

**Aus dem Zentrum Anatomie der Universität zu Köln  
Institut I für Anatomie  
Geschäftsführender Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Addicks**

---

**Neural differenzierte embryonale Stammzellen – von  
der Zellbiologie zur Zellersatztherapie**

**Habilitationsschrift  
vorgelegt dem Fachbereich  
Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig Universität Giessen**

---

von  
**Dr. med. vet. Stefan Arnhold**  
aus Peine

Köln 2001

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>2</b>
<b>Vorbemerkung</b>	<b>4</b>
<b>Verwendete Abkürzungen</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Das Modell der embryonalen Stammzellen	7
1.1.1 Differenzierungspotential embryonaler Stammzellen in vitro	7
1.1.2 Neurale Differenzierungskapazität von ES-Zellen	11
1.2 Fragestellungen	13
1.2.1 Abschnitt I: Normogenese neural differenzierter ES-Zellen	13
1.2.2 Abschnitt II: Experimentelle Untersuchungen am Modell der neural differenzierten ES-Zellen	14
1.2.3 Abschnitt III: ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien	15
<b>1.3 Verwendete Zelllinien und Methoden</b>	<b>17</b>
1.3.1 Verwendete ES-Zelllinien	17
1.3.2 Kultivierungsprotokolle	18
1.3.3 Embryonale Schnittserien	18
1.3.4 Mikroskopische Techniken	18
1.3.5 Elektrophysiologie	19
1.3.6 Molekularbiologische und biochemische Techniken	19
1.3.7 Durchflußzytometrie	19
1.3.8 Stereotaktische Zelltransplantation	19
<b>2 Darstellung und Diskussion der kumulierten Ergebnisse</b>	<b>20</b>
2.1 Abschnitt I: Normogenese neural differenzierter embryonaler Stammzellen	20
2.1.1 Neuronale Differenzierungskapazität von ES-Zellen	20
2.1.2 Hinweise zur Regulation der Kalziumhomöostase in neuronal differenzierten Zellen des EB	26
2.1.2.1 Expression von Kalziumkanälen in neuronal differenzierten ES-Zellen	26
2.1.2.2 Differenzierungsabhängige Expression von Kalzium-bindenden Proteinen	33
2.1.3 Differenzierungskapazität von ES-Zellen zu Makro- und Mikrogliazellen	36
<b>2.2 Abschnitt II: Experimentelle Untersuchungen von Differenzierungsmechanismen am Modell der neural differenzierten ES-Zellen</b>	<b>45</b>
2.2.1 Die Bedeutung der NO-Synthase II für die neuronale Differenzierung in vivo und in vitro	45
2.2.2 Befunde zur Glutamat induzierten Neurotoxizität an neuronal differenzierten ES-Zellen	49
2.2.3 Der Einfluss einer $\beta$ 1-Integrindefizienz auf die neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen	51
2.3 Abschnitt III: ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien bei neurodegenerativen Erkrankungen	58
2.3.1 GFP-Expression unter der Kontrolle des $\gamma$ -Aktinpromoters erlaubt die Beobachtung der Differenzierung von Neuronen und Gliazellen nach Transplantation	60
2.3.2 Selektion neuraler Vorläuferzellen mit Hilfe der GFP Fluoreszenz unter spezifischer Kontrolle des Tymidinkinase-Nestin Promoters	63
2.3.3 Differenzierung und Anreicherung Tyrosinhydroxylase-positiver Neuronen aus ES-Zellen	68
2.3.4 Der therapeutische Einsatz von ES-Zellen am Tiermodell für die Makuladegeneration	70

<b>3</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>Summary</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Vorgelegte Veröffentlichungen</b>	<b>97</b>
6.1	zu Abschnitt I: Neurobiologie neural differenzierter ES-Zellen	97
6.2	zu Abschnitt II: Experimentelle Untersuchungen von Differenzierungsmechanismen am Modell der neural differenzierten ES- Zellen mit Bezug zur Situation in vivo	97
6.3	zu Abschnitt III: ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien	98

## Vorbemerkung

---

Die vorgelegte Habilitationsschrift besteht aus 11 thematisch zusammenhängenden Originalveröffentlichungen in referierten Journalen und zwei eingereichten Arbeiten. Die aufgeführten Arbeiten werden mit relevanten Arbeiten der internationalen Literatur in den Zusammenhang gebracht. Die vorliegende Schrift umfasst drei Abschnitte. Die Arbeiten des Abschnitts I zur Zellbiologie neural differenzierter ES-Zellen beschäftigen sich mit der neuronalen und glialen Differenzierungskapazität von embryonalen Stammzellen. In Abschnitt II werden experimentelle Arbeiten zusammengefaßt, die sich mit verschiedenen differenzierungsrelevanten Aspekten sowie mit neurotoxikologischen Fragestellungen beschäftigen. Dem Abschnitt III liegen Arbeiten zugrunde, die die Eignung neural differenzierter ES-Zellen als mögliche Ausgangspopulation für Zellersatztherapien bei neurodegenerativen Erkrankungen untersuchen. Dazu werden ES-Zellklone mit stabiler Transfektion von Expressionskassetten für das grün fluoreszierende Protein (GFP) verwendet. Durch entsprechende Transplantationsexperimente wird die Differenzierungskapazität selektionierter ES-Zellen im Empfängergewebe untersucht. Schließlich wird anhand eines Tiermodells (hier für die Makuladegeneration des Menschen) ein durch subretinal transplantierte neural differenzierte ES-Zellen induzierter „Rescue-Effekt“ dokumentiert.

Die Zitatnummern der eigenen Arbeiten sind zur Unterscheidung von Zitaten aus der internationalen Literatur im Text bei eigener Erstautorenschaft durch Fettdruck und bei Ko-Autorenschaft durch Kursivdruck hervorgehoben.

## Verwendete Abkürzungen

---

$\omega$ -Aga-IVA	omega-Agatoxin IVA
$\omega$ -CTx-GVIA	omega-Conotoxin GVIA
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP4	bone morphogenic protein 4
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CB	Calbindin
cGMP	zyklisches Guanosin-5`-monophosphat
CNP	2` , 3`-zyklischen Nukleotid 3`-Phosphohydrolase
CR	Calretinin
DetaNONOate	(Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-amonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate]
DRG	dorsal root ganglia
EB	embryoid body
EC-Zellen	embryonale Karzinomazellen
EGF	epidermal growth factor
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Gal C	Galactocerebrosid
GDNF	glial cell derived neurotrophic factor
GFAP	saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HNK-1	human natural killer cell antigen 1
HVA	high voltage activated
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IPE Zellen	Irispigmentepithelzellen
LIF	leukemia inhibitory factor
L-NAME	NG-Nitro-L-arginine-methyl ester . hydrochlorid
LVA	low voltage activated
LY294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
MAP-2	Mikrotubuli assoziiertes Protein
NADPH	reduziertes Nicotinamidadeninucleotidphosphat

NGF	nerve growth factor
NMDA	N-methyl-Daspartic-acid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS-I	neuronale NO-Synthase
NOS-II	induzierbare NO-Synthase
NOS-III	endotheliale NO-Synthase
O-2A	Oligodendrozyten, Typ-2 Astrozyten Vorläuferzellen
O4	Oligodendrozytenmarker O4
ODQ	[1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]
PC12	Phäochromozytomazelllinie
PDGF	platelet derived growth factor
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol 3 kinase
PV	Parvalbumin
RA	Retinsäure
RCS	Royal College of Surgeons
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion
SAKK	spannungsabhängiger Kalziumkanal
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNP	Natriumnitroprussid
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
YC-1	[3-(5'-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzylindazol]

# 1 Einleitung

---

## 1.1 *Das Modell der embryonalen Stammzellen*

### 1.1.1 Differenzierungspotential embryonaler Stammzellen in vitro

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind klonale Zelllinien, die entweder aus dem 8-Zellstadium von Embryonen (Wobus et al., 1991; Delhaise et al., 1996), meistens jedoch aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). ES-Zellen haben die bemerkenswerte Kapazität, selbst nach über 250 Teilungszyklen unter Beibehaltung ihrer Pluripotenz (Suda et al., 1987) in Kultur zu proliferieren, ohne ihren euploiden Chromosomensatz zu verlieren. Um die ES-Zellen in einem undifferenzierten und pluripotenten Zustand zu halten, müssen sie entweder in einem Zellkulturmedium kultiviert werden, das mit dem leukemia inhibitory factor (LIF) supplementiert wird (Gearing et al., 1987; Smith et al., 1988) oder/und auf einem „feeder layer“ aus embryonalen Fibroblasten (Wobus et al., 1984). So behalten sie ihre Potenz, sich an allen Gewebetypen eines Organismus einschließlich der Keimbahn zu beteiligen. Wenn sie mit einem Embryo vor der Implantation konfrontiert werden, kommt es zur Chimärenbildung, wobei sich das differenzierende Gewebe aus einer Mischung von Zellen des Empfängertieres und aus Zellen der ES-Spenderzellen zusammensetzt (**Abb. 1**) (Bradley et al., 1984; Rossant and Chapman, 1983; Gossler et al., 1989). Aufgrund dieser Eigenschaften werden ES-Zellen als Vektoren verwendet, um bestimmte Gene in die Keimbahn der Maus einzuschleusen, so daß der Effekt einer Überexpression bzw. der Ausschaltung bestimmter Gene studiert werden kann (Thomas and Capecchi, 1987; Friedrich and Soriano, 1991; Skarnes et al., 1992).

Murine ES-Zellen eignen sich hervorragend zum Studium embryonaler Entwicklungsmechanismen bei Säugern, da sie auch in vitro nach Entfernung des *feeder layers* oder dem Absetzen von LIF (Gough et al., 1989) das Potential be-

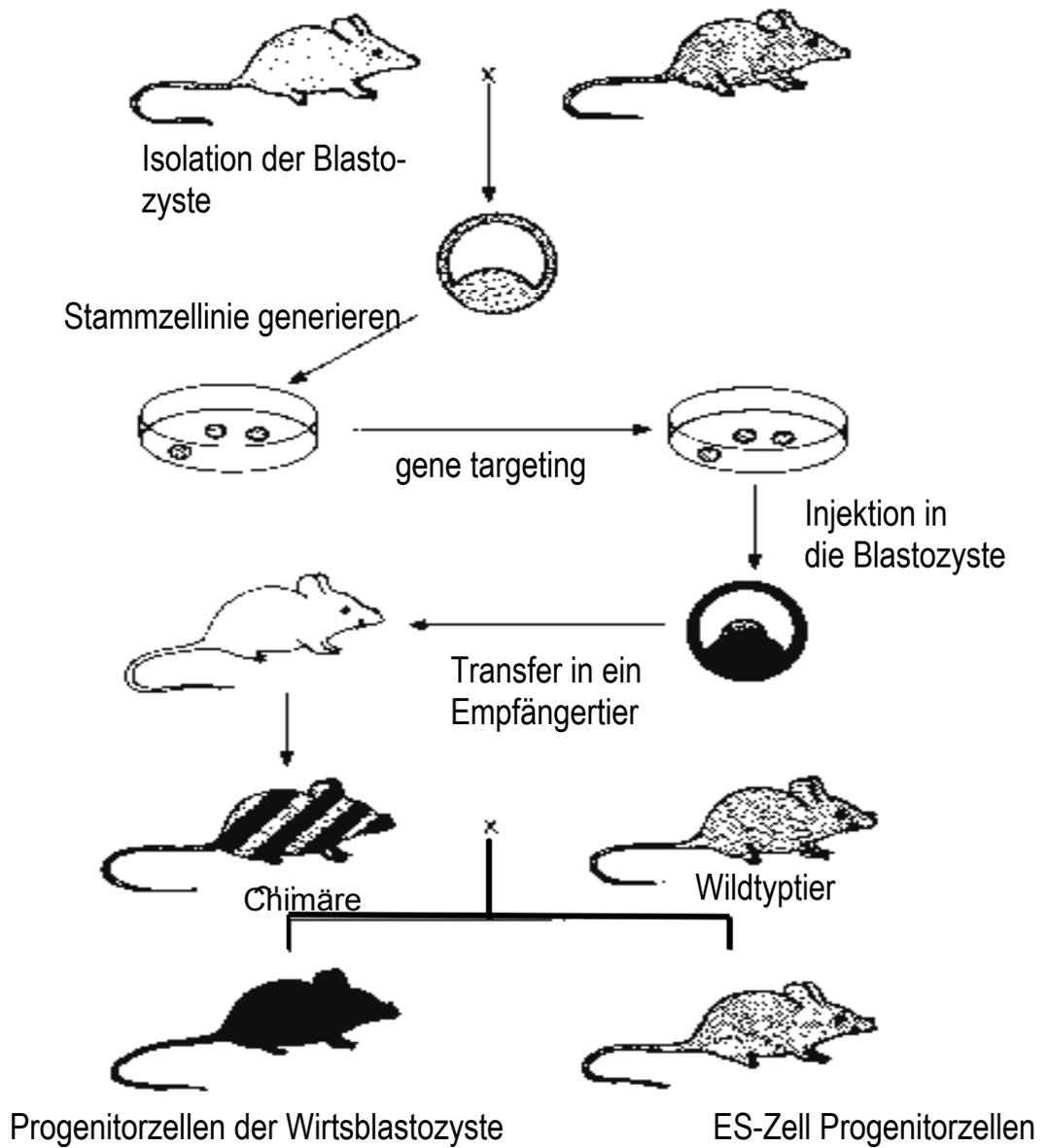


Abb. 1 : Gewinnung von ES-Zellen aus der Blastozyste der Maus und ihre weitere Verwendung für „gene targeting“ Untersuchungen.

sitzen, sich in Derivate der drei primären Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm zu differenzieren. So konnte gezeigt werden, daß sich aus in vitro kultivierten ES-Zellen multiple Zelltypen einschließlich Herzmuskulatur (Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1994; Maltsev et al., 1993; Guan et al., 1999) Skelettmuskulatur (Miller-Hance et al., 1993; Rohwedel et al., 1994; Rohwedel et al., 1998a; Rohwedel et al., 1995), Endothelzellen (Schmitt et al., 1991; Wang et al., 1992), Nervenzellen (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strubing et al., 1995; Okabe et al., 1996), hämatopoetische Zellen (Martin, 1981; Mortensen et al., 1991; Sawai et al., 1991; Schmitt et al., 1991; Zhuang et al., 1992; Wiles, 1993) Epithelzellen (Bagutti et al., 1996) glatte Muskelzellen (Drab et al., 1997) und Fettzellen (Dani et al., 1997) differenzieren (**Abb. 2**). Durch die Gabe von spezifischen Induktoren wie beispielsweise der Retinsäure (Bain et al., 1995; Rohwedel et al., 1999) kann die Differenzierung bestimmter Zelltypen, beispielsweise von Nervenzellen aus ES-Zellen gefördert werden. Das Potential von ES-Zellen als Modellsystem für Studien bezüglich grundlegender Mechanismen der embryonalen Differenzierung wird durch eine stetig steigende Zahl entsprechender Publikationen belegt.

Aufgrund des hervorragenden Potentials muriner pluripotenter embryonaler Stammzellen gibt es zahlreiche Bestrebungen, die ES-Zelltechnologie auch in anderen Spezies als der Maus zu etablieren. Obwohl viele dieser embryonalen Zelllinien in ihren Eigenschaften wie Morphologie und Epitoprofil (Stekelenburg-Hamers et al., 1995), zumindest teilweise denen der Maus ähneln, gibt es bisher nur wenige Angaben über lebendgeborene, fruchtbare Keimbahnchimären anderer Spezies (Pain et al., 1996). Die Hindernisse bei der Etablierung von pluripotenten ES-Zelllinien aus anderen Spezies als der Maus sind im Prinzip nicht geklärt. Um so aufregender und vielversprechender sind neuere Berichte über ES-Zellkulturen von Primaten oder des Menschen, die in ihren Eigenschaften denen der Maus ähneln (Shamblott et al., 1998; Thomson and Marshall, 1998) und als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien eingesetzt werden könnten.

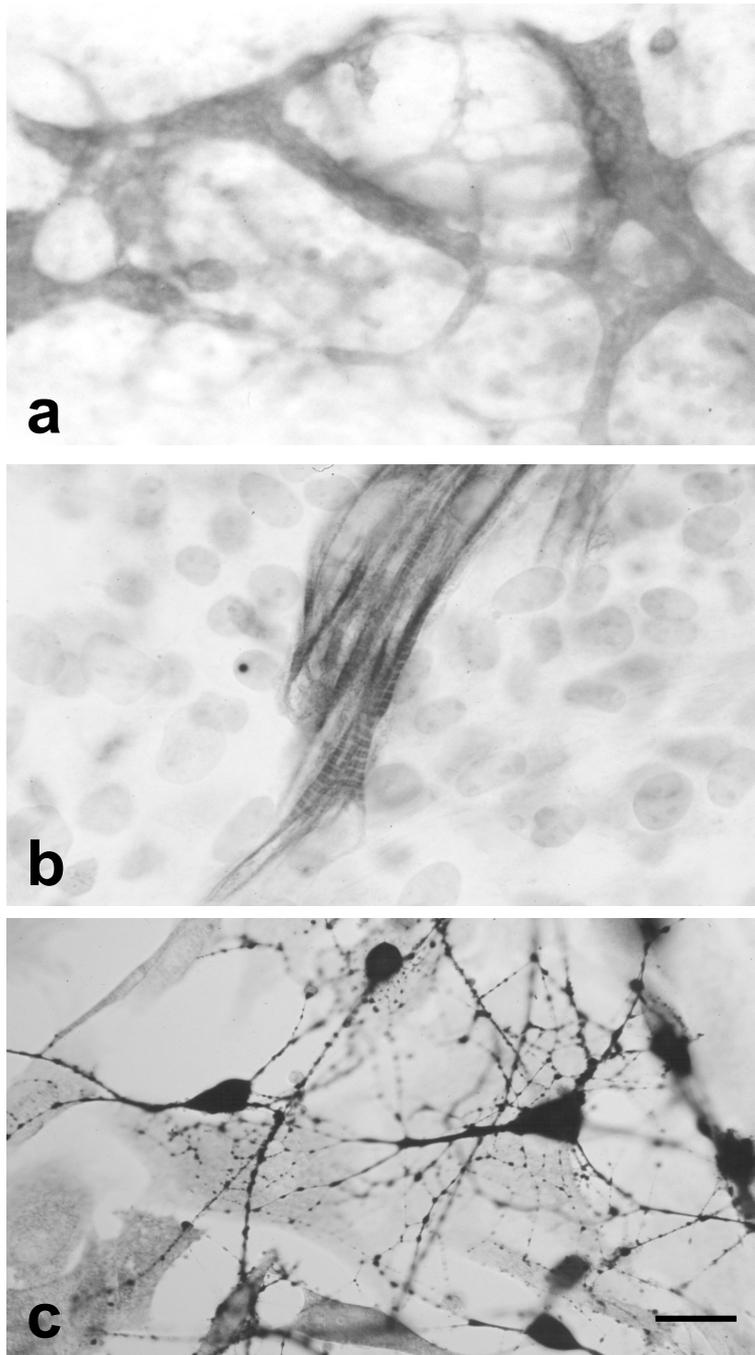


Abb. 2: Differenzierungskapazität pluripotenter ES-Zellen in nicht-stimulierten (a und b) und in Retinsäure-stimulierten Bedingungen. a) Differenzierung von Blutgefäßen in der Darstellung mit PECAM, einem Marker für Endothelzellen. b) Differenzierung von Kardiomyozyten in der Darstellung mit  $\alpha$ -Aktin, einem Marker für Herzmuskelzellen. c) Doppelimmunhistochemie zur Darstellung von Neuronen (MAP2, schwarz) und Astroglia (grau) nach Retinsäureinduktion. Balken entspricht 20  $\mu$ m.

### 1.1.2 Neurale Differenzierungskapazität von ES-Zellen

Unter normalen Differenzierungsbedingungen stellen neuronale Zellen nur einen verhältnismäßig kleinen Prozentsatz der Gesamtzellpopulation, die sich aus embryonalen Stammzellen differenzieren. Um die ES-Zellkultur auch für Studien zur Neurogenese zugänglich zu machen, gibt es verschiedene experimentelle Ansätze, mit Hilfe derer der Anteil der Nervenzelldifferenzierung erhöht wird. Einige dieser Versuchsansätze orientieren sich an Untersuchungen mit diversen Progenitorzelllinien bzw. embryonalen Teratokarzinomzelllinien (Alonso et al., 1991; McBurney et al., 1988; Andrews, 1998; Matsuoka et al., 1989; Hill and Robertson, 1998), die analog zu ES-Zellen verschiedene Differenzierungsrichtungen einschlagen können (Rossant and McBurney, 1982; Jones-Villeneuve et al., 1982; Edwards and McBurney, 1983). Nach einer Behandlung mit Retinsäure (RA), der biologisch aktiven Form des essentiellen Nahrungsbestandteiles Vitamin A (Retinol) (Wolf, 1996), gehen sowohl aus den verschiedenen Progenitorzelllinien als auch aus ES-Zellen Zellen hervor, die sowohl antigene als auch elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen und Gliazellen zeigen (Jones-Villeneuve et al., 1982; Bain et al., 1996). Für EC und ES-Zellen konnte allerdings darüber hinaus gezeigt werden, daß RA auch die Differenzierung anderer Zelltypen wie glatte Muskelzellen und Adipozyten in Abhängigkeit des Zeitfensters und der applizierten Konzentration induziert (Strickland and Mahdavi, 1978; Edwards and McBurney, 1983; Jones-Villeneuve et al., 1982; Blank et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strubing et al., 1995a; Wobus et al., 1997; Dani et al., 1997; Drab et al., 1997).

Die neurale Differenzierung wird gefördert, wenn RA während der ersten beiden Tage der embryoid body (EB)-Bildung aus EC- (Jones-Villeneuve et al., 1982) oder aus ES-Zellen (Strübing C., 1995) appliziert wird. So vermittelt eine RA-Inkubation die Expression von neuronalen Markern und neuronalen Morphologien in bis zu 30% der Zellen (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strubing et al., 1995). Unter den gleichen Bedingungen zeigen andere Zellen die Eigenschaften von reaktiven Astrozyten siehe (Hollands, 1997). Von den Zellen mit neuronaler Morphologie konnte gezeigt werden, daß sie Neurofilament und

Neurotubuli assoziierte Proteine exprimieren, die mit postmitotischen Neuronen in Verbindung gebracht werden (Bain et al., 1995).

Alternative Differenzierungsprotokolle unter Verwendung der Faktoren Insulin, Transferrin, Selenchlorid und Fibronectin bewirken eine Selektionierung von neuronalen Vorläuferzellen (Okabe et al., 1996). Diese neural differenzierten Zellen aus ES-Zellen können aufgrund ihrer Charakteristika mit echten multipotenten neuroepoetischen Stammzellen verglichen werden, wie sie im frühembryonalen Neuroepithel vorkommen. Neuroepoetische Stammzellen teilen sich analog zur Situation im zerebralen Cortex mitotisch und differenzieren zu bipotenten Progenitorzellen, aus denen dann neuronale oder gliale Progenitorzellen hervorgehen (Cameron and Rakic, 1991).

## **1.2 Fragestellungen**

### **1.2.1 Abschnitt I: Normogenese neural differenzierter ES-Zellen**

Im ersten Teilabschnitt der Arbeit wird die Differenzierungskapazität von ES-Zellen in die neurale Richtung untersucht. Im Rahmen dieser Charakterisierung wird mit Hilfe von morphologischen und immunzytochemischen Techniken zunächst das Vorkommen verschiedener neuronaler Subtypen charakterisiert. Mit Hilfe dieser detaillierten Untersuchung soll nachgewiesen werden, ob das Differenzierungsmuster im in vitro-System der ES-Zellen auf die in vivo-Situation übertragbar ist.

Nach Beschreibung der neuronalen Differenzierungskapazität von ES-Zellen soll an den neuronal differenzierten Zellen die differenzierungsabhängige Expression von Strukturen, die an der Kalziumhomöostase beteiligt sind, näher untersucht werden, da die intrazelluläre Kalziumkonzentration eine entscheidende Rolle bei zentralen Aspekten der neuronalen Normogenese spielt. Dazu wird mit Hilfe elektrophysiologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Untersuchungsverfahren die Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen sowie von kalziumbindenden Proteinen mit Beginn der Neurogenese studiert und eine reifungsabhängige Verschiebung der Expressionsmuster untersucht.

Schließlich wird an dem System der neural differenzierten ES-Zellen ebenfalls mit morphologischen und immunzytochemischen Techniken die Differenzierungskapazität zu Makro- und Mikrogliazellen evaluiert. Dabei wird sowohl eine temporo-spatiale Beziehung zur Neurogenese als auch die Differenzierung anhand von stadienspezifischen glialen Markern nach dem glial lineage von Cameron und Rakic (1991) aufgezeigt.

### **1.2.2 Abschnitt II: Experimentelle Untersuchungen am Modell der neural differenzierten ES-Zellen**

Im Rahmen von experimentellen Studien soll zunächst die Bedeutung des intrazellulären Signalmoleküls NO sowie der Effekt einer Glutamatintoxikation auf sich differenzierende Neurone evaluiert werden. Darüber hinaus soll die Rolle des transmembranären Moleküls  $\beta$ -1 Integrin für die neuronale Differenzierung untersucht werden.

Da es immer mehr Hinweise über eine Beteiligung von NO an der neuronalen Differenzierung gibt, soll ausgehend von in vivo-Befunden zur olfaktorischen und vestibulocochleären Rezeptorgenese sowie zu Befunden zur Entwicklung des Cortex und der Retina, mit Hilfe des in vitro-Systems der ES-Zellen und pharmakologischer Techniken die Rolle von NO bei der neuronalen Differenzierung näher definiert werden. Darüber hinaus soll geklärt werden, welche der drei NOS-Isoformen maßgeblich an neuronalen Entwicklungsprozessen beteiligt ist und ob der NO Effekt über den klassischen Guanylatzyklase/cGMP-Signalweg vermittelt wird.

Da dem NO-System eine Beteiligung bei neurodegenerativen und ischämischen Prozessen, die mit einer Freisetzung von toxischen Konzentrationen Glutamat einhergehen, zugeschrieben wird, interessiert uns der Effekt einer Glutamatintoxikation auf sich differenzierende Nervenzellen. Im Rahmen der Untersuchung soll mit Hilfe von vitalmikroskopischen Zeitverlaufsstudien der Effekt einer simulierten Glutamatintoxikation mit dem Glutamatrezeptoragonisten N-methyl-Daspartic-acid (NMDA) auf neuronale Zellen vitalmikroskopisch analysiert werden. Dabei soll die Frage geklärt werden, ob die Differenzierung lediglich gehemmt wird oder ob es im weiteren Verlauf der Intoxikation zu einer völligen Degeneration der Nervenzellen kommt.

Für die neuronale Differenzierung ist der Einfluss der Zelladhäsion und der Migration ein wichtiger Aspekt. Deshalb soll in einem weiteren experimentellen Teilprojekt der Bedeutung der Zell-Zell- sowie der Zell-Matrix-Interaktion bei der neuronalen Differenzierung Rechnung getragen werden, die über Integrine als

transmembranäre Bindeglieder zwischen dem Zytoskelett und der Extrazellulärmatrix vermittelt wird. So ist es das Ziel, die Rolle von  $\beta 1$  Integrin für die Neurogenese mittels eines Vergleiches der neuronalen Differenzierung aus der Wildtyp ES-Zelllinie D3 mit der  $\beta 1$  Integrin defizienten knock-out ES-Zelllinie G201 zu untersuchen. Als Kriterien für die Differenzierung dienen in dieser Untersuchung die neuronale Migration, das neuronale Fortsatzwachstum sowie morphologische und immunhistochemische Reifungsparameter.

### **1.2.3 Abschnitt III: ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien**

Aufgrund jüngster Berichte über die Isolierung menschlicher embryonaler Stammzellen (Thomson et al., 1998) rückt ein eventueller Einsatz von allogenen, in-vitro differenzierten ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien immer mehr in den Fokus des Interesses. Um humane Stammzellen allerdings therapeutisch nutzen zu können, müssen grundlegende Fragen zunächst an tierischen ES-Zelllinien durchgeführt werden. Diese sollten zum Ziel haben, geeignete Expandierungs- und Differenzierungsprotokolle zur Selektionierung geeigneter Zellpopulationen zu etablieren sowie die Differenzierungskapazität von transplantierten ES-Zellen in einem Empfängergewebe zu charakterisieren. Deshalb ist es das Ziel des eigenen Ansatzes, unter Verwendung eines ES-Zellklons mit stabiler Expression des grün fluoreszierenden Proteins unter der Kontrolle des  $\beta$ -Aktin-Promoters das Schicksal von transplantierten Zellen in einem Empfängergewebe unabhängig ihres Differenzierungsstadiums zu untersuchen.

In einem nachfolgenden experimentellen Ansatz soll unter Nutzung eines ES-Zellklons, bei dem die GFP-Expressionskassette unter der Kontrolle des Nestin-Promoters steht, die Selektion von neuronalen Vorläuferzellen in vitro direkt verfolgt und die Voraussetzung dafür geschaffen werden, die selektionierte Zellpopulation mittels präparativen Zellsorting für Transplantationstherapien für neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise M. Parkinson anzureichern.

Da im Verlauf des M.Parkinson dopaminerge Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra degenerieren, wird in einem weiteren Schritt die Differenzierungspotenz von ES-Zellen in TH-positive, dopaminerge Neurone untersucht. Diese Untersuchungen knüpfen an die Charakterisierung der allgemeinen neuronalen Differenzierungspotenz von ES-Zellen nach dem klassischen Reinsäureprotokoll an. Dabei wird durch eine in vitro Präkonditionierung von neuronalen Vorläuferzellen versucht die Population von TH-positiven (dopaminergen) Neuronen anzureichern, so daß ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Transplantationstherapien bei M. Parkinson genutzt werden können.

Schließlich wird an einem Tiermodell für eine degenerative Erkrankung, hier für die Makuladegeneration des Menschen, die Potenz von transplantierten neural differenzierten ES-Zellen, degenerative Prozesse zu stoppen, demonstriert.

### 1.3 **Verwendete Zelllinien und Methoden**

Die in den vorgelegten Arbeiten erhobenen Befunde fanden unter Verwendung nachfolgend aufgelisteter embryonaler Stammzelllinien, Testverfahren und Analysemethoden statt. Alle angewendeten Methoden sind in den entsprechenden Originalarbeiten ausführlich beschrieben.

