



Etablierung eines *in vitro* Modellsystems zur Differenzierung synaptisch verknüpfter Nervenzellen aus pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus

Carsten Strübing¹, Anna M. Wobus² und Jürgen Hescheler^{1,3}

¹Institut für Pharmakologie, FU Berlin, ²Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben und ³Institut für Neurophysiologie, Universität zu Köln

Zusammenfassung

Die Untersuchung grundlegender Differenzierungsprozesse und toxischer Wirkungen während der embryonalen Neurogenese wird bis heute durch den Mangel an adäquaten zellulären Modellsystemen erschwert. Neurone aus frühen Stadien der Embryogenese können nur in geringen Mengen und unter erheblichem Einsatz von Tieren gewonnen werden. Permanente Tumorzelllinien, die in neuron-ähnliche Zelltypen differenzieren können, stellen nur eine beschränkte Alternative zum Einsatz embryonaler Primärkulturen dar. Keine der bekannten permanenten Zelllinien ist in der Lage, vollständig differenzierte, synaptisch verknüpfte Nervenzellen *in vitro* zu bilden.

Eine neue Möglichkeit zum Studium von Entwicklungsprozessen auf zellulärer Ebene bieten pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen¹), die grundsätzlich Zellen aller drei Keimblätter bilden können. Die erfolgreiche Differenzierung von Nervenzellen aus ES-Zellen wurde bisher noch nicht detailliert beschrieben. Durch Nutzung der ES-Zelllinie BLC 6 und Kultivierung der Zellen in embryo-ähnlichen Aggregaten (embryoid bodies) ist es uns gelungen, *in vitro* neuronale Zellen mit einer hohen Effektivität zu differenzieren. Eine elektrophysiologische Charakterisierung der BLC 6-abgeleiteten Neurone zeigt, daß diese Zellen die komplexen elektrischen Eigenschaften postmitotischer Nervenzellen besitzen und durch inhibitorische und exzitatorische Synapsen funktionell gekoppelt sind. Das BLC 6 Modell dürfte das derzeit einzige zelluläre Entwicklungsmodell darstellen, das Untersuchungen von einer pluripotenten Stammzelle bis zur terminal differenzierten Nervenzelle erlaubt.

Summary: Establishment of an in vitro model system for the differentiation of synaptically coupled neurons from mouse embryonic stem cells.

The investigation of fundamental differentiation processes and toxic effects during the neurogenesis in the embryo is still difficult, since there are only a few suitable cellular model systems available so far. The isolation of neurons from early embryonic origin results in a very small amount of cells and a high number of laboratory animals is required for this purpose.

Permanent tumor cell lines, able to differentiate into neuron-like cell types, are only a limited alternative for the use of primary cultures. None of the known permanent cell lines is capable to form terminally differentiated, synaptically coupled neurons in vitro.

Embryonic stem (ES) cells can generate cell types of all three germ layers and provide a new possibility to study developmental processes on a cellular level. Nevertheless the successful differentiation of neurons from ES cells has not been shown.

By using the ES cell line BLC 6 and cultivation of the cells in embryo-like aggregates (embryoid bodies), we were able to differentiate efficiently neuronal cells in vitro. The electrophysiological characterisation of the BLC 6-derived neurons shows that these cells carry the complex electrical properties of postmitotic neurons and are coupled by inhibitory and excitatory synapses. The BLC 6 model probably represents the only developmental cell model suitable for studies from pluripotent stem cells to terminal differentiated neurons.

Keywords: Embryonic stem cells, neuronal development, electrophysiology, ionic channels, neurotoxicity

¹ Abkürzungen: AMPA, (\pm)-a-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionsäure; AP-5, (\pm)-2-Amino-5-phosphonopentansäure; Bicucullin, (-)-Bicucullinmethchlorid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion; EB, embryoid body; ES-Zellen, embryonale Stammzellen-;

(D)MEM Dulbeccos minimal essential medium; FKS, fötales Kälberserum; GABA, g-Aminobuttersäure; I_K , I_{Na} , I_{Ca} , spannungsabhängige K^+ , Na^+ und Ca^{2+} -Ströme; NMDA, N-methyl-D-aspartat; RA, all-trans Retinolsäure; TTX, Tetrodotoxin; ZNS, Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die ontogenetische Entwicklung des zentralen Säugernervensystem (ZNS) ist ein hochkomplexer und vielfältig regulierter Prozeß. Unser Wissen über die molekularen Grundlagen dieser Differenzierungsprozesse, insbesondere während der frühen embryonalen Neurogenese, ist bis heute aber nur sehr beschränkt (McKay, 1989; Luskin, 1994).

Aufgrund der hohen Durchlässigkeit der Plazentaschranke ist der sich entwickelnde Embryo fast allen durch den mütterlichen Organismus aufgenommenen Substanzen zugänglich. Besonders in den frühen Stadien der Embryogenese führen teratogene und embryotoxische Einflüsse zu schweren Mißbildungen oder zum pränatalen Tod. Das ZNS stellt dabei einen der sensibelsten Punkte für pränatale Schädigungen dar. Aus diesem Blickwinkel ist es von großem Interesse, mehr über die embryonalen Differenzierungsmechanismen und damit über mögliche Ansatzpunkte embryoschädigender Substanzen während der Neurogenese zu erfahren.

Obwohl es in den vergangenen Jahren gelungen ist, einige Vorläuferzellen neuronaler Zelltypen aus dem Embryo zu isolieren und zu kultivieren (Temple und Raff, 1985; Anderson und Axel, 1986; Temple, 1989), besteht ein Hauptproblem beim Studium der frühen neuronalen Entwicklung weiterhin in der Zugänglichkeit geeigneten Zellmaterials.

Die Isolation von frühen primären embryonalen Zellen erfordert einen sehr hohen Einsatz an Tieren, und die Zahl der gewonnenen Zellen ist in der Regel so gering, daß keine biochemischen oder molekularbiologischen Methoden zu ihrer Untersuchung eingesetzt werden können. Ein Mäuseembryo besteht am Tag 8 nach Befruchtung, einem Zeitpunkt, an dem sich bereits erste neuronale Zelltypen gebildet haben, aus ungefähr 25.000 Zellen. Bei einer Einzelzellpräparation könnten aus diesem Stadium etwa 0.1% neuronale

Zellen gewonnen werden, d.h. 25 Zellen!

