

Mikrokinematographische Neurodifferenzierungs- und Neurotoxizitätsstudien an einem *in vitro* Modell unter Verwendung embryonaler Stammzellen der Maus

Stefan Arnholt, Christian Andressen, Jürgen Hescheler* und Klaus Addicks
Institut I für Anatomie und *Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln, D-Köln

Zusammenfassung

Die Ontogenese des Nervensystems der Säuger ist in weiten Teilen unbekannt. Dies beruht auf dem Fehlen von experimentellen Systemen, die die Aufklärung von zellulären Mechanismen während der neuronalen Reifung unterstützen. In jüngster Zeit wurde die erfolgreiche Gewinnung neuronaler Zellen unter Verwendung embryonaler Stammzellen der Zelllinie BLC-6 durch unsere Gruppe beschrieben. Diese Zellen bilden komplexe neuronale Netzwerke mit typischen elektrophysiologischen Eigenschaften inklusive der synaptischen Kopplung, wie sie aus *in vivo* Befunden bekannt sind.

Eingehende Untersuchungen zur Transmitterausstattung haben eine Reihe von neuroaktiven Substanzen nachweisen können, darunter auch Glutamat. Für diesen excitatorischen Neurotransmitter ist eine Beteiligung bei ischämiebedingter Neurodegeneration beschrieben worden. Da bekannt ist, daß eine erhöhte Glutamat-Freisetzung die neuronale Fortsatzbildung sowie die neuronale Vitalität beeinflusst, wurde das *in vitro* Modell der embryonalen Stammzellen herangezogen, um die Effekte einer Glutamatintoxikation über den Glutamat-Agonisten NMDA während der frühen embryonalen Entwicklung zu untersuchen. Trotz des Vorhandenseins der entsprechenden Rezeptoren in allen morphologischen Phänotypen zeigte die eingesetzte Vitalbeobachtung eine erhöhte Degeneration morphologisch differenzierter bi- und multipolarer Neurone im Vergleich zu undifferenzierten apolaren Neuronen.

Summary: Microcinematographic studies on neurodifferentiation and neurotoxicity in vitro using mouse embryonic stem cells
The ontogeny of the mammalian nervous system remains largely unknown, mainly because of the lack of experimental systems that will allow identification of cellular mechanism involved in neuronal maturation. Recently the successful differentiation of neurons from embryonic stem cells of the BLC-6 cell line has been shown by our group, and these cells are able to form complex neuronal networks with typical electrophysiological characteristics including postsynaptic potentials, comparable to the situation *in vivo*. Further characterization of neuronal cells revealed characteristic phenotypes, equipped with various neurotransmitters, e.g. glutamate. This excitatory neurotransmitter is reported to be involved in ischemia dependent neurological disorders. As the investigation of toxic effects during neuronal maturation in the embryo is usually rather difficult, due to the limited isolation of early embryonic neurons, the ES cell line seems to be an appropriate model to study effects of neurotoxicological substances. Because of the well known effect of glutamate on dendritic outgrowth and neuronal survival, the *in vitro* system of embryonic stem cells was applied to study the effect of glutamate intoxication by the receptor agonist NMDA during early neuronal development using videomicroscopic time lapse studies. The results point out that the NMDA induced neurotoxicity correlates with the degree of neuronal differentiation. Despite the existence of NMDA receptors in apolar, bipolar and multipolar neurons, the latter two populations were affected more dramatically than undifferentiated apolar neurons.

Keywords: embryonic stem cells, neuronal development, neurotransmitters, glutamate toxicity

1 Einleitung

Embryonale Stammzellen sind klonale Zelllinien, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste der Maus gewonnen werden (Evans und Kaufmann, 1981; Martin, 1981). ES Zellen besitzen drei Eigenschaf-

ten, die sie zusammen zu einem gut geeigneten System zum Studium der Entwicklungsmechanismen bei Säugern machen:

I. sie besitzen das Potential, sich in Zellen aller drei embryonalen Keimblätter zu differenzieren. Diese totipotente Kapazi-

tät embryonaler Stammzellen wird am deutlichsten durch ihre Eigenschaft illustriert, nach Injektion in eine Blastozyste funktionell an der normalen embryonalen Entwicklung teilnehmen zu können (Rossant und Chapman, 1983; Goslar et al., 1989),

II. sie lassen sich in Kultur in einem undifferenzierten Status nahezu unbegrenzt vermehren. Selbst nach über 250 Teilungszyklen in Kultur behalten ES Zellen ihre Totipotenz (Suda et al., 1987). Damit sind sie ideal für eine genetische Manipulation einsetzbar (Thomas und Capecchi, 1987).

III. diese Zellen sind in ihrer Differenzierung sowohl für elektrophysiologische als auch vitalmikroskopische Untersuchungen zugänglich.

Über die bei der neuronalen Differenzierung beteiligten Faktoren ist noch wenig bekannt. Erste Hinweise über beteiligte Mechanismen wurden sowohl aus *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen unter Verwendung neuronaler Zellkulturen gewonnen. Für die Zelllinie BLC-6 (Strübing et al., 1995) werden zur Induktion einer neuronalen Differenzierung dieser totipotenten Zellen zwei Stimuli verwendet: Die Zellen aggregieren in der von uns verwendeten Präparation des hängenden Tropfens zu soliden Zellhaufen, was zur Expression spezifischer Gene führt (ein Prozeß, der die Bildung der inneren Zellmasse während der Embryogenese imitiert), und zweitens ist die Behandlung der Stammzellen mit Retinsäure eine wichtige Voraussetzung, um die neuronale Differenzierung zu fördern (Bain et al. 1995, Strübing et al., 1995).

In der vorliegenden Studie haben wir in einem ersten Schritt die sich entwickelnden Neurone aus der ES Zelllinie BLC-6 bezüglich ihrer Transmitterausstattung untersucht. Dabei wurde außer den klassischen exzitatorischen und inhibitorischen Transmittern auch das Vorkommen einiger Neuropeptide untersucht. Parallel dazu wurden reifungsabhängige morphologische Veränderungen dokumentiert. Dabei konnte eine Korrelation differenzierungsabhängiger Phänotypen (apolare, bipolare und multipolare Nervenzellen) mit der Transmitterausstattung der Neurone für GABA, Glutamat und Glycin herausgearbeitet werden.

Aufgrund der guten Zugänglichkeit der Neurone bietet das Modell der ES Zellen neben dem Studium der neuronalen Differenzierung die Möglichkeit, Neurotoxizitätsstudien durchzuführen.

