

# Analyse des *in vivo* Differenzierungspotentials humaner leukämischer Zellen sowie humaner und muriner neuraler Stammzellen

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**



vorgelegt von

Michael Dürr  
geboren in Würzburg

Würzburg 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg in der Zeit von Juni 2002 bis Januar 2005 angefertigt. Betreut wurde sie durch Prof. Dr. Albrecht Müller und Prof. Dr. Georg Krohne.

Das Titelbild zeigt die Injektion von Zellen in eine murine Blastozyste.

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. U. Scheer

Gutachter: Prof. Dr. A. Müller

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Bütthard, 02.05.05

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>Summary</b> .....	<b>8</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Entwicklung und Charakterisierung von Stammzellen</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Differenzierung von Stammzellen</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 Transdifferenzierung und Plastizität von Stammzellen</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4 Epigenese</b> .....	<b>15</b>
1.4.1 Acetylierung von Histonen.....	16
1.4.2 Methylierung genomischer DNA.....	17
1.4.3 Synergismus epigenetischer Prozesse.....	17
1.4.4 Modifikation epigenetischer Markierungen.....	18
<b>1.5 Neurale Stammzellen</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6 Das hämatopoetische System</b> .....	<b>19</b>
<b>1.7 Genetische und epigenetische Veränderungen in Krebszellen</b> .....	<b>21</b>
<b>1.8 Charakterisierung von Leukämien</b> .....	<b>22</b>
<b>2 Fragestellung und experimentelle Strategie</b> .....	<b>25</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Injektion humaner leukämischer Zellen in murine Blastozysten</b> .....	<b>26</b>
3.1.1 Humaner Donoranteil in murinen Embryonen.....	26
3.1.2 Humaner Donoranteil in adulten Rezipienten.....	28
3.1.3 Analyse der Genexpression humaner leukämischer Zellen in chimären Embryonen.....	29
3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Injektion humaner leukämischer Zellen in murine Blastozysten.....	35
<b>3.2 Untersuchungen zum Einfluss Chromatin-modifizierender Substanzen auf         das Differenzierungspotential muriner neuraler Stammzellen</b> .....	<b>36</b>
3.2.1 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Acetylierung von Histon H4.....	38

3.2.2	Einfluss von TSA/Aza auf die Methylierung genomischer DNA in neuronalen Stammzellen.....	40
3.2.3	Reaktivierung der Oct-4 Transkription durch verschiedene HDAC-Inhibitoren .....	42
3.2.4	Genexpressionsanalyse verschiedener linienspezifischer Gene in NSZ.....	43
3.2.5	Untersuchungen zur Besiedelung muriner Embryonen durch NSZ.....	45
3.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss epigenetischer Modifikationen auf das Entwicklungspotential muriner NSZ.....	50
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung des Einflusses von Chromatin-modifizierenden Substanzen auf humane neurale Stammzellen.....</b>	<b>51</b>
3.3.1	Charakterisierung und Differenzierung humaner neuraler Stammzellen.....	51
3.3.2	Einfluss von TSA/Aza auf die Histonacetylierung.....	52
3.3.3	Besiedelung immun-supprimierter NOD/SCID Mäuse durch humane Nabelschnurzellen, humane neurale Stammzellen und TSA/Aza behandelte humane neurale Stammzellen.....	53
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Behandlung humaner NSZ mit TSA und AzaC.....	56
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Injektion humaner Tumorzellen in murine Blastozysten.....</b>	<b>57</b>
4.1.1	Gewebespezifische Kontribution humaner leukämischer Zellen nach Injektion in murine Blastozysten.....	58
4.1.2	Differenzierung humaner leukämischer Zellen nach Injektion in murine Blastozysten.....	60
4.1.3	Reprogrammierung humaner leukämischer Zellen durch embryonale Mikroumgebung ?.....	61
<b>4.2</b>	<b>Epigenetische Modifikationen in murinen NSZ.....</b>	<b>63</b>
4.2.1	Einfluss HDAC-Inhibitoren und AzaC auf den Epigenotyp und das Genexpressionsprofil von NSZ.....	63
4.2.2	Molekulare Voraussetzungen für die Differenzierung somatischer Stammzellen.....	64
4.2.3	Der Einfluss epigenetischer Modifikationen auf das Entwicklungspotential von NSZ.....	65

4.3	Epigenetische Modifikationen in humanen NSZ.....	69
4.4	Ausblick.....	71
5	Material und Methoden.....	73
5.1	Mausstämme.....	73
5.2	Antikörper.....	73
5.3	Lösungen und Chemikalien.....	74
5.4	Verbrauchsmaterial.....	76
5.5	Geräte.....	76
5.6	Zellkultur.....	77
5.7	Tierexperimentelle Arbeiten.....	78
5.8	Molekularbiologische Methoden.....	80
5.9	Proteinbiochemische Methoden.....	90
5.10	Immunhistochemie und <i>in situ</i> Hybridisierungen.....	92
6	Literaturverzeichnis.....	95
7	Veröffentlichungen.....	111
8	Lebenslauf.....	112
	Danksagung.....	113

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die zelluläre Identität somatischer Stamm-/Vorläuferzelltypen durch Behandlung mit Chromatin-modifizierenden Substanzen und/oder durch Transplantation verändert werden kann. Dazu wurden humane leukämische KG-1 Zellen in murine Blastozysten injiziert. Murine und humane neurale Stammzellen (NSZ) wurden *in vitro* mit Trichostatin A (TSA) und 5'-Aza-2'-deoxycytidin (AzaC) inkubiert und anschließend in murine Blastozysten bzw. adulte NOD/SCID Mäuse transplantiert.

In dem Versuchen konnte gezeigt werden, dass humane leukämische Zellen nach Injektion in murine Blastozysten in sich entwickelnden Embryonen und adulten Tiere präferentiell hämatopoetische Gewebe besiedeln. Daneben konnte gezeigt werden, dass myeloische Leukämiezellen in chimären murinen Embryonen ein Erythrozyten-spezifisches Genexpressionsmuster aktivieren.

Die Inkubation humaner und muriner NSZ mit Histondeacetylase-Inhibitoren und AzaC führte zu einer reversiblen Hyperacetylierung von Histon H4 und zur Demethylierung genomischer DNA. Die Injektion behandelter muriner NSZ in murine Blastozysten führte im Vergleich zu unbehandelten NSZ zu einer stärkeren Besiedelung adulter Tiere durch Donorzellen. Darüber hinaus besiedelten Abkömmlinge injizierter behandelter NSZ häufiger hämatopoetische Gewebe in chimären Tieren und exprimierten Hämatopoese-spezifische Oberflächenproteine. Weitere Analysen ergaben, dass humane NSZ im Gegensatz zu humanen hämatopoetischen Stammzellen nicht dazu in der Lage sind, in immunsupprimierten NOD/SCID Mäusen ein humanes hämatopoetisches System zu etablieren. Auch nach Inkubation humaner NSZ mit Chromatin-modifizierenden Substanzen konnte keine humane Hämatopoese in transplantierten Mäusen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Differenzierungsstatus und das Entwicklungspotential verschiedener Zelltypen durch geeignete Stimuli verändert werden kann. Durch Injektion in embryonale Mikroumgebung differenzieren humane leukämische Zellen und aktivieren ein Erythrozyten-spezifisches Genexpressionsmuster. Durch die Veränderung des Epigenotyps muriner NSZ gefolgt von einer Transplantation in murine Blastozysten konnte eine Transdifferenzierung neuraler in hämatopoetische Zellen induziert werden.

---

## Summary

The objective of the present thesis was to investigate whether the cellular identity of somatic stem and progenitor cell types could be modified by treatment with chromatin modifying agents and/or transplantation into appropriate *in vivo* systems. To this end, human leukemic KG-1 cells were injected into murine blastocysts. Murine and human neural stem cells (NSC) were incubated with Trichostatin A (TSA) and 5'-Aza-2'-deoxycytidine (AzaC) *in vitro* and subsequently transplanted into murine blastocysts and adult NOD/SCID mice respectively.

It could be shown that after transplantation into murine blastocysts human leukemic cells preferentially engraft hematopoietic tissues of developing embryos and adults. Furthermore, myeloid leukemic cells activated an erythrocyte-specific gene expression pattern in chimeric embryos.

Incubation of human and murine NSC with Histone deacetylases and AzaC caused reversible hyperacetylation of histone H4 and demethylation of genomic DNA. Comparison of adult recipient mice revealed that the injection of treated murine NSC caused a more stringent engraftment of recipients than untreated murine NSC. In addition, progeny of TSA/AzaC treated NSC engrafted more often hematopoietic tissues and expressed hematopoiesis-specific surface markers. In a further set of experiments it could be demonstrated that in contrast to human hematopoietic stem cells, human NSC do not engraft the hematopoietic system of immunodeficient mice. Even after treatment of human NSC with chromatin-modifying agents no human hematopoiesis was detected in transplanted mice.

Overall, these results indicate that the differentiation status and developmental potential of several somatic progenitor and stem cell types could be modified by appropriate stimuli. By exposure to embryonic microenvironment human leukemic cells differentiate and activate an erythrocyte-specific gene expression pattern. After modification of the epigenotype of murine NSC followed by transplantation into murine blastocysts transdifferentiation of neural into hematopoietic cells could be induced.

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AGM	Aorta-Gonad-Mesonephros
AML	akute myeloische Leukämie
AzaC	5'-Aza-2'-deoxyCytidine
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	coding DNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnmt	Dinukleotidmethyltransferase
dNTP	desoxyNukleotidtriphosphat
EGF	Epidermal Growth Factor
EK-Zelle	embryonale Karzinomazelle
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
FACS	Fluorescence activated cell scan
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HPRT	Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
kDA	kiloDalton
l	Liter
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
min	Minute
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NOD/SCID	non obese diabetic/severe combined immun deficiency
NSZ	neurale Stammzelle
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SAHA	Suberoylanilid Hydroxaminsäure
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SSZ	somatische Stammzelle
TSA	Trichostatin A
U	Einheit
VZ	Vorläuferzelle
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
°C	Grad Celsius

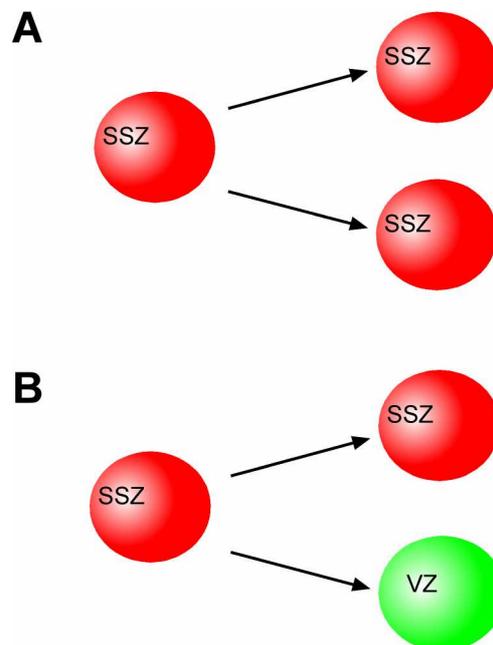
## 1. Einleitung

### 1.1 Entwicklung und Charakterisierung von Stammzellen

Die Ontogenese aller Säuger beginnt mit der Verschmelzung einer Samenzelle mit einer Eizelle zur Zygote. Sie wird als totipotente Zelle bezeichnet, da sich aus ihr direkt oder indirekt alle Zelltypen entwickeln, die den gesamten Organismus aufbauen. Auch die Zellen, die in den ersten Furchungsteilungen bis zum Morulastadium entstehen, können noch nach Trennung voneinander einen kompletten Organismus bilden und sind daher ebenfalls totipotent. Im weiteren Entwicklungsverlauf entsteht die Blastozyste, die bereits aus untereinander verschiedenen Zelltypen besteht (Rossant, 1975a; Rossant, 1975b; Rossant and Ofer, 1977). Während Zellen des Trophektoderm, das als einzellige Schicht das Blastozoe umgibt, extraembryonales Gewebe wie z.B. die Plazenta bilden, gehen alle intraembryonalen und ein Teil der extraembryonalen Gewebe auf die im Blastozoe befindliche innere Zellmasse (IZM) zurück. Die IZM lässt sich in Epiblast und Hypoblast einteilen. Aus der IZM können *in vitro* wachsende, nicht transformierte permanente Zelllinien (ES-Zellen) etabliert werden (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). ES-Zellen können *in vitro* durch Co-Kultur auf embryonalen Fibroblasten oder durch Zugabe von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) zum Kulturmedium in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden (Gough et al., 1989; Williams et al., 1988). Werden murine ES-Zellen durch Mikroinjektion in Blastozysten transplantiert und injizierte Blastozysten von einer Leihmutter ausgetragen, so werden chimäre Mäuse geboren. Diese Chimären sind Mosaik aus Zellen, die von der IZM der Blastozysten und Nachkommen injizierter ES-Zellen abstammen (Beddington and Robertson, 1989). Daneben können ES-Zellen *in vitro* in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen differenzieren (Doetschman et al., 1985; Schuldiner et al., 2000). ES-Zellen sind demnach Stammzellen mit unbegrenztem Teilungs- und *in vitro* Multiliniendifferenzierungs-potential. *In vivo* zeichnen sie sich durch die Fähigkeit aus, alle Zellen des erwachsenen Tieres bilden zu können. Da ES-Zellen aber *per se* kein extraembryonales Gewebe aufbauen können, lässt sich aus ES-Zellen allein kein Organismus erzeugen. Daher werden ES-Zellen im Gegensatz zu den totipotenten, frühen embryonalen Zellen als pluripotent bezeichnet (Nagy et al., 1990). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung entstehen während der Gastrulation die drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm, innerhalb derer sich die Organanlagen bilden. Ab diesem Zeitpunkt werden auch somatische Stammzellsysteme eingerichtet, die die Entwicklung unterschiedlicher Zelltypen ermöglichen. Diese Stammzellsysteme sind durch einen hierarchischen Aufbau charakterisiert, wobei an deren Spitzen jeweils eine kleine

Anzahl undifferenzierter Stammzellen steht, die über wenige, kaum differenzierte Vorläuferzellen alle ausdifferenzierten Zelltypen ihres Kompartimentes bilden. Die an Aufbau und Regeneration des adulten Organismus beteiligten somatischen Stammzellensysteme sind im Gegensatz zu den frühembryonalen toti- und pluripotenten Zellen dauerhaft. Somatische Stammzellen (SSZ) bilden unter anderem die Haut (epidermale Stammzellen) (Watt, 1998), Zellen des peripheren zentralen Nervensystems (neurale Stammzellen, NSZ) (Weiss et al., 1996b) sowie das Blutsystem (hämatopoetische Stammzellen, HSZ) (Morrison et al., 1995). Die verschiedenen Stammzelltypen entstehen in der Embryonalentwicklung zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Geweben (Müller et al., 1994; Qian et al., 2000).

Stammzellen sind rein funktionell durch ihre Fähigkeit zur klonalen Selbsterneuerung und Multiliniendifferenzierung definiert (Jordan and Lemischka, 1990; Loeffler and Potten, 1997; Morrison et al., 1995). Um diese Funktion ausführen zu können, teilen sich Stammzellen entweder symmetrisch in zwei neue Stammzellen, oder aber asymmetrisch in eine Stammzelle und eine Vorläuferzelle (Huang et al., 1999; Potten and Loeffler, 1990)(Abb.1).



**Abb.1 Zellteilung von Stammzellen.** Teilt sich eine somatische Stammzelle (SSZ) symmetrisch (A), so entstehen zwei Tochterzellen, die ebenfalls Stammzelleigenschaften besitzen. Bei asymmetrischer Zellteilung (B) entsteht aus einer Stammzelle eine neue Stammzelle sowie eine Vorläuferzelle (VZ).

Stammzellen sind dabei in der Lage, alle differenzierten Zellen eines Kompartimentes zu bilden. Von Stammzellen kann also immer dann gesprochen werden, wenn Zellen beide

definierenden Eigenschaften, Selbsterneuerungs- und Multiliniendifferenzierungspotential, aufweisen.

Die präzise Regulation des Proliferations- und Differenzierungspotentials von Stammzellen ist für die komplexe Entwicklung eines intakten Embryos von großer Bedeutung. Als eine Instanz, die für diese Regulation verantwortlich ist, werden Stammzellnischen angesehen. Für viele Stammzelltypen wurde die Existenz von Stammzellnischen nachgewiesen (Doetsch, 2003; Fuchs and Segre, 2000). Diese Nischen stellen für SSZ eine spezifische Mikroumgebung dar, die das Überleben und die Entwicklung der Stammzellen steuert.

## **1.2 Differenzierung von Stammzellen**

Die Regulation der Differenzierung innerhalb eines Stammzellsystems kann durch intrinsische und extrinsische Prozesse gesteuert werden. Demnach beeinflusst das intrinsische Genexpressionsmuster der Zellen deren Differenzierungszustand. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass in undifferenzierten HSZ Genloci, deren Expression charakteristisch für differenzierte hämatopoetische Zellen sind, auf niedrigem Expressionsniveau transkribiert werden (Hu et al., 1997; Kontaraki et al., 2000; Ye et al., 2003). Dies wurde dahingehend interpretiert, dass in Vorläuferzellen ein labiles Gleichgewicht der Transkription zwischen sich gegenseitig ausschließenden Expressionsmustern besteht (Enver et al., 1998; Korn et al., 1973; Socolovsky et al., 1998; Till et al., 1964). Es wird vermutet, dass HSZ durch promiskuitive Transkription verschiedener Expressionsprogramme permissiv für Differenzierung in alle Linien des hämatopoetischen Systems sind (Cross and Enver, 1997). Offenbar bewirken stochastische Verschiebungen in diesem Gleichgewicht, dass sich eines der konkurrierenden Expressionsmuster gegen die anderen durchsetzt und etabliert. In der differenzierenden Zelle führt dies dann zu der exklusiven Expression linienspezifischer Gene. Einen zweiten Mechanismus zur Differenzierung von Stammzellen stellt die extrinsische Regulation der Linienentscheidung innerhalb eines Stammzellsystems dar. Ursächlich hierfür sind die Einflüsse des Stroma auf die Stammzellen (Dorshkind, 1990; Friedrich et al., 1996). Dabei wird das Stroma durch umgebende Zellen gebildet, die durch die Sekretion löslicher, sowie der Präsentation membranständiger Signalmoleküle den Differenzierungs- und Proliferationszustand von Stamm- und Vorläuferzellen bestimmen (Gunji et al., 1991; Ohneda et al., 1990).

Die extrinsische Regulation von Stammzellen erhält vor dem Hintergrund der nachfolgend beschriebenen Experimente zur Stammzellplastizität besonderes Gewicht. Es wäre denkbar, dass Plastizität somatischer Stammzellen nur im Kontext spezieller Mikroumgebungen

möglich ist, da diese über SSZ-spezifische Signaltransduktionswege die Änderung zellulärer Identitäten bewirken könnten.

### **1.3 Transdifferenzierung und Plastizität von Stammzellen**

Eine zentrale Lehrmeinung der Entwicklungsbiologie stellt die Unidirektionalität von Entwicklungsprozessen dar. Während der Ontogenese entwickeln sich nach der Gastrulation und der Bildung der drei Keimblätter somatische Stamm- und Vorläuferzellen von denen schließlich die einzelnen Effektorzelltypen abstammen, die die verschiedenen Gewebe und Organe und damit den kompletten Organismus aufbauen.

Einige neuere experimentelle Arbeiten stellen allerdings in Frage, ob die Zelllinienzugehörigkeit und das Differenzierungsstadium somatischer Stammzellen tatsächlich unveränderlich fixiert sind. Geiger und Kollegen konnten beispielsweise zeigen, dass HSZ aus adulten Mäusen nach Transplantation in eine embryonale Mikroumgebung embryonalspezifische Globingene exprimierten. Im reziproken Versuchsansatz exprimierten embryonale hämatopoetische Vorläuferzellen nach Transplantation in adulte Tiere das adulte Globin-Gen (Geiger et al., 1998).

Auch die Genexpression differenzierter Zellen konnte durch geeignete Stimuli reprogrammiert werden. So konnte in Fibroblasten eine Reprogrammierung in Zellen mit lymphoidem Charakter induziert werden, wenn diese mit Kern- oder Zytoplasmaextrakten von T-Zellen inkubiert wurden (Hakelien et al., 2002). Weiterhin weißt das Klonen von Säugern durch Kerntransplantation darauf hin, dass Kerne differenzierter Zellen auf einen Zustand des Zygotenstadium reprogrammiert werden können, wenn diese Zellkerne in eine Oozyte transplantiert werden (Wilmut et al., 1997). Ein Vergleich der Erfolgsfrequenzen in Klonexperimenten zeigte allerdings, dass das Klonen mit Hilfe von Zellkernen aus Stammzellen gegenüber Kernen aus differenzierten Zellen erfolgreicher ist. Offenbar ist der Kern einer Stammzelle leichter zu reprogrammieren als der einer bereits differenzierten Zelle (Liu, 2001). Zusammengefasst lassen diese Befunde vermuten, dass das Differenzierungsstadium einer somatischen Zelle nicht endgültig fixiert ist, sondern mittels geeigneter experimenteller Modifikationen veränderbar ist.