Die Nutzung permanenter Tumorzelllinien ermöglicht eine einfache Kultivierung und Gewinnung relativ großer Zellmengen für biochemische Untersuchungen und toxikologische Screeningverfahren. Eine ganze Reihe solcher Linien, abgeleitet von neuronalen bzw. neuroendokrinen Tumoren (z.B. PC12, SHSY-5Y) oder Teratokarzinomen (P19, NT2), kann zu Neuronen-ähnlichen Zellen differenziert werden. Allerdings ist das Differenzierungspotential dieser Zelllinien beschränkt, und die gebildeten neuronalen Zellen unterscheiden sich in wichtigen Merkmalen von reifen Nervenzellen, es fehlt z.B. eine Kopplung durch funktionelle Synapsen.

Einen neuen Zugang zum Studium früher embryonaler Entwicklungsstadien bieten ES-Zelllinien (Evans und Kaufman, 1981). Diese Zellen können als „selbsterneuernde“ Stammzellen permanent in Kultur vermehrt werden. Sie vereinigen die Vorteile einer permanenten Zelllinie nichttransformierten pluripotenten Phänotyps mit der Fähigkeit, *in vitro* in Zelltypen aller drei primären Keimblätter differenzieren zu können (Doetschmann et al., 1985; Wobus und Hescheler, 1992; Maltsev et al., 1994; Rohwedel et al., 1994).

In der vorliegenden Studie nutzten wir die ES-Zelllinie BLC 6 (Wobus et al., 1988) zur *in vitro* Differenzierung neuronaler Zellen. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik, einer hochempfindlichen elektrophysiologischen Meßmethode, konnten wir zeigen, daß die aus BLC 6 Stammzellen abgeleiteten Neurone alle wesentlichen Eigenschaften differenzierter Nervenzellen, inklusive der synaptischen Kopplung besitzen.

Das BLC 6 Modell bietet damit nicht nur neue Möglichkeiten zur Untersuchung zellulärer Entwicklungsvorgänge, sondern stellt auch ein relativ einfaches System zur Testung toxischer Substanzen während der Nervenzelldifferenzierung dar.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur und Zelldifferenzierung:

BLC 6 Stammzellen wurden auf embryonalen Mausfibroblasten als „feeder layer“ kultiviert (Rohwedel et al., 1994) und in einem Abstand von 2 Tagen passagiert. Zur Differenzierung wurden die Zellen in embryo-ähnliche Aggregate (*embryoid bodies*) überführt. Das angewandte Differenzierungsprotokoll wird in Abbildung 1 beschrieben. Alle im folgenden angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf das Plattieren der *embryoid bodies* (EBs) in Multiwell-schalen. Während der Differenzierung wurden die Zellen in (D)MEM (Biochrom, Berlin, FRG), supplementiert mit 20% fötalem Kälberserum (FKS, Gibco BRL, Eggenstein, FRG), 2 mM Glutamin (Gibco BRL), nichtessentiellen Aminosäuren (Stocklösung 1:100, Biochrom), 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom) und 50 µM β -Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, FRG), gehalten.

2.2 Elektrophysiologie:

EBs, kultiviert für 2 bis 20 Tage auf gelatinisierten Deckgläsern, wurden in eine Perfusionskammer (4 ml/min) transferiert und die neuronalen Zellen in den EB-Ausläufern identifiziert. Ganzzell-Patch-Clamp-Experimente [Hamill et al., 1981] wurden bei 37°C durchgeführt (mit Ausnahme von Experimenten zur Bestimmung der TTX-Sensitivität von Na⁺-Kanälen, die bei 8°C durchgeführt wurden). Patch-Pipetten mit Pipettenwiderständen zwischen 3 und 6 M Ω wurden aus Borosilikatglas-kapillaren (Jencons, Leight Buzzard, UK) hergestellt. Ionenströme wurden mit einem List LM / EPC 7 Patch-Clamp-Verstärker (List Electronics, Darmstadt, FRG) sowie dem CED Interface (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) aufgezeichnet. Die Zellkapazitäten wurden durch 2 ms lange Spannungs-rampenpulse von -80 zu -100 mV

bestimmt. Die Daten wurden gefiltert (3 kHz) und auf Harddisk oder DAT-Recorder gespeichert. *Off line* Datenanalyse wurde mit Hilfe der CED Software und SigmaPlot 5.0 (Jandel Corp., Corte Madeira, USA) durchgeführt. Statistische Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Die Patchpipetten wurden mit einer K^+ -Lösung (II) gefüllt, die folgende Substanzen enthielt: 20 mM K_4 -BAPTA, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 3 mM Mg_2ATP , 10 mM Hepes, pH eingestellt auf 7.4 mit KOH bei 37°C. Für die Isolation von einwärtsgerichteten Ba^{2+} - und Na^+ -Strömen verwendeten wir eine Cs^+ -Pipettenlösung mit: 120 mM CsCl, 1 mM $MgCl_2$, 3 mM Mg_2ATP , 10 mM Hepes, 10 mM EGTA, pH 7.4 eingestellt mit CsOH bei 37°C.

Die extrazelluläre Standardlösung (E1) enthielt: 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glukose, 10 mM Hepes, pH eingestellt auf 7.4 mit NaOH bei

37°C. Ströme durch NMDA-Rezeptoren wurden in einer modifizierten extrazellulären Lösung (E1-0Mg) bestimmt, die wie E1 zusammengesetzt war, jedoch kein $MgCl_2$ enthielt.

Für die Messung von Ba^{2+} -Strömen durch Ca^{2+} -Kanäle wurde eine Lösung mit: 120 mM D(-)-N-Methylglukamin, 10.8 mM $BaCl_2$, 5.4 mM CsCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glukose, 10 mM Hepes, pH eingestellt auf 7.4 mit HCl bei 37°C, benutzt.

Isradipin wurde freundlicherweise von Sandoz (Basel, Switzerland) zur Verfügung gestellt. ω -Contoxin GVIA und ω -Agatoxin IVA wurden von Alomone Labs (Jerusalem, Israel), 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dion (CNQX) und (\pm)-2-Amino-5-phosphonopentansäure (AP-5) von RBI (Natick, USA) geliefert. Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma (Deisenhofen, FRG) bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Differenzierungsinduktion neuronaler Zellen durch Retinolsäure:

Zur Generierung neuronaler Zellen aus pluripotenten BLC 6 ES-Zellen wurden diese zunächst in 3-dimensionalen EBs kultiviert, wie in Abbildung 1 gezeigt. 2 Tage nach dem Plattieren der EBs in Multiwellschalen konnten die ersten neuronalen Zellen morphologisch von anderen Zelltypen unterschieden werden (Wobus et al., 1988; Rohwedel et al., 1994). Die differenzierten Neurone erscheinen zuerst als Zellen mit kurzen Neuriten an der Peripherie der plattierten EBs und bilden nach kurzer Zeit (2–3 Tage nach Plattieren) untereinander sichtbare Verbindungen.

