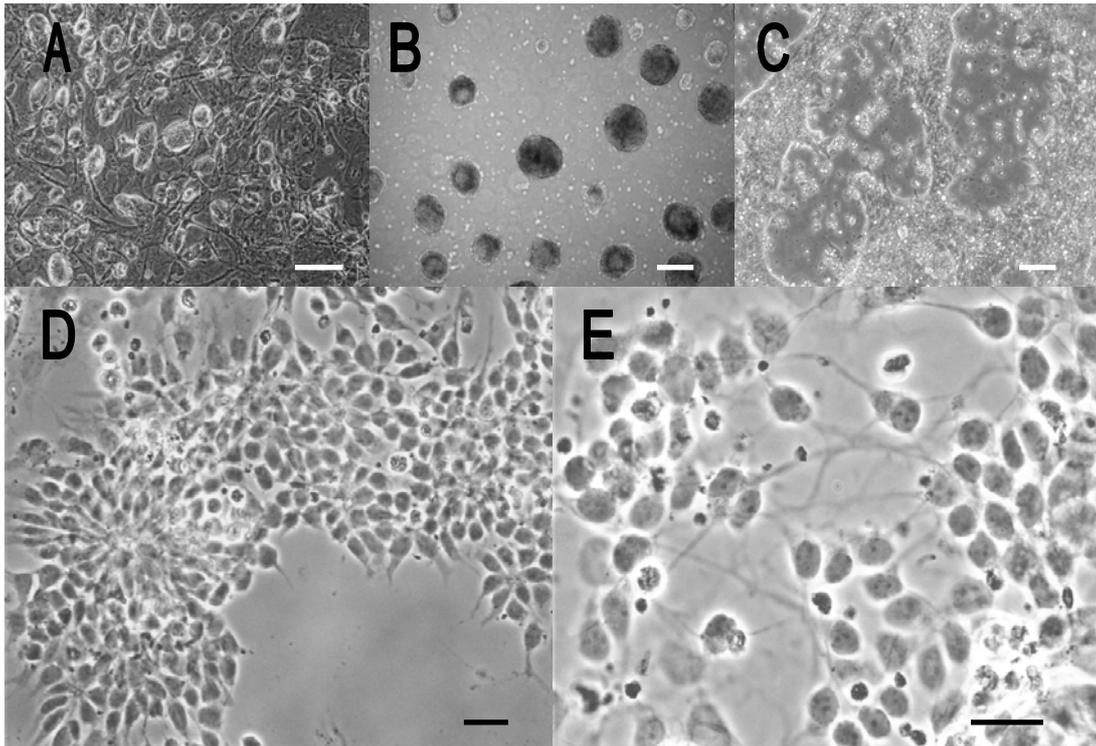


Abb. 5. Morphologie differenzierender embryonaler Stammzellen.

(A): Proliferierende ES-Zellen auf Feederzell-Platten. (B): Differenzierungsinduktion in frei in Medium schwimmenden Embryoidkörpern. (C): Neuroepitheliale Zellinseln in ITSFn-Selektivmedium mit darüber liegenden abgestorbenen Zellen. (D): Proliferierende neurale Zellen in FGF-2-haltigem N3FL Medium. (E): Differenzierende neurale Zellen 4 Tage nach FGF-2-Entzug. Messbalken: in A, D und E 20 μm ; B und C 50 μm .

Differenzierungsinduktion durch die Bildung von Embryoidkörpern

In diesem Schritt beginnen die ES-Zellen spontan zu differenzieren. Sie verlieren ihre Pluripotenz und fangen an, sich zu Zellen der drei Keimblätter zu entwickeln.

Zunächst werden die Zellschalen zweimal mit 3 ml Hanks-EDTA gespült. Nun wird vorsichtig jeweils 1,5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Während das Trypsin auf die Zellkontakte

einwirkt, werden pro 6 cm Zellkulturschale acht unbeschichtete 6 cm Schalen (bakteriologische Petri-Schalen) mit jeweils 3 ml DMEM-ES-Diff befüllt. Das Trypsin wird mit je 6,5 ml DMEM + 10 % Serum neutralisiert. Behutsam wird jetzt die Lösung mit den Zellschollen auf die neuen Schalen verteilt. Anders als bei der Passage auf Gelatine, sollten hier größere Zellcluster erhalten bleiben. In den nächsten Tagen bilden sich dann aus diesen Fragmenten frei schwimmende runde Zellaggregate, die als Embryoidkörper (*embryoid bodies*; EBs) bezeichnet werden (siehe Abb.5b). Nach zwei Tagen wird das Medium gewechselt. Durch den Mediumwechsel werden kleinere Zellaggregate entfernt und man erhält schließlich eine Suspensionskultur weitgehend gleich großer EBs. Für den Mediumwechsel wird der Inhalt von acht EB-Schalen in ein 50 ml Röhrchen gegeben und gewartet, bis die EBs am Boden sedimentieren. Vorsichtig wird der Überstand bis auf ca. 5 ml abgenommen. Es werden 27 ml DMEM-ES-Diff zugegeben; anschließend wird die Zellsuspension wieder auf die zuvor benutzten Schalen zurückpipettiert.

Ähnlich wie bei der Embryogenese entstehen innerhalb des Embryoidkörpers Anlagen der Keimblätter. Mit zunehmender Ausreifung bildet sich an der Oberfläche der EBs eine Schicht aus primitivem Endoderm. Im Zentrum liegen die noch weitgehend undifferenzierten ES-Zellen, die bei weiterer Kultivierung Abkömmlinge der drei Keimblätter bilden würden.

Nach drei Tagen werden die Embryoidkörper auf Zellkulturschalen ausplattiert. Besonders wichtig ist hierbei die gleichmäßige Verteilung der EBs. Nur wenn die Zellen sich gleichmäßig zu einem einschichtigen Zellrasen ausbreiten, können im nachfolgenden Schritt effizient neurale Zellen angereichert werden. Die Zellschalen dürfen daher nicht zu dicht mit Zellen bewachsen sein.

Der Inhalt von jeweils acht EB-Schalen wird in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Die EBs werden sedimentiert, in DMEM-ES-Diff suspendiert und gleichmäßig auf einer 10 cm Zellkulturschale plattiert. Innerhalb von 24 h lassen sich die EBs auf den Schalengrund nieder. Sie flachen sich ab, und die äußeren Zellen wandern in die Peripherie aus.

Selektion neuraler Vorläufer in ITSFn-Medium

Der nächste Schritt dient der Anreicherung neuroektodermaler Zellen. Das eingesetzte serumfreie ITSFn-Medium begünstigt das Überleben neuraler Zellen, während nicht-neurale Zellen in hohem Maße zugrunde gehen (Okabe et al., 1996).

Das verbrauchte Medium wird verworfen und durch neu angesetztes ITSFn ersetzt. Hierzu werden je 10 cm Schale 9 ml ITS mit 22,5 µl Fibronectin versetzt. Von diesem Zeitpunkt an wachsen die Zellen ohne Serum. Viele nutritive Stoffe fallen weg. Das Medium enthält als Supplemente Insulin, Transferrin, Na-Selenit und Fibronectin (ITSFn). Die Medienzusammensetzung ist so abgestimmt, dass nur die für das Überleben der neuroektodermalen Zellen absolut erforderlichen Stoffe enthalten sind. Innerhalb der nächsten 72 h kommt es vorwiegend unter den nicht-neuralen Zellen zu einem massiven Zelltod. Mitunter lösen sich ganze Abschnitte des Zellrasens komplett ab, was auch zu Verlusten von neuroektodermalen Zellen führen kann. Der pH-Wert des Mediums sinkt, was an einer raschen Gelbfärbung erkennbar ist. Fünf Tage verweilen die Zellen im ITSFn-Medium, wobei nach dem zweiten und vierten Tag das Medium gewechselt wird.

Auch nach Zugabe des Selektivmediums lassen sich zwei Zellsorten auf der Schale unterscheiden. Zum einen die neuroektodermalen Zellen, welche dicht zusammengelagert, rundlich und dunkel erscheinen, zum anderen primitive und endodermal differenzierte Zellen, welche die neuroektodermalen Zellansammlungen umlagern (siehe Abb.5c). Diese Zellen wachsen flach und lagern sich wabenartig aneinander. Zu diesem Zeitpunkt weisen in der Regel bereits mehr als 80 Prozent der Zellen einen neuralen Phänotyp auf.

Neuronale Differenzierung in N3 Medium mit Laminin-Beschichtung (N3L)

Im nächsten Schritt differenzieren die neuralen Vorläuferzellen zu Neuronen.

Sowohl das N3 Medium als auch die Laminin-Beschichtung begünstigen die neuronale Differenzierung (Okabe et al., 1996; Bronner-Fraser M, 1985). Zunächst werden die ITSFn-Schalen gespült und von Zelldetritus befreit. Anschließend werden die Zellen durch Trypsin abgelöst. Nachdem das Trypsin durch DMEM + 10 % Serum neutralisiert worden ist, werden sie bei 1000 U/min für 5 min bei RT zentrifugiert, und das aus zwei bis vier Schalen gewonnene Zellpellet wird in 3 ml Hanks-Puffer mit Zusatz von 1 % DNase resuspendiert. Die Zellsuspension wird nun durch drei Pasteur-Pipetten mit immer kleiner werdenden, geflämten Öffnungen trituriert. Schließlich wird die Zellsuspension durch ein Mikrosieb mit einer Porengröße von 40 µm gegeben. 20 µl dieser Suspension werden für die Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer entnommen. Unterdessen wird die Einzelzellsuspension bei 1000

U/min für 3 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wird in N3 Medium resuspendiert, so dass eine Suspension mit 3×10^6 Zellen/ml entsteht. Je 1 ml dieser Zellsuspension wird mit N3 Medium auf 10 ml aufgefüllt und mit 10 μ l Laminin versetzt (Endkonz.: 10 μ g/ml). Die Zellen werden nun auf am Vortag mit 3 ml einer 1 % Polyornithin-Lösung beschichtete 10 cm Zellkulturschalen plattiert.

Entscheidend für die Qualität der so hergestellten N3L-Kulturen ist die Aufhebung der Zellkontakte. Bleiben Zellen in ihrem Zellverband, behalten sie ihren undifferenzierten Phänotyp bei und bilden große Zellaggregate, die plattierten EBs ähneln. Andererseits können die Zellen durch einen zu intensiven Triturierungsprozess geschädigt werden. Auch bei optimaler Bearbeitung werden am darauf folgenden Tag Zellverluste von bis zu 50 % verzeichnet. Die verbleibenden Zellen reifen zu bipolaren Phänotypen heran, deren Fortsätze in den folgenden Tagen zusehends an Länge gewinnen.

Proliferation neuraler Vorläuferzellen in der Anwesenheit von FGF-2 (N3FL-Medium)

Durch den Zusatz von FGF-2 zum N3L-Medium können die im ITSFn-Stadium angereicherten neuralen Vorläuferzellen weiter vermehrt werden. Bei dieser Protokollvariante wird den Zellen mit der Überführung aus dem ITSFn-Stadium in N3L-Medium *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) zugesetzt. FGF-2 hat einen starken proliferativen Effekt auf neurale Vorläuferzellen und hemmt gleichzeitig ihre Ausdifferenzierung. Die Zellen werden für fünf Tage in diesem Wachstumsmedium kultiviert. Bei diesem Schritt spielt die Zelldichte eine entscheidende Rolle. Wachsen die Zellen in zu hoher Dichte, können noch vorhandene undifferenzierte Zellen die Schale überwuchern. Bei zu geringer Zelldichte kommt die Proliferation nur sehr langsam in Gang oder die Zellpopulation geht insgesamt zugrunde. Diese Abhängigkeit der Proliferation von der Zelldichte weist darauf hin, dass die Zellen in diesem Stadium zusätzlich para- oder autokrin wirkende Faktoren benötigen.

Unter optimalen Bedingungen wachsen die Zellen binnen fünf Tagen zu einem dichten Zellrasen zusammen (siehe Abb.5d). Vereinzelt sind noch an Embryoidkörper erinnernde Zellansammlungen zu finden. Durch Entzug von FGF-2 lässt sich die Differenzierung dieser Zellen induzieren. Die Zellcluster differenzieren vom Rand aus beginnend. Ihr Zytoplasma wird heller und sie entsenden lange Fortsätze (siehe Abb.5e). Sie ähneln nun dem Aussehen nach den N3L-Zellen.

2.2.1 Zellkalender

N3L-Kulturen:

Tag 1:	Gamma-bestrahlte, embryonale Fibroblasten anzüchten
Tag 3:	Aussähen der embryonalen Stammzellen
Tag 5:	Mediumwechsel
Tag 6:	Passage auf Gelatine
Tag 8:	Herstellung von Embryoidkörpern
Tag 9:	Mediumwechsel
Tag 11:	Ausplattieren der Embryoidkörper
Tag 12:	Transfer in ITSFn-Medium
Tag 14:	Mediumwechsel
Tag 16:	Transfer in N3L Medium
Tag 18:	Immunopanning der N3L-Kulturen

bei N3FL-Kulturen ab dem 16. Tag:

Tag 16:	Transfer in N3FL Medium mit nachfolgend täglicher Zugabe von FGF-2
Tag 18:	Mediumwechsel
Tag 20:	Mediumwechsel
Tag 21:	Mediumwechsel
Tag 23:	Immunopanning der N3FL-Kulturen

Die Anzucht von Zellkulturen mit einem großen Anteil PSA-NCAM-positiver Zellen dauert also bei N3L-Kulturen 18 Tage und bei N3FL-Kulturen 23 Tage.

2.2.2 Immunopanning

Für das Immunopanning wurden sowohl N3L- als auch N3FL-Kulturen verwendet. Die N3L-Kulturen wachsen zwei Tage in N3 Medium heran, bevor sie dem Immunopanning unterzogen werden. N3FL-Kulturen werden über fünf Tage in Anwesenheit von FGF-2 proliferiert und im Anschluss durch Wachstumsfaktorentzug für zwei Tage differenziert. Als methodischer Ausgangspunkt für Immunopanning diente eine Modifikation des Protokolls "*In vitro generation of pure oligodendrocyte cultures*" von Wiley & Sons (1998).

Immunopanning der N3FL-Kulturen

Arbeitsschritte am ersten Tag:

Materialien: Polyornithin-Lösung, Tris-HCL (ph=9,5), biotinylated anti-mouse IgM, Aluminium-Folie, 10 cm Zellschalen (Falcon Optilux)

Der biotinilierte anti-mouse IgM-Antikörper wird mit 5 ml Tris-HCL-Puffer (ph=9.5) 1:100 verdünnt und auf eine 10 cm Schale (*Falcon Optilux*) gegeben. Die Schale wird mit Aluminiumfolie umhüllt und 12 h bei 4 °C eben und erschütterungsfrei gelagert. Polyornithin-beschichtete Schalen werden für die Aussaat der gepannten Zellen vorbereitet.

Arbeitsschritte am zweiten Tag:

Materialien: PBS (steril), monoklonaler PSA-NCAM-Antikörper (IgM), BSA (filtriert), N3 Medium, Hanks`balanced salt solution (Hanks), DNase, 3 Pasteur-Pipetten, Mikrosieb (40 µm)

Die tags zuvor mit dem biotinilierten anti-mouse IgM-Antikörper beschichtete Schale wird 3 x vorsichtig mit 5 ml PBS gewaschen. 100 mg BSA werden in 5 ml PBS gelöst (entsprechend einer Gesamtkonzentration von 2 % BSA) und über einen 20-µm Filter in ein 15 ml-Röhrchen gefiltert. PSA-NCAM-Antikörper wird in einer Gesamtverdünnung von 1:400 zugegeben. Die Lösung wird für 1 h bei RT auf den Schalen belassen. Anschließend wird die Antikörperlösung abgenommen und aufbewahrt. Die Schale wird 3 x mit N3 Medium gewaschen. Die in N3L kultivierten Zellen werden 2 x mit 5 ml Hanks-Puffer gespült. Im Anschluss werden 4,5 ml Hanks-Puffer und 500 µl DNase (Vorverdünnung 1:100; entspricht einer Gesamtverdünnung von 0,1 %) zugesetzt. Die Zellen werden nun mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch von der Platte entfernt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Schale wird 2 x mit je 4 ml Hanks-Puffer gespült, um noch verbliebene Zellen aufzunehmen. Die gewonnene Zellsuspension wird mit 1000 U/min für 7 min bei RT zentrifugiert.

Anschließend wird das Zellpellet in 3 ml einer 0.1 % DNase/Hanks-Puffer-Lösung resuspendiert und mit Hilfe geflämmerter Pasteur-Pipetten zu einer Einzelzellsuspension trituriert. Die Zellsuspension wird durch ein Mikrosieb mit 40 µm Porengröße gegeben und mit 10 ml Hanks-Puffer nachgespült. 20µl der Zellsuspension werden zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Bei RT wird 7 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Während des Zentrifugierens wird der primäre Antikörper entfernt und dieser noch 3 x mit 5 ml N3 Medium gespült. Das Pellet wird in 5 ml N3

Medium gelöst und durchmischt, dann werden die Zellen auf die vorbereitete Panningschale gegeben.

Die Panningschale wird nun für 30 min bei 37 °C im Zellkulturinkubator gelagert. Hierbei wird die Schale nach jeweils 10 und 20 Minuten vorsichtig geschwenkt. Im Anschluss daran wird die Schale 6 x mit 5 ml N3 Medium gespült, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Die erste Spülfraktion wird in ein 15 ml Röhrchen gegeben und nachfolgend als Kontrolle separat ausplattiert.