Arbeiten, in denen der Einfluss des epigenetischen Status der Zelle auf die Reprogrammierung untersucht wurde konnten zeigen, dass eine Veränderung des Methylierungsstatus des Genoms auch einen Wechsel im Schicksal einer Zelle induzieren kann. So konnte nach Inkubation muriner Fibroblasten mit dem Nukleotidanalogen 5'-Aza-2'-deoxycytidin (AzaC) eine stabile Myeloblastenzelllinie isoliert werden

(Lassar et al., 1986). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Zellen mit AzaC in Verbindung dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) synergistisch auf die Reaktivierung stillgelegter Gene in Tumorzellen wirkt (Cameron et al., 1999). Epigenetische Modifikationen verändern allerdings nicht das gesamte Transkriptom, sondern beeinflussen lediglich die Expression eines kleinen Teils aller Gene. In einer Veröffentlichung wurde beschrieben, dass lediglich die Expression von etwa 3 % aller Gene durch die Inkubation der Zellen mit TSA und AzaC beeinflusst wird (Van Lint et al., 1996). Dies lässt vermuten, dass nur wenige Genloci für eine Modifikation durch TSA und AzaC zugänglich sind.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde das traditionelle Konzept der Differenzierungsfähigkeit von SSZ in den letzten Jahren in Frage gestellt. So wurde berichtet, dass murine NSZ, die als Neurosphären *in vitro* kultiviert wurden, nach intravenöser Injektion in subletal bestrahlte Rezipienten hämatopoetische Zellen bildeten und nach Injektion in Blastozysten zu Effektorzellen aller drei Keimblätter differenzierten (Bjornson et al., 1999; Clarke et al., 2000). Desweiteren wurde beschrieben, dass HSZ Hepatozyten generieren können und dass sogar einzelne HSZ mehrere Organe einer adulten Rezipientenmaus besiedelten (Krause et al., 2001; Lagasse et al., 2000).

Dennoch ist die generelle Plastizität von SSZ und Vorläuferzellen heftig umstritten, da die hämatopoetische Kompetenz von NSZ sehr selten beobachtet wurde und möglicherweise auf epigenetische Veränderungen zurückzuführen ist. Insbesondere Arbeiten aus dem Labor von I. Weissman zeigen, dass HSZ nicht zu neuronalen Zellen differenzieren und dass einzelne transplantierte HSZ keine nicht-hämatopoetischen Zellen bilden können (Wagers et al., 2002). Weitere Veröffentlichungen zeigten, dass NSZ nach intravenöser Transplantation keine hämatopoetischen Zellen bildeten, und stehen damit im klaren Widerspruch zu früheren Ergebnissen von Björnson et al. (Magrassi et al., 2003; Morshead et al., 2002). Mögliche Erklärungen für diese widersprüchlichen experimentellen Befunde bieten Beobachtungen, wonach Stammzellen den Phänotyp heterologer Zelltypen auch durch spontane Zellfusion annehmen können, so dass die daraus resultierenden Zellen fälschlicherweise als Ergebnis einer Plastizität von SSZ interpretiert wurden (Dürr and Müller, 2003). Jedoch scheint nicht in allen Fällen vermeintlicher Transdifferenzierung eine Zellfusion von SSZ mit heterologen Zelltypen zugrunde zu liegen. In einer aktuellen Arbeit berichten Jang et al., dass HSZ ohne Zellfusion zu Leberzellen differenzieren können, wenn sie durch ein Zellsieb getrennt mit Leberzellen co-kultiviert werden (Jang et al., 2004).

Schließlich konnte die Arbeitsgruppe um Fred Gage demonstrieren, dass eine Co-Kultur von NSZ mit endothelialen Zellen zu einer stabilen Expression von endothelialen Markern in NSZ führt und dass diese Zellen sogar kapillare Netzwerke ausbilden konnten (Wurmser et al., 2004). Diese Beobachtung ist umso bemerkenswerter, da NSZ ektodermalen, Endothel-Zellen jedoch mesodermalen Ursprung haben.

Neuere Befunde lassen vermuten, dass das Entwicklungspotential von SSZ durch gezielte epigenetische Modifikationen verändert werden kann. So behalten humane HSZ nach *in vitro* Kultur ihr Potential zur Besiedelung von NOD/SCID Mäusen bei, wenn sie mit den Chromatin-modifizierenden Substanzen TSA und AzaC behandelt wurden (Milhem et al., 2004). Auch konnten NSZ nach Inkubation in TSA und AzaC sowie anschließender Injektion in bestrahlte adulte Mäuse das gesamte hämatopoetische System bestrahlter Rezipienten repopulieren (Schmittwolf et al., 2005). Diese Daten könnten eine plausible Erklärung für die Diskrepanz in den widersprüchlichen Beobachtungen zur Transdifferenzierung von NSZ liefern und die Hypothese von Morshead et al. unterstützen, wonach durch epigenetische Modifikationen ein hämatopoetisches Differenzierungspotential in NSZ induziert werden kann (Morshead et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Reihe von experimentellen Befunden für ein erweitertes Entwicklungspotential von SSZ spricht, dass allerdings auch Arbeiten existieren, die keine Hinweise auf die Transdifferenzierung von SSZ geben. Wenn Transdifferenzierung von SSZ zu heterologen Zelltypen tatsächlich existiert, scheint es sich um sehr seltene Ereignisse zu handeln, die gegebenenfalls durch epigenetische Modifikationen induziert werden können.

#### **1.4 Epigenese**

Alle somatischen Zellen eines Säugers besitzen mit Ausnahme erythroider und lymphoider Zellen ein identisches Genom. Durch die differentielle Genexpression können im Organismus unterschiedliche Effektorzellen mit ihren speziellen Funktionen gebildet werden. Die Entwicklung verschiedener Zelltypen basiert also auf einer selektiven Aktivierung des Genoms. Neben gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren ist auch der Zustand des Chromatins ein Regulator der transkriptionellen Aktivität im Genom (Bonifer, 1999; Bonifer, 2005). Seit längerem ist bekannt, dass transkriptionell aktive Chromatinbereiche hyperacetyliert und nicht - oder nur schwach - methyliert sind. Im Gegensatz dazu sind inaktive Chromatinomänen methyliert und hypoacetyliert (Cedar, 1988). Während der DNA-Replikation und der darauf folgenden Zellteilung wird der epigenetische Zustand des

Chromatins auf die Tochterzellen vererbt. Die Aufrechterhaltung des Epigenotyps der Zelle und des zelltypspezifischen Genexpressionsmusters ist daher mitverantwortlich für die stabile Zellidentität (Avots et al., 2002).

Das Entwicklungspotential von Stammzellen wird durch zelltypspezifische Genexpressionsmuster reguliert. Untersuchungen des Genexpressionsprofils verschiedener Stammzelltypen zeigten, dass sowohl gemeinsame als auch distinkte Genexpressionsmuster existieren (Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002; Terskikh et al., 2001). Bei der Bestimmung dieses definierten Musters spielt die Chromatinstruktur der unterschiedlichen Genorte eine wichtige Rolle (Bonifer, 1999). Dies bedeutet, dass jedes Gen einen definierten Epigenotyp im Bezug auf Zelltyp und Entwicklungsstadium besitzt.

#### 1.4.1 Acetylierung von Histonen

Die kleinste strukturelle Einheit des Chromatin, das Nukleosom, wird aus einem Protein-Komplex von Histon H2A, H2B, H3 und H4 Dimeren, um das 146 bp des DNA-Strang gewunden werden, gebildet (Camerini-Otero et al., 1976). Der Epigenotyp wird unter anderem durch den sogenannten Histoncode festgelegt, der die Modifikationen der Histone z. B. durch Histondeacetylasen (HDACs) oder Histonacetyltransferasen (HATs) beschreibt (Jenuwein and Allis, 2001). Posttranslationelle Modifikationen von Histonen wie Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung beeinflussen das Auftreten von Hetero- bzw. Euchromatin (Peterson and Laniel, 2004). Eine Art der Modifikation ist die Acetylierung von Histonen, die posttranslational und reversibel an den  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppen von Lysinen in Kernhistonen auftritt. Man geht davon aus, dass die Acetylierung der Histone zu einer räumlichen Auffaltung des Chromatins führt, da sich die negativ geladenen Acetylgruppen der Histone und die ebenfalls negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Stranges abstoßen (Norton et al., 1989). Die Lockerung des Chromatins führt zu einer leichteren Zugänglichkeit der DNA-Sequenz für Proteine des Transkriptionsapparates. Daher wird die Acetylierung der Histone mit der transkriptionellen Aktivität des acetylierten Genomabschnittes assoziiert (Chahal et al., 1980; Jenuwein and Allis, 2001; Toth et al., 2004).

Der Grad der Histonacetylierung ist abhängig von den Aktivitäten der HATs und HDACs. Um die Expression eines Genes zu ermöglichen, binden Transkriptionsfaktoren spezifische Erkennungssequenzen in der DNA und rekrutieren Multiproteinkomplexe und Histon-modifizierende Enzyme. Als Folge werden Histone acetyliert und demethyliert. Dies öffnet die lokale Chromatinstruktur, ermöglicht den Zugang weiterer regulatorischer Proteine an die DNA und erlaubt die Transkription (Jenuwein and Allis, 2001).

#### 1.4.2 Methylierung genomischer DNA

Eine weitere Möglichkeit, den epigenetischen Status im Vertebratengenom zu modifizieren, stellt die Methylierung von Cytosin, vorzugsweise innerhalb eines CpG Dinukleotids, dar. Methylierte Cytosin-Basen spielen eine Hauptrolle bei der stabilen Repression der Transkription (Bird and Wolffe, 1999; Dillon and Festenstein, 2002). Das genomische DNA-Methylierungsmuster wird unter anderem durch die Aktivität von zwei Methyltransferasen, Dnmt1 und Dnmt3, bestimmt. In adulten somatischen Stammzellen bleibt das Methylierungsmuster des Genoms stabil. Allerdings ist die Methylierung der DNA während der frühen Entwicklung und in bestimmten Gehirntumoren ein sehr dynamischer, durch Enzyme vermittelter Prozess (Schmutte and Jones, 1998). Neben den bekannten DNA-Methyltransferasen wurde auch eine DNA-Demethylase identifiziert, die den Prozess der Cytosindemethylierung kontrolliert (Bhattacharya et al., 1999; Ramchandani et al., 1999).

#### 1.4.3 Synergismus epigenetischer Prozesse

Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre machten deutlich, dass DNA-Methylierung und Histonacetylierung nicht unabhängig voneinander stattfindende Prozesse sind, sondern dass die an der Chromatin-Modifizierung beteiligten Enzyme zusammenwirken und oftmals große Proteinkomplexe bilden. So wurden Proteine identifiziert, die direkt an methylierte DNA binden und somit das Methylierungsmuster ‚lesen‘ können. Eines dieser Proteine, MeCP2, rekrutiert durch Bindung an methylierte DNA weitere Proteine, darunter den Co-Repressor Sin3a und verschiedene HDACs, um dadurch die Transkription an diesem Genlocus zu unterdrücken (Nan et al., 1998). Auch das DNA-bindende Protein MBD2 erkennt methyliertes Cytosin und bildet nach DNA-Bindung zusammen mit NuRD den MeCP1-Komplex. Durch zusätzliche Rekrutierung von HDACs an diesen Komplex wird ebenfalls die Transkription reprimiert (Ng et al., 1999). Genomabschnitte, die viele methylierte Cytidine enthalten, korrelieren daher mit der Bildung von Heterochromatin und sind weitgehend transkriptionell inaktiv (Hsieh, 1994). Versuche von Cameron und Kollegen zur Modifikation epigenetischer Muster zeigten außerdem, dass die Inkubation von Tumorzellen mit TSA allein nicht ausreicht, um die Re-Expression hypermethylierter Gene zu bewirken. Erst die Inkubation der Tumorzellen mit dem HDAC-Inhibitor TSA in Kombination mit dem Nukleotidanalogen AzaC führte zu einer stabilen Re-Expression verschiedener Tumorsuppressorgene (Cameron et al., 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass DNA-Methylierung und Histondeacetylierung an einem Genlocus gleichgerichtet ablaufen können

und durch beide Chromatin-modifizierende Prozesse synergistisch die Transkription gesteuert wird.

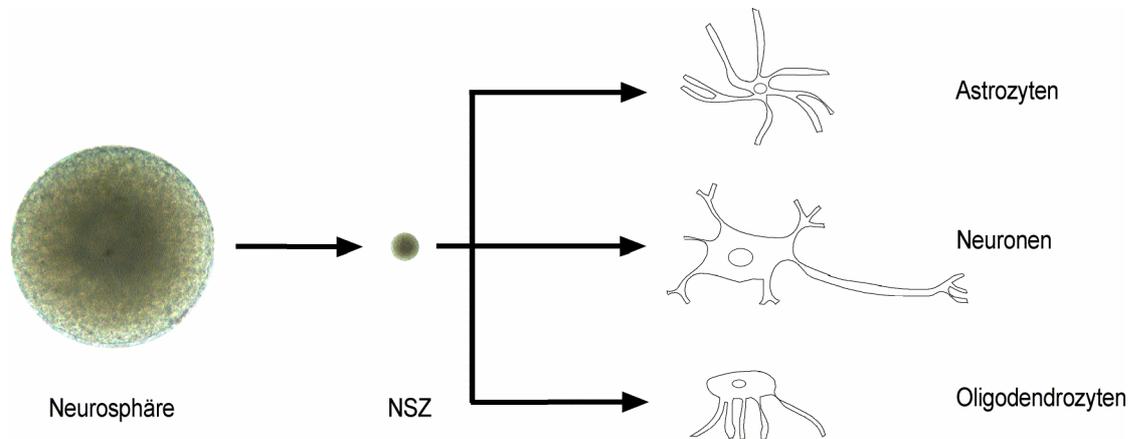
#### 1.4.4 Modifikation epigenetischer Markierungen

Inzwischen ist eine Reihe natürlicher und synthetischer Verbindungen beschrieben, die spezifisch HDAC inhibieren (Hassig and Schreiber, 1997). Diese HDAC-Inhibitoren lassen sich drei großen Stoffgruppen zuordnen: Salze kurzkettiger Fettsäuren wie Natrium-Butyrat, dessen Einfluss auf die Differenzierung von Zellen schon seit längerem bekannt ist (Candido et al., 1978), Tetrapeptide wie Depsipeptid, das bereits in klinischen Studien zur Therapie von Leukämien getestet wird (Nakajima et al., 1998), sowie Hydroxamsäuren, zu denen u.a. TSA (Yoshida et al., 1990) und Suberoylanilid-Hydroxaminsäure (SAHA) (Richon et al., 1998) zählen. Die inhibitorische Aktivität dieser Verbindungen liegt dabei in ihrer Interaktion mit der katalytischen Domäne der HDACs (Jung, 2001; Yoshida et al., 1990). HDAC-Inhibitoren induzieren also indirekt die Acetylierung von Histonen, was zu einem Zellzyklusarrest und als Konsequenz zur Apoptose führen kann (Johnstone, 2002). AzaC wird häufig als DNA-Methylierungsinhibitor verwendet. Es wird als Nukleotidanalogen während der Replikation in die DNA eingebaut und bindet kovalent und irreversibel die Methyltransferase Dnmt1 (Santi et al., 1984). Durch diese Inaktivierung der Methyltransferase erfolgt eine passive Demethylierung, wenn Zellen sich teilen und ihre DNA replizieren (Pietrobono et al., 2002). Während der DNA-Replikation und Zellteilung wird das Acetylierungs- und Methylierungsmuster in den Tochterzellen wiederhergestellt. Die Weitergabe des Epigenotyps auf die nächste Zellgeneration ist für die Festlegung der Zellidentität entscheidend (Avots et al., 2002). Somit könnte durch Eingreifen in die Regulation des Epigenotyps, etwa durch Hemmung der HDACs oder der DNA-Methyltransferasen, das Genexpressionsmuster und somit die Zellidentität von adulten Stammzellen verändert werden.

### **1.5 Neurale Stammzellen**

Bis vor kurzem ging die allgemeine Lehrmeinung davon aus, dass Schäden an der zellulären Struktur des zentralen Nervensystems nicht durch Zellneubildung kompensiert werden können, sondern dass daraus resultierende Einbusen nur durch Funktionsübernahme durch andere Hirnareale kompensiert werden können. Diese Annahme wurde erst in jüngerer Zeit durch Forschungsergebnisse widerlegt, die Neubildung von Neuronen im erwachsenen Gehirn nachweisen konnten (Mayer-Proschel et al., 1997; Mujtaba et al., 1998; Vescovi et al., 1999; Vescovi and Snyder, 1999). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Neurogenese in Maus und Mensch in verschiedenen Hirnarealen auch im adulten Organismus existiert.

Neurale Stammzellen können aus embryonalen oder adulten Teilen des Gehirns verschiedener Säuger, wie Maus, Ratte oder Mensch isoliert und in Kultur genommen werden (Bjornson et al., 1999; Gage, 2000; Mehler and Gokhan, 1999), sowie aus murinen oder humanen ES-Zellen gebildet werden (Carpenter et al., 2001; Mujtaba et al., 1999; Zhang et al., 2001). NSZ können *in vitro* durch Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF über viele Passagen hinweg stabil kultiviert werden, ohne dabei ihr Multiliniendifferenzierungspotential zu verlieren. *In vitro* bilden NSZ schwimmende sphärische Aggregate, sogenannte Neurosphären und können durch Entzug der Wachstumsfaktoren und durch Zugabe von Serum in Neuronen und gliale Zelltypen wie Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren (Mayer-Proschel et al., 1997; Rao and Mayer-Proschel, 1997).



**Abb.2 Differenzierung von NSZ.** *In vitro* kultivierte NSZ bilden Zellaggregate, sogenannte Neurosphären. NSZ sind in der Lage die wichtigsten Zellen des neuralen Systems, Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten zu bilden.

## 1.6 Das hämatopoetische System

Das hämatopoetische System ist das am besten untersuchte Stammzellsystem der Säuger. Es setzt sich aus den HSZ, verschiedenen Typen von Vorläuferzellen und den reifen Effektorzellen zusammen. Es können mindestens acht reife Blutzellklassen unterschieden werden (Abb.3).

Ausgehend von der multipotenten Stammzelle erfolgt die Differenzierung hin zu den Effektorzellen über eine Kaskade proliferierender Vorläuferzellen. Die hämatopoetischen Zellen entstammen dem mesodermalen Keimblatt. Während der Embryonalentwicklung der Vertebraten lässt sich die erste hämatopoetische Aktivität im Dottersack nachweisen. Primitive Erythrozyten und embryonaltypische Makrophagen, sowie das Fehlen von Lymphozyten sind Kennzeichen dieser transienten Hämatopoese (Moore and Metcalf, 1970; Zon, 1995). Die primitiven Erythrozyten sind kernhaltig und exprimieren embryonaltypische

Globingene (Russell, 1979). Neben dem Dottersack gibt es im Vertebratenembryo noch einen zweiten Ort, an dem *de novo* HSZ entstehen. Im Säuger handelt es sich hierbei um die Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (AGM-Region) (Medvinsky et al., 1993; Muller et al., 1994). Die AGM Region enthält die ersten intraembryonalen Vorläufer- und Stammzellen, die in die fötale Leber einwandern. In der fötalen Leber kommt es zu einer Expansion der HSZ, die dann das später entstehende Knochenmark und die Milz besiedeln.

Bereits in den 60er Jahren wurden erste Versuche unternommen, HSZ zu charakterisieren und zu isolieren. Von großer Bedeutung sind die Arbeiten von Wu, Siminovitch, Till und McCulloch, die HSZ über die Bildung von Kolonien in der Milz bestrahlter Mäuse nach Injektion hämatopoetischer Zellen als Kolonie-bildende Einheit der Milz (colony forming unit spleen, CFU-S) definierten (Till and McCulloch, 1961). Bereits damals wurde erkannt, dass die Zellen des Knochenmarks, die in bestrahlten Rezipienten zu Milzkolonien führten, keine homogene Zellpopulation darstellen. Später konnte anhand von physikalischen Merkmalen und Oberflächenmarkern im adulten murinen Knochenmark eine Zellpopulation identifiziert werden, aus der alle reifen Blutzellen generiert werden können. Diese mit HSZ sehr stark angereicherte Zellpopulation besitzt einen  $\text{Thy1.1}^{\text{niedrig}}/\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+/\text{Sca-1}^+$  Phänotyp und repräsentiert weniger als 0,05 % des murinen Knochenmarks. Diese Zellen sind jedoch in der Lage, alle Blutzelltypen komplett zu rekonstituieren (Spangrude et al., 1988; Uchida and Weissman, 1992).