Die Induktion mit 10^{-7} M Retinolsäure (RA) während der Formation der EBs erhöhte die Anzahl der gebildeten neuronalen Zellen, ohne deren Morphologie zu beeinflussen. Vergleichende Patch-Clamp-Untersuchungen an Neuronen, die in der

Abwesenheit von RA differenziert wurden (in (D)MEM unter Zusatz von 15% DCC FKS (Rohwedel et al., 1994)), zeigen, daß sich diese Zellen in Bezug auf die Expression von Ionenkanälen und die Form von Aktionspotentialen nicht von den unter RA-Einfluß entwickelten Zellen unterscheiden.

3.2 Aktionspotentiale und spannungsabhängige Ionenkanäle in BLC 6 Neuronen:

Um elektrische und chemische Signale weiterzuleiten und zu verarbeiten, besitzen alle Zellen spezialisierte, integrale Membranproteine, sogenannte Ionenkanäle, die durch Änderungen ihrer elektrischen Leitfähigkeit zelluläre Antworten auslösen können. Ionenkanäle spielen in elektrisch erregbaren Zellen, wie Neuronen, eine besondere physiologische Rolle und wurden in diesen Zellen eingehend charakterisiert. Sowohl die pharmakologischen Eigenschaften als auch die Lokalisation von Ionenkanälen in unterschiedlichen Bereichen des Nervensystems sind gut untersucht, und aus dem Set von Ionenkanälen einer Zelle, sozusagen ihrem „elektrophysiologischen Fingerabdruck“, lassen sich präzise Rückschlüsse auf den vorliegenden Zelltyp ziehen. Ebenso beruhen eine ganze Reihe von pathophysiologischen Erscheinungen im ZNS, wie Epilepsien, Folgewirkungen zerebraler Ischämien (Tymianski et al., 1993), aber auch genetische Schädigungen, z.B. das Angelman Syndrom (Nakatsu et al., 1993), direkt oder indirekt auf Veränderungen der Aktivität oder Expression von Ionenkanälen.

Wir untersuchten die elektrischen Eigenschaften und die Entwicklung von Ionenkanälen während der Differenzierung von BLC 6 Neuronen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in der „Ganzzellkonfiguration“, die es erlaubt, definierte Ionenstromkomponenten einzelner Zellen zu erfassen.

Die neuronalen Zellen waren während der ersten 2–3 Tage nach dem

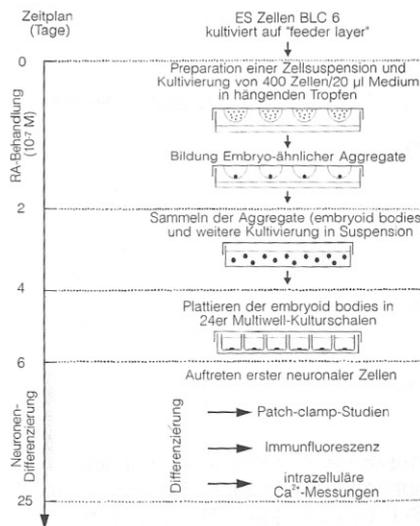


Abbildung 1: Experimentelles Protokoll zur *in vitro* Differenzierung neuronaler Zellen aus ES-Zellen der Linie BLC 6. Am Tag 4 wurden die EBs auf gelatinisierte Deckgläschen in Multiwellschalen plattiert. Mit Hilfe des gezeigten Protokolls ist es möglich, eine Differenzierungseffektivität (in % der EBs, die neuronale Zellen enthalten) von ungefähr 80–90% zu erreichen. Ohne Induktion mit RA beträgt die Differenzierungseffektivität im Vergleich nur etwa 20–30%.

Plattieren nicht elektrisch erregbar, entwickelten aber nachfolgend schnelle, Tetrodotoxin (TTX)-sensitive Aktionspotentiale (Abb. 2), deren Form und reguläres Muster mit Aktionspotentialen von Interneuronen aus dem Rattencortex (Hestrin, 1993) vergleichbar sind. Die Hemmbarkeit der Aktionspotentiale durch TTX zeigt an, daß diese hauptsächlich durch Na⁺-Kanäle (siehe unten) vermittelt werden.

Wir charakterisierten im folgenden die Ionenströme, welche die Grundlage der beobachteten Aktionspotentiale darstellen, und konnten zeigen, daß spannungsabhängige K⁺-, Na⁺- und Ca²⁺-Ströme (I_K , I_{Na} , I_{Ca}) mit ansteigender Stromdichte während der neuronalen Differenzierung exprimiert wurden. Da die zeitliche Abfolge der Expression spannungs-

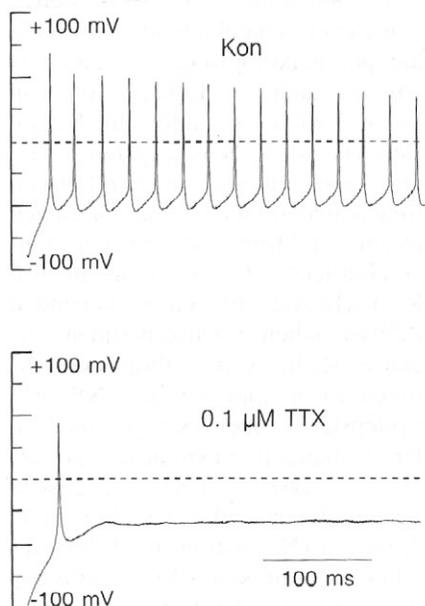


Abbildung 2: Stimulierte TTX-sensitive Aktionspotentiale in neuronal differenzierten BLC 6 Zellen. Aktionspotentiale eines 7 Tage alten BLC 6 Neurons wurden unter Standardbedingungen (I1, E1) in der Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik gemessen. Aktionspotentiale wurden durch die Injektion eines positiven Stromes von 2 nA ausgelöst. Gezeigt sind Aufzeichnungen vor (Kon) und während der Applikation von 0,1 µM TTX. Die gestrichelte Linie gibt ein Potential von 0 mV an.