Die nach diesem Schritt noch adhärenen Zellen werden mit 3 ml Trypsin über einen Zeitraum von 2 min unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin-Inhibitor wird die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Schale wird noch 2 x mit N3 Medium gespült; anschließend werden die gewonnen Zellen mit 1000 U/min für 7 min bei RT zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in 1 ml N3 Medium gelöst und der Zellsuspension hinzugegeben. 20 µl werden für die Zellzählung entnommen. Die Zellen werden mit N3 Medium in einer Dichte von $6-8 \times 10^5$ Zellen pro Polyornithin-beschichtete 3,5 cm Schale plattiert.

Immunopanning der N3L-Kulturen

Das Immunopanningprotokoll der N3L-Kulturen gleicht weitestgehend dem der N3FL-Kulturen, wobei aufgrund geringerer Zelladhäsion auf die Verwendung eines Mikrosiebes verzichtet und die geringe verwendete Trypsinmenge durch Medium ausgewaschen werden kann.

2.2.3 Fixieren der Zellkulturen

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen werden die Zellkulturen für 10 Minuten in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung (in PBS) fixiert. Anschließend wird zweimal mit je 3 ml PBS gespült. Die Zellen werden durch 3 ml PBS mit 0,1 % Natrium-Azid-Zusatz bedeckt und der Schalendeckel mit Parafilm versiegelt. Die fixierten Zellen werden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Prinzip der Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Antigene mit Hilfe spezifischer, Fluoreszenzmarkierter Antikörper dargestellt. Gegenüber permanenten Substraten zeichnen sich Fluoreszenzfarbstoffe durch eine bessere Auflösung subzellulärer Strukturen und die Möglichkeit einer Mehrfachmarkierung aus. Fluoreszenzfarbstoffe sind Moleküle, welche das Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Licht einer längeren Wellenlänge emittieren. Die am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Rhodamin (emittiert rotes Licht) und Floureszein (emittiert grünes Licht).

Verwendete Färbungen

Die fixierten Zellen wurden mit Hilfe Zelltyp-spezifischer Antikörper auf ihre Differenzierung hin untersucht. Als Marker für eine neuronale Differenzierung diente hauptsächlich der Antikörper TUJ-1 gegen das in neuronalen Zellen exprimierte β -III-Tubulin (Lee et al. 1990). Unreife neurale Vorläuferzellen wurden mit einem Antikörper gegen das Intermediärfilament Nestin identifiziert, das jedoch auch in Gliazellen und anderen Zelltypen vorkommen kann (Lendahl et al., 1990a). Als Marker für Astrozyten diente ein Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP; Bignami und Dahl, 1974). Ergänzend kam der Antikörper O4 zum Einsatz, der ein frühes Oligodendrozyten-spezifisches Oberflächenantigen erkennt. Der Marker A2B5 wird typischerweise von glialen Vorläuferzellen exprimiert, findet sich jedoch auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf reifen glialen sowie neuronalen Zellen (Eisenbarth et al. 1979).

Färbetechnik

Immunfluoreszenzfärbungen werden überwiegend unter Verwendung von primären und sekundären Antikörpern durchgeführt. Diese Kopplung von zwei Antikörpern bietet wesentliche Vorteile. Ein sonst nur schwaches Signal kann verstärkt werden und feine Strukturen werden so sichtbar. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern, werden die Präparate vor der Inkubation mit dem primären spezifischen Antikörper mit unspezifischen Antikörpern einer anderen Tierspezies „geblockt“. Hierzu werden die Zellen über einen Zeitraum von 15 min in einer 5 %igen Lösung von Ziegen Serum (*normal goat serum*; NGS) inkubiert. Das hierin enthaltene Gemisch von Antikörpern blockiert unspezifische Bindungsstellen und verringert

dadurch Färbeartefakte. Mit dem gleichen Ziel wird auch den Antikörperlösungen 1 % NGS zugesetzt. Bei der Färbung intrazellulärer Antigene ist oft die Zugabe von Triton X-100 notwendig. Es erhöht die Permeabilität der Membran und sorgt so für eine bessere Penetration des Antikörpers. Auch durch eine längere Inkubation über Nacht kann das Signal verstärkt werden.

Für die Darstellung der Gesamtzellpopulation und zur Beurteilung der Vitalität der gefärbten Zellen kommt Höchst-Farbstoff zur Anwendung. Er bindet direkt an das Chromatin des Nukleus und emittiert blaues Licht. Die gefärbten Zellpräparate werden in einem wässrigen Einbettmedium (Vecta-Shield) eingedeckelt. Dies schützt vor Austrocknung, Ausbleichung und mikrobiologischem Befall.

Doppelmarkierung fixierter Zellen mit Antikörpern gegen β -III-Tubulin und PSA-NCAM

- Präinkubation der Zellen in 10 % NGS (15 min, RT)
- Inkubation mit *IgG-mouse monoclonal anti- β -III-Tubulin* (TUJ-1, 1:500 in PBS), 1 % NGS (1 h, RT)
- Zellpräparate dreimal mit PBS spülen
- Inkubation der Zellen für 1 h bei RT mit *FITC-conjugated goat anti-mouse IgG* (1:100 in PBS, 1 % NGS)
- Zellpräparate dreimal mit PBS spülen
- Zwischenfixieren für 15 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS)
- Zellpräparate dreimal mit PBS spülen
- Inkubation der Zellen für 15 Minuten bei RT mit 5 % NGS (in PBS)
- Inkubation der Zellen für 24 h bei RT mit *mouse monoclonal anti-PSA-NCAM* (IgM, 1:400 in PBS, 1 % NGS)
- Zellpräparate dreimal mit PBS spülen
- Inkubation der Zellen für 1 h bei RT mit *biotinylated anti-mouse IgM* (1:100 in PBS)
- Zellpräparate dreimal mit PBS spülen
- Inkubation der Zellen für 1 h bei RT mit *Texas-Red-Avidine* (1:125 in Hepes-Puffer)
- Zellpräparate dreimal mit PBS spülen
- Inkubation der Zellen für 15 Minuten bei RT mit Höchst (1:600 in Bicarbonat-Lösung)

- Einen Tropfen Vecta-Shield in die Mitte des Deckgläschens geben und versiegeln.
- Gefärbte Zellpräparate bei 4 °C im Kühlschrank lagern

Mehrfachmarkierungen mit anderen Antikörpern

Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen mit anderen Antikörpern wurden in Anlehnung an das oben wiedergegebene Protokoll für TUJ-1 und PSA-NCAM durchgeführt. Die Reihenfolge, Inkubationszeiten und Antikörperkonzentrationen sind im Folgenden in verkürzter Form wiedergegeben:

TUJ-1 und Nestin-130: *TUJ-1* (1:500), 1 h bei RT; *Nestin-130* (1:50), 1 h bei RT

A2B5 und GFAP: *A2B5* (1:200), 1 h bei RT; *GFAP* (1:100), 1 h bei RT

O4 und GFAP: *O4* (1:5), 24 h bei RT; *GFAP* (1:100), 1 h bei RT

Quantifizierung der Zellen

Zur Quantifizierung der Zellen nach den Immunfärbungen werden jeweils 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung oder mindestens 2000 Zellen ausgezählt. Berücksichtigt werden nur Zellen, die in der Höchst-Färbung eine vitale Kernstruktur aufweisen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt, soweit nicht anders angegeben, in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung.

2.3 Pilotversuche zur stereotaktischen Transplantation in das Gehirn neonataler Ratten

Mit dem Ziel, erste Daten zur in vivo Differenzierung der aufgereinigten Zellpopulation zu erhalten, wurden ausgewählte N3FL-Zellen nach Immunopanning in das Gehirn neonataler Ratten implantiert. Dabei wurden insgesamt 8 Empfängertiere mit Zellen aus drei Präparationen implantiert.

2.3.1 Vorbereitung der Zellen für die Transplantation

Nach dem enzymatischen Ablösen der Zellen mit Trypsin werden sie 7 min bei RT und 1200 U/min zentrifugiert. Die der Wand des Gefäßes anhaftenden Zellen werden mit 3 ml Hanks-Puffer + 300µl DNase vorsichtig von dem Zentrifugenröhrchen gelöst und erneut mit 1200 U/min für 7 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und mit Hanks-Puffer eine Zellsuspension einer Konzentration von 10^5 Zellen/µl hergestellt.

2.3.2 Transplantationstechnik

Zunächst werden die Ratten einer Unterkühlungsnarkose unterzogen. Hierzu werden sie für sieben Minuten auf locker geschichtetem Eis gekühlt und anschließend auf einen gekühlten Stereotaxierahmen („Cunningham Frame“) überführt. Es handelt sich hierbei um einen kleinen OP-Tisch mit stereotaktischen Vorrichtungen und der Möglichkeit, die Hypothermie durch Zugabe von Trockeneis in ein mit Ethanollösung gefülltes Reservoir aufrecht zu erhalten. Für die Implantation wird eine Glaskapillare mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 50 µm verwendet. Nach Anfertigen eines Bohrlochs erfolgt die stereotaktische Zielpunkteinstellung: Bregma – 1,2 mm (posterior), 1,8 mm (lateral), 2.1 mm (ventral ab Duralevel). Nach Einstellung des Zielpunkts (Hippocampus-Region) wird 1 µl der Zellsuspension über einen Zeitraum von 3 min injiziert. Die Kapillare verweilt in dieser Position noch 3 weitere Minuten und wird dann innerhalb von 3 min langsam herausgeführt. Damit soll ein Rückstrom der Zellen in den Stichkanal minimiert werden.

2.3.3 Histologische Aufarbeitung der Empfängergehirne

Perfusion

Die Wistar-Ratten werden in eine tiefe, terminale Inhalationsnarkose (Isofluran) versetzt, und anschließend in einer Plastikwanne fixiert. Das Epigastrium wird mit einer Schere eröffnet und das Sternum nach cranial mobilisiert. Der Thorax wird beidseits des Sternums eröffnet. Die Vena cava inferior wird abgeklemmt und mit einer Butterflynadel der linke Ventrikel punktiert. Mit einer Schere wird das rechte Atrium eröffnet und PBS über die Butterflynadel infundiert, bis klare Flüssigkeit aus dem rechten Atrium läuft. Daran schließt sich eine 15minütige Perfusion mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) an.

Gehirnentnahme aus dem Schädel

Die Kopfhaut wird entlang der Fissura sagitalis eröffnet und die Kopfschwarte beidseits nach lateral mobilisiert, bis die Schädelkalotte frei liegt. Von der Nase beginnend wird die Kalotte nach occipital mit einer Knochenzange eröffnet. Das Gehirn wird entnommen und über Nacht in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) bei 4 °C nachfixiert. Das Gehirn wird anschließend in PBS überführt und bei 4 °C gelagert.

Einbetten in Gelatine

Aus Alufolie wird eine das Gehirn fassende quaderförmige Form gefaltet. Die Form wird auf Eis gestellt und das Gehirn hineingelegt. Nun wird 37 °C warme Gelatine hineingegossen bis das Gehirn vollständig bedeckt ist. Nach 20 Minuten ist die Gelatine vollständig ausgehärtet, und kann, mit dem eingebetteten Gehirn, der Form entnommen werden.

Schneiden am Vibratom

Von dem eingebetteten Gehirn wird der gewünschte mittlere Teil mit einer fettfreien Rasierklinge herausgeschnitten. Die occipitale Schnittfläche wird mit Sekundenkleber auf den Vibratomschlitten geklebt. In PBS werden 30 µm dicke coronare Serienschnitte angefertigt und mit einer gebogenen Glasöse (geflämmte Pasteur-Pipette) in eine mit PBS und 0,1 % Natrium Azid-gefüllte 24-Loch-Platte überführt.

2.3.4 Histologische und immunhistochemische Gewebefärbungen

Hämatoxilin-Eosin Färbung (HE)

- Gehirnschnitte auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufziehen. Kurz in Wasser tauchen und für eine Minute antrocknen lassen.
- Schnitte für 10 Sekunden in Hämatoxilin tauchen.
- Von dort ins Wasserbad geben („Bläuen“). Ein wenig hin und her bewegen und erneut in sauberes Wasser geben.
- Schnitte für 3 Sekunden in Eosin geben.
- 2 x in 100 %iges Ethanol tauchen, um überschüssiges Eosin zu entfernen.

- Schnitte in Isopropanol geben und dann in Xylol überführen.
- Objektträger mit einem Tuch von Farbschlieren befreien. Ein Tropfen Einbettmedium (Entellan) auf ein passendes Deckgläschen geben und vorsichtig auf den Schnitt absenken. Überschüssiges Einbettmedium entfernen und zum Trocknen auf saugfähiges Papier legen.

Permanente immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Nestin

- Inkubation der Gehirnschnitte mit 5 % NGS (in PBS) für 15 min bei RT
- Inkubation der Gehirnschnitte für 24 h bei RT mit *rabbit polyclonal anti-Nestin-130* (IgG, 1:50 in PBS unter Zusatz von 1 % Triton und 1 % NGS)
- Gehirnschnitte 3 x mit PBS spülen.
- Inkubation der Gehirnschnitte für 1 h bei RT mit 4 Tropfen *biotinylated anti-rabbit IgG* (*Kit*)
- Gehirnschnitte dreimal mit PBS spülen.
- Inkubation der Gehirnschnitte für 1 h bei RT mit 4 Tropfen *Streptavidine-Peroxidase* (*Kit*)
- Schließlich mit *4-(Diethylamino)-benzaldehyd (DAB; 1:20 in Tris-Puffer unter Zusatz von 2,3 % H₂O₂)* für ca. 90 Sekunden unter Sichtkontrolle (Mikroskop) entwickeln.
- Gehirnschnitte 3 x mit PBS spülen.
- Gehirnschnitte auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufziehen und kurz in Wasser spülen. 2 h bei RT trocknen lassen.
- Gehirnschnitte in Küvetten mit Wasser stellen. Von dort aus für 10 Sekunden in Hämatoxilin überführen.
- Die Hirnschnitte zweimal gut in Wasser spülen („Bläuen“).
- Nun die Schnitte die aufsteigende Ethanol-Reihe passieren lassen (bis zum Xylol).
- Mit einem Tuch Farbreste auf dem Objektträger entfernen. Einen Tropfen Einbettmedium (Entellan) auf ein Deckgläschen geben und dieses sehr behutsam, von einer Seite beginnend, auf den Schnitt herunter gleiten lassen. Überschüssiges Einbettmedium entfernen und dann Schnitte trocknen lassen.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten zur Optimierung der Bedingungen des Immunopannings

Im Vorfeld von Herrn Khalad Karram in meiner Arbeitsgruppe durchgeführte Arbeiten haben ergeben, dass sich in zwei Tage alten N3L-Kulturen viele PSA-NCAM-positive Zellen nachweisen lassen. Der Anteil dieser Zellen nimmt vom ersten bis zum vierten Tag in der N3L-Kultur zu. Allerdings differenzieren die Zellen auch in zunehmendem Maße. Sie verlieren die Eigenschaften von Vorläuferzellen und bilden Fortsätze aus, die komplexe Zellaufreinigungen mittels Immunopanning unmöglich machen. Daher galt es, einen Zeitpunkt für die Gewinnung PSA-NCAM-positive Zellen zu bestimmen, an dem die ES-Zellen noch relativ undifferenziert sind, aber bereits ausreichend viel PSA-NCAM exprimieren. N3L-Kulturen, die zwei Tage ausdifferenzierten, erschienen uns als günstig, diesen Anforderungen zu entsprechen. Was die Zelldichte anbelangt, erwies es sich als optimal, die durch Immunopanning gewonnen Zellen in einer Dichte von $5 \times 10^6/\text{cm}^2$ zu plattieren.

Auswahl der Zellkulturschalen für das Immunopanning

Im Gegensatz zur Zellkultur kamen beim Immunopanning unbeschichtete Kunststoff-Schalen zum Einsatz. Benutzt wurden 10 cm Schalen (Falcon Optilux®). Versuche mit den sonst für die EB-Reifung benutzten, unbeschichteten Schalen brachten jedoch ebenfalls gute Ergebnisse.

Vorbereitung der aufzureinigenden Zellpopulation

Günstig erwies sich, die N3L-Kulturen zunächst dreimal mit Hanks-Puffer zu waschen, um Zelldetritus zu entfernen. Zum Lösen der Zellen von der Kulturschale konnten keine proteolytischen Enzyme verwendet werden, da diese das Oberflächenprotein PSA-NCAM zerstört hätten. Deshalb wurden die Zellen mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst. Besonders wichtig erwies sich das gründliche Ausschaben der Randbereiche der N3L-Kulturschalen. Mit einem Anteil von 0,1 % DNase in der Arbeitslösung ließ sich ein Verkleben der Zellen zuverlässig verhindern. Durch zweimaliges Nachspülen der Schalen mit Hanks-Puffer konnten nahezu alle Zellen zur Weiterverarbeitung gewonnen werden. Für die erfolgreiche Durchführung des Immunopanning müssen zwei wichtige Voraussetzungen erfüllt sein:

- Vorliegen der aufzureinigenden Zellen als Einzelzellsuspension
- Intakte Membranoberflächen der Zellen

Zunächst galt es, die Bedingungen für die Herstellung einer Einzelzellsuspension zu optimieren. Die Öffnungen von drei Pasteur-Pipetten wurde durch Flämmung über einem Bunsenbrenner in ihrem Durchmesser unterschiedlich stark verkleinert, so dass jeweils eine Pipette mit kleiner, mittlerer und großer Öffnung der Spitze zur Triturierung der Zellen verfügbar war. Die Zellsuspension der N3L-Kulturen wurde durch die Pipetten mit kleiner werdenden geflämmten Öffnungen gespült. Aufgrund der Variabilität der Größe der Öffnungen musste das Ergebnis in kurzen Abständen (bei der kleinsten Öffnung nach jedem Durchspülen) unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Ein Problem stellte die bei Triturierung aus zerstörten Zellen freiwerdende DNA dar. Durch Zusatz 0,1 %iger DNase zur Zellsuspension konnten die Verklumpung von Zellen und deren Wandadhäsion verringert werden.