Da es aus ethischen Gründen nicht möglich ist, Versuche vergleichbar denen im Maussystem am Menschen durchzuführen, wurden als Ersatz Tiermodelle entwickelt, in denen humane Zellen als Xenotransplantat in Mäuse injiziert wurden, um das Stammzellpotential verschiedener humaner Zellpopulationen zu untersuchen (Ploemacher et al., 1992). Humane HSZ zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach Injektion in bestrahlte immundefiziente NOD/SCID (**n**on **o**bese **d**iabetic/**s**evere **c**ombined **i**mmune **d**eficiency) Mäuse das gesamte Blutssystem repopulieren (Dick et al., 1991; Szilvassy et al., 1990) oder als sogenannte long term culture initiating cells (LTC-IC) zur Initiation von Langzeitkulturen *in vitro* fähig sind (Sutherland et al., 1989). Humane HSZ sind in der Zellpopulation mit dem Phänotyp  $\text{CD34}^+/\text{CD38}^-$  hoch angereichert. Diese Zellpopulation entspricht etwa 0,05 % der mononukleären Zellen im humanen Knochenmark. Die Xenotransplantation humaner Zellen hat zum Problem, dass viele hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie IL-3 oder GM-CSF Spezies-spezifisch wirken und die murine Mikroumgebung so nur bedingt die Proliferation und die Differenzierung der injizierten Zellen ermöglichen kann (Bock et al., 1995; Yang et al., 1986). Außerdem werden die humanen Zellen vom körpereigenen Immunsystem der

Maus erkannt und eliminiert. Die Verwendung von NOD/SCID Mäusen für die Xenotransplantation humaner Zellen ermöglicht eine stärkere Repopulierung. Aufgrund der SCID-Mutation besitzen die Mäuse keine B- oder T-Zellen. Damit ist weder eine T-Zell-vermittelte Abstoßung humaner Zellen möglich, noch gibt es xenoreaktive Antikörper, die eine Abstoßungsreaktion gegen humane Transplantate induzieren könnten. Durch die NOD-Mutation leiden die Tiere zudem an einem Verlust an natürlichen Killerzellen und einer verminderten Stimulierbarkeit der Makrophagen. Da das Immunsystem dieser Mäuse ausgeschaltet ist, kann der Donoranteil humaner Zellen im Knochenmark der transplantierten Mäuse bis zu 10 % der gesamten Knochenmarkzellen betragen (Cashman et al., 1997; Greiner et al., 1995). Eine weitere Möglichkeit, Tiere mit einem partiell humanen Blutsystem zu etablieren, besteht in der Injektion humaner Zellen in Blastozysten. Nach Injektion humaner Zellen des Phänotyps  $CD34^+/CD38^-$  aus humanem Nabelschnurblut in murine Blastozysten liegt der Anteil humaner Zellen am murinen Blutsystem allerdings deutlich niedriger und erreicht nur ca. 20 humane pro 100.000 murinen Zellen. Dennoch erfolgt auch in diesen Zellen die Expression linienspezifischer Markergene, wie die Globingene, entwicklungspezifisch (Harder et al., 2002).

Um die Homöostase im hämatopoetischen System aufrecht zu erhalten, wirken sowohl extrazelluläre lösliche Faktoren wie Chemokine und Interleukine, als auch membranständige Faktoren wie z.B. Integrine auf die Zellen des hämatopoetischen Systems ein. Die zelltypspezifische Wirkung dieser Faktoren wird durch intrazelluläre Signalwege vermittelt. Dabei sind die Ziele der extrazellulären Signale letztendlich Transkriptionsfaktoren, die das Genexpressionsmuster in diesen Zellen bestimmen (Sieweke and Graf, 1998).

### **1.7 Genetische und epigenetische Veränderungen in Krebszellen**

Krebs stellt eine komplexe, auf genetischen und epigenetischen Veränderungen basierende Krankheit dar, bei der entscheidende Kontrollmechanismen der Zellen versagen. Während die Proliferation gesunder Zellen den Bedürfnissen des gesamten Organismus angepasst ist, vermehren sich Tumorzellen unkontrolliert. Veränderungen regulatorischer Mechanismen, die die Homöostase des Organismus steuern, führen zur Transformation normaler Zellen zu Tumorzellen. Aufgrund dieser Transformation ist der Organismus nicht mehr fähig, das Schicksal der Tumorzelle bezüglich ihres Proliferations- oder Differenzierungsverhaltens oder ihrer Apoptose zu steuern (Trosko and Ruch, 1998).

Embryonale Karzinomazellen (EK-Zellen) stellen maligne Stammzellen dar. EK-Zellen besitzen die Fähigkeit, alle ausdifferenzierten Zelltypen des Körpers bilden zu können.

Nach Injektion in adulte Mäuse bilden sie sogenannte Teratokarzinome aus. Bei Teratokarzinomen handelt es sich um Tumore, die aus verschiedenen, ausdifferenzierten Zelltypen sowie undifferenzierten Zellen bestehen (Damjanov, 1990). Illmensee und Kollegen konnten zeigen, dass durch Injektion von EK-Zellen in murine Blastozysten chimäre Tiere erzeugt werden können, die in den meisten Geweben Donoranteile der injizierten Zellen aufwiesen. Während also die subkutane Injektion von EK-Zellen in adulte Tiere zur Bildung von Teratokarzinomen führte, verloren EK-Zellen ihren malignen Phänotyp in der embryonalen Mikroumgebung der Blastozyste (Illmensee and Mintz, 1976). Ähnliche Experimente wurden mit Neuroblastoma- und Adenokarzinomazellen durchgeführt (Gerschenson et al., 1986; Podesta et al., 1984). Auch diese malignen Zellen revertierten unter dem Einfluss einer embryonalen Mikroumgebung zu Zellen mit normalem Proliferations- und Differenzierungsverhalten.

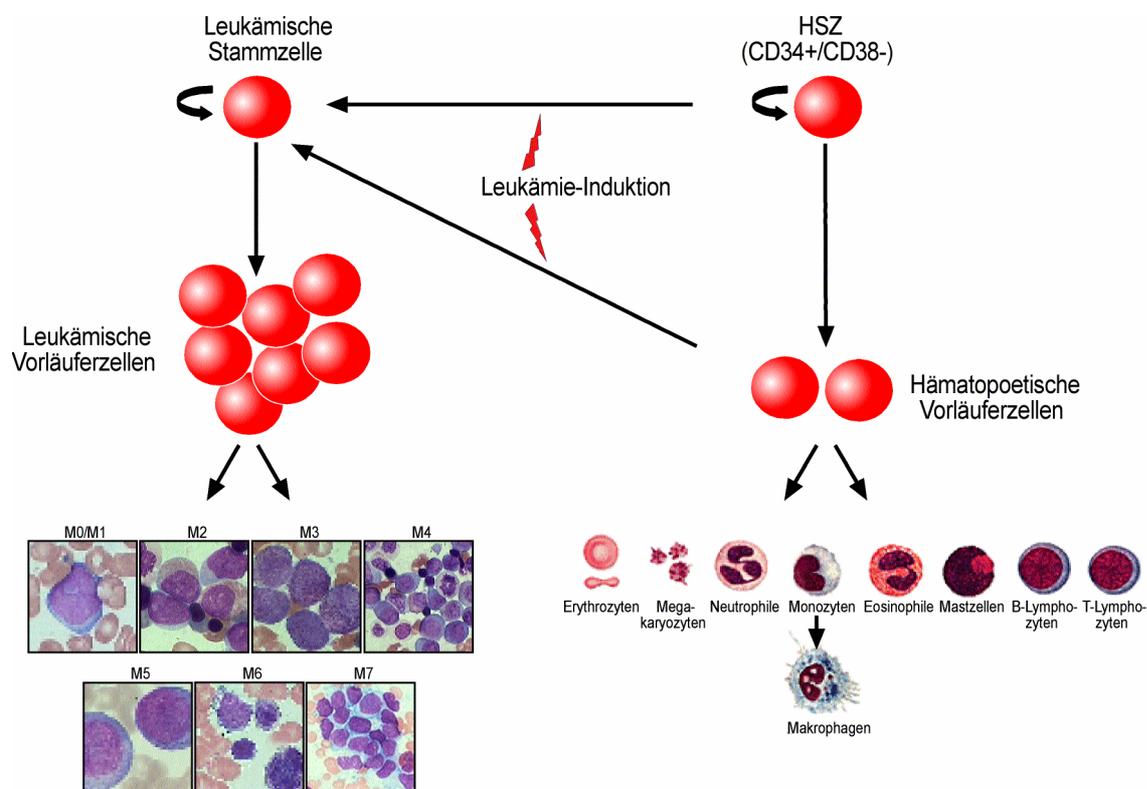
Da EK-Zellen keine offensichtlichen genetischen Veränderungen tragen wird spekuliert, ob die Expression des genetischen Programms in EK-Zellen durch epigenetische Faktoren soweit verändert ist, dass die EK-Zellen entarten (Jaenisch et al., 1982; Mintz and Illmensee, 1975). Veränderungen des Genexpressionsprofils können durch Modifikation des Acetylierungs- und Methylierungsstatus des Chromatins verursacht werden (Aujame et al., 1984; Jenuwein and Allis, 2001). Die normale Entwicklung von EK-Zellen im Embryo lässt vermuten, dass die Aktivität wichtiger Regulatoren für Differenzierung und Proliferation durch die embryonale Mikroumgebung soweit verändert wurde, dass die Zellen zu normalen, nicht transformierten Zellen revertierten.

Aber auch bei Zellen, die aufgrund genetischer Veränderungen wie Chromosomentranslokation oder Punktmutationen zu Tumorzellen transformiert sind, konnte bereits gezeigt werden, dass durch externe Stimuli eine Reversion ihrer Tumorigenität bewirkt werden kann. So konnten Medullablastomzellen als Kernspender zum Klonieren gesunder Mäuse benutzt werden (Li et al., 2003). Offensichtlich erfuhr der Nukleus der Tumorzelle durch die Transplantation in die embryonale Umgebung eine Reprogrammierung.

## **1.8 Charakterisierung von Leukämien**

Leukämie ist eine Krebserkrankung der Blut-bildenden Organe, also des Knochenmarks, aber auch der Lymphknoten, der Milz und der Mandeln. Eine Leukämie entsteht, wenn Vorläuferzellen nicht zu reifen Blutzellen differenzieren, sondern sich unkontrolliert vermehren und im Blut anreichern.

Ursprünglich ging man davon aus, dass eine DNA-Veränderung in HSZ zur Entstehung leukämischer Stammzellen führt. Versuche im Labor von John Dick zeigten, dass in der Stammzellpopulation des Knochenmarks leukämischer Patienten Zellen existieren, die nach Transplantation in NOD/SCID Mäuse eine Leukämie etablieren (Bonnet and Dick, 1997). Andere Arbeitsgruppen postulieren inzwischen allerdings, dass die Mutation, die zur Entstehung leukämischer Stammzellen führt, auch in Vorläuferzellen stattfinden kann. Durch die Mutation könnten die Vorläuferzellen wieder Stammzelleigenschaften annehmen und so eine Leukämie etablieren (Passegue et al., 2003).



**Abb.3 Entstehung einer myeloischen Leukämie.** HSZ bilden hämatopoetische Vorläuferzellen; diese wiederum differenzieren über linienrestringierte Vorläuferzellen zu den Effektorzellen des hämatopoetischen Systems (rechter Teil der Abbildung). Mutationen in HSZ bzw. hämatopoetischen Vorläuferzellen führen zur Entstehung leukämischer Stammzellen (Leukämie-Induktion). Diese bilden eine große Anzahl leukämischer Vorläuferzellen, die nicht zu funktionellen Effektorzellen differenzieren können und das Blut überschwemmen (linker Teil der Abbildung). Abhängig von den durch Mutation betroffenen Genen bilden sich mehr oder weniger ausdifferenzierte Blastenzellen. Die Blastenzellen werden anhand ihres Differenzierungsgrades nach dem FAB (French-American-British) System in die Klassen M0 (weitgehend undifferenziert) bis M7 (weitgehend differenziert) eingeteilt (verändert nach (Bonnet and Dick, 1997; Passegue et al., 2003)).

Je nach Verlauf der Krankheit unterscheidet man akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien entwickeln sich sehr rasch und die leukämischen Zellen sind in einem sehr frühen Differenzierungsstadium arretiert. Bei chronischen Leukämien sind die Krebszellen relativ

ausgereift. Der Krankheitsverlauf ist langsamer und ruft erst sehr spät Symptome hervor. Leukämien werden zudem noch in myeloische und lymphatische Formen unterteilt. Bei den myeloischen Leukämien sind die Vorläufer der Granulozyten und Monozyten betroffen, während bei lymphatischen Leukämien eine Störung in der Reifung zu Lymphozyten vorliegt. Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine bösartige Erkrankung des Blut-bildenden Knochenmarks, bei der überwiegend unreife und funktionsuntüchtige Vorstufen der myeloischen Zellen, die Myeloblasten, gebildet werden. Sie ist die häufigste akute Leukämieform bei Erwachsenen und die zweithäufigste Form der Leukämie bei Kindern (Copelan and McGuire, 1995). Molekulare Ursache der AML ist häufig eine Translokation, die die kodierende Region eines Transkriptionsfaktors betrifft. Das resultierende Fusionsprotein wird zumeist stark überexprimiert und ist in der Lage, über transkriptionelle Vorgänge auf Signalkaskaden einzuwirken, die Wachstum, Differenzierung oder Überleben von Vorläuferzellen regulieren (Look, 1997). Da die leukämischen Blasten der AML ein eingeschränktes Proliferationspotential besitzen, muss es eine Population von Zellen geben, die ähnlich gesunden HSZ aufgrund ihres Proliferations- und Selbsterneuerungspotentials die Leukämie erhalten können. In der Tat gelang es durch Injektion humaner leukämischer Zellen des Phänotyps  $CD34^+/CD38^-$  die AML in NOD/SCID Mäusen zu etablieren (Bonnet and Dick, 1997). Der AML liegt folglich ähnlich der normalen Hämatopoese eine hierarchische Organisation zugrunde, bei der eine kleine Anzahl von Stammzellen das leukämische System erhält.

## 2 Fragestellung und experimentelle Strategie

Die Zelllinienzugehörigkeit und das Differenzierungsstadium einer Zelle ist nicht endgültig festgelegt, sondern kann durch interne und externe Stimuli sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verändert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und wenn ja, unter welchen Bedingungen der Differenzierungsstatus und das Entwicklungspotential humaner leukämischer Zellen, sowie humaner und muriner neuraler Stammzellen beeinflusst werden können.

Es wurde untersucht, inwieweit die Differenzierung humaner leukämischer Zellen *in vivo* induziert werden kann. Dazu wurden Zellen der humanen leukämischen Zelllinie KG-1 in murine Blastozysten injiziert. Die Besiedelung muriner Gewebe durch humane Zellen und deren Differenzierungsstatus wurde in chimären Geweben bestimmt.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob das Differenzierungspotential muriner und humaner neuraler Stammzellen durch epigenetische Modifikation *in vitro* und anschließende Transplantation *in vivo* erweitert werden kann. NSZ wurden *in vitro* mit HDAC-Inhibitoren und dem Nukleotidanalogen AzaC transient inkubiert. Anschließend wurde die Veränderung der Histonacetylierung und DNA-Methylierung untersucht. Murine NSZ wurden nach Inkubation mit Chromatin-modifizierenden Substanzen in murine Blastozysten transplantiert. In adulten Tieren wurde die Besiedelung verschiedener Organe und Gewebe durch Donorzellen untersucht und der Differenzierungsstatus von Donorzellen analysiert. Humane NSZ wurden nach Inkubation mit Chromatin-modifizierenden Substanzen in immunsupprimierte NOD/SCID Tiere transplantiert und auf ihre Fähigkeit zur Transdifferenzierung hin untersucht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Injektion humaner leukämischer Zellen in murine Blastozysten

Die Zelllinie KG-1 wurde aus dem peripheren Blut eines an Erythroleukämie erkrankten Mannes, der anschließend eine akute myelogene Leukämie entwickelte, etabliert. Zahlreiche Chromosomenaberrationen konnten im Karyotyp von KG-1 Zellen beschrieben werden (Koeffler and Golde, 1980).

KG-1 Zellen wachsen nicht-adhären und benötigen für die Proliferation *in vitro* keine Wachstumsfaktoren. Die Differenzierung zu erythroiden oder myeloiden Zellen kann *in vitro* durch Zugabe von Phorbol-Myristat-Acetat oder Retinolsäure induziert werden (Drach et al., 1993; Koeffler et al., 1981).

Da die Differenzierung von Zellen immer mit einer Veränderung des Genexpressionsprofils der differenzierenden Zellen verbunden ist, kann durch Analyse der Genexpression auf den Differenzierungsstatus der Zellen geschlossen werden.

KG-1 Zellen exprimieren bereits im undifferenzierten Zustand ein breites Spektrum intrazellulärer Markerproteine (z.B. HLA-DR $\alpha$ ,  $\beta$ -Globin) (eigene Beobachtungen), die für die myeloide bzw. erythroide Differenzierung typisch sind, sowie Myelozyten-spezifische Oberflächenantigene (z.B. CD13, CD15, CD33) (Prieto et al., 1994), so dass eine eindeutige Analyse des Differenzierungsstatus nach Differenzierungsinduktion erschwert wird.

##### 3.1.1 Humaner Donoranteil in murinen Embryonen

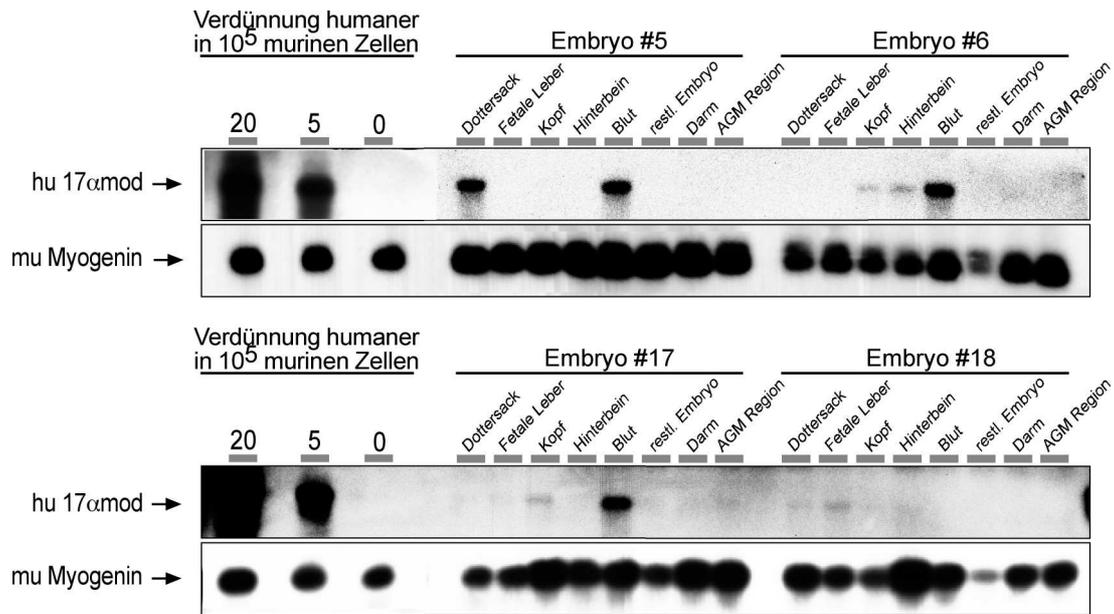
In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob Zellen einer etablierten leukämischen Zelllinie vergleichbar gesunden HSZ nach Injektion in murine Blastozysten und der Reimplantation der Blastozysten in scheinchwangere Ammentiere in sich entwickelnden Embryonen überleben können. Desweiteren wurde analysiert, in welchen Geweben die leukämischen Zellen bzw. deren Nachkommen zu finden sind und zu welchen Zelltypen die injizierten Zellen differenzieren.

Die Ermittlung des Anteils humaner Zellen in murinem Gewebe erfolgte hierbei zuerst durch PCR Amplifikation eines Teils der Zentromerregion des humanen Chromosom 17 unter Verwendung spezifischer Primer (17 $\alpha$ mod PCR) (Warburton et al., 1991). Die Amplifikationsbedingungen waren so gewählt, dass ein lineares Verhältnis zwischen eingesetzter Menge humaner DNA und amplifiziertem PCR Fragment existiert. Die PCR ermöglichte die Detektion von weniger als 5 humanen Zellen pro 100.000 murinen Zellen (Harder et al., 2002).

Um zu untersuchen, ob Nachkommen der injizierten KG-1 Zellen sich entwickelnde murine Embryonen besiedeln, wurden zwischen 5 und 30 Zellen der Linie KG-1 in murine Blastozysten injiziert. Am Tag 12.5 der Entwicklung wurden die Embryonen den Ammentieren entnommen, aus isolierten Geweben wurde genomische DNA gewonnen und mit humanspezifischer PCR (17 $\alpha$ mod) auf humane Donoranteile untersucht. Von den Embryonen im Stadium E12.5 wurden insgesamt 8 verschiedene Organe bzw. Gewebe isoliert und untersucht. Neben den hämatopoetischen Geweben Dottersack, fetale Leber, Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM) Region und peripheres Blut wurde als überwiegend neuroektodermales Gewebe der Kopf analysiert. Als endodermales Organ diente der Darm. Das Hinterbein wurde als überwiegend mesodermaler Anteil des Embryos entnommen. Zusätzlich wurden die restlichen Gewebe jedes Embryo zusammengefasst und in die Analyse mit einbezogen.

Nach Injektion humaner KG-1 Zellen in murine Blastozysten konnten insgesamt 31 Embryonen analysiert werden, wobei auf der Ebene der genomischen DNA bei 14 Embryonen humane Zellen in mindestens einem Gewebe detektiert werden konnten. Bei 9 von 31 Embryonen wurden humane Zellen im peripheren Blut nachgewiesen. Im Dottersack, dem embryonalen Gewebe mit der ersten hämatopoetischen Aktivität bei Säugern, konnten bei 5 von 31 Embryonen menschliche Zellen nachgewiesen werden. Im Kopf befanden sich bei 4 Embryonen Nachkommen der KG-1 Zellen.

Die stärksten PCR Signale und damit höchsten Donoranteile humaner Zellen konnten jeweils im peripheren Blut der chimären Embryonen festgestellt werden. In den Embryonen Nr. 5, 6 und 17 entsprach der Anteil humaner Zellen am peripheren Blut ca. 5 humanen Zellen pro 100.000 murinen Blutzellen (Abb.4). Im Dottersack von Embryo Nr. 5 konnten maximale Anteile von etwa 5 humanen Zellen pro 100.000 murinen Zellen beobachtet werden (Abb.4).