abhängiger Ionenkanäle kritisch für die weitere Zelldifferenzierung und Entwicklung sein könnte (Spitzer et al., 1994), wurde der zeitliche Anstieg von I_K , I_{Na} und I_{Ca} während der gesamten Differenzierungsperiode (2-20 Tage nach Plattieren) untersucht. Wir konnten alle 3 Kanaltypen bereits am Differenzierungstag 2 (nach Plattieren) nachweisen und fanden, daß sich der Anstieg ihrer Stromdichten durch monoexponentielle Funktionen (Abb. 3) beschreiben läßt. Weiterhin stellten wir fest, daß

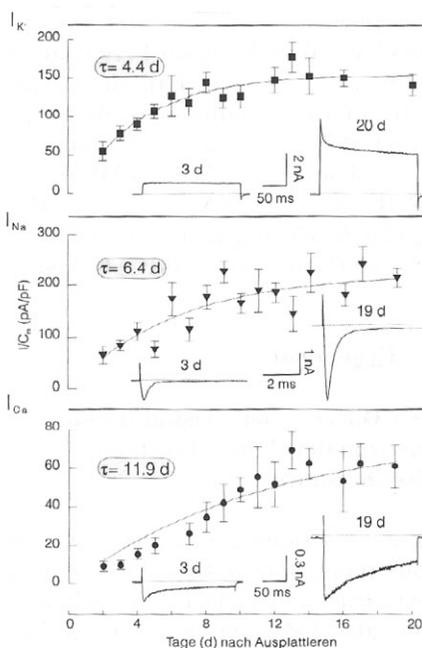


Abbildung 3: Entwicklungsabhängige Expression spannungsabhängiger Ionenkanäle in neuronalen BLC 6 Zellen. Von Tag 2 bis 20 nach Plattieren der EBs wurden spannungsabhängige K⁺ (I_K)-, Na⁺ (I_{Na})- und Ca²⁺ (I_{Ca})-Kanäle in neuronalen Zellen gemessen. I_K , I_{Na} und I_{Ca} wurden durch Spannungspulse zu +40, -20 bzw. 0 mV ausgelöst. Das Haltepotential betrug in allen Fällen -80 mV. Die Stromdichten (I/C_m) von I_K , I_{Na} und I_{Ca} wurden als Maß für die Kanaldichte bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von ≥ 3 Experimenten angegeben und wurden mit monoexponentiellen Funktionen ($f = a \cdot (1 - \exp(-x/t))$) gefittet (Linien). Unter den Zeitverläufen sind repräsentative Stromableitungen eines frühen (3 d) und späten (19-20 d) Differenzierungsstadiums gezeigt.

I_K , I_{Na} und I_{Ca} unterschiedlich schnell ihre maximalen Stromdichten erreichen (ausgedrückt in den Zeitkonstanten (t) von 4,4; 6,4 bzw. 11,9 d für I_K , I_{Na} und I_{Ca}).

Die pharmakologische Charakterisierung der spannungsabhängigen Stromkomponenten zeigte eine „Neuronen-typische“ Sensitivität der Kanäle für bestimmte Hemmstoffe. I_{Na} war hochempfindlich für das Neurotoxin TTX. Der K_i -Wert für die Hemmung von I_{Na} durch TTX wurde mit 15 nM bestimmt (Abb. 4), ein Wert, der gut mit früher beschriebenen Werten für neuronale Na⁺-Kanäle (Agnew, 1984) übereinstimmt.

Die pharmakologische Evaluierung des Ganzzellkalziumstromes (zusammengefaßt in der Tabelle) zeigte, daß mindestens 4 verschiedene Ca²⁺-Kanalsubtypen (die als L-, N-, P- und R-Typ bezeichnet werden) in neuronalen BLC 6 Zellen vorkommen. Darunter finden sich auch die für Nervenzellen charakteristischen P- (Purkinje) und N- (neuronal) Typ Kanäle.

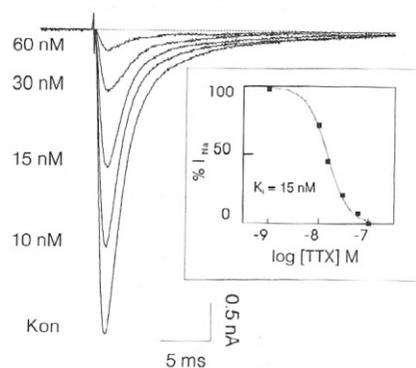


Abbildung 4: TTX-Sensitivität des spannungsabhängigen Na⁺ Kanals in BLC 6-abgeleiteten Nervenzellen. I_{Na} wurde bei 8°C durch Spannungspulse von -80 auf -20 mV aktiviert. Gezeigt sind der Kontrollstrom (Kon) und Ströme nach kumulativer Applikation der angegebenen TTX-Konzentrationen in extrazellulärer Lösung (E1). Die gestrichelte Linie gibt den Nullstrom an. Das Inset zeigt die Abhängigkeit der I_{Na} Hemmung von der TTX-Konzentration. Die Daten wurden mit Hilfe der allgemeinen Dosis-Wirkungs-Gleichung gefittet. Die ermittelte halbmaximal-wirksame TTX-Konzentration (K_i) beträgt 15 nM.

Tabelle: Hemmbarkeit des Gesamtkalziumstroms (I_{Ca}) in BLC 6 Neuronen durch spezifische Kalziumkanalblocker

Ca ²⁺ Kanalsubtyp	Kanalblocker (Konz.)	% Hemmung des I_{Ca} (Mittelwert \pm SEM, n=8)
L-Typ	Isradipin (3 μ M)	31 \pm 9%
N-Typ	ω -Conotoxin GVIA (3–10 μ M)	34 \pm 10%
P-Typ	ω -Agatoxin IVA (100–200 nM)	12 \pm 6%
R-Typ	Cd ²⁺ (50 μ M)	23 \pm 11%

3.3 Rezeptor-operierte Ionenkanäle und synaptische Verbindungen:

Im Unterschied zu spannungsaktivierten Ionenkanälen werden Rezeptor operierte Ionenkanäle durch Bindung von Neurotransmittern oder anderen Signalmolekülen gesteuert. Diese Kanäle spielen eine essentielle Rolle bei der schnellen synaptischen Übertragung, sind aber auch an der Vermittlung trophischer und zytotoxischer Prozesse sowie der Synapsenbildung während der neuronalen Entwicklung (Lipton und Kater, 1989; Lauder, 1993; Scheetz und Constantine-Paton, 1994) beteiligt.

Wir testeten die funktionelle Expression Rezeptor-operierter Ionenkanäle durch Messung der Stromantworten nach extrazellulärer Applikation verschiedener Neurotransmitter oder selektiver Rezeptoragonisten. BLC 6 Neurone reagierten auf die Applikation von γ -Aminobuttersäure (GABA), Glyzin, Kainat und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), aber nicht auf Nikotin (Abb. 5).