Diese Bedingungen ergaben schließlich zufrieden stellende Einzelzellsuspensionen, in denen nur noch sehr vereinzelt kleinere Zellaggregate (bis zu 4 Zellen) nachweisbar waren. Allerdings führten diese stringenten Bedingungen auch zu einem bis zu 50%igen Zellverlust.

Nach der anschließenden Zentrifugation mussten die Zellen erneut durch die kleinste der Pasteur-Pipetten trituriert werden, um bei der Zentrifugation entstandene Verklumpungen wieder zu lösen.

Es erwies sich als günstig, die vorbereitete Immunpanningschale (sog. Panningschale) dreimal mit N3 Medium zu waschen, um überschüssigen PSA-NCAM-Antikörper zu entfernen. Die Einzelzellsuspension wurde dann vorsichtig vom Rand her auf die Selektionsschale gegeben. Bei leichtem Schwenken der Schale unter dem Zellkulturmikroskop sah man nun die einzelnen Zellen über den Boden schweben.

Ablösen der Zellen von der Panningschale

Zunächst wurden die gebundenen Zellen wie von Wiley et al. (1998) beschrieben, mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst. Trotz mehrfacher Versuche, in denen der Ansatzwinkel des Zellschabers geändert, der Druck variiert und der Vorschub verlangsamt und beschleunigt wurde, hielten die Zellen der Belastung nicht stand und zerbarsten. Die hieraufhin durchgeführte enzymatische Ablösung der Zellen mit Trypsin erwies sich als wesentlich effizienter.

3.2 PSA-NCAM Immunopanning im N3L-Stadium

Qualitative Beobachtungen während des Panning-Vorgangs

Bereits nach 10 min Verbleib im Inkubator war bei leichter Neigung der Panningschale zu erkennen, dass ein Teil der Zellen fest am Boden anhaftete. Zellen, die sich noch in Lösung befanden, glitten über die am Boden adhärenen Zellen hinweg. Die im Medium schwebenden Zellen waren zum größten Teil noch einzeln, es waren jedoch auch kleine Zellcluster (2-3 Zellen) zu sehen. Es fanden sich jedoch keine Zellcluster, die nach Neigung der Schale am Boden haften blieben. Mit dem Ziel, nur locker am Boden haftende Zellen, die evtl. PSA-NCAM-negativ waren, zu lösen, wurde die Schale mehrmals leicht seitwärts geneigt. Rotierende Schwenkbewegungen erwiesen sich jedoch als ungünstig, da es hierdurch zu einer Ansammlung loser Zellen im Zentrum der Schale kam. Der zur Verfügung stehende Platz der Schale würde so nicht optimal genutzt. Nach zwanzig Minuten dockten bereits deutlich mehr Zellen am antikörperbeladenen Boden an. Am Ende der 30minütigen Inkubation war eine Vielzahl von einzelnen, dem Boden anhaftende Zellen zu sehen. Einige von ihnen hatten einen kleinen Fortsatz entwickelt, dessen Länge bis zu der eines Zelldurchmessers betrug.

Nach mehrmaligem Spülen und Absaugen des Überstandes enthielt das über den haftenden Zellen befindliche Spülmedium nur noch ganz vereinzelt Zellen. Auf dem Schalengrund fanden sich keine Zell-Konglomerate. Das Ablösen der gebundenen Zellen nach ausgiebigem Spülen der Schale und Zugabe von 3 ml Trypsinlösung, konnte mikroskopisch verfolgt werden. Unter wiederholtem seitlichem Antippen der Schale war nach drei Minuten zu sehen, dass einzelne Zellen sich vom Boden lösten. Mit der Elektropipette wurden jetzt 10 ml N3 Medium zugegeben. Der Strahl der Pipette löste den überwiegenden Teil der Zellen von der Schale. Die Zellsuspension wurde nun zentrifugiert, um sie von dem jetzt bereits verdünnten Trypsin zu befreien. Allerdings ging durch diesen Zentrifugationsschritt ein weiterer Teil der Zellen verloren, eine Beobachtung, die auch von Wiley et al. (1998) gemacht wurde. Das nach der Zentrifugation verbleibende Zellpellet war in der Regel mit bloßem Auge nicht mehr erkennbar.

Effizienz der Aufreinigung PSA-NCAM-positiver Zellen aus N3L-Kulturen

Aus der Gesamtheit der zur Inkubation auf die Panningschale gegebenen N3L-Zellen wurde nur ein Anteil von 15,06 % \pm 7,44 % (siehe Tab. 3) als PSA-NCAM-positive Zellen isoliert. Die restlichen Zellen waren entweder PSA-NCAM-negativ oder gingen durch das Ablösen, die Zentrifugation oder den Transfer der Zellen verloren.

Zelllinie und Passage-Nr.	Zahl der verwendeten N3L-Zellen	Selektionierte PSA ⁺ -Zellen
J ₁ P ₁₈	3.380.000	650.000
J ₁ P ₁₈	1.500.000	320.000
J ₁ P ₁₉	2.600.000	120.000

Diese Daten repräsentieren 3 unabhängige Experimente, in denen 5 Tage alte N3L Kulturen einem PSA-NCAM Immunopanning unterzogen und nach weiteren 48 h fixiert und ausgewertet wurden.

Gesamtdarstellung der links gezeigten Einzelexperimente

Zellverlust
84,94 %
(\pm 7,44 %)

PSA-NCAM⁺-Zellen
15,06 %
(\pm 7,44 %)

Tab. 3. Effizienz des PSA-NCAM Immunopanning im N3L-Stadium

3.2.1 Charakterisierung der über Immunopanning von N3L-Kulturen erhaltenen Zellpopulationen

Morphologie

24 Stunden nach dem Plattieren zeigten sich wenige bipolare Zellen mit klarem Zytoplasma. Die Zellfortsätze der einzelnen Zellen standen teilweise mit einander in Verbindung. Die Zelldichte war so gering, dass kurz nach der Aussaat keine Zellen miteinander in Berührung standen. Selten anzutreffen waren große Zellen mit dunklem Zytoplasma und zahlreichen Fortsätzen.

Immunfluoreszenz

Zwei Tage nach Immunopanning und Kultivierung der Zellen in N3 Medium zeigte sich, dass Antikörper gegen β -III-Tubulin in der Mehrzahl der Zellen eine intrazelluläre filamentäre Färbung erzeugten (siehe Abb.6). Die Zellen zeigten zudem eine deutliche Membranfärbung für PSA-NCAM, die sich bis in die Peripherie der Zellausläufer fortsetzte. Nur wenige Zellen wiesen keine Anfärbbarkeit für PSA-NCAM und β -III-Tubulin auf (siehe Tab. 4).

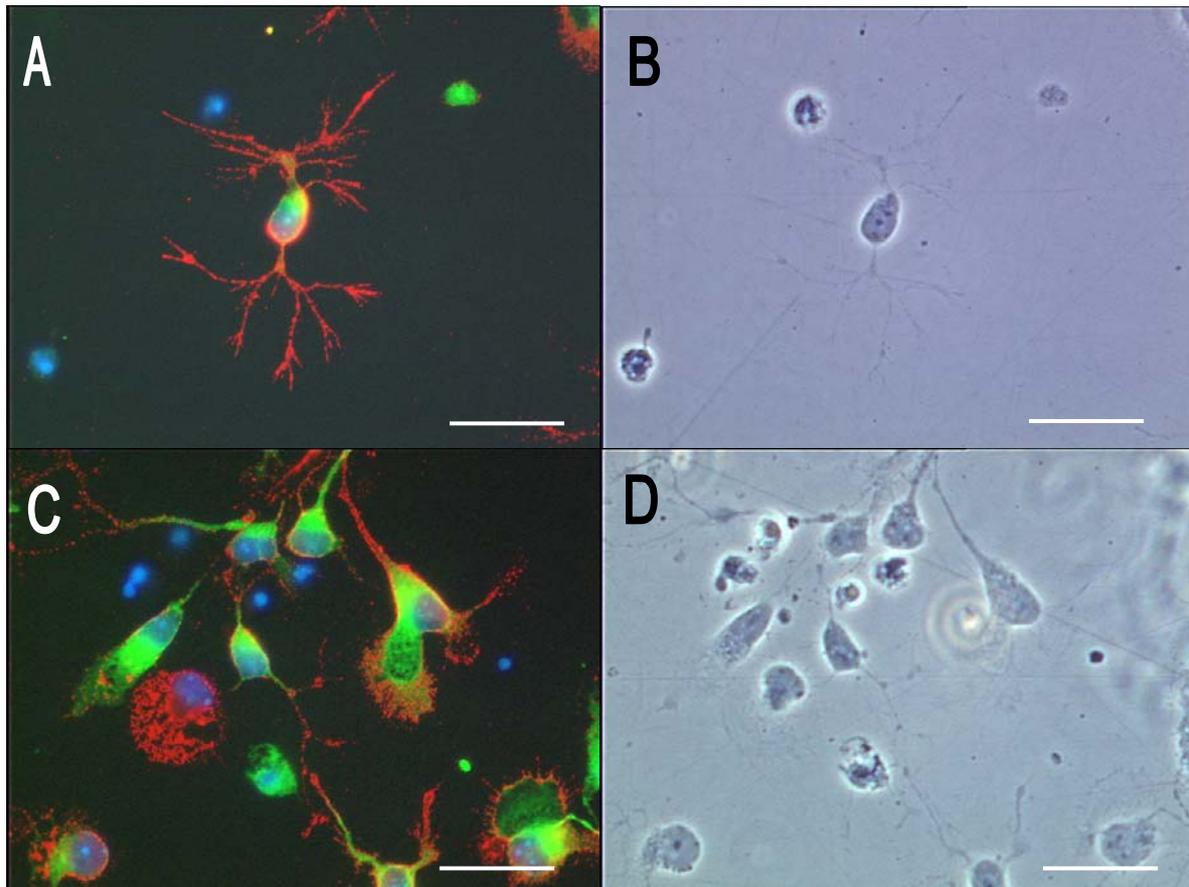
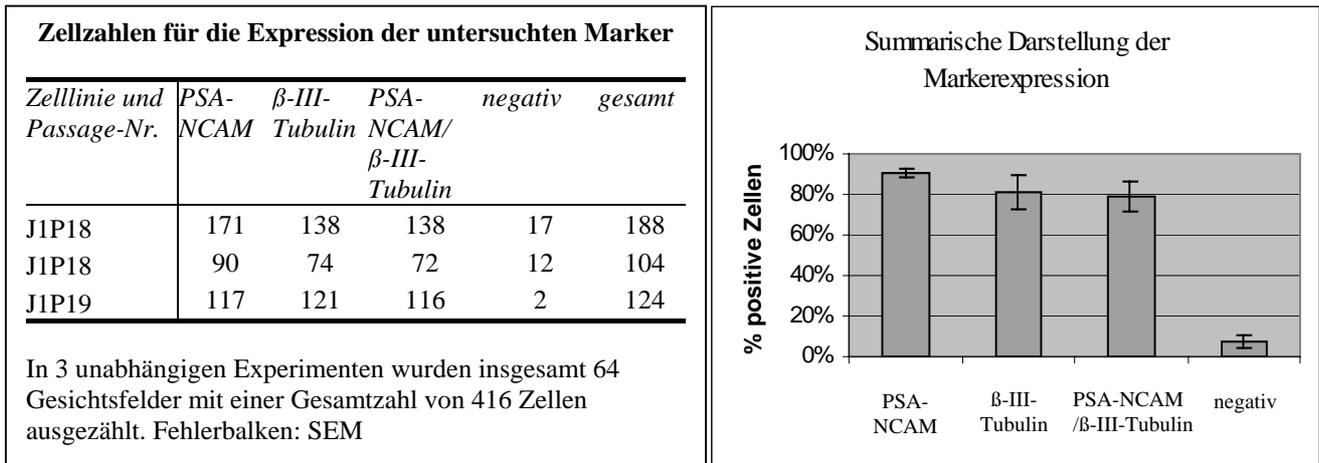


Abb. 6. ES-Zell-abgeleitete neuroepitheliale Zellen, die nach dem PSA-NCAM-Immunopanning zwei Tage ohne Zusatz von Faktoren ausreifen.

(A): Eine typische bipolare Zelle mit PSA-NCAM-positiver Zellmembran (rot) und intrazellulärer Expression von β -III-Tubulin (grün). (B): Gleiche Zelle im Phasenkontrast. (C): Gruppe PSA-NCAM/ β -III-Tubulin-doppeltmarkierter Neurone mit zahlreichen Fortsätzen. (D): Gleicher Bildausschnitt im Phasenkontrast. Skalierung 20 μ m

90,62 % \pm 2,26 % (siehe Tab. 4) der durch Immunopanning gewonnenen Zellen exprimierten PSA-NCAM. Eine mit 80,71 % \pm 8,46 % (siehe Tab. 4) etwas kleinere Population der Zellen färbte sich mit dem TUJ-1-Antikörper gegen β -III-Tubulin an. Dies waren fast ausschließlich Zellen, die ebenfalls PSA-NCAM exprimierten (78,73 % \pm 7,51 % der Gesamtheit der Zellen). 7,40 % \pm 2,98 % der Zellen waren für beide Marker negativ.



Tab. 4. Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin nach Immunopanning von N3L-Kulturen

3.3 Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin in N3FL-Kulturen

Neben N3L-Kulturen wurden für das Immunopanning auch N3FL-Kulturen eingesetzt, die sich von den N3L-Kulturen darin unterscheiden, dass sie im Anschluss an das gewohnte ITSFn-Protokoll 5 Tage unter Zusatz von FGF expandiert wurden. Es wurden zunächst zwei N3FL-Kulturansätze angelegt, die anschließend in je fünf 3,5 cm Schalen mit jeweils 1×10^6 Zellen überführt wurden. Im Anschluss an diese Proliferationsphase wurde FGF-2 abgesetzt und an den ersten vier aufeinander folgenden Tagen nach FGF-2-Entzug jeweils eine 3,5 cm Schale fixiert. Die so gewonnenen Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin untersucht.

Morphologische Merkmale von N3FL-Kulturen während der ersten 4 Tage nach FGF-2-Entzug

Die Zellen zeigten 24 h nach FGF-2-Entzug noch den typischen Phänotyp einer N3FL-Kultur. Zwei Populationen von Zellen waren vornehmlich anzutreffen. Eine Zellpopulation aus flachen Zellansammlungen ließ morphologisch vermuten, dass es sich um eine neurale Vorläuferzelle handelte. Mehrere Dutzend, dicht beieinander liegende Zellen bildeten jeweils einen lockeren Verband, der nach außen hin unregelmäßig begrenzt war und von einzelnen flacheren Zellen

umsäumt wurde. Diese Zellen waren polygonal und besaßen ein dunkles Zytoplasma. Die außen liegenden Zellen hatten einen oder mehrere kurze Fortsätze.

Des Weiteren fanden sich Zellcluster, die in ihrer Form plattierten EBs ähnelten. Im Zentrum fanden sich mehrere Lagen von Zellen übereinander, die sich konvex nach oben wölbten. Die Zellen hatten ein helles Zytoplasma und nur vereinzelt kurze Fortsätze.

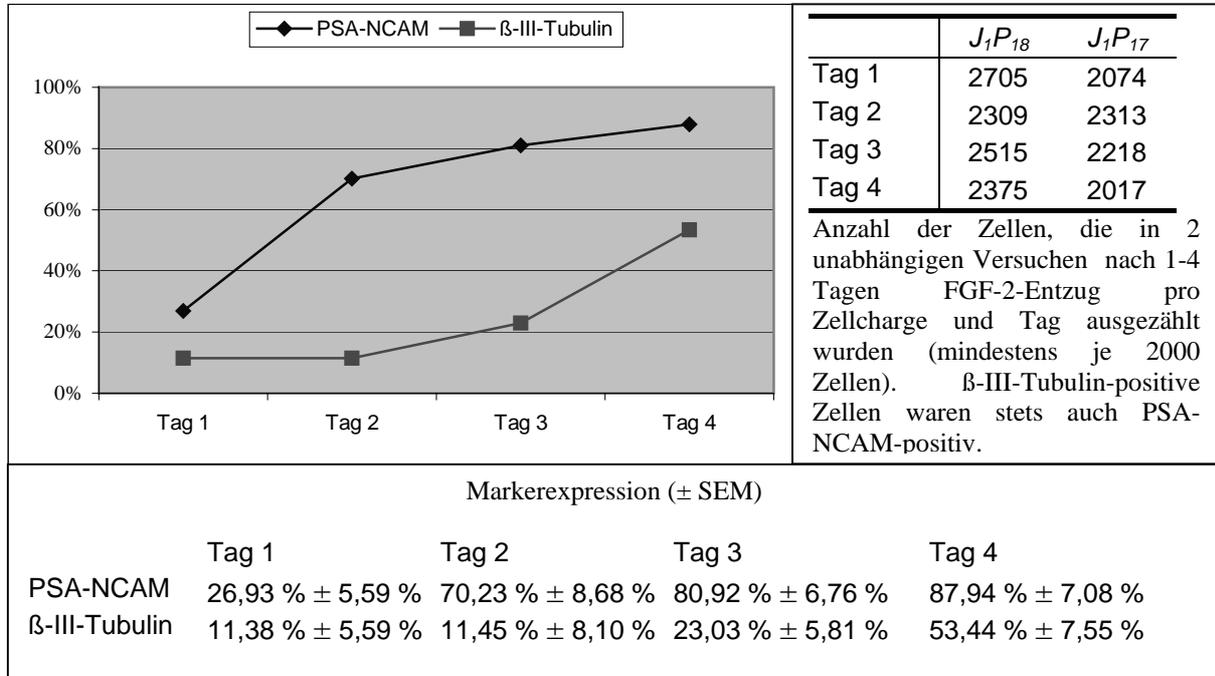
Zwei Tage nach Faktorentzug waren die Kulturen deutlich expandiert. Die Zellcluster waren etwa um das anderthalbfache größer geworden und die flacheren Zellansammlungen konfluieren zusehends. Im Verlaufe des dritten Tages waren einzeln liegende Zellen nur noch sehr selten anzutreffen. Während die Zellcluster weiter an Größe zunahm, wiesen die flachen Zellansammlungen degenerative Merkmale auf. Die Zellen zeigten Vakuolisierungen und die Zellmembranen waren beschädigt. Das Medium enthielt Zelldetritus.