**Abb.4 Gewebeverteilung humaner Zellen in murinen E12.5 Embryonen nach Blastozysteninjektion humaner KG-1 Zellen.** Autoradiogramme einer PCR Southern-Blot Analyse humaner Donoranteile in Geweben muriner E12.5 Embryonen nach Injektion humaner leukämischer KG-1 Zellen in murine Blastozysten. Jeweils eine Verdünnungsreihe von 0 bis 20 humanen Zellen in 100.000 murinen Zellen ist abgebildet. Mittels 17 $\alpha$ mod PCR wurden humane Zellen detektiert. Zur Kontrolle der Menge und Qualität der eingesetzten genomischen DNA wurden alle Proben einer Myogenin-spezifischen PCR unterzogen.

Geht man davon aus, dass E12.5 Embryonen etwa  $2 \times 10^6$  periphere Blutzellen besitzen (Wong et al., 1986), errechnet sich bei einer Donorkontribution von 5 humanen Zellen pro 100.000 murinen Zellen eine Gesamtzahl von etwa 100 humanen Zellen im peripheren Blut chimärer Embryonen.

Nach Injektion in murine Blastozysten überleben und proliferieren die humanen KG-1 Zellen in den sich entwickelnden Embryonen und lassen sich durch eine 17 $\alpha$ mod spezifische PCR nachweisen. Die leukämischen Zellen besiedeln dabei bevorzugt das periphere Blut, sowie den während der primitiven Hämatopoese aktiven embryonalen Dottersack.

### 3.1.2 Humaner Donoranteil in adulten Rezipienten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass humane leukämische Zellen murine Embryonen besiedeln, sollte in einer weiteren Versuchsreihe überprüft werden, ob in adulten Tieren noch Chimerismus nachzuweisen war, oder ob nach Entwicklung des Immunsystems xenogene Zellen in chimären Tieren eliminiert werden. Dazu wurde ein Teil der sich aus den injizierten Blastozysten entwickelnden Embryonen ausgetragen.

Die geborenen Tiere waren allesamt lebensfähig und zeigten bis zum Alter von ca. 3 Monaten keine äußeren Anzeichen einer Erkrankung. Zu diesem Zeitpunkt wurden 15 verschiedene Gewebe bzw. Organe auf Chimerismus hin überprüft. Es wurden die neuroektodermalen

Gewebe Hirn, Rückenmark, Nervus ischiadicus sowie das ektodermale Gewebe Haut, die mesodermalen Gewebe Milz, Thymus, Knochenmark, peripheres Blut, Herz, Beinmuskel und Niere, die entodermalen Organe Leber, Darm und Lunge sowie die Gonaden isoliert und untersucht.

Von den 10 analysierten Tieren konnte bei vier auf DNA-Ebene eine Kontribution durch humane Zellen festgestellt werden. In allen vier chimären Tieren konnten humane Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden (Tab.1). Dort war auch der Chimerismus mit bis zu 5 humanen in 100.000 murinen Zellen am höchsten (Daten nicht gezeigt).

Tab.1 Verteilung humaner Donorzellen in adulten Mäusen

Tier#	Hirn	Rückenmark	N. ischiadicus	Leber	Lunge	Darm	Herz	Muskel	Gonaden	Milz	Thymus	Knochenmark	Blut	Haut	Niere
1	x												x		
3		x	x					x					x	x	
4		x						x					x		x
7			x		x				x			x	x		x
Σ	1/10	2/10	2/10	0/10	1/10	0/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	1/10	4/10	1/10	2/10

**Tab.1 Verteilung humaner Zellen in adulten Mäusen nach Blastozysteninjektion humaner leukämischer Zellen.** Dargestellt ist das Ergebnis der PCR Southern-Blot Analyse von Geweben adulter Mäuse. Aufgeführt sind Tiere, die nach Injektion humaner leukämischer KG-1 Zellen in murine Blastozysten im Alter von 3 Monaten humane Zellen in ihren Geweben enthielten. Mit einem (x) markiert sind die Gewebe der individuellen Tiere, die Donoranteile zeigten. Die Gesamtzahl der chimären sowie der untersuchten Gewebe ist angegeben.

Neben den neuralen Geweben Rückenmark und Nervus ischiadicus konnte auch im Muskel und in der Niere von jeweils zwei Tieren ein Chimerismus detektiert werden. In Hirn, Lunge, Gonaden, Knochenmark und Haut von jeweils einem Tier waren humane Zellen nachzuweisen. In Geweben, die selten Donoranteile enthielten, war die Signalstärke der 17 $\alpha$ mod PCR im Allgemeinen schwächer als in den häufiger Chimerismus aufweisenden Organen und lag bei 5 oder weniger humanen Zellen pro 100.000 murinen Zellen.

Humane leukämische Zellen integrieren nach Injektion in Präimplantationsblastozysten in sich entwickelnde murine Embryonen und können auch in adulten Tieren nach der Ausbildung eines vollständigen Immunsystems nachgewiesen werden.

### 3.1.3 Analyse der Genexpression humaner leukämischer Zellen in chimären Embryonen

Neben dem Nachweis einer reproduzierbaren Besiedelung muriner Embryonen durch humane Zellen war es von Interesse zu untersuchen, ob die leukämischen Zellen durch die embryonale Mikroumgebung zur Differenzierung angeregt werden können.

Zelluläre Differenzierungsprozesse gehen einher mit Veränderungen des Genexpressionsprofils. Als Nachweis kann die Expression Differenzierungs-spezifischer Markergene dienen. Dazu gehören die Hämoglobingene als Marker erythroider Differenzierung. Die Analyse der Expression erfolgt entweder durch Nachweis des Proteins oder durch die Detektion des Transkriptionsprodukts, der mRNA.

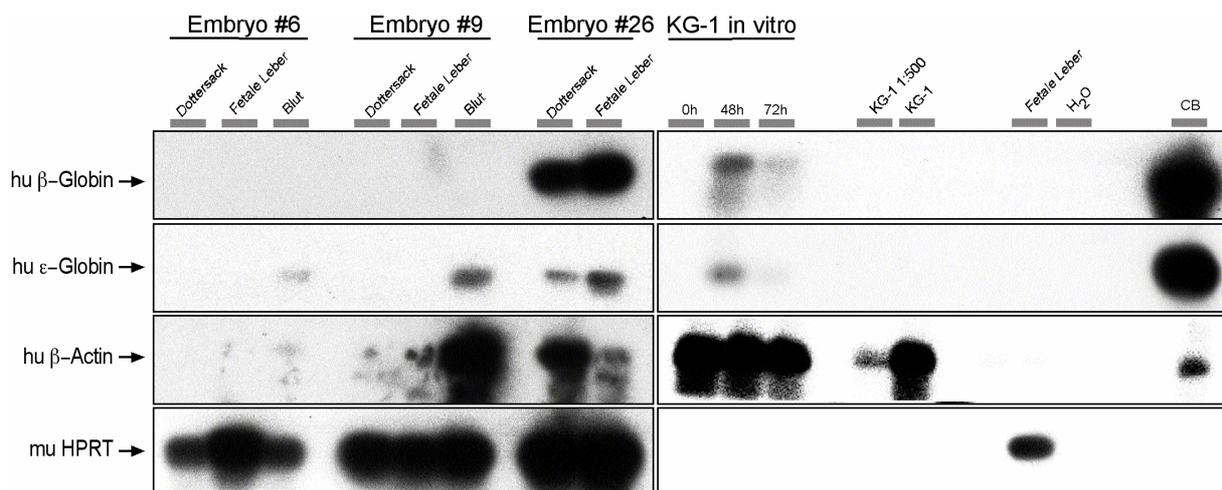
Im vorliegenden Versuch wurde aus Dottersack, fetaler Leber und peripherem Blut der Embryonen die gesamte RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Kontrolle der reversen Transkription und zum Abgleich der eingesetzten cDNA Menge wurden die Ansätze entweder einer murinen HPRT spezifischen RT-PCR oder einer humanen  $\beta$ -Aktin spezifischen RT-PCR unterzogen. Die Haushaltsgene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und  $\beta$ -Aktin werden in allen murinen bzw. humanen Zellen in ungefähr gleichen Mengen exprimiert und können somit zum Abgleich der cDNA-Mengen dienen.

Mittels RT-PCR wurde die Expression der humanen  $\epsilon$ - und  $\beta$ -Globingene untersucht (Abb.6). Das  $\epsilon$ -Globin wird während der Ontogenese des Mausembryo als erste Hämoglobin-Form etwa von Tag 7 bis 11 der Entwicklung exprimiert (Palis and Yoder, 2001; Russell, 1979). KG-1 Zellen exprimieren das  $\epsilon$ -Globin nicht. Wie Abbildung 5 zeigt, induziert die Kultur von KG-1 Zellen mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) für 48 h die Expression von  $\epsilon$ -Globin. Bei 2 untersuchten Embryonen, die auch auf DNA-Ebene eine Kontribution durch humane Zellen zeigten, konnten Transkripte des humanen  $\epsilon$ -Globin im peripheren Blut nachgewiesen werden. Embryo Nr. 26 zeigte eine  $\epsilon$ -Globinexpression in Dottersack und fetaler Leber. Die erhaltenen Hybridisierungssignale der  $\epsilon$ -Globin-spezifischen RT-PCR von chimären Embryonen verglichen mit denen von *in vitro* differenzierten KG-1 Zellen waren in etwa gleich stark. Aus der Analyse genomischer DNA mittels  $17\alpha$ mod PCR ist bekannt, dass der Anteil humaner Zellen im Blut dieser Embryonen ca. 5 humane Zellen pro 100.000 murinen Zellen beträgt. Legt man zugrunde, dass E12.5 Embryonen etwa  $2 \times 10^6$  Zellen im peripheren Blut besitzen (Wong et al., 1986), errechnet sich für die chimären Embryonen eine Zahl von etwa 100 humane Zellen in ihrem gesamten peripheren Blut. Der Teil diese 100 humanen Zellen, der sich in der RT PCR Probe befand, enthielt ebensoviel  $\epsilon$ -Globin mRNA wie die  $10^6$  KG-1 Zellen aus der *in vitro* Kultur, die in die RT-PCR eingesetzt wurden.

$\beta$ -Globin ist die Hämoglobinvariante adulter Tiere. Seine Expression wird im Anschluss an die Expressionsphase der beiden anderen Hämoglobinformen in der Maus etwa ab dem Stadium E14.5 angeschaltet (Crossley and Orkin, 1993; Russell, 1979). KG-1 Zellen zeigen keine Expression dieser Hämoglobinform.

Allerdings kann durch Inkubation in PMA für 48 bzw. 72 h die Expression *in vitro* induziert werden. Bei einem untersuchten Embryo wurden  $\beta$ -Globin-Transkripte im Dottersack und in der fetalen Leber nachgewiesen. Anhand der Stärke der Hybridisierungssignale kann daraus geschlossen werden, dass die wenigen KG-1 Zellen im chimären Tier sehr viel mehr  $\beta$ -Globin exprimieren, als KG-1 Zellen nach *in vitro* Differenzierung.

Neben der Expression von humanen  $\epsilon$ - bzw.  $\beta$ -Globin-Genen konnte auch humane  $\beta$ -Aktin mRNA in einigen Geweben nachgewiesen werden. So finden sich im Blut von Embryo #9 neben muriner  $\epsilon$ -Globin auch humane  $\beta$ -Aktin Transkripte. In Embryo #26 konnte sowohl  $\epsilon$ - und  $\beta$ -Globin als auch  $\beta$ -Aktin mRNA in Dottersack und fetaler Leber nachgewiesen werden. Die Detektion von Transkripten des humanen Strukturgenes  $\beta$ -Aktin spricht für die Annahme, dass humane leukämische Zellen chimäre Embryonen aktiv besiedeln und dort überleben.

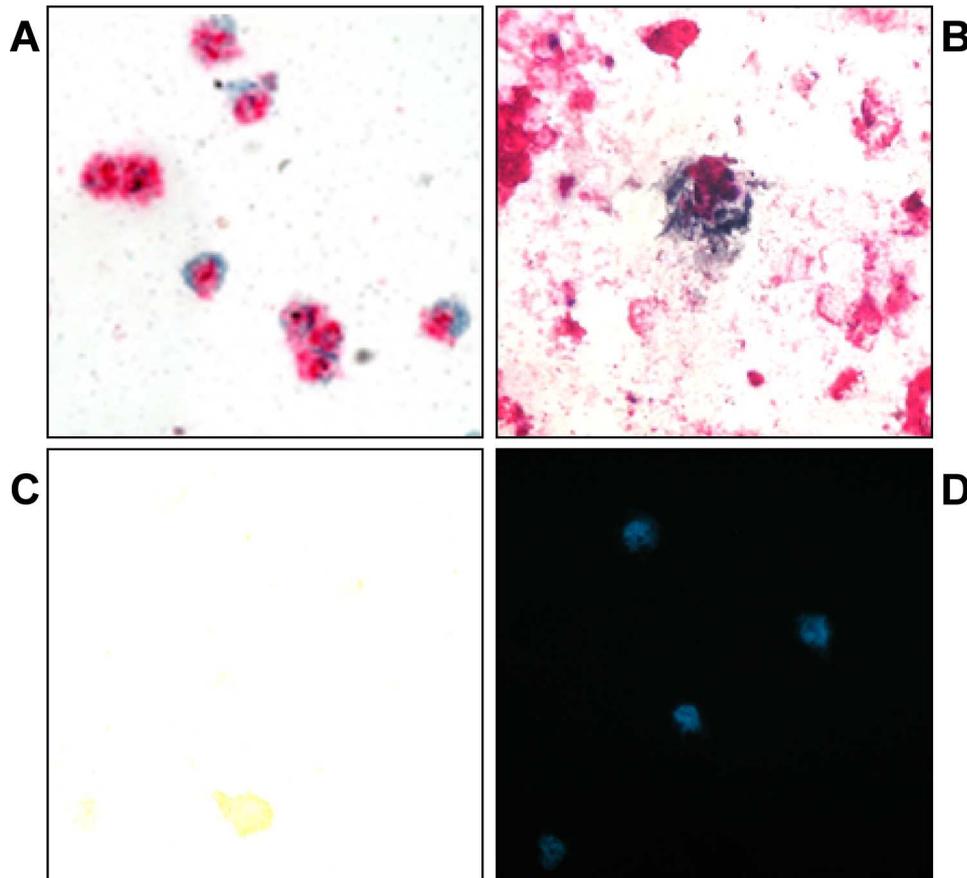


**Abb.5 Expression linienspezifischer Gene in murinen E12.5 Embryonen nach Injektion leukämischer KG-1 Zellen.** Autoradiogramme von RT-PCR Analysen humaner Zellen in murinen E12.5 Embryonen sowie humaner KG-1 Zellen. Zur Analyse der Expression Differenzierungs-relevanter Gene wurde aus Geweben RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und zur Kontrolle einer murinen HPRT-spezifischen PCR unterzogen. Durch PCR mit jeweils spezifischen Primern wurde die Expression der humanen Gene  $\beta$ -Globin,  $\epsilon$ -Globin und  $\beta$ -Aktin untersucht.

Um die Donorkontribution leukämischer Zellen in chimären Tieren und die Differenzierung injizierter KG-1 Zellen weiter zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen den panhämatopoetischen Marker CD45 sowie gegen humanes Glycophorin A, einem Marker erythroider Zellen, angeschlossen. Im Laufe ihrer Reifeentwicklung beginnen Erythroblastenzellen den erythroiden Marker Glycophorin A bzw. CD235a zu exprimieren (Outram et al., 1988); (Robinson et al., 1981). Mit zunehmender Reifung wird die Expression des

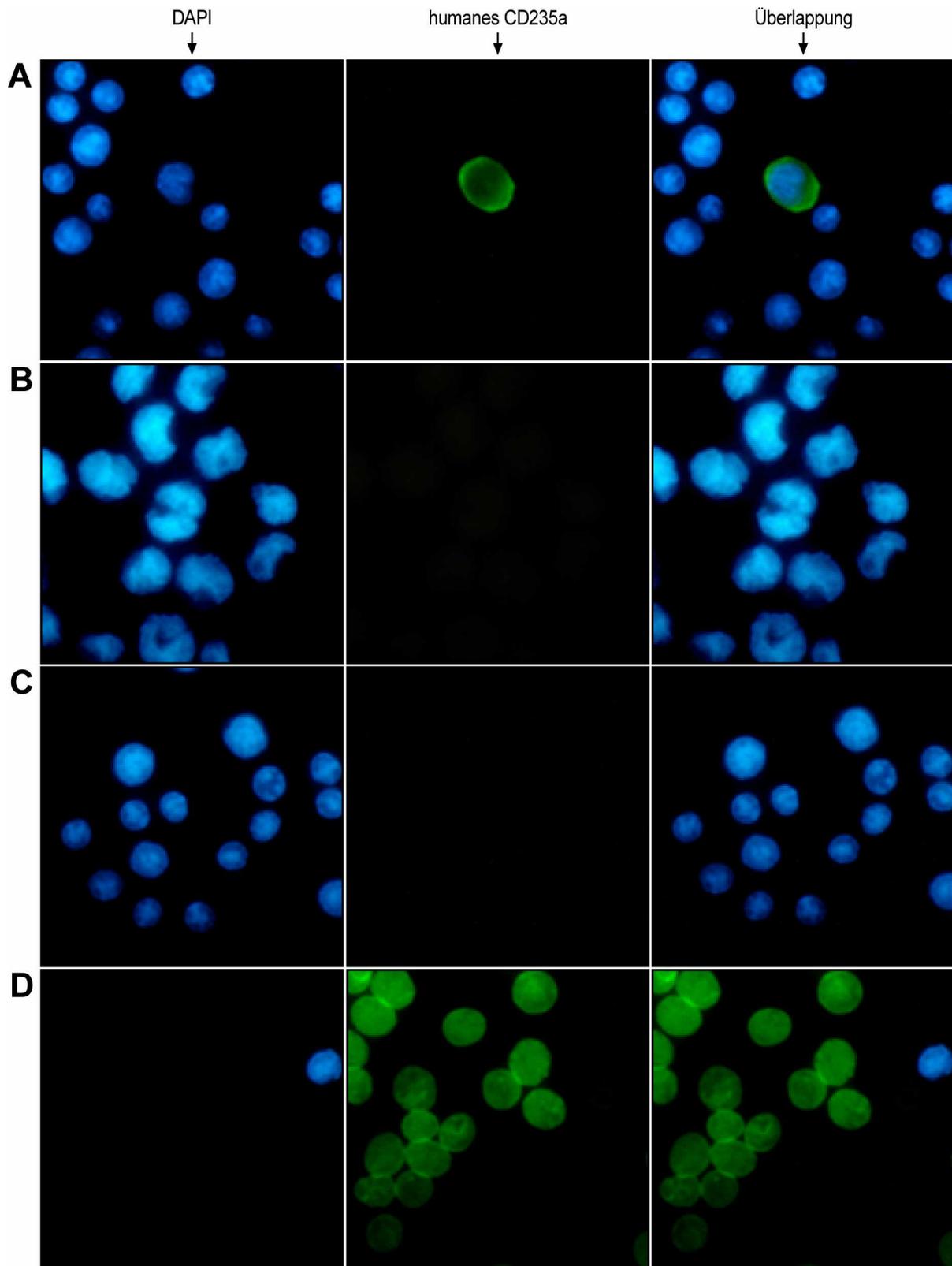
panhämatopoetischen Markers CD45 eingeschränkt (Harashima et al., 2002). Reife Erythrozyten besitzen letztendlich einen CD45<sup>-</sup> und CD235a<sup>+</sup> Phänotyp.

Leukozyten aus dem peripheren Blut von Embryonen wurden einer immunhistochemischen Färbung gegen humanes CD45 verbunden mit einer *in situ* Hybridisierung gegen humanes Chromosom 17 unterzogen. CD45 ist ein panhämatopoetischer Marker, der sowohl von humanen als auch murinen hämatopoetischen Zellen, ausgenommen reifen Erythrozyten, exprimiert wird. Mittels eines monoklonalen Antikörpers, der ausschließlich humanes CD45 bindet, wurde das periphere Blut chimärer Embryonen analysiert. Um humane Zellen *in situ* gleichzeitig über den Nachweis humaner DNA zu detektieren, wurde die immunhistochemische Färbung von CD45 mit einer *in situ* Hybridisierung auf DNA-Sequenzen des humanen Chromosom 17 kombiniert. Dazu wurden die Zellpräparate nach der Antikörperfärbung mit einer Digoxigenin-gekoppelten Sonde für repetitive Sequenzen im Chromosom 17 hybridisiert und anschließend mittels eines sekundären Antikörpers gegen Digoxigenin einer Farbreaktion unterzogen. Humane Leukozyten zeigten daraufhin aufgrund der Farbreaktion des CD45 Antikörpers sowohl eine Rotfärbung, als auch eine dunkelblaue Einfärbung durch die human-spezifische DNA-Sonde (Abb.6A). Humane Leukozyten wurden in 90 von 100 Fällen vom Antikörper gegen humanes CD45 sowie in 80 von 100 Fällen von der human-spezifischen DNA-Sonde erkannt. Murine embryonale Leukozyten zeigten dagegen weder CD45- noch human-spezifische DNA-Färbung (Abb.6C), intakte Zellkerne konnten jedoch durch eine fluoreszenzblaue DAPI-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 6D). In Leukozyten von Embryonen, die aus einer zweiten Serie von Injektionen von KG-1 Zellen in Blastozysten entstanden waren, konnten humane Zellen nachgewiesen werden, die die humane Form des Hämatopoese-spezifischen Markers CD45 exprimierten sowie eine human-spezifische DNA-Sonde gebunden haben (Abb.6B). Dabei waren in 1/3 der Blutproben von sich entwickelnden Embryonen humane CD45 exprimierende Zellen nachweisbar. Der Anteil humaner Zellen in chimären Blutproben lag bei 3 bis 4 humanen Zellen in 100.000 murinen Leukozyten.