#### 1.3.1 **Verwendete ES-Zelllinien**

- ES-Zellen der Linie BLC 6, zur Verfügung gestellt von Frau Dr. A. M. Wobus (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben).
- D3 ES-Zelllinie (Doetschman et al., 1985) bezogen von der ATCC, Manassas, Va., USA.
- ES-Zelllinie G201 mit homozygoter  $\beta 1$  Integrin-Defizienz, zur Verfügung gestellt von Prof. Fässler, Institut für Exp. Pathologie, Universität Lund, Schweden.
- D3 Subklone 1 und 2 mit spezifischer GFP-Fluoreszenz in neuronalen Vorläuferzellen unter Verwendung des 2kb nestin intron II enhancer-Thymidinkinase Promoter-Fragmentes (zur Verfügung gestellt von U. Lendahl) (*Andressen et al., 2001a*).
- D3 Subklon7 (**Arnhold et al., 2000a**) unter Verwendung des pCX-( $\beta$ -act)-EGFP-Expressinsvektors unter der Kontrolle des chicken  $\beta$ -actin-Promoters (zur Verfügung gestellt von von Dr. Okabe, Universität Osaka, Japan (Okabe et al., 1997)

### **1.3.2 Kultivierungsprotokolle**

- Stammzellhaltung nach gängigen Protokollen unter Verwendung von leukemia inhibitory factor (LIF) (Rohwedel et al., 1994) mit bzw. ohne „feeder“ Zellen.
- Induktion der neuralen Differenzierung über Retinsäure.
- Selektion neuraler Vorläuferzellen in chemisch-definiertem serumfreien Medium unter Zusatz von Insulin, Transferrin, Selenchlorid und Fibronectin.
- Differenzierung selektionierter Vorläuferzellen in B27/N2 supplementiertem Medium.

### **1.3.3 Embryonale Schnittserien**

- Embryonale Schnittserien nach Fixierung und Paraffineinbettung von Mäuseembryonen der Embryonalstage E12 bis E19.

### **1.3.4 Mikroskopische Techniken**

- Klassische Licht-, Phasenkontrast- und Vitalmikroskopie zur morphologischen Identifizierung neuraler Differenzierungsstadien bzw. zur Verfolgung ihrer Differenzierungsdynamik.
- Klassische immunhistochemische Techniken zur Detektion und Darstellung spezifischer fragestellungsrelevanter Marker.
- Kamera Lucida Zeichnungen zur Korrelation von Transmitterexpression und Zellmorphologie.
- Morphometrische Analyse zur Quantifizierung von differenzierungsrelevanten Daten mit Hilfe der Optimas Software (Optimas, Seattle Washington).

### **1.3.5 Elektrophysiologie**

- Patch clamp-Technik in der Ganzzell-(*whole-cell*)-Konfiguration zur Messung von Ganzzellströmen verschiedener Qualitäten bzw. zur Identifizierung der Kalziumkanalsubtypen sowie zur Detektion der Rezeptorprofile in verschiedenen neuronalen Differenzierungsstadien.

### **1.3.6 Molekularbiologische und biochemische Techniken**

- Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) für den Nachweis der Kalziumkanalsubtypen bzw. deren Splice-Varianten auf Einzelzellniveau.
- Western-Blot zur Bestimmung der Spezifität der Antikörper gegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten.

### **1.3.7 Durchflußzytometrie**

- Durchflußzytometrie bzw. Fluorescence activated cell sorting (FACS) zur Bestimmung der Intensität der GFP-Fluoreszenz von Einzelzellen.

### **1.3.8 Stereotaktische Zelltransplantation**

- Stereotaktische intrazerebrale Transplantation zur Beurteilung der Migrations- und Differenzierungskapazität sowie der Integration in vitro selektierter neuraler Stammzellen in vivo.

## 2 Darstellung und Diskussion der kumulierten Ergebnisse

---

### 2.1 *Abschnitt I: Normogenese neural differenzierter embryonaler Stammzellen*

#### 2.1.1 Neuronale Differenzierungskapazität von ES-Zellen

Zahlreiche Aspekte neuronaler Differenzierungsprozesse, insbesondere die während der frühen embryonalen Neurogenese, sind bis heute nur sehr beschränkt untersucht (McKay, 1989; Luskin, 1994). Dieser Umstand beruht zum Teil auf der eingeschränkten Zugänglichkeit geeigneten embryonalen Zellmaterials bzw. experimentellen Systemen, die eine profunde Analyse embryonaler Differenzierungsprozesse zulassen. In jüngerer Zeit rücken deshalb zunehmend embryonale Stammzellen als Modell zum Studium von früh-embryonalen Differenzierungsprozessen in den Fokus des Interesses. Unter Verwendung von spezifischen Kultivierungsprotokollen, die den Prozentsatz der neuralen Population erhöhen, bieten sie auch die Möglichkeit zum Studium von Mechanismen der früh-embryonalen Neurogenese.

Die embryonale Neurogenese in vivo nimmt ihren Ausgang von proliferativen multipotenten neuroepithelialen Stammzellen im frühen Neuroepithel. Diese Stammzellen teilen sich zunächst symmetrisch, so daß aus einer Progenitorzelle zwei neurale Progenitorzellen hervorgehen. Mit fortschreitender Entwicklung wird eine zunehmende Zahl der Zellteilungen asymmetrisch, so daß aus einer Progenitorzelle zwei ungleiche Tochterzellen hervorgehen. Eine der Tochterzellen differenziert sich zu einer neuronalen bzw. glialen Vorläuferzelle, während die andere als Stammzelle weiter proliferiert (Knoblich, 1997). Die Differenzierung neuraler Zellen zu neuronalen Subpopulationen in vivo mit einigen Hundert verschiedener Phänotypen (Stevens, 1998), das axonale Wachstum sowie die Synaptogenese geschieht durch das Zusammenspiel mehrerer Faktorenklassen. Dazu gehören Zelloberflächenmoleküle oder lösliche Signalmoleküle. Diese zellulär sezernierten Signale beeinflussen den Differenzierungsweg benachbarter

Zellen, indem sie Transkriptionsfaktoren aktivieren und über nachgeschaltete Effektorgene die funktionellen Eigenschaften der Neurone beeinflussen bzw. deren Identität bestimmen.

Da bisher nur einige wenige präliminäre immunhistochemische und elektrophysiologische Charakterisierungen bezüglich der neuronalen Differenzierungseigenschaften von ES-Zellen existieren (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strubing et al., 1995), ist das Ziel des eigenen Ansatzes, die neurale Differenzierungskapazität nach RA Induktion und nach Plattierung der im hängende Tropfen gebildeten embryoähnlichen Aggregate (EBs) (**Abb. 3**) detailliert zu untersuchen. In einem ersten Schritt soll das Vorkommen neuronaler Subtypen bzw. die neuronale Differenzierungsdynamik charakterisiert sowie das differenzierungsabhängige Rezeptorprofil für die klassischen Neurotransmitter elektrophysiologisch bestimmt werden.

Die eigenen Befunde zeigen, daß es nach Plattierung der EBs zu einer kontinuierlichen Migration von Zellen aus dem zentralen Zellhaufen in die Peripherie kommt. Die neuronale Differenzierung erfolgt in Abhängigkeit einer zonalen Anordnung (**Abb. 4**). Dabei stellt der plattierte EB den zentralen Zellhaufen dar, um den sich in einer konzentrischen Anordnung zwei periphere Zonen lagern, die über die Zytomorphologie der Untergrundzellen relativ klar voneinander abgegrenzt werden können. Es sind dies eine intermediäre Zone mit pflastersteinähnlichen polygonalen Zellen und eine äußere Zone mit großen polymorphen Zellen. Bereits zwei Tage nach Plattierung (n.p.) der EBs können Nervenzellen mit Hilfe des neuronalen Markers Neuronen spezifischer Enolase (NSE) nachgewiesen werden. Diese zeigen unterschiedlichste Morphologien sowie eine komplexe Netzwerkbildung. Unter Verwendung des Synapsenmarkers Synaptophysin kann über die Expression dieses synapsenassoziierten Proteins auf eine synaptische Kopplung der Zellen untereinander geschlossen werden. Mit Hilfe entsprechender Antikörper lässt sich die Expression der wichtigsten Neurotransmitter wie Glycin, GABA, Glutamat und Serotonin sowie eine Auswahl von Neuropeptiden, wie das Vasointestinale Polypeptid, Substanz P und Neuropeptid Y detektieren. Darüber hinaus können bestimmte neuronale Morphologien mit der Expression bestimmter Neurotransmitter bzw. Neuropeptide korreliert werden. Außerdem zeigt sich ein stadienspezifisch gehäuftes Auftreten

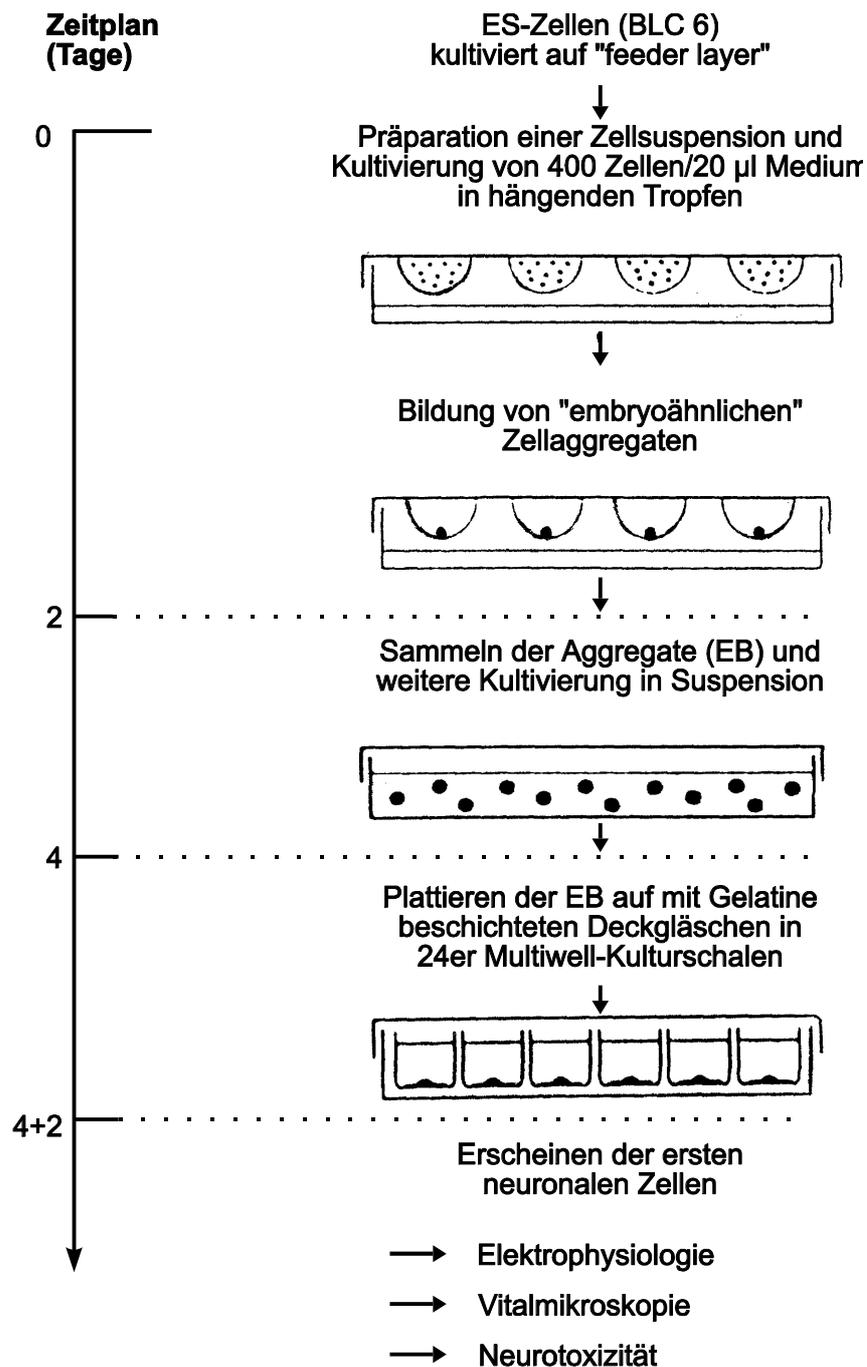


Abb. 3: Differenzierungsschema zur in vitro Differenzierung neuronaler Zellen aus ES-Zellen. Nach Aggregation von ES-Zellen in der Präparation des hängenden Tropfens unter Zugabe von Retinsäure innerhalb von 2 Tagen werden die gebildeten Zellaggregate (EBs) abgespült und für weitere 2 Tage in Suspension kultiviert. Am 4. Tag erfolgt die Plattierung der EBs auf Gelatine-beschichteten Deckgläschen in Multiwell-Schalen.

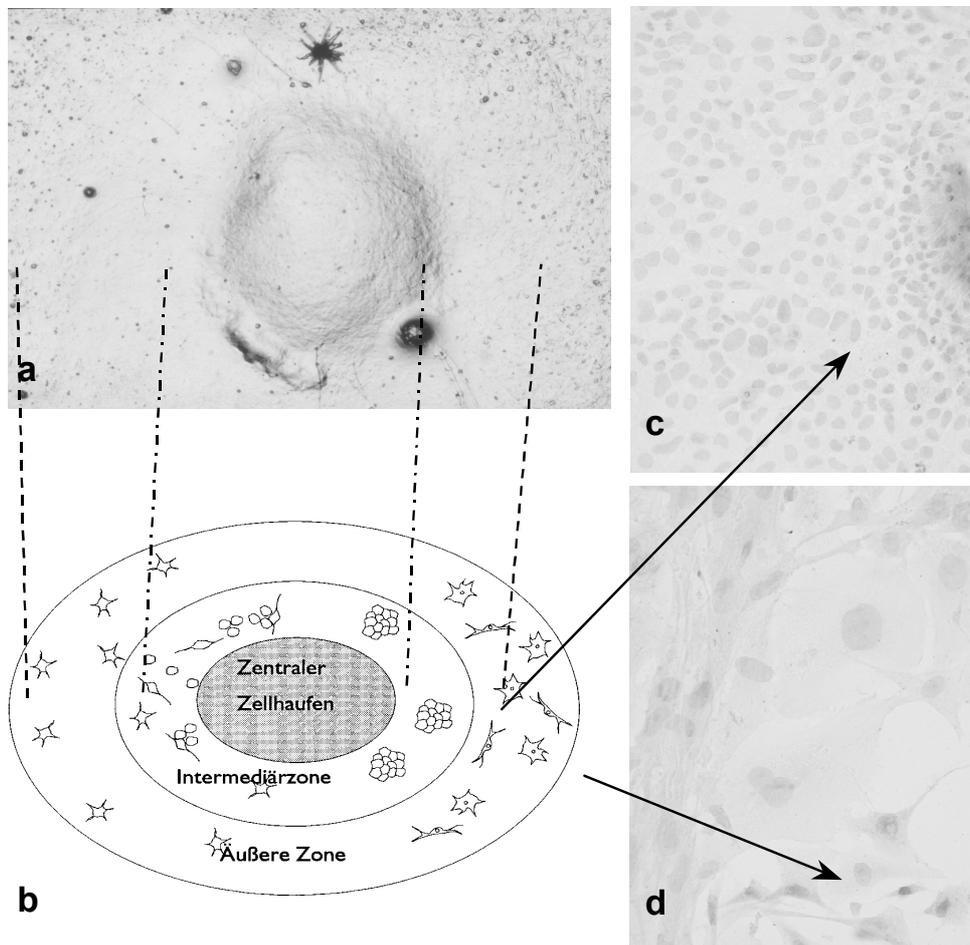


Abb. 4: Darstellung der räumlichen Organisation eines plattierten EB. A) Agaroseabdruck eines EB 5 Tage nach Platierung. b) Schematische Darstellung zur zonalen Einteilung des plattierten EB. Um den zentralen Zellhaufen (ursprünglicher EB) lassen sich zwei konzentrische Zonen, eine intermediäre und eine äußere Zone, abgrenzen. Die Einteilung der konzentrischen Zonen erfolgt nach den Phänotypen der Zellen des Untergrundes. Die unterschiedlichen Morphologien der Untergrundzellen (polygonal und multiform) sind in den mikroskopischen Aufnahmen deutlich zu erkennen (c und d). Auf der linken Seite des Schemas sind die verschiedenen neuronalen Phänotypen und ihre zonales Vorkommen angedeutet. In der Intermediärzone finden sich hauptsächlich a- und bipolare Zellen und in der äußeren Zone vorwiegend multipolare Neurone.

bestimmter morphologischer Phänotypen. Mit Hilfe einer vitalmikroskopischen Zellbeobachtung kann eine kontinuierliche Migration sich differenzierender Neurone aus dem zentralen Zellhaufen entlang fester Leitstrukturen in die Peripherie beobachtet werden. Weiterhin erlaubt die vitalmikroskopische Zellbeobachtung den Nachweis der Morphogenese von apolaren über bi- zu multipolaren Neuronen. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen kann der typische Natriumeinwärtsstrom in den morphologisch identifizierten Neuronen detektiert werden, und darüber hinaus durch Applikation der entsprechenden Transmitter die Rezeptoren für die klassischen Neurotransmitter bereits in sehr frühen Differenzierungsstadien ermittelt werden (**Arnhold et al., 1998**).

Die Ergebnisse dieses Teilabschnittes der Untersuchung weisen darauf hin, daß ES-Zellen bezüglich immunhistochemischer und morphologischer Kriterien in eine Vielzahl neuronaler Phänotypen differenzieren. Sie erweitern damit frühere Befunde bezüglich der Differenzierungskapazität von ES-Zellen nach RA Induktion (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strubing et al., 1995; van Inzen et al., 1996). Dabei fehlen in diesen Arbeiten genauere morphologische Charakterisierungen der Zellen, und es werden nur unzureichende Daten bezüglich der Expression der geläufigsten Neurotransmitter sowie über ihr relatives Auftreten geliefert. Außerdem werden in diesen Arbeiten keine Angaben über die neuronale Differenzierungsdynamik gemacht, von der in der vorliegenden Studie gezeigt werden kann, daß sie in Abhängigkeit von einer zonalen Anordnung erfolgt.

Die Expression der verschiedenen Neurotransmitter und Neuropeptide in neuronal differenzierten ES-Zellen sowie die Diversität neuronaler Morphologien geben einen deutlichen Hinweis darauf, daß die Induktion der neuralen Differenzierung über RA, keineswegs nur die Differenzierung eines bestimmten neuronalen Phänotyps fördert. Diese Befunde stehen damit im Einklang mit Beobachtungen von (Henion and Weston, 1994), die beschreiben, daß RA die Replikation und das Überleben kultivierter multipotenter Neuralleistenvorläuferzellen fördert und damit letztendlich die Differenzierung einer größeren neuronalen Population induziert als dies bisher beschrieben wurde (Mena et al., 1994; Rylett et al., 1993). Aufgrund der zellulären Vielfalt in der hier beschriebenen EB-Präparation, verbunden mit dem funktionellen Nachweis einer synaptischen Kopplung (Strubing et al., 1995a) bzw. über den Nachweis mittels Synaptophy-

sin, unterstützen und erweitern die Daten dieser Studie frühere Befunde, die darauf hinweisen, daß aus ES-Zellen differenzierte Neurone bzw. neuronale Netzwerke wichtige Merkmale des neuronalen Gewebes wie es in vivo vorkommt, besitzen (Strubing et al., 1995; Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995). Interessanterweise kann in den neuronal differenzierten ES-Zellen in einigen Fällen eine Korrelation von Chemo- und Phänotyp hergestellt werden. So wird der Neurotransmitter Glutamat vorwiegend in multipolaren Zellen, die hauptsächlich in der Peripherie des EB lokalisiert sind, exprimiert, während GABAerge und glycinerge Neurone sowohl bi- als auch multipolar sein können. Sie sind dann entsprechend in der intermediären bzw. in der peripheren Zone des EB anzusprechen. Daraus kann geschlossen werden, daß spezifische Umweltfaktoren bzw. Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte auch in diesem System ihre Funktion als Differenzierungsfaktoren wahrnehmen.

Trotz der räumlichen Abhängigkeit der Differenzierungsprozesse im EB können keine Anhaltspunkte für eine Kompartimentierung im Sinne einer terminalen Differenzierung bestimmter Hirnabschnitte wie z.B. Cortex, Cerebellum oder Hirnstamm gefunden werden.

Es ist somit eher naheliegend, daß es sich in diesem in vitro-System um frühe neuronale Differenzierungsprozesse handelt. Allerdings entspricht die hier beschriebene Korrelation von Chemo- und Phänotyp Befunden aus dem ZNS. So ist beispielsweise der Neurotransmitter Glutamat typischerweise in multipolaren Projektionsneuronen des cerebralen Cortex zu finden (Divac et al., 1977; Storm-Mathisen and Vaglum, 1994). Für GABAerge Neurone des ZNS kann keine solche einheitliche Zuordnung zu einem bestimmten Phänotyp vorgenommen werden. Diesem in vitro-Befund entspricht die Beobachtung, daß die Morphologie GABAerger Neurone in vivo stark vom Netzwerk des jeweiligen Hirnabschnittes abhängig ist (Mugnaini, 1985; Freed, 1992).

In Anlehnung an die Situation in vivo, wo die neuronale Migration in einigen Systemen in Abhängigkeit von radialen Gliazellen abläuft (Montgomery, 1994; Vaca and Wendt, 1992) kann auch in der EB Präparation aufgrund einer engen temporo-spatialen Beziehung von Neuronen und Astroglia (*Angelov et al., 1998; Arnhold et al., 1998*), von einer unterstützenden Rolle von radialen Gliazellen für die neuronale Migration ausgegangen werden. Dies wird von den hier beschriebenen vitalmikroskopischen Befunden einer Wanderung von apolaren

Neuronen aus dem zentralen Zellhaufen in die Peripherie auf festen radial angeordneten Migrationsrouten verdeutlicht. Haben diese wandernden unreifen Neurone ihr terminales Siedlungsgebiet erreicht, erfolgt die terminale Differenzierung, so daß dann der entsprechende Phänotyp mit immunhistochemischen Färbungen charakterisiert werden kann. Dabei fällt auf, daß die Expression der verschiedenen Neurotransmitter erst ab einem bestimmten Differenzierungsgrad, d.h. in bi- oder multipolaren Zellen nachweisbar ist. Andererseits können durch elektrophysiologische Ableitungen neben dem neuronentypischen Natriumstrom die Rezeptoren für die klassischen exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitter (Glutamat, GABA und Glycin) bereits in apolaren juvenilen Neuronen detektiert werden. Daraus kann zunächst geschlossen werden, daß früh differenzierende postmitotische Neurone bereits elektrisch aktiv sind, bevor sie die Möglichkeit besitzen Neurotransmitter zu synthetisieren. Darüber hinaus sind sie auch mit einer gewissen Ausstattung von Neurotransmitterrezeptoren versehen, bevor eine initiale Neurotransmitterexpression detektiert werden kann. Tatsächlich lassen auch Befunde aus in vivo Untersuchungen den Schluss zu, daß die Rezeptorausstattung, die schon vor dem Einwachsen afferenter Fasern zu finden ist, Einfluss auf die Synaptogenese nimmt und damit zumindest teilweise für die weitere Differenzierung verantwortlich sein kann (Ostermann et al., 1995; Moser et al., 1996). Möglicherweise wird mit zunehmender Differenzierung und mit der funktionellen Spezialisierung der Neurone die Rezeptorausstattung reduziert. Ähnliche Befunde können auch hinsichtlich der Kalziumkanalausstattung in Korrelation zur neuronalen Reifung gemacht werden (s.u.).

Insgesamt zeigen die hier präsentierten Befunde die Differenzierung einer Vielzahl neuronaler Phänotypen aus ES-Zellen nach RA Induktion. Die räumlich abhängige Differenzierung von neuronalen Phänotypen zeigt allerdings, daß auch systemimmanente Faktoren existieren, die die neuronale Differenzierung beeinflussen, so daß die Differenzierungscharakteristika in der ES-Kultur starke Parallelen zur in vivo-Situation aufweisen. Damit kann gezeigt werden, daß es sich bei der ES-Kultur um ein verlässliches in vitro-System zum Studium früher embryonaler Differenzierungsmechanismen handelt.

## 2.1.2 Hinweise zur Regulation der Kalziumhomöostase in neuronal differenzierten Zellen des EB

Nachdem in den vorherigen Abschnitten die Differenzierungskapazität von ES-Zellen zu einer Vielzahl von neuronalen Subtypen gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage, inwieweit sich die Neurone neben ihrer unterschiedlichen Transmitter- bzw. Rezeptorausstattung auch anhand ihrer unterschiedlichen Ausstattung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen bzw. von Kalziumbindenden Proteinen charakterisieren lassen und wie sich das Expressionsmuster dieser an der Kalziumhomöostase beteiligten Strukturen differenzierungsabhängig ändert. Dies ist insbesondere von Interesse, da der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt während der Neurogenese wichtig für die Determination des Neurotransmitterphänotyps (Lipton and Kater, 1989; Komuro and Rakic, 1993; Scheetz and Constantine-Paton, 1994; Spitzer, 1994) sowie für die Expression verschiedener Gene (Spitzer N., 1991) ist. Darüber hinaus ist der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt wichtig für das axonale Wachstum, die Modulation der Membranerregbarkeit (Reuter, 1983; Hille, 1992) und ist an der Neurotransmitterausschüttung beteiligt (Olivera et al., 1994). Unter physiologischen Bedingungen wird die Konzentration des freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  durch eine Reihe von an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beteiligten Zellorganellen bzw. -proteinen wiederhergestellt. Dazu gehören unter anderem spannungsabhängige (SAKK) und Ligandengesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sowie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine (Andressen et al., 1993).

### 2.1.2.1 Expression von Kalziumkanälen in neuronal differenzierten ES-Zellen

SAKK, die aufgrund von biophysikalischen und pharmakologischen Untersuchungen entsprechend ihrer Spannungsabhängigkeit in sogenannte low-voltage-activated (LVA) (T-Typ) und high-voltage activated (HVA) (L-, N-, P-, Q- und R-Typ) eingeteilt werden, steuern den transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, (Reuter, 1983; Hille, 1992). SAKK bestehen mindestens aus drei Genprodukten, nämlich

der ionendurchlässigen porenbildenden Hauptuntereinheit  $\alpha 1$ , die mit strukturellen/regulatorischen  $\alpha 2\delta$ - und  $\beta$ -Hilfsuntereinheiten gekoppelt ist (Hofmann et al., 1994). Die  $\alpha 1$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten lassen sich in mehrere Gruppen einteilen und damit bestimmten Zelltypen zuordnen. Während die  $\alpha 1D$ - Untereinheit dem neuronalen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zugeordnet werden kann, besteht die zweite Gruppe aus den A-, B-, und E-Genklassen, die für non-L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle kodieren (Catterall W., 1995). Während gesichert ist, daß das  $\alpha 1B$ -Genprodukt die zentrale Poren-bildende Untereinheit des N-Typ-SAKK darstellt (Williams et al., 1992), kodiert die  $\alpha 1A$ -Untereinheit entweder für den P- oder den Q-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom (Mori et al., 1991). Für die  $\alpha 1E$ -Untereinheit wird vermutet, daß sie die porenbildende Untereinheit des R-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals repräsentiert.

Für die meisten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalsubtypen wurden spezifische Blocker isoliert bzw. synthetisiert. Während der L-Typ SAKK durch Dihydropyridine wie Nifedipin und Isradipin blockiert werden kann (Bean B.P., 1989), lassen sich die neuronalen N-Typ-Kanäle durch omega-Conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTx-GVIA) und P-Typ Kanäle durch omega-Agatoxin IVA ( $\omega$ -Aga-IVA) inhibieren (Aosaki and Kasai, 1989; Plummer et al., 1989). Den beiden zuletzt genannten Kanaltypen wird insbesondere die präsynaptische Regulation der Neurotransmitterfreisetzung zugeschrieben (Olivera et al., 1994).

Entsprechend der Verhältnisse in vivo zeigen die bisher an neural differenzierten ES-Zellen erhobenen Daten, daß mindestens vier pharmakologisch distinkte "high voltage activated" (HVA)  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wie der L-, N-, P/Q, sowie der R-Typ-Kalziumkanal, die für das Entstehen des Gesamtzellkalziumstromes verantwortlich sind, exprimiert werden (Strubing et al., 1995a). Mit Hilfe von pharmakologischen Experimenten konnte am ES-Zellmodell weiterhin gezeigt werden, daß Neurotransmitter wie Somatostatin insbesondere die Aktivität von L- und N-Typ Kalziumkanälen in frühen neuronalen Differenzierungsstadien über G-Proteine regulieren (Strubing et al., 1997).

Korrespondierend dazu zeigen die eigenen an ES-Zellen erhobenen Daten sowohl elektrophysiologisch als auch immunhistochemisch die Expression des L-, N-, P/Q- sowie des R-Typ-Kalziumkanals in allen neuronalen Differenzierungsstadien (Arnhold et al., 2000a). In Übereinstimmung mit vitalmikroskopischen Befunden (Arnhold et al., 1998) bezüglich der phänotypischen Veränderungen

individueller Neurone während der neuronalen Differenzierung in ES-Zellen kann auch eine veränderte Beteiligung der o.g. spannungsabhängigen Kalziumkanäle am Gesamtkalziumstrom in typischen Vertretern der drei morphologischen Reifungsstadien a-, bi- und multipolaren Neuronen registriert werden (**Abb. 5**). Während sich die L- und N-Typ Stromkomponenten, ausgehend von den apolaren/unipolaren über die bipolaren zu den multipolaren Neuronen, deutlich reduzieren, kann im Vergleich zu den juvenilen Morphologien ein signifikanter Anstieg der P/Q-Typ Kanalbeteiligung in morphologisch reifen Neuronen beobachtet werden. Eine ähnliche Situation mit einem Anstieg der entsprechenden Kanalbeteiligung trifft auch für den R-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zu. Zusammen mit der beschriebenen Verschiebung der Kalziumkanal-Beteiligung zugunsten von P/Q und R-Typ Kanälen in der vorliegenden Studie, kann ebenfalls ein differenzierungsabhängiger Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromdichte registriert werden (**Arnhold et al., 2000a**). Immunzytochemische Analysen zeigen die Existenz der  $\alpha 1$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten in mehr als 90 % aller Neuronen in allen morphologischen Reifestadien. Die elektrophysiologisch/pharmakologisch erhobenen Daten zum Vorkommen aller vier Kalziumstromkomponenten in neuronal differenzierten ES-Zellen werden durch entsprechende RT-PCR-Analysen bestätigt (**Abb. 6**) (*Vajna et al., 1998*).