Vier Tage nach Entzug von FGF-2 flachten sich die Zellcluster ab, und einzelne Zellen migrierten in die Peripherie ab. Diese entwickelten lange Fortsätze, die radiär nach außen wuchsen und stark miteinander vernetzt waren. Die Zellen der flachen Zellgruppen trugen ebenfalls lange, untereinander vernetzte Fortsätze. Diese waren in ihrem Verlauf beschädigt und hatten unregelmäßige Konturen.

Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin

In der Immunfärbung mit Antikörpern gegen PSA-NCAM und β -III-Tubulin zeigten sich deutliche Veränderungen im Anteil exprimierender Zellen. Der Anteil an PSA-NCAM-positiven Zellen nahm bereits nach 48 h stark zu, während der Anteil an β -III-Tubulin-positiven Zellen nur langsam anstieg (siehe Tab. 5). Dabei fanden sich Unterschiede im Verteilungsmuster der Marker auf den untersuchten Zellen. Zellen, die einzeln oder in der Peripherie der oben beschriebenen Cluster lagen, exprimierten deutlich häufiger beide Marker als Zellen der zentralen Clusteranteile. β -III-Tubulin-positive Zellen waren immer auch PSA-NCAM-positiv. Der Anteil der β -III-Tubulin-positiven Zellen entsprach daher exakt der Menge PSA-NCAM/ β -III-Tubulin-doppeltmarkierter Zellen. Nach dem vierten Tag nach FGF-2-Entzug war eine quantitative Auswertung der Markerexpression aufgrund der hohen Zelldichte und Zeichen der Degeneration nicht mehr möglich. Ohnehin wären Zellen in diesen späten Differenzierungsstadien aufgrund ihrer Fragilität und ihrer bereits weitgehend abgeschlossenen Ausreifung für die Isolierung einer früh in der Differenzierung stehenden neuronalen Zelle ungeeignet gewesen. Wir entschieden uns

daher, N3FL-Kulturen für das PSA-NCAM-Immunopanning zu verwenden, die 2 Tage ohne FGF-2 ausdifferenzierten. Diese Zellen wiesen einen hohen Gehalt an PSA-NCAM bei gleichzeitig noch wenig differenzierter Morphologie auf.



Tab. 5. N3FL-Kultur nach FGF-2-Entzug: Expression von PSA-NCAM und β-III-Tubulin im Zeitverlauf

3.4 PSA-NCAM Immunopanning von N3FL-Kulturen

Um das Immunopanning von N3FL-Kulturen zu optimieren, wurden geringfügige Modifikationen des N3L-Immunopanning-Protokolls durchgeführt. Die Einzelzellsuspensionen der N3FL-Kulturen wiesen im Vergleich zu N3L-Kulturen eine ausgeprägte Tendenz zur Verklumpung und Anhaftung an Pipetten und Plastikgefäßen auf. Ein ähnliches Phänomen war bereits von Wiley et al. (1998) beschrieben worden. Dies erforderte es, die Zeit der Zentrifugation auf sieben Minuten zu erhöhen. Das Pipettieren musste zügiger durchgeführt werden, um den Verlust durch anhaftende Zellen an der Kunststoffpipette so gering wie möglich zu halten. Zur Elimination von Zellclustern wurde ein 40 µm Kunststoff-Mikrosieb eingesetzt. Dieser Schritt war wichtig, da Zellcluster eine wesentliche Beeinträchtigung für die Reinheit der

PSA-NCAM-positive Zellen darstellten. Enthielte ein nicht aufgelöster Zellcluster PSA-NCAM-positive und -negative Zellen, würden so PSA-NCAM-negative Zellen die Reinheit der Zellen nach Immunopanning reduzieren. Nach Filtration durch das 40 µm Mikrosieb fanden sich zwar noch vereinzelt Zellpaare, aber keine größeren Cluster mehr. Durch die starke Wandadhärenz der Zellen nach Immunopanning würde eine Verdünnung des Trypsins mit mehrfachen Wasch- und Zentrifugationsschritten die Ausbeute enorm reduzieren. Aus diesem Grund wurde ein Trypsin-Inhibitor verwendet.

Qualitative Beobachtungen während des Immunopanning-Vorgangs

Die Beobachtungen während der 30-minütigen Inkubation der Panningschale entsprachen weitestgehend denen, die bei dem PSA-NCAM-Immunopanning der N3L-Kulturen gemacht wurden (siehe oben). Ein Unterschied war die große Menge von $0,6 - 4,1 \times 10^7$ Zellen (siehe Tab.6), die auf die Panningschalen gegeben wurden. Für jede einzelne Zelle stand daher eine weitaus geringere Fläche Antikörper-beschichteter Fläche auf der Panningschale zur Verfügung. Am Ende des Panningvorgangs war die Panningschale dicht mit Zellen übersät, und viele Zellen befanden sich noch im Medium.

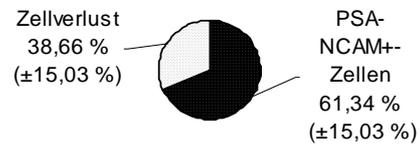
Aufreinigung PSA-NCAM-positiver Zellen aus N3FL-Kulturen

Der Anteil der durch das Immunopanning gewonnenen PSA-NCAM-positive Zellen aus N3FL-Kulturen war größer als bei den verwendeten N3L-Kulturen. Es wurden $61,34 \pm 15,03$ % (siehe Tab.6) PSA-NCAM-positive Zellen aus der Gesamtheit der für das Immunopanning verwendeten N3FL-Kulturen gewonnen. Die Zellzahl der eingesetzten N3FL-Kulturen war um ein vielfaches höher als bei den verwendeten N3L-Kulturen (vgl. Tab.3 mit Tab.6). Der Verlust der für das PSA-NCAM Immunopanning eingesetzten Zellen betrug $38,66 \pm 15,03$ % (siehe Tab.6). Hierin enthalten sind PSA-NCAM-negative Zellen und PSA-NCAM-positive Zellen, die bei der Prozedur verloren gingen.

Zelllinie und Passage-Nr.	Zellzahl der verwendeten N ₃ FL-Kulturen	Isolierte PSA ⁺ -Zellen
J ₁ P ₁₉	12.000.000	5.000.000
J ₁ P ₁₆	12.500.000	6.250.000
J ₁ P ₁₉	6.250.000	4.250.000
J ₁ P ₁₇	27.650.000	22.100.000
J ₁ P ₁₈	41.000.000	23.375.000

In 5 unabhängigen Experimenten wurden N3FL-Kulturen 2 Tage nach FGF-2-Entzug einem PSA-NCAM Immunopanning unterzogen und ausgezählt.

Gesamtdarstellung der links gezeigten Einzelergebnisse



Werte +/- Standardabweichung

Tab. 6. Effizienz des PSA-NCAM Immunopanning von N3FL Kulturen

3.4.1 Charakterisierung der über PSA-NCAM-Immunopanning von N3FL-Kulturen erhaltenen Zellpopulationen

24 Stunden nach Aussaat der Zellen auf Polyornithin-beschichtete Petrischalen waren sie von einheitlichem Phänotyp. Die Zellen waren rundlich, von ähnlicher Größe und hatten ein klares Zytoplasma. Innerhalb des ersten Tages nach Immunopanning entwickelten die Zellen wenige kleine Fortsätze, die bereits mit denen von benachbarten Zellen in Kontakt standen. Es war nur wenig Zelltod auszumachen, nur vereinzelt fanden sich abgestorbene Zellen. Im Verlaufe der ersten 48 Stunden nach Immunopanning schien die Population leicht zu proliferieren oder war zumindest von der Zellzahl stabil. Zellen, die nah bei einander positioniert waren und miteinander in Verbindung standen, richteten sich aneinander aus, und bildeten lockere Anhäufungen von etwa 50 Zellen (siehe Abb.7). Diese Zellkonglomerate schienen im Zentrum mitotische Aktivität aufzuweisen, während Zellen, die außerhalb dieser Zellverbände lagen, schneller zu Grunde gingen. Erst nach 48 Stunden machten sich Zeichen der Degeneration bemerkbar. Zellen lösten sich vom Boden, die Fortsätze wurden in ihrer Kontur unregelmäßig und Vakuolen entstanden im Inneren der Zellen.

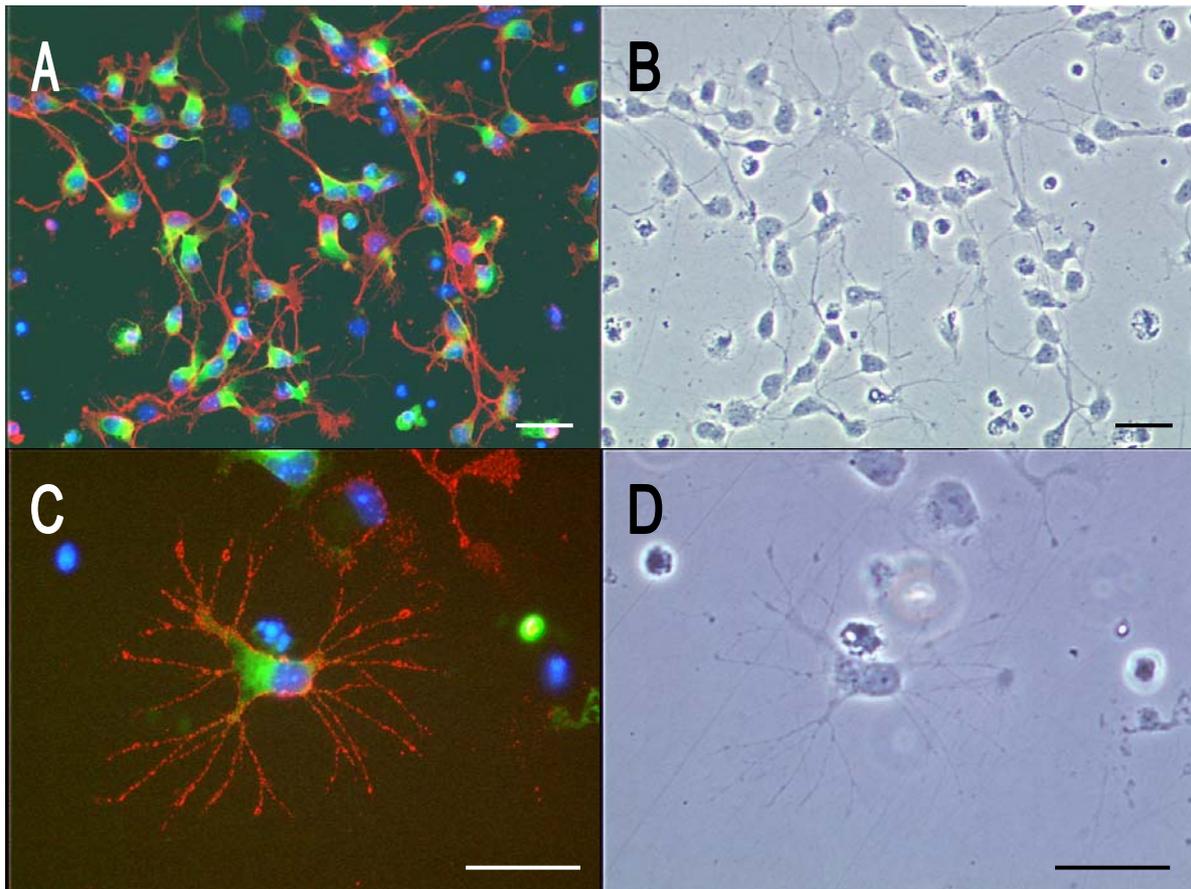
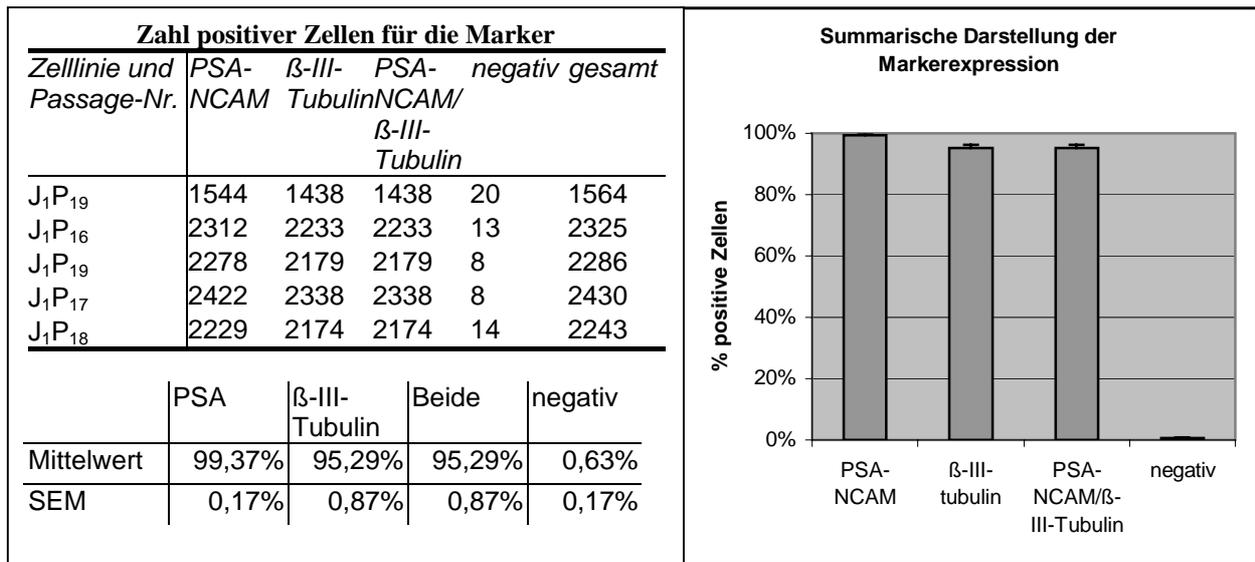


Abb. 7. ES-Zell-abgeleitete, über PSA-NCAM Immunopanning von N3FL-Kulturen gewonnene neuronal differenzierte Zellen (2 Tage nach Immunopanning).

(A): Netzwerk PSA-NCAM-positiver (rot) und β -III-Tubulin-positiver (grün) Zellen mit langen Fortsätzen und neuronaler Morphologie. (B): Phasenkontrast. (C): PSA-NCAM-positive/ β -III-Tubulin-positiv Zelle mit zahlreichen Zellfortsätzen. (D): Phasenkontrast. Skalierung 20 μ m

Eine Expression von PSA-NCAM ließ sich nach 48 h in nahezu allen einem PSA-NCAM-Immunopanning unterzogenen Zellen nachweisen ($99,37\% \pm 0,17\%$, siehe Tab.7, Abb.7a und c). Ein Großteil dieser Zellen ($95,29\% \pm 0,87\%$) ließ sich mit dem TUJ-1-Antikörper für β -III-Tubulin anfärben (siehe Tab.7, Abb.7a und c). Der Teil der Zellen, der PSA-NCAM und β -III-Tubulin exprimiert, entsprach exakt dem Anteil der β -III-Tubulin-positiver Zellen. Dies bedeutet, dass die β -III-Tubulin-positiven Zellen in den 5 unabhängig durchgeführten Experimenten immer auch PSA-NCAM-positiv waren.



Tab. 7. Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin nach Immunopanning von N3FL-Kulturen
In 5 unabhängigen Experimenten wurden 91 Gesichtsfelder mit einer Gesamtzahl von 10848 Zellen ausgezählt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an.