Es ist bekannt, daß bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Schlaganfall, Schädel-Hirn-Trauma und Epilepsie erhöhte Spiegel des physiologischerweise im zentralen Nervensystem vorkommen-

den Neurotransmitters Glutamat auftreten (Choi, 1987). Diese Erhöhung kommt durch eine primäre Schädigung einiger Nervenzellen durch Sauerstoffminderversorgung zustande. In der Folge wird durch Zellschädigung der Neurotransmitter unkontrolliert und in unphysiologischen Konzentrationen in den Extrazellularräumen freigesetzt, was über eine dadurch bedingte permanente Stimulation benachbarter Neurone zu deren Schädigung führt. Diese Situation haben wir in unserem System durch Stimulation des hauptsächlich daran beteiligten Glutamatrezeptors über den Rezeptoragonisten N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) imitiert, um so vitalmikroskopisch die Effekte in Analogie zu einer Glutamatneurotoxizität zu untersuchen.

Insgesamt zeigen unsere Befunde, daß das ES-Zellsystem ein geeignetes *in vitro* Modell zur Untersuchung zellulärer und morphologischer Entwicklungsvorgänge darstellt. Darüber hinaus dient es aber auch als experimenteller Zugang für die Durchführung von Neurotoxizitätsstudien während der Nervenzelldifferenzierung.

2 Material und Methoden

Zellkultur und Zelldifferenzierung

ES-Zellen der Linie BLC-6 (Wobus et al., 1988) wurden auf konfluent in Gewebekulturschalen (Durchmesser 6 cm) wachsenden embryonalen Mausfibroblasten („feeder layer“) kultiviert (siehe Rohwedel et al., 1994). Das weitere Kultivierungsschema zum Studium von neuronalen Entwicklungsschritten ist in Abb. 1 dargestellt. Nach Herstellung einer Zellsuspension durch Trypsinierung aggregierten die Zellen in einem hängenden Tropfen (400 Zellen/20 µl Medium) innerhalb von 2 Tagen zu sogenannten *embryoid bodies* (EBs). Als Medium verwendeten wir DME Medium (Biochrom, Berlin, FRG), supplementiert mit 15% fötalem Kälberserum (FKS, Gibco BRL, Eggenstein, FRG), 2mM Glutamin (Gibco BRL), nichtessentiellen Aminosäuren (Stammlösung 1:100, Biochrom), 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, FRG) und 50 µM β-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, FRG). Während der Kultivierung im hängenden Tropfen (Differenzierungstage 1 und 2) wurde dem Medium all-trans Retinsäure (RA) (Serva, Heidelberg, FRG) als Induktor einer neuronalen Reifung zugesetzt. RA wurde

in Ethanol (96%) gelöst und als Stammlösung (10^{-3} M) bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Aliquots wurden jeweils nur einmal verwendet und frisch vor jedem Differenzierungsansatz in Medium auf die Konzentration von 10^{-7} M verdünnt. Nach der Bildung der EBs wurden diese in einer Suspensionskultur für 2 weitere Tage in DME Medium ohne RA gehalten. Danach erfolgte das Ausbringen dieser Aggregate (Plattieren) auf mit Gelatine (0,1% w/v) beschichteten Deckgläschen in Multiwellschalen. In diesen Schalen wurde die weitere Kultivierung der EBs bis zum Einsatz in den Versuchen durchgeführt. Alle folgenden Altersangaben der Kulturen beziehen sich auf dem Zeitraum nach Plattieren der EB.

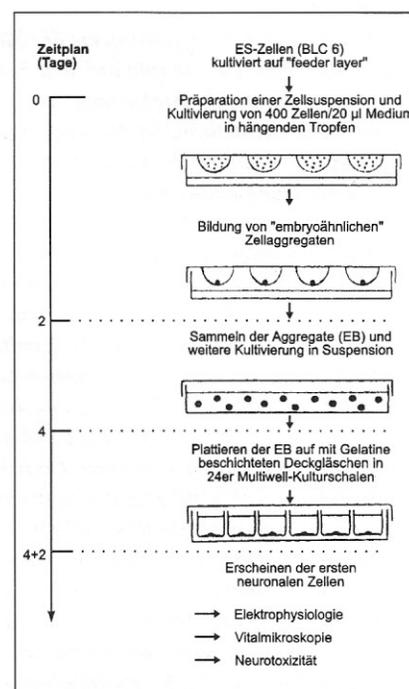


Abb. 1 Differenzierungsschema zur *in vitro* Differenzierung neuronaler Zellen aus ES Zellen (BLC-6).

Nach Aggregation von ES Zellen in der Präparation des hängenden Tropfens unter Zugabe von Retinsäure innerhalb von 2 Tagen werden die gebildeten Zellaggregate (EB) abgespült und für weitere 2 Tage in Suspension kultiviert. Am 4. Tag erfolgt die Plattierung der EBs auf gelatinisierte Deckgläschen in Multiwell-Schalen.

Immuncytochemie

Der Nachweis verschiedener neuronaler Marker erfolgt unter Verwendung geeigneter polyklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen. Dazu wurden Primäran-

tikörper zum Nachweis folgender Antigene eingesetzt: die Neuronen spezifische Enolase, (NSE, 1:6000, Polyscience), Synaptophysin als Nachweis von synaptischen Verschaltungen (Biomol, 1:1000), die Neurotransmitter Glutamat, GABA, Glycin und Serotonin (alle 1:1000, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Veh, Berlin), sowie die Neuropeptide Substanz P, Vasointestinales Polypeptid, Neuropeptid Y (alle 1:2000, Sigma). Als Sekundärantikörper zur Detektion der eingesetzten Primärantikörper dienen biotinylierte Immunglobuline aus der Ziege (1:400, DAKO). Der enzymatische Nachweis dieser Antikörperkomplexe erfolgte über Avidin konjugierte Meerrettich-Peroxydase (DAKO, 1:100) mit Diaminobenzidin (Sigma) und H_2O_2 (Merck) als Substrat.

Vitalmikroskopie

EBs wurden zu verschiedenen Zeiten nach Plattieren (2-20 Tage) in eine temperierte Kammer (37°C) transferiert, die auf dem Kreuztisch eines Inversmikroskops angebracht ist. Diese Kammer wurde für die Dauer der Beobachtung mit einer wasserdampfgesättigten Mischung aus 95% Luft / 5% CO_2 begast. Mit Hilfe einer computergestützten Bildaufnahme- und Analyseeinheit (Lucia M, Nikon) wurden in Zeitabständen von 30 Minuten Bilder ausgewählter Neuronenpopulationen digitalisiert und die morphologischen Veränderungen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von bis zu 24 Stunden analysiert.

Elektrophysiologie

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt (Hamill et al., 1981).