Die Expression aller in der ES-Zellkultur untersuchten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten wurde bereits früher im ZNS verschiedener adulter Säugetierspezies mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die  $\alpha 1$ -Untereinheiten der neuronalen Kalziumkanäle nachgewiesen, so z. B. in der Ratte (Westenbroek et al., 1992; Soong et al., 1993; Westenbroek et al., 1995; Yokoyama et al., 1995), der Maus (Mori et al., 1991; Coppola et al., 1994; Williams et al., 1994) und im Kaninchen (Niidome et al., 1992; Fujita et al., 1993). Darüber hinaus wurde das Vorkommen der  $\alpha 1$  A-,  $\alpha 1$  B- und  $\alpha 1$  E- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheit auch im menschlichen Kleinhirn detektiert (Volsen S.G. et al., 1995).

Da es bisher keine Untersuchungen über die Expression verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten während der Embryonalentwicklung gibt, liefert diese

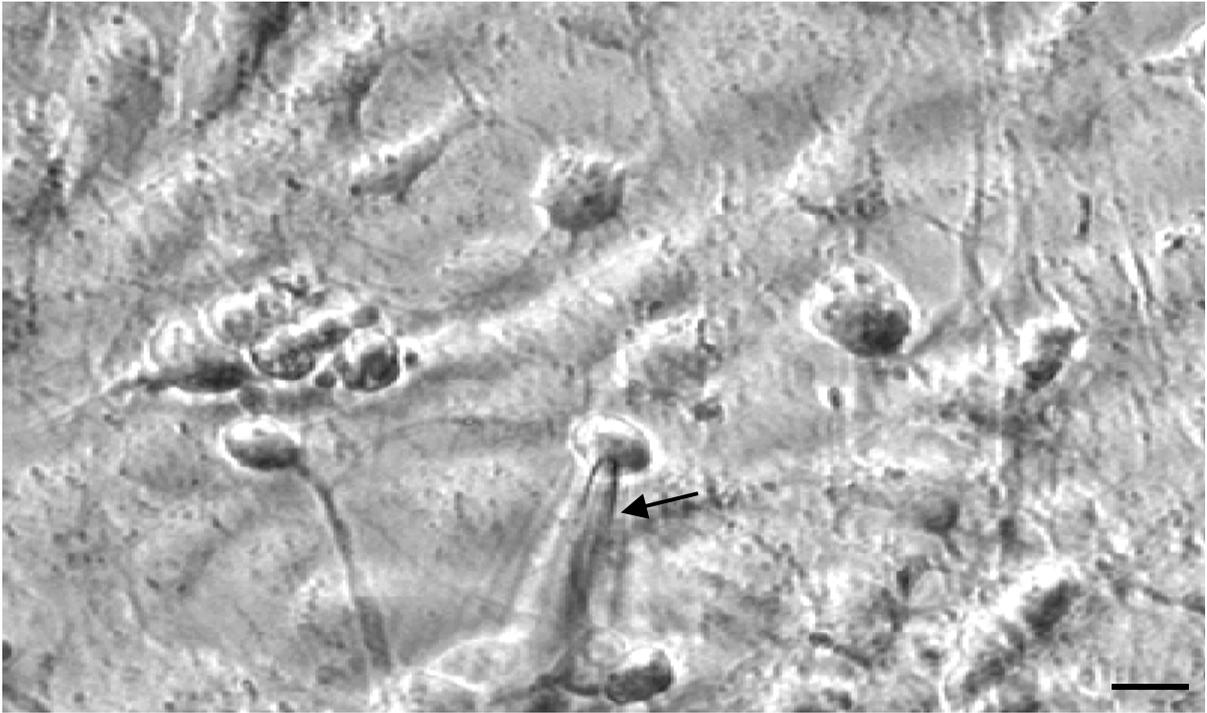
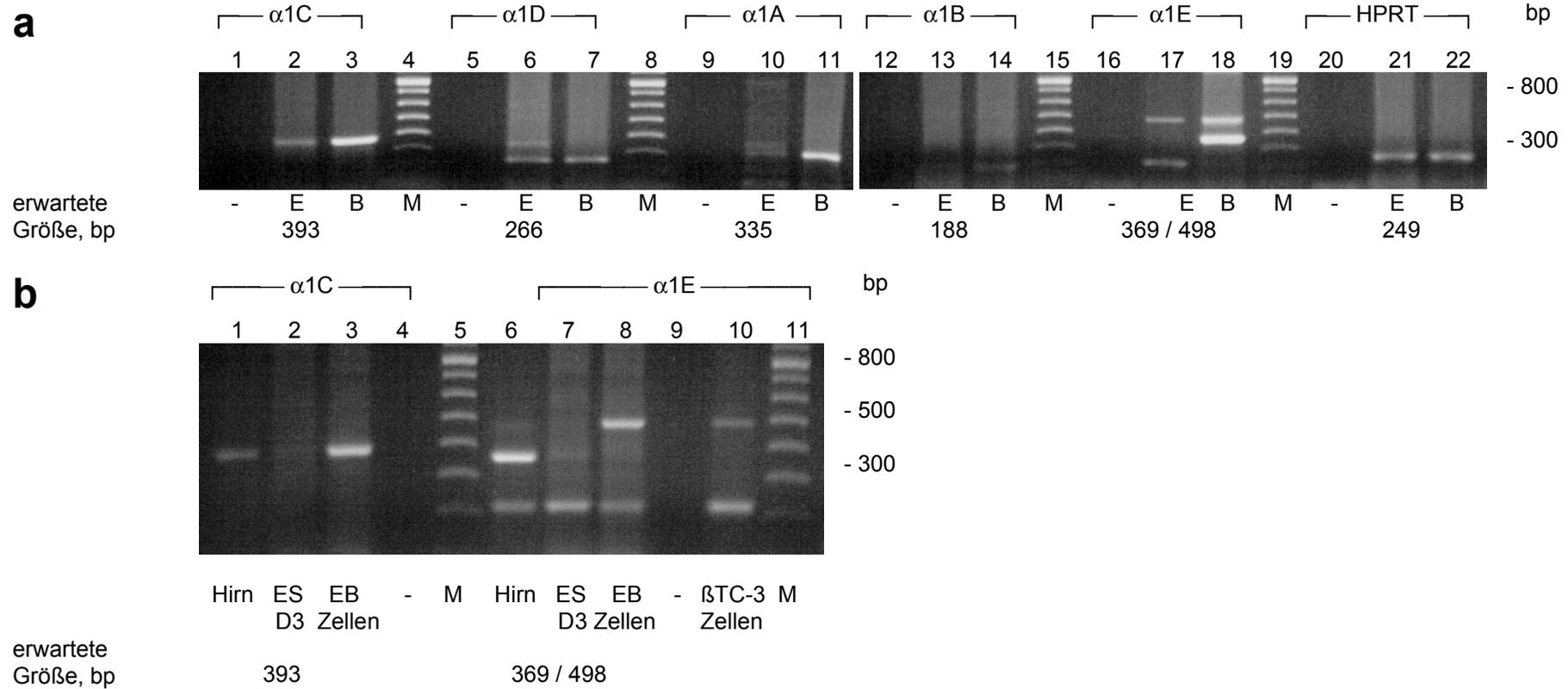


Abb. 5: Darstellung einer neuronal differenzierten ES-Zelle während einer patch clamp Ableitung in der „whole cell“ Konfiguration, Pfeil = Patch Pipette, Balken = 10 $\mu$ m.

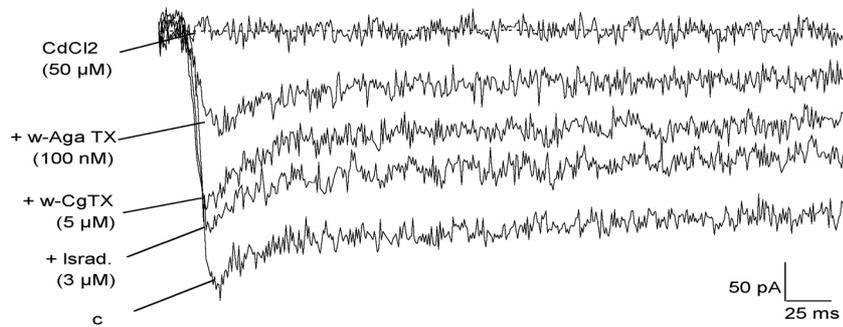


**Abb. 6:** PCR-Amplifikation von  $\alpha 1$ -cDNS-Fragmenten aus differenzierten embryonalen Stammzellen. Als Marker wurde 100 bp-ladder™ (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein) verwendet (Spur 4, 8, 15, 19 in (A), Spur 5 und 11 in (B)). Die erwarteten Produktgrößen sind unterhalb der Diagramme angegeben. (a) Amplifikation aus differenzierten BLC6-ES-Zellen mit Untereinheit-spezifischen Oligonukleotidpaaren; jeweils aufgetragen: PCR-Produkte aus Amplifikation von Negativkontrolle ohne cDNS (-), BLC6-cDNS und Maushirn-cDNS; im Falle der HPRT-Amplifikation enthält die Negativkontrolle BLC6-GesamtRNS. (b) Amplifikation aus differenzierten D3/Aat17-ES-Zellen mit  $\alpha 1C$ - bzw.  $\alpha 1E$ -spezifischen Primern; für Spur 1 und 6 wurde Maushirn-cDNS, für Spur 4 und 9 die Negativkontrollen ohne RNS verwendet; in Spur 2 und 7 bzw. in Spur 3 und 8 wurde cDNS aus D3/Aat17-ES-Zellen vor der Plattierung bzw. elf Tage nach Plattierung verwendet. Spur 10 enthält als zusätzliche Positivkontrolle die Amplifikationsprodukte der murinen Insulinoma-Zelllinie  $\beta$ -TC3.

Arbeit die ersten immunocytochemischen Hinweise für die Expression der  $\alpha 1$  A-,  $\alpha 1$  B- und  $\alpha 1$  E- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten während der Embryonalentwicklung in einem in vitro-Versuchsmodell. Die immunzytochemische Detektion der verschiedenen  $\alpha 1$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten korrespondieren mit den elektrophysiologischen Daten und zeigen, daß während der frühen Embryogenese Neurone mit einem vielfältigen Muster an SAKK ausgestattet sind. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß die Zellen mit Hilfe der Vielzahl von SAKK ihren enormen Bedarf an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen während dieser kritischen Phase der Entwicklung regulieren. Dies wird auch durch die mit zunehmender Differenzierung ansteigenden Kalziumstromdichte deutlich, die häufig während der Nervenzellentwicklung beobachtet wird (Bode-Greuel and Singer, 1988; McCobb et al., 1989; Giffin et al., 1991; Thompson and Wong, 1991; Dourado and Dryer, 1992; Mynlieff and Beam, 1992).

Die hier vorgestellten elektrophysiologischen bzw. pharmakologischen Daten zum Vorkommen aller vier Kalziumstromkomponenten werden zusätzlich noch durch die RT-PCR-Analysen bestätigt. Mit Hilfe dieses Nachweisverfahrens kann zusätzlich das Vorkommen der  $\alpha 1$ E-Isoform in den neuronal differenzierten ES-Zellen gezeigt werden da für diese Isoform bis dato noch keine spezifischen Antikörper existieren (Vajna et al., 1998). Die  $\alpha 1$ E-Komponente wird als der native Gegenspieler des R-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals angesehen (Randall and Tsien, 1995; Tottene et al., 1996). Bei der genaueren Analyse der  $\alpha 1$ E-Transkripte fällt allerdings auf, daß von der  $\alpha 1$ E-Isoform zwei Splicevarianten existieren (**Abb. 7**). Dabei tritt in den neuronalen Zellen des EBs das kürzere  $\alpha 1$ E-Fragment signifikant häufiger auf als die längere Variante, was mit Hilfe von RT-PCR-Analysen von Kortexpräparationen der Ratte bestätigt werden kann. Dort kann analog zu den Mausebefunden ausschließlich ebenfalls nur die kürzere Spleißvariante gefunden werden (Vajna et al., 1998). Dagegen tritt die längere  $\alpha 1$ E-Variante gehäuft in nicht-neuronalen Zellen auf, was in ES-Zell-Differenzierungsstudien, die nicht mit dem RA-Protokoll durchgeführt werden, deutlich wird. Es kann somit angenommen werden, daß das Vorkommen der kürzeren Variante generell auf neuronale Zellen beschränkt ist.

**a**



**b**

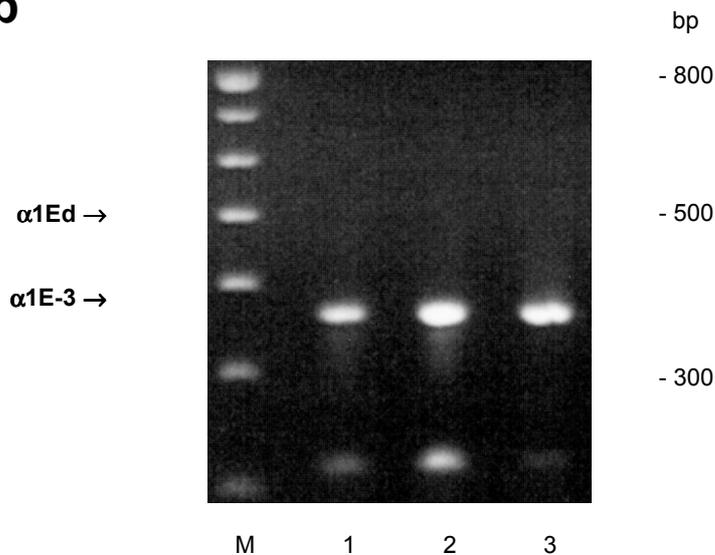


Abb. 7: Identifizierung von SAKKs bzw.  $\alpha$ 1E in einzelnen Neuronen *in vitro* differenzierter BLC6-ES-Zellen. (a) Barium-Einwärtsströme 3 Tage nach Plattierung; die dargestellten Ströme wurden ohne Blocker [c], bzw. nach sukzessiver Zugabe von 3  $\mu$ M Isradipin [israd.], 5  $\mu$ M  $\omega$ -Conotoxin-GVIA [ $\omega$ -CGTX] und  $\omega$ -Agatoxin-IVA [ $\omega$ -AgaTX] ermittelt. Der verbleibende Strom („resistenter Strom“) wird reversibel durch 50  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> blockiert (b) Gelelektrophoretische Auftrennung dreier repräsentativer Einzelzell-RT-PCR-Produkte. Spur 1 enthält die 100 bp ladder (Gibco BRL/ Life Technologies, Eggenstein); die PCR-Produkte in Spur 1 und 2 mit einer Länge von etwa 220 bp sind Unspezifitäten ribosomalen Ursprungs.

Aufgrund der Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als „second messenger“ während der Embryonalentwicklung ist es naheliegend, daß in vielen Zellen während der Embryogenese die ersten einwärtsgerichteten Ionenströme tatsächlich  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme sind (Dietzel, 1995). Die wenigen Arbeiten, die sich mit einer entwicklungsabhängigen Verschiebung der HVA SAKK beschäftigen, zeigen analog zu den eigenen Befunden eine entwicklungsbedingte Zunahme der Q-Typ-SAKK-Beteiligung am Gesamtzellkalziumstrom, beispielsweise in DRG-Neuronen (Hilaire et al., 1996). Darüber hinaus kann eine N-Typ-Beteiligung am Gesamtstrom in frühen hippocampalen Neuronen gezeigt werden, während die P/Q-Typ-Beteiligung in allen Entwicklungsstadien zu detektieren war (Verderio et al., 1995). Im Gegensatz dazu gibt es Daten von Hippocampusneuronen, die zeigen, daß die N-Typ SAKK-Beteiligung bis in die frühe postnatale Periode ansteigt (Jones et al., 1997). Dabei bleibt es Spekulation, ob dort eine Neuexpression vorliegt, die in dem ES-Zellsystem nicht auftritt, da es sich bei den Neuronen in diesem System nicht um terminal differenzierte Nervenzellen handelt.

#### 2.1.2.2 Differenzierungsabhängige Expression von Kalzium-bindenden Proteinen

Der transmembranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität. Eine Störung dieses Gradienten führt unweigerlich zu neuronalen Degenerationserscheinungen (Farber, 1981). Da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über SAKK nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip gesteuert wird, kann eine niedrige intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nur durch ein effizientes Puffersystem für freies intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert werden. Eines dieser Puffersysteme stellen die im Zytoplasma liegenden  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine dar (McBurney and Neering, 1985; Kretsinger and Nakayama, 1993; Rasmussen, 1989; Wasserman and Fullmer, 1983). Sie bilden eine Gruppe von homologen Proteinen mit einer charakteristischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomäne (Moncrief et al., 1990). Mitglieder der Gruppe sind Calbindin (CB), Parvalbumin (PV) und Calretinin (CR), die nur in bestimmten Subpopulationen des peripheren und zentralen Nervensystems exprimiert werden (Celio, 1990; Braun, 1990; Baimbridge et al., 1992; Andresen et al., 1993). Antikörper gegen diverse  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine werden zu-

nehmend für neuroanatomische Studien eingesetzt. So ist die zelluläre Lokalisation dieser Proteine -trotz quantitativer Unterschiede- in qualitativer Hinsicht spezieübergreifend (Celio, 1990; Hendry and Jones, 1991; Van Brederode et al., 1990).

Die eigenen Daten bezüglich des Vorkommens von  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine in neuronal differenzierten ES-Zellen zeigen die Expression der drei Proteine CR, CB und PV in den verschiedenen Stadien nach Plattierung (2-5 d n.p., 11-14 d n.p. und 15-19 d n.p.). Im Gegensatz zum allgemeinen Auftreten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaluntereinheiten ist die neuronale Expression der  $\text{Ca}^{2+}$ -binden Proteine sehr selektiv. So beschränkt sich die Expression von CR auf nur etwa 10% aller Neurone in allen Stadien n.p.. Es wird hauptsächlich in differenzierteren multipolaren Zellen mit langen varikösen Fortsätzen exprimiert. Für CB kann eine Zunahme der Expression von 10% in frühen Plattierungsstadien auf 30% in späteren Stadien detektiert werden. Dabei wird analog zur Expression von CR CB hauptsächlich von multipolaren Zellen exprimiert. Allerdings kann in a- oder bipolaren Zellen eine schwache Färbung registriert werden. Demgegenüber kann PV präferentiell in bipolaren Neuronen nachgewiesen werden. Die Expressionsrate steigt von 20% in frühen Stadien n.p. auf 30% in späteren Stadien n.p. an.

Da das Expressionsmuster der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine in der vorliegenden Untersuchung sehr stark mit der Reife der Zellen zu korrelieren scheint, ist davon auszugehen, daß ihr Auftreten generell für spätere Entwicklungsstadien vorgesehen ist. Dies würde ihnen eine Rolle bei der Reifung von speziellen physiologischen Funktionen zuschreiben. In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise aus Untersuchungen des zentralen Nervensystems der Maus, der Ratte und des Zebrafinken, welche besagen, daß  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine nicht mit Entwicklungsschritten der frühen, sondern eher der späteren neuronalen Embryogenese in Verbindung gebracht werden können (Enderlin et al., 1987; Solbach and Celio, 1991; Frassoni et al., 1991; Braun, 1990; Andressen et al., 1993). Tatsächlich ist PV ein Marker für sich entwickelnde, jedoch nicht terminal differenzierte DRG-Neurone sowie für Neurone des Hippocampus und neozerebralen Interneuronen (Solbach and Celio, 1991). Trotz der Beobachtung eines transienten bipolaren Phänotypes bei sich entwickelnden Neuronen im EB muss geschlossen werden, daß es sich bei den Zellen, die eine PV-Immunopositivität aufweisen, um eine Subpopulation von bipolaren Zellen handelt. Sie scheinen in

dem bipolaren Reifungszustand dauerhaft zu verharren. Im Gegensatz zur PV-Expression wird das Auftreten von CB in frühen und daher unreifen Zellen des zerebralen Kortex beobachtet (Enderlin et al., 1987).

Zusammenfassend zeigen die Befunde über die Expression von Kalziumkanaluntereinheiten und  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen, daß im Gegensatz zum generellen Phänomän einer Verschiebung der Kalziumkanalbeteiligung am Gesamtkalziumstrom zugunsten der P/Q- und R-Typ-Kanäle, die Expression der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine nur auf einige Subpopulationen von bi- und multipolaren Neuronen beschränkt ist. Aufgrund dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, daß die Expression bestimmter  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Proteine weder eine Voraussetzung für Veränderungen des Kalziumkanalmusters noch für Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromdichte sein muss. Sie zeugen vielmehr von einer weiter fortgeschrittenen neuronalen Differenzierung. Trotz einer anhand der Veränderung der Kalziumkanalausstattung und des Profils der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine detektierten beginnenden Maturierung der Neurone im EB muss dennoch eine begrenzte Spezialisierung der Zellen angenommen werden. Die neuronal differenzierten Stammzellen können mit Neuronen aus pränatalen embryonalen Stadien verglichen werden, die noch keine funktionelle Etablierung von bestimmten neuronalen Subsystemen aufweisen. Diese Sichtweise ist konkordant mit anderen Beobachtungen, die ebenfalls davon ausgehen, daß sowohl die Expression von SAKK-Untereinheiten (Jones et al., 1997) und die der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine erst postnatal terminiert werden (Solbach and Celio, 1991; Enderlin et al., 1987; Frassoni et al., 1991). Diese Beobachtungen stehen auch im Einklang mit den eigenen Daten zur neuronalen Differenzierungskapazität von ES-Zellen, die ebenfalls zeigen, daß die Neurone aus ES-Zellen einen pränatalen Zustand repräsentieren (**Arnhold et al., 1998**).

### 2.1.3 Differenzierungskapazität von ES-Zellen zu Makro- und Mikrogliazellen

Parallel zur neuronalen Differenzierung kann nach RA-Induktion die Differenzierungskapazität von ES-Zellen zu Gliazellen mit entsprechenden immunhistochemischen Markern studiert werden und die Vergleichbarkeit glialer Entwicklungsschritte im EB-System mit in vivo-Befunden bzw. mit Befunden aus Primärkulturansätzen (Temple and Raff, 1985; Cameron and Rakic, 1991; Levison and Goldman, 1993; Mabie et al., 1997; Kamei et al., 1998) etabliert werden. Da in den meisten Differenzierungsstudien, die bisher an embryonalen Stammzellen durchgeführt wurden, die neuronale Differenzierung im Vordergrund steht, ist die eigene Untersuchung die erste, die sich explizit mit der Differenzierungspotenz in die gliale Linie beschäftigt (*Angelov et al., 1998*). Für die Gliadifferenzierung spielt analog zur neuronalen Differenzierung sowohl die genetische Determinierung als auch lokale Faktoren (Zelladhäsion, neurotrophe Faktoren) eine wichtige Rolle. Aufgrund der Differenzierung zahlreicher glialer Morphologien und der Expression verschiedener reifungsabhängiger Marker der glialen Linie nach RA-Induktion in der ES-Zellkultur ist es das Ziel, neben der Ermittlung einer temporo-spatialen Beziehung zwischen Neuronen, Makro- und Mikrogliazellen, die Gliadifferenzierung in diesem System mit Hilfe des „glial lineage“ nach Cameron und Rakic (Cameron and Rakic, 1991) zu charakterisieren.

Das Modell des „glial lineage“ beruht auf der Analyse von morphologischen Kriterien sowie auf der Analyse der fortschreitenden Reifung individueller Zelltypen über einen Erwerb bzw. Verlust bestimmter Antigene (**Abb 8**). So sind Zellen mit einer Expression von Rat-401 (Nestin) (Hockfield and McKay, 1985; Lendahl et al., 1990), RC-1 (Edwards et al., 1990) und RC-2 (Misson et al., 1988) und einer radialen Morphologie die ersten Zellen der glialen Linie, die während der Entwicklung beobachtet werden können (Rakic, 1972; Choi, 1981; Bentivoglio and Mazzarello, 1999). Mit ihrer charakteristisch, elongierten Zellform zeigen sie eine Orientierung senkrecht zur Oberfläche des wachsenden Gewebes

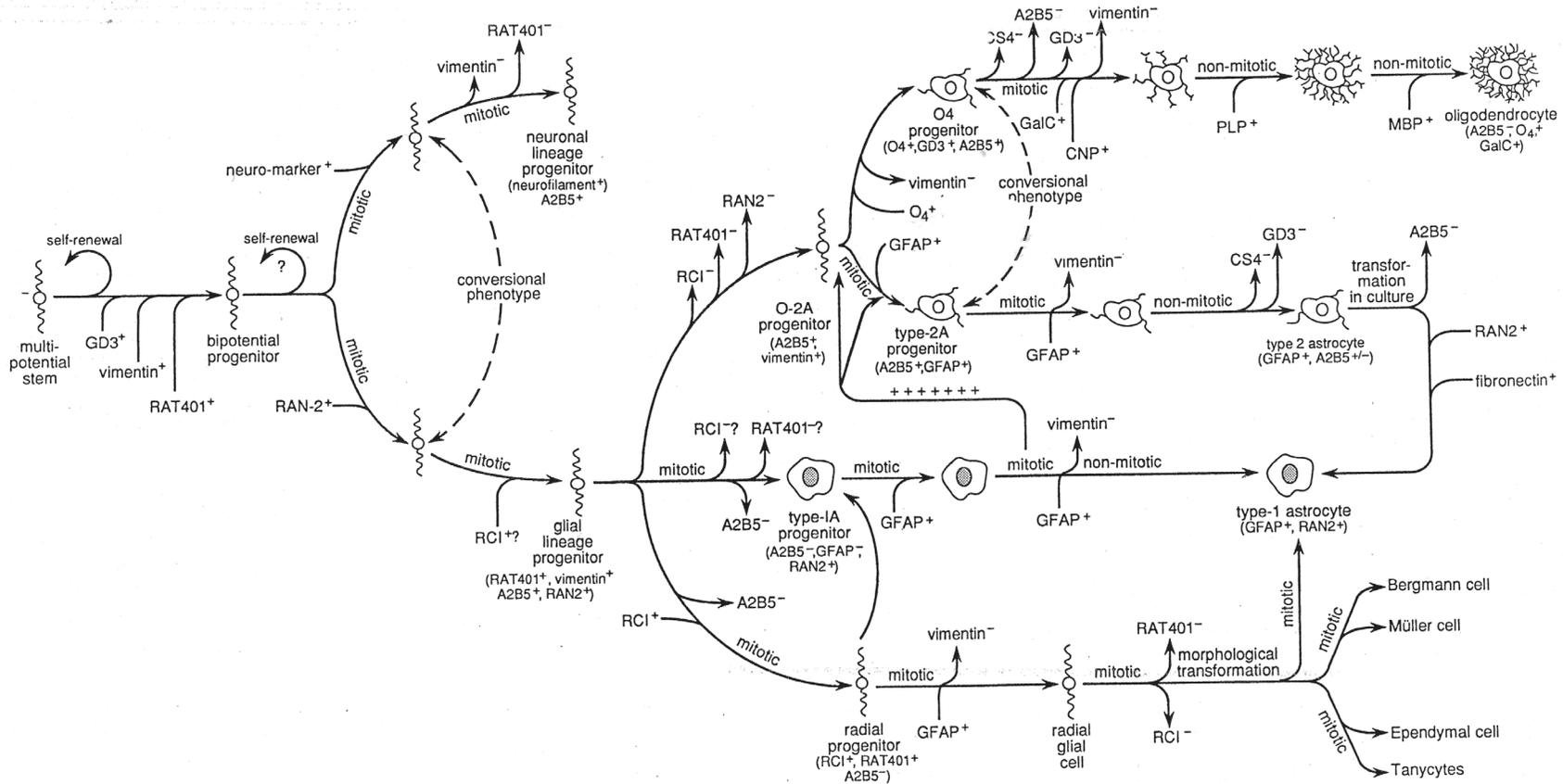


Abb. 8: Schematische Übersicht der Gliazelllinien, die sich während der Entwicklung des zerebralen Kortex differenzieren. Der Erwerb bzw. der Verlust von Antigenkomponenten, die im Verlauf der Reifung individueller Zelltypen auftreten, ist mit + oder - gekennzeichnet (Cameron und Rakic, 1991).

(Chanas-Sacre et al., 2000). Es kommt dabei zu einer engen Nachbarschaft zwischen den radial angeordneten Fortsätzen und migrierenden Neuronen (Rakic, 1972). In späteren Differenzierungsstadien dieser radialen Gliazellen kommt es zu einer Koexpression der Intermediärfilamente mit dem sauren Gliafaserprotein GFAP (Voigt, 1989). Die Expression der drei Intermediärfilament-assoziierten Marker verliert sich jedoch mit der Transformation der radialen Gliazellen in die klassischen astrozytären Phänotypen bzw. in O-2A-Progenitorzellen (Hockfield and McKay, 1985; Misson et al., 1988; Edwards et al., 1990). In diesen Stadien kann dann nur noch die Expression von GFAP beobachtet werden (Dahl et al., 1985), daß als Marker für die Identifizierung von reifen Astrozyten herangezogen wird. Astrozyten differenzieren in zwei verschiedene Linien: Typ-1- und Typ-2-Astrozyten. Allerdings gilt nur für Typ-1-Astrozyten die GFAP Expression als sicheres Differenzierungsmerkmal (Liesi et al., 1983; French-Constant et al., 1986). Sie gelten auch als Induktoren für die Entwicklung der O-2A-Zelllinie (Noble et al., 1988; Raff et al., 1988). Aus den O-2A-Zellen gehen unter in vitro Bedingungen Oligodendrozyten und Typ-2-Astrozyten hervor (Raff et al., 1983). O-2A-Progenitorzellen zeichnen sich durch Immunopositivität für A2B5 und Vimentin, jedoch durch eine fehlende Expression von GFAP und Ran 2 (Raff, 1989) aus. Sie differenzieren in Abwesenheit entsprechender Induktionsfaktoren für die Differenzierung von Typ-2-Astrozyten spontan zu O4 positiven Oligodendrozyten (Lee et al., 2000a). Während sie zusätzlich durch das etwas zeitlich verzögerte Auftreten von Galactocerebroside (Gal C) (Sommer and Schachner, 1981; Dubois-Dalcq, 1987; Raff et al., 1978) charakterisiert werden können, kann A2B5 in diesen Zellen nicht mehr detektiert werden.