Wurden die durch PSA-NCAM-Immunopanning gewonnenen Zellen auf ihre Expression von Nestin und β -III-Tubulin untersucht ($n = 1$), stellte sich ein Anteil von 6,90 % (siehe Tab.8) der aufgereinigten Zellpopulation als Nestin-positiv dar. Diese Zellen fanden sich meist in kleinen Gruppen (3-5) und lagerten sich wabenförmig dicht zusammen. Sie wuchsen flach und

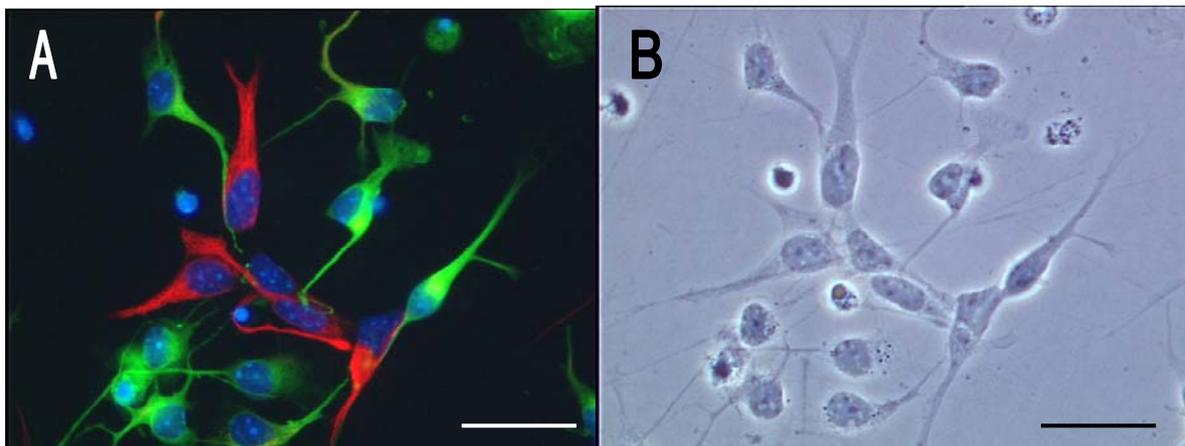


Abb. 8. Neuronal differenzierte ES-Zellen wurden unter Zusatz von FGF-2 proliferiert und nach zwei Tagen einem PSA-NCAM-Immunopanning zugeführt.

Die Fixation der Zellen erfolgte zwei Tage nach dem Immunopanning. Eine Kohorte Nestin-positiver Zellen (rot), umgeben von β -III-Tubulin positiven Zellen (grün). Es finden sich keine Zellen mit Doppelmarkierung (A). Phasenkontrast (B). Skalierung 20 μ m

hatten meist nur einen plumpen Fortsatz mit nur vereinzelt kleinen Aufzweigungen (siehe Abb.8a und b). Es fiel auf, dass diese Nestin-positiven Zellansammlungen von β -III-Tubulin-markierten Zellen in dichter Nachbarschaft umgeben waren und auch zum Teil über Fortsätze in Kontakt zueinander standen. Es wurden keine Zellen beobachtet, die eine Doppelmarkierung für Nestin und β -III-Tubulin aufwiesen (siehe Abb.8a).

Nur sehr vereinzelt fanden sich A2B5-positive oder GFAP-positive Zellen (siehe Tab.8). Keine Zelle war für beide Marker positiv. Es waren einzelne sehr lange GFAP-positive Fortsätze zu sehen, die jedoch nicht mit einem Zelleib in Verbindung standen und sich keinem der mit Höchst-Farbstoff markierten Zellkerne zuordnen ließen. Hierbei handelte es sich am ehesten um markierte Fragmente abgestorbener Zellen. Die A2B5-positiven Zellen entsandten sternförmig Fortsätze und erschienen im Phasenkontrast sehr flach. Der Zellkern nahm fast den ganzen Zellkörper ein. GFAP-positive Zellen wiesen insbesondere im Bereich der Fortsätze sowie deren Ansatz am Zelleib eine intensive Immunreaktion auf. O4-positive Zellen konnten in der Gesamtheit der über PSA-NCAM-Immunopanning gewonnenen Zellen nicht gefunden werden (siehe Tab.8).

Zahl positiver Zellen für die Marker						Prozentualer Anteil positiver Zellen	
<i>Zelllinie und Passage-Nr.</i>	<i>Nestin</i>	<i>Nestin/β-III-Tubulin</i>	<i>GFAP</i>	<i>A2B5</i>	<i>O4</i>	<i>gesamt</i>	
J ₁ P ₁₉	95	0				1377	A2B5 0,45 %
J ₁ P ₁₉			2	5		1105	GFAP 0,18 %
J ₁ P ₁₉					0	1914	Nestin 6,90 %
							Nestin/ β -III-Tubulin 0,00 %
							O4 0,00 %

Repräsentative Ergebnisse eines Immunopanningversuchs. Es wurden in 3 Ansätzen Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt; die Gesamtzellzahl bezieht sich auf die ausgezählten Zellen pro Färbeansatz.

Tab. 8. Expression nicht-neuronaler Marker in über PSA-NCAM-Immunopanning gewonnenen Zellen

Charakterisierung der ausselektionierten, nicht-adhärennten Zellpopulation

Die beim Immunopanning (IP) von N3FL Kulturen nicht adhärennten Zellen (IP-Negativfraktion) wurden näher charakterisiert. Es handelt sich hierbei nicht ausschließlich um PSA-NCAM-

negative Zellen, sondern um Zellen des Überstandes nach dem Immunopanning. Von diesem Überstand ist anzunehmen, dass er auch PSA-NCAM-positive Zellen enthielt, die nicht an der Panningschale hafteten oder sich wieder lösten. Die Zusammensetzung der Zellen schwankte stark in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Kultur.

Die Zellen des Mediumüberstandes nach Immunopanning wurden auf Polyornithin-beschichtete Schalen ausgesät. In einer Dichte von 1×10^6 Zellen / $3,5 \text{ cm}^2$ Petrischale wurden die Zellen zwei Tage in N3 Medium ohne Zusatz von FGF-2 kultiviert und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach 24 h zeigten sich dichte Zellkulturen mit viel Zelltod. Zumeist fanden sich große Zellkonglomerate, die sich im Zentrum mitotisch aktiv darstellten. Zellen des Randbereichs waren stark miteinander vernetzt und wanderten nur spärlich nach außen hin ab.

In 5 unabhängigen Experimenten wurden insgesamt 11740 Zellen ausgezählt. Prozentuale Anteile der Marker.		Repräsentative Ergebnisse aus Einzelversuchen. Es wurden jeweils mindestens 20 Gesichtfelder oder 2000 Zellen ausgezählt. Prozentuale Anteile der Marker.	
PSA-NCAM	87,87 %	Nestin	6,20 %
β -III-Tubulin	78,76 %	Nestin ⁺ / β -III-Tubulin ⁺	0,00 %
β -III-Tubulin ⁺ /PSA-NCAM ⁺	78,76 %	GFAP	0,81 %
negativ	12,13 %	A ₂ B ₅	1,79 %
		O4	0,00 %

Tab. 9. Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin von Zellen der IP-Negativfraktion

87,87 % \pm 3,37 % (siehe Tab.9) der Zellgesamtheit der IP-Negativfraktion waren nach 48 h Kultur für PSA-NCAM positiv. Es fiel auf, dass Zellen, die unreif erschienen und sich im Zentrum der oben beschriebenen Zellanhäufungen befanden, oftmals PSA-NCAM-negativ waren. Zellen, die abseits dieser Konglomerate lagen, zeigten fast immer eine PSA-NCAM-Expression. Für die β -III-Tubulin-Expression zeigte sich ein Anteil von 78,76 % \pm 4,20 % (siehe Tab.9). Den PSA-NCAM-positive Zellen des Immunopannings entsprechend, zeigten auch bei der IP-Negativfraktion alle β -III-Tubulin-exprimierenden Zellen eine Expression von PSA-NCAM (n = 5, siehe β -III-Tubulin-positive/PSA-NCAM-positive Zellen in Tab.9).

Bei kombinierter Immunfluoreszenzfärbung für β -III-Tubulin und Nestin zeigte sich ein Anteil von 6,20 % \pm 1,38 % (siehe Tab.9) Nestin-positiver Zellen. Keine der ausgewerteten Zellen koexprimierte Nestin und β -III-Tubulin. Einige der Nestin- und auch der β -III-Tubulin-positiven

Zellen zeigten eine nur mäßig ausgeprägte Anfärbbarkeit für den jeweiligen Marker. Es fanden sich nur geringe Anteile glialer Marker (siehe Tab.9)

3.5 Versuche zur Proliferation der aus N3FL-Kulturen selektierten PSA-NCAM-positiven neuronalen Zellen

Bei zwei Immunopanning-Experimenten wurde geprüft, in wie weit selektierte PSA-NCAM-positive Zellen weiter proliferiert werden können, eine Voraussetzung, die Stammzellen erfüllen müssten (siehe Einleitung). In Anlehnung an das Verfahren zur Proliferation von neuronal differenzierten ES-Zellen der Arbeitsgruppe um Rao wurden unmittelbar nach dem Immunopanning jeweils 1×10^6 PSA-positive Zellen auf eine mit Polyornithin beschichtete $3,5 \text{ cm}^2$ Schale plattiert und FGF-2 und NT-3 in einer Konzentration von jeweils 10 ng/ml zugesetzt. Die Zellen zeigten keinerlei mitotische Aktivität und gingen nach 48 Stunden zu Grunde.

Die Arbeitsgruppe um Rao beschrieb eine sich selbst erneuernde neuronal-beschränkte Vorläuferzelle (neuron-restricted precursor, NRP), die sie aus Primärzellen und aus ES-Zellen der Maus durch PSA-NCAM-Immunopanning isolierte. Die Bedingungen der ES-Zellkultur dieser Arbeitsgruppe unterschied sich von unserem Zellkultur-Protokoll durch die Ausdifferenzierung der neuronalen Zellen vor dem Immunopanning mit Retinsäure (100 μM) sowie dem erweiterten Faktoren-Angebot mit NGF, PDGF und BDNF (jeweils 10 ng/ml) nach dem Immunopanning. Schließlich differenzierten die NRPs unter FGF-Entzug und Laminin- oder poly-L-Lysin-Beschichtung zu Neuronen unterschiedlichen Phänotyps (Mujtaba et al., 1999).

3.6 Pilotexperimente zur Transplantation aus N3FL-Kulturen selektierter PSA-NCAM-positiver Vorläuferzellen

Die Transplantation durch PSA-NCAM Immunopanning selektierter Zellpopulationen in das Gehirn neonataler Ratten sollte einen ersten Eindruck über das „in vivo“-Differenzierungspotential dieser Zellen vermitteln. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Pilotstudie die Gehirne von 8 Empfängertieren analysiert, die am Postnataltag 2 eine Injektion von 1 μl einer Zellsuspension mit 10^5 Zellen/ μl erhalten hatten.

3.6.1 Histopathologische Untersuchung der Transplantate

Acht Ratten vom Typ "Wistar" erhielten am zweiten Postnataltag aufgereinigte PSA-NCAM-positive Zellen aus N3FL-Kulturen als Transplantat in den Seitenventrikel. In einem Teil der Empfängertiere konnten die Transplantate bereits während des Schneidens makroskopisch abgegrenzt werden. In sieben Empfängertieren ließen sich Zellcluster im Seitenventrikel erkennen; ein weiteres Transplantat bezog auch Teile des caudalen Hippocampus mit ein. Nach Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin war eine nähere morphologische Charakterisierung möglich. Hierbei zeigte sich, dass die transplantierten Zellen überwiegend im Seitenventrikel lokalisiert und nur wenig in das Gehirnparenchym vorgedrungen waren (siehe Abb.9b). Zellen im Lumen des Ventrikels bildeten ovale Zellaggregate. Hierin waren neuralrohrartige Strukturen zu erkennen (siehe Abb.9b und c). Das mehrreihige hohe Epithel bildete in den runden Zellansammlungen ein Lumen und zeigte vereinzelt apikale Mitosen. In etwa der Hälfte der runden Gebilde lagen Zellen innerhalb des Lumens. Zusätzlich zeigten sich Zellverbände anderer Morphologie. Sie hatten ein helleres bläuliches Zytoplasma, waren etwas größer und lagen weniger dicht in einem lockeren Zellverbund (siehe Abb.9b). Sie wiesen keine Polarität auf und verteilten sich um die runden, epithelialen Strukturen. In diesem Gewebe fanden sich Erythrozyten und Kapillaren.

3.6.2 Inkorporation und Differenzierung der transplantierten Zellen

Zur Identifikation der transplantierten Zellen wurden die Gewebeproben der Empfängertiere einer in-situ Hybridisierung unterzogen (siehe Abb.9a und d), einem Verfahren, das durch Verwendung Spezies-spezifischer DNA-Sonden eine Unterscheidung zwischen Zellen der Maus und der Ratte zulässt. Nach Inkorporation der Mauszellen in Gebiete abseits der Injektionsstelle können diese anhand des Hybridisierungssignals identifiziert werden.

Die Mauszellen waren deutlich durch die schwarze Färbung der in-situ-Hybridisierung markiert (siehe Abb.9a und d). Zwei Wochen nach Transplantation waren nur etwa 10 % der hybridisierten Zellen aus dem Transplantat ausgewandert (siehe Abb.9a). Die Zellen legten dabei eine Distanz von bis zu 200 µm zurück. Generell ließen sich in allen acht Gehirnen zwei Gewebetypen unterscheiden. Zum einen fanden sich rosettenförmige Neuralrohr-ähnliche Strukturen. Diese Strukturen wurden von lockeren Zellverbänden umgeben, aus denen einzelne

Zellen ins Wirtsgewebe migrierten. Die nur schwach ausgeprägte Permanentfärbung mit einem Antikörper gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein-2 (MAP-2) ließ den überwiegenden Teil der aus den Clustern auswandernden Zellen positiv erscheinen. Eine exakte quantitative Auswertung war aufgrund der sehr geringen Signalstärke jedoch nicht möglich. (siehe Abb.9d).

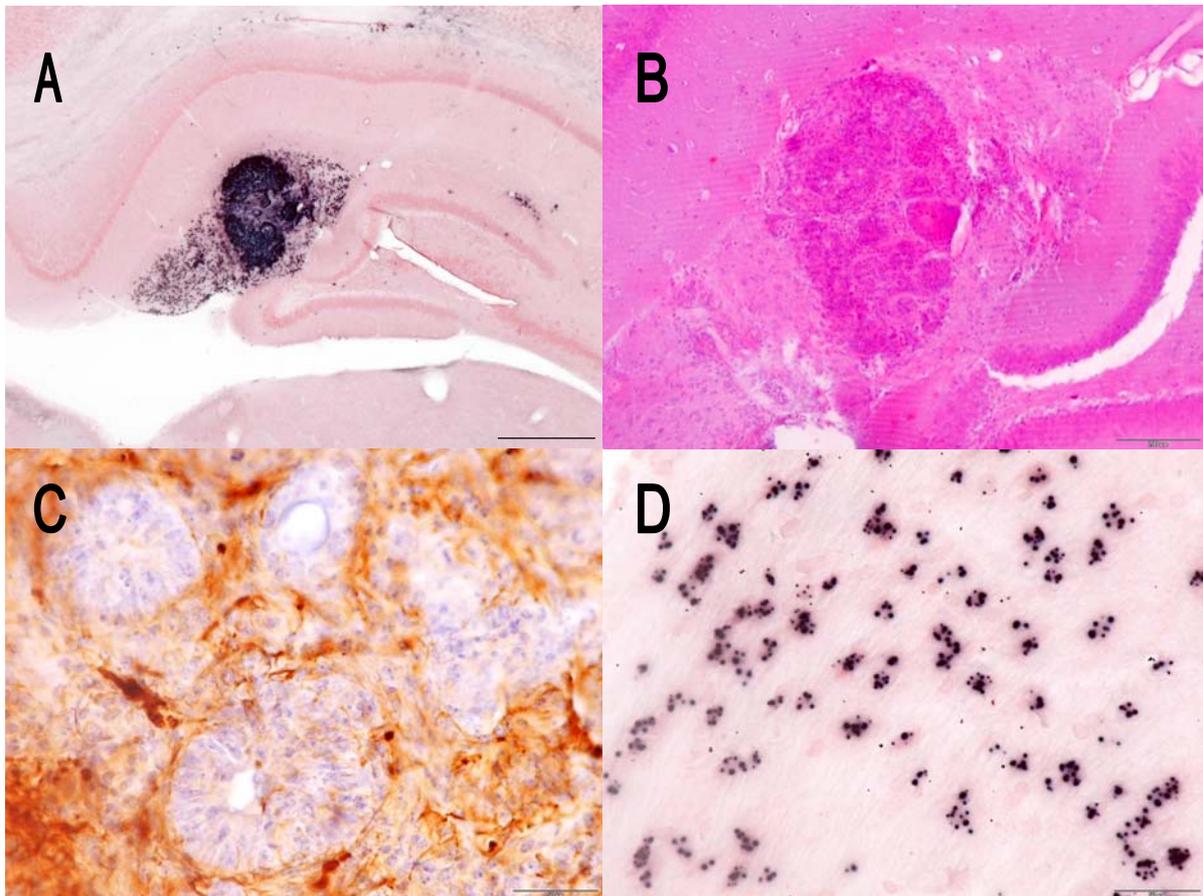


Abb. 9. Koronare Schnitte durch das Gehirn transplanteder Wistar-Ratten.

N3FL-Zellen wurden 2 Tage nach FGF-2-Entzug einem Immunopanning unterzogen und danach direkt mit einer Kanüle in die Seitenventrikel 2 Tage alter Versuchstiere transplantiert. Nach 14 Tagen wurden die Gehirne histologisch untersucht. (A) Die in-situ-Hybridisierung zeigt eine nur spärliche Integration der Zellen in das Wirtsgehirn, der überwiegende Anteil der Spenderzellen hat sich im Bereich des Seitenventrikels angesiedelt. (B) Transplantat mit Neuralrohr-artigen Strukturen, umgeben von lockerem Gewebe; HE-Färbung. (C) Neuralrohrartige schwach Nestin-positive Rosetten mit angrenzendem für Nestin kräftig markiertem Gewebe. Nestin/Hämatoxylin-Färbung. (D) Migrationsstrom der in-situ-hybridisierten Mauszellen ins Wirtsgehirn. Die Transplantatzellen zeigen eine nur schwache rote Anfärbung mit dem MAP-2-Antikörper (Antikörper-Markierung nach in-situ-Hybridisierung nur eingeschränkt möglich). Messbalken: A: 500 µm, B: 200 µm, C 50 µm und D: 25 µm.