In der hier beschriebenen Untersuchung wurden EBs verschiedener Plattierungsstadien (2-15 Tage) verwendet. Dazu wurden sie in eine Perfusionskammer auf einem Inversmikroskop transferiert. Die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Die neuronalen Zellen wurden anhand ihrer charakteristischen Morphologie ausgewählt und elektrophysiologisch anhand eines für neuronale Zellen typischen Na^+ Einwärtsstromes charakterisiert, der mit Hilfe des Kugelfischgiftes Tetrodotoxin (TTX, 0,1 μM , RBI, UK) spezifisch blockiert werden kann. Die Ableitung der Zellen erfolgte mit Hilfe fein ausgezogener Glaskanülen (Patch Pipetten) aus Borosilikatglas (Jencons, Light Buz-

zard, UK) mit Pipettenwiderständen zwischen 3-5 MW.

Um die Ionenströme der Zelle elektrophysiologisch zu messen, wurde die „perforated patch“ Methode angewandt. Für diese Methode wird die Zelle nach dem Ansaugen der Zellmembran mit der Pipette durch das Einwirken des Fungizids Amphotericin B (Sigma, Deisenhofen) eröffnet. Über den Ableit-Verstärker (Axon Instruments, USA) wurde unter den Bedingungen der Spannungsklemme ein Haltepotential von -80 mV angelegt. Die Zellkapazität als Maß für die Oberfläche der Zellmembran wurde mit Hilfe von 2 ms langen Spannungsrampenpulsen von -80 zu -100 mV bestimmt.

Die Patchpipetten wurden mit einer K^+ -Lösung gefüllt, die folgende Substanzen enthielt: 20 mM K_4 -BAPTA, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 3 mM Mg_2ATP , 10 mM Hepes, der pH wurde mit KOH bei 37°C eingestellt auf 7,4. Die extrazelluläre Standardlösung enthielt: 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glukose, 10 mM Hepes, der pH wurde mit NaOH bei 37°C auf 7,4 eingestellt.

Das Rezeptorprofil der untersuchten Neurone wurde durch Zugabe der entsprechenden Transmitter bzw. Rezeptoragonisten (GABA, Glycin und Kainat für den Glutamatrezeptor) in die Extrazellulärlösung ermittelt.

Neurotoxizitätsstudie

Selektive Areale der EB Präparation mit neuronalen Netzen werden für mindestens 3 Stunden beobachtet, um den Fortschritt der neuronalen Differenzierung unter Beobachtungsbedingungen zu dokumentieren. Nach diesem Zeitraum wird durch Applikation des Glutamatrezeptoragonisten N-methyl-D-aspartic-acid (NMDA, Sigma, 500 μM) in das Inkubationsmedium eine Glutamatintoxikation simuliert. Nach 5 Minuten wird das Medium gewechselt, und die Effekte der mit Hilfe des NMDA Rezeptoragonisten simulierten Glutamatintoxikation werden in Zeitintervallen von 30 Minuten bis zur völligen Degeneration der neuronalen Zellen beobachtet.

3 Ergebnisse

Anordnung der Zellen des EB nach Plattierung

Sofort nach Plattieren des EB kommt es zu einem Anwachsen auf die mit Gelatine

beschichteten Deckgläschen. Durch diese Kontaktstimulation des plattierten EB läßt sich eine kontinuierliche Migration von Zellen aus einem zentralen Zellhaufen in die Peripherie beobachten. Dabei entspricht das Zentrum dem ursprünglichen Zellaggregat, das sich im hängenden Tropfen gebildet hat. Bei den auswachsenden Zellen handelt es sich um epitheliale Zellen, die einen nahezu zweidimensionalen Zellverband bilden (Abb. 2 a, b). Bereits 2 Tage nach Plattierung können über die Zytomorphologie dieser Zellen zwei konzentrische Zonen im Zellrasen unterschieden werden (Abb. 2c, d): i) eine intermediäre Zone mit Pflasterstein-ähnlichen polygonalen Zellen, und ii) eine äußere Zone, mit großen polymorphen Zellen. Mit fortschreitender Zeit nach Plattierung flacht sich die zentrale Zellansammlung durch ein kontinuierliches Auswandern von Zellmaterial in die Peripherie weiter ab.

Morphologische Charakterisierung neuronaler Zellen

Neurone lassen sich bereits zwei Tage nach Plattieren mit Hilfe von Antikörpern gegen NSE nachweisen. Die NSE positiven Zellen zeigen typische neuronale Morphologien, die sich aufgrund von Fortsatzbildung in apolare, bipolare und multipolare Neurone unterscheiden lassen. Apolare und bipolare Zellen finden sich vorzugsweise in der Intermediärzone auf den Pflasterstein-ähnlichen Zellen, wobei die apolaren Neurone häufig in sogenannten sekundären Zellclustern anzutreffen sind. Bipolare Neurone werden üblicherweise in der Nachbarschaft zu diesen Zellclustern apolarer Neurone angetroffen. Einige dieser bipolaren Zellen haben bereits untereinander neuronale Kontakte gebildet, was sich durch den immunhistochemischen Nachweis für Synaptophysin bestätigen läßt. Obwohl in der Intermediärzone überwiegend bipolare Zellen gefunden werden, kommen auch multipolare Zellen vor, ihre Dichte ist jedoch deutlich geringer. Die präferentielle Lokalisation dieses letztgenannten Zelltyps ist jedoch in der äußeren Zone auf den polymorphen Zellen der Untergrundschicht (siehe Schema Abb. 2b).

Die morphologische Charakterisierung der Nervenzellen zu verschiedenen Zeiten nach Plattierung zeigt, daß alle drei Phänotypen (apolar, bipolar, multipolar)

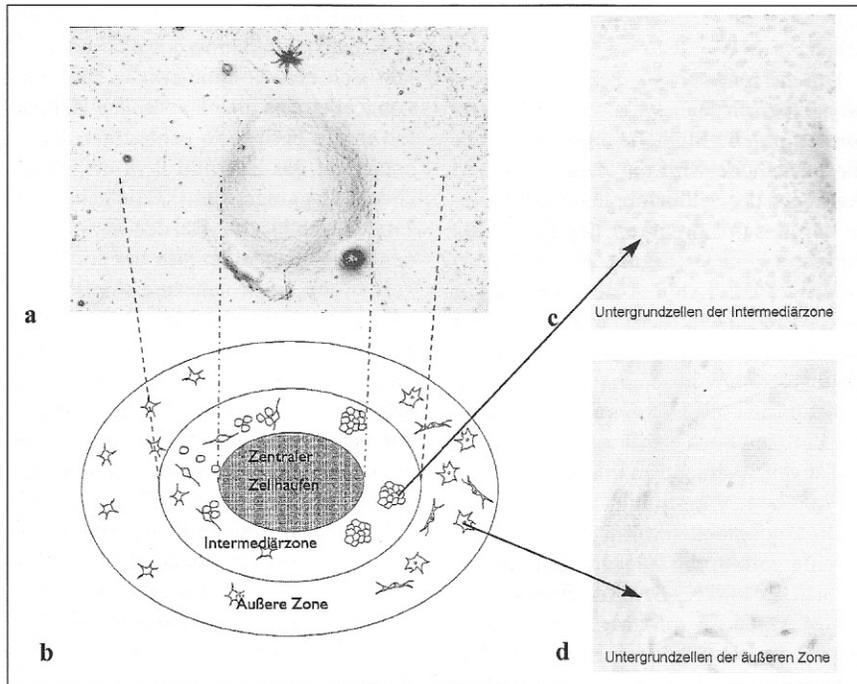


Abb. 2 (a) Abguß einer EB Präparation um den Tag 5 nach Plattieren zur Darstellung der räumlichen Organisation.