Zu den ersten Zellen der glialen Linie im EB gehören A2B5-positive Zellen gefolgt von radialen Zellen, die immunopositiv für RC-2 sind. Etwa 5 Tage n.p. können die ersten GFAP positiven radialen Zellen detektiert werden. Ihre Zahl nimmt im weiteren Verlauf der Differenzierung zu (**Abb. 9**). In einem Teil dieser Zellen kann eine Immunopositivität für CD15, einem Kohlenhydrat der

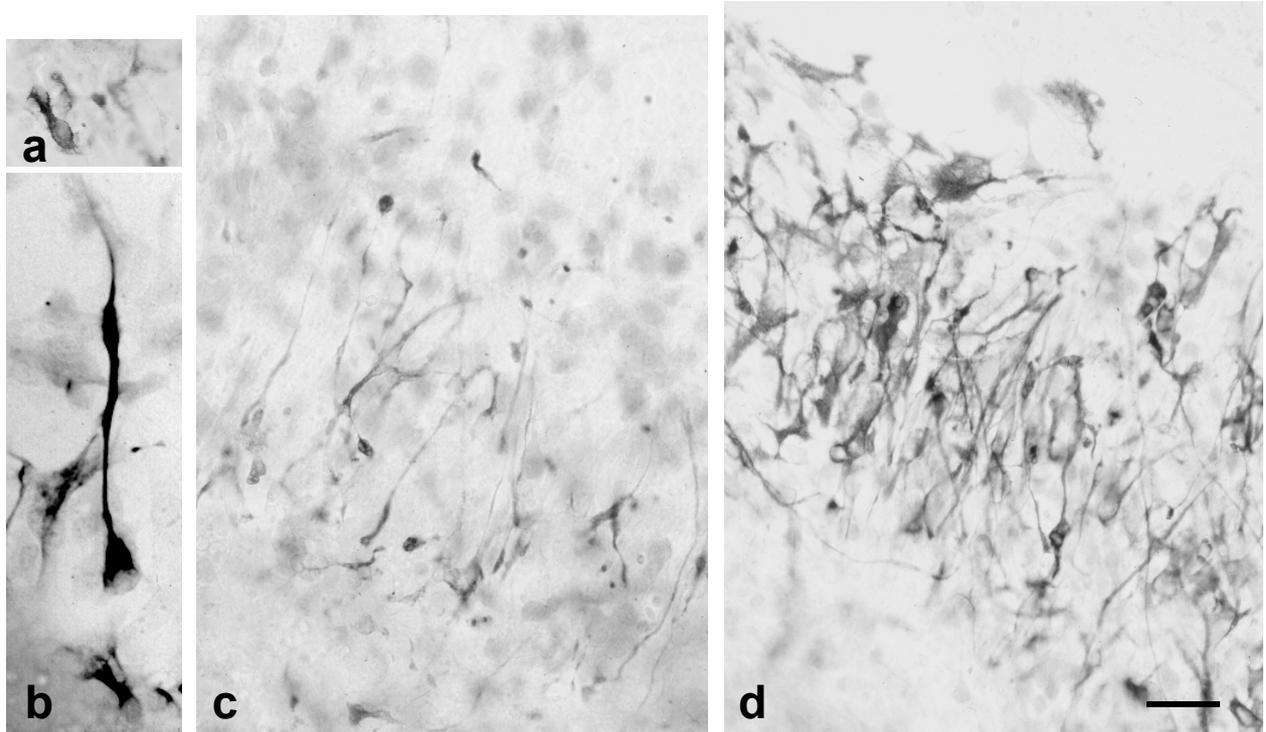


Abb. 9: Differenzierung von radialen Gliazellen zwischen dem Tag 2 und 6 n.p. a) Gliale Vorläuferzellen mit kurzen stumpfen Fortsätzen, dargestellt mit dem Marker A2B5 zwei Tage n.p.. b) Am Tag 3 n.p. können ähnliche Zellen mit dem Marker RC2 markiert werden, der auch Zellen mit radialer Morphologie detektiert. c) Ab Tag 4 n.p. kann eine zunehmende Zahl radialer Gliazellen immunopositiv für GFAP. d) Zwei Tage später (Tag 6 n.p.) hat die Zahl der GFAP positiven radialen Gliazellen deutlich zugenommen. Balken entspricht 10µm in a. b und 20µm in c. d.

Laktoserie, das während der ZNS-Entwicklung der Maus (Mai et al., 1998) in radialen Gliazellen exprimiert wird, detektiert werden. Die GFAP-positiven Zellen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu NSE-positiven neuronalen Perikarya. Zwischen dem 5.-9. Tag n.p. nimmt die Zahl der GFAP-positiven Gliazellen zugunsten von protoplasmatischen GFAP-positiven Zellmorphologien ab (**Abb. 10**). Diese Transformation der radialen Gliazellen, die teilweise mit einem von zentral nach peripher transloziertem Soma einhergeht, kann auch mit Hilfe des Markers CD15 bestätigt werden. Während der späten Phase der glialen Differenzierung (9-16 Tage n.p.) verschwinden die GFAP-positiven radialen Gliazellen vollständig. Dagegen kann weiterhin eine A2B5-Immunopositivität in Zellen mit einem einzelnen starken Fortsatz detektiert werden. Darüber hinaus wird es in kleinen runden Zellen mit einem stark verzweigten primären Fortsatz exprimiert. Letzterer Zelltyp kann ebenfalls anhand seiner O4-Immunopositivität identifiziert werden. Etwas später sind auch GalC-positive Oligodendrozyten nachweisbar. Zum gleichen Zeitpunkt sind GFAP-positive Gliazellenglia in enger Nachbarschaft zu NSE-positiven Zellen lokalisiert (**Abb. 11**). Während dieser Phase der terminalen Differenzierung sind erstmals 5C6-positive Mikrogliazellen in perineuronaler Lokalisation detektierbar.

Die Befunde bezüglich der Gliadifferenzierung in der mit RA stimulierten ES-Zellkultur machen deutlich, daß differenzierte neuronale Zellen mit der Expression von NSE vor einer Expression von typischen Gliamarkern in frühen Plattierungsstadien im EB beobachtet werden können (*Angelov et al., 1998*). Bei der glialen Differenzierung im EB geht eine Änderungen in der Markerexpression immer auch mit Änderungen der morphologischen Erscheinung einher. So ist in Übereinstimmung mit dem Konzept von Cameron und Rakic A2B5 der erste Marker der glialen Linie, der im EB nach RA Induktion um den zweiten bis dritten Tag n.p. exprimiert wird. A2B5-immunopositive Zellen zeichnen sich durch kurze stumpfe Fortsätze aus und können als gliale Vorläuferzellen angesehen werden, da bereits einen Tag später Zellen mit einer ähnlichen Morphologie ebenfalls RC2, einen Marker, der ebenfalls in radialen Gliazellen detektiert werden kann, exprimieren. Die Beobachtung einer frühen RC2-Expression in glialen Vorläuferzellen stimmt mit Beschreibungen aus der murinen

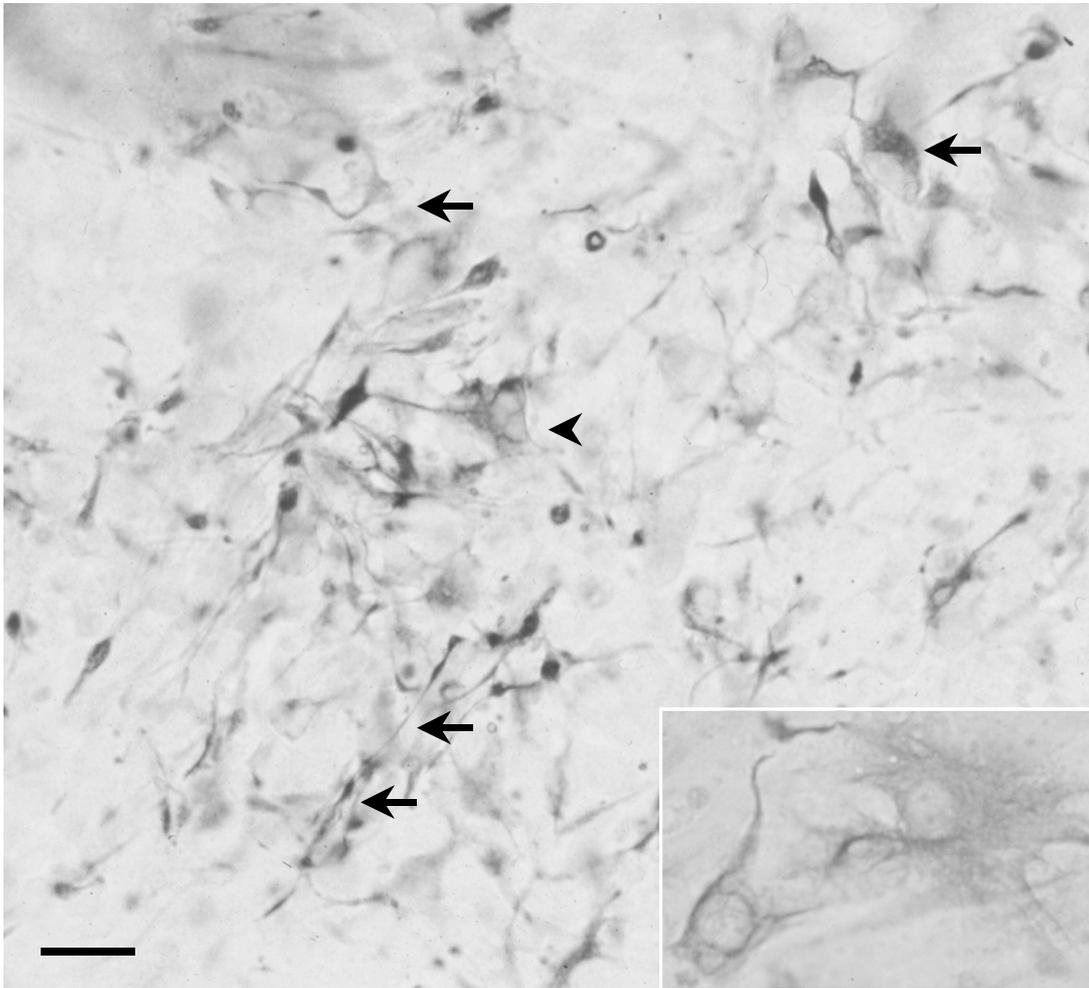


Abb. 10: Ab dem 8. Tag n.p. kann eine morphologische Veränderung der GFAP positiven Zellen detektiert werden. Dabei kommt es zu einer zahlenmässigen Abnahme GFAP-positiver radialer Gliazellen (Doppelpfeil) zugunsten von flachen und protoplasmatischen Phänotypen (Pfeile). Balken entspricht 20 $\mu$ m, im Inset 4 $\mu$ m.

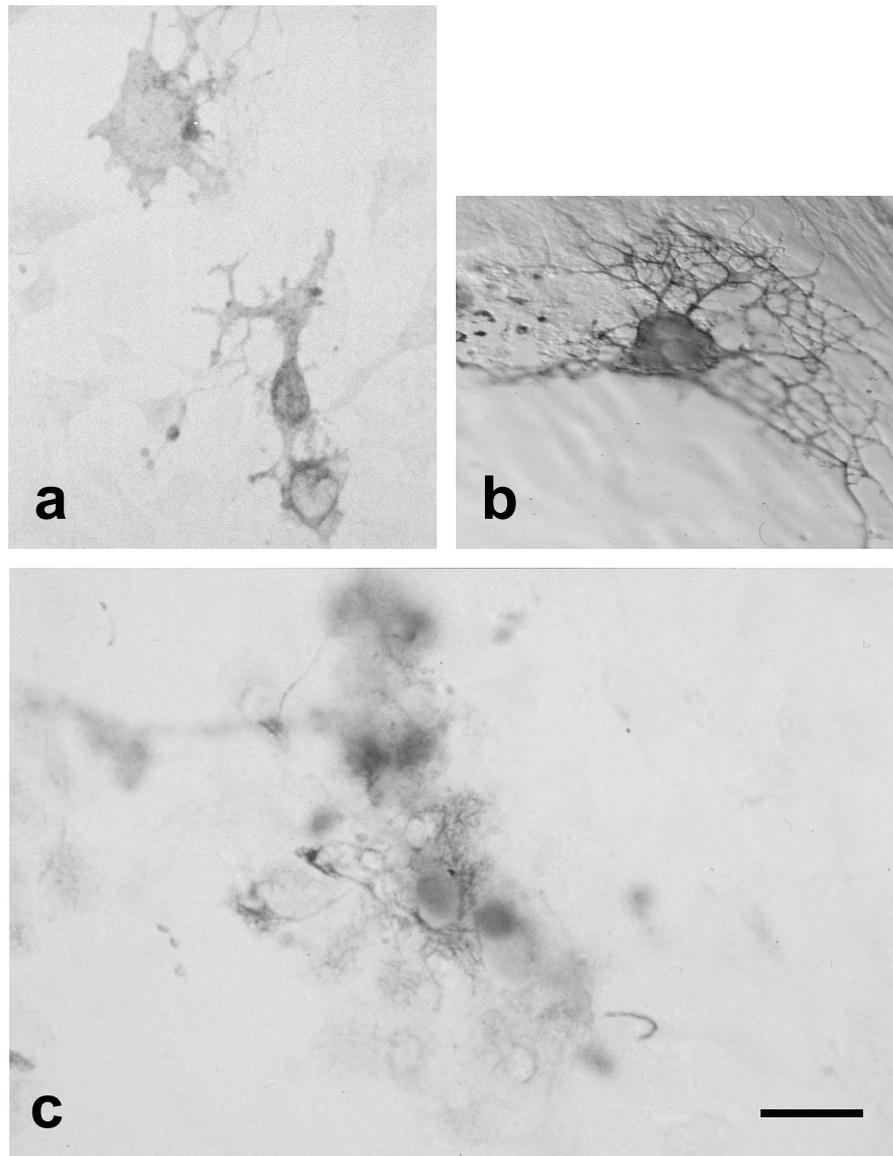


Abb. 11: Differenzierung innerhalb der glialen Linie in späteren Entwicklungsstadien. a) A2B5 Immunreaktivität in Zellen mit einzelnen starken Fortsätzen sowie in „Pfannekuchen-ähnlichen“ Zellen und in Zellen mit einem hohen Verzweigungsgrad um den Tag 8 n.p. b) Gal C immunopositive Zellen mit einem runden Soma und einzelnen stark verzweigten Fortsätzen werden ab dem Tag 12 n.p gefunden. Diese Zellen erinnern an Oligodendrozyten wie sie in der Primärkultur vorkommen. c) GFAP-positive Glia in enger Nachbarschaft zu NSE positiven Zellen (grau). Filamente der GFAP-positiven Zellen umhüllen die Perikarya der NSE-positiven Neurone, indem sie ein dichtes Netzwerk bilden. Balken entspricht 5 $\mu$ m in a, c und 2,5 $\mu$ m in b.

Embryogenese von (Misson et al., 1988) überein. Diese RC2-positiven glialen Vorläuferzellen und auch später die GFAP-positiven Gliazellen zeichnen sich durch eine klare Polarität aus, so daß in etwas fortgeschritteneren Stadien sich dann auch radial orientierte Fortsätze, die sich von der zentralen Zellmasse des EB in die Peripherie erstrecken, zu finden sind. Dies spiegelt die in vivo Situation insofern wieder, als daß während der späteren Embryogenese in vivo GFAP-positiv Zellen lange radiale Fortsätze haben, die terminal verzweigt sind. Diese radialen Gliazellen erstrecken sich von der ventrikulären Zone, der späteren ependymalen Schicht in die Peripherie, wo sie mit ihren konischen Endfüßchen die piale Oberfläche erreichen (Levitt and Rakic, 1980). Ähnlich der Situation in vivo, wo die neuronale Migration in vielen Systemen nur in Assoziation mit Astrozyten von- statten geht (Joosten and Gribnau, 1989; Smith et al., 1986), scheinen auch im EB die Axone der Neurone die radialen Gliazellen als Leitstruktur anzunehmen. Darüber hinaus fördern die Astrozyten die neuronale Überlebensrate indem sie eine Reihe von neurotrophen Faktoren sezernieren (Montgomery, 1994; Vaca and Wendt, 1992).

Die eigene Beobachtung über ein von zentral nach peripher transloziertes Soma während der fortschreitenden Differenzierung GFAP-positiver Zellen, unterstützt die auf in vivo-Befunden beruhenden Ansicht (Edwards et al., 1990), daß es sich bei radialen Gliazellen, abgesehen von der intrinsischen radialen Glia wie der Bergmann-Glia im Cerebellum, den Müller-Zellen in der Retina und den Tanyzyten der ventrikulären Zone im Hypothalamus, um eine transiente Morphologie eines frühen glialen Phänotypes handelt. Während der weiteren Gliazellendifferenzierung differenzieren sie in reife Astrozyten, so wie das ebenfalls aus in vivo-Befunden bekannt ist (Schmechel and Rakic, 1979; Levitt and Rakic, 1980; Pixley and de Vellis, 1984; Cameron and Rakic, 1991). In Übereinstimmung mit morphologischen Beobachtungen eines Verschwindens von radialen Gliazellen aus dem Kortex und eines vermehrten Auftretens von Astrozyten kann auch in späteren Plattierungsstadien der EBs eine reifungs-abhängige Verminderung radialer Zellelemente zugunsten von GFAP-positiven flachen und protoplasmatischen Gliazellen beobachtet werden. Diese morphologische Transformation der makroglialen Zellen im EB etwa am Tag 5 n.p. kann auch mit Hilfe der Expression des Oberflächenmarker CD15 bestätigt werden. In vivo wird dieses Karbohydrat der Lactoserie sowohl in radialen Gliazellen während der murinen

Neurogenese (Ashwell and Mai, 1997) als auch in Astrozyten der adulten Maus exprimiert (Bartsch and Mai, 1991).

Da weder GFAP noch CD15 geeignete Marker sind, um eine Analyse der Differenzierung in Typ 1- und Typ 2- Astrozyten durchzuführen, wird in der vorliegenden Studie A2B5 eingesetzt. A2B5 kann nicht nur als Oberflächenmarker von Vorläuferzellen der glialen Linie verwendet werden, sondern wird auch in O2A-Progenitorzellen, den Vorläuferzellen von Typ 2-Astrozyten und Oligodendrozyten, exprimiert (Cameron and Rakic, 1991). So handelt es sich wahrscheinlich bei den in späteren Plattierungsstadien der EBs auftretenden A2B5-positiven Zellen um Vorläuferzellen der O2A-Linie. Mit Hilfe der morphologischen Beurteilung kann spekuliert werden, daß kleine runde A2B5-positive Zellen mit stumpfen Fortsätzen in späteren Stadien n.p. direkt zu Astrozyten differenzieren, da dann die Bereitstellung entsprechender neurotropher Faktoren durch andere Gliazellen oder Neurone gewährleistet ist.

Ein weiterer morphologischer Phänotyp A2B5-immunreaktiver Zellen mit zahlreichen kurzen Fortsätzen hat starke Ähnlichkeit mit Zellen, die positiv für den Marker für Oligodendrozytenvorläuferzellen O4 sind (*Angelov et al., 1998*). Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesen Zellen um die später differenzierenden GalC-positiven Oligodendrozyten handelt. Bestätigt werden diese Befunde auch von (*Liu et al., 2000*), die ebenfalls die Differenzierung von Oligodendrozyten aus ES-Zellen zeigen konnten und darüber hinaus auch einen myelinisierenden Effekt dieser Zellen *in vitro* und nach Transplantation in das Rückenmark von Shiverer-Mäusen demonstrieren konnten.

Mikrogliazellen sind diejenigen Zellen in der EB Präparation, die als späteste gliale Zellpopulation um den Tag 16 n.p. (*Angelov et al., 1998*) ausgemacht werden können. Das späte Erscheinen dieser 5C6- Gal-3-positiven Mikrogliazellen in EBs stimmt mit zahlreichen experimentellen *in vivo*-Befunden überein, die ebenfalls zeigen konnten, daß im ZNS Mikrogliazellen später als Neurone und Makrogliazellen differenzieren und dabei einen Höhepunkt zwischen dem 5. und 15. postnatalen Tag erreichen (*Ashwell, 1991; Hume et al., 1983; Perry and Gordon, 1988; Perry and Gordon, 1991; Perry et al., 1985; Richardson et al., 1993*). Allerdings kann aufgrund der Pluripotenz der ES-Zellen anhand der 5C6, GAL-3-Immunopositivität im EB keine letztgültige Aussage getroffen werden, ob

es sich bei diesen Zellen tatsächlich um klassische Mikrogliazellen, wie sie im ZNS vorkommen handelt, oder um periphere Gewebsmakrophagen, wie sie in jedem Gewebetyp angetroffen werden. Die nahe antigene und funktionelle Verwandtschaft von Mikrogliazellen und Makrophagen ist seit langem wohl bekannt und hat deshalb zu der Spekulation geführt, daß Mikrogliazellen aus der Monozyten/Makrophagen Linie stammen (Jordan and Thomas, 1988; Perry and Gordon, 1991; Sedgwick et al., 1991).

Zusammenfassend kann gezeigt werden, daß innerhalb einer neural induzierten ES-Zellkultur ein ähnliches Muster von glialen Differenzierungsmarkern exprimiert wird, wie dies aus in vivo- und verschiedenen in vitro-Befunden bekannt ist. Die Gliogenese kann damit kontinuierlich von frühen Progenitorzellen bis hin zu verschiedenen differenzierten Gliazelltypen studiert werden. Es kann eine zeitliche und räumliche Beziehung zwischen dem Auftreten von radialen Gliazellen, Typ 1-Astrozyten, Oligodendrozytenvorläuferzellen sowie von Mikrogliazellen ermittelt werden. Damit bietet das in vitro System von neural differenzierten embryonalen Stammzellen hervorragende Voraussetzungen, um beispielsweise Faktoren zu analysieren, die bei der Etablierung der glialen Entwicklungslinie beteiligt sind, ohne die Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen zu vernachlässigen. Mit Hilfe dieser Faktorenanalyse könnten dann spezifische Kultivierungsprotokolle etabliert werden. Mit Hilfe dieser Protokolle könnten bestimmte gliale Populationen herausselektiert werden, die anschließend als Material für Zellersatztherapien, beispielsweise für die Behandlung von demyelinisierenden Erkrankungen, eingesetzt werden könnten.

## **2.2 Abschnitt II: Experimentelle Untersuchungen von Differenzierungsmechanismen am Modell der neural differenzierten ES-Zellen**

### **2.2.1 Die Bedeutung der NO-Synthase II für die neuronale Differenzierung in vivo und in vitro**

Neben seiner ursprünglichen Rolle als relaxierender Faktor der Endothelzelle ist NO auch als wichtiges Molekül im zentralen Nervensystem identifiziert worden, das für eine Vielzahl von Funktionen wie beispielsweise der Kontrolle des zentralen Durchblutung, der Regulation der Neurotransmittersekretion sowie der Langzeit-Potenzierung verantwortlich gemacht wird (Dawson et al., 1993; Bredt and Snyder, 1994a; Garthwaite, 1995). Eines der Zielenzyme des NO ist die lösliche Guanylatcyclase, dessen Produkt (cGMP) als „second messenger“ fungiert und eine Reihe von Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und Ionenkanälen reguliert (Phung et al., 1999). Neben seinen vielfältigen Funktionen im adulten Nervensystem wird dem NO auch eine Beteiligung an der Hirnentwicklung (Gally et al., 1990) zugeschrieben. NO wird durch das Enzym NO-Synthase synthetisiert, von der 3 Isoformen bekannt sind. Die neuronale (NOS-I)- sowie die endotheliale (NOS-III)-Isoform wurden ursprünglich in Nerven- bzw. Endothelzellen und die induzierbare NOS-II in aktivierten Makrophagen identifiziert (Bredt and Snyder, 1994a). In zahlreichen Untersuchungen konnte eine transiente Expression insbesondere der NOS-I Synthase während der ZNS-Ontogenese detektiert werden (Bruning, 1993; Dermon and Stamatakis, 1994; Samama et al., 1995; Matsumoto et al., 1993; Bredt and Snyder, 1994b; Giullì et al., 1994).

Aufbauend auf eigenen in vivo-Befunden einer transienten Expression ausschließlich der induzierbaren NOS-II Isoform während früher neuronaler Differenzierungsschritte in olfaktorischen (Arnhold et al., 1997) und vestibulocochleären Rezeptorzellen (Arnhold et al., 1999) sollte anhand von embryonalen Schnittserien des Kortex und der Retina, mit Hilfe neuronaler Primärkulturen des embryonalen Kortex sowie des ES-Zellmodells eine weitergehende und all-

gemeingültige Beteiligung von NO an der früh-embryonalen Neurogenese untersucht werden. Darüber hinaus sollte evaluiert werden, ob der NO-Effekt über den klassischen sGC-cGMP-Signalweg vermittelt wird und welche der drei Isoformen maßgeblich an Differenzierungsmechanismen beteiligt ist. Diese Untersuchungen stützen sich auf in vitro-Befunden von PC12 Zellen, mit deren Hilfe gezeigt werden konnte, daß NO als zytostatisches Agens den Übergang von der Proliferation zur Differenzierung steuert (Peunova und Enikolopov, 1995).

Für eine derartige Untersuchung bietet insbesondere das Modell der neural differenzierten ES-Zellen hervorragende Voraussetzungen, da die Differenzierung sehr früher neuronaler Stadien beobachtet bzw. beurteilt werden kann, so daß das geeignete Zeitfenster für ein Wirkoptimum der NO-Donatoren - stimulierenden bzw. der NO-Synthese-inhibierenden Faktoren getroffen werden kann.

Die in den eigenen Arbeiten dokumentierten Befunde einer ausschließlichen NOS-II-Expression in olfaktorischen- (**Arnhold et al., 1997**) und vestibulocochleären Rezeptorzellen (**Arnhold et al., 1999**) sowie im embryonalen Kortex und der Retina werden sowohl von immunhistochemischen Befunden über eine ebenfalls ausschließliche Expression der NOS-II in der kortikalen Primärkultur und in neural differenzierten ES-Zellen in frühen Differenzierungsstadien unterstützt. Darüber hinaus bestätigen die funktionellen Daten hinsichtlich eines signifikanten differenzierungshemmenden Effektes von spezifischen NOS-II-Inhibitoren die o.g. Expressionsstudien. Außerdem zeigen die funktionellen Untersuchungen einen deutlichen differenzierungsstimulierenden Effekt nach NO-Donatorapplikation. Weder in den immunhistochemischen noch in den pharmakologischen Untersuchungen mit Inhibitoren (ODQ) bzw. Agonisten (YC1) der löslichen Guanylatzyklase können Anhaltspunkte für eine Vermittlung der sGC/cGMP-Signalkaskade gefunden werden (**Arnhold et al., 2001**). Darüber hinaus kann nach NOS-II Inhibition eine Verminderung bzw. nach NO-Donatorbehandlung eine Zunahme der Kalziumkanaldichte registriert werden.

Die immunhistochemischen und funktionellen Daten unterstützen nicht nur eigene in vivo Befunden zur ausschließlichen NOS-II Expression während der Rezeptorgenese im embryonalen Nasenepithel (**Arnhold et al., 1997**) bzw. im

embryonalen Vestibulocochlearorgan der Maus (**Arnhold et al., 1999**), sondern stehen auch im Einklang mit anderen Studien, die gezeigt haben, daß in neuronalen Zellen in vitro eine Induktion der NOS-II durch proinflammatorische Zytokine aber auch durch physiologische Stimuli wie NGF bzw. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  möglich ist (Kifle et al., 1996; Ogura and Esumi, 1996; Peunova et al., 1996; Obregon et al., 1997). Sie stehen jedoch im Widerspruch zu immunhistochemischen Färbungen des embryonalen Rattenkortex, mit Hilfe derer ausschließlich der Nachweis einer Expression der konstitutiven neuronalen Isoform (NOS-I) erbracht werden kann (Black et al., 1995) und zu Befunden einer NGF induzierten Hochregulation der NOS-I in Neuronen des basalen Vorderhirns der Ratte (Holtzman et al., 1994). Allerdings zeigen Peunova et al. (1996), präzisierend an PC12 Zellen, daß in frühen Differenzierungsstadien NOS-II und erst in späteren Stadien NOS-I die vorherrschende Isoform zur NO Produktion ist.

Daß NO tatsächlich einen differenzierungsfördernden Effekt hat, zeigen die eigenen pharmakologischen Experimente unter Verwendung des NO-Donators DetaNONOate sowohl in der neuronalen Primärkultur als auch in neuronal differenzierten ES-Zellen. Hinsichtlich einer weiteren Vermittlung des NO-Signals für die neuronale Differenzierung über den sGC/cGMP-Signalweg zeigen vorliegende Befunde, daß der differenzierende Effekt des NO in keinem der beiden Zellkultursysteme über den sGC/cGMP-Signalweg weitervermittelt wird, da weder der spezifische Inhibitor der sGC noch der Einsatz des cGMP-Analogen YC-1 registrierbare Effekte auf die neuronale Differenzierung ausüben. Die Befunde decken sich damit mit den in vivo-Befunden des embryonalen Mauskortex, in denen in Korrelation zur NOS-II-Expression keine Immunpositivität für sGC bzw. cGMP nachweisbar ist (**Arnhold et al., 2001a**) und stehen im Einklang mit Befunden zur olfaktorischen und vestibulocochleären Rezeptorgenese. In den differenzierenden Rezeptorzellen kann ebenfalls kein sGC/ cGMP-Nachweis erbracht werden (**Arnhold et al., 1997; Arnhold et al., 1999**). Im Gegensatz dazu ist im adulten murinen Vestibulocochlearorgan der Nachweis für die Expression sowohl von sGC als auch von cGMP möglich, allerdings keine NOS-II Expression mehr nachweisbar. Es dominieren dann NOS-I und NOS-III (Hess et al., 1998). Die fehlende Wirkung von Mediatoren, die den sGC/ cGMP-Signalweg beeinflussen steht im Einklang mit in vitro Befunden der PC12 Zelle, in denen ebenfalls keine Mediation über den sGC/cGMP-Signalweg doku-

mentiertbar ist (Liu et al., 1997; Phung et al., 1999), so daß ein anderer, bisher unbekannter Mechanismus für die Signalweiterleitung verantwortlich sein muss. Einer dieser Mechanismen wird durch die elektrophysiologischen Befunde über eine NO-abhängige Modulation der Kalziumkanaldichte angedeutet. Sie stehen im Einklang mit anderen in vitro-Studien, die ebenfalls von einem NO-medierten Anstieg des Kalziumeinstroms bedingt durch eine vergrößerte Kalziumstromamplitude ausgehen (Ohkuma et al., 1998; Chen und Schofield , 1995).