Mit etwa 70 % der Zellen bestand der größte Teil des Transplantats aus Zellen, die deutlich Nestin exprimierten (siehe Abb.9c). Die Zellen der neuralrohrähnlichen Strukturen waren

schwach Nestin-positiv. Es stellten sich radiär das Epithel durchziehende Nestin-positive Filamente dar (siehe Abb.9c). Die Endothelzellen der Gefäße stellten sich ebenfalls Nestin-positiv dar. Innerhalb des Transplantats gab es aber auch Areale, die sich Nestin-negativ darstellten (siehe Abb.9c).

Diese Untersuchungen der in-vivo-Differenzierung der PSA-NCAM-positiven Zellen stellen eine qualitative Pilotstudie dar; weitere detaillierte quantitative Untersuchungen sind notwendig, um das Differenzierungspotential dieser Zellen im Wirtsgehirn zu ergründen.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Selektion ES-Zell-abgeleiteter neuronaler Kulturen mittels Immunopanning die Erzeugung hochaufgereinigter neuronaler Zellpopulationen erlaubt. Immunhistochemisch und morphologisch handelte es sich bei den selektionierten Zellen um eine nahezu reine Kultur neuronalen Charakters. Es ließen sich Zellpopulationen mit einem Anteil von bis zu $95,29 \pm 0,87$ % β -III-Tubulin-positiver Neuronen erzeugen, die nach dem Immunopanning über mindestens 48 Stunden rekultivierbar waren. Im Folgenden soll die Wertigkeit von PSA-NCAM als selektierbares Markerantigen zur Aufreinigung einer neuronalen Vorläuferzelle aus einer ES-Zell-abgeleiteten neuronalen Kultur für den therapeutischen Zellersatz im ZNS diskutiert werden. Dabei wird das Immunopanning mit anderen, in unserer Arbeitsgruppe praktizierten Aufreinigungsverfahren verglichen.

4.1 Aufreinigung PSA-NCAM-positiver Zellen aus ES-Zell-abgeleiteten neuronalen Kulturen

Ziel dieser Arbeit war es, PSA-NCAM-positive Zellen in hoher Reinheit und großer Zellzahl zu selektionieren. Zunächst war noch unklar, ob es sich bei einer reinen PSA-NCAM-positiven Kultur um ausschließlich neuronal differenzierte Zellen handeln würde. Es gab zwar viele Hinweise darauf, dass PSA-NCAM auf Neuronen im ZNS exprimiert wird (Butler et al., 1997; Landmesser et al., 1990; O'Leary und Terashima, 1988), aber auch gliale Zellen exprimieren zumindest temporär PSA-NCAM (Ben-Hur et al., 1998).

Um die über Immunopanning gewonnenen PSA-NCAM-positiven Zellen für weitere in vitro und in vivo Applikationen einsetzen zu können, mussten hohe Reinheitsgrade erzielt werden. Es wurden für PSA-NCAM-exprimierende Zellen prozentuale Aufreinigungen bei N3L-Kulturen von $90,62 \pm 2,26$ % (siehe Tab.4) und bei N3FL-Kulturen von $99,37 \pm 0,17$ % (siehe Tab.7) erzielt. Die besseren Ergebnisse bei der Selektion PSA-NCAM-positiver Zellen aus N3FL-Kulturen lassen sich durch die Modifikationen im Immunopanningverfahren erklären, die zu einer Optimierung des Arbeitsprozesses geführt haben. Denkbar wäre zudem, dass die robusteren Zellen der N3FL-Kulturen nach dem Immunopanning wieder schneller PSA-NCAM exprimierten, als die Zellen der N3L-Kulturen. In den N3L-Kulturen wären dann Zellen als

falsch-negativ gezählt worden und die erzielten Aufreinigungsgrade dieser Versuchsreihe wären somit nur scheinbar niedriger.

PSA-NCAM-positive Zellen aus N3L und N3FL-Kulturen entsprechen frühen neuronalen Zellen

Der überwiegende Teil der selektionierten Zellen zeigte durch Markierung mit dem Antikörper TUJ-1 (siehe Tab.4 und 7) die Expression des Neuronen-spezifischen β -III-Tubulins an (Lee et al., 1990). Ein kleiner Teil der Zellen ließ sich für Nestin anfärben (siehe Tab.4 und 7) und deutete somit auf das Vorhandensein von unreifen neuroepithelialen Zellen hin (Lendahl et al., 1990a).

Interessanterweise zeigten die Zellen keine Doppelmarkierung von Nestin und β -III-Tubulin (siehe Tab.8), so dass man hier von einer Ablösung des Nestinfilaments durch ein Zelltyp-spezifischen neuronalen Marker ohne zeitliche Überschneidung ausgehen kann (siehe Abb.11). Dieses Phänomen ist bereits an neuroepithelialen Zellen des adulten Säugergehirns beschrieben worden und findet sich u.a. bei in EGF oder FGF-2 propagierten Stammzellen aus dem ZNS (Gritti et al., 1996; Reynolds et al., 1992; Weiss et al., 1996a und b).

Die selektionierten Zellen waren teilweise nur schwach positiv für Nestin oder β -III-Tubulin. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zellen gerade im Begriff waren, ihre Markerexpression von Nestin auf β -III-Tubulin umzustellen. PSA-NCAM scheint über einen Zeitraum exprimiert zu werden, der sich über zwei Entwicklungsstadien der Zellen erstreckt: Die unreifen neuroepithelialen Nestin-positiven Zellen und die schon neuronal ausdifferenzierten β -III-Tubulin-positiven Zellen. PSA-NCAM würde demnach sowohl auf bereits neuronal determiniertem Neuroepithel als auch auf unreifen Neuronen exprimiert werden (siehe Abb.10).

Ob eine Koexpression von Nestin und PSA-NCAM tatsächlich besteht, bedarf weiterer Untersuchungen durch Doppelmarkierung der Zellen. In Einzelexperimenten fand sich ein Anteil von 6,90 % Nestin-positiver Zellen in einer Zellpopulation mit einem Anteil von $99,37 \pm 0,17$ % PSA-NCAM-exprimierender Zellen (siehe Tab.8), so dass hier ein kleiner Anteil der Zellen mit Koexpression anzunehmen ist, wie es bereits von Mujtaba et al., (1999) beschrieben wurde.

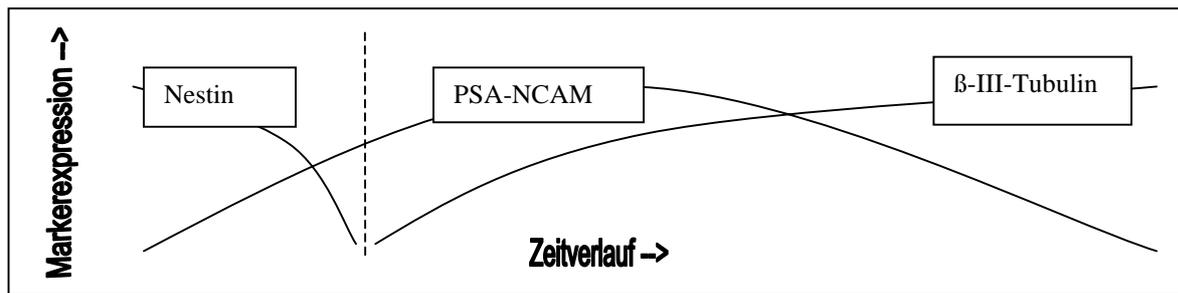


Abb. 10. Modell zu der Markerexpression einer neuronal differenzierenden Zelle im Zeitverlauf

PSA-NCAM-Expression glialer Zellen

Die PSA-NCAM-Expression glial determinierter neuroepithelialer Zellen scheint in dem verwendeten System keine wesentliche Rolle zu spielen, da sich auch nach 48 h Reifung der Zellen nach dem Immunopanning (siehe oben) nur wenige Zellen mit glialer Markerexpression fanden (siehe Tab.8). Es ist anzunehmen, dass sich die sehr wenigen PSA-NCAM-negativen Zellen unserer Zellpräparationen in diesen kleinen Anteilen widerspiegeln, denkbar wäre jedoch auch, dass einige wenige Gliazellen zu diesem Zeitpunkt PSA-NCAM exprimieren. Um dies zu klären, wären weitere Doppelmarkierungen mit zusätzlichen Markern erforderlich.

Ben-Hur et al. (1998) fanden PSA-NCAM-positive Zellen in Kulturen von neonatalen Zellpräparationen des ZNS. Es wurde eine „Prävorläuferzelle“ der bipotenten O-2A-Zelle beschrieben, die sich in Oligodendrozyten und Typ-2-Astrozyten differenziert. Selektionierte PSA-NCAM-positive Zellen dieser Kulturen entwickelten mit 51 % Astrozyten und 44 % Oligodendrozyten überwiegend Zellen glialen Phänotyps, nur 5 % reiften zu Neuronen aus. Die Phänotypisierung der aus diesen Kulturen gewonnenen nicht selektierten PSA-NCAM-negativen Zellen deutete auf einen multipotenten Zelltyp hin, der zu etwa gleichen Anteilen Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten hervorbrachte (Ben-Hur et al., 1998). Unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich eine oligodendrogliale Vorläuferzelle aus ES-Zellkulturen der Maus durch *Lineage Selection*-Verfahren, durch Verwendung eines Antibiotikaresistenzgens unter der transkriptionellen Kontrolle des 2`3`-cyclic nucleotide 3`-phosphodiesterase (CNP) Promotors gewinnen lässt (Glaser et al., 2005). Dieses Enzym kommt in sich teilenden oligodendroglialen Vorläuferzellen vor. Auch hier findet sich in der frühen Differenzierung dieser Zellen ein Anteil von 88 ± 9 % PSA-NCAM-exprimierender Zellen, vergesellschaftet mit einem hohen Anteil Nestin (80 ± 7 %). Zugleich ließen sich keine β-III-Tubulin exprimierenden Zellen nachweisen.

Das Vorkommen von PSA-NCAM in adultem Hirngewebe und in ES-Zell-abgeleiteten Kulturen mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen weist auf ein komplexes Geschehen der PSA-NCAM-Expression während der Entwicklung hin. Die Ergebnisse von Ben-Hur et al. (1998) und Glaser et al., (2005) zeigen, dass PSA-NCAM auch in den glialen Zweigen der Differenzierung von neuralem Gewebe vorkommt und daher keinesfalls ein expliziter neuronaler Marker ist. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch deutlich, dass PSA-NCAM zur Aufreinigung neuronaler Vorläuferzellen aus ES-Zell-abgeleiteter neuronaler Kulturen genutzt werden kann.

Fehlende Vermehrbarkeit PSA-NCAM-positiver Zellen in Vorversuchen zur Proliferation machen das Vorliegen einer Stammzelle unwahrscheinlich

Trotz zahlreicher Variationen der Medienkomposition und der Oberflächenbeschichtungen konnten die durch das Immunopanning von N3FL-Kulturen gewonnenen Zellen nicht weiter vermehrt werden. Da die Vermehrbarkeit der Zellen ein notwendiges Kriterium für die Definition einer Stammzelle darstellt (McKay et al., 1997; siehe Einleitung), müssen wir hier von dem Vorliegen einer neuronalen Vorläuferzelle ausgehen.

Die Arbeitsgruppe um Rao beschrieb eine selbsterneuernde ES-abgeleitete neuronale Stammzelle (Mujtaba et al., 1999), die PSA-NCAM exprimiert. Die Zellen konnten über mehr als 10 Passagen kultiviert werden und unter FGF-2-Entzug differenzieren. Das Zellkulturprotokoll unterschied sich durch den Zusatz von Retinsäure nach FGF-2-Entzug von den hier verwendeten Kulturbedingungen, die dem Protokoll von Okabe et al. (1996) folgten. Bei den von uns gewonnenen Ergebnissen zur Vermehrbarkeit der Zellen handelt es sich um Pilotexperimente, daher müssen auch die Schlussfolgerungen mit der notwendigen Vorsicht interpretiert werden.

Eine mögliche Ursache für die fehlende Proliferation der selektionierten Zellen nach Immunopanning könnte die Abwesenheit glialer Zellen darstellen. Gliazellen gelten als Hilfs- und Stützgewebe der Nervenzellen (Zilles und Rehkämper 1994a). Kulturen, die lediglich neuronale Zellen enthalten, stellen daher schon per se eine unphysiologische Situation dar. Versuche mit Zusatz von Medium glialer Kulturen könnten zumindest den humoralen Part der Gliazellen ersetzen helfen.

Elektrophysiologische Aktivität ist für das Überleben von Nervenzellen von hoher Bedeutung (Oppenheim und Nunez, 1982). Dies wurde schon früh für die Ontogenese des Menschen (Zilles und Rehkämper 1994b) und für sich entwickelnde Hühnerembryonen beschrieben (Hollyday und Hamburger, 1976). Inwieweit sich in unseren isolierten neuronalen Kulturen elektro-

physiologische Aktivität findet oder eine fehlende Aktivität das Absterben der Zellen zur Folge hatte, bedarf weiterer Untersuchungen.

Endogen produzierte Wachstumsfaktoren spielen im ZNS bei der Neurogenese und für das Überleben von Neuronen eine große Rolle. Die enzymatische Ablösung unserer Zellen von der Immunpanningschale mit Trypsin und die damit verbundene Zerstörung der Oberflächenrezeptoren auf der Zellmembran könnte daher die für das Überleben notwendige Signalkaskade unterbrochen haben, an deren Anfang ebenfalls die elektrische Aktivität der Nervenzellen steht. Die Zeitspanne, in der PSA-NCAM nach enzymatischer Entfernung auf der Zelle in nennenswertem Maße wiedergefunden wird, beträgt etwa 24 Stunden (Kiss et al., 1994). Die Arbeitsgruppe Rao hatte ihre PSA-NCAM-positiven Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Immunpanning-Schale gelöst (Mujtaba et al., 1999). Hierbei war zu erwarten, dass die Oberflächenrezeptoren der Zellmembranen weniger zu Schaden kamen, als bei der von uns durchgeführten enzymatischen Ablösung der Zellen mittels Trypsin. Zahlreiche Versuche, unsere Zellen mittels Zellschaber nach dem Immunpanning vom Boden zu lösen, zerstörten diese jedoch.

4.2 PSA-NCAM und A2B5 - bipotentes Differenzierungsmodell neuronaler Stammzellen

Die Arbeitsgruppe um Rao entwickelte ein Differenzierungskonzept für neurale Vorläuferzellen, basierend auf der PSA-NCAM-Expression (siehe Abb.11). Aus unreifen Neuroepithelzellen hervorgegangene PSA-NCAM-positive Zellen differenzieren demnach zunächst ausschließlich neuronal und werden als neuron-restricted precursors (NRPs) bezeichnet. PSA-NCAM-negative Zellen, die A2B5-positiv sind, werden entsprechend ihrer glialen Bestimmung als glial-restricted

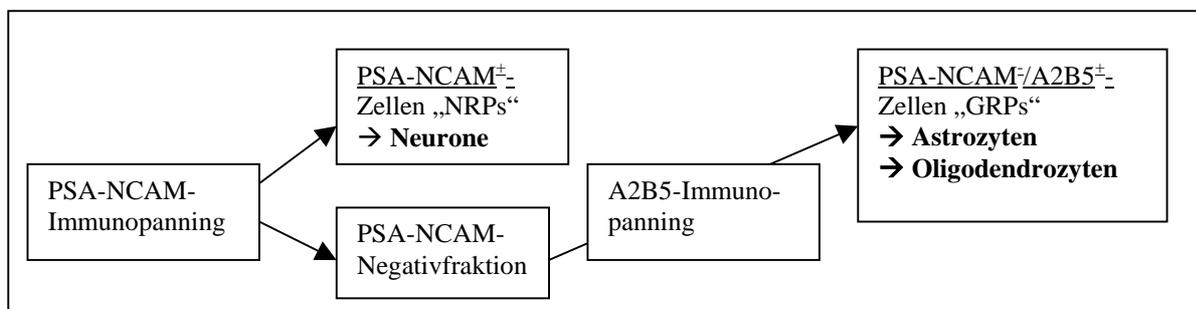


Abb. 11. Bidirektionales Differenzierungsmodell für neuronale Vorläuferzellen

precursor (GRPs) beschrieben. Zunächst wurde dieses Konzept für Neuralrohrzellen der Maus (Mayer-Proschel et al., 1997), später für ES-Zell-abgeleitete Vorläuferzellen vorgestellt (Mujtaba et al., 1999).

Zur Selektion der GRPs aus ES-Zellen wurde die Negativfraktion des PSA-NCAM-Immunopannings erneut einem Immunopanning unterzogen (Mujtaba et al., 1999), diesmal mit einem Antikörper gegen A2B5. Die A2B5-positiven/PSA-NCAM-negativen Zellen exprimieren Nestin und lassen sich nicht für GFAP und β -III-Tubulin anfärben. Durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen können Typ I-Astrozyten (Zusatz von ciliary neurotrophic factor [CNTF]), Typ II-Astrozyten (Zusatz von 10 % FKS) und Oligodendrozyten (Zusatz von PDGF/Trijodthyronin [T3]) entwickelt werden, nicht aber Neurone.

Die Markerexpression unserer durch Immunopanning gewonnenen PSA-NCAM-positiven Zellen deckt sich weitestgehend mit diesem Differenzierungsmodell der Rao-Arbeitsgruppe. In den Untersuchungen der Rao-Gruppe und in unseren Ergebnissen zeigten sich hohe Anteile β -III-Tubulin-positiver Zellen und keine, bzw. nur geringe Anteile O-4 und GFAP exprimierender Zellen.