(b) Schematische Darstellung zur Einteilung des plattierten EBs in einen zentralen Zellhaufen sowie flächig ausgeprägter Intermediär- und äußerer Zone. Die Einteilung der konzentrischen Zonen nach den Phänotypen der Zellen des Zellrasens (Untergrundzellen) sind durch schematische Zellzeichnungen auf rechten Seite angedeutet. Die unterschiedlichen Morphologien dieser Zellen (polygonal und multiform) sind in den mikroskopischen Aufnahmen deutlich zu erkennen (c und d). Auf der linken Seite des Schemas (b) sind die verschiedenen neuronalen Zelltypen und ihre Verteilung angedeutet, wobei in der Intermediärzone hauptsächlich a- und bipolare Zellen lokalisiert sind, während sich multipolare Neurone vorwiegend in der äußeren Zone finden.

während des gesamten Untersuchungszeitraumes (2-21 Tage nach Plattieren) angetroffen werden können, daß aber die prozentualen Häufigkeiten sich mit zunehmendem Alter zugunsten des multipolaren Zelltyps verschieben (vergleiche Absatz zur Vitalmikroskopie).

Charakterisierung der Zellen nach ihrem Gehalt an Neurotransmittern und Neuropeptiden

Zeitgleich mit dem Auftreten von NSE positiven Zellen ab dem Tag 2 nach Plattierung lassen sich bipolare und multipolare Neurone immunhistochemisch nachweisen, die sowohl exzitatorische (Glutamat, Serotonin) als auch inhibitorische Transmitter (GABA, Glycin) synthetisieren (Abb. 3a-d). In apolaren Zellen kann jedoch während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Immunpositivität für die o.g. Neurotransmitter, sondern nur für NSE nachgewiesen werden. Eine genauere morphologische Analyse der immunhistochemisch gefärbten Nervenzellen mit Hilfe von Zell-Zeichnungen ergibt eine strenge Korrelation von Phänotyp und Neurotransmittergehalt (Abb. 3e). Zellen, bei denen immunhistochemisch der Transmitter Glutamat nachgewiesen wurde, sind ausschließlich vom multipolaren Phänotyp und überwiegend in der äußeren Zone lokalisiert. Demgegenüber sind Zellen mit dem Transmitter GABA entweder bipolar

oder multipolar, wobei entsprechend den o.g. Zonen im EB die bipolaren Neurone in der Intermediärzone und die multipolaren Zellen eher in der äußeren Zone aufzufinden sind.

Vitalmikroskopische Zellbeobachtung

Mit Hilfe der vitalmikroskopischen Zellbeobachtung kann kurz nach Plattierung das Auswandern sich differenzierender neuronaler Zellen aus der zentralen Zellmasse des EBs direkt beobachtet werden. Diese Zellwanderungen laufen entlang fester Leitstrukturen in die Peripherie, wo die Zellen ihre weitere Differenzierung erfahren (Abb. 4). Die Wanderungsgeschwindigkeit beträgt 20-30 μm pro Stunde.

Ausgehend von einer zeitabhängigen, immunhistochemisch detektierbaren Zunahme an morphologisch differenzierten, d.h. bipolaren und multipolaren Zellen erlaubt die vitalmikroskopische Beobachtung auch den direkten Nachweis einer Morphogenese individueller Neurone von apolaren (Abb. 4a) zu bi- (Abb. 4b) bzw. multipolaren Neuronen (Abb. 4c). Dabei werden die Zellen über mehrere Stunden bis Tagen in Aufnahmeintervallen von 30 Minuten über ein computergestütztes digitales Aufnahmeverfahren als Bilddateien abgespeichert. Phänotypische Veränderungen lassen sich in kurzen Zeiträumen beobachten. Die vitalmikroskopische

Analyse (Abb. 5) zeigt, daß apolare Zellen (Abb. 5a), die sich entweder aus dem zentralen Zellhaufen oder aus einem Sekundärcluster gelöst haben und damit typischerweise in der Intermediärzone angesiedelt sind, innerhalb von 1-2 Stunden eine Morphogenese zu pseudounipolaren Neuronen (Abb. 5b) durchmachen. Weitere 2 Stunden später erfährt dieselbe Zelle, die durch ihre Lage zu den benachbarten Zellen identifiziert wird, eine phänotypische Veränderung zu einer bipolaren Zelle (Abb. 5c). Nach ca. 4-5 Stunden entsteht aus dem bipolaren Neuron eine multipolare Zelle, die über ihre Fortsätze Kontakt zu Nachbarnervenzellen aufnimmt (Abb. 5d). Dabei beträgt die Geschwindigkeit der Fortsatzbildung ca. 1-3 μm pro Fortsatz innerhalb von einer Stunde. Der letzte Schritt, also die Umwandlung von der bipolaren zur multipolaren Zelle, kann jedoch unterbleiben, so daß die Differenzierung der Zelle zum bipolaren Neuron ebenfalls ein endgültiges Differenzierungsstadium darstellen kann.