Insgesamt unterstreichen die an der Primärkultur, an neuronal differenzierten ES-Zellen sowie die in vivo-Befunde die Funktion von NO als kritischen Mediator bei der Differenzierung von Nervenzellen. Dabei scheint die Produktion von NO in frühen Differenzierungsstadien ausschließlich der induzierbaren NOS-II vorbehalten zu sein. Darüber hinaus wird deutlich, daß der NO-Effekt unabhängig vom sGC/cGMP-Signalweg vermittelt wird, möglicherweise über eine direkte Beeinflussung der Kalziumhomöostase.

### 2.2.2 Befunde zur Glutamat induzierten Neurotoxizität an neuronal differenzierten ES-Zellen

Parallel zur Möglichkeit des Studiums physiologischer Differenzierungsmechanismen bietet die ES-Zellkultur die Möglichkeit auch pathophysiologische Veränderungen wie beispielsweise die Folgen einer Glutamatintoxikation während der neuronalen Differenzierung näher zu beleuchten.

Einer Glutamatintoxikation kommt deshalb eine so bedeutende Rolle zu, da Glutamat, als der bedeutendste exzitatorische Transmitter im ZNS von Säugern (Stone et al., 1987) physiologisch in hohen Konzentrationen vorkommt. In Energiemangelsituationen, beispielsweise bei hypoxischen oder ischämischen Zuständen (Benveniste et al., 1984; Benveniste et al., 1989), bei Hypoglykämie (Butcher et al., 1987), (Wieloch, 1985), oder bei fokaler Epilepsie (Collins and Olney, 1982), kann sich Glutamat im Extrazellularraum stark anreichern. Das in den Extrazellularraum abgegebene endogene Glutamat (Rothman and Olney, 1986), (Choi, 1987) induziert die Degeneration benachbarter Neurone, wobei die genauen Mechanismen noch nicht völlig geklärt sind. Als einer der Wirkungsmechanismen wird die direkte Schädigung der Neurone durch eine exzessive neuronale Exzitation angesehen (Olney et al., 1971). Allerdings wird auch spekuliert, daß ein glutamatbedingter starker Kalziuminflux für die Glutamatneurotoxizität verantwortlich sein könnte (Berdichevsky et al., 1987). Als weitere Möglichkeit für die Auswirkung einer Glutamatintoxikation wird als Folge einer Überaktivierung der Glutamatrezeptoren eine massive NO-Freisetzung diskutiert. Das freie hochreaktive Radikal NO mediiert eine zelluläre Toxizität durch die Schädigung von kritischen metabolischen Enzymen. Darüber hinaus kann es über eine Reaktion mit Superoxid noch aggressivere Peroxynitrite bilden (Bredt, 1999), so daß NO eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Hirnschlages, des M. Parkinson, der Chorea Huntington sowie bei der amyotrophen Lateralsklerose eingeräumt wird (Bredt, 1999).

Im einzelnen zeigen die eigenen an der neural differenzierten ES-Zellkultur erhobenen Befunde, daß der Glutamatrezeptoragonist NMDA ein bemerkenswert potentes, schnellwirkendes Neurotoxin darstellt (Arnhold et al., 1998). Nach

Applikation von 500µM NMDA können nach einem Beobachtungszeitraum von 3 Stunden bereits deutliche Schädigungen und nach weiteren 3 Stunden ein vollständiges Verschwinden der Neurone beobachtet werden. Die eingesetzte NMDA-Konzentration beträgt in diesem Ansatz maximal die Hälfte der Glutamatkonzentration von 1mM, die normalerweise in den terminalen Nervenendungen des ZNS gefunden wird (Lalonde and Cote, 1993). In Übereinstimmung mit Befunden aus der kortikalen Primärkultur (Choi et al., 1987) können bi- und multipolare Neurone bereits nach 3 Stunden nicht mehr detektiert werden. Daß auch juvenile, apolare Neurone in der EB-Kultur deutliche Degenerationerscheinungen zeigen, kann auf den längeren Beobachtungszeitraum in den hier vorgestellten Untersuchungen (bis zu 6 Stunden nach Toxingabe) zurückgeführt werden.

Insgesamt wird deutlich, daß sich mit dem Modell der ES-Zellen, in dem die Neurone mit allen Zellen ihrer Umgebung einschließlich Gliazellen in Kontakt treten können nicht nur neuronale Entwicklungsprozesse sondern auch degenerative neurotoxische Prozesse untersuchen lassen. Darüber hinaus weisen die hier dargestellten Ergebnisse eine hohe Übereinstimmung mit Befunden aus in vivo- und Primärzelluntersuchungen auf. Damit kann dieses in vitro-Modell als Ersatz- und Ergänzungsmodell zur Vermeidung von Tierversuchen herangezogen werden und erweist sich als geeignetes System um neurotoxikologische Fragestellungen zu bearbeiten, so daß es sich für ein Routine-Monitoring zur Untersuchung von embryoneurotoxikologischen Substanzen wie Ethanol, Glucocorticoiden u.ä. anbietet.

### 2.2.3 Der Einfluss einer $\beta$ 1-Integrindefizienz auf die neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen

Die Interaktion von Neuronen mit Komponenten der Extrazellulärmatrix ist eine notwendige Voraussetzung für den physiologischen Ablauf der neuronalen Entwicklung (Letourneau et al., 1994; Letourneau et al., 1992; Reichardt and Tomaselli, 1991). Dabei stellen die Integrine als transmembranäre Glykoproteine die wichtigsten Bindeglieder zwischen dem Zytoskelett und der Extrazellulärmatrix dar (Hynes, 1987; Knaus et al., 1986), denen sowohl Adhäsions- als auch Kommunikationseigenschaften zukommen (Defilippi et al., 1997; Hynes, 1992a; Hynes, 1992b; Lafrenie and Yamada, 1996; Schwarz et al., 1994).

Im Gegensatz zu anderen Zelladhäsionsmolekülen bestehen die Integrine aus nicht kovalent gebundenen heterodimeren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten (Hynes, 1992b). Man unterscheidet mindestens 8  $\beta$ - und 16  $\alpha$ -Untereinheiten, die jeweils als  $\alpha/\beta$ -Heterodimere vorliegen und mehr als 20 verschiedene Rezeptoren hervorbringen (Hynes, 1992b). Sie interagieren extrazellulär mit verschiedensten Liganden wie Substratadhäsionsmolekülen der Extrazellulärmatrix (Fibronectin, Laminin, Tenascin und Thrombospondin), Komplementfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen benachbarter Zellen (Cadherine, Immunglobuline, Integrine, Selektine). Intrazellulär sind die Integrine im Bereich der fokalen Adhäsionen mit Proteinen wie Vinculin, Talin und  $\alpha$ -Aktinin verankert (Briesewitz et al., 1993; Burridge et al., 1988; Jockusch et al., 1995) (**Abb. 12**). In Abhängigkeit von dem jeweiligen Liganden übertragen sie Signale, die sowohl Zytoskelettproteine umorganisieren als auch andere zelluläre Funktionen wie den intrazellulären Metabolismus, die Genexpression, die Proliferation, Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes, Kalziumspiegelmodulationen und Tyrosinphosphorylierung der Proteine beeinflussen (Clark et al., 1994; Clark and Brugge, 1995).

Da die homozygote Inaktivierung des  $\beta$ 1-Integrin-Gens zum Tod embryonaler Mäuse um den Implantationszeitpunkt führt (Fassler et al., 1995; Fassler and Meyer, 1995), konnten bisher keine morphologischen und funktionellen Analysen zur Bedeutung der Integrine für die Neurogenese in vivo durchgeführt wer-

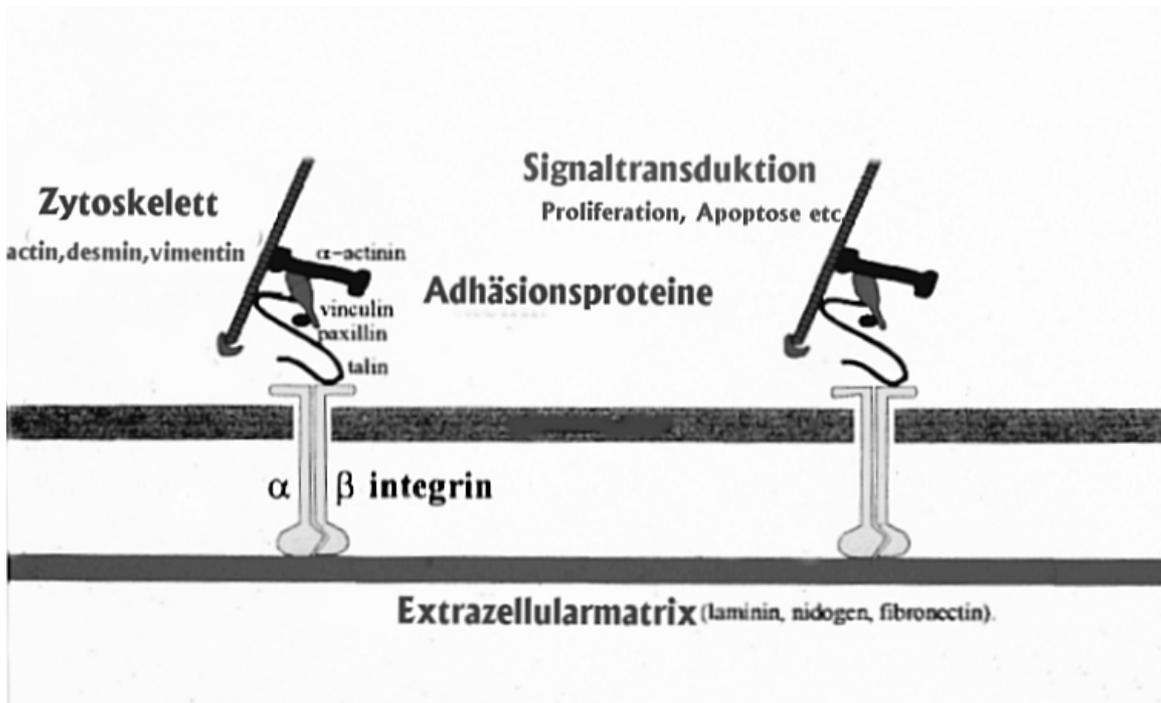


Abb. 12: Transmembranäre Lokalisation der Integrinketten und ihre Verankerung mit Komponenten der Extrazellulärmatrrix bzw. mit dem Zytoskelett.

den. So stellt die Verwendung von  $\beta$ 1-Integrin defizienten ES-Zellen die einzige Möglichkeit für eine fundierte Analyse dar. Unter Verwendung der von Fässler (Fässler et al., 1995) mit Hilfe der gene-targeting Technologie generierten ES-Zelllinie G201 konnte bereits gezeigt werden, daß eine  $\beta$ 1-Integrindefizienz zu einer deutlichen Störung sowohl der Angiogenese (Bloch et al., 1997) als auch der Kardiomyogenese (Fässler et al., 1996) führt.

Hinsichtlich einer detaillierten Analyse zur Bedeutung von  $\beta$ 1-Integrin für die neuronale Differenzierung wird im eigenen Versuchsansatz die Differenzierung von neuronalen Zellen der Wildtyp ES-Zelllinie D3 mit der Neurogenese in Zellen der  $\beta$ 1-Integrin-defizienten Zelllinie G201 verglichen. Als Untersuchungskriterien werden die neuronale Migration, die morphologische Reifung sowie die Expression von typischen neuronalen Markern herangezogen. Darüber hinaus wird die differentielle Ausstattung der Zellen mit den klassischen Neurotransmittern studiert und die Zellfortsatzlängen quantifiziert. Für die Beurteilung von Unterschieden in der neuronalen Differenzierung zwischen beiden Zelllinien werden in dem hier beschriebenen Ansatz frühe (4-6 Tage n.p.) und späte (16-18 Tage n.p.) Plattierungsstadien herangezogen (Andressen et al., 1998).

Die Befunde zeigen, analog zu den Befunden in Abschnitt I, die Ausbildung komplexer Netzwerke von funktionell gekoppelten Neuronen mit bi- und multipolarer Morphologie und deutliche Migrationstendenzen in frühen Plattierungsstadien der D3-Präparationen. Dagegen sind diese Differenzierungsprozesse in der G201-Zelllinie stark verzögert. Die Zellen zeigen eine deutlich verminderte Migration und eine eingeschränkte neuronale Differenzierung. Im Vergleich zu den Wildtypzellen kommt es zu einer verzögerten Expression der wichtigsten Neurotransmitter wie GABA und Glutamat sowie des Synapsenmarkers Synaptophysin. Die Quantifizierung des prozentualen Auftretens neuronaler Morphologien in späten Plattierungsstadien zeigt eine deutliche Dominanz apolarer Morphologien in G201 Präparationen. Dagegen ist die durchschnittliche Fortsatzlänge in den  $\beta$ 1-Integrin-defizienten Zellen im Vergleich zur Wildtypzelllinie signifikant herabgesetzt.

Da die neuronale Migration ein wichtiger Bestandteil der Differenzierung ist, bei der Verbindungen zwischen den Zellen und der Extrazellulärmatrix geknüpft und

wieder gelöst werden (Hynes, 1987), ist für die Beurteilung des Effektes einer  $\beta$ 1-Integrindefizienz in erster Linie die Migrationsfähigkeit der Zellen beider Zelllinien interessant. Die stark verminderte Migration der Neurone in der Zelllinie G201 deckt sich mit Befunden aus Versuchen mit inhibierenden Antikörpern gegen  $\beta$ 1-Integrin in denen ebenfalls eine gestörte Migration von zerebellären Neuronen (Hall et al., 1997) und Zellen der Neuralleiste gezeigt worden ist (Bronner-Fraser, 1986). Allerdings ist die Interpretation dieser Befunde im Vergleich zu denjenigen, die an der G201-Zelllinie erhoben werden können, vorsichtig einzuschätzen, da die funktionelle Blockade der Integrine durch Antikörper nebenwirkungsbehaftet ist. Antikörper werden im Stoffwechsel der Zellen abgebaut und müssen für eine kontinuierlichen Inaktivierung der Epitope regelmäßig den Zellkulturen zugeführt werden. Als Folge kommt es zu einer Aktivierung von Komplementfaktoren, die im Serum zytotoxisch wirken und mit anderen Integrinen Kreuzreaktionen zeigen (Diaz-Gonzalez et al., 1996).

Injektionsstudien bei denen  $\beta$ 1-Integrin-defiziente Zellen in die embryonale Anlage der Neuralleiste injiziert wurden, zeigen zwar eine Störung der dorsolateralen Migration und eine damit verbundene unterdrückte Melanozytendifferenzierung, die ventrale Migration der übrigen Derivate der Neuralleiste läuft dagegen im physiologischen Rahmen ab (Beauvais-Jouneau et al., 1999). Analog zu den an der ES-Zelllinie erhobenen Befunde kann durch derartige Untersuchungen gezeigt werden, daß die gestörte Migration in den Neuronen über alternative Adhäsionsmechanismen, die möglicherweise über andere Integrine vermittelt werden, kompensiert werden können (Beauvais-Jouneau et al., 1999). Allerdings müssen auch weitere kompensatorische Zelladhäsionsmechanismen in Betracht gezogen werden, da gezeigt wurde, daß die Laminin-abhängige Adhäsion zerebellärer Neurone auf zwei unabhängigen Adhäsionsmechanismen beruht (Hall et al., 1997). Neben einer  $\beta$ 1-Integrin-vermittelten Adhäsion, kommt auch eine über das HNK-1 Karbohydratepitop der Laktoserie vermittelte in Betracht. HNK-1 wird auf verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen einschließlich der Integrine exprimiert (Pesheva et al., 1987). Erst die Blockade beider Adhäsionsverfahren bewirkt eine ausgeprägte Adhäsionsinhibition (Hall et al., 1997).

Die Befunde bezüglich einer retardierten Neurogenese in den eigenen Untersuchungen stehen im Einklang zu früheren Daten, die zeigen, daß verschiedene

Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Laminin, Kollagen, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin (Letourneau et al., 1994) die Neuritenformation während der Entwicklung und Regeneration beeinflussen (Letourneau, 1975). Darüber hinaus gibt es weitere experimentelle Daten aus Untersuchungen mit blockierenden  $\beta$ 1-Integrin-Antikörpern, die auf die Bedeutung der  $\beta$ 1-Integrine als Rezeptoren der Extrazellulärmatrix (Hynes, 1992a; Reichardt and Tomaselli, 1991; Schwarz et al., 1994; Tomaselli et al., 1987) und ihre Beteiligung am Neuritenwachstum hinweisen (Tomaselli et al., 1986). Korrelierend dazu können  $\beta$ 1-Integrinkomplexe im Bereich des axonalen Wachstumskegels von Neuronen nachgewiesen werden (Sakaguchi und Radke, 1996). Tatsächlich wird die Gruppe der Integrine zu den wachstumsassoziierten intrinsischen Proteinen des Wachstumskegels gezählt, die vermutlich in die Signalübertragung integriert sind (Caroni, 1997; Grabham and Goldberg, 1997; McKerracher et al., 1996). So sind die Integrine intrazellulär an der Aktivierung verschiedener Elemente von Signalkaskaden beteiligt (Adhäsionskinasen, MAP-kinasen, GTPasen, intrazellulärer Calciumspiegel), von denen bekannt ist, daß sie das Neuritenwachstum beeinflussen (Bozzo et al., 1994; Clark and Brugge, 1995; Kater and Mills, 1991; Sarnier et al., 2000; Weeks et al., 1990). Außerdem bestehen während des axonalen Wachstums Wechselwirkungen der Integrine mit verschiedenen trophischen Faktoren (Grabham and Goldberg, 1997; Hoang and Chiba, 1998; Ohyama et al., 1997). Frühere Untersuchungen an der Zelllinie G201 bezüglich der Neurogenese haben gezeigt, daß es bei  $\beta$ 1-Integrindefizienz zwar zu einer Zunahme der neuronal differenzierten Zellen, allerdings mit gestörtem Fortsatzwachstum, kommt (Rohwedel et al., 1998b).

Trotz der beobachteten retardierten Entwicklung der überwiegenden Mehrzahl der neuronalen Zellen in den G201-ES-Zellen werden einzelne Neurone mit langen Fortsätzen sowie mit Transmitter- und Synaptophysinexpression beobachtet. Dieses könnte ebenfalls durch die kompensatorische Wirkung weiterer Adhäsionsmoleküle (Hall et al., 1997) bzw. durch eine gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren begründet sein (Sastray et al., 1996).

Insgesamt weisen die Befunde der Untersuchung auf die Bedeutung der  $\beta$ 1-Integrine für die neuronale Differenzierung hin. Da die Differenzierung lediglich verzögert ist und nicht vollständig inhibiert ist, kann auf den Einfluss kompensa-

torischer Adhäsionsmechanismen bzw. Adhäsionsmoleküle während neuronaler Differenzierungsvorgänge geschlossen werden. In diesem Zusammenhang zeigen weiterführende Studien unter Angebot von definierten Substraten wie Polyornithin/Laminin bzw. Fibronectin, daß einige der hier untersuchten Differenzierungsparameter wie die Zellmigration oder die Zellfortsatzlänge der Situation, wie sie in der Wildtypzelllinie gefunden werden, angeglichen werden können. Darüber hinaus können differenzierungsverbessernde Effekte auch durch die Applikation von kompartmentspezifischen Faktoren wie sie in Astrozyten-konditionierten Medium enthalten sind, erzielt werden. Die differenzierungsbegünstigenden Effekte bezüglich der beiden Parameter Zellmigration und Zellfortsatzlänge lassen sich sowohl durch das Angebot definierter Substrate als auch nach Zugabe von neurotrophen Faktoren und in Kombination beider Behandlungen entsprechend quantifizieren (**Abb. 13**) (*Andressen et al., 2001b*).

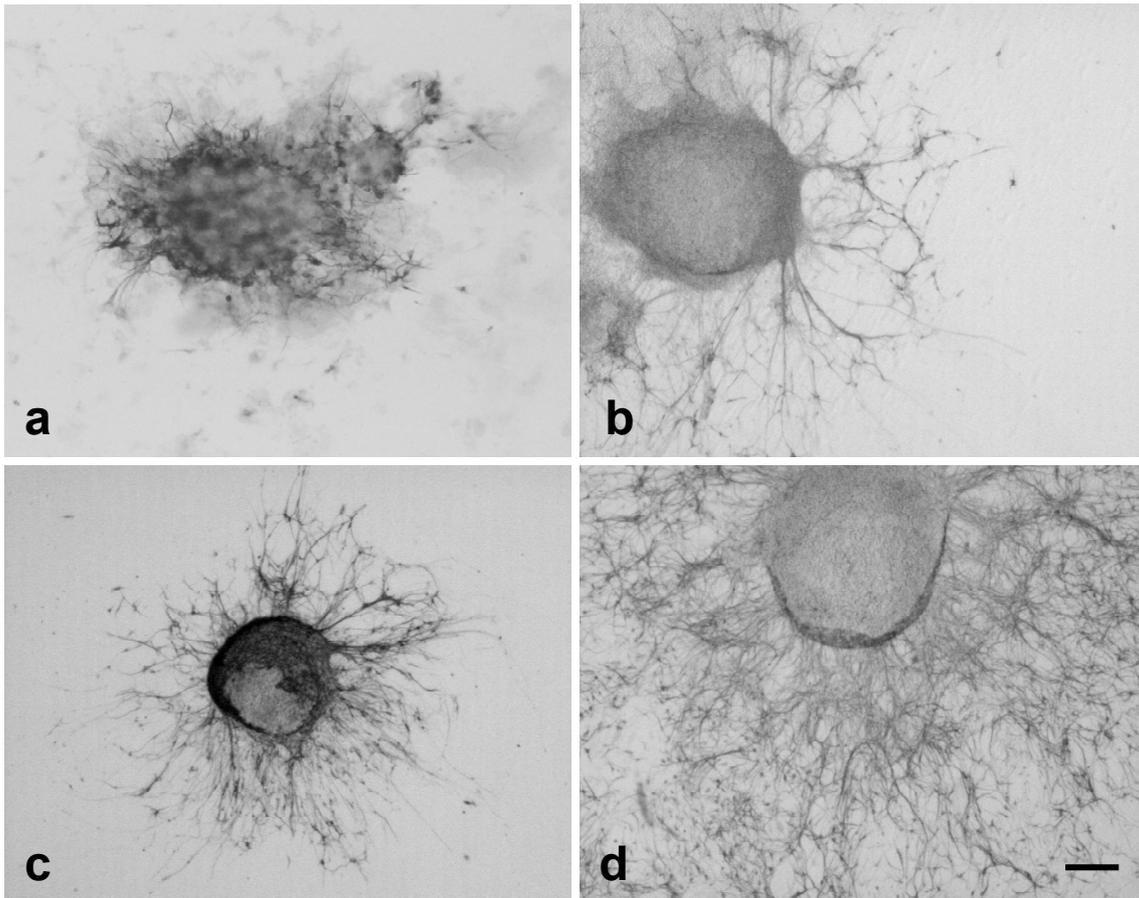


Abb. 13: Folgen der  $\beta 1$  Integrindefizienz für die neuronale Differenzierung und Kompensationsmöglichkeiten durch vergleichende Kultivierung der D3 Wildtyp ES-Zelllinie und der  $\beta 1$  Integrin defizienten Zelllinie G201 auf verschiedenen Substraten bzw. in unterschiedlichen Kulturmedien. Fehlende Neuritenbildung nach Plattierung der  $\beta 1$  Integrin defizienten ES-Zellen auf Gelatine (a), deutlich ausgeprägte Fortsatzbildung nach Plattierung von D3 Wildtyp EBs (b). Plattierung der  $\beta 1$  Integrin defizienten Zellen auf Polyornithin/Laminin in Astrozyten-konditioniertem Medium resultiert in einer deutlichen Ausbildung von neuronalen Fortsätzen und einer Netzwerkbildung (c). Unter den gleichen Bedingungen kommt es auch zu einer markanten Zunahme der neuronalen Netzwerkbildung in den D3 EBs (d). Balken entspricht 100 $\mu$ m.

### **2.3 *Abschnitt III: ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien bei neurodegenerativen Erkrankungen***

Eine Schädigung des zentralen Nervensystems, wie sie bei neurodegenerativen Erkrankungen, beispielsweise bei M. Parkinson, auftritt, hat aufgrund der begrenzten regenerativen Kapazität von Nervenzellen katastrophale Auswirkungen. Im Gegensatz zu Nervenzellen von Fischen, Amphibien oder des peripheren bzw. sich entwickelnden Nervensystems von Säugern, können sich Neurone des adulten Nervensystems nach einer Schädigung nicht erneuern. Um eine Regeneration im adulten ZNS zu erzielen, muss zunächst gewährleistet sein, daß ein geschädigtes Neuron überlebt und anschließend die Projektion der geschädigten Axone mit den ursprünglichen neuronalen Zielstrukturen wiederhergestellt wird. Sobald die Kontakte neu geknüpft sind, muss die Remyelinisierung, die Ausbildung von funktionellen Synapsen sowie die Bereitstellung von neurotrophen Faktoren erfolgen (Horner and Gage, 2000).

Da bei den meisten neurodegenerativen Erkrankungen sowohl Neurone als auch Gliazellen degenerieren, könnten durch entsprechende Zellersatztherapien geschädigte Zellen ersetzt bzw. fortschreitende Degenerationen aufgehalten werden (Boheler and Fiszman, 1999). Eines der Hauptprobleme bei Transplantationstherapien heutzutage ist der Mangel an geeigneten Spendergeweben, so daß der Bedarf insgesamt nur zu einem geringen Prozentsatz gedeckt werden kann (Platt and Lin, 1998). Grundsätzlich können als Quellen des Spendermaterials autologe Zellen des Empfängers, allogene Zellen derselben Spezies oder xenographe Zellen einer anderen Spezies eingesetzt werden. Neben retroviral immortalisierten Neuronen aus dem fetalen Gehirn (Renfranz et al., 1991; Snyder et al., 1992) stellen neurale Stammzellen sicherlich eine der vielversprechendsten Quellen für den Ersatz von Neuronen und Gliazellen im geschädigten Nervensystem dar. Dabei gibt es verschiedene Ansätze entsprechende Stammzellpopulationen zu rekrutieren. So gibt es beispielsweise die Möglichkeit neurale Stammzellen aus verschiedenen embryonalen bzw. adulten Hirnarealen zu isolieren (Cattaneo and McKay, 1990; Cattaneo and McKay, 1991; Reynolds and Weiss, 1992; Gage, 2000). Da es sich jedoch als äußerst

schwierig erweist adäquate Zellzahlen zu erhalten, die dann auch noch in ausreichender Menge in den gewünschten Zelltyp, wie beispielsweise dopaminerge Neurone für eine mögliche Therapie des M. Parkinson differenzieren, gibt es andererseits Ansätze neurale Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen zu selektionieren und unter Zugabe von EGF bzw. bFGF anzureichern (Okabe et al., 1996). Derlei gewonnene Vorläuferpopulationen können vor einer Transplantation in ein Empfängerhirn zusätzlich genetisch modifiziert werden, so daß sie Markerproteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) bzw. therapeutische Gene zur Synthese von neurotrophen Faktoren exprimieren (Flax et al., 1998; Gage et al., 1995; Liu et al., 1999). Über die reine Differenzierungskapazität von ES-Zellen in einem Empfängergewebe hinaus, wie dies in früheren Ansätzen bereits gezeigt wurde (Deacon et al., 1998); (Brüstle et al., 1999), muss allerdings gewährleistet sein, daß die Zellen in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen und darüber hinaus die Voraussetzungen geschaffen werden, daß nach Transplantation die gewünschten neuronalen Subpopulationen (beispielsweise dopaminerge Neurone zur Behandlung von M. Parkinson) generiert werden.

Um das Potential der humanen ES-Zellen besser einschätzen zu können, ist es um so bedeutender, grundlegende Arbeiten an etablierten tierischen ES-Zelllinien durchzuführen und geeignete Protokolle für die Selektionierung bestimmter Zellpopulationen zu entwickeln. Darüber hinaus muss die Differenzierung und die Integration der Zellen in einem Empfängergewebe genau charakterisiert werden, so daß Teratombildungen bzw. Abstoßungsreaktionen sicher ausgeschlossen werden können. So gibt es immer mehr Untersuchungen, in denen ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Transplantationsexperimente eingesetzt werden. Mit Hilfe des unspezifischen Induktors Retinsäure konnte gezeigt werden, daß neuronal differenzierte ES-Zellen nach Transplantation in ein Empfängerhirn für mindestens 6 Wochen überleben und ihre Differenzierungseigenschaften beibehalten (Dinsmore et al., 1996). Dabei zeigten die Zelltransplantate unterschiedliche Größen und Morphologien und es differenzierten zahlreiche Zellen mit neuralem Phänotyp, die über spezifische neurale Marker wie Neurofilament, Neuronen-spezifische Enolase, Tyrosinhydroxylase und GFAP charakterisiert werden konnten (Deacon et al., 1998).

### 2.3.1 GFP-Expression unter der Kontrolle des $\beta$ -Aktinpromoters erlaubt die Beobachtung der Differenzierung von Neuronen und Gliazellen nach Transplantation

Um die Potenz von ES-Zellen für eine Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson evaluieren zu können, muß zunächst die Differenzierungskapazität von neural selektionierten ES-Zellen nach Transplantation beurteilt werden. Für derartige Untersuchungen bietet sich insbesondere eine Zellmarkierung unter Verwendung einer Expressionskassette für das grün fluoreszierende Protein (GFP) an.

Dieses Protein der Tiefseequalle *Aequorea victoria* kann als einzigartiger in vivo-Marker zur Überwachung dynamischer Prozesse in Zellen eingesetzt werden. Es kann beispielsweise, wie hier gezeigt wird, unter der Kontrolle eines ubiquitären Promoters wie für das  $\beta$ -Aktin (Okabe et al., 1997) (**Abb. 14.**) als Marker von transplantierten Zellen in einem Empfängerhirn verwendet werden (**Arnhold et al., 2000b**) bzw. unter der Kontrolle des 2. Intron des humanen Nestin-Gens (Lothian and Lendahl, 1997) als Reportersequenz für die Selektion von neuronalen Vorläuferzellen dienen (*Andressen et al., 2001a*). GFP benötigt außer molekularem Sauerstoff keinerlei Kofaktoren für seine Synthese (Cubitt et al., 1995), es akkumuliert im Zytoplasma der Zellen und übt selbst bei starker Anreicherung keine toxischen Effekte auf die Zellen aus (Prendergast, 1999). Die physiologischen Eigenschaften der Zellen werden durch GFP nicht verändert (Kolossoff et al., 1998). Im Gegensatz zu anderen Reportergenen kann GFP somit als Marker für lebende Zellen verwendet werden.