4.3 Lineage Selection-Verfahren zur Gewinnung ES Zell-abgeleiteter neuronaler Zellen

In unserer Arbeitsgruppe kamen zwei weitere Verfahren zur *Lineage Selection* neuronaler Zellen aus ES-Zell-Kulturen zur Anwendung. Knockin ES-Zellen, an deren Tau-Lokus das EGFP-Gen (*enhanced green fluorescent protein*) gekoppelt ist (Tucker et al., 2001), wurden nach bekanntem Protokoll (Okabe et al., 1996) zu neuronalen Zellen ausdifferenziert. Die zunächst keine Fluoreszenz aufweisenden Zellen zeigten in der ersten Woche nach FGF-2-Entzug eine schnelle Induktion der EGFP-Expression. Dies waren Zellen mit polarer neuronaler Morphologie. Sieben Tage nach FGF-2-Entzug zeigte der überwiegende Anteil der EGFP-positiven Zellen eine Koexpression von β -III-Tubulin. Auch die Expression reiferer neuronaler Marker wie MAP-2 und NeuN war zu finden. Zur *Lineage Selection* wurden Zellen dieses Stadiums dem FACS[®] (*fluorescence-activated cell sorting*) zugeführt. Es wurde ein Reinheitsgrad von $93,7 \pm 2,3$ % β -III-Tubulin-positiver Zellen erreicht (Wernig et al., 2002).

In einer weiteren ES-Zell-Arbeit unserer Gruppe wurde das EGFP-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des $T\alpha$ 1-Tubulin-Promoters exprimiert. $T\alpha$ 1-Tubulin ist ein neuronal-spezifisches

Antigen (Gloster et al., 1994 und 1999; Lewis et al., 1985; Miller et al., 1987), das wie PSA-NCAM von migrierenden, unreifen Neuronen exprimiert wird (Gloster et al., 1999; McClain und Edelman, 1982). Zur Herstellung einer reinen neuronalen Population wurden die $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen zwei Tage nach FGF-2-Entzug durch FACS[®] isoliert (Schmandt, Meents et al., 2005). Die so gewonnenen $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen zeigten einen Anteil von $98,5 \pm 0,5$ % β -III-Tubulin-positiver Zellen. Die Expressionsanalyse der für PSA-NCAM und $T\alpha 1$ -Tubulin positiven Zellen zeigte, dass sich in beiden Populationen zahlreiche unterschiedliche neuronale Marker fanden: β -III-Tubulin, Doublecortin, MAP2abc, MAP2ab, NeuN, GABA und Glutamat. Es wird deutlich, dass alle hier diskutierten *Lineage Selection*-Verfahren sich eignen, hochaufgereinigte neuronale Zellkulturen mit einem β -III-Tubulin-Anteil von über 93 % aus ES-Zellen zu generieren. Obwohl sowohl für PSA-NCAM als auch Tau in der Literatur die Expression durch Gliazellen beschrieben wurde (Ben-Hur et al., 1998, LoPresti et al., 1995) wurden in diesen Experimenten keine Gliazellen angereichert. Das PSA-NCAM-Immunopanning erlaubt es, im Vergleich zu der *Lineage Selection* mittels der Tau-Lokus gekoppelten EGFP-Fluoreszenz, bereits am 2.Tag nach FGF-2-Entzug große Mengen neuronaler Zellen aus den N3FL-Kulturen zu isolieren, da zu diesem frühen Zeitpunkt bereits über 70 % der Zellen PSA-NCAM exprimieren. Das Auftauchen Tau-EGFP-positiver Zellen findet in nennenswertem Umfang erst in den folgenden Tagen statt (Wernig et al., 2002 und Tab. 5). Bei den Tau-EGFP-positiven Zellen, die an Tag 8 nach FGF2 Entzug untersucht wurden, handelt es sich überwiegend um postmitotische Neurone, wie ein BrdU-Assay zeigte. Es ist daher anzunehmen, dass diese Zellen weiter differenziert sind als die durch PSA-NCAM-Immunopanning gewonnenen Zellen. Beim Vergleich der *Lineage Selection*-Strategien durch PSA-NCAM-Immunopanning und der Fluoreszenz-basierten Selektion von $T\alpha 1$ -EGFP-positiven Zellen führte letztere zu höheren Reinheitsgraden ($95,3 \pm 0,9$ % versus $98,5 \pm 0,5$ %; Schmandt, Meents et al., 2005 und Tab. 7). Die Markerexpression der EGFP- und PSA-NCAM-positiven Zellen 3 Tage nach Wachstumsfaktorentzug deutet daraufhin, dass durch das PSA-NCAM-Immunopanning etwas früher in der Entwicklung stehende Neurone isoliert werden (Schmandt, Meents et al., 2005). Ein zusätzlicher Hinweis für die weiter fortgeschrittene Differenzierung der $T\alpha 1$ -EGFP- und Tau-EGFP-positiven Zellen ist, dass sich nach bisherigen Erfahrungen keine glialen Zellen mehr aus ihnen ableiten lassen (Schmandt, Meents et al., 2005; Wernig et al., 2002), wobei dies für die hier untersuchten PSA-NCAM-positiven-Zellen zumindest noch möglich erscheint. Da beim PSA-NCAM-Immunopanning im Gegensatz zu den anderen beiden Verfahren die Zellen nur

epigenetisch markiert wurden, bergen sie ein geringeres Risiko in Bezug auf eine neoplastische Transformation. Dies brächte für die mögliche spätere Anwendung beim Menschen Vorteile in der Anwendungssicherheit. Die EGFP-Expression der Zellen bei den genannten Verfahren bietet hingegen die Möglichkeit, die Integration und die elektrophysiologischen Eigenschaften der Nervenzellen nach Transplantation in Wirtstier zu untersuchen.

4.4 Pilotexperimente zur Transplantation selektionierter PSA-NCAM-positiver Vorläuferzellen

Am Ende unserer experimentellen Studien stand die Untersuchung der PSA-NCAM-positiven Zellen im lebenden Organismus. Viele Einflüsse, die im Organismus auf die Zellen und deren Differenzierung einwirken, können in der Zellkultur nicht nachgeahmt werden. Vor allem die Dreidimensionalität, aber auch die Komplexität der auf die Zelle einwirkenden Stoffe kann in der Zellkultur nicht simuliert werden.

Zwei Wochen nach Transplantation der selektionierten PSA-NCAM-positiven Zellen in die Seitenventrikel fanden sich dort Zellcluster, die überwiegend ventrikelnah gelegen waren. Die einzelnen Zellen zeigten wenig Tendenz zur Inkorporation in das Wirtsgewebe, was sich durch den Reifegrad der transplantierten Tiere erklären ließe. Die Neurogenese ist postnatal bei der Ratte, bis auf die Hippocampusregion, nahezu beendet, während sie z.B. bei Frettchen noch anhält (McConnell, 1988). Das Gehirngewebe der transplantierten Tiere könnte bereits zu strukturiert gewesen sein, als dass die transplantierten PSA-NCAM-positiven Zellen in der Lage gewesen wären, es zu durchdringen. Brüstle et al. (1998) und Campbell et al. (1995) transplantierten foetale neurale Vorläuferzellen in die Seitenventrikel embryonaler Tiere und beobachteten eine weitreichende Verteilung und Integration der Zellen in die bestehenden neuronalen Systeme. Brüstle et al. (1998) beschrieben u.a. im Sehnerv, Corpus Callosum und Cortex der Empfängertiere inkorporierte Transplantatzellen, die zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen differenziert waren. Campbell et al. (1995) beschrieben von den Transplantaten ausgehende Zelltrassen in das umliegende Gewebe, jedoch in größerem Ausmaß als bei den hier durchgeführten Transplantaten. Auch bei den Transplantationsversuchen von Campbell et al. (1995) und Brüstle et al. (1998) zeigten sich noch nach wenigen Wochen residuale Zellaggregate in den Randarealen der Ventrikellumina.

Bei den von uns beschriebenen Clustern zeigten sich 2 Wochen nach Transplantation innerhalb der Neuralrohr-ähnlich Strukturen apikale Mitosen. Für eine therapeutische Anwendung würden solche sich in Teilung befindliche Zellen ein großes Risiko darstellen. Die Anfärbarkeit für Nestin (siehe Abb.10b und c) weist daraufhin, dass es sich um neurale, unreife Zellen handelt (Lendahl et al., 1990a). Nicht-neurale, Teratom-artige Areale weisen zudem auf die Präsenz nicht-neuraler Zellen in der transplantierten Suspension hin, die nach in vivo Differenzierung nicht-neurale Gewebe bilden könnten. Es ist bekannt, dass transplantierte undifferenzierte ES-Zellen in der Lage sind, Teratocarcinome und Teratome zu bilden (Damjanov et al., 1993).

Die Organisation zu primitiven dreidimensionalen neuralen Strukturen zeigt, dass die aufgereinigte Zellpopulation noch sehr unreif ist. Bei Folgeexperimenten ist daher anzustreben, mit weiter in vitro ausdifferenzierten Zellen zu arbeiten. Die Anwesenheit nicht-neuraler Zellen könnte auf einen noch immer unzureichenden Aufreinigungsgrad der Zellpopulationen hinweisen. Denkbar wäre zudem, dass sich die PSA-NCAM-positiven Zellen, die neural oder neuronal differenziert waren, rückentwickelt und eine Art von „Retro-Differenzierung“ durchgemacht haben.

4.5 Mögliche Perspektive: Medizinische Anwendung ES-Zell-abgeleiteter Neurone beim Menschen

Die medizinische Anwendung von ES-Zellen beim Patienten ist eine vielversprechende Perspektive für die Behandlung von hirnganischen Systemerkrankungen. Bislang wurde für den Zellersatz im ZNS vorwiegend fetales Gewebe eingesetzt. Für die Therapie des Morbus Parkinson gibt es hierzu vielversprechende klinische Ergebnisse (Kordower et al., 1995; Lindvall 1994; Olanow et al., 1996). Die Parkinsonsche Erkrankung stellt einen besonders geeigneten Kandidaten für die Zelltransplantation dar. Dies liegt daran, dass hier lediglich ein Typ von Neuronen zugrunde geht, dessen wesentliche Aufgabe die Bereitstellung von Dopamin im Striatum ist (Zilles und Rehkämper 1994c). So erklärt sich auch die im Anfangstadium der Erkrankung noch recht gut greifende medikamentöse Therapie, deren Ziel es lediglich ist, den Spiegel dieses Neurotransmitters zu erhöhen. Werden humane foetale Zellpräparationen des ventralen Mesenzephalons in das Striatum von Parkinson-Patienten transplantiert, reduziert sich die klassische klinischen Symptomtrias, Hypobradylkinese, Tremor und Rigor, wenn auch in

unterschiedlichem Ausmaß (Kordower et al., 1995). Als Parameter des Überlebens der transplantierten Zellen diente die Fluor-Dopa-Aufnahme, einer modifizierten Ausgangssubstanz des Dopamins im Putamen. Darstellungen in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zeigten Anstiege um bis zu 72 % nach der Transplantation, die sich dann über 18 Monate konstant hielten. Eine an einem aus anderer Ursache verstorbenen Patienten durchgeführte histologische Untersuchung zeigte, dass die foetalen Zellen in vivo überlebt und sich sogar noch vermehrt hatten. Die Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen wuchsen als Cluster und zeigten eine ausgeprägte Innervation des Putamens. In der Zwischenzeit ist es gelungen aus murinen und humanen ES Zellen dopaminerge Neurone herzustellen, deren therapeutisches Potential in ersten Ansätzen am Tiermodell gezeigt werden konnte (Bjorklund et al., 2002; Kawasaki et al., 2000; Kim et al., 2002; Lee et al., 2000; Park et al., 2003; Takagi et al., 2005; Yoshizaki et al., 2004; Zeng et al., 2004).

Eine größere Herausforderung für Zellersatz stellen Erkrankungen dar, bei denen Nervenzellen über große Areale und/oder an vielen verschiedenen Stellen zugrunde gehen. Bei einem Schlaganfall gehen beispielsweise viele kortikale Neurone mit komplexer Funktion zugrunde. Der Ersatz solcher Zellen dürfte sich als weitaus schwieriger gestalten als bei der Parkinsonschen Erkrankung. Im Tiermodell gibt es Hinweise dafür, dass ein kortikaler Zelluntergang transplantierten Vorläuferzellen ein Migrationssignal in Richtung der Läsion gibt und die Differenzierung eines pyramidalen Phänotyps induziert (Sheen und Macklis 1995). Es wäre daher denkbar, dass ein solches „Rekrutierungsphänomen“ für die Reparatur von Defekten genutzt werden könnte.

5 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Immunopanning als Verfahren geeignet ist, PSA-NCAM-positive neuronale ES-Zellen zu selektionieren. Es können aus verschiedenen Stadien des mehrstufigen Differenzierungsprotokolls Zellpopulationen gewonnen werden, die bis zu 95 Prozent Neurone beinhalten. Ein Teil der selektionierten Zellen exprimiert den neuroepithelialen Marker Nestin, der jedoch im zeitlichen Verlauf durch das neuronenspezifische β -III-Tubulin ersetzt wird. PSA-NCAM wird offensichtlich über eine Zeitspanne exprimiert, die noch unreife neuroepitheliale Zellen sowie bereits neuronal differenzierte Zellen erfasst. Gliale Marker fanden sich unter den aufgereinigten Zellen nur in sehr geringem Umfang. Unsere Ergebnisse decken sich mit den publizierten Befunden von der Arbeitsgruppe um Rao. Das von dieser Gruppe postulierte bidirektionale neurale Differenzierungskonzept mit einer Aufteilung in PSA-NCAM-positive Zellen, die neuronal differenzieren und PSA-NCAM-negative/A2B5-positive-Zellen mit glialer Determination spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider.

Nach Immunopanning ließen sich die selektionierten Zellen für 48 Stunden in Medium ohne Wachstumsfaktor kultivieren. Eine kontinuierliche Proliferation dieser Zellpopulation war jedoch auch in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren nicht möglich. In einer ersten Pilotstudie wurden PSA-NCAM-positive Zellen in den Hippocampus postnataler Ratten transplantiert. Die Zellen bildeten Cluster mit Neuralrohr-ähnlichen Strukturen sowie Neuropil-artigem Gewebe. Eine Integration der Zellen ins Gehirnparenchym fand nur sehr eingeschränkt statt. Zukünftige Untersuchungen werden klären müssen, ob und unter welchen Bedingungen diese neuronalen Vorläuferzellen weiter vermehrt werden können und welcher Ausreifungsgrad der Zellpräparationen für Transplantationen am besten geeignet ist.

Neben der neuronalen *Lineage-Selection* bietet PSA-NCAM interessante weitere Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien für die Behandlung neurologischer Erkrankungen. So scheint PSA-NCAM die Zellkontakte zwischen Zellen untereinander und zur Matrix zu modifizieren, wahrscheinlich über Interaktionen mit anderen Zelladhäsionsmolekülen. Eine Modifikation der PSA-NCAM-Expression könnte es erlauben, Prozesse wie die axonale Zielinnervation, den synaptischen Umbau sowie die Migration von Zellen durch Gewebeverbände positiv zu beeinflussen. Eine zukünftige medizinische Anwendung setzt aber noch weitere gründliche Studien *in vitro* und im Tiermodell voraus. Dabei gilt es, gewonnene

Erkenntnisse über Differenzierungsmechanismen und Migration neuronaler Zellen in einen rekonstruktiven Kontext zu stellen.