Elektrophysiologische Charakterisierung der Nervenzellen

Die elektrophysiologische Charakterisierung der zunächst morphologisch identifizierten Neurone zeigt, daß sie alle einen für neuronale Zellen typischen Na^+ Einwärtsstrom besitzen. Der Strom kann auf-

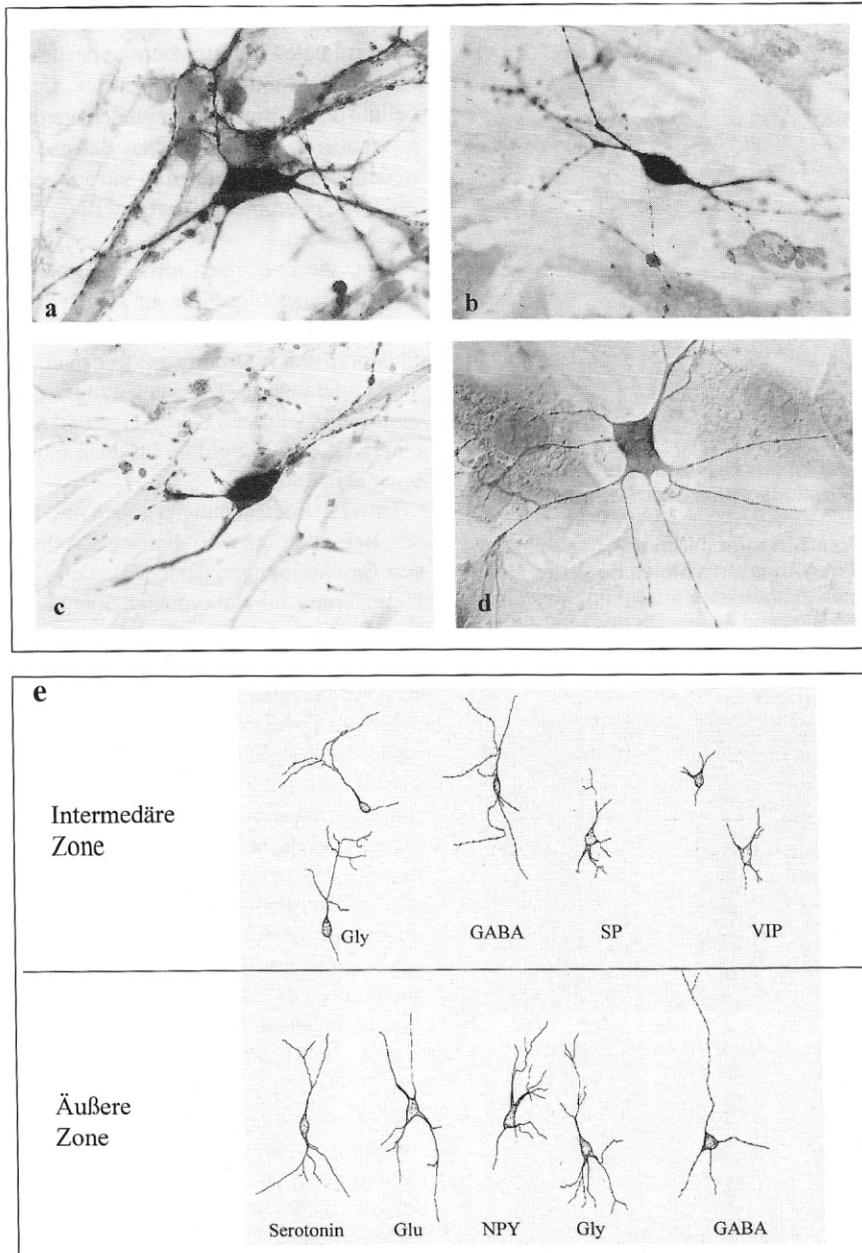


Abb. 3 Immunhistochemische Darstellung von Neuronen mit Antikörpern gegen (a) Glutamat, (b) Serotonin, (c) Glycin und (d) GABA als Neurotransmitter.

(e) Zellzeichnungen zur Darstellung einer Korrelation von neuronalen Phänotypen und Ausstattung mit verschiedenen exzitatorischen (Glutamat, Serotonin) und inhibitorischen Neurotransmittern (Glycin, GABA) bzw. Neuropeptiden (Vasointestinales Polypeptid/VIP, Substanz P/SP, Neuropeptid Y/ NPY) und ihr präferentielles Vorkommen in der Intermediär- oder äußeren Zone.

grund seiner Inhibierbarkeit durch den selektiven Na^+ Kanalblocker TTX, durch den der Strom bereits in niedrigen Konzentrationen ($0,1 \mu\text{M}$) vollständig gehemmt wird, zweifelsfrei als Na^+ Strom identifiziert werden (Abb. 6a).

Darüber hinaus kann in den Neuronen des EB die Existenz verschiedener Ionenkanäle, die an einen Rezeptor gekoppelt

sind, nachgewiesen werden (Abb. 6b). Die entsprechende Rezeptorantwort wird durch die extrazelluläre Applikation entsprechender Neurotransmitter wie GABA, Glycin und Kainat als Agonist für Kainat sensitive sogenannte AMPA-Glutamat-Rezeptoren ausgelöst. Dabei fällt auf, daß in der Mehrzahl der untersuchten Neuro-

torischen und inhibitorischen Neurotransmitter des Zentralnervensystems exprimiert werden. Die Detektion dieser Rezeptoren erfolgt bereits in sehr frühen Stadien nach Plattierung (2 Tage), wenn vorwiegend apolare Neurone dominieren und in diesen Zellen immunhistochemisch noch keine Neurotransmitter detektiert werden können. Es werden jedoch zu keinem Zeitpunkt nikotinische Cholinrezeptoren, die durch Acetylcholin aktiviert werden, gefunden.

Analyse der Glutamat induzierten Neurotoxizität über die vital-mikroskopische Zellbeobachtung

Neuronal differenzierte ES Zellen werden für 5 Minuten in Anwesenheit des Glutamatrezeptoragonisten NMDA ($500 \mu\text{M}$) inkubiert und direkt danach wieder in NMDA freies Medium überführt und in die Beobachtungskammer verbracht. Mit dem vitalmikroskopischen Zellbeobachtungssystem wird die Kultur vor und nach NMDA-Inkubation beobachtet. Die Auswertung der off-line Analyse (Abb. 7 a-d) ergibt eine deutliche zytomorphologische Veränderung nach ca. 3 Stunden. Die meisten Zellen, insbesondere bi- und multipolare Neurone, weisen degenerative Veränderungen auf; sie ziehen innerhalb von 3 Stunden ihre Fortsätze zurück, runden sich ab und lagern sich in Clustern von apolaren Zellen zusammen. Nach weiteren 3 Stunden haben sich die Zellen von der Zellunterlage abgelöst und lassen sich nur noch als Zelltrümmer nachweisen. Im Gegensatz zu dem Rückgang neuronaler Zellen zeigen die nicht-neuronalen Zellen des zentralen Zellhaufens bzw. die Zellen des unterliegenden Zellrasens weiterhin die Tendenz zur Zellproliferation. ((Abb. 7a-d))

4 Diskussion

ES Zellen der Zelllinie BLC-6 differenzieren nach Retinsäure-Induktion in Neurone mit einer Vielzahl von morphologisch und immunzytochemisch unterschiedlichen Eigenschaften. Die phänotypische Differenzierung dieser Neurone erfolgt nach einem Auswandern von apolaren Neuronen aus der zentralen Zellmasse in die Peripherie. Dabei finden sich bipolare und einige multipolare Zellen vorzugsweise in der Intermediärzone, während in der äußeren Zone hauptsächlich multipolare