Wenn die GFP-Expression unter der Kontrolle eines  $\beta$ -Aktinpromoters steht,

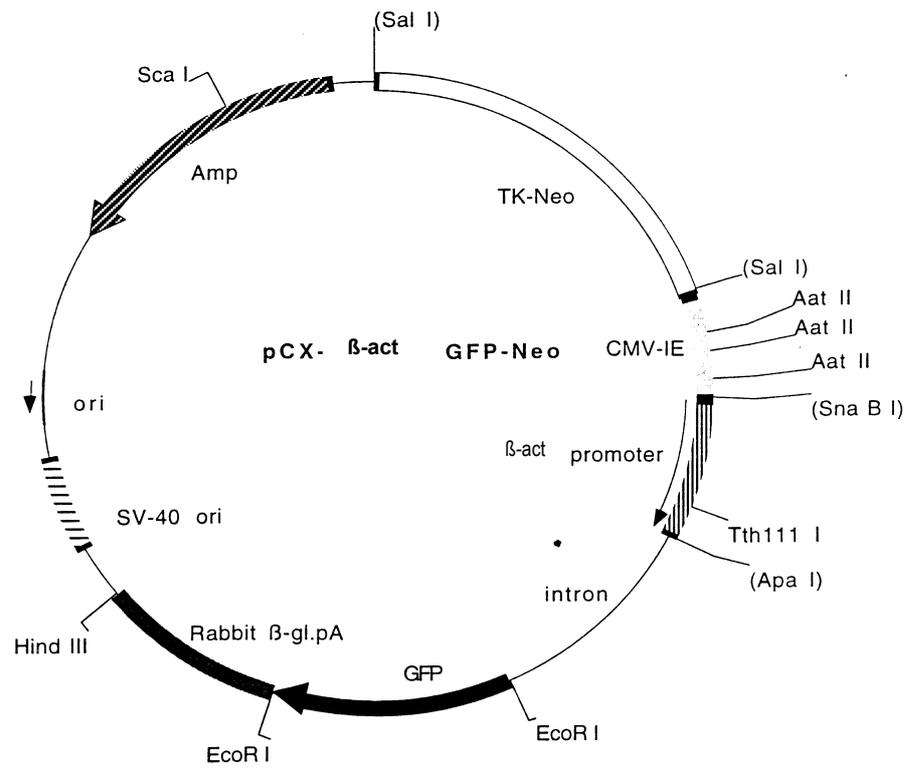


Abb. 14: Schema des  $\beta$ -Aktin Promoters und nachgeschalteter GFP Expressionskassette.

können Zellen nach Transplantation aufgrund der ubiquitären Expression von  $\beta$ -Aktin unabhängig ihres Differenzierungszustandes im Empfängergewebe identifiziert werden. In der eigenen Arbeit wird deshalb ein ES-Zellklon mit stabiler GFP-Expression unter der Kontrolle dieses Promoters verwendet (**Arnhold et al., 2000b**). Unter Einsatz desselben Konstruktes konnte eine GFP-Expression in transgenen Tieren in allen Gewebetypen einschließlich des Gehirnes jedoch nicht in Erythrozyten und Haaren gezeigt werden (Okabe et al., 1997). Mit Hilfe eines modifizierten Kultivierungsprotokolles nach (Okabe et al., 1996) (s.o.) kann eine relativ reine Population grün-fluoreszierender neuraler Vorläuferzellen angereichert werden. Allerdings ist davon auszugehen, daß unter diesen Bedingungen, analog zu den Befunden von Andressen et al. (*Andressen et al., 2001a*), in den Selektionskulturen auch bereits postmitotische Neurone und Gliazellen enthalten sind, die aufgrund der ubiquitären Zellmarkierung ebenfalls eine GFP-Expression zeigen. In Übereinstimmung mit Befunden früherer Arbeiten, in denen eine GFP-Expression unter der Kontrolle des  $\alpha$ -Aktin-Promoters zum Studium der Kardiomyogenese verwendet wurde, können keine Unterschiede hinsichtlich der Differenzierungskapazität oder funktioneller Parameter im Vergleich zur Wildtypzelllinie D3 oder anderen ES-Zelllinien beobachtet werden. Die Kultivierung in Abwesenheit von LIF führt zur Differenzierung in eine Vielzahl von Zelltypen (Keller et al., 1993; **Arnhold et al., 1998**; Robbins et al., 1990).

Transplantation der selektionierten grün-fluoreszierenden neuralen Vorläuferzellen führt im Empfängertier zur Differenzierung von reifen neuronalen Phänotypen, die mit Hilfe des maus- und neuronenspezifischen Markers Thy-1 detektiert werden können. Darüber hinaus können nach Transplantation der GFP-exprimierenden Zellen aber auch GFAP-positive Astrozyten im adulten Rattenhirn detektiert werden (**Arnhold et al., 2000b**). Damit zeigen die Befunde dieser Arbeit erstmalig, daß neural selektionierte ES-Zellen mit einer ubiquitären GFP-Expression im adulten Striatum sowohl in die neuronale als auch in die gliale Richtung differenzieren und die Zellen aufgrund ihrer GFP-Expression nach Transplantation während der Migration, ihrer Differenzierung und Integration kontinuierlich identifizierbar sind und ihr weiteres Schicksal unabhängig ihres Differenzierungszustandes in vivo verfolgt werden kann. Damit bieten neurale

Vorläuferzellen eines ES-Zellklones mit ubiquitärer GFP-Expression ideale Voraussetzungen, um den Einsatz von ES-Zellen als mögliches Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien beispielsweise bei M. Parkinson im Tierexperiment zu testen. Sie erleichtern eine Evaluation, ob mögliche Funktionsverbesserungen im pathologischen Tiermodell (Induktion parkinsonähnlicher Symptome durch eine 6OHDA Läsion, Schwarting and Huston, 1996) tatsächlich aufgrund eines echten Zellersatzes oder eher durch unspezifische Sekretion von neurotrophen Faktoren herbeigeführt wird. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß neural differenzierte ES-Zellen durch Induktion mit spezifischen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, nach Transplantation an der normalen Neurogenese teilnehmen und sogar eine Remyelinisierung in einem Tiermodell für einen humanen Myelinisierungsdefekt herbeiführen (Brustle et al., 1999).

### **2.3.2 Selektion neuraler Vorläuferzellen mit Hilfe der GFP Fluoreszenz unter spezifischer Kontrolle des Thymidinkinase-Nestin Promoters**

Da nach Einsatz des modifizierten Selektionsprotokoll nach Okabe et al., 1996 in den Kulturen neben einer großen Zahl von neuralen Vorläuferzellen noch ein relativ großer Prozentsatz differenzierter postmitotischer Nerven- und Gliazellen enthalten ist, muss im Rahmen einer Entwicklung für Zellersatztherapien ein weiterer Selektionierungsschritt für die Generierung einer wirklich reinen Population neuraler Vorläuferzellen stattfinden. Für eine solche Selektion werden im eigenen Ansatz, analog zu einer ZNS-spezifischen Expression des lacZ-Reportergens unter Regulation des zweiten Introns des Nestin-Gens in Mäusen (Josephson et al., 1998; Lothian and Lendahl, 1997; Yaworsky and Kappen, 1999; Zimmerman et al., 1994) ES-Zellen mit einer Expressionskassette für das grün fluoreszierenden Protein (GFP) unter Regulation des Thymidinkinase-Promoters in Verbindung mit dem zweiten Intron des humanen Nestin-Gens transfiziert (*Andressen et al., 2001a*) (**Abb. 15**).

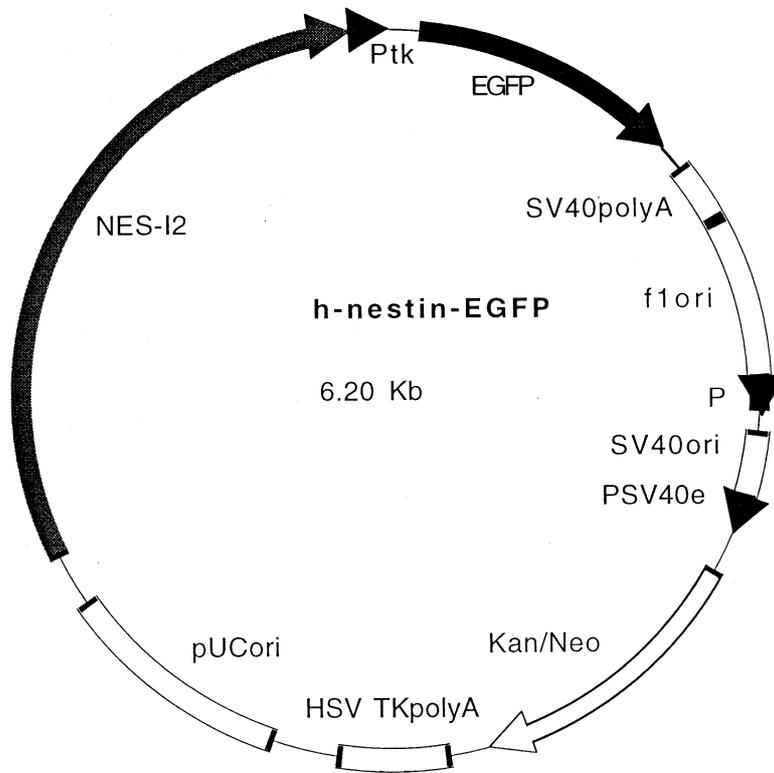


Abb. 15: Thymidinkinasepromoter mit dem zweiten Intron des humanen Nestingens und nachgeschaltete GFP Expressionskassette.

Dabei dient die Untersuchung der spezifischen GFP-Expression in Nestin-positiven neuronalen Vorläuferzellen zur Etablierung eines erleichterten Monitorings einer Selektionierung die ser Zellen als Voruntersuchung auf eine mögliche Zellsortierung durch ein präparatives fluorescence-activated-cell-sorting (FACS).

Nestin gehört zur Familie der Intermediärfilamentproteine, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. Es ist während der Embryonalentwicklung der Ratte erstmals um E7.5 in der Neuralplatte nachweisbar (Lothian and Lendahl, 1997). Um E11 findet man es in den pialen Ausläufern der radialen Gliazellen (Marvin et al., 1998) und um E12 sind 98-100% der Zellen des Neuralrohrs nestin-positiv. Danach treten in den ventralen Abschnitten des Neuralrohrs, parallel zum Auftreten der ersten postmitotischen Neurone, vereinzelt nestin-negative Zellen in Erscheinung (Frederiksen and McKay, 1988; Hockfield and McKay, 1985; Lendahl et al., 1990). Die Nestin-Expression wird demnach am Übergang von der proliferierenden neuroepithelialen Stammzelle zur postmitotisch differenzierten Nerven- und Gliazelle herunterreguliert. Somit ist Nestin nur noch in wenigen Zellen des adulten ZNS nachweisbar. Da Nestin während der Embryonalentwicklung beispielsweise auch in Vorläuferzellen von Herz- (Kachinsky et al., 1995) und Skelettmuskulatur (Sejersen and Lendahl, 1993; Wroblewski et al., 1997; Kachinsky et al., 1994; Carlsson et al., 1999), in Endothelzellen (Mokry and Nemecek, 1998), im peripheren Nervensystem und im Hoden bei Maus und Ratte (Dahlstrand et al., 1995; Hockfield and McKay, 1985; Stemple and Anderson, 1992) sowie in verschiedenen neuroepithelialen Tumoren (Gliome und Glioblastome) des ZNS (Dahlstrand et al., 1992a; Tohyama et al., 1992; Dahlstrand et al., 1992b) exprimiert wird, jedoch das zweite Intron des Nestin-Gens die Expression von Reportergenen auf neurale Vorläuferzellen beschränkt (Zimmerman et al., 1994), wird in der eigenen Untersuchung zum Nachweis neuraler Vorläuferzellen eine GFP-Expression unter die Kontrolle des Thymidinkinase-Promoters in Verbindung mit dem zweiten Intron des humanen Nestin-Gens gestellt (*Andressen et al., 2001a*).

Das eigene Vorgehen steht im Gegensatz zu weiteren Ansätzen, bei denen die Selektion neuraler Vorläuferzellen mittels eines Neomycin-Resistenzgens unter der Kontrolle des Sox2-Gens, das ähnlich wie Nestin im Rahmen der frühen

Neurogenese exprimiert wird (Li et al., 1998). Bei diesem Modell kann die Genexpression allerdings nicht über ein Reporter-gen sichtbar gemacht werden und deshalb sind die Selektion und der Ablauf der neuronalen Differenzierung nicht zu beobachten. Es besteht darüber hinaus noch die Möglichkeit der Selektionierung mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) unter Regulation des  $T\alpha 1$ -Tubulin-Promoters (Wang et al., 1998). Der Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch die Expression von  $T\alpha 1$ -Tubulin auch in frühen postmitotischen Neuronen (Gloster et al., 1999; Wang et al., 1998). Das ist für den Einsatz bei Zellersatztherapien ein einschränkendes Kriterium, da die Selektion über den Thymidinkinase-Promoter in Verbindung mit dem zweiten Intron des humanen Nestin-Gens auch eine Differenzierung von Astroglia und Oligodendroglia ermöglicht (Hockfield and McKay, 1985; Messam et al., 2000).

In Verbindung mit einem modifizierten Differenzierungsprotokoll für neurale Vorläuferzellen nach Okabe et al. (1996) unter Zusatz von astrozyten-konditioniertem Medium erweist sich in den eigenen Untersuchungen die GFP-Expression unter der Kontrolle des 2. Introns des humanen Nestin-Gens in den zwei untersuchten Zellklonen durchaus spezifisch für undifferenzierte neurale Vorläuferzellen mit einer maximalen Anreicherung während 7 Tagen im Selektionsmedium. Der Anteil der GFP-exprimierenden Zellen an der zellulären Gesamtpopulation beträgt 95%. Daß es sich dabei tatsächlich um proliferierende neurale Vorläuferzellen handelt, kann mit Hilfe der Immunhistochemie für Nestin, dem Marker für neurale Vorläuferzellen (Hockfield and McKay, 1985), detektiert werden (Andressen et al., 2001a). Diese Beobachtungen hinsichtlich der Proliferation bzw. Anreicherung neuraler Vorläuferzellen, ihrer Migration und Differenzierung, stimmen mit eigenen Befunden, die an der D3-Wildtypzelllinie erhoben wurden bzw. mit denen von Okabe et al. (1996), völlig überein. Sie deuten darauf hin, daß die GFP-Expressions-kassette in den genetisch modifizierten ES-Zellklonen keinerlei negativen Einfluss auf die Differenzierungskapazität in die neurale Linie hat. Immunzytochemisch können am 7. Tag n.p. in den Selektionskulturen weder undifferenzierte ES-Zellen noch Vorläuferzellen von Myozyten (alpha-Aktin-positive Kardiomyozyten) oder andere nicht-neurale Zelltypen (beispielsweise PECAM positive Endothelzellen) nachgewiesen werden. Allerdings werden einige postmitotische Neurone und differenzierte Gliazellen detektiert. Das Vorkommen zahlreicher postmitotischer Neurone und einiger

Gliazellen in den selektionierten Zellpräparationen bestätigt die Notwendigkeit einer weitergehenden Selektion zur Gewinnung einer reinen Population neuraler Vorläuferzellen für Zellersatztherapien und zeigt den dynamischen Prozess zwischen Selektion und weiterer Differenzierung unter diesen Kulturbedingungen.

Analog zu den fluoreszenzmikroskopischen bzw. immunhistochemischen Befunden kann mit Hilfe der FACS-Analyse die größte Zahl von Zellen mit hohen Fluoreszenzintensitäten nach der siebentägigen Selektionsperiode nachgewiesen werden. Der Anteil dieser Zellen fällt bis zum elften Tag im Selektionsmedium und zunehmender Differenzierung wieder deutlich ab. Damit stimmen diese Befunde auch mit den Beobachtungen von Okabe et al. (1996) überein, wonach das Maximum an neuralen Vorläuferzellen am 6. bis 8. Tag nach Plattieren festzustellen ist.

Werden die neuralen Vorläuferzellen nach der siebentägigen Selektionsperiode in ein Medium replattiert (B27-Supplement enthaltenes Neurobasalmedium), das speziell für die Förderung der Differenzierung neuraler Zellen entwickelt wurde, kann ein zunehmender Anteil MAP2-positiver Neurone, GFAP positiver Astrozyten sowie O4 positiver Oligodendrozyten detektiert werden. Im Gegensatz dazu nimmt der Prozentsatz der nestin-positiven Vorläuferzellen immer weiter ab.

Nach intrazerebraler Transplantation zeigen die nach dem ITSF-Protokoll angereicherten GFP-exprimierenden neuralen Vorläuferzellen des Nestin-Klones, analog zu neural differenzierten Zellen des  $\beta$ -Aktinklones, die Kapazität zur Differenzierung in reife Thy-1-positive Neurone und GFAP-positive Gliazellen. Die GFP-markierten neuralen Vorläuferzellen zeichnen sich somit durch eine gute Integrations- und Differenzierungsfähigkeit in einem Gewebe mit geringer Plastizität aus, wie es im adulten Rattenhirn vorliegt. Anhand ihrer Grünfluoreszenz können die transfizierten neuralen Vorläuferzellen nach intrazerebraler Transplantation zumindestens solange identifiziert werden bis die Differenzierung in die jeweilige Linie (neuronal bzw. glial) weiter fortschreitet. Insgesamt erscheint die Integration der vorselektionierten Zellen besser als die von nicht-selektionierten undifferenzierten ES-Zellen, was in früheren Transplantationsstudien gezeigt werden konnte. In diesen Experimenten resultierte die Trans-

plantation der ES-Zellen in der Bildung von Zellaggregaten mit differenzierten Neuronen im Zentrum des Sphäroids (Deacon et al., 1998).

Darüber hinaus kann mit dem hier vorgestellten Ansatz erstmals gezeigt werden, daß die neuralen Vorläuferzellen eine gute Integrationstendenz auch in Lokalisationen außerhalb der normalerweise neurale Vorläuferzellen beherbergenden subventrikulären Zone zeigen (Alvarez-Buylla and Lois, 1995).

Summarisch belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Spezifität der nestin-gesteuerten GFP-Expression im ES-Modell. Es kann keine ektope GFP-Expression festgestellt werden, die letztendlich eine Tumorbildung induzieren könnte. Die Untersuchungen zeigen, daß die Eigenschaften und die neurale Differenzierungskapazität der ES-Zellen durch die Transfektion und die damit verbundene GFP-Expression nicht beeinflusst werden. Nestin ist der einzige bekannte Marker, der das Potential zur Selektion einer reinen Population selbsterneuernder proliferierender neuraler Vorläuferzellen als Ausgangsmaterial für eine Zellersatztherapie besitzt. Trotz seines komplexen Expressionsmusters hat Nestin somit entscheidende Vorteile im Vergleich zu anderen früh-exprimierten neuralen Markern. Darüber hinaus werden über die leichte Identifizierung neuraler Vorläuferzellen mit Hilfe der GFP-Expression Untersuchungen erleichtert, die sich mit dem Studium von Differenzierungsmechanismen für das neuronale bzw. gliale Kommitment beschäftigen.

### 2.3.3 Differenzierung und Anreicherung Tyrosinhydroxylase-positiver Neuronen aus ES-Zellen

Um im Rahmen von Zellersatztherapien für M. Parkinson degenerierte dopaminerge Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra zu ersetzen, müssen mit Hilfe weiterer in vitro-Untersuchungen geeignete Differenzierungsprotokolle entwickelt werden, die die Differenzierung von selektionierten Vorläuferzellen in dopaminerge Neurone fördern. Neural differenzierte Vorläuferzellen aus ES-Zellen besitzen nämlich im Gegensatz zu neuronalen Vorläuferzellen, die beispielsweise aus dem embryonalen Striatum oder Hippocampus isoliert werden, keinerlei Kommitment für eine Differenzierungsrichtung (Lundberg et al., 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß sie in die dopaminerge Richtung differenzieren können (Lee et al., 2000b).

Mit Hilfe des Retinsäureprotokolls differenziert zwar eine Vielzahl von neuronalen Phänotypen, wie dies in Abschnitt I der vorliegenden Arbeit gezeigt worden ist (Andressen et al., 1998; **Arnhold et al., 1998**), allerdings ist die Ausbeute TH- positiver (dopaminerger) Neurone unter den hier vorgestellten Differenzierungsbedingungen, wie die eigenen Befunde an der D3-ES-Zelllinie (Klinz et al., 2000) und die von Dinsmore et al., 1998 am E14TG2a ES-Zellklon zeigen, eher gering. Dagegen kann der Prozentsatz TH-positiver Neurone durch Modifikationen der Signalkaskade mit dem Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) LY294002 deutlich erhöht werden (**Arnhold et al., 2001c**). Die Entwicklung dieses PI-3-Kinase-Inhibitors (Vlahos et al., 1994) hat das Studium der funktionellen Rolle der PI-3-Kinase bei der Signaltransduktion verschiedener Zelltypen erleichtert. So gibt es Befunde, die belegen, daß die Aktivierung des PI-3-Kinase-Signalweges das Überleben hippocampaler Neurone (Matsuzaki et al., 1999), von Motoneuronen (Dolcet et al., 1999) und von mesencephalen Neuronen (Sawada et al., 2000) unterstützt.

Obwohl gezeigt werden konnte, daß die PI-3-Kinase die Differenzierung von funktionierenden embryonalen Kardiomyozyten aus ES-Zellen in vitro unter-

drückt (Klinz et al., 2000), gibt der hier vorgestellte Ansatz einen klaren Hinweis darauf, daß die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu TH-positiven Neuronen unter negativer Kontrolle des PI-3-Kinasesignalweges steht. Möglicherweise inhibiert ein Faktor, der entweder von den ES-Zellen selber synthetisiert wird oder im Kultivierungsmedium enthalten ist, die Differenzierung von TH-positiven Neuronen. Diese Inhibition könnte durch die Aktivität des PI-3-Kinaseinhibitors LY294002 rückgängig gemacht werden. Im Gegensatz zu einer Induktion über Retinsäure fördert die Inhibition der PI-3-Kinase das Langzeitüberleben TH-positiver Neurone.

Die effiziente Selektionierung von TH-positiven Neuronen in vitro kann wertvolle Informationen über den Zeitverlauf der Differenzierung sowie über die morphologischen und funktionellen Eigenschaften dieser Zellen liefern, ohne die Notwendigkeit neurale Zellkulturen aus Embryonen herstellen zu müssen. Es müssen jedoch noch weitergehende Arbeiten folgen, die zum Ziel haben eine Anreicherung von neuronalen Vorläuferzellen durch entsprechende Selektionsprotokolle mit neurotrophen Faktoren bzw. Zytokinen zu bewirken, die dann nach Transplantation in ein Empfängerhirn präferentiell zu TH-positive Neuronen und damit in die dopaminerge Richtung differenzieren.

### 2.3.4 Der therapeutische Einsatz von ES-Zellen am Tiermodell für die Makuladegeneration

Nachdem gezeigt werden konnte, daß neural differenzierte ES-Zellen in vitro zu einer hochreinen Population angereichert werden können und sich nach Transplantation in ein Empfängerhirn integrieren und ortstypisch differenzieren, soll die regenerative Potenz dieser Zellen in einem Tiermodell für eine degenerative Erkrankung getestet werden. Ein geeignetes Modell für ein spontan degenerierendes Gewebe stellt die Royal College of Surgeons-Ratte (RCS-Ratte) dar. Sie ist ein Tiermodell für die altersbedingte Makuladegeneration des Menschen, bei dem es durch eine genetische Mutation postnatal zu einer progredienten Degeneration retinaler Pigmentepithel-(RPE) Zellen, gefolgt von einer Degeneration der Photorezeptoren kommt. Außerdem kann eine Vaskulopathie beobachtet werden (Sheedlo et al., 1991).

Für die Untersuchung wurden wie im vorherigen Abschnitt, ES-Zellen des Klonen, bei dem die GFP-Expression unter der Kontrolle des zweiten Intron des humanen Nestin-Genes steht, eingesetzt. Bei der Befunderhebung fällt auf, daß die neural selektierten ES Zellen nach Transplantation in den subretinalen Spalt der RCS-Ratten eindeutig mittels ihrer GFP-Expression identifizierbar sind. In Langzeituntersuchungen kann die Migration dieser Zellen in die Retina beobachtet werden. Während es bei den Kontrolltieren nach zwei Monaten zu einer vollständigen Degeneration der Photorezeptorzellen kommt, können nach Transplantation der ES-Zellen mehrere Reihen erhaltener Photorezeptoren in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle detektiert werden. Diese erhaltenen Photorezeptorzellen weisen elektronenmikroskopisch eine diesen Zellen entsprechende, normale Ultrastruktur auf (Arnhold et al., 2000c; Schraermeyer et al., 2001). Ähnliche Daten wie die in der vorliegenden Arbeiten vorgestellten, konnten auch durch eine Transplantation von RPE-Zellen in den subretinalen Spalt erhoben werden (Gouras and Lopez, 1989; Li and Turner, 1988; Gouras et al., 1989; Sheedlo et al., 1992). Da die Photorezeptoren nach RPE-Zelltransplantation selbst in einiger Entfernung der Injektionsstelle erhalten waren, ist davon auszugehen, daß neben einer verbesserten Phagozytoseaktivität,

möglicherweise auch trophische Faktoren, die von den RPE-Zellen produziert werden, einen positiven Einfluss auf das Überleben der Photorezeptoren haben (Sheedlo et al., 1992). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, daß die Applikation des basischen Fibroblasten Wachstumsfaktors (Faktorovich et al., 1992) bzw. eine Scheinoperation (Silverman and Hughes, 1990) vorübergehend eine Degeneration der Photorezeptorzellen aufhalten.

Die subretinale (Lawrence et al., 2000; Rezai et al., 1997; Schraermeyer et al., 1999) und intrachoroidale (Schraermeyer et al., 1999) Transplantationen von Irispigmentepithelzellen (IPE Zellen)(Rezai et al., 1997; Schraermeyer et al., 1999) und Schwann Zellen (Lawrence et al., 2000) und wie in dieser Arbeit gezeigt, auch ES-Zellen haben einen positiven Einfluss auf die Überlebensrate von Photorezeptorzellen in RCS Ratten. Da mittlerweile bekannt ist, daß sowohl RPE als auch IPE Zellen zahlreiche neurotrophe Faktoren sezernieren (Kociok et al., 1998), ist zu vermuten, daß die induzierten „rescue“-Effekte nach ES-Zelltransplantation ebenfalls vor allem auf einer Freisetzung von neurotrophen Faktoren beruhen. Dabei sind die Faktoren, die für das Überleben der Photorezeptoren in RCS-Ratten verantwortlich sind, noch nicht eindeutig identifiziert. Es wird allerdings vermutet, daß ein Teil der beteiligten Faktoren von den RPE-Zellen selber produziert wird, deren Freisetzung durch eine Zelltransplantation eingeleitet wird. Andererseits kann auch davon ausgegangen werden, daß die ES-Zellen eine ganze Reihe von Faktoren produzieren, da sie in Kultur auch ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren in eine Vielzahl von Zellen differenzieren (s.o.). Da der genetisch-bedingte Retinadefekt der RCS-Ratten auch von einer ausgeprägten Vaskulopathie begleitet wird, könnten auch Wachstumsfaktoren, die die Vaskulogenese fördern, für den positiven Effekt nach ES-Zelltransplantation und der damit verbundenen gestoppten Photorezeptordegeneration verantwortlich sein. Diese Sichtweise wird von Beobachtungen über eine spontane Differenzierung von ES-Zellen verschiedener Linien zu Endothelzellen gestützt.

Die Erkenntnis, daß auch neural differenzierte ES-Zellen die Potenz haben geeignete Faktoren zu produzieren, um eine fortschreitende Zelldegeneration zu stoppen, würde ihren therapeutischen Einsatz bei M. Parkinson, zusätzlich zur Zellersatztherapie, noch wertvoller machen. Bei diesem Krankheitsbild könnte durch eine kontinuierliche Sekretion von neurotrophen Faktoren die fortschrei-

tende Degeneration dopaminerger Neurone aufgehalten werden, und darüber hinaus können transplantierte Zellen durch die Sekretion von neuroprotektiven Faktoren vor Untergang geschützt werden.

### 3 Zusammenfassung

---

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift stellt die Differenzierungskapazität von murinen embryonale Stammzellen in die neurale Richtung und deren Verwendung für embryologische Studien zur Neurogenese dar. Darüber hinaus wird ihre Eignung als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien bei neurodegenerativen Erkrankungen modellhaft charakterisiert.

Der erste Abschnitt der Arbeit befasst sich mit der Differenzierungspotenz der Zellen zu Neuronen, unter Verwendung eines FCS- und Retinsäure-haltigem Kultivierungsmediums. Die entstehende Vielfalt von differenzierenden neuronalen Phänotypen wird immunzytochemisch beurteilt und die Neurone zusätzlich anhand ihres Rezeptorprofils elektrophysiologisch charakterisiert. Die Übertragbarkeit der Befunde auf die *in vivo*- Situation wird ausführlich diskutiert. Aufgrund der immensen Bedeutung des Kalziumhaushaltes während der neuronalen Differenzierung, wird die Ausstattung der differenzierenden Neurone hinsichtlich spannungsabhängiger Kalziumkanäle sowie Kalzium-bindender Proteine untersucht. Dabei kann eine differenzierungsabhängige Verschiebung des Kalziumkanalmusters beobachtet werden. Dagegen ist die Expression der verschiedenen Kalzium-bindenden Proteine auf bestimmte neuronale Reifungsstadien beschränkt. Die Untersuchung der Differenzierungskapazität in Makro- und Mikrogliazellen ergänzt die Charakterisierung der neuronalen Differenzierung. In einem experimentellen Abschnitt wird die Bedeutung der NO-Synthase II für die neuronale Differenzierung im Vergleich mit der neuronalen kortikalen Primärkultur demonstriert. Die Daten korrelieren mit *in vivo* Befunden zur Rezeptorgenese der Riechschleimhaut und des Vestibulocochlearorgans sowie mit Befunden der Kortex- und Retinaentwicklung an embryonalen Schnittserien. Parallel dazu kann mit Hilfe einer Knock-out- ES-Zelllinie, die eine Defizienz für das  $\beta 1$ -Integrin aufweist, die Notwendigkeit dieses transmembranären Moleküles für eine regelgerecht ablaufende Differenzierung gezeigt werden. Schließlich demonstriert der experimentelle Abschnitt unter Verwendung von pharmakologischen Methoden und mit Hilfe einer Vitalbeobachtung der differenzierenden Neurone den Effekt einer Glutamatintoxikation auf sich entwickelnde Nervenzel-

len. Somit eignet sich das Modell der embryonalen Stammzellen auch für die Evaluation von neurotoxikologischen Fragestellungen.