**Abb.6 Detektion humaner CD45 exprimierender Zellen im peripheren Blut chimärer Embryonen.** Lichtmikroskopische sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer kombinierten Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung. Humane KG-1 Zellen (A), murine Leukozyten (C) sowie murine Leukozyten aus chimären Embryonen (B) wurden mit einem Antikörper gegen humanes CD45 inkubiert und mittels Vektor Red rot angefärbt. Humanes Chromosom 17 wurde durch eine 17a<sub>mod</sub> DNA Sonde in einer *in situ* Hybridisierung dunkelblau angefärbt. Zur Kontrolle wurden Zellkerne der murinen Leukozyten (C) mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI fluoreszenzblau angefärbt (D).

Zum Nachweis der CD235a-Expression wurde eine weitere Serie von Blastozysten mit KG-1 Zellen injiziert, das periphere Blut der sich entwickelnden Embryonen isoliert, auf Objektträger zentrifugiert und einer humanem CD235a-spezifischen Antikörperfärbung unterzogen. In einem Kontrollexperiment konnte keine CD235a<sup>+</sup> Zelle unter 100.000 kernhaltigen Zellen aus einem nicht-injizierten Embryo detektiert werden (Abb.7C). Auch *in vitro* kultivierte KG-1 Zellen wurden vom Antikörper nicht gebunden (Abb.7B). Währenddessen wurden 198 von 200 humane Blutzellen vom CD235a-spezifischen Antikörper erkannt (Abb.7D). 28 Embryonen aus Injektionen von KG-1 Zellen in murine Blastozysten wurden untersucht, wobei in 9 Fällen CD235a<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen wurden (Abb.7A). Dabei waren von 100.000 kernhaltigen Zellen auf dem Objektträger im Durchschnitt 9.4 (min=2; max=22) CD235a<sup>+</sup> Zellen zu finden.



**Abb.7 Humane CD235a positive Donorzellen im Blut chimärer E12.5 Embryonen.** A) Blutzellen eines repräsentativen Embryos nach Injektion humaner leukämischer KG-1 Zellen in murine Blastozysten; B) *in vitro* kultivierte KG-1 Zellen; C) Blutzellen eines nicht-transplantierten Kontrollembryos; D) humanes Blut. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen CD235a positiver Zellen (grün), DAPI gefärbter Zellkerne (blau) sowie die überlappende Darstellung beider Fluoreszenzen nach Zentrifugation der Zellen auf Objektträger. (Vergrößerung 1000x)

Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass die Nachkommen injizierter KG-1 Zellen im peripheren Blut chimärer Embryonen zu finden sind und dass sie neben humanen  $\beta$ -Aktin-, humanen  $\beta$ - und  $\epsilon$ -Globin-Transkripten den humanen panhämatopoetischen Marker CD45 sowie den Erythrozyten-spezifischen Marker CD235a exprimieren.

#### 3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Injektion humaner leukämischer Zellen in murine Blastozysten

Die Injektion von humanen leukämischen Zellen in murine Blastozysten führte zu chimären Embryonen und chimären adulten Mäusen. Der Anteil chimärer Tiere ist dabei deutlich geringer, als etwa nach der Injektion muriner ES-Zellen zu erwarten wäre (Beddington and Robertson, 1989).

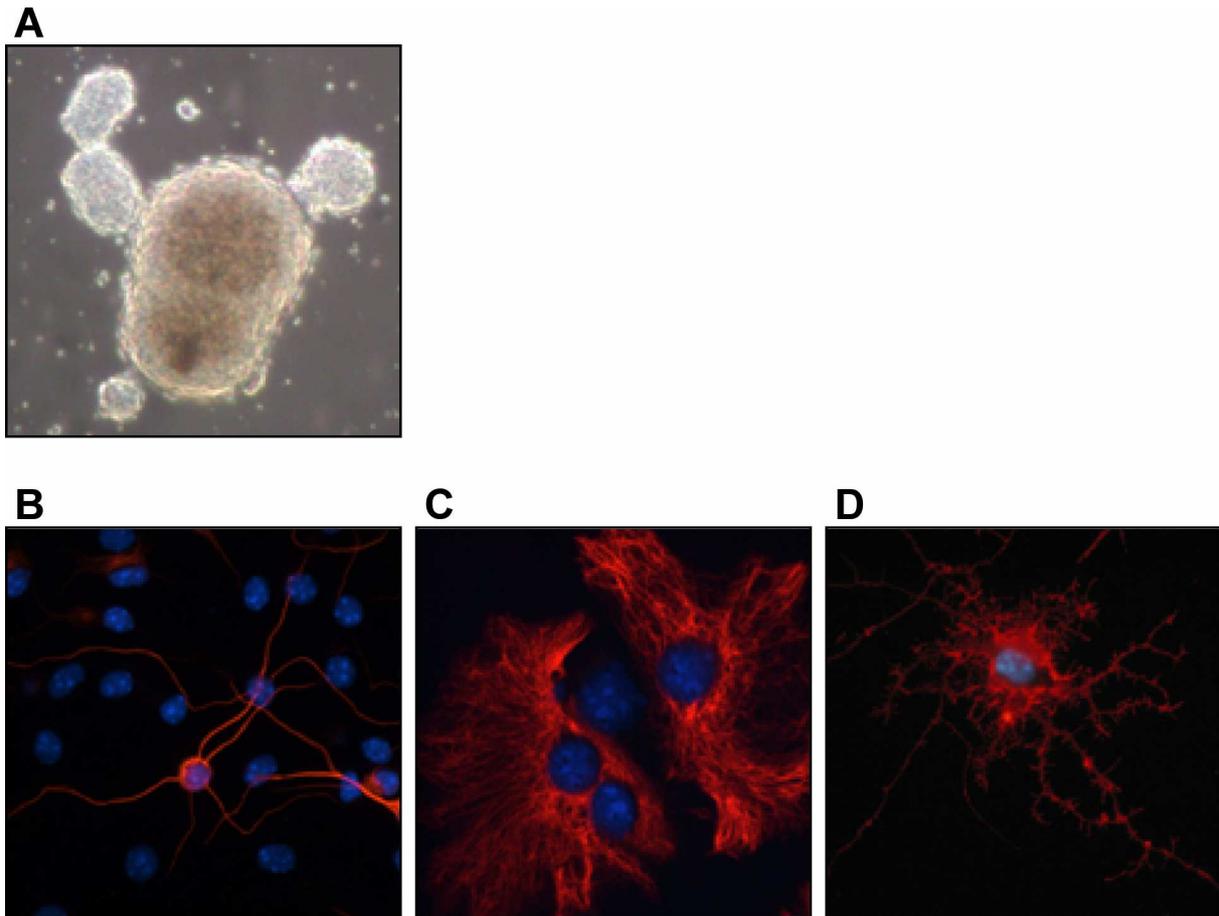
Nach Injektion in murine Blastozysten besiedelten KG-1 Zellen bevorzugt das Blut und den Dottersack sich entwickelnder E12.5 Embryonen sowie das Blut adulter Tiere. Eine Abschätzung der Gesamtzahl humaner Zellen im peripheren Blut chimärer Embryonen lässt vermuten, dass humane Zellen in muriner embryonaler Mikroumgebung proliferieren konnten. Nach Injektion von 5-30 humanen KG-1 Zellen in murine Blastozysten waren im peripheren Blut chimärer E12.5 Embryonen etwa 100 Nachkommen der injizierten humanen Zellen nachweisbar. Adulte chimäre Tiere entwickelten bis zum Alter von 3 Monaten keine Tumoren.

Nach Injektion in murine Blastozysten wurde in KG-1 Zellen die Expression der  $\epsilon$ - und  $\beta$ -Globingene induziert. Außerdem können in chimären E12.5 Embryonen humane Zellen nachgewiesen werden, die den hämatopoetischen Marker CD45 sowie den erythroiden Marker CD235a tragen. Die Expression dieser Gene kann als Indiz einer entwicklungspezifischen Differenzierung humaner leukämischer Zellen in muriner Mikroumgebung gewertet werden (Dürr et al., 2003).

Diese Tatsache ist ein Hinweis darauf, dass eine Regulation des Differenzierungsstatus leukämischer Zellen durch embryonale Mikroumgebung stattfindet.

### **3.2 Untersuchungen zum Einfluss Chromatin-modifizierender Substanzen auf das Differenzierungspotential muriner NSZ**

NSZ können aus verschiedenen Geweben adulter Tiere, darunter Hippocampus, subventrikuläre Zone und Bulbus olfaktorius, gewonnen werden (Morshead et al., 1994; Reynolds and Weiss, 1992; Weiss et al., 1996a). Aber auch aus dem Cortex des fötalen Gehirns können NSZ isoliert werden (McKay, 1997). Alle hier beschriebenen Experimente wurden mit NSZ durchgeführt, die murinen fetalen Hirnen am Tag 14.5 der Entwicklung entnommen wurden. Dazu wurde aus Embryonen am Tag 14 der Trächtigkeit das Vorderhirn präpariert und durch Trituration in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium in Gegenwart von bFGF und EGF kultiviert. Dabei bilden NSZ nicht-adhärierende Zellaggregate, sogenannte Neurosphären (Hulsas and Quesenberry, 2000) (Bez et al., 2003) (Abb.8A). Neurosphären enthalten neben differenzierten Zelltypen neurale Stamm- und Vorläuferzellen, die nach Vereinzelnung entweder differenzieren oder klonal neue Neurosphären bilden und so ihre Stammzeleigenschaft demonstrieren. Limitierende Verdünnungsreihen zeigen, dass etwa 3% der Zellen einer Neurosphäre neue Neurosphären bilden. Induziert man durch Wachstumsfaktorentzug Differenzierung, so bilden sich aus Zellen einer Neurosphäre Neurone (Abb.8B), Astrozyten (Abb.8C) sowie Oligodendrozyten (Abb.8D) (Schmittwolf et al., 2005).



**Abb.8 Charakterisierung *in vitro* kultivierter muriner NSZ.** A) Gezeigt ist die lichtmikroskopische Aufnahme *in vitro* kultivierter humaner Neurosphären (Vergrößerung 200x). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Differenzierung humaner NSZ zu: B) Neuronen, C) Astrozyten und D) Oligodendrozyten. Linienspezifische Antikörper wurden jeweils mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (orange) angefärbt. Zur Lokalisation einzelner Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt.

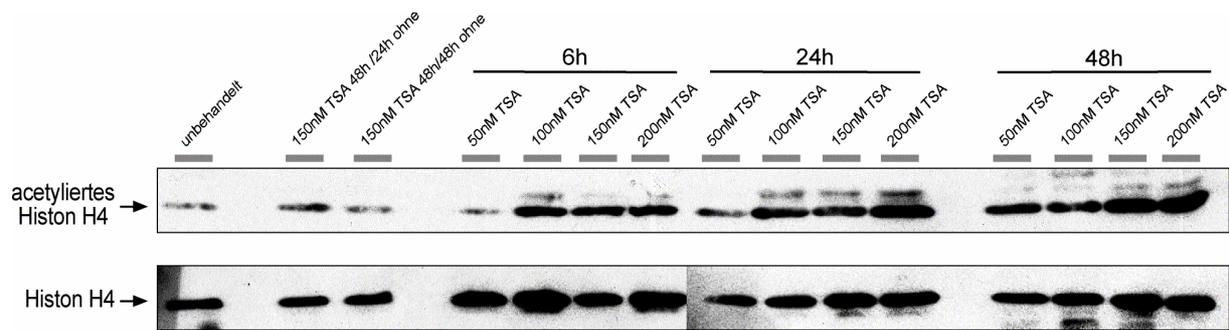
Aktuelle Publikationen zur Entwicklungsmöglichkeit somatischer Stammzellen zeigen, dass das Differenzierungspotential von SSZ durch Modifikation des epigenetischen Status beeinflusst werden kann (Milhem et al., 2004){Hsieh, 2004 #5367}. Ziel der Untersuchungen war es daher, den Einfluss verschiedener Histondeacetylase-Inhibitoren sowie des Nukleotidanalogen AzaC auf die Chromatinstruktur neuraler Stammzellen zu untersuchen und die Effekte epigenetischer Modifikationen auf die Transkription und das Entwicklungspotential neuraler Stammzellen zu bestimmen. Da verschiedene Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf das Entwicklungspotential von SSZ kamen wurde spekuliert, dass die Kultur von SSZ *in vitro* einen Einfluss auf das Entwicklungspotential der Zellen haben könnte. Um einen Effekt der *in vitro* Kultur auf das Differenzierungspotential von NSZ gering zu halten, wurden ausschließlich NSZ, die längstens 6 Wochen *in vitro* kultiviert wurden, in den Transplantationsversuchen eingesetzt. Dazu wurden murine NSZ mit HDAC-Inhibitoren in Kombination mit dem

Nukleotidanalogen AzaC inkubiert. Da HDAC-Inhibitoren Apoptose-induzierende Aktivität besitzen, wurden in allen Experimenten NSZ aus bcl-2 transgenen Embryonen eingesetzt (Johnstone, 2002). Die ubiquitäre Expression von bcl-2 unter der Kontrolle des murinen H-2K<sup>b</sup> Promotors beeinflusste die embryonale und adulte Entwicklung nicht (Domen et al., 1998). In limitierenden Verdünnungsreihen zeigten bcl2- transgene NSZ im Vergleich zu wildtypischen NSZ eine leicht erhöhte Rate Neurosphären-initiiierender Zellen. Bcl-2 transgene NSZ konnten zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren (Schmittwolf et al., 2005).

### 3.2.1 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Acetylierung von Histon H4

Histone nehmen eine wichtige Funktion bei der Ausprägung von Chromatin und somit auch bei der Genregulation ein. Da es für die Untersuchung des Entwicklungspotentials von somatischen Stammzellen von Interesse war, ob sich das Acetylierungsmuster und eventuell die transkriptionelle Aktivität von NSZ ändern lässt, wurden NSZ transient mit HDAC-Inhibitoren inkubiert. Die meisten bisher bekannten HDAC-Inhibitoren lassen sich den Stoffklassen der kurzkettigen Fettsäuren, den Tetrapeptiden sowie den Hydroxamsäuren zuordnen. Darüber hinaus gibt es Moleküle weiterer Stoffklassen, die ebenfalls als HDAC-Inhibitoren wirken. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden murine NSZ mit den Hydroxamsäuren Trichostatin A, SAHA, Scriptaid sowie den Benzamidinen SW68 und SW70 inkubiert (Jung, 2001).

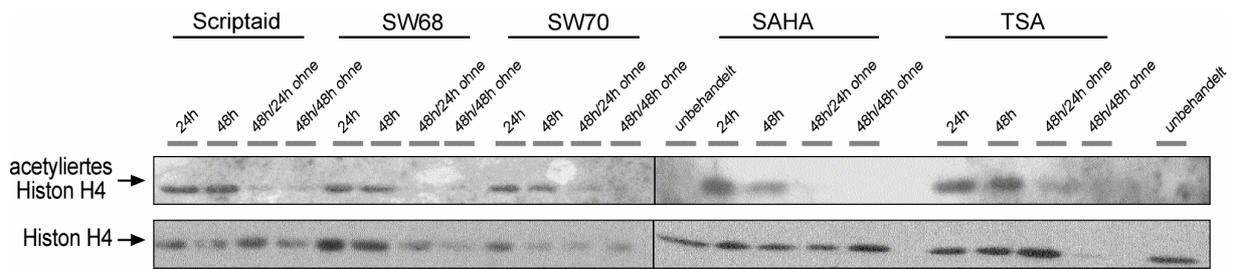
In einer ersten Versuchsreihe wurden murine, aus bcl-2 transgenen Tieren isolierte NSZ für 48h mit TSA in unterschiedlichen Konzentrationen kultiviert. Nach 48h wurden die Zellen in frischem Medium ohne Inhibitoren aufgenommen und erneut für 48h inkubiert. Im Abstand von 24 h wurden Zellen entnommen und Kernproteine isoliert. Gleiche Mengen an Proteinen wurden anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet. Die Acetylierung von Histon H4 wurde mittels eines Antiserums gegen die acetylierten Lysine 5, 8, 12 und 16 des Histon H4 bestimmt und mit der Gesamtmenge an Histon H4 verglichen (Abb.9).



**Abb.9 Acetylierung von Histon H4 nach Inkubation mit TSA und AzaC.** Western-Blot Analyse der Acetylierung von Histon H4 in murinen NSZ. Nukleäre Lysate von NSZ, die entweder unbehandelt oder mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten von TSA und AzaC kultiviert waren, wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem Antiserum behandelt, um die Acetylierung von Histon H4 an den Lysinen 5, 8, 12 und 16 zu bestimmen. Anschließend wurde zur Ladekontrolle mit einem polyklonalen Antikörper gegen gesamtes Histon H4 getestet.

Im Zellkern *in vitro* kultivierter NSZ liegt lediglich ein kleiner Teil des gesamten Histon H4 in der acetylierten Form vor. Bei Inkubation in 50 nM TSA konnte nach 6 h noch keine Veränderung des Acetylierungsgrads beobachtet werden. Bei Kultivierung der NSZ mit mindestens 100 nM TSA wurde hingegen bereits nach 6 h eine Zunahme der Acetylierung festgestellt. Wird die Inkubation mit TSA fortgesetzt, nimmt die Acetylierung weiter zu. Nach 24 h konnte auch mit 50 nM TSA eine Zunahme der Acetylierung von Histon H4 beobachtet werden. Die stärkste Acetylierung von Histon H4 trat nach 48 h unter 200 nM TSA ein. Höhere TSA-Konzentrationen bzw. längere Inkubationszeiten konnten nicht analysiert werden, da die stark Apoptose-induzierende Wirkung von TSA zu einem deutlichen Abfall der Zellzahl geführt hat. Bereits 24 h nach Wegnahme von TSA war ein deutlicher Rückgang der Acetylierung von Histon H4 zu beobachten und nach 48 h Kultur ohne TSA war der Grad der Acetylierung wieder auf dem Niveau unbehandelter NSZ angelangt.

Um die Wirkung unterschiedlicher HDAC-Inhibitoren auf die Acetylierung von Histon H4 sowie die Auswirkung auf die Proliferation der Zellen zu vergleichen, wurden in einem weiteren Experiment NSZ eines Kulturansatzes parallel mit 150 nM TSA, 10  $\mu$ M SAHA, 20  $\mu$ M Scriptaid, 20  $\mu$ M SW68 oder 20  $\mu$ M SW70 inkubiert (Abb.10). Dabei zeigte sich, dass alle HDAC-Inhibitoren bei den eingesetzten Konzentrationen zu einer vergleichbar starken Acetylierung von Histon H4 nach 24 bzw. 48 h Inkubation führten. Auch die Deacetylierung der Histone nach Wegnahme der HDAC-Inhibitoren erfolgte etwa gleich schnell.



**Abb.10 Acetylierung von Histon H4 nach Inkubation mit verschiedenen HDAC-Inhibitoren und AzaC.** Dargestellt sind Western-Blot Analysen nukleärer Lysate von NSZ nach Inkubation mit verschiedenen HDAC-Inhibitoren in Kombination mit AzaC. Neben der Acetylierung von Histon H4 aus unbehandelten NSZ ist auch die Acetylierung von Histon H4 aus NSZ nach Inkubation mit den HDAC-Inhibitoren TSA, SAHA, Scriptaid, SW68 und SW70 in Kombination mit AzaC abgebildet. Die Analyse erfolgte gemäß der Beschreibung unter Abb.5. Als Ladekontrolle wurde die Menge an gesamten Histon H4 bestimmt.

Der Rückgang der Zellzahlen aufgrund der Behandlung durch HDAC-Inhibitoren war bei allen getesteten Substanzen etwa gleich stark. Jedoch erhöhte sich die Zellzahl nach Wegnahme von TSA, SW68 und SW70 rascher als nach Behandlung durch SAHA und Scriptaid (Reckewell, 2004).

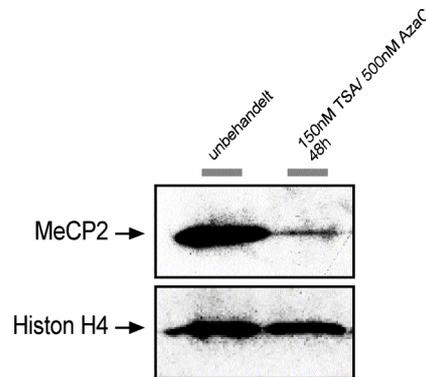
Somit lässt sich feststellen, dass die transiente Behandlung muriner NSZ mit HDAC-Inhibitoren zu einer reversiblen Hyperacetylierung von Histon H4 führt. Bereits 6 h nach Beginn der Inkubation mit TSA/AzaC kann eine Hyperacetylierung beobachtet werden. Die Wegnahme der Inhibitoren führte innerhalb von 24 – 48 h zu einem Rückgang der Acetylierung auf das Niveau vor der Behandlung. Die HDAC-Inhibitoren TSA, SAHA, Scriptaid, SW68 und SW70 führen bei unterschiedlichen Konzentrationen zu vergleichbar starker Acetylierung von Histon H4 in murinen NSZ.

### 3.2.2 Einfluss von TSA/Aza auf die Methylierung genomischer DNA in neuronalen Stammzellen

Neben der Acetylierung von Histonen hat auch die Methylierung von Cytidinen im DNA-Strang Auswirkung auf die Ausprägung von Hetero- bzw. Euchromatin. Beide Mechanismen wirken synergistisch bei der Ausbildung des Chromatin (Csankovszki et al., 2001).