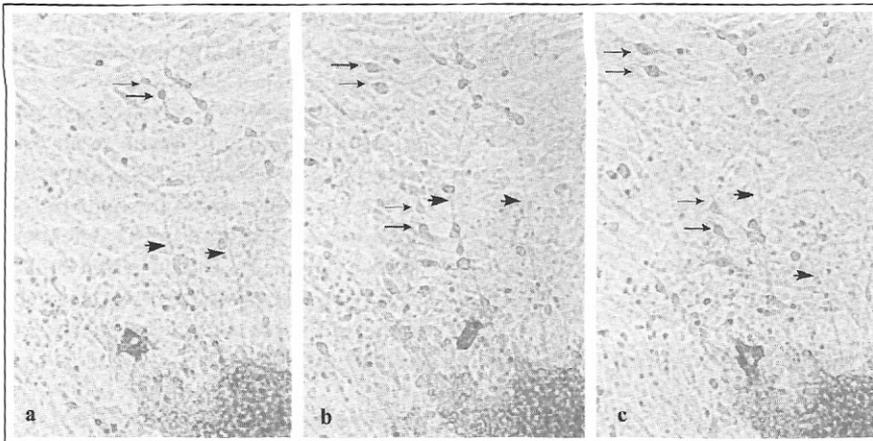


Abb. 4 Neuronale Wanderung von apolaren Neuronen aus dem zentralen Zellhaufen in die Peripherie auf festen, radial angeordneten Migrationsrouten nach Beobachtungsintervallen von jeweils 3 Stunden.

Apolare Zellen verlassen diese Routen nach Erreichen ihrer Terminationsgebiete, die entweder in der Intermediärzone oder in der äußeren Zone am distalen Ende der Migrationsrouten (große Pfeile) liegen können. In diesen Zielgebieten erfolgt ihre morphologische Reifung (kleine Pfeile). Im unteren rechten Bildrand ist jeweils der zentrale Zellhaufen erkennbar.

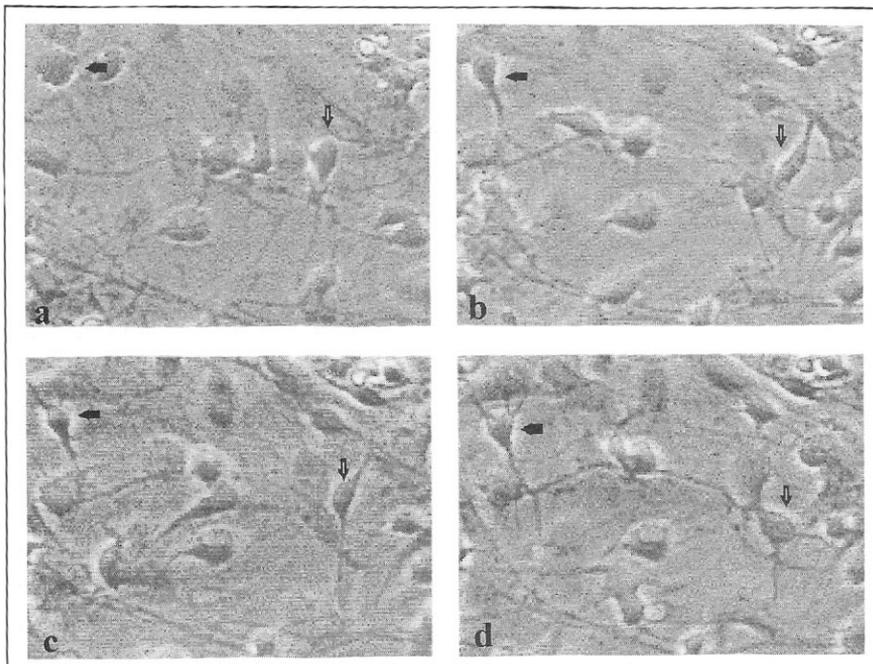


Abb. 5 Lebendbeobachtung neuronaler Differenzierung über einen Zeitraum von 12 Stunden (a-d) zeigt die Morphogenese von (a) apolaren über (b, c) bi- zu (d) multipolaren Neuronen (Pfeile).

Neurone zu finden sind. Diese räumlich abhängige Differenzierung von neuronalen Phänotypen zeigt, daß über die Induktion durch die Retinsäure hinaus auch systemimmanente Faktoren existieren, die die Neurodifferenzierung beeinflussen. Dabei kommt insbesondere den Zellen des Zellrasens, der den Neuronen als Substrat dient, eine entscheidende Rolle zu. Unse-

re Untersuchungen zur Gliogenese in Stammzellpräparationen zeigen, daß unter den substratbildenden Zellen immunhistochemisch unterschiedliche Populationen glialer Zellen vorkommen (Angelov et al., 1998).

Obwohl die Differenzierungsprozesse im EB in einer räumlich abhängigen Weise ablaufen, können keine Anhaltspunkte

für eine Kompartimentierung im Sinne einer terminalen Differenzierung bestimmter Hirnabschnitte wie z.B. Cortex, Cerebellum oder Hirnstamm gefunden werden. Es ist also davon auszugehen, daß es sich in dem hier verwendeten *in vitro* System um frühe neuronale Differenzierungsprozesse handelt.

Trotz dieser frühen Entwicklungsstadien der untersuchten Neurone zeigen diese aber bereits eine feste Zuordnung von Phänotyp und Neurotransmittergehalt. So sind glutamaterge Neurone vorzugsweise multipolar, während GABAerge und glycinerge Zellen sowohl bi- als auch multipolar sein können.

Unsere Untersuchungen gehen mit diesen Befunden über die bereits bestehenden Beschreibungen der neuronalen Differenzierung aus embryonalen Stammzellen (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; van Inzen et al., 1996; Strübing et al., 1995) hinaus, in denen weder auf die neuronale Diversität noch auf eine Korrelation der neurochemischen Eigenschaften mit bestimmten Morphologien eingegangen wird. Die von uns beschriebene Korrelation jedoch entspricht Befunden zum Zentralnervensystem. So ist beispielsweise der Neurotransmitter Glutamat typischerweise in multipolaren Projektionsneuronen des cerebralen Cortex zu finden, über die subcorticale Zielstrukturen angesteuert werden (Divac et al., 1977; Ottersen, 1991; Storm-Mathisen und 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 GABA synthetisierender Zellen *in vivo* stark vom Netzwerk des jeweiligen Hirnabschnittes abhängig ist (siehe Mugnainy und Oertel, 1985; Freed, 1992).