Der Effekt von GABA (1 mM) wurde durch 100 μ M (-)Bicucullin und der von Glyzin (1 mM) durch 30 μ M Strychnin vollständig gehemmt, was für eine Aktivierung des Stromes über GABA_A bzw. Glyzin-Rezeptoren spricht.

Glutamat, der wichtigste exzitatorische Transmitter im ZNS, wirkt über 3 pharmakologisch und funktionell unterschiedliche Klassen ionotroper Rezeptoren – NMDA-, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure (AMPA)- und

Kainat-Rezeptoren (Seeburg, 1993). In hohen Konzentrationen werden durch Glutamat auch neurotoxische Effekte, z.B. während neuronaler Hypoxie oder Ischämie ausgelöst. In neuronalen BLC 6 Zellen lösen 100 μ M NMDA einen nicht-inaktivierenden Strom in der Anwesenheit von 10 μ M Glyzin und Abwesenheit von Mg²⁺ (Abb. 5) aus. Dieser Strom wurde fast vollständig durch 50 μ M AP-5 oder durch Entfernen des extrazellulären Glyzins gehemmt, in Übereinstimmung mit dem pharma-

kologischen Profil von NMDA-Rezeptoren.

Das Neurotoxin Kainat induziert schnell desensitisierende Stromantworten durch Bindung an Kainat-Rezeptoren. Es bindet allerdings auch an AMPA-Rezeptoren und löst dabei einen nicht-inaktivierenden Strom aus (Herb et al., 1992). Ein solcher, nicht-inaktivierender Strom konnte in unserem Modell beobachtet und durch den unspezifischen AMPA/Kainat-Rezeptorblocker CNQX (20 μ M) vollständig gehemmt werden.

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, daß BLC 6 abgeleitete Nervenzellen sowohl NMDA- als auch AMPA-Rezeptoren exprimieren. Diese Eigenschaft konnte bisher nur für eine permanente Zelllinie, die Teratokarzinomlinie NT2-N, gezeigt werden (Younkin et al., 1993) und kann als Indiz dafür dienen, daß BLC 6 Neuronen den Differenzierungsgrad postmitotischer ZNS Neurone erreichen. Glutamat-Rezeptorvermittelte zytotoxische Effekte wer-

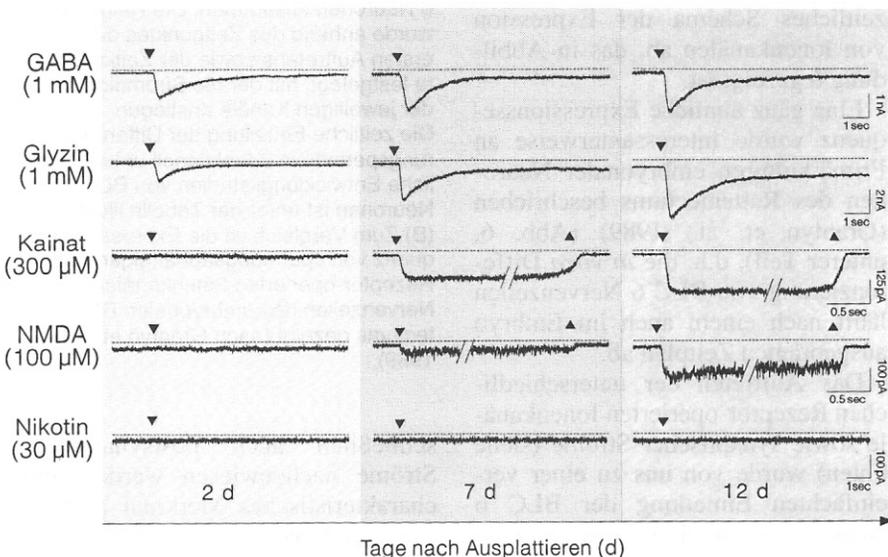


Abbildung 5: Expression von Rezeptor-operierten Ionenkanälen in neuronalen BLC 6 Zellen

Die Wirkung verschiedener Agonisten wurde an neuronalen BLC 6 Zellen während der gesamten Differenzierungsperiode (2–20 Tage nach dem Plattieren der Zellen) getestet. Gezeigt sind repräsentative Experimente von verschiedenen Tagen (2, 7, 12 d) nach dem Ausplattieren der EBs.

In allen Experimenten wurden die Zellen bei einem konstanten Haltepotential von –80 mV gemessen. Die Pfeile zeigen den Beginn und das Ende der Applikation des jeweiligen Agonisten an. Ströme durch NMDA-Rezeptoren wurden in einer Mg²⁺-freien Tyrodelösung (E1-0Mg) in der Anwesenheit von 10 μ M Glyzin und 1 μ M Strychnin ausgelöst.

den durch eine drastische Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eingeleitet. In vorläufigen Experimenten mit Hilfe des Kalziumbindenden Farbstoffes Fura 2 konnten wir einen Glutamat-bedingten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration auch in differenzierten BLC 6 Neuronen zeigen.

Neben dem Nachweis von Rezeptor-operierten Ionenkanälen wurde auch ihr Auftreten im Verlaufe der Nervenzelldifferenzierung untersucht. Ebenso wie bei den spannungsabhängigen Kanälen vergrößerte sich die Stromdichte (ein Maß für die Anzahl der exprimierten Kanäle) der nachgewiesenen Rezeptor-operierten Kanäle im Zuge auf der Differenzierung (Abb. 5). Wir konnten feststellen, daß $GABA_A$ - und Glyzin-Rezeptoren bereits ab Tag 2 (nach Plattieren) exprimiert wurden, wobei ein größerer Anteil der Zellen auf $GABA$ reagierte. Dagegen konnten Effekte von Kainat erst nach ungefähr 3 und von NMDA nach ungefähr 4 Tagen gemessen werden. Aus diesen Daten leiten wir ein zeitliches Schema der Expression von Ionenkanälen ab, das in Abbildung 6 gezeigt ist.

Eine ganz ähnliche Expressionssequenz wurde interessanterweise an Primärkulturen embryonaler Neuronen des Rattentectums beschrieben (Grantyn et al., 1989) (Abb. 6, unterer Teil), d.h. die *in vitro* Differenzierung von BLC 6 Nervenzellen läuft nach einem auch im Embryo ausgeprägten Zeitplan ab.