Im vorliegenden Experiment sollte überprüft werden, ob die Inkubation von NSZ mit AzaC die Methylierung des DNA-Stranges beeinflusst. Hierzu wurden murine NSZ sowohl mit dem HDAC-Inhibitor TSA, als auch mit dem Nukleotidanalogen AzaC inkubiert. Nach 48 h Inkubation wurde die Menge an MeCP2 im Zellkern der NSZ bestimmt. Dazu wurden die Zellkerne isoliert, das Lysat im Western-Blot aufgetragen und mit polyklonalen Antikörpern gegen MeCP2 getestet. Da MeCP2 direkt an methyliertes Cytidin bindet, kann es als Indikator für die Methylierung von DNA genutzt werden (Abb.11). In unbehandelten NSZ konnte eine große Menge an MeCP2 im Nukleus nachgewiesen werden.

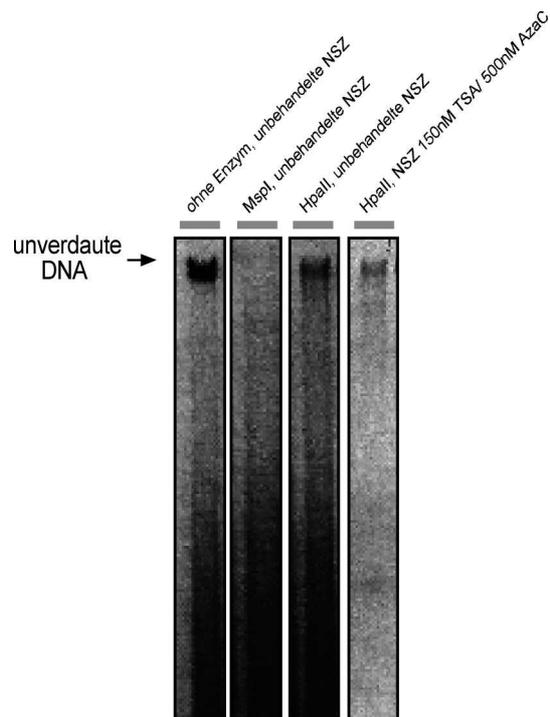
Nach 48 h Inkubation mit 150 nM TSA sowie 500 nM AzaC war eine weitaus geringere Menge an MeCP2 Protein in den Zellkernen der NSZ vorhanden.



**Abb.11 Einfluss von TSA und AzaC auf die Menge an MeCP2 im Zellkern von NSZ.** Abgebildet ist eine Western Blot Analyse zur Bestimmung der Menge an MeCP2 im Zellkern von NSZ nach Behandlung mit TSA und AzaC. Nukleäre Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und mit einem Antikörper gegen MeCP2 getestet. Als Ladekontrolle wurde die Menge an gesamten Histon H4 bestimmt.

In einem zweiten Ansatz wurden NSZ ebenfalls für 48 h mit 150 nM TSA und 500 nM AzaC behandelt, anschließend die genomische DNA isoliert und einem enzymatischen Verdau unterzogen. Die dabei eingesetzten Restriktionsenzyme HpaII und MspI wirken als sogenannte Isoschizomere, d.h. sie nutzen beide dieselbe Restriktionsstelle, das Tetramer CCGG, wobei MspI den DNA-Strang unabhängig von der Methylierung der Cytidine schneidet, während HpaII durch die Methylierung der Cytidine blockiert wird. Wird die genomische DNA nach enzymatischem Verdau über ein Agarosegel aufgetrennt, liegt die DNA nach MspI Verdau fast vollständig in kleinen Fragmenten vor, während die Inkubation mit HpaII die DNA abhängig vom Methylierungsgrad unterschiedlich stark schneidet. In Abb. 12 ist zu sehen, dass unverdaute DNA aus NSZ überwiegend in langen Fragmenten am oberen Ende des Agarosegels zu finden ist. Ein Verdau mit dem Methylierungs-insensitiven Restriktionsenzym MspI bewirkt den vollständigen Verdau genomischer DNA, so dass überwiegend kurze Fragmente im unteren Teil des Agarosegels sichtbar sind. Die Inkubation genomischer DNA aus unbehandelten Zellen mit dem Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym HpaII bewirkt lediglich einen geringen Verdau genomischer DNA, d.h. aufgrund der Methylierung der Cytidine in der genomischen DNA von NSZ konnte nur ein Teil der Restriktionsstellen durch das Enzym getrennt werden. Nach Inkubation von NSZ mit 150 nM TSA/ 500 nM Aza für 48 h sinkt der Anteil unverdauter genomischer DNA hingegen ab. Zwar wird die DNA nicht vollständig verdaut wie bei der Inkubation mit MspI, jedoch wird im Vergleich zu genomischer DNA aus unbehandelten NSC durch das

Methylierungs-sensitive Restriktionsenzym HpaII mehr DNA verdaut, d.h. es liegen mehr Restriktionsstellen unmethyliert vor.



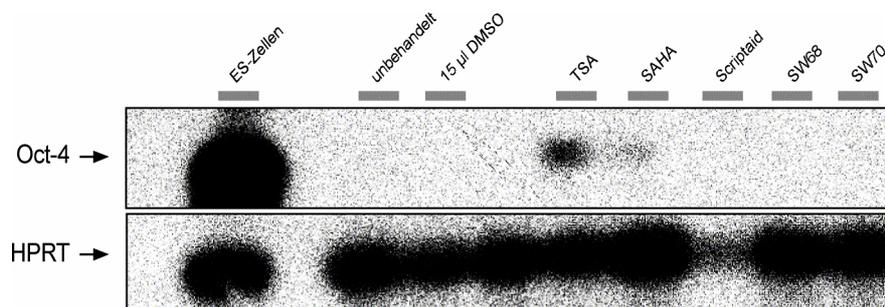
**Abb. 12 Methylierung genomischer DNA nach Inkubation von NSZ mit TSA/AzaC.** Die Aufnahme eines Ethidiumbromid gefärbten 0,5%igem Agarosegels nach Auftrennung genomischer DNA aus NSZ ist dargestellt. Murine NSZ wurden mit TSA/AzaC kultiviert. Anschließend wurde die genomische DNA isoliert und mit Restriktionsenzymen verdaut. Abgebildet ist die elektrophoretische Auftrennung unverdauter genomischer DNA, MspI und HpaII verdauter DNA aus unbehandelten NSZ und HpaII verdauter DNA aus TSA/AzaC behandelten Zellen.

Beide Ergebnisse belegen, dass die Inkubation von NSZ mit AzaC einen Einfluss auf die Methylierung von Cytidinen im DNA-Strang hat. Zum einen sinkt die Menge an DNA-gebundenem MeCP2, zum anderen ist die nukleäre DNA nach AzaC Inkorporation zugänglicher für einen Verdau des Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym HpaII.

### 3.2.3 Reaktivierung der Oct-4 Transkription durch verschiedene HDAC-Inhibitoren

Der Transkriptionsfaktor Oct-4 gilt als einer der wichtigsten Regulatoren der Totipotenz von ES-Zellen (Pesce et al., 1999). Die Expression von Oct-4 ist während der Ontogenese auf Zellen der inneren Zellmasse bis zum Blastozystenstadium, sowie auf die Keimzellen des sich entwickelnden Organismus beschränkt (Pesce et al., 1999; Scholer et al., 1990). Damit murine NSZ ihr Differenzierungspotential verändern und Zelltypen heterologer Gewebe bilden, könnte es notwendig sein, dass die Zellen transient pluripotente Eigenschaften sowie Genexpressionsmuster pluripotenter Zellen annehmen. Daher sollte der Einfluss verschiedener HDAC-Inhibitoren auf die Expression von Oct-4 untersucht werden. Dazu wurden murine NSZ unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 10 beschrieben inkubiert.

Die Expression von Oct-4 wurde nach 48h mittels RT-PCR untersucht (Abb.13). Wie erwartet, konnte eine starke Expression des Oct-4 Genes in ES-Zellen nachgewiesen werden, während *in vitro* kultivierte NSZ keine Transkription von Oct-4 zeigen. Überraschenderweise konnte nach Behandlung mit 150 nM TSA, bzw. 10  $\mu$ M SAHA in Verbindung mit 500 nM AzaC Oct-4 Expression in murinen NSZ beobachtet werden, wobei in NSZ, die mit TSA behandelt waren, mehr Oct-4 Transkript vorhanden war, als in SAHA-behandelten NSZ. Die Behandlung von NSZ mit den HDAC-Inhibitoren Scriptaid, SW68 und SW70 führte hingegen zu keiner Reexpression des ES-Zell-spezifischen Oct-4 Gens, was auf eine unterschiedliche Wirkung der HDAC-Inhibitoren hindeutet.



**Abb. 13 Expression von Oct-4 in murinen NSZ nach Kultur mit HDAC-Inhibitoren in Kombination mit AzaC.** Autoradiogramme von RT-PCR Analysen muriner NSZ. Zur Analyse der Expression des ES-Zell-Markers Oct-4 wurde aus *in vitro* kultivierten und mit HDAC-Inhibitoren sowie AzaC inkubierten NSZ RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und zur Kontrolle einer HPRT-spezifischen PCR unterzogen. Durch PCR mit spezifischen Primern wurde die Expression von Oct-4 in verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Als Kontrollen sind die PCR-Ergebnisse von ES-Zellen und von unbehandelten NSZ abgebildet. Um einen Effekt des Solvenz DMSO auf die Genexpression der NSZ auszuschließen, wurde ein Ansatz von NSZ mit DMSO inkubiert und in die Analyse aufgenommen.

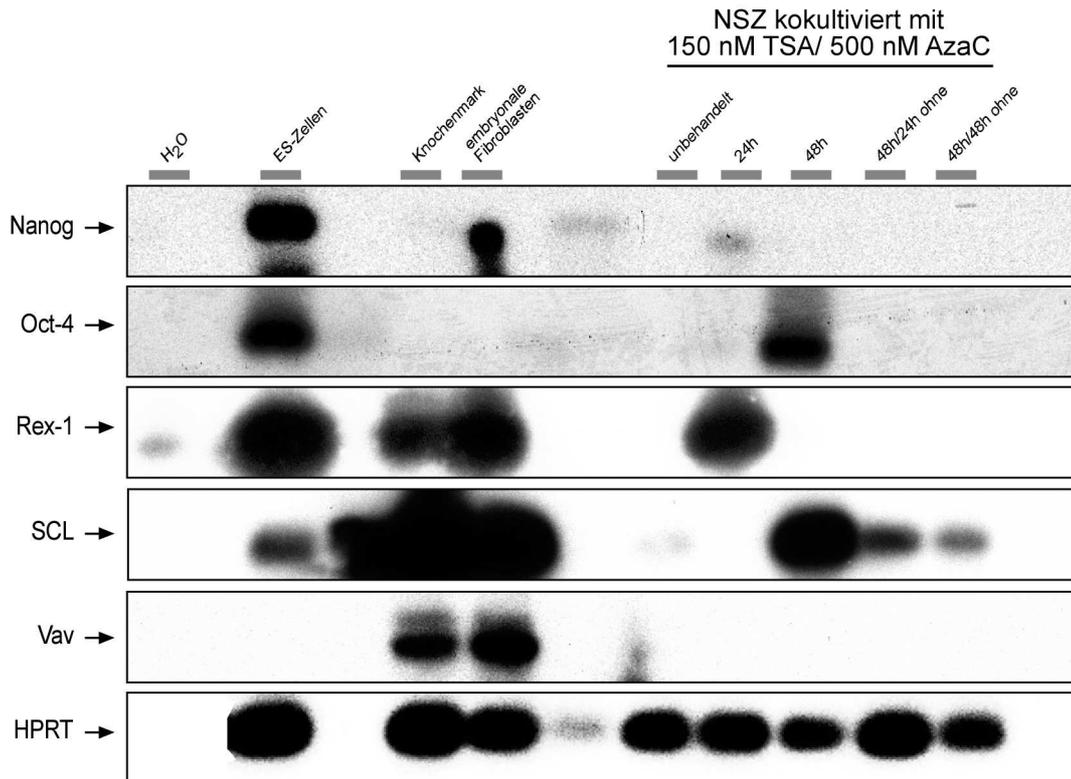
Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Inkubation von NSZ mit den HDAC-Inhibitoren TSA und SAHA in Verbindung mit dem Nukleotidanalogen AzaC die Expression des Oct-4 Gens in NSZ induziert wird.

### 3.2.4 Genexpressionsanalyse verschiedener linienspezifischer Gene in NSZ

Alle Zellen eines Organismus einschließlich der Stammzellen besitzen dasselbe Genom. Dennoch unterscheiden sich verschiedene Zelltypen in ihrer Funktion, Morphologie und Genexpression. Die Identität jeder Zelle wird dabei durch Zelltyp-spezifische Genexpressionsmuster festgelegt (Fisher, 2002) (Cook and Tyers, 2004). Dieses Muster wird durch extrinsische Faktoren (extrazelluläre Signalmoleküle, Zell-Zell-Interaktionen) und intrinsische Faktoren (Transkriptionsfaktoren) beeinflusst. Wie in Abb. 10 gezeigt wurde, bewirkt die Inkubation von NSZ mit allen getesteten HDAC-Inhibitoren eine Hyperacetylierung von Histon H4. Gleichzeitig lassen die Ergebnisse vermuten, dass TSA,

SW68 und SW70 eine geringe apoptotische Wirkung auf NSZ besitzen. Aus Abb.13 wird deutlich, dass die endogene Oct-4 Expression in NSZ durch TSA und SAHA induziert werden kann. Zusammenfassend wird deutlich, dass TSA aufgrund seiner Wirkung auf die Histon-Hyperacetylierung und Oct-4 Reaktivierung in Verbindung mit AzaC ein potenter Induktor von Chromatin-Modifikationen in murinen NSZ darstellt.

Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob die Behandlung von NSZ mit TSA und AzaC die Expression linienspezifischer Gene beeinflusst. In die Analysen wurden die ES-Zell-spezifischen Gene Nanog und Oct-4 einbezogen (Chambers et al., 2003) (Mitsui et al., 2003) (Scholer et al., 1990). Außerdem wurde der Transkriptionsfaktor Rex-1, dessen Promotor eine Bindungsstelle für Oct-4 besitzt, in die Untersuchungen eingeschlossen (Rosfjord and Rizzino, 1994). Da aus früheren Experimenten bekannt war, dass NSZ nach Transplantation in Blastozysten transient hämatopoetische Zellen bilden können (Harder et al., 2004), wurde die Expression des Hämatopoese-spezifischen Transkriptionsfaktors SCL sowie des Protoonkogenes Vav analysiert (Robb et al., 1995) (Zhang et al., 1994)(Abb.14). Wie erwartet exprimieren ES-Zellen die Gene Nanog, Oct-4 sowie Rex-1. Außerdem konnten Transkripte von SCL in ES-Zellen detektiert werden. Dies steht im Widerspruch zu bisherigen Ergebnissen, allerdings konnte gezeigt werden, dass ES-Zellen unter geeigneten Kulturbedingungen zu SCL exprimierenden hämatopoetischen Zellen differenzieren können (Chung et al., 2002). Daher könnte in der ES-Zell-Population, die für diesen Versuch verwendet wurde, SCL exprimierende Zellen vorhanden gewesen sein. In Knochenmarkzellen wurden SCL und Vav exprimiert. In einer Primärkultur embryonaler Fibroblasten wurde das ES-Zell-spezifische Gen Rex-1 exprimiert. Außerdem war die Expression von SCL und Vav nachzuweisen. Während *in vitro* kultivierte NSZ keines der untersuchten Gene exprimierten, konnte nach Inkubation mit 150 nM TSA und 500 nM AzaC die Expression einiger linienspezifischer Gene beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde eine schwache Expression des ES-Zell-spezifischen Gens Nanog festgestellt. Auch der Transkriptionsfaktor Rex-1 wurde von NSZ nach 24h Inkubation mit TSA und AzaC exprimiert. Nach einer Inkubationszeit von 48h konnten neben einer deutlichen Expression des ES-Zell-spezifischen Markers Oct-4 auch Transkripte von SCL nachgewiesen werden. Die Expression von SCL hielt noch an, nachdem TSA und AzaC bereits seit 24 bzw. 48h entfernt worden waren. Die Expression des Hämatopoese-spezifischen Protoonkogenes Vav konnte durch die Behandlung der NSZ mit TSA und AzaC allerdings nicht induziert werden.



**Abb. 14 Expression von Entwicklungskontrollgenen in murinen NSZ nach Inkubation mit TSA/AzaC.** Gezeigt sind Autoradiogramme von RT-PCR Analysen verschiedener muriner Zellpopulationen. Aus ES-Zellen, mononukleären Knochenmarkszellen, embryonalen Fibroblasten, sowie Kurzzeit-kultivierten *bcl-2*<sup>+</sup> NSZ wurde nach verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation mit TSA und AzaC RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und RT-PCR Reaktionen mit gen-spezifischen Primern für Nanog, Oct-4, Rex-1, SCL, Vav, Nestin und HPRT unterzogen.

Die Analyse zeigt, dass die Chromatin-modifizierenden Chemikalien TSA und AzaC in der Lage sind, das Genexpressionsmuster von NSZ zu verändern. Nach der Inkubation in TSA und AzaC exprimieren die Zellen Gene, die in ES-Zellen sowie hämatopoetischen Zellen exprimiert werden.

### 3.2.5 Untersuchungen zur Besiedelung muriner Embryonen durch NSZ

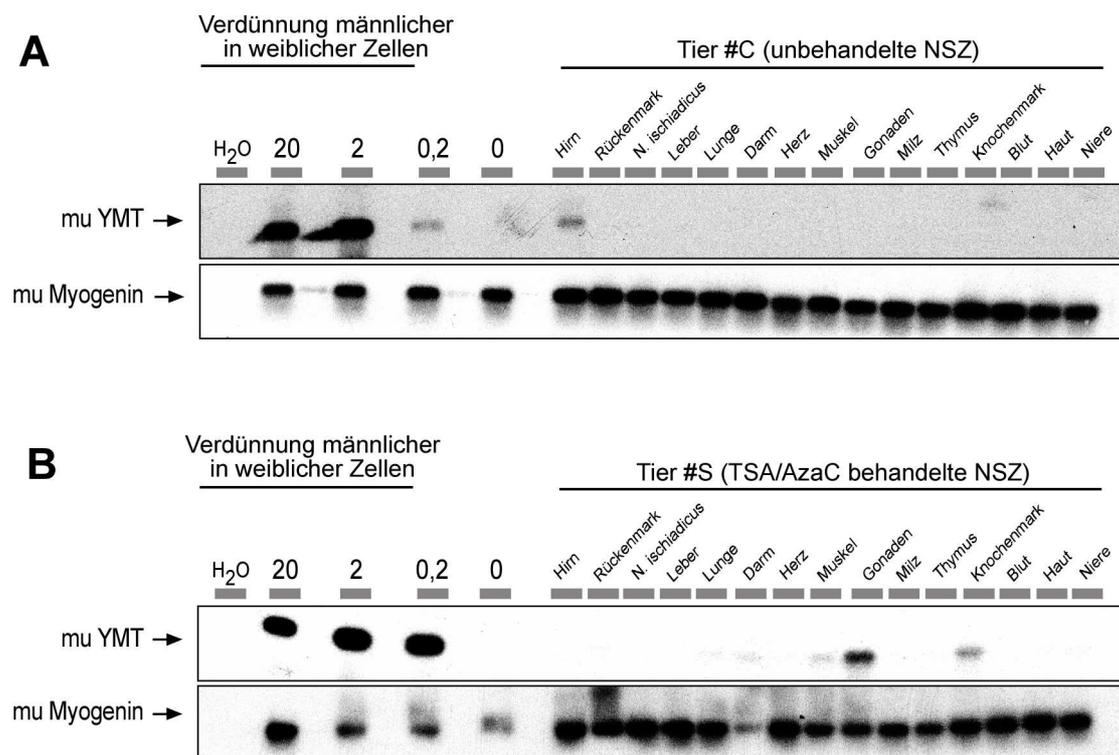
In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine transiente Behandlung von NSZ mit dem HDAC-Inhibitor TSA sowie dem Nukleotidanalogen AzaC zu einer Hyperacetylierung von Histon H4 (Abb.10) und einer Demethylierung genomischer DNA (Abb.11, Abb.12) führt. Gleichzeitig induziert die Behandlung von NSZ mit TSA/AzaC die Expression der ES-Zell-spezifischen Gene Nanog, Oct-4 und Rex-1 sowie des hämatopoetischen Markers SCL (Abb.14). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass NSZ trotz einer Behandlung mit TSA und AzaC ihr Neurosphären-initiiierendes Potential und die Differenzierungsfähigkeit zu neuronalen Zelltypen beibehalten (Schmittwolf et al., 2005). Welchen Effekt die epigenetische Modifikation auf das Entwicklungspotential der NSZ hat,

sollten in einem *in vivo* Versuchsaufbau bestimmt werden, der die Voraussetzungen zur Differenzierung in alle Zelltypen entsprechend pluripotenten ES-Zellen zur Verfügung stellt. Die Injektion von Zellen in murine Blastozysten und die Analyse der Besiedelung von Organen des sich entwickelnden Embryos erlaubt den Vergleich der Entwicklungsmöglichkeit von somatischen Stammzellen mit pluripotenten ES-Zellen, die nach Injektion in Blastozysten an der Entwicklung aller Gewebe und Organe teilnehmen (Beddington and Robertson, 1989). In diesem Experiment wurde daher 5 – 10 Zellen aus einer unmittelbar vorher vereinzelt und längstens 6 Wochen *in vitro* kultivierten Neurosphärenkultur in das Blastozoele von 3.5 Tage alten murinen Blastozysten injiziert. Nach Retransfer in scheinchwangere Ammentiere wurden Tiere geboren, die im Alter von 3 Monaten auf Chimerismus untersucht wurden. Dabei wurden männliche Zellen injiziert und weibliche Tiere mittels einer Y-Chromosom-spezifischen PCR auf die Anwesenheit männlicher Zellen überprüft. Es wurden aus adulten Tieren 15 Gewebe entnommen und in die Untersuchungen einbezogen (Abb.15).