6 Literaturverzeichnis

Armstrong RJ, Hurelbrink CB, Tyers P, Ratcliffe EL, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA. The potential for circuit reconstruction by expanded neural precursor cells explored through porcine xenografts in a rat model of Parkinson's disease. <i>Exp Neurol</i> 2002 May;175(1):98-111
Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. <i>Dev Biol.</i> 1995 Apr;168(2):342-57.
Ben-Hur T, Rogister B, Murray K, Rougon G, Dubois-Dalcq M, Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. <i>J Neurosci</i> 1998 Aug 1;18(15):5777-88
Bernstine EG, Koyama H, Ephrussi B. Enhanced expression of alkaline phosphatase in hybrids between neuroblastoma and embryonal carcinoma. <i>Somatic Cell Genet.</i> 1977 Mar;3(2):217-25.
Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. <i>Cell Transplant</i> 2002;11(3):261-4
Biglami A, Dahl D. Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. <i>Nature.</i> 1974 Nov 1;252(5478):55-6. No abstract available.
Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2002 Feb 19;99(4):2344-9. Epub 2002 Jan 8.
Bronner-Fraser M. Effects of different fragments of the fibronectin molecule on latex bead translocation along neural crest migratory pathways. <i>Dev Biol.</i> 1985 Mar;108(1):131-45.
Brüstle O, Choudhary K, Karram K, Huttner A, Murray K, Dubois-Dalcq M, McKay RD. Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. <i>Nat Biotechnol.</i> 1998 Nov;16(11):1040-4.
Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD, Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. <i>Science</i> 1999 Jul 30;285(5428):754-6
Brüstle O, Maskos U, McKay RD. Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. <i>Neuron.</i> 1995 Dec;15(6):1275-85.
Brüstle O, McKay RD. Neuronal progenitors as tools for cell replacement in the nervous system. <i>Curr Opin Neurobiol</i> 1996 Oct;6(5):688-95
Brüstle O, Spiro AC, Karram K, Choudhary K, Okabe S, McKay RD, In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1997 Dec 23;94(26):14809-14
Butler AK, Uryu K, Morehouse V, Rougon G, Chesselet MF, Regulation of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum: effects of cortical lesions. <i>J Comp Neurol</i> 1997 Dec 15;389(2):289-308
Buytaert-Hoefen KA, Alvarez E, Freed CR. Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. <i>Stem Cells.</i> 2004;22(5):669-74.
Campbell K, Olsson M, Bjorklund A. Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. <i>Neuron.</i> 1995

Dec;15(6):1259-73.
Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. <i>Exp Neurol</i> . 2001 Dec;172(2):383-97.
Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arai S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. <i>Hepatology</i> 2002 Jul;36(1):22-9
Choi D, Oh HJ, Chang UJ, Koo SK, Jiang JX, Hwang SY, Lee JD, Yeoh GC, Shin HS, Lee JS, Oh B. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. <i>Cell Transplant</i> 2002;11(4):359-68
Damjanov I. Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. <i>Int J Dev Biol</i> 1993 Mar;37(1):39-46
Daston MM, Bastmeyer M, Rutishauser U, O'Leary DD, Spatially restricted increase in polysialic acid enhances corticospinal axon branching related to target recognition and innervation. <i>J Neurosci</i> 1996 Sep 1;16(17):5488-97
Dubois C, Figarella-Branger D, Rougon G, Rampini C, [Polysialylated NCAM in CSF, a marker for invasive medulloblastoma]. <i>C R Seances Soc Biol Fil</i> 1998;192(2):289-96
Edelman GM, Chuong CM, Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1982 Nov;79(22):7036-40
Eisenbarth GS, Walsh FS, Nirenberg M, Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1979 Oct;76(10):4913-7
Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH, Neurogenesis in the adult human hippocampus. <i>Nat Med</i> 1998 Nov;4(11):1313-7
Evans MJ, Kaufman MH, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. <i>Nature</i> 1981 Jul 9;292(5819):154-6
Figarella-Branger DF, Durbec PL, Rougon GN, Differential spectrum of expression of neural cell adhesion molecule isoforms and L1 adhesion molecules on human neuroectodermal tumors. <i>Cancer Res</i> 1990 Oct 1;50(19):6364-70
Finley MF, Kulkarni N, Huettner JE. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. <i>J Neurosci</i> . 1996 Feb 1;16(3):1056-65.
Finne J, Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. <i>J Biol Chem</i> 1982 Oct 25;257(20):11966-70
Glaser T, Perez-Bouza A, Klein K, Brustle O. Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. <i>FASEB J</i> . 2005 Jan;19(1):112-4. Epub 2004 Oct 14.
Gloster A, El-Bizri H, Bamji SX, Rogers D, Miller FD. Early induction of Talpha1 alpha-tubulin transcription in neurons of the developing nervous system. <i>J Comp Neurol</i> . 1999 Mar 1;405(1):45-60.
Gloster, A, Wu, W, Speelman, A, Weiss, S, Causing, C, Pozniak, C, Reynolds, B, Chang, E, Toma, JG, Miller, FD. The T α 1 α -tubulin promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. <i>J. Neurosci</i> . 1994 14, 7319-7330.
Gluer S, Schelp C, von Schweinitz D, Gerardy-Schahn R, Polysialylated neural cell adhesion

molecule in childhood rhabdomyosarcoma. <i>Pediatr Res</i> 1998 Jan;43(1):145-7
Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL, Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. <i>J Neurosci</i> 1996 Feb 1;16(3):1091-100
Hollyday M und Hamburger V; <i>J Comp. Neurol.</i> 1976, 170:311-320
Jacoby DB, Lindberg C, Ratliff J, Wetzell K, Stewart GR, Dinsmore J. Comparison of fresh and cryopreserved porcine ventral mesencephalon cells transplanted in A rat model of Parkinson's disease. <i>J Neurosci Res</i> 2002 Aug 1;69(3):382-96
Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. <i>Exp Hematol</i> 2002 Aug;30(8):896-904
Kameda K, Shimada H, Ishikawa T, Takimoto A, Momiyama N, Hasegawa S, Misuta K, Nakano A, Nagashima Y, Ichikawa Y, Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer neural invasive lesion. <i>Cancer Lett</i> 1999 Apr 1;137(2):201-7
Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. <i>Neuron.</i> 2000 Oct;28(1):31-40.
Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. <i>J Neurosci.</i> 2005 May 11;25(19):4694-705.
Kilpatrick TJ, Bartlett PF, Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. <i>Neuron</i> 1993 Feb;10(2):255-65
Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. <i>Nature.</i> 2002 Jul 4;418(6893):50-6. Epub 2002 Jun 20.
Kiss JZ, Wang C, Olive S, Rougon G, Lang J, Baetens D, Harry D, Pralong WF. Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. <i>EMBO J.</i> 1994 Nov 15;13(22):5284-92.
Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP, et al., Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. <i>N Engl J Med</i> 1995 Apr 27;332(17):1118-24
Landmesser L, Dahm L, Schultz K, Rutishauser U, Distinct roles for adhesion molecules during innervation of embryonic chick muscle. <i>Dev Biol</i> 1988 Dec;130(2):645-70
Landmesser L, Dahm L, Tang JC, Rutishauser U, Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. <i>Neuron</i> 1990 May;4(5):655-67
Lantuejoul S, Moro D, Michalides RJ, Brambilla C, Brambilla E, Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. <i>Am J Surg Pathol</i> 1998 Oct;22(10):1267-76
Larsson LC, Frielingsdorf H, Mirza B, Hansson SJ, Anderson P, Czech KA, Strandberg M, Widner H. Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. <i>Exp Neurol</i> 2001 Nov;172(1):100-14

Le Gal La Salle G, Rougon G, Valin A..The embryonic form of neural cell surface molecule (E-NCAM) in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainic acid-induced status epilepticus. <i>J Neurosci</i> 1992 Mar;12(3):872-82
Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. <i>Cell Motil Cytoskeleton</i> 1990;17(2):118-32
Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. <i>Nat Biotechnol.</i> 2000 Jun;18(6):675-9.
Lendahl U, McKay RD, The use of cell lines in neurobiology. <i>Trends Neurosci</i> 1990b Apr;13(4):132-7
Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD, CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. <i>Cell</i> 1990a Feb 23;60(4):585-95
Lewis, SA, Lee, MG-S, Cowan, NJ. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. <i>J. Cell Biol.</i> 1985 101, 852-859
Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. <i>Cell.</i> 1992 Jun 12;69(6):915-26.
Lindvall O. Clinical application of neuronal grafts in Parkinson's disease. : <i>J Neurol</i> 1994 Dec;242(1 Suppl 1):S54-6
LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 1995 Oct 24;92(22):10369-73.
Mayanil CS, George D, Mania-Farnell B, Bremer CL, McLone DG, BremerEG, overexpression of Murine Pax3 Increases NCAM Polysialylation in a Human Medulloblastoma Cell Line. <i>J Biol Chem</i> 2000 Apr 17;
Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS, Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. <i>Neuron</i> 1997 Oct;19(4):773-85
McClain DA, Edelman GM, A neural cell adhesion molecule from human brain. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1982 Oct;79(20):6380-4
McConnell SK. Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. <i>J Neurosci.</i> 1988 Mar;8(3):945-74.
McKay R, Stem cells in the central nervous system. <i>Science</i> 1997 Apr 4;276(5309):66-71
Miller, FD, Naus, CC, Durand, M, Bloom, FE, Milner, RJ. Isotypes of alpha-tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. <i>J. Cell Biol.</i> 1987 105, 3065-3073
Mujtaba T, Piper DR, Kalyani A, Groves AK, Lucero MT, Rao MS, Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. <i>Dev Biol</i> 1999 Oct 1;214(1):113-27
Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK, Keirstead HS. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. <i>Glia.</i> 2005 Feb;49(3):385-96.
Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD, Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. <i>Mech Dev</i> 1996 Sep;59(1):89-102
Olanow CW, Kordower JH, Freeman TB. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. : <i>Trends Neurosci</i> 1996 Mar;19(3):102-9

O'Leary DD, Terashima T, Cortical axons branch to multiple subcortical targets by interstitial axon budding: implications for target recognition and "waiting periods". <i>Neuron</i> 1988 Dec;1(10):901-10
Oppenheim RW, Nunez R. Electrical stimulation of hindlimb increases neuronal cell death in chick embryo. <i>Nature</i> 1982 Jan 7;295(5844):57-9
Park CH, Minn YK, Lee JY, Choi DH, Chang MY, Shim JW, Ko JY, Koh HC, Kang MJ, Kang JS, Rhie DJ, Lee YS, Son H, Moon SY, Kim KS, Lee SH. In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. <i>J Neurochem.</i> 2005 Mar;92(5):1265-76.
Park S, Kim EY, Ghil GS, Joo WS, Wang KC, Kim YS, Lee YJ, Lim J. Genetically modified human embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease. <i>Neurosci Lett.</i> 2003 Dec 19;353(2):91-4.
Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. <i>Nat Biotechnol</i> 2001 Dec;19(12):1117-8.
Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S, A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. <i>J Neurosci</i> 1992 Nov;12(11):4565-74
Schmandt T, Meents E, Gossrau G, Gornik V, Okabe S, Brüstle O. High-Purity Lineage Selection of Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. <i>Stem Cells and Development</i> 2005 14(1):55-64
Schulz TC, Noggle SA, Palmarini GM, Weiler DA, Lyons IG, Pensa KA, Meedeniya AC, Davidson BP, Lambert NA, Condie BG. Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. <i>Stem Cells.</i> 2004;22(7):1218-38.
Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. <i>J Clin Invest.</i> 2002 May;109(10):1291-302.
Sheen VL, Macklis JD: Targeted neocortical cell death in adult mice guides migration and differentiation of transplanted embryonic neurons. <i>J Neurosci</i> 1995, 15:8378-8392.
Shin S, Dalton S, Stice SL. Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells. <i>Stem Cells Dev.</i> 2005 Jun;14(3):266-9.
Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D, Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. <i>Nature</i> 1988 Dec 15;336(6200):688-90
Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Gutin PH, Studer L. Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. <i>Nat Biotechnol.</i> 2005 May;23(5):601-6. Epub 2005 Apr 24.
Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. <i>J Clin Invest.</i> 2005 Jan;115(1):102-9
Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. <i>Nat</i>

Cell Biol 2001 Sep;3(9):778-84
Tucker KL, Meyer M, Barde YA. Neurotrophins are required for nerve growth during development. <i>Nat Neurosci.</i> 2001 Jan;4(1):29-37.
Uryu K, Butler AK, Chesselet MF, Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. <i>J Comp Neurol</i> 1999 Mar 8;405(2):216-32
Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, McKay RD, Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. <i>Neuron</i> 1995 Jul;15(1):105-14
Weiss MJ, Embryonic stem cells and hematopoietic stem cell biology. <i>Hematol Oncol Clin North Am</i> 1997 Dec;11(6):1185-98
Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. <i>J Neurosci.</i> 1996b Dec 1;16(23):7599-609.
Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? <i>Trends Neurosci.</i> 1996a Sep;19(9):387-93. Review.
Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, Bussow H, Beck H, Brüstle O. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. <i>J Neurosci.</i> 2004 Jun 2;24(22):5258-68.
Wernig M, Tucker KL, Gornik V, Schneiders A, Buschwald R, Wiestler OD, Barde YA, Brüstle O., Tau EGFP embryonic stem cells: an efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation. <i>J Neurosci Res</i> 2002 Sep 15;69(6):918-24
Wiley & Sons. <i>Current Protocols in Neuroscience</i> 1998. Chapter 3. Cellular and Developmental Neuroscience. Unit 3.13 Isolation and Generation of Oligodendrocytes by Immunopanning.
Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Sahara T, Uchiyama Y, Okano H. Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. <i>Neurosci Lett.</i> 2004 Jun 3;363(1):33-7.
Zeng X, Cai J, Chen J, Luo Y, You ZB, Fötter E, Wang Y, Harvey B, Miura T, Backman C, Chen GJ, Rao MS, Freed WJ. Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. <i>Stem Cells.</i> 2004;22(6):925-40.
Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. <i>Nat Biotechnol.</i> 2001 Dec;19(12):1129-33.
Zilles K und Rehkämper G. Funktionelle Neuroanatomie: Lehrbuch und Atlas. Springer-Verlag, Berlin 1994. Seite 39 (a), Seite 37-38 (b), Seite 390-391 (c)
Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. <i>Neuron.</i> 1994 Jan;12(1):11-24.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Zwei Strategien für die Erzeugung angereicherter neuraler Zellkulturen aus embryonalen Stammzellen.....	14
Abb. 2. Prinzip des Immunopanning.	16
Abb. 3. Aufbau von PSA-NCAM.....	18
Abb. 4. Schema der neuronalen Differenzierung embryonaler Stammzellen	24
Abb. 5. Morphologie differenzierender embryonaler Stammzellen.	27
Abb. 6. ES-Zell-abgeleitete neuroepitheliale Zellen, die nach dem PSA-NCAM-Immunopanning zwei Tage ohne Zusatz von Faktoren ausreifen.	44
Abb. 7. ES-Zell-abgeleitete, über PSA-NCAM Immunopanning von N3FL-Kulturen gewonnene neuronal differenzierte Zellen (2 Tage nach Immunopanning).	50
Abb. 8. Neuronal differenzierte ES-Zellen wurden unter Zusatz von FGF-2 proliferiert und nach zwei Tagen einem PSA-NCAM-Immunopanning zugeführt.	51
Abb. 9. Koronare Schnitte durch das Gehirn transplantiertter Wistar-Ratten.	56
Abb. 10. Modell zu der Markerexpression einer neuronal differenzierenden Zelle im Zeitverlauf.....	60
Abb. 11. Bidirektionales Differenzierungsmodell für neuronale Vorläuferzellen	62

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Primäre Antikörper	23
Tab. 2. Sekundäre Antikörper und Substrate	23
Tab. 3. Effizienz des PSA-NCAM Immunopanning im N3L-Stadium	43
Tab. 4. Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin nach Immunopanning von N3L-Kulturen	45
Tab. 5. N3FL-Kultur nach FGF-2-Entzug: Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin im Zeitverlauf	47
Tab. 6. Effizienz des PSA-NCAM Immunopanning von N3FL Kulturen	49
Tab. 7. Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin nach Immunopanning von N3FL-Kulturen	51
Tab. 8. Expression nicht-neuronaler Marker in über PSA-NCAM-Immunopanning gewonnenen Zellen ..	52
Tab. 9. Expression von PSA-NCAM und β -III-Tubulin von Zellen der IP-Negativfraktion	53

Abkürzungsverzeichnis

aNCAM	adultes NCAM (niedriger Gehalt an PSA)
BDNF	<i>brain derived growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
ddH ₂ O	<i>Doppelt destilliertes Wasser</i>
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
EB	<i>embryoid body</i> (Embryoidkörper)
EDTA	<i>ethylen-diamin-tetra-acetic-acid</i>
eNCAM	Embryonales NCAM (hoher Gehalt an PSA)
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS [®]	<i>fluoreszenz-activated-cell-sorting</i>
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i>
FKS	Foetales Kälber Serum
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
HBSS	Hanks`balanced salt solution
HE	Hämatoxilin-Eosin
ITSFn	Medium welches <u>I</u> nsulin, <u>T</u> ransferrin, <u>N</u> a-Selenit und <u>F</u> ibronektin enthält
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NT-3	Neurotrophin-3
P.A.	Paraformaldehyd
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PSA	<i>poly sialic acid</i> (Polysialinsäure)
PSA-NCAM	<i>polysialic acid - neural cell adhesion molecule</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TrkB	<i>tyrosine kinase receptor B</i>
T3	Trijodthyronin
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Rachel Buschwald und Khalad Karram, die mich in meiner täglichen Arbeit in der Zellkultur und den Laboren unterstützt haben. Dies gilt insbesondere für die arbeitsreichen Wochenenden.

Für die Überlassung des Themas und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen möchte ich meinem Doktorvater Prof. Oliver Brüstle danken.

Herrn Klatt vom Fotoarchiv danke ich für die Zusammenstellung der Zellkulturphotos.

Anja Sueß danke ich für das abschließende Korrekturlesen.

Mein letzter Dank gilt den Mitarbeitern der Institute für Neuropathologie und Rekonstruktive Neurobiologie in Bonn und der guten Atmosphäre im Institut, ohne die diese Arbeit nicht halb so viel Spaß gemacht hätte.

Lebenslauf

29.03.1976 geboren in Bonn

Schulausbildung

1982 bis 1986 Besuch der Grundschule "Om Berg" in Roleber bei Bonn

1986 bis 1995 Besuch der Integrierten Gesamtschule (IGS) Bonn-Beuel

Hochschulausbildung

10/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin in Bonn

08/1997 Physikum

08/1998 Erstes Staatsexamen

03/1998 bis 04/1998 Famulatur in der Neuropathologie in Bonn

09/1998 bis 04/1999 Unterbrechung des Studiums für die Doktorarbeitstätigkeit an dem Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums in Bonn.

03/2001 Zweites Staatsexamen

01/2002 Hochschulwechsel an die Humboldt-Universität in Berlin

11/2002 Drittes Staatsexamen (HU Berlin)

Medizinische Tätigkeit

04/2003 - 02/2004 Zivildienst als Arzt im Praktikum in der Kinderklinik des Klinikums Neukölln in Berlin

seit 05/2004 Arzt im Praktikum in der Pädiatrie des Krankenhauses Düren mit Weiterbeschäftigung als Assistenzarzt

Publikationen

Schmandt T, Meents E, Gossrau G, Gornik V, Okabe S, Brüstle O. High-Purity Lineage Selection of Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. *Stem Cells and Development* 2005 14(1):55-64