Das Auftreten der unterschiedlichen Rezeptor-operierten Ionenkanäle sowie synaptischer Ströme (siehe unten) wurde von uns zu einer vereinfachten Einteilung der BLC 6 Neurogenese in drei Entwicklungsstadien (früh, intermediär, terminal) benutzt (siehe Abb. 6). Das frühe Stadium ist durch das Vorhandensein spannungsabhängiger Ionenkanäle, $GABA_A$ - und Glyzin-Rezeptoren gekennzeichnet, im mittleren Stadium werden zusätzlich Glutamat-Rezeptoren exprimiert. In der terminalen Entwicklungsetappe der BLC 6-Nervenzelldifferenzierung konnten

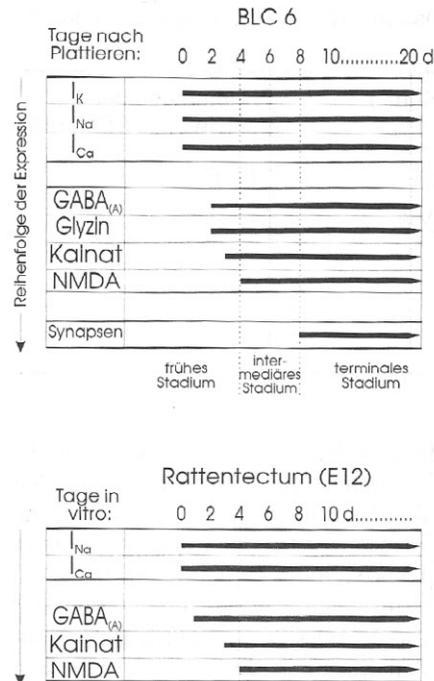


Abbildung 6: Zeitliche Abfolge der Ionenkanalexpression und Synapsenbildung in neuronalen BLC 6 Zellen (A) Die Tabelle faßt alle Daten zur Expression von spannungsabhängigen- und Rezeptor-operierten Ionenkanälen sowie von synaptischen Strömen in BLC 6 Neuronen zusammen. Die Reihenfolge wurde anhand des Zeitpunktes des ersten Auftretens sowie der Zeitkonstante festgelegt, mit der die Stromdichten der jeweiligen Kanäle anstiegen. Die zeitliche Einteilung der Differenzierungsperiode in 3 funktionell unterschiedliche Entwicklungsstadien von BLC 6 Neuronen ist unter der Tabelle illustriert. (B) Zum Vergleich ist die Expressionssequenz von spannungsabhängigen und Rezeptor-operierten Ionenkanälen in Nervenzellen des embryonalen Rattentectums gezeigt (nach Grantyn et al., 1989).

schließlich auch postsynaptische Ströme nachgewiesen werden, ein charakteristisches Merkmal postmitotischer Nervenzellen, deren Hauptaufgabe die Verarbeitung von Informationen in einem synaptischen Netzwerk ist. Für keines der zahlreichen auf Tumorzelllinien basierenden neuronalen Modelle konnte bisher eine funktionelle synaptische Kopplung von Neuronen gezeigt werden.

Bei der synaptischen Übertragung entstehen in den postsynaptischen

Zellen charakteristische Stromfluktuationen, die mit der Patch-Clamp-Technik abgeleitet werden können. Diese Ströme werden durch die Bindung von präsynaptisch freigesetzten Transmittermolekülen an die postsynaptisch lokalisierten Rezeptor-operierten Ionenkanäle hervorgerufen.

Da die Sekretion von Neurotransmittern ein Ca^{2+} -abhängiger Prozeß ist, sollten die basale präsynaptische Transmitterfreisetzung und die dadurch aktivierten synaptischen Ströme auch durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Nervenzellen stimulierbar sein. Wir untersuchten das Auftreten spontaner postsynaptischer Ströme sowie ihre Stimulation durch extrazelluläres K^+ und Glutamat, die eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration induzieren. Bis zum Tag 8 (nach Plattieren) wurde keinerlei synaptische Aktivität festgestellt, danach konnten jedoch spontane und stimulierte postsynaptische Ströme beobachtet werden.

In Abbildung 7 sind Glutamat-induzierte postsynaptische Ströme gezeigt, die durch gleichzeitige Applikation des $GABA_A$ -Rezeptorantagonisten Bicucullin hemmbar waren. Die Bicucullin-Sensitivität der postsynaptischen Ströme spricht für einen Synapsentyp, bei dem $GABA$ als Transmittersubstanz auftritt ($GABA$ -erge Synapse). Obwohl in den meisten Fällen $GABA$ -erge Synapsen nachgewiesen wurden, zeigten einige Zellen ($n = 4$), aber auch Bicucullin insensitive postsynaptische Ströme. Da diese Ströme durch Glutamatrezeptorantagonisten (CNQX und AP-5) blockierbar waren, schlußfolgern wir, daß auch glutamaterge Synapsen zwischen einigen der differenzierten Nervenzellen ausgebildet werden.

Diese Daten zeigen, daß terminal differenzierte BLC 6-abgeleitete Neuronen durch inhibitorische ($GABA$ -erge) und exzitatorische (glutamaterge) Synapsen gekoppelt sind. Damit erlaubt das BLC 6 Modell, *in vitro* die Neurogenese von einer undifferenzierten Stammzelle