Um den Einfluss einer transienten Inkubation von NSZ in TSA und AzaC auf das Entwicklungspotential der NSZ zu untersuchen, wurden unbehandelte NSZ sowie NSZ, die für 48 h mit 150 nM TSA/ 500 nM AzaC inkubiert wurden, in murine Blastozysten injiziert und die Unterschiede in der Besiedelung von Geweben und Organen der adulten Tiere ermittelt. Insgesamt wurden 10 Tieren nach Injektion unbehandelter und 10 Tiere nach Injektion behandelter NSZ in die Untersuchungen eingeschlossen. In allen 10 Tieren, die als Blastozysten unbehandelte NSZ erhalten hatten, wurden in mindestens einem Gewebe männliche Zellen detektiert. Der Anteil an Donorzellen in chimären Geweben lag bei etwa 0.2% (Abb.15A, Tab. 2A). Vergleichbar mit früheren Untersuchungen (Kirchhof et al., 2002) wurden die neuralen Gewebe Hirn, Rückenmark und Nervus ischiadicus häufig von injizierten NSZ besiedelt. Während Hirn und Rückenmark in 5 der 8 Tiere besiedelt waren, war der N. ischiadicus in 4 Mäusen chimär. Allerdings waren auch in einigen hämatopoetischen Geweben männliche Zellen nachweisbar. So konnte im Knochenmark und peripheren Blut von 4 analysierten Tieren Chimerismus festgestellt werden. Auch der Thymus war bei 4 Tieren durch männliche Zellen besiedelt. Auch in anderen, nicht-neuralen Organen konnte ein Chimerismus nachgewiesen werden. Allein in den Hautbiopsien der untersuchten Tiere fanden sich keine männlichen Donorzellen.

Auch nach Behandlung von NSZ mit TSA/AzaC konnten männliche Zellen in zahlreichen Geweben der untersuchten Tiere nachgewiesen werden (Abb.15B, Tab. 2B). Hier waren Rückenmark, Herz, Muskel und Knochenmark die am häufigsten besiedelten Gewebe.

Insgesamt 7 von 10 Tieren wiesen männlichen Zellen im Rückenmark auf, in 6 von 10 Tieren waren Herz, Skelettmuskel und Knochenmark besiedelt. Aber auch andere Gewebe wiesen ähnlich wie nach Injektion unbehandelter NSZ Donorzellen auf. Ein Vergleich des Besiedlungsmusters adulter Tiere nach Injektion unbehandelter und TSA/AzaC behandelte NSZ ergab, dass behandelte NSZ alle untersuchten Gewebe besiedeln, während unbehandelte NSZ nicht in der Haut zu finden waren. In den übrigen Geweben waren in den meisten Fällen mehr Tiere durch TSA/AzaC behandelte NSZ besiedelt als durch unbehandelte NSZ.



**Abb.15 Verteilung von Donorzellen in adulten Mäusen nach Injektion muriner NSZ in Blastozysten.** A) Gezeigt ist ein repräsentatives Weibchen, das nach Injektion männlicher unbehandelter NSZ in Präimplantationsblastozysten und Transfer in Ammentiere im Alter von 3 Monaten männliche Zellen in seinen Geweben enthielt. B) Abgebildet ist ein weibliches Tier, das nach Injektion männlicher TSA/AzaC behandelte NSZ in Präimplantationsblastozysten im Alter von 3 Monaten männliche Zellen in seinen Geweben enthielt. Dargestellt sind Autoradiogramme einer PCR Southern-Blot Analyse männlicher Donoranteile in Geweben weiblicher Tiere nach Injektion männlicher NSZ in murine Blastozysten. Jeweils eine Verdünnungsreihe von 20 bis 0 % männlicher in weiblicher Zellen sowie ein Kontrollansatz ohne genomische DNA (H<sub>2</sub>O) ist abgebildet. Mittels YMT PCR wurden männliche Zellen detektiert. Zur Kontrolle der Menge und Qualität der eingesetzten genomischen DNA wurden alle Proben einer Myogenin-spezifischen PCR unterzogen.

Tab.2 Verteilung männlicher Donorzellen in weiblichen Rezipienten

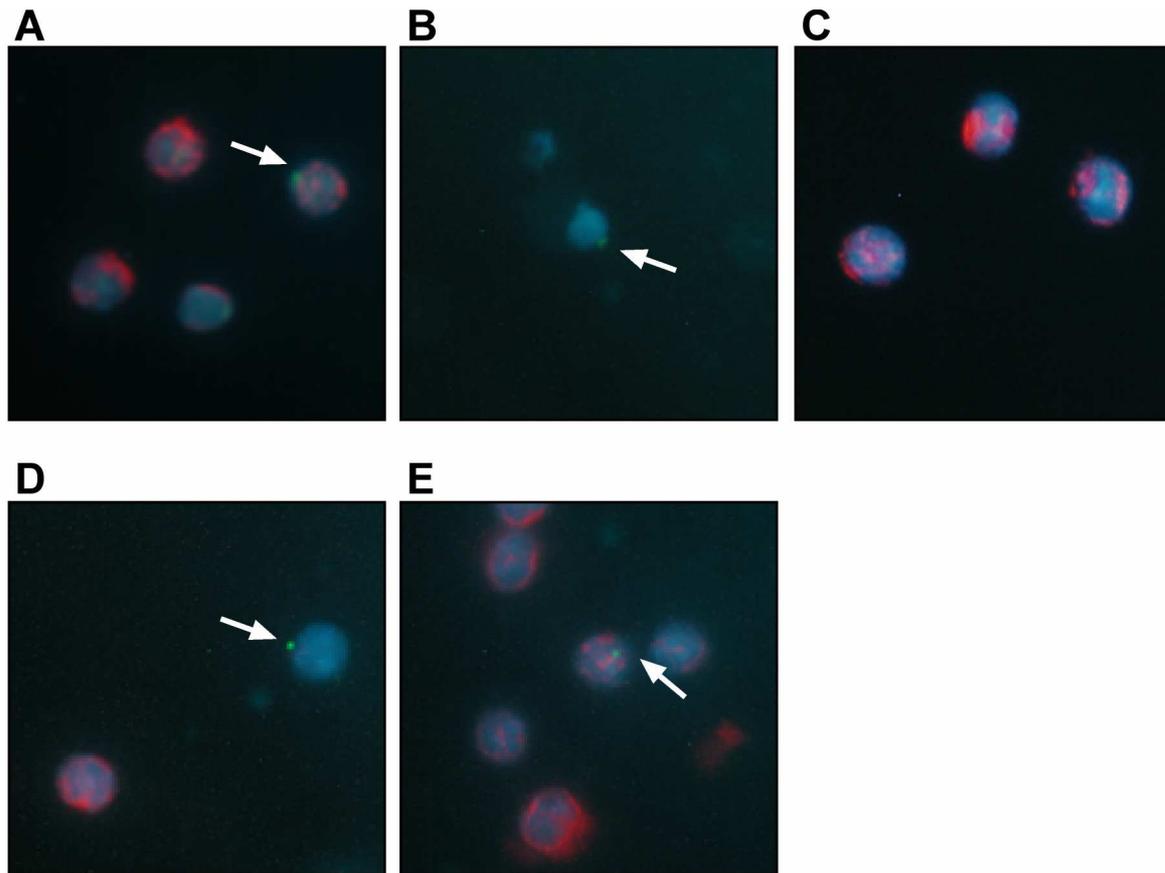
Tier#	Hirn	Rückenmark	N. ischiadicus	Leber	Lunge	Darm	Herz	Gonaden	Muskel	Milz	Thymus	Knochenmark	Blut	Haut	Niere
<b>A</b>															
B		x						x							
C	x											x			
D							x					x	x		
E			x						x			x			
F	x	x	x	x		x	x	x	x		x		x		x
K	x	x					x	x	x		x				
M	x	x	x	x	x		x	x		x	x	x	x		
N												x			
O			x												
P	x	x		x		x		x			x				
Σ	5/10	5/10	4/10	3/10	1/10	2/10	4/10	5/10	3/10	1/10	4/10	5/10	3/10	0/10	1/10
<b>B</b>															
G					x		x	x	x			x			
H		x	x								x				
I															
J		x	x		x				x			x			
L	x	x	x			x	x	x		x	x	x	x	x	x
Q		x		x		x	x	x	x			x			
R															
S								x				x			
T	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x		x	
U	x	x	x	x	x		x		x		x		x		
Σ	3/10	6/10	5/10	3/10	3/10	3/10	5/10	5/10	5/10	1/10	4/10	6/10	2/10	2/10	1/10

**Tab.2 Verteilung von Donorzellen in adulten weiblichen Rezipienten nach Blastozysteninjektion männlicher NSZ.** Dargestellt ist das Ergebnis der PCR Southern-Blot Analyse von Geweben adulter Mäuse. Aufgeführt sind weibliche Tiere, die nach Injektion männlicher unbehandelter NSZ (A) sowie männlicher TSA/AzaC inkubierter NSZ in murine Blastozysten im Alter von 3 Monaten Y-Chromosom<sup>+</sup> Zellen in ihren Geweben enthielten. Mit einem (x) markiert sind die Gewebe der individuellen Tiere, die Donoranteile zeigten. Die Gesamtzahl der chimären sowie der untersuchten Gewebe ist angegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass murine NSZ nach Injektion in Präimplantationsblastozysten den sich entwickelnden Embryo besiedeln und im adulten Tier neben neuralen auch in vielen anderen Geweben und Organen zu finden sind. Eine Inkubation der NSZ mit 150 nM TSA und 500 nM AzaC für 48h führt dazu, dass alle Organe zumindest in einem Tier Donorzellen aufweisen. Desweiteren hat es den Anschein, dass der Anteil an Tieren, die chimäre Organe und Gewebe aufweisen, zunimmt.

Über die zelluläre Identität der Donorkontribution in Geweben geben die Daten aus der PCR-Analyse keine Auskunft. Aus Genexpressionsanalysen war bekannt, dass NSZ nach Inkubation mit TSA und AzaC den Hämatopoese-spezifischen Transkriptionsfaktor SCL exprimieren. Zudem war das Knochenmark von Rezipientenmäusen nach Injektion TSA/AzaC behandelter NSZ etwas häufiger besiedelt, als nach Transplantation unbehandelter NSZ. Um zu überprüfen, ob NSZ nach Injektion in murine Blastozysten auch zu anderen als neuralen Zellen differenzieren können, wurden daher Knochenmarkzellen chimärer Tiere

immunhistochemisch analysiert. Dazu wurden chimäre Tiere durch Y-Chromosom-spezifische YMT-PCR identifiziert, mononukleäre Zellen des Knochenmarks isoliert, auf Objektträger zentrifugiert und einer Antikörperfärbung unterzogen. Zum Nachweis einer hämatopoetischen Differenzierung der NSZ wurden die Knochenmarkzellen gegen den panhämatopoetischen Marker CD45 gefärbt. Donorzellen wurden anschließend durch eine *in-situ* Hybridisierung gegen das Y-Chromosom nachgewiesen. Eine Kontrollfärbung von Knochenmarkzellen einer männlichen Spendermaus (Abb.16A) zeigt, dass von 100 männlichen hämatopoetischen Zellen etwa 98 Zellen eine rote Oberflächenfluoreszenz aufgrund der CD45-spezifischen Antikörperfärbung sowie eine punktuelle Grünfluoreszenz des Y-Chromosoms zeigen. NSZ, die aus einem männlichen Embryo isoliert wurden, zeigten keine Färbung durch den CD45-spezifischen Antikörper. Allerdings konnte in über 90% der Zellen Signale der Y-Chromosom-spezifischen Sonde detektiert werden (Abb.16B). Knochenmarkzellen einer weiblichen Spendermaus zeigen zwar eine rote Fluoreszenzfärbung durch CD45-spezifische Antikörperbindung aber keinerlei grüne Fluoreszenzfärbung (Abb.16C). Die Analyse des Knochenmarks von zwei Tieren #D und #E, die aus der Injektion von unbehandelten NSZ in eine Blastozyste hervorgingen, zeigte männliche Donorzellen, die kein CD45 exprimieren. In Abb.16D ist exemplarisch eine Donorzelle im Knochenmark von Tier #D gezeigt. In beiden Tieren befanden sich 10 männliche, CD45<sup>-</sup> Donorzellen unter 100.000 Knochenmarkzellen. Dagegen ergab die Untersuchung der Knochenmarkzellen der beiden Tiere #G und #Q, denen als Blastozyste TSA/AzaC behandelte NSZ injiziert wurden, dass im Knochenmark dieser Tiere männliche Donorzellen vorhanden sind, die den hämatopoetischen Marker CD45 exprimieren (Abb.16E, Tier #Q). Von 25 Y-Chromosom<sup>+</sup> Donorzellen unter 100.000 Knochenmarkzellen in Tier G exprimierten 5 den Hämatopoese-spezifischen Marker CD45. Bei Tier Q befanden sich unter 100.000 Zellen im Knochenmark 32, die durch die Y-Chromosom-spezifische Sonde als männlich identifiziert wurden. Darunter wurden 2 Zellen auch durch Antikörper gegen CD45 gefärbt.



**Abb.16 CD45/Y-Chromosom positive Donorzellen im Knochenmark chimärer weiblicher Mäuse.** A) Knochenmarkszellen einer männlichen Kontrollmaus; B) *in vitro* kultivierte NSZ aus einem männlichen Embryo; C) Knochenmarkszellen einer weiblichen Kontrollmaus; D) Knochenmarkszellen einer chimären weiblichen Maus nach Injektion männlicher unbehandelter NSZ in Blastozysten; E) Knochenmarkszellen einer chimären weiblichen Maus nach Injektion männlicher TSA/AzaC behandelter NSZ in Blastozysten. Gezeigt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Knochenmarkszellen nach immunhistochemischer Färbung gegen murines CD45 (rot) sowie Y-Chromosom-spezifischer *in situ* Hybridisierung (grün). Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt.

Es ist festzuhalten, dass die Inkubation von NSZ mit TSA und AzaC zu einer vermehrten Besiedelung muriner Gewebe nach Injektion in Blastozysten führt und dass TSA/AzaC behandelte NSZ oder deren Nachkommen nach Besiedelung sich entwickelnder Embryonen Zellen bilden, die den hämatopoetischen Marker CD45 exprimieren.

### 3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss epigenetischer Modifikationen auf das Entwicklungspotential muriner NSZ

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass eine transiente Behandlung muriner NSZ mit HDAC-Inhibitoren und dem Nukelotidanalogen AzaC zur Hyperacetylierung von Histonen und Demethylierung genomischer DNA führt. Die Inkubation von NSZ mit TSA und Aza führt zu einer Reaktivierung der Oct-4 Expression in NSZ. Daneben wird der hämatopoetische Transkriptionsfaktor SCL exprimiert. Nach Injektion in murine Blastozysten besiedeln sowohl unbehandelte als auch TSA/Aza inkubierte NSZ sich entwickelnde

Embryonen und können im adulten Tier in einer Vielzahl von Geweben und Organen nachgewiesen werden. Die Behandlung von NSZ mit TSA/AzaC führt dazu, dass der Anteil chimärer Geweben zunimmt. Zusätzlich konnten im Knochenmark chimärer Tiere nach Transplantation TSA/AzaC behandelte NSZ Donorzellen nachgewiesen werden, die den hämatopoetischen Marker CD45 exprimierten.

### **3.3 Untersuchung des Einflusses von Chromatin-modifizierenden Substanzen auf humane neurale Stammzellen**

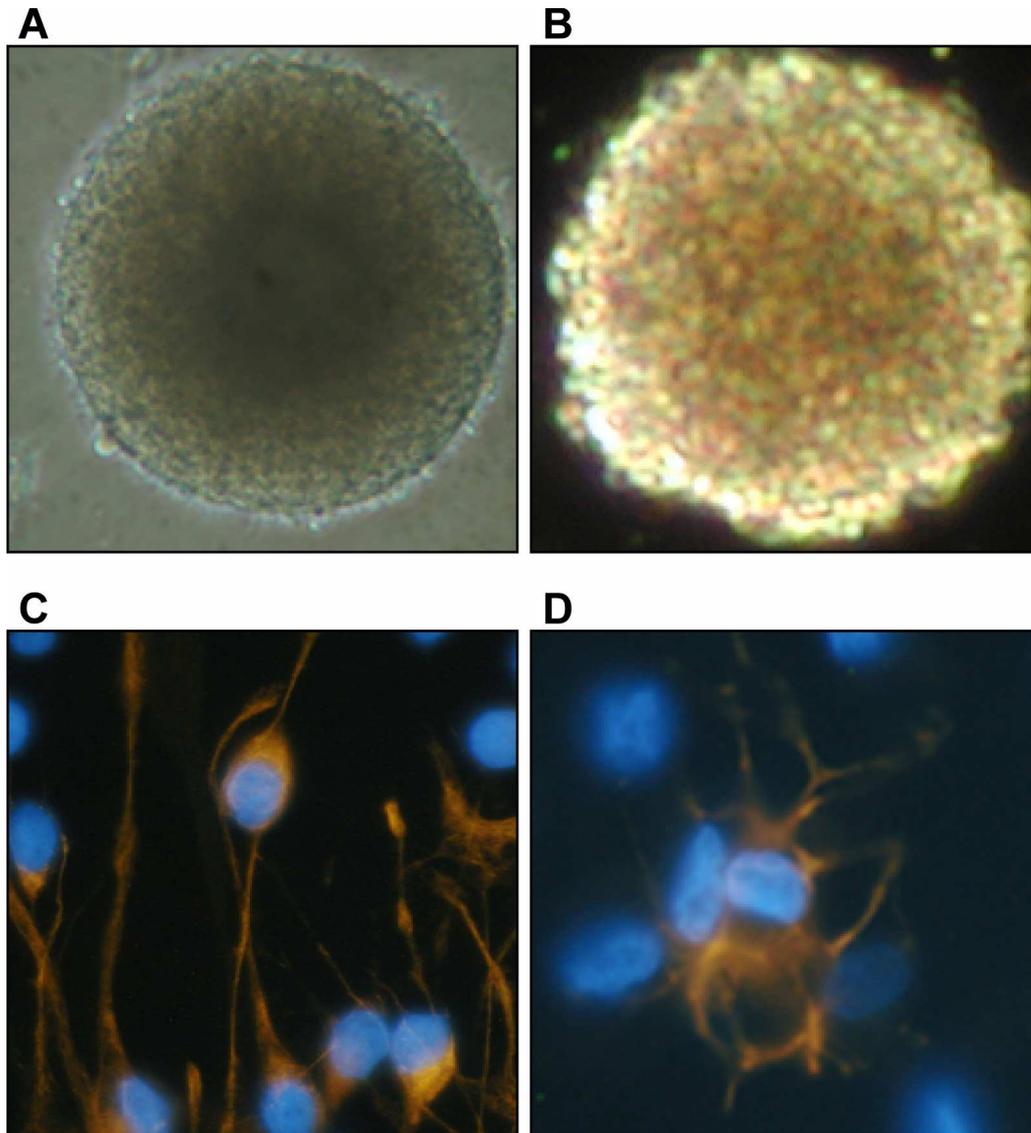
Potentielle therapeutische Anwendungen humaner somatischer Stammzellen zielen auf die Erzeugung von Ersatzgewebe für Transplantationszwecke ab (Jakel et al., 2004) (McBride et al., 2004) (Lindvall et al., 2004). Jedoch ist die Zugänglichkeit zu somatischen Stammzellen im adulten Organismus bei einigen Stammzellsystemen erschwert oder das Gewebe verfügt über kein bekanntes Stammzellsystem im adulten Organismus. So lässt sich zwar eine begrenzte Zahl hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blutsystem eines Erwachsenen isolieren, die Gewinnung von NSZ ist hingegen ohne schwerwiegende Eingriffe nicht möglich. Eine Lösung könnte die Erweiterung des Entwicklungspotentials leicht isolierbarer somatischer Stammzellen sein, so dass diese Zellen eines anderen Kompartimentes bilden können.

An murinen NSZ konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit Chemikalien, die den Epigenotyp der Zellen destabilisieren, das Entwicklungspotential der Zellen erweitert werden kann und dass NSZ Hämatopoese-spezifische Marker exprimieren (Abb. 16)(Schmittwolf et al., 2005). Die Ergebnisse aus dem murinen Stammzellsystem sollten nun auf humane NSZ übertragen werden.

#### 3.3.1 Charakterisierung und Differenzierung humaner neuraler Stammzellen

Humane NSZ lassen sich aus fetalem Hirn isolieren und wachsen ähnlich murinen NSZ in Serum-freiem Medium, das mit den Wachstumsfaktoren EGF, bFGF und NSF-1 angereichert ist (Svendsen et al., 1998). Die NSZ bilden dabei freischwimmende Neurosphären (Abb.17A, B). Die in den beschriebenen Versuchen eingesetzten humanen NSZ wurden von der Firma Cambrex bezogen. Die Isolation aus humanen Feten erfolgte mit Einverständniserklärung, für die Experimente lag eine Erlaubnis der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg vor. Unter den vorhandenen Laborbedingungen proliferierten die humanen NSZ sehr langsam und stellten nach kurzer *in vitro* Kultur die Proliferation ein. Dadurch war die Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen limitiert.

Durch Wachstumsfaktorentzug differenzierten die Zellen zu  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> Neuronen (Abb.17C) und O4<sup>+</sup> Oligodendrozyten (Abb.17D).