Die Mechanismen, die für die beobachtete typische Verteilung neurochemisch definierter Neurone verantwortlich gemacht werden, sind noch weitgehend unbekannt. Unsere Befunde über eine Rezeptorausstattung bei gleichzeitigem Fehlen jeglicher Transmitter in apolaren, juvenilen Neuronen weisen auf einen grundlegenden Mechanismus der neuronalen Ontogenese hin. Tatsächlich lassen auch Befunde aus *in vivo* Untersuchungen den Schluß zu, daß die Rezeptorausstattung, die schon vor dem Einwachsen entspre-

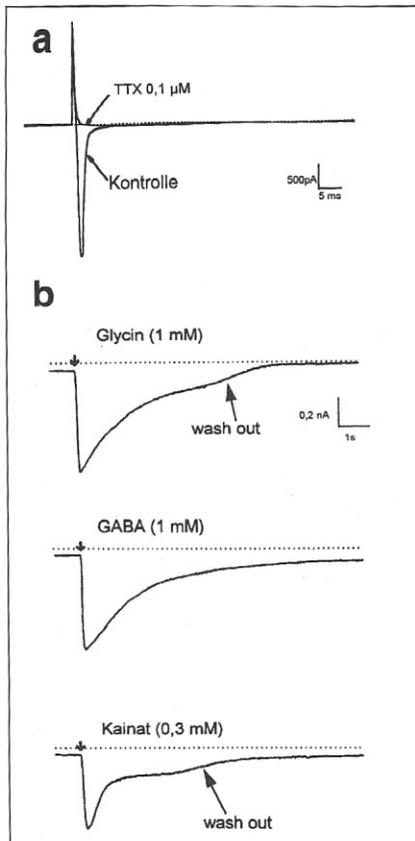


Abb. 6 (a) Elektrophysiologischer Nachweis der Existenz des für Nervenzellen typischen schnellen Na^+ -Einwärtsstroms, der über TTX hemmbar ist.

(b) Für die so identifizierten Nervenzellen lassen sich verschiedene Neurotransmitter-Rezeptoren über die Aktivierung rezeptorgekoppelter Ionenkanäle durch Applikation spezifischer Rezeptoragonisten nachweisen.

chender 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). Darüber hinaus spielen sicherlich noch andere, lokale Faktoren für die terminale Differenzierung der Neurone eine Rolle.

Für die Bearbeitung der Fragestellungen nach einer Determination von Neuronen über lokale Faktoren bietet sich das hier vorgestellte *in vitro* Modell an. Erste Hinweise lassen auf ein Zusammenspiel mit glialen Zellen schließen. So kommen zu frühen Zeitpunkten überwiegend radiale Gliazellen vor, die sich radial von der zentralen Zellmasse in die Peripherie erstrecken (Andressen et al., 1998), während gliale Zellen wie Typ1- bzw. Typ2-Astrozyten sowie Oligodendrozyten (nach Ca-

meron und Rakic, 1991), aber auch Mikrogliazellen, eine Zonenabhängigkeit aufweisen (Angelov et al., 1998)

Mit Hilfe der vitalmikroskopischen Zellbeobachtung lassen sich nicht nur physiologische, sondern auch pathophysiologische Veränderungen unmittelbar studieren. Unsere Befunde über die Glutamat induzierte Neurotoxizität zeigen, daß das Modell der ES-Zellen, in dem die Neurone mit allen Zellen ihrer Umgebung einschließlich Gliazellen in Kontakt treten können, für toxikologische Fragestellungen besonders geeignet ist. In einer weiteren neuropharmakologischen Fragestellung untersuchen wir zur Zeit den Einfluß von Glucocorticoiden auf die Calcium-Homöostase und die damit verbundenen Einflüsse auf

Neuritenwachstum und Zelldifferenzierung. Ebenso wird in einem weiteren Versuch die Wirkung von proliferativen und antiproliferativen Faktoren (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor und Stickstoffmonoxyd) auf die neuronale Reifung untersucht.

Unsere Befunde zeigen, daß der exzitatorische Glutamatrezeptoragonist NMDA ein bemerkenswert potentes, schnellwirkendes Neurotoxin in der embryonalen Stammzellkultur darstellt. Nach Applikation von $500\mu\text{M}$ NMDA können nach einem Beobachtungszeitraum von 3 Stunden bereits deutliche Schädigungen und nach weiteren 3 Stunden ein vollständiges Verschwinden der Neuronen beobachtet werden. Die eingesetzte NMDA Kon-