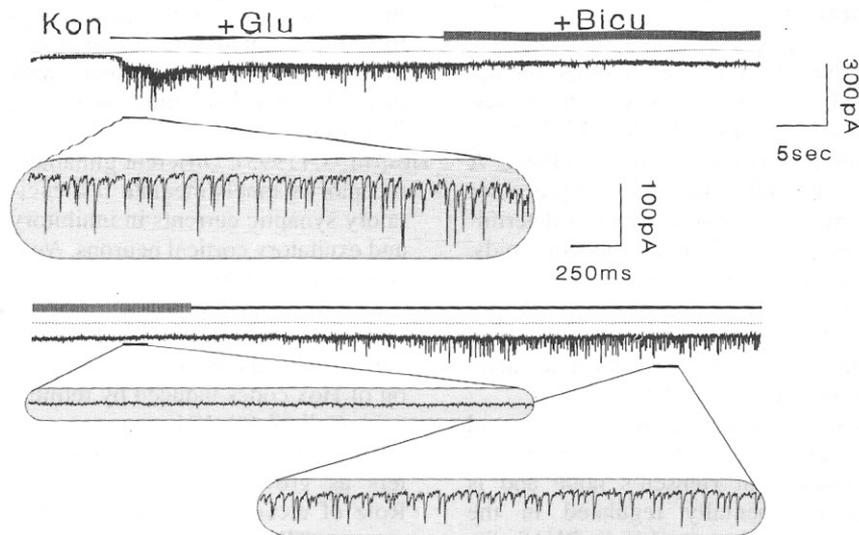


Abbildung 7: Glutamat-induzierte postsynaptische Ströme in terminal differenzierten BLC 6 Nervenzellen
Gezeigt sind Stomableitungen von einem BLC 6 Neuron am Tag 8 nach Ausplattieren. Die Ströme wurden in den Standardlösungen (I1, E1) bei einem konstanten Haltepotential von -80 mV gemessen.
Unter Kontrollbedingungen (Kon) ist nur ein geringer Ruhestrom erkennbar, der nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ Glutamat (Glu) von postsynaptischen Strömen (abwärtsgerichtete Stromfluktuationen) überlagert wird. In der Anwesenheit von Glutamat können die synaptischen Ströme durch Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Bicucullin (Bic) reversibel gehemmt werden.
Die unterstrichenen Abschnitte sind noch einmal in vergrößerter Darstellung gezeigt. Die gestrichelte Linie markiert den Nullstrom.

bis hin zur Bildung neuronaler Netzwerke zu verfolgen.

4 Diskussion

Das von uns benutzte Differenzierungsprotokoll erlaubt die spontane Genese von Neuronen aus undifferenzierten ES-Zellen, die durch Induktion mit dem Morphogen RA während der EB-Bildung verstärkt wird. Auf zellulärer Ebene wiesen die mit oder ohne RA differenzierten neuronalen Zellen keine morphologischen oder elektrophysiologisch erkennbaren Unterschiede auf.

In der eingesetzten Konzentration wirkt RA im Embryo als Teratogen und induziert vor allem Mißbildungen der Gliedmaßen, des Nervensystems und des Gesichtes. Beim Vergleich der RA Wirkung *in vivo* und *in vitro* ist aber zu beachten, daß die externe RA Administration am Embryo zu einer Überlagerung und Verstärkung der bereits natürlich vorhandenen RA-Gradienten führt. In

einigen Gewebeabschnitten des Embryos, z.B. dem für die Neurogenese wichtigen Hensschen Knoten, wurden *in situ* RA-Konzentrationen von ungefähr 33 nM, also einem Drittel der in unseren Versuchen eingesetzten Konzentration nachgewiesen (Chen et al., 1992). In Übereinstimmung mit unseren Resultaten konnten in früheren *in vitro* Studien erst bei Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ RA teratogene Effekte an neuronalen Zellen von Neuralleistenexplantaten gezeigt werden (Greenberg, 1983). Aufbauend auf den umfangreichen Studien zur spezifischen Transkriptionsaktivierung von Entwicklungskontroll (= Hox)-Genen (Boncinelli et al., 1991; Kessel und Gruss, 1991) können wir davon ausgehen, daß RA in der von uns eingesetzten Konzentration keine toxischen oder teratogenen Wirkungen an den sich entwickelnden Nervenzellen hervorruft, sondern als physiologischer Differenzierungsfaktor die Neurogenese stimuliert.

Die pharmakologische Charakterisierung von Ionenkanälen in neuronalen BLC 6 Zellen zeigte, daß verschiedene Typen spannungabhängiger K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle sowie ein neuronaler, hoch TTX-sensitiver Na^+ -Kanal (Agnew, 1984) exprimiert werden. Zwei Ca^{2+} -Stromkomponenten wurden als N- und P-Typ-Kanäle identifiziert, die in neuronalen und neuroendokrinen Zellen vorkommen (Mintz et al., 1992; Scherübl et al., 1993). Darüber hinaus konnten wir Rezeptoren für GABA, Glyzin und Glutamat (AMPA- und NMDA-Rezeptoren), die wichtigsten inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmitter im ZNS, nachweisen.

Diese Kanäle stellen die molekularen Wirkorte vieler Pharmaka, z.B. Nifedipin und Verapamil an Ca^{2+} -Kanälen, Barbiturate und Diazepam am GABA_A -Rezeptor, aber auch anderer antiepileptisch und analgetisch wirksamer Neuropharmaka, sowie Lokalanästhetika dar. Auch für teratogene Substanzen, wie Alkohole, konnten Effekte auf Ionenkanäle gezeigt werden (Covarrubias und Rubin, 1993). Untersuchungen zur zellulären Wirkung solcher Substanzen auf die Neurogenese erscheinen daher an diesem Modell sinnvoll. Besonders interessant dürften neuronale BLC 6 Zellen für das Studium Glutamat-Rezeptor-vermittelter exzitotoxischer Prozesse sein, da, abgesehen von primären Nervenzellen, nur die Teratokarzinomlinie NT2-N diese Rezeptoren in Kultur exprimiert.

Die Fähigkeit von BLC 6 Zellen, vollendifferenzierte Nervenzellen zu bilden, wird weiter durch die Tatsache gestützt, daß funktionelle Synapsen an diesen Zellen nachweisbar waren. Inhibitorische postsynaptische Ströme wurden durch GABAerge Synapsen ausgelöst, die *in vivo* überwiegend in höheren zerebralen Regionen vorkommen.

Unsere Daten demonstrieren, daß BLC 6 Stammzellen *in vitro* hochdifferenzierte postmitotische Nervenzellen bilden. Die Form der Aktionspotentiale, das Ionenkanalmuster und die Art der synaptischen Über-

tragung ähneln hauptsächlich denen inhibitorischer zerebraler Interneurone. Auf die Existenz einer kleinen Population von exzitatorischen Neuronen (ca. 5–10% aller neuronalen Zellen) kann aus dem Auftreten exzitatorischer glutamaterger synaptischer Ströme geschlossen werden. Auch im Säugetiercortex entwickeln sich exzitatorische Pyramidenzellen und inhibitorische Interneurone getrennt von einem sehr frühen Zeitpunkt der Neurogenese an (Luskin et al., 1988; Parnavelas et al., 1991).

Unsere Untersuchungen lassen schlußfolgern, daß dieses Modell geeignet ist, effektiv neuronale Differenzierungsprozesse *in vitro* zu studieren. Terminal differenzierte BLC 6 Neurone sind in ihren elektrophysiologischen (und soweit bisher untersucht auch biochemischen) Eigenschaften vergleichbar mit Primärkulturen embryonaler Säugernervenzellen.