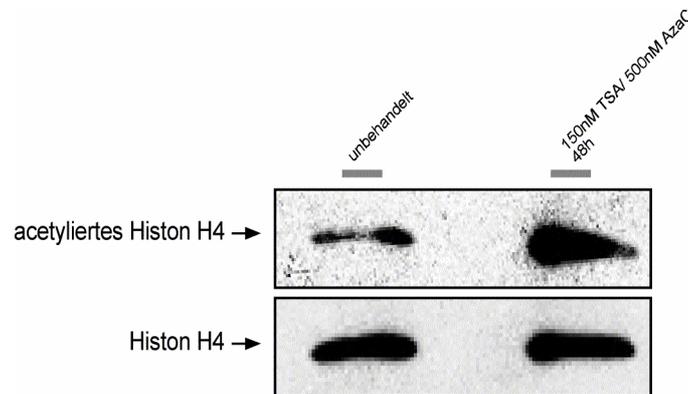


**Abb. 17 Charakterisierung humaner *in vitro* kultivierter NSZ.** Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen *in vitro* kultivierter humaner Neurosphären. A) Vergrößerung 100x; B) Vergrößerung 200x. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Differenzierung humaner NSZ zu C) Neuronen sowie D) Oligodendrozyten sind abgebildet. Linienspezifische Antikörper wurden jeweils mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (orange) angefärbt. Zur Lokalisation einzelner Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt.

### 3.3.2 Einfluss von TSA/AzaC auf die Histonacetylierung

Zur Überprüfung der These, dass die Inkubation humaner NSZ in TSA/AzaC einen vergleichbaren Effekt auf die Acetylierung von Histon H4 wie bei murinen NSZ ausübt, wurden humane Zellen für 48 h mit 150 nM TSA und 500 nM AzaC kultiviert. Nukleäres Lysat wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Acetylierung von Histon H4 wurde mittels eines Antiserums bestimmt und mit der Menge an gesamten Histon H4

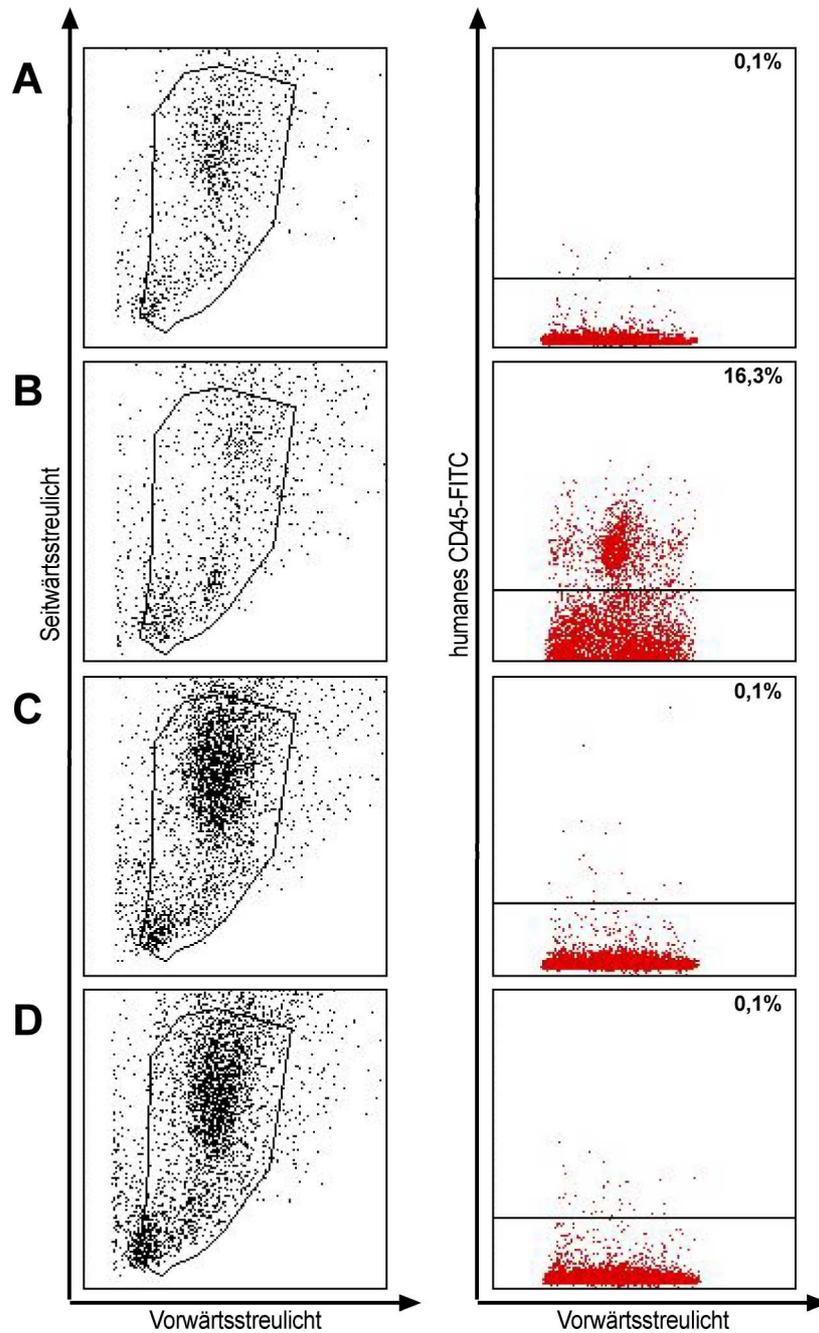
verglichen. Wie in Abb. 18 deutlich wird, induziert die Behandlung humaner NSZ mit TSA/AzaC ähnlich wie bei murinen NSZ eine Hyperacetylierung von Histon H4. Aufgrund der begrenzten Zahl an humanen NSZ wurde auf weitergehende Untersuchung der Acetylierung von Histon H4 bzw. der Methylierung genomischer DNA verzichtet.



**Abb.18 Acetylierung von Histon H4 in humanen NSZ.** Western-Blot Analyse der Acetylierung von Histon H4 im Zellkern humaner NSZ vor bzw. nach Inkubation mit TSA und AzaC. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde der Blot mit einem Antikörper gegen gesamtes Histon H4 getestet.

### 3.3.3 Besiedelung immun-supprimierter NOD/SCID Mäuse durch humane Nabelschnurzellen, humane neurale Stammzellen und TSA/AzaC behandelte humane neurale Stammzellen

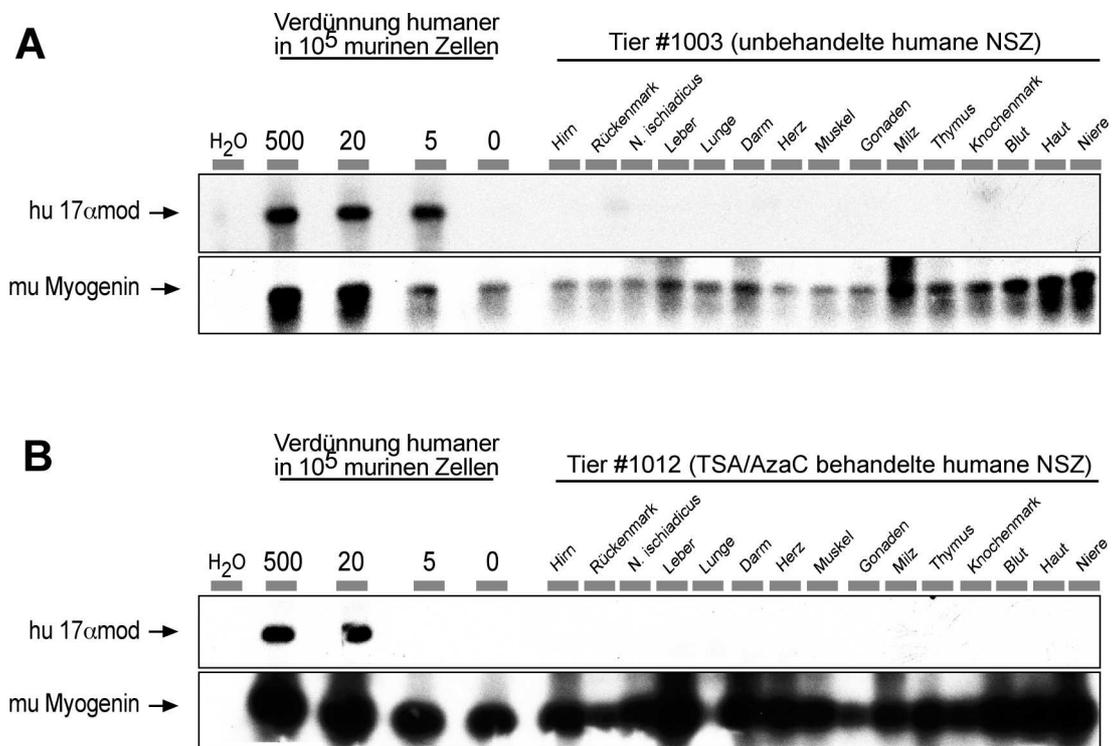
Da auch in humanen NSZ eine Hyperacetylierung von Histon H4 nach Inkubation in TSA/AzaC beobachtet werden konnte, sollte der Einfluss der epigenetischen Modifikation auf das Entwicklungspotential humaner NSZ analysiert werden. Insbesondere war zu überprüfen, ob humane NSZ, ähnlich muriner NSZ, nach transientser Behandlung mit TSA und AzaC zu einer Differenzierung zu hämatopoetischen Zellen fähig sind. NOD/SCID Mäusen fehlen aufgrund multipler Mutationen verschiedene Effektorzellen des Immunsystems. Neben T- und B-Lymphozyten können im peripheren Blut dieser Tiere auch keine NK-Zellen nachgewiesen werden (eigene Beobachtungen). Lediglich eine kleine Population von Makrophagen ist zur unspezifischen Immunabwehr fähig. Diese Tiere werden daher erfolgreich als Rezipienten für die hämatopoetische Repopulation nach Injektion humaner HSZ verwendet, da keine Abstoßungsreaktionen gegen das Xenotransplantat auftreten (Larochelle et al., 1995) (Greiner et al., 1995) (Tamaki et al., 2002). In diesen Tieren sollte zunächst die Repopulation des hämatopoetischen Systems, nachfolgend auch anderer Gewebe und Organe mittels FACS-Analyse des Knochenmarks sowie humanspezifischer PCR an genomischer DNA untersucht werden.



**Abb.19 Besiedelung des Knochenmarks von NOD/SCID Tieren durch humane Zellen.** A) Knochenmarkzellen eines nicht-transplantierten NOD/SCID Tieres; B) Knochenmark eines NOD/SCID Tieres nach Transplantation humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen; C) Knochenmark eines NOD/SCID Tieres nach Transplantation unbehandelter humaner NSZ; D) Knochenmarkzellen eines NOD/SCID Tieres nach Transplantation TSA/AzaC behandelter humaner NSZ. Abgebildet ist die durchflusszytometrische Analyse von Knochenmarkzellen. Im Vorwärtsstreulicht/Seitwärtsstreulicht-Diagramm werden die Zellen anhand ihrer Morphologie aufgetrennt. Im eingegrenzten Bereich befinden sich die lebenden Zellen. Im Vorwärtsstreulicht/humanes CD45-FITC Diagramm werden humane hämatopoetische Zellen aufgetrennt. Im oberen Teil des Diagramms befinden sich die humanen Zellen. Angegeben ist der Anteil der lebenden, humanen CD45<sup>+</sup> Zellen.

Im Knochenmark nicht-transplantierten NOD/SCID Tiere konnten keine humanen CD45<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (Abb.19A). In einem Kontrollexperiment wurden  $4.5 \times 10^6$  humane CD34<sup>+</sup> Zellen aus der Nabelschnur intravenös in subletal bestrahlte NOD/SCID Tiere transplantiert. Acht Wochen nach Transplantation zeigten 5 von 15 analysierten Tieren

humane CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark (Abb.19B). Daraufhin wurden in zwei NOD/SCID Mäuse jeweils  $2 \times 10^5$  humane *in vitro* kultivierte NSZ transplantiert. Keines der beiden Tiere zeigte nach acht Wochen humane CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark (Abb.19C). Die Transplantation von  $2 \times 10^5$  humanen NSZ, die für 48 h mit 150 nM TSA und 500 nM AzaC inkubiert waren, ergab nach acht Wochen ebenfalls keine humanen CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark von zwei transplantierten Tieren (Abb.19D). Um zu überprüfen, ob humane CD45<sup>+</sup> Zellen in den transplantierten Tieren vorhanden sind, wurden aus allen vier Tieren 15 verschiedene Gewebe und Organe entnommen und genomische DNA isoliert. Die Analyse der genomischen DNA mittels human-spezifischer 17 $\alpha$ mod PCR ergab keine Kontribution durch humane Zellen in den Geweben (Abb.20A, B).



**Abb.20 Gewebeverteilung humaner Zellen in immun-supprimierten NOD/SCID Tieren nach Transplantation humaner NSZ.** Autoradiogramme einer PCR Southern-Blot Analyse humaner Donoranteile in Geweben adulter Mäuse nach intravenöser Transplantation humaner unbehandelter NSZ (A) und humaner NSZ nach Behandlung mit TSA/AzaC (B). Jeweils eine Verdünnungsreihe von 0 bis 500 humanen Zellen in 100.000 murinen Zellen sowie ein Kontrollansatz ohne genomische DNA (H<sub>2</sub>O) ist abgebildet. Mittels 17 $\alpha$ mod PCR wurden humane Zellen detektiert. Zur Kontrolle der Menge und Qualität der eingesetzten genomischen DNA wurden alle Proben einer Myogenin-spezifischen PCR unterzogen.

Da humane NSZ *in vitro* nur begrenzt proliferierten, konnten keine weiteren Versuchsansätze mit größerer Tier- bzw. Zellzahl durchgeführt werden.

### 3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Behandlung humaner NSZ mit TSA und AzaC

Humane NSZ können, ähnlich murinen NSZ, *in vitro* kultiviert und differenziert werden. Die Proliferationsrate der verwendeten humanen NSZ ist sehr gering. Die Inkubation humaner NSZ mit TSA und AzaC führt vergleichbar muriner NSZ zu einer Hyperacetylierung von Histon H4. Eine Erweiterung des Entwicklungspotentials der NSZ in Form einer hämatopoetischen Differenzierung nach Inkubation mit TSA/AzaC und intravenöser Transplantation in immun-supprimierte NOD/SCID Tiere konnte nicht beobachtet werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Injektion humaner Tumorzellen in murine Blastozysten

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob die Injektion humaner leukämischer KG-1 Zellen in murine Blastozysten zu chimären Tieren führt, ob die embryonale Umgebung die Proliferation und Differenzierung leukämischer Zellen kontrolliert und ob humane leukämische Zellen zur Differenzierung angeregt werden können.

Die Transplantation von ES-Zellen in einen adulten Organismus bewirkt die Bildung sogenannter Teratokarzinome, malignen Tumoren, die differenzierte Zellen aller drei Keimblätter enthalten. Experimente mit murinen embryonalen Karzinomazellen zeigten, dass diese Zellen nach Injektion in adulte Tiere wiederum Teratokarzinome ausbilden. Wurden EK-Zellen allerdings in Blastozysten injiziert, entwickelten sich Mäuse, die in allen Geweben einschließlich der Keimbahn einen Chimerismus zeigten, ohne dass die chimären Tiere an Tumoren erkrankten (Mintz and Illmensee, 1975). Aufbauend auf diesen Versuchen sollten nun humane leukämische Zellen in murine Blastozysten injiziert werden.

Ein erstes Hindernis bei der Etablierung solcher Chimären ist die xenogene Situation, die entsteht, wenn humane Zellen in einen murinen Organismus injiziert werden, da das Immunsystem der Mäuse die humanen Zellen als fremd erkennen und abstoßen könnte. Da bei der Blastozysteninjektion die humanen Zellen in präimmune Entwicklungsstadien der Tiere gelangen, könnte während der späteren Entwicklung des Immunsystems Toleranz gegenüber den injizierten humanen Zellen induziert werden, die eine Besiedelung des Organismus durch die humanen Zellen zulässt.

Dass es prinzipiell möglich ist, chimäre Tiere durch Blastozysteninjektion humaner Zellen zu erzeugen, konnte bereits gezeigt werden. Nach Injektion humaner HSZ aus Nabelschnurblut in murine Blastozysten entwickelten sich chimäre Tiere mit humanen Blutzellen (Kirchhof et al., 2002). Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, konnten auch durch Injektion humaner Zellen der etablierter Leukämiezelllinie KG-1 in murine Blastozysten chimäre Embryonen und adulte Tiere erzeugt werden. Allerdings ist der Anteil chimärer Tiere weit niedriger, als nach Injektion von ES-Zellen oder murinen HSZ zu erwarten (Abb.4, Tab.1). Nach der Injektion muriner ES-Zellen oder humaner HSZ lag der Anteil an Embryonen, die sich aus injizierten Blastozysten entwickelten, bei etwa 70 %, während diese Rate nach Injektion humaner leukämischer Zellen zwischen 20 und 50 % lag (persönliche Mitteilung Dr. F. Harder, eigene Beobachtungen). Ein Grund könnte sein, dass die leukämischen Zellen vergleichbar ihrem Verhalten *in vitro* bzw. im Patienten unkontrolliert proliferieren.

Werden 30 humane AML Zellen in Blastozysten mit etwa 150 murinen Zellen injiziert, könnte dies zur Folge haben, dass die humanen Zellen den murinen Embryo überwachsen. Dies würde sehr wahrscheinlich dazu führen, dass die chimären Embryonen zugrunde gehen. Allerdings führte die Injektion humaner Zellen in Blastozysten zur Bildung chimärer Embryonen und chimärer adulten Tiere. Dies deutet darauf hin, dass die murine embryonale Mikroumgebung entweder eine unkontrollierte Proliferation der humanen leukämischen Zellen verhindern konnte, oder in den leukämischen Zellen Apoptose induziert und somit eine Überwucherung des Embryos verhindert hat.

Die Embryonen, die sich trotz erhöhter Letalität nach Injektion humaner Zellen einer etablierter AML Zelllinien entwickelten, zeigten einen Chimerismus, der vergleichbar ist mit Ergebnissen nach Injektion humaner HSZ aus Nabelschnurblut. Im Gegensatz dazu war die Kontribution der Donorzellen nach Injektion muriner HSZ in Blastozysten bis zu 100fach erhöht. Ein Grund für die verminderten Donoranteile nach Injektion humaner Zellen in murine Blastozysten könnte die speziesspezifische Wirkung vieler Wachstumsfaktoren wie z.B. IL-3 und GM-CSF sein (Harder et al., 2002). Dadurch ist die murine Mikroumgebung nur bedingt fähig, Proliferation oder Differenzierung humaner Zellen zu ermöglichen.

#### 4.1.1 Gewebespezifische Kontribution humaner leukämischer Zellen nach Injektion in murine Blastozysten

Injiziert man leukämische Zellen in Blastozysten, ergeben sich mehrere Möglichkeiten einer Verteilung dieser Zellen bzw. ihrer Nachkommen im sich entwickelnden chimären Organismus. Prinzipiell könnten die Zellen ähnlich ES-Zellen die Fähigkeit besitzen, an der Bildung aller Gewebe in gleicher Weise teilzunehmen. Es wäre auch möglich, dass die Zellen nur wenige Gewebe besiedeln oder präferentiell nur in bestimmten Geweben zu finden sind.

Die Gewebespezifität der Zellen kann dabei durch Oberflächenproteine und Rezeptoren reguliert werden. Von einigen ES-Zelllinien ist beispielsweise bekannt, dass sie nach mehreren *in vitro* Passagen nicht mehr in der Lage sind, nach Injektion in Blastozysten fortpflanzungsfähige Nachkommen zu bilden (Nagy et al., 1993).

Für die gerichtete Besiedelung von Organen ist darüber hinaus die Expression bestimmter Faktoren notwendig, die eine Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung ermöglichen.

Im Laufe der Säugerontogenese wandern beispielsweise die HSZ der definitiven Hämatopoese, die zuerst in der AGM Region lokalisiert werden können (Müller et al., 1994), zunächst in die fetale Leber, die eine zentrale Rolle in der fetalen Hämatopoese einnimmt, und später in das Knochenmark, welches das wichtigste hämatopoetische Organ des adulten Organismus darstellt (Bonifer et al., 1998; Medvinsky and Dzierzak, 1996). Bei der Migration

durch den Embryo benötigen die HSZ Signale, die den Weg zum Zielorgan weisen. Solche Signale werden unter anderem von den Integrinen, den Proteinen der Zell-Zell-Interaktion, bereitgestellt. Ein Ausschalten des  $\beta$ 1-Integrines führt im murinen Embryo dazu, dass die HSZ aus der fetalen Leber nicht mehr das Knochenmark besiedeln können, sondern im peripheren Blut akkumulieren (Hirsch et al., 1996; Potocnik et al., 2000). Die Besiedelung von Organen durch zirkulierende Zellen findet auch im adulten Tier unentwegt statt. Hier spielt unter anderem der Rezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF-1 bei der Einnistung der HSZ eine wichtige Rolle. Wird der Rezeptor blockiert, so können die HSZ das Knochenmark von letal bestrahlten Mäusen nicht mehr repopulieren (Lapidot, 2001).

Humane leukämische KG-1 Zellen zeigten nach Injektion in murine Blastozysten Gewebekontribution präferentiell in hämatopoetischen Geweben von E12.5 Embryonen und adulten Tieren (Abb.4, Abb.5). Während humane Zellen nach Injektion von KG-1 Zellen vor allem im peripheren Blut und Dottersack sich entwickelnder Embryonen zu finden