Im letzten Abschnitt der Arbeit steht die modellhafte Verwendung von neural differenzierten ES-Zellen für Zellersatztherapien im Vordergrund. Dazu werden neural selektionierte ES-Zellen eines Klonen mit einer GFP-Expression unter der Kontrolle des  $\beta$ -Aktinpromoters, zur sicheren Identifizierung der Zellen im Empfängergewebe, in das Striatum adulter Ratten transplantiert und ihre Differenzierungskapazität in Neurone und Gliazellen beurteilt. Unter Verwendung eines weiteren ES-Zellklones, bei dem die GFP-Expression unter der Kontrolle des 2. Introns des humanen Nestingens steht, kann die Selektion der neuronalen Vorläuferzellen in vitro unmittelbar verfolgt werden. Damit wird die Voraussetzung für eine nahezu 100%ige Aufreinigung der Zellen mittels präparativen FACS geschaffen. Hinsichtlich einer zukünftigen Therapie des M. Parkinson unter Verwendung von humanen ES-Zellen kann anhand dieser murinen Zelllinie, eine Erhöhung des Prozentsatzes dopaminerger Neurone mit Hilfe eines Inhibitors der Phosphatidylinositolkinase 3 in Kultur modellhaft dargestellt werden.

Tatsächlich wird anhand des Tiermodelles für die humane Makuladegeneration gezeigt, daß neural differenzierte ES-Zellen im Rahmen einer Zellersatztherapie die Verbesserung des krankhaften Zustandes bewirken. Als Lieferanten protektiver neurotropher Faktoren halten sie fortschreitende Degenerationsprozesse auf.

## 4 Summary

---

The presented thesis deals with the differentiation capacity of murine embryonic stem cells into the neural lineage and their use in embryological studies regarding neurogenesis as well as their use as cell material for cell replacement therapies in neurodegenerative diseases.

In the first section of this work the differentiation potency of ES-cells into the neuronal direction in a cultivation medium supplemented with FCS and retinoic acid is elucidated. The variety of differentiating neuronal phenotypes is evaluated immunocytochemically and additionally generated neurons are characterized electrophysiologically regarding their receptor profiles for the main excitatory and inhibitory neurotransmitters. The conveyance of the obtained data to the situation in vivo is thoroughly discussed. In order to meet the extraordinary significance of the calcium homeostasis during neuronal differentiation the occurrence of voltage gated calcium channels as well as calcium binding proteins is investigated. While there is a differentiation-dependent shift in the expression of calcium channels subtypes in all maturation stages, the expression of calcium binding proteins is restricted to certain neuronal subtypes.

In addition to the thorough characterisation of neuronal differentiation in the ES-cell system, the differentiation capacity into macro- and microglial cells is evaluated. In the following experimental section the significance of the NO-synthase II for neuronal differentiation is studied in comparison with the primary culture of embryonic cortex neurons. Furthermore, data are correlated with in vivo findings concerning olfactory and vestibulocochlear receptorogenesis as well as with findings from cortical and retinal development.

In a second experimental approach using a  $\beta$ 1-integrin knock out ES-cell line, the necessity of this transmembrane molecule is demonstrated for an undisturbed neuronal differentiation by modulating cell-cell and cell-matrix interaction.

Additionally, using computer assisted vital microscopy the effect of a glutamate intoxication is evaluated on differentiated neurons, indicating the use of ES-cells as a model system for neuro- and embryo-toxicological studies, respectively.

In the final section of this work the use of neurally differentiated embryonic stem cells for cell replacement therapies is evaluated. In order to determine the dif-

differentiation capacity of neurally selected stem cells in vivo after transplantation, cells of an ES-cell clone with a GFP-expression under the control of a  $\beta$ -actin promoter are applied. Thus, transplanted cells can be unequivocally identified after stereotactic injection into the adult striatum and furthermore, their differentiation into neurons and astrocytes can be investigated immunocytochemically. With a second genetically modified ES-cell clone with a GFP expression under the control of the second intron of the human nestin gene, the selection of neural precursor cells can be directly monitored in vitro. This procedure offers a tool to obtain a near pure population of neural precursor cells by preparative flow cytometry (FACS). In order to prepare neural differentiated ES-cells for a specific treatment of Parkinson`s Disease it is demonstrated how the percentage of TH positive dopaminergic neurons can be markedly increased by incubating the cells in the presence of the inhibitor for the phosphatidylinositolkinase 3. Finally, an actual benefit using neurally selected ES-cells is shown in an animal model for the human macula degeneration. In this model neurally selected ES-cells have the potency to delay continuous degeneration processes by supplying neuroprotective factors.

## 5 Literaturverzeichnis

---

1. Alonso,A., Breuer,B., Steuer,B., and Fischer,J. (1991). The F9-EC cell line as a model for the analysis of differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 389-397.
2. Alvarez-Buylla,A. and Lois,C. (1995). Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* **13**, 263-272.
3. Andressen,C., Blümcke,I., and Celio,M.R. (1993). Calcium-binding proteins: selective markers for nerve cells. *Cell Tissue Res.* **271**, 181-208.
4. Andressen,C., **Arnhold,S.**, Puschmann,M., Bloch,W., Hescheler,J., Fassler,R., and Addicks,K. (1998). Beta1 integrin deficiency impairs migration and differentiation of mouse embryonic stem cell derived neurons. *Neurosci. Lett.* **251**, 165-168.
5. Andressen,C., Stöcker,E., Klinz,F.-J., Lenka,N., Hescheler,J., **Arnhold,S.**, and Addicks,K. (2001a). Nestin specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells* **19**, 419-424.
6. Andressen,C., Kruttwig,K., Meissner,G., Fassler,R., **Arnhold,S.**, and Addicks,K. (2001b). Migration and differentiation of  $\beta$ -1 integrin deficient ES cell derived neurones influenced by components of the extracellular matrix. *Anat. Anz.* **183 Suppl.** 31.
7. Andrews,P.W. (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS* **106**, 158-167.
8. Angelov,D.N., **Arnhold,S.**, Andressen,C., Grabsch,H., Puschmann,M., Hescheler,J., and Addicks,K. (1998). Temporospacial relationships between macroglia and microglia during in vitro differentiation of murine stem cells. *Dev. Neurosci* **20**, 42-51.
9. Aosaki,T. and Kasai,H. (1989). Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch.* **414**, 150-156.
10. **Arnhold,S.**, Andressen,C., Bloch,W., Mai,J.K., and Addicks,K. (1997). NO synthase-II is transiently expressed in embryonic mouse olfactory receptor neurons. *Neurosci. Lett.* **229**, 165-168.
11. **Arnhold,S.**, Andressen,C., Hescheler,J., and Addicks,K. (1998). Mikrokineamatographische Neurodifferenzierungs- und Neurotoxizitätsstudien an einem in vitro Modell unter Verwendung embryonaler Stammzellen der Maus. *Altex* **15**, 59-66.
12. **Arnhold,S.**, Klinz,F.J., Bloch,W., Hess,A., Andressen,C., and Addicks,K. (1999). Selective expression of the NOS II isoform during mouse vestibulo-cochlear receptorgeneration. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 2187-2193.
13. **Arnhold,S.**, Andressen,C., Angelov,D.N., Vajna,R., Volsen,S.G., Hescheler,J., and Addicks,K. (2000a). Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 201-212.
14. **Arnhold,S.**, Lenartz,D., Kruttwig,K., Klinz,F.J., Kolossov,E., Hescheler,J., Sturm,V., Andressen,C., and Addicks,K. (2000b). Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into

- Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J. Neurosurg.* 93, 1026-1032.
15. **Arnhold,S.**, Kruttwig,K., Andressen,C., Schraermeyer,U., and Addicks,K. (2000c). Rescue-Effekte nach Transplantation von GFP markierten neural differenzierten embryonalen Stammzellen in RCS Ratten. *Anat. Anz.* 182 *Suppl.*, 145.
  16. **Arnhold,S.**, Faßbender,A., Kruttwig,K., Löhning,B., Andressen,C., and Addicks,K. (2001a). Der Einfluß von NOS-II auf die neuronale Differenzierung in vitro. *Anat. Anz.* 183 *Suppl.*, 73.
  17. **Arnhold,S.**, Fassbender,A., Kruttwig,K., Klinz,F.-J., Andressen,C., and Addicks,K. (2001b). NOS-II promotes neuronal differentiation as demonstrated in vivo and in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* *eingereicht.*
  18. **Arnhold,S.**, Klinz,F.-J., Kruttwig,K., Siodlaczek,J., Kolossov,E., Hescheler J., Andressen,C., and Addicks,K. (2001c). Efficient generation of tyrosine hydroxylase-positive neurons from murine embryonic stem cells in vitro by an inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Histochem. J.* *eingereicht.*
  19. Ashwell,K. (1991). The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 58, 1-12.
  20. Ashwell,K.W. and Mai,J.K. (1997). Developmental expression of the CD15-epitope in the brainstem and spinal cord of the mouse. *Anat. Embryol. (Berl)* 196, 13-25.
  21. Bagutti,C., Wobus,A.M., Fassler,R., and Watt,F.M. (1996). Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev. Biol.* 179, 184-196.
  22. Baimbridge,K.G., Celio,M.R., and Rogers,J.H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15, 303-308.
  23. Bain,G., Kitchens,D., Yao,M., Huettner,J.E., and Gottlieb,D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.* 168, 342-357.
  24. Bain,G., Ray,W.J., Yao,M., and Gottlieb,D.I. (1996). Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 691-694.
  25. Bartsch,D. and Mai,J.K. (1991). Distribution of the 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine (FAL) epitope in the adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 263, 353-366.
  26. Bean B.P. (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 367-384.
  27. Beauvais-Jouneau,A., Pla,P., Bernex,F., Dufour,S., Salamero,J., Fassler,R., Panthier,J.J., Thiery,J.P., and Larue,L. (1999). A novel model to study the dorso-lateral migration of melanoblasts. *Mech. Dev.* 89, 3-14.
  28. Bentivoglio,M. and Mazzarello,P. (1999). The history of radial glia. *Brain Res. Bull.* 49, 305-315.
  29. Benveniste,H., Drejer,J., Schousboe,A., and Diemer,N.H. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43, 1369-1374.
  30. Benveniste,H., Jorgensen,M.B., Sandberg,M., Christensen,T., Hagberg,H., and Diemer,N.H. (1989). Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on

- glutamate release and intact innervation from CA3. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 9, 629-639.
31. Berdichevsky,E., Munoz,C., Riveros,N., Cartier,L., and Orrego,F. (1987). Neuropathological changes in the rat brain cortex in vitro: effects of kainic acid and of ion substitutions. *Brain Res.* 423, 213-220.
  32. Black,S.M., Bedolli,M.A., Martinez,S., Bristow,J.D., Ferriero,D.M., and Soifer,S.J. (1995). Expression of neuronal nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain. *Neurobiol. Dis.* 2, 145-155.
  33. Blank,R.S., Swartz,E.A., Thompson,M.M., Olson,E.N., and Owens,G.K. (1995). A retinoic acid-induced clonal cell line derived from multipotential P19 embryonal carcinoma cells expresses smooth muscle characteristics. *Circ. Res.* 76, 742-749.
  34. Bloch,W., Forsberg,E., Lentini,S., Brakebusch,C., Martin,K., Krell,H.W., Weidle,U.H., Addicks,K., and Fassler,R. (1997). Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J. Cell Biol.* 139, 265-278.
  35. Bode-Greuel,K.M. and Singer,W. (1988). Developmental changes of the distribution of binding sites for organic Ca<sup>2+</sup>-channel blockers in cat visual cortex. *Exp. Brain Res.* 70, 266-275.
  36. Boheler,K.R. and Fiszman,M.Y. (1999). Can exogenous stem cells be used in transplantation? *Cells Tissues. Organs* 165, 237-245.
  37. Bozzo,C., Defilippi,P., Silengo,L., and Tarone,G. (1994). Role of tyrosine phosphorylation in matrix-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.* 214, 313-322.
  38. Bradley,A., Evans,M., Kaufman,M.H., and Robertson,E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.
  39. Braun,K. (1990). Calcium-binding proteins in avian and mammalian central nervous system: localization, development and possible functions. *Prog. Histochem. Cytochem.* 21, 1-64.
  40. Bredt,D.S. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31, 577-596.
  41. Bredt,D.S. and Snyder,S.H. (1994a). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63:175-95, 175-195.
  42. Bredt,D.S. and Snyder,S.H. (1994b). Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 13, 301-313.
  43. Briesewitz,R., Kern,A., and Marcantonio,E.E. (1993). Ligand-dependent and -independent integrin focal contact localization: the role of the alpha chain cytoplasmic domain. *Mol. Biol. Cell* 4, 593-604.
  44. Bronner-Fraser,M. (1986). Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev. Biol.* 115, 44-55.
  45. Bruning,G. (1993). NADPH-diaphorase histochemistry in the postnatal mouse cerebellum suggests specific developmental functions for nitric oxide. *J. Neurosci. Res.* 36, 580-587.
  46. Brustle,O., Jones,K.N., Learish,R.D., Karram,K., Choudhary,K., Wiestler,O.D., Duncan,I.D., and McKay,R.D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial pre-

- cursors: a source of myelinating transplants [see comments]. *Science* 285, 754-756.
47. Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:487-525, 487-525.
  48. Butcher, S.P., Sandberg, M., Hagberg, H., and Hamberger, A. (1987). Cellular origins of endogenous amino acids released into the extracellular fluid of the rat striatum during severe insulin-induced hypoglycemia. *J. Neurochem.* 48, 722-728.
  49. Cameron, R.S. and Rakic, P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4, 124-137.
  50. Carlsson, L., Li, Z., Paulin, D., and Thornell, L.E. (1999). Nestin is expressed during development and in myotendinous and neuromuscular junctions in wild type and desmin knock-out mice. *Exp. Cell Res.* 251, 213-223.
  51. Caroni, P. (1997). Intrinsic neuronal determinants that promote axonal sprouting and elongation. *Bioessays* 19, 767-775.
  52. Cattaneo, E. and McKay, R. (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347, 762-765.
  53. Cattaneo, E. and McKay, R. (1991). Identifying and manipulating neuronal stem cells. *Trends Neurosci.* 14, 338-340.
  54. Catterall W. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 493-531.
  55. Celio, M.R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375-475.
  56. Cepko, C. (1988). Immortalization of neural cells via oncogene transduction. *Trends Neurosci.* 11, 6-8.
  57. Chanas-Sacre, G., Rogister, B., Moonen, G., and LePrince, P. (2000). Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation [In Process Citation]. *J. Neurosci. Res.* 61, 357-363.
  58. Chen C. and Schofield G. (1995). Nitric oxide donors enhance Ca<sup>2+</sup> currents and blocked noradrenaline-induced Ca<sup>2+</sup> current inhibition in rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 482, 521-531.
  59. Choi, B.H. (1981). Radial glia of developing human fetal spinal cord: Golgi, immunohistochemical and electron microscopic study. *Brain Res.* 227, 249-267.
  60. Choi, D.W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369-379.
  61. Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., and Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7, 357-368.
  62. Clark, E.A. and Brugge, J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.
  63. Clark, E.A., Trikha, M., Markland, F.S., and Brugge, J.S. (1994). Structurally distinct disintegrins contortrostatin and multisquamatin differentially regulate platelet tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269, 21940-21943.
  64. Collins, R.C. and Olney, J.W. (1982). Focal cortical seizures cause distant thalamic lesions. *Science* 218, 177-179.
  65. Coppola, T., Waldmann, R., Borsetto, M., Heurteaux, C., Romey, G., Mattei, M.G., and Lazdunski, M. (1994). Molecular cloning of a murine N-type calcium chan-

- nel alpha 1 subunit. Evidence for isoforms, brain distribution, and chromosomal localization. *FEBS Lett.* 338, 1-5.
66. Cubitt,A.B., Heim,R., Adams,S.R., Boyd,A.E., Gross,L.A., and Tsien,R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20, 448-455.
  67. Dahl,D., Crosby,C.J., Sethi,J.S., and Bignami,A. (1985). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Comp Neurol.* 239, 75-88.
  68. Dahlstrand,J., Collins,V.P., and Lendahl,U. (1992a). Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 52, 5334-5341.
  69. Dahlstrand,J., Zimmerman,L.B., McKay,R.D., and Lendahl,U. (1992b). Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 2), 589-597.
  70. Dahlstrand,J., Lardelli,M., and Lendahl,U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 84, 109-129.
  71. Dani,C., Smith,A.G., Dessolin,S., Leroy,P., Staccini,L., Villageois,P., Darimont,C., and Ailhaud,G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J. Cell Sci.* 110, 1279-1285.
  72. Dawson,V.L., Dawson,T.M., Bartley,D.A., Uhl,G.R., and Snyder,S.H. (1993). Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* 13, 2651-2661.
  73. Deacon,T., Dinsmore,J., Costantini,L.C., Ratliff,J., and Isacson,O. (1998). Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp. Neurol.* 149, 28-41.
  74. Defilippi,P., Venturino,M., Gulino,D., Duperray,A., Boquet,P., Fiorentini,C., Volpe,G., Palmieri,M., Silengo,L., and Tarone,G. (1997). Dissection of pathways implicated in integrin-mediated actin cytoskeleton assembly. Involvement of protein kinase C, Rho GTPase, and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 21726-21734.
  75. Delhaise,F., Bralton,V., Schuurbiens,N., and Dessy,F. (1996). Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *Eur. J. Morphol.* 34, 237-243.
  76. Dermon,C.R. and Stamatakis,A. (1994). Laminar pattern of NADPH-diaphorase activity in the developing avian cerebellum. *Neuroreport* 5, 1941-1945.
  77. Diaz-Gonzalez,F., Forsyth,J., Steiner,B., and Ginsberg,M.H. (1996). Trans-dominant inhibition of integrin function. *Mol. Biol. Cell* 7, 1939-1951.
  78. Dietzel,I.D. (1995). Voltage-gated ion currents in embryogenesis. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2, 293-308.
  79. Dinsmore,J., Ratliff,J., Deacon,T., Pakzaban,P., Jacoby,D., Galpern,W., and Isacson,O. (1996). Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant.* 5, 131-143.
  80. Divac,I., Fonnum,F., and Storm-Mathisen,J. (1977). High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature* 266, 377-378.
  81. Doetschman,T.C., Eistetter,H., Katz,M., Schmidt,W., and Kemler,R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: for-

- mation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **87**:27-45., 27-45.
82. Dolcet,X., Egea,J., Soler,R.M., Martin-Zanca,D., and Comella,J.X. (1999). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J. Neurochem.* **73**, 521-531.
  83. Dourado,M.M. and Dryer,S.E. (1992). Changes in electrical properties of chick ciliary ganglion neurones during embryonic development. *J. Physiol.* **449**, 411-428.
  84. Drab,M., Haller,H., Bychkov,R., Erdmann,B., Lindschau,C., Haase,H., Morano,I., Luft,F.C., and Wobus,A.M. (1997). From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J.* **11**, 905-915.
  85. Dubois-Dalcq,M. (1987). Characterization of a slowly proliferative cell along the oligodendrocyte differentiation pathway. *EMBO J.* **6**, 2587-2595.
  86. Edwards,M.A., Yamamoto,M., and Caviness,V.S., Jr. (1990). Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience* **36**, 121-144.
  87. Edwards,M.K. and McBurney,M.W. (1983). The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Dev. Biol.* **98**, 187-191.
  88. Enderlin,S., Norman,A.W., and Celio,M.R. (1987). Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat. Embryol. (Berl)* **177**, 15-28.
  89. Evans,M.J. and Kaufman,M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
  90. Faktorovich,E.G., Steinberg,R.H., Yasumura,D., Matthes,M.T., and LaVail,M.M. (1992). Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J. Neurosci.* **12**, 3554-3567.
  91. Farber,J.L. (1981). The role of calcium in cell death. *Life Sci.* **29**, 1289-1295.
  92. Fassler,R. and Meyer,M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* **9**, 1896-1908.
  93. Fassler,R., Pfaff,M., Murphy,J., Noegel,A.A., Johansson,S., Timpl,R., and Albrecht,R. (1995). Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J. Cell Biol.* **128**, 979-988.
  94. Fassler,R., Rohwedel,J., Maltsev,V., Bloch,W., Lentini,S., Guan,K., Gullberg,D., Hescheler,J., Addicks,K., and Wobus,A.M. (1996). Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J. Cell Sci.* **109**, 2989-2999.
  95. Ffrench-Constant,C., Miller,R.H., Kruse,J., Schachner,M., and Raff,M.C. (1986). Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve. *J. Cell Biol.* **102**, 844-852.
  96. Flax,J.D., Aurora,S., Yang,C., Simonin,C., Wills,A.M., Billingham,L.L., Jendoubi,M., Sidman,R.L., Wolfe,J.H., Kim,S.U., and Snyder,E.Y. (1998). Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat. Biotechnol.* **16**, 1033-1039.

97. Fraichard,A., Chassande,O., Bilbaut,G., Dehay,C., Savatier,P., and Samarut,J. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* *108*, 3181-3188.
98. Frassoni,C., Bentivoglio,M., Spreafico,R., Sanchez,M.P., Puelles,L., and Fairren,A. (1991). Postnatal development of calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the thalamus of the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *58*, 243-249.
99. Frederiksen,K. and McKay,R.D. (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J. Neurosci.* *8*, 1144-1151.
100. Freed,M.A. (1992). GABAergic circuits in the mammalian retina. *Prog. Brain Res.* *90:107-31.*, 107-131.
101. Friedrich,G. and Soriano,P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* *5*, 1513-1523.
102. Fujita,Y., Mynlieff,M., Dirksen,R.T., Kim,M.S., Niidome,T., Nakai,J., Friedrich,T., Iwabe,N., Miyata,T., Furuichi,T., and . (1993). Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron* *10*, 585-598.
103. Gage,F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* *287*, 1433-1438.
104. Gage,F.H., Coates,P.W., Palmer,T.D., Kuhn,H.G., Fisher,L.J., Suhonen,J.O., Peterson,D.A., Suhr,S.T., and Ray,J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 11879-11883.
105. Gally,J.A., Montague,P.R., Reeke,G.N., Jr., and Edelman,G.M. (1990). The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3547-3551.
106. Garthwaite,J. (1995). Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.* *18*, 51-52.
107. Gearing,D.P., Gough,N.M., King,J.A., Hilton,D.J., Nicola,N.A., Simpson,R.J., Nice,E.C., Kelso,A., and Metcalf,D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J* *6*, 3995-4002.
108. Giffin,K., Solomon,J.S., Burkhalter,A., and Nerbonne,J.M. (1991). Differential expression of voltage-gated calcium channels in identified visual cortical neurons. *Neuron* *6*, 321-332.
109. Giulli,G., Luzi,A., Poyard,M., and Guellaen,G. (1994). Expression of mouse brain soluble guanylyl cyclase and NO synthase during ontogeny. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *81*, 269-283.
110. Gloster,A., El Bizri,H., Bamji,S.X., Rogers,D., and Miller,F.D. (1999). Early induction of Talpha1 alpha-tubulin transcription in neurons of the developing nervous system. *J. Comp Neurol.* *405*, 45-60.
111. Gossler,A., Joyner,A.L., Rossant,J., and Skarnes,W.C. (1989). Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* *244*, 463-465.
112. Gough,N.M., Williams,R.L., Hilton,D.J., Pease,S., Willson,T.A., Stahl,J., Gearing,D.P., Nicola,N.A., and Metcalf,D. (1989). LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.* *1*, 281-288.
113. Gouras,P. and Lopez,R. (1989). Transplantation of retinal epithelial cells [editorial]. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *30*, 1681-1683.

114. Gouras,P., Lopez,R., Kjeldbye,H., Sullivan,B., and Brittis,M. (1989). Transplantation of retinal epithelium prevents photoreceptor degeneration in the RCS rat. *Prog. Clin. Biol. Res.* *314*:659-71, 659-671.
115. Grabham,P.W. and Goldberg,D.J. (1997). Nerve growth factor stimulates the accumulation of beta1 integrin at the tips of filopodia in the growth cones of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* *17*, 5455-5465.
116. Guan,K., Furst,D.O., and Wobus,A.M. (1999). Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Eur. J Cell Biol.* *78*, 813-823.
117. Hall,H., Carbonetto,S., and Schachner,M. (1997). L1/HNK-1 carbohydrate- and beta 1 integrin-dependent neural cell adhesion to laminin-1. *J. Neurochem.* *68*, 544-553.
118. Hendry,S.H. and Jones,E.G. (1991). GABA neuronal subpopulations in cat primary auditory cortex: co-localization with calcium binding proteins. *Brain Res.* *543*, 45-55.
119. Henion,P.D. and Weston,J.A. (1994). Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations. *Dev. Biol.* *161*, 243-250.
120. Hess,A., Bloch,W., Arnhold,S., Andressen,C., Stennert,E., Addicks,K., and Michel,O. (1998). Nitric oxide synthase in the vestibulocochlear system of mice. *Brain Res.* *813*, 97-102.
121. Hilaire,C., Diochot,S., Desmadryl,G., Baldy-Moulinier,M., Richard,S., and Valmier,J. (1996). Opposite developmental regulation of P- and Q-type calcium currents during ontogenesis of large diameter mouse sensory neurons. *Neuroscience* *75*, 1219-1229.
122. Hill,D.P. and Robertson,K.A. (1998). Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* *2*, 183-190.
123. Hille,B. (1992). G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* *9*, 187-195.
124. Hoang,B. and Chiba,A. (1998). Genetic analysis on the role of integrin during axon guidance in *Drosophila*. *J. Neurosci.* *18*, 7847-7855.
125. Hockfield,S. and McKay,R.D. (1985). Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* *5*, 3310-3328.
126. Hofmann,F., Biel,M., and Flockerzi,V. (1994). Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*:399-418, 399-418.
127. Hollands,P. (1997). Comparative stem cell biology. *Int. J. Dev. Biol.* *41*, 245-254.
128. Holtzman,D.M., Kilbridge,J., Bredt,D.S., Black,S.M., Li,Y., Clary,D.O., Reichardt,L.F., and Mobley,W.C. (1994). NOS induction by NGF in basal forebrain cholinergic neurones: evidence for regulation of brain NOS by a neurotrophin. *Neurobiol. Dis.* *1*, 51-60.
129. Horner,P.J. and Gage,F.H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* *407*, 963-970.
130. Hume,D.A., Perry,V.H., and Gordon,S. (1983). Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J. Cell Biol.* *97*, 253-257.

131. Hynes,R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-554.
132. Hynes,R.O. (1992b). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
133. Hynes,R.O. (1992a). Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 621-624.
134. Jockusch,B.M., Bubeck,P., Giehl,K., Kroemker,M., Moschner,J., Rothkegel,M., Rudiger,M., Schluter,K., Stanke,G., and Winkler,J. (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:379-416, 379-416.
135. Jones-Villeneuve,E.M., McBurney,M.W., Rogers,K.A., and Kalnins,V.I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* 94, 253-262.
136. Jones,O.T., Bernstein,G.M., Jones,E.J., Jugloff,D.G., Law,M., Wong,W., and Mills,L.R. (1997). N-Type calcium channels in the developing rat hippocampus: subunit, complex, and regional expression. *J. Neurosci.* 17, 6152-6164.
137. Joosten,E.A. and Gribnau,A.A. (1989). Astrocytes and guidance of outgrowing corticospinal tract axons in the rat. An immunocytochemical study using anti-vimentin and anti-glial fibrillary acidic protein. *Neuroscience* 31, 439-452.
138. Jordan,F.L. and Thomas,W.E. (1988). Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res.* 472, 165-178.
139. Josephson,R., Muller,T., Pickel,J., Okabe,S., Reynolds,K., Turner,P.A., Zimmer,A., and McKay,R.D. (1998). POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development* 125, 3087-3100.
140. Kachinsky,A.M., Dominov,J.A., and Miller,J.B. (1994). Myogenesis and the intermediate filament protein, nestin. *Dev. Biol.* 165, 216-228.
141. Kachinsky,A.M., Dominov,J.A., and Miller,J.B. (1995). Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 843-847.
142. Kamei,Y., Inagaki,N., Nishizawa,M., Tsutsumi,O., Taketani,Y., and Inagaki,M. (1998). Visualization of mitotic radial glial lineage cells in the developing rat brain by Cdc2 kinase-phosphorylated vimentin. *Glia* 23, 191-199.
143. Kanzaki,M., Nobusawa,R., Mogami,H., Yasuda,H., Kawamura,N., and Kojima,I. (1995). Production of activin A and follistatin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 108, 11-16.
144. Kater,S.B. and Mills,L.R. (1991). Regulation of growth cone behavior by calcium. *J. Neurosci.* 11, 891-899.
145. Keller,G., Kennedy,M., Papayannopoulou,T., and Wiles,M.V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell Biol.* 13, 473-486.
146. Kifle,Y., Monnier,J., Chesrown,S.E., Raizada,M.K., and Nick,H.S. (1996). Regulation of the manganese superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase gene in rat neuronal and glial cells. *J. Neurochem.* 66, 2128-2135.
147. Knaus,P., Betz,H., and Rehm,H. (1986). Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J. Neurochem.* 47, 1302-1304.
148. Knoblich,J.A. (1997). Mechanisms of asymmetric cell division during animal development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 833-841.
149. Kociok,N., Heppekausen,H., Schraermeyer,U., Esser,P., Thumann,G., Grisanti,S., and Heimann,K. (1998). The mRNA expression of cytokines and their re-

- ceptors in cultured iris pigment epithelial cells: a comparison with retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 67, 237-250.
150. Kolossov,E., Fleischmann,B.K., Liu,Q., Bloch,W., Viatchenko-Karpinski,S., Manzke,O., Ji,G.J., Bohlen,H., Addicks,K., and Hescheler,J. (1998). Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* 143, 2045-2056.
  151. Komuro,H. and Rakic,P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95-97.
  152. Kordower,J.H., Freeman,T.B., Snow,B.J., Vingerhoets,F.J., Mufson,E.J., Sanberg,P.R., Hauser,R.A., Smith,D.A., Nauert,G.M., Perl,D.P., and . (1995). Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 332, 1118-1124.
  153. Kretsinger,R.H. and Nakayama,S. (1993). Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. IV. Exon shuffling did not determine the domain compositions of EF-hand proteins. *J. Mol. Evol.* 36, 477-488.
  154. Lafrenie,R.M. and Yamada,K.M. (1996). Integrin-dependent signal transduction. *J. Cell Biochem.* 61, 543-553.
  155. Lalonde,R. and Cote,C. (1993). Behavioral effects of non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 79-84.
  156. Lawrence,J.M., Sauve,Y., Keegan,D.J., Coffey,P.J., Hetherington,L., Gorman,S., Whiteley,S.J., Kwan,A.S., Pheby,T., and Lund,R.D. (2000). Schwann cell grafting into the retina of the dystrophic RCS rat limits functional deterioration. *Royal College of Surgeons. Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 518-528.
  157. Lee,J.C., Mayer-Prosche,M., and Rao,M.S. (2000a). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30, 105-121.
  158. Lee,S.H., Lumelsky,N., Studer,L., Auerbach,J.M., and McKay,R.D. (2000b). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 18, 675-679.
  159. Lendahl,U. and McKay,R.D. (1990). The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci.* 13, 132-137.
  160. Lendahl,U., Zimmerman,L.B., and McKay,R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
  161. Letourneau,P.C. (1975). Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev. Biol.* 44, 92-101.
  162. Letourneau,P.C., Condic,M.L., and Snow,D.M. (1992). Extracellular matrix and neurite outgrowth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 625-634.
  163. Letourneau,P.C., Condic,M.L., and Snow,D.M. (1994). Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J. Neurosci.* 14, 915-928.
  164. Levison,S.W. and Goldman,J.E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10, 201-212.
  165. Levitt,P. and Rakic,P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp Neurol.* 193, 815-840.