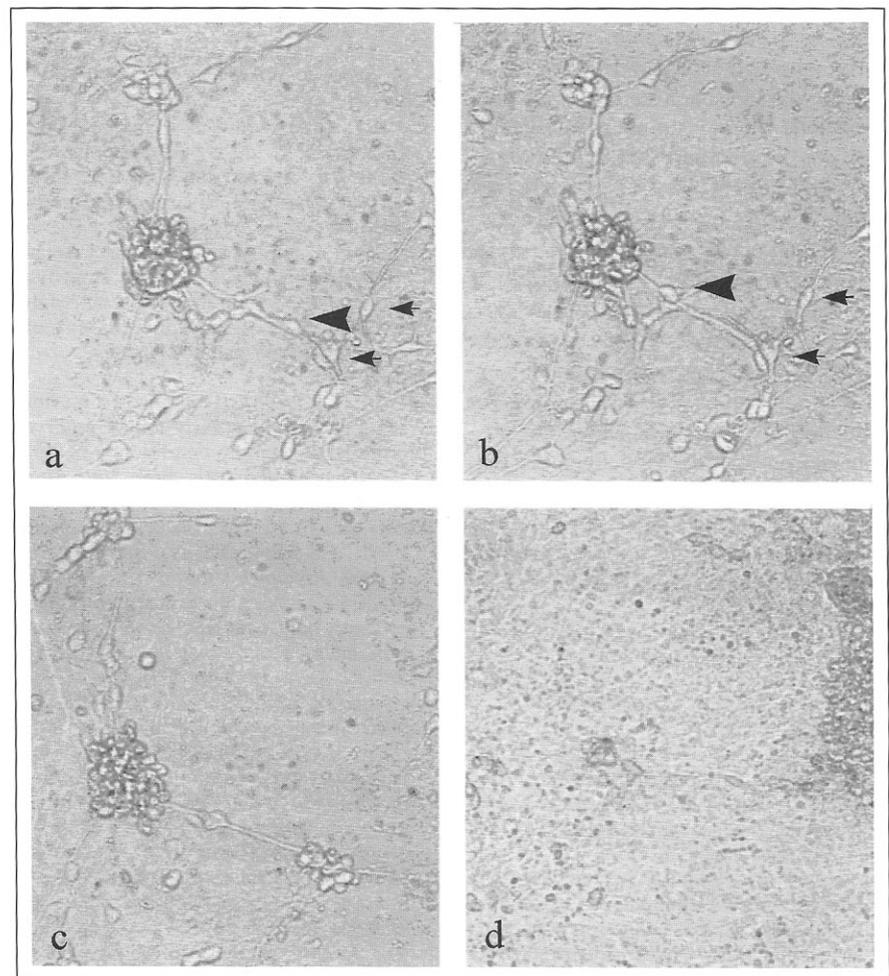


Abb. 7 Neurotoxische Veränderungen nach Applikation des Glutamat-Agonisten NMDA. **(a,b)** Während die neuronalen Zellen innerhalb des Beobachtungszeitraums vor Applikation keine degenerativen Veränderungen zeigen, kommt es **(c)** nach Applikation zu einer initialen Retraktion von Zellfortsätzen innerhalb von 3 Stunden und **(d)** verzögerter Degeneration der apolaren Nervenzellen innerhalb eines Zeitraums von weiteren 3 Stunden, während die nicht-neuronalen Zellen des Zellrasens sowie des zentralen Zellhaufens (rechter Bildrand) keine Degenerationserscheinungen aufweisen bzw. weiter proliferieren.



zentration beträgt in diesem Ansatz maximal die Hälfte der Glutamatkonzentration von 1 mM, die normalerweise in den terminalen Nervenendigungen des ZNS gefunden wird (Waelch, 1951; siehe auch Cote und Crutcher, 1991). 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 im EB Modell deutliche Degenerationserscheinungen in unserem Versuchsansatz zeigen, kann auf den längeren Beobachtungszeitraum unserer Untersuchungen (bis zu sechs Stunden nach Toxingabe) zurückgeführt werden.

Diese Befunde zeigen, daß sich mit dem Modell der embryonalen Stammzellkultur sowohl neuronale Entwicklungsprozesse als 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 ist dieses *in vitro* Modell ein geeignetes System, um neurotoxikologische Fragestellungen unter Umgehung einer erheblichen Anzahl von Tierversuchen zu bearbeiten. Dabei vereinigt das System des EB die Vorteile der beiden anderen Untersuchungsbedingungen (Entwicklungsdynamik analog zur Situation, wie sie im lebenden Organismus auftritt und Zugänglichkeit der Zellen, wie dies nur in der Zellkultur möglich ist), so daß es sich als Routine-Modell zur Untersuchung embryoneurotoxischer Substanzen (Ethanol, Glucocorticoide) anbietet.

Literatur

- Andressen, C., Arnhold, S., Hescheler, J. und Addicks, K. (1998). Gliogenese in embryonalen Stammzellen. *Anat. Anz.* 180, 77, Suppl.
- Angelov, D. N., Arnhold, S., Andressen, C., Grabsch, H., Puschmann, M., Hescheler, J. und Addicks, K. (1998). Temporospacial relationships between macroglia and microglia during *in vitro* differentiation of murine stem cells. *Dev. Neurosci.* 20, 42-51.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. und Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev. Biol.* 168, 342-357.
- Cameron, R. S. and Rakic, P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4, 124-137.
- Choi, D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369-379.
- Cote, L. and Ceutcher, M.D. (1991). The Basal Ganglia. In E. R. Kandel, J. H. Schwartz and T. M. Jessel, ed., *Principle of Neuroscience* (647-659). New York: Elsevier.
- Divac, I., Fonnum, F., Storm-Mathisen, J. (1977). High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature* 24, 377-378.
- Evans, J. and Kaufmann, M. H. (1981). Establishment and culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fraichard A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P. and Samarut, J. (1995). *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glia cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* 108, 3181-3188.
- Freed, M. A. (1992). GABAergic circuits in the mammalian retina. In R. R. Minze, R. E. Marc and A. M. Sillito, eds., *Progress in Brain Research* Vol. 90, 107-131 Amsterdam: Elsevier.
- Gosslar, A., Joyner, A. L., Rossant, J. and Skanes, W. C. (1989). Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* 244, 463-465.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100
- 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.
- Moser, N., Wevers, A., Lorke, D. E., Reinhardt, S., Maelicke, A., Schröder, 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.
- Mugnaini, E. und Oertel, W. H. (1985). An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminates in the rat. In A. Björklund and T. Hökfelt, eds., *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Vol. 4, 436-608). Amsterdam: Elsevier.
- Ostermann, C. H., Grunwald, J., Wevers, A., Lorke, D. E., Reinhardt, S., Maelicke, A., 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.
- Ottersen, O.P. (1991). Excitatory amino acid neurotransmitters: anatomical system. In B. Meldrum, ed., *Excitatory Amino Acid Antagonists* (14-38). Oxford: Blackwell.
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H., Hescheler, J. and Wobus, A. M. (1994). Myogenesis *in vitro*: Developmental expression of skeletal muscle determination genes and ionic currents in embryonic stem cell (ESC)-derived myocytes. *Dev. Biol.* 164, 87-33.
- Rossant, J. and Chapman, V. M. (1983). Somatic and germline mosaicism in interspecific chimaeras between *Mus musculus* and *Mus caroli*. *Embryol. Exp. Morphol.* 73, 193-205.
- Spitzer, N. C. (1995). Spontaneous Activity: Functions of calcium transients in neuronal differentiation. *Perspectives on developmental Neurobiology* 2, 379-386.
- Storm-Mathisen, A., Vaglum, P. (1994). Conduct disorder patients 20 years later: a personal follow-up study. *Acta Psychiatr Scand* 89, 416-420.
- Strübing, C., Wobus, A. M. und Hescheler, J. H. (1995). Etablierung eines „in vitro“ Modellsystems zur Differenzierung synaptisch verknüpfter Nervenzellen aus pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus. *Altex* 12, 129-137.
- Suda, Y., Suzuki, M., Ikawa, Y. and Aizawa, S. (1987). Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *J. Cell Physiol.* 133, 197-201.
- Thomas, K. R. and Capecchi, M.R. (1987). Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo cell derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- van Inzen, W., Peppelenbosch, M. P., van den Brand, M. W. M., Tertoolen, L. G. J. and de Laat, S. W. (1996). Neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1312, 21-26.
- Wobus, A. M., Rohwedel, J., Maltsev, V. und Hescheler, J. (1988) *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes and skeletal muscle cells modulated by retinoic acid. *Roux Arch. Dev. Biol.* 204, 36-45.

Danksagung

Diese Arbeit wurde gefördert von der Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (set, Mainz) und durch das Köln Fortune Programm der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln (57/1996). Wir danken Frau Faulhaber für die Unterstützung in der Zellkultur und Frau Siodlaczek für die technische Hilfe bei der Immunocytochemie.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Jürgen Hescheler
 Institut für Neurophysiologie der
 Universität zu Köln
 Robert-Koch-Straße 39
 D-50931 Köln
 e-mail: jh@physiologie.uni-koeln.de