Darüber hinaus bietet das BLC 6 Modell neue Möglichkeiten, an einer permanenten Zelllinie pharmakologische und toxikologische Untersuchungen an Nervenzellen während der embryonalen Entwicklung durchzuführen, die über bisherige Untersuchungen an neuronalen Tumorzelllinien wesentlich hinausgehen. Des weiteren ermöglicht das ES-Zellmodell die Untersuchung neuronaler Funktionen nach Differenzierung von ES-Zellen mit inaktivierten Genen („*loss of function*“ Mutationen). Auf Grund eines frühen Absterbens der Embryonen sind solche Analysen *in vivo* häufig undurchführbar. Da es sich bei ES-Zelllinien um permanente Linien handelt, wird die Verwendung von neuronalem Zellmaterial aus lebenden Säugern vermieden. Unsere Untersuchungen leisten damit einen Beitrag zur Schaffung von Tierersatzmodellen *in vitro* und zur Vermeidung von Tierversuchen in der medizinischen Forschung und in pharmakologisch-toxikologischen Untersuchungen.

Literatur

- Agnew, W. S. (1984). Voltage-regulated sodium channel molecules. *Annu. Rev. Physiol.* 46, 517–530.
- Anderson, D.J. und Axel, R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* 47, 1079–1090.
- Boncinelli, E., Simeone, A., Acampora, D. und Mavilio, F. (1991). HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet.* 7, 329–334.
- Chen, Y., Huang, L., Russo, A. F. und Solursh, M. (1992). Retinoic acid is enriched in Hensen's node and is developmentally regulated in the early chicken embryo. *PNAS* 89, 10056–10059.
- Covarrubias, M. und Rubin, E. (1993). Ethanol selectively blocks a noninactivating K⁺ current expressed in *Xenopus* oocytes. *PNAS* 90, 6957–6960.
- Doetschman, T., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. und Kemler, R. (1985). The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. exp. Morph.* 87, 27–45.
- Evans, M. J. und Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Greenberg, J. H. (1983). Detection of teratogens using cells in culture. In E. M. Johnson und D. M. Kochhar (Hrsg.), *Teratogenesis and reproductive toxicology* (289–297). Berlin: Springer-Verlag.
- Grantyn, R., Perouansky, M., Rodriguez-Tébar, A. und Lux, H. D. (1989). Expression of depolarizing voltage- and transmitter-activated currents in neuronal precursor cells from the rat brain is preceded by a proton-activated sodium current. *Dev. Brain Res.* 49, 150–155.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85–100.
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W. und Seeburg, P. H. (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows a widespread expression in brain and forms channels with distantly related subunits. *Neuron* 8, 775–785.
- Hestrin, S. (1993). Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons. *Neuron* 11, 1083–1091.
- Kessel, M. und Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrate and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67, 89–104.
- Lauder, J. M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals. Role of receptors and second messengers. *TINS* 16, 233–240.
- Lipton, S. A. und Kater, S. B. (1989). Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *TINS* 12, 265–270.
- Luskin, M. B., Pearlman, A. L. und Sanes, J. R. (1988). Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied *in vivo* with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1, 635–647.
- Luskin, M. B. (1994). Neuronal cell lineage in the vertebrate central nervous system. *FASEB J.* 8, 722–730.
- Maltsev, V. A., Wobus, A. M., Rohwedel, J., Bader, M. und Hescheler, J. (1994). Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ. Res.* 75, 233–244.
- McKay, R. D. G. (1989). The origins of cellular diversity in the mammalian central nervous system. *Cell* 58, 815–821.
- Mintz, I. M., Adams, M. E. und Bean, B. P. (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9, 85–95.
- Nakatsu, Y., Tyndale, R. F., DeLorey, T. M., Durham-Pierre, D., Gardner, J. M., McDanel, H. J., Nguyen, Q., Wagstaff, J., Lalande, M., Sikela, J. M., Olsen, R. W., Tobin, A. J. und Brilliant, M. H. (1993). A cluster of three GABA_A receptor subunits genes is deleted in a neurological mutant of the mouse *p* locus. *Nature* 364, 448–450.
- Parnavelas, J. G., Barfield, J. A., Franke, E. und Luskin, M. B. (1991). Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neu-

- rons in the rat telencephalon. *Cerebral Cortex* 1, 463–468.
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H.-H., Hescheler, J. und 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.
- Scheetz, A. J. und Constantine-Paton, M. (1994). Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* 8, 745–752.
- Scherübl, H., Kleppisch, T., Zink, A., Raue, F., Krautwurst, D. und Hescheler, J. (1993). Major role of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels in Ca^{2+} -induced calcitonin secretion. *Am. J. Physiol.* 264, E354–E360.
- Seeburg, P. H. (1993). The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *TINS* 16, 359–365.
- Spitzer, N. C., Gu, X. und Olson, E. (1994). Action potentials, calcium transients and the control of differentiation of excitable cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 70–77.
- Temple, S. und Raff, M. C. (1985). Differentiation of a bipotential glial progenitor cell in single cell microculture. *Nature* 313, 223–225.
- Temple, S. (1989). Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* 340, 471–473.
- Tymianski, M., Wallace, M. C., Spigelman, I., Masaaki, U., Carlen, P. L., Tator, C. H. und Charlton, M. P. (1993). Cell-permeant Ca^{2+} chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron* 11, 221–235.
- Wobus, A. M., Grosse, R. und Schöneich, J. (1988). Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro. *Biomed. Biochim. Acta* 47, 965–973.
- Wobus, A. M. und Hescheler, J. (1992). Entwicklung eines *in vitro*-Herzzell-Modells für embryotoxikologische und pharmakologische Studien. *Alternativen zu Tierexperimenten (ALTEX)* 9 Nr. 17, 29–42.
- Younkin, D. P., Tang, C.-M., Hardy, M., Reddy, U. R., Shi, Q.-Y., Pleasure, S. J., Lee, V. M.-Y. und Pleasure, D. (1993). Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in the NT2 human cell line. *PNAS* 90, 2174–2178.

Danksagung

Wir danken Frau I. Reinsch, Herrn W. Stamm (FU) und Frau Sabine Sommerfeld (IPK) für die hervorragende Zellkultivierung und technische Hilfe. Herrn Prof. Dr. H. Spielmann sind wir für die kontinuierliche Unterstützung dieser Studie dankbar.

Diese Arbeit wurde gefördert durch ZEBET, BGVV, Projekt Fo2.1-1328-122 (J.H.) und der DFG, Projekt Wo 503/1-2 (A.M.W.).

Korrespondenzadresse

Jürgen Hescheler
 Institut für Neurophysiologie der
 Universität zu Köln
 Robert-Koch-Straße 39
 D-50931 Köln