166. Li, L.X. and Turner, J.E. (1988). Transplantation of retinal pigment epithelial cells to immature and adult rat hosts: short- and long-term survival characteristics. *Exp. Eye Res.* *47*, 771-785.
167. Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., and Smith, A. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr. Biol.* *8*, 971-974.
168. Liesi, P., Dahl, D., and Vaheri, A. (1983). Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J. Cell Biol.* *96*, 920-924.
169. Lipton, S.A. and Kater, S.B. (1989). Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci.* *12*, 265-270.
170. Liu, H., Force, T., and Bloch, K.D. (1997). Nerve growth factor decreases soluble guanylate cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 6038-6043.
171. Liu, S., Qu, Y., Stewart, T.J., Howard, M.J., Chakraborty, S., Holekamp, T.F., and McDonald, J.W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 6126-6131.
172. Liu, Y., Himes, B.T., Solowska, J., Moul, J., Chow, S.Y., Park, K.I., Tessler, A., Murray, M., Snyder, E.Y., and Fischer, I. (1999). Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus. *Exp. Neurol.* *158*, 9-26.
173. Liu, Z.H., Shintani, Y., Sakamoto, Y., Harada, K., Zhang, C.Y., Fujinaka, Y., Abe, M., Goto, T., and Saito, S. (1996). Effects of LHRH, FSH and activin A on follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocr. J.* *43*, 321-327.
174. Lothian, C. and Lendahl, U. (1997). An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 452-462.
175. Lundberg, C., Martinez-Serrano, A., Cattaneo, E., McKay, R.D., and Bjorklund, A. (1997). Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp. Neurol.* *145*, 342-360.
176. Luskin, M.B. (1994). Neuronal cell lineage in the vertebrate central nervous system. *FASEB J.* *8*, 722-730.
177. Mabie, P.C., Mehler, M.F., Marmur, R., Papavasiliou, A., Song, Q., and Kessler, J.A. (1997). Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J. Neurosci.* *17*, 4112-4120.
178. Mai, J.K., Andressen, C., and Ashwell, K.W. (1998). Demarcation of prosencephalic regions by CD15-positive radial glia. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 746-751.
179. Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J., and Wobus, A.M. (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech. Dev.* *44*, 41-50.
180. Maltsev, V.A., Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M., and Hescheler, J. (1994). Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ. Res.* *75*, 233-244.
181. Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *78*, 7634-7638.

182. Marvin,M.J., Dahlstrand,J., Lendahl,U., and McKay,R.D. (1998). A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J. Cell Sci.* *111*, 1951-1961.
183. Matsumoto,T., Pollock,J.S., Nakane,M., and Forstermann,U. (1993). Developmental changes of cytosolic and particulate nitric oxide synthase in rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *73*, 199-203.
184. Matsuoka,I., Mizuno,N., and Kurihara,K. (1989). Cholinergic differentiation of clonal rat pheochromocytoma cells (PC12) induced by retinoic acid: increase of choline acetyltransferase activity and decrease of tyrosine hydroxylase activity. *Brain Res.* *502*, 53-60.
185. Matsuzaki,H., Tamatani,M., Mitsuda,N., Namikawa,K., Kiyama,H., Miyake,S., and Tohyama,M. (1999). Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.* *73*, 2037-2046.
186. McBurney,M.W., Reuhl,K.R., Ally,A.I., Nasipuri,S., Bell,J.C., and Craig,J. (1988). Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J. Neurosci.* *8*, 1063-1073.
187. McBurney,R.N. and Neering,I.R. (1985). The measurement of changes in intracellular free calcium during action potentials in mammalian neurones. *J. Neurosci. Methods* *13*, 65-76.
188. McCobb,D.P., Best,P.M., and Beam,K.G. (1989). Development alters the expression of calcium currents in chick limb motoneurons. *Neuron* *2*, 1633-1643.
189. McKay,R.D. (1989). The origins of cellular diversity in the mammalian central nervous system. *Cell* *58*, 815-821.
190. McKerracher,L., Chamoux,M., and Arregui,C.O. (1996). Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Mol. Neurobiol.* *12*, 95-116.
191. Mena,M.A., Casarejos,M.J., Estrada,C., and de Yébenes,J.G. (1994). Effects of retinoic acid on NB 69 human neuroblastoma cells and fetal rat mid brain neurons. *J. Neural Transm. Park Dis. Dement. Sect.* *8*, 85-97.
192. Messam,C.A., Hou,J., and Major,E.O. (2000). Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Exp. Neurol.* *161*, 585-596.
193. Miller-Hance,W.C., LaCorbiere,M., Fuller,S.J., Evans,S.M., Lyons,G., Schmidt,C., Robbins,J., and Chien,K.R. (1993). In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. *J. Biol. Chem.* *268*, 25244-25252.
194. Misson,J.P., Edwards,M.A., Yamamoto,M., and Caviness,V.S., Jr. (1988). Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *44*, 95-108.
195. Mokry,J. and Nemecek,S. (1998). Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells. *Folia Biol. (Praha)* *44*, 155-161.
196. Moncrief,N.D., Kretsinger,R.H., and Goodman,M. (1990). Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evol.* *30*, 522-562.
197. Montgomery,D.L. (1994). Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol.* *31*, 145-167.

198. Mori,Y., Friedrich,T., Kim,M.S., Mikami,A., Nakai,J., Ruth,P., Bosse,E., Hofmann,F., Flockerzi,V., and Furuichi,T. (1991). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350, 398-402.
199. Mortensen,R.M., Zubiaur,M., Neer,E.J., and Seidman,J.G. (1991). Embryonic stem cells lacking a functional inhibitory G-protein subunit (alpha i2) produced by gene targeting of both alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7036-7040.
200. Moser,N., Wevers,A., Lorke,D.E., Reinhardt,S., Maelicke,A., and Schroder,H. (1996). Alpha4-1 subunit mRNA of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat olfactory bulb: cellular expression in adult, pre- and postnatal stages. *Cell Tissue Res.* 285, 17-25.
201. Mugnaini,E. (1985). GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. *J. Comp Neurol.* 235, 61-81.
202. Mynlieff,M. and Beam,K.G. (1992). Developmental expression of voltage-dependent calcium currents in identified mouse motoneurons. *Dev. Biol.* 152, 407-410.
203. Niidome,T., Kim,M.S., Friedrich,T., and Mori,Y. (1992). Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 308, 7-13.
204. Noble,M., Murray,K., Stroobant,P., Waterfield,M.D., and Riddle,P. (1988). Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333, 560-562.
205. Obregon,E., Punzon,M.C., Gonzalez-Nicolas,J., Fernandez-Cruz,E., Fresno,M., and Munoz-Fernandez,M.A. (1997). Induction of adhesion/differentiation of human neuroblastoma cells by tumour necrosis factor-alpha requires the expression of an inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1184-1193.
206. Ogura,T. and Esumi,H. (1996). Nitric oxide synthase expression in human neuroblastoma cell line induced by cytokines. *Neuroreport* 7, 853-856.
207. Ohkuma,S., Katsura,M., Hibino,Y., Xu,J., Shirotani,K., and Kuriyama,K. (1998). Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in mouse cerebral cortical neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54, 133-140.
208. Ohyama,K., Kawano,H., and Kawamura,K. (1997). Localization of extracellular matrix molecules, integrins and their regulators, TGF betas, is correlated with axon pathfinding in the spinal cord of normal and Danforth's short tail mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 103, 143-154.
209. Okabe,M., Ikawa,M., Kominami,K., Nakanishi,T., and Nishimune,Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313-319.
210. Okabe,S., Forsberg-Nilsson,K., Spiro,A.C., Segal,M., and McKay,R.D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* 59, 89-102.
211. Olivera,B.M., Miljanich,G.P., Ramachandran,J., and Adams,M.E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 63:823-67, 823-867.
212. Olney,J.W., Ho,O.L., and Rhee,V. (1971). Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14, 61-76.

213. Ostermann,C.H., Grunwald,J., Wevers,A., Lorke,D.E., Reinhardt,S., Maelicke,A., and Schroder,H. (1995). Cellular expression of alpha 4 subunit mRNA of the nicotinic acetylcholine receptor in the developing rat telencephalon. *Neurosci. Lett.* 192, 21-24.
214. Pain,B., Clark,M.E., Shen,M., Nakazawa,H., Sakurai,M., Samarut,J., and Etches,R.J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122, 2339-2348.
215. Perry,V.H. and Gordon,S. (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.* 11, 273-277.
216. Perry,V.H. and Gordon,S. (1991). Macrophages and the nervous system. *Int. Rev. Cytol.* 125, 203-244.
217. Perry,V.H., Hume,D.A., and Gordon,S. (1985). Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15, 313-326.
218. Pesheva,P., Horwitz,A.F., and Schachner,M. (1987). Integrin, the cell surface receptor for fibronectin and laminin, expresses the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures shared by adhesion molecules. *Neurosci. Lett.* 83, 303-306.
219. Peunova,N. and Enikolopov,G. (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375, 68-73.
220. Peunova,N., Kuzin,B., Roberts,I., O'Kane,C., and Enikolopov,G. (1996). Nitric oxide, cell multiplication, and cell survival. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61:417-26, 417-426.
221. Phung,Y.T., Bekker,J.M., Hallmark,O.G., and Black,S.M. (1999). Both neuronal NO synthase and nitric oxide are required for PC12 cell differentiation: a cGMP independent pathway. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64 , 165-178.
222. Pixley,S.K. and de Vellis,J. (1984). Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* 317, 201-209.
223. Platt,J.L. and Lin,S.S. (1998). The future promises of xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862:5-18, 5-18.
224. Plummer,M.R., Logothetis,D.E., and Hess,P. (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* 2, 1453-1463.
225. Prendergast,F.G. (1999). Biophysics of the green fluorescent protein. *Methods Cell Biol.* 58:1-18, 1-18.
226. Raff,M.C. (1989). Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* 243, 1450-1455.
227. Raff,M.C., Lillien,L.E., Richardson,W.D., Burne,J.F., and Noble,M.D. (1988). Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333, 562-565.
228. Raff,M.C., Miller,R.H., and Noble,M. (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303, 390-396.
229. Raff,M.C., Mirsky,R., Fields,K.L., Lisak,R.P., Dorfman,S.H., Silberberg,D.H., Gregson,N.A., Leibowitz,S., and Kennedy,M.C. (1978). Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature* 274, 813-816.

230. Rakic,P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp Neurol.* 145, 61-83.
231. Randall,A. and Tsien,R.W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15, 2995-3012.
232. Rasmussen,H. (1989). The cycling of calcium as an intracellular messenger. *Sci. Am.* 261, 66-73.
233. Reichardt,L.F. and Tomaselli,K.J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:531-70., 531-570.
234. Renfranz,P.J., Cunningham,M.G., and McKay,R.D. (1991). Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 66, 713-729.
235. Reuter,H. (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 301, 569-574.
236. Reynolds,B.A. and Weiss,S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [see comments]. *Science* 255, 1707-1710.
237. Rezai,K.A., Kohen,L., Wiedemann,P., and Heimann,K. (1997). Iris pigment epithelium transplantation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 235, 558-562.
238. Richardson,A., Hao,C., and Fedoroff,S. (1993). Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 7, 25-33.
239. Robbins,J., Gulick,J., Sanchez,A., Howles,P., and Doetschman,T. (1990). Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J. Biol. Chem.* 265, 11905-11909.
240. Rohwedel,J., Maltsev,V., Bober,E., Arnold,H.H., Hescheler,J., and Wobus,A.M. (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev. Biol.* 164, 87-101.
241. Rohwedel,J., Horak,V., Hebrok,M., Fuchtbauer,E.M., and Wobus,A.M. (1995). M-twist expression inhibits mouse embryonic stem cell-derived myogenic differentiation in vitro. *Exp. Cell Res.* 220, 92-100.
242. Rohwedel,J., Guan,K., Zuschratter,W., Jin,S., Ahnert-Hilger,G., Furst,D., Fassler,R., and Wobus,A.M. (1998a). Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Dev. Biol.* 201, 167-184.
243. Rohwedel,J., Kleppisch,T., Pich,U., Guan,K., Jin,S., Zuschratter,W., Hopf,C., Hoch,W., Hescheler,J., Witzemann,V., and Wobus,A.M. (1998b). Formation of postsynaptic-like membranes during differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 239, 214-225.
244. Rohwedel,J., Guan,K., and Wobus,A.M. (1999). Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues. Organs* 165, 190-202.
245. Rossant,J. and Chapman,V.M. (1983). Somatic and germline mosaicism in interspecific chimaeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 73, 193-205.
246. Rossant,J. and McBurney,M.W. (1982). The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 70:99-112, 99-112.

247. Rothman,S.M. and Olney,J.W. (1986). Glutamate and the pathophysiology of hypoxic–ischemic brain damage. *Ann. Neurol.* 19, 105-111.
248. Rylett,R.J., Goddard,S., and Lambros,A. (1993). Regulation of expression of cholinergic neuronal phenotypic markers in neuroblastoma LA-N-2. *J. Neurochem.* 61, 1388-1397.
249. Sakaguchi,D.S. and Radke,K. (1996). Beta 1 integrins regulate axon outgrowth and glial cell spreading on a glial-derived extracellular matrix during development and regeneration. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 97, 235-250.
250. Samama,B., Chateau,D., and Boehm,N. (1995). Expression of NADPH-diaphorase in the rat forebrain during development. *Neurosci. Lett.* 184, 204-207.
251. Sarner,S., Kozma,R., Ahmed,S., and Lim,L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *Mol. Cell Biol.* 20, 158-172.
252. Sastry,S.K., Lakonishok,M., Thomas,D.A., Muschler,J., and Horwitz,A.F. (1996). Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. *J. Cell Biol.* 133, 169-184.
253. Sawada,H., Ibi,M., Kihara,T., Urushitani,M., Honda,K., Nakanishi,M., Akaike,A., and Shimohama,S. (2000). Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J.* 14, 1202-1214.
254. Sawai,S., Shimono,A., Hanaoka,K., and Kondoh,H. (1991). Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. *New Biol.* 3, 861-869.
255. Scheetz,A.J. and Constantine-Paton,M. (1994). Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* 8, 745-752.
256. Schmechel,D.E. and Rakic,P. (1979). Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* 277, 303-305.
257. Schmitt,R.M., Bruyns,E., and Snodgrass,H.R. (1991). Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev.* 5, 728-740.
258. Schraermeyer,U., Kociok,N., and Heimann,K. (1999). Rescue effects of IPE transplants in RCS rats: short-term results. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1545-1556.
259. Schraermeyer,U., Thumann,G., Luther,T., Kociok,N., **Arnhold,S.**, Kruttwig,K., Andressen,C., Addicks,K., and Bartz-Schmidt,K.-U. (2001). Subretinally transplanted embryonic stem cells rescue photoreceptor cells from degeneration in the in RCS rats. *Cell Transplant.* *eingereicht.*
260. Schwarting,R.K. and Huston,J.P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog. Neurobiol.* 50, 275-331.
261. Schwarz,M.A., Hamilton,L.D., Tardelli,L., Narula,S.K., and Sullivan,L.M. (1994). Stimulation of cytolytic activity by interleukin-10. *J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol.* 16, 95-104.
262. Sedgwick,J.D., Schwender,S., Imrich,H., Dorries,R., Butcher,G.W., and ter,M., V (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7438-7442.

263. Sejersen,T. and Lendahl,U. (1993). Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J. Cell Sci.* 106 ( Pt 4), 1291-1300.
264. Shambloott,M.J., Axelman,J., Wang,S., Bugg,E.M., Littlefield,J.W., Donovan,P.J., Blumenthal,P.D., Huggins,G.R., and Gearhart,J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13726-13731.
265. Sheedlo,H.J., Gaur,V., Li,L.X., Seaton,A.D., and Turner,J.E. (1991). Transplantation to the diseased and damaged retina. *Trends Neurosci.* 14, 347-350.
266. Sheedlo,H.J., Li,L., Gaur,V.P., Young,R.W., Seaton,A.D., Stovall,S.V., Jaynes,C.D., and Turner,J.E. (1992). Photoreceptor rescue in the dystrophic retina by transplantation of retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 138:1-49, 1-49.
267. Silverman,M.S. and Hughes,S.E. (1990). Photoreceptor rescue in the RCS rat without pigment epithelium transplantation. *Curr. Eye Res.* 9, 183-191.
268. Skarnes,W.C., Auerbach,B.A., and Joyner,A.L. (1992). A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes Dev.* 6, 903-918.
269. Smith,A.G., Heath,J.K., Donaldson,D.D., Wong,G.G., Moreau,J., Stahl,M., and Rogers,D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
270. Smith,G.M., Miller,R.H., and Silver,J. (1986). Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation. *J. Comp Neurol.* 251, 23-43.
271. Snyder,E.Y., Deitcher,D.L., Walsh,C., Arnold-Aldea,S., Hartweg,E.A., and Cepko,C.L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68, 33-51.
272. Solbach,S. and Celio,M.R. (1991). Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat. Embryol. (Berl)* 184, 103-124.
273. Sommer,I. and Schachner,M. (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev. Biol.* 83, 311-327.
274. Soong,T.W., Stea,A., Hodson,C.D., Dubel,S.J., Vincent,S.R., and Snutch,T.P. (1993). Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260, 1133-1136.
275. Spitzer N. (1991). A developmental handshake: neuronal control of ionic currents and their control of neuronal differentiation. *J. Neurobiol.* 22, 659-673.
276. Spitzer,N.C. (1994). Spontaneous Ca<sup>2+</sup> spikes and waves in embryonic neurons: signaling systems for differentiation. *Trends Neurosci.* 17, 115-118.
277. Stekelenburg-Hamers,A.E., Van Achterberg,T.A., Rebel,H.G., Flechon,J.E., Campbell,K.H., Weima,S.M., and Mummery,C.L. (1995). Isolation and characterization of permanent cell lines from inner cell mass cells of bovine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 444-454.
278. Stemple,D.L. and Anderson,D.J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973-985.
279. Stevens,C.F. (1998). Neuronal diversity: too many cell types for comfort? *Curr. Biol.* 8, R708-R710.

280. Stone, T.W., Connick, J.H., Winn, P., Hastings, M.H., and English, M. (1987). Endogenous excitotoxic agents. *Ciba Found. Symp.* 126:204-20., 204-220.
281. Storm-Mathisen, A. and Vaglum, P. (1994). Conduct disorder patients 20 years later: a personal follow-up study. *Acta Psychiatr. Scand.* 89, 416-420.
282. Strickland, S. and Mahdavi, V. (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* 15, 393-403.
283. Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedenmann, B., Hescheler, J., and Wobus, A.M. (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech. Dev.* 53, 275-287.
284. Strübing C. (1995). Etablierung eines in vitro Modellsystems zur Differenzierung synaptisch verknüpfter Nervenzellen aus pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus. *Altex* 12, 129-137.
285. Strubing, C., Rohwedel, J., Ahnert-Hilger, G., Wiedenmann, B., Hescheler, J., and Wobus, A.M. (1997). Development of G protein-mediated Ca<sup>2+</sup> channel regulation in mouse embryonic stem cell-derived neurons. *Eur. J. Neurosci.* 9, 824-832.
286. Suda, Y., Suzuki, M., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1987). Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *J. Cell Physiol* 133, 197-201.
287. Temple, S. and Raff, M.C. (1985). Differentiation of a bipotential glial progenitor cell in a single cell microculture. *Nature* 313, 223-225.
288. Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
289. Thompson, S.M. and Wong, R.K. (1991). Development of calcium current subtypes in isolated rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol* 439, 671-689.
290. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
291. Thomson, J.A. and Marshall, V.S. (1998). Primate embryonic stem cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:133-65, 133-165.
292. Tohyama, T., Lee, V.M., Rorke, L.B., Marvin, M., McKay, R.D., and Trojanowski, J.Q. (1992). Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest* 66, 303-313.
293. Tomaselli, K.J., Damsky, C.H., and Reichardt, L.F. (1987). Interactions of a neuronal cell line (PC12) with laminin, collagen IV, and fibronectin: identification of integrin-related glycoproteins involved in attachment and process outgrowth. *J. Cell Biol.* 105, 2347-2358.
294. Tomaselli, K.J., Reichardt, L.F., and Bixby, J.L. (1986). Distinct molecular interactions mediate neuronal process outgrowth on non-neuronal cell surfaces and extracellular matrices. *J. Cell Biol.* 103, 2659-2672.
295. Tottene, A., Moretti, A., and Pietrobon, D. (1996). Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 16, 6353-6363.
296. Vaca, K. and Wendt, E. (1992). Divergent effects of astroglial and microglial secretions on neuron growth and survival. *Exp. Neurol.* 118, 62-72.
297. Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., **Arnhold, S.**, Grabsch, H., Klockner, U., Perez-Reyes, E., Hescheler, J., and Schneider, T. (1998). New isoform of the neuronal Ca<sup>2+</sup> channel alpha1E subunit in islets of Langerhans and kidney--

- distribution of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunits in cell lines and tissues. *Eur. J. Biochem.* 257, 274-285.
298. Van Brederode, J.F., Mulligan, K.A., and Hendrickson, A.E. (1990). Calcium-binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex. *J. Comp Neurol.* 298, 1-22.
  299. van Inzen, W.G., Peppelenbosch, M.P., van den Brand, M.W., Tertoolen, L.G., and de Laat, S.W. (1996). Neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1312, 21-26.
  300. Verderio, C., Coco, S., Fumagalli, G., and Matteoli, M. (1995). Calcium-dependent glutamate release during neuronal development and synaptogenesis: different involvement of omega-agatoxin IVA- and omega-conotoxin GVIA-sensitive channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6449-6453.
  301. Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., and Brown, R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241-5248.
  302. Voigt, T. (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp Neurol.* 289, 74-88.
  303. Volsen S.G., Day N.C., McCormack A.L., Smith W., Craig P.J., Ince P., Shaw P.J., Ellis S.B., Gillspie A., Harpold M.M., and Lodge D. (1995). The expression of voltage-dependent calcium channels in human cerebellum. *Molecular Brain Res.* 34, 271-282.
  304. Wang, R., Clark, R., and Bautch, V.L. (1992). Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. *Development* 114, 303-316.
  305. Wang, S., Wu, H., Jiang, J., Delohery, T.M., Isdell, F., and Goldman, S.A. (1998). Isolation of neuronal precursors by sorting embryonic forebrain transfected with GFP regulated by the T alpha 1 tubulin promoter [published erratum appears in *Nat Biotechnol* 1998 May;16(5):478]. *Nat. Biotechnol.* 16, 196-201.
  306. Wasserman, R.H. and Fullmer, C.S. (1983). Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Annu. Rev. Physiol* 45:375-90., 375-390.
  307. Weeks, B.S., DiSalvo, J., and Kleinman, H.K. (1990). Laminin-mediated process formation in neuronal cells involves protein dephosphorylation. *J. Neurosci. Res.* 27, 418-426.
  308. Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Warner, C., Dubel, S.J., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9, 1099-1115.
  309. Westenbroek, R.E., Sakurai, T., Elliott, E.M., Hell, J.W., Starr, T.V., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1995). Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J. Neurosci.* 15, 6403-6418.
  310. Wieloch, T. (1985). Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Prog. Brain Res.* 63:69-85, 69-85.
  311. Wiles, M.V. (1993). Embryonic stem cell differentiation in vitro. *Methods Enzymol.* 225:900-18, 900-918.
  312. Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B., and Harpold, M.M. (1992). Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257, 389-395.

313. Williams, M.E., Marubio, L.M., Deal, C.R., Hans, M., Brust, P.F., Philipson, L.H., Miller, R.J., Johnson, E.C., Harpold, M.M., and Ellis, S.B. (1994). Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* **269**, 22347-22357.
314. Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jakel, P., and Schoneich, J. (1984). Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp. Cell Res.* **152**, 212-219.
315. Wobus, A.M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M.C., Rohwedel, J., Ji, G., Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J., and Franz, W.M. (1997). Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol. Cell Cardiol.* **29**, 1525-1539.
316. Wobus, A.M., Wallukat, G., and Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation* **48**, 173-182.
317. Wolf, G. (1996). A history of vitamin A and retinoids. *FASEB J.* **10**, 1102-1107.
318. Wroblewski, J., Engstrom, M., Edwall-Arvidsson, C., Sjoberg, G., Sejersen, T., and Lendahl, U. (1997). Distribution of nestin in the developing mouse limb bud in vivo and in micro-mass cultures of cells isolated from limb buds. *Differentiation* **61**, 151-159.
319. Yaworsky, P.J. and Kappen, C. (1999). Heterogeneity of neural progenitor cells revealed by enhancers in the nestin gene. *Dev. Biol.* **205**, 309-321.
320. Yokoyama, C.T., Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Soong, T.W., Snutch, T.P., and Catterall, W.A. (1995). Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J. Neurosci.* **15**, 6419-6432.
321. Zhuang, Y., Kim, C.G., Bartelmez, S., Cheng, P., Groudine, M., and Weintraub, H. (1992). Helix-loop-helix transcription factors E12 and E47 are not essential for skeletal or cardiac myogenesis, erythropoiesis, chondrogenesis, or neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 12132-12136.
322. Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., and McMahon, A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors [published erratum appears in *Neuron* 1994 Jun;12(6):following 1388]. *Neuron* **12**, 11-24.

## 6 Vorgelegte Veröffentlichungen

---

### 6.1 zu Abschnitt I: Neurobiologie neural differenzierter ES-Zellen

**Arnhold, S.**, Andressen, C., Hescheler, J. und Addicks, K. (1998): Mikrocinematographische Neurodifferenzierungs- und Neurotoxizitätsstudie an einem in vitro Modell unter Verwendung embryonaler Stammzellen der Maus, *Altex*, 15, 59-66

**Arnhold, S.**, Andressen, C., Angelov, D.N., Vajna, R., Volsen, S.G., Hescheler, J. and Addicks, K. (2000): Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 201-212.

Vajna, R., Schramm, M., Pereverzev, A., **Arnhold, S.**, Grabsch, H., Klöckner, U., Perez-Reyes, E., Hescheler, J. and Schneider, T (1998): New Isoform of the Neuronal Ca<sup>2+</sup> Channel  $\alpha$ 1E Subunit in Islets of Langerhans and Kidney. Distribution of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channel  $\alpha$ 1 Subunits in Cell Lines and Tissues, *Eur. J. Biochem.* 257, 274-285.

Angelov, D.N., **Arnhold, S.**, Andressen, C., Grabsch, H, Hescheler, J. and Addicks, K. (1998): Spatio and temporal expression of glial markers in embryonic stem cell derived neuronal cells, *Dev. Neurosci.* 20, 42-51

### 6.2 zu Abschnitt II: Experimentelle Untersuchungen von Differenzierungsmechanismen am Modell der neural differenzierten ES-Zellen mit Bezug zur Situation in vivo

**Arnhold, S.**, Andressen, C., Bloch, W., Addicks, K. (1997): NOS-II is transiently expressed during the differentiation of the olfactory epithelium, *Neurosci. Lett.* 229, 165-168

**Arnhold, S.**, Andressen, C., Bloch, W., Hess, A., Addicks, K. (1999): Selective expression of the S-II isoform during mouse vestibulocochlear receptorogenesis, *Eur. J. Neurosci.* 11, 2187-2193.

Hess, A., Bloch, W., **Arnhold, S.**, Andressen, C., Stennert, E., Addicks, K., Michel, O. (1998) Nitric oxide in the vestibulocochlear system of mice, *Brain Res.* 813, 97-102.

Andressen, C., **Arnhold, S.**, Puschmann, M., Bloch, W., Hescheler, J., Fässler, R. and Addicks, K. (1998): Beta1 integrin deficiency impairs migration and differentiation of mouse embryonic stem cell derived neurons. *Neurosci. Lett.* 251, 165-168.

**Arnhold, S.**, Fassbender, A., Löhnig, B., Kruttwig, K., Andressen, C. and Addicks, K. (2002) NOS-II promotes neuronal differentiation as demonstrated in vivo and in vitro Int J Dev Neurosci. Apr;20(2):83-92.

### **6.3 zu Abschnitt III: ES-Zellen als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien**

**Arnhold, S.**, Lenartz, D., Kruttwig, K., Klinz, F.J., Kolossov, E., Hescheler J., Andressen C., Sturm V. und Addicks K. (2000) GFP labelled ES cell derived neural precursor cells differentiate into Thy-1 positive neurones and glia after transplantation into the striatum of the adult rat. J. Neurosurg. 93, 1026-1032.

Andressen, C., Stöcker, E., Klinz, F.-J., Lenka, N., Hescheler, J., **Arnhold, S.**, Addicks, K. (2001) Nestin specific green fluorescence protein expression in embryonic stem cell derived neural precursor cells used for transplantation. Stem Cells 19, 419-424

Schraermeyer, U., Thumann, G., Luther, T., Kociok, N., **Arnhold, S.**, Kruttwig, K., Andressen, C., Addicks, K., Bartz-Schmidt, K.-U. (2001) Subretinally transplanted embryonic stem cells rescue photoreceptor cells from degeneration in RCS rats Cell Transplant;10(8):673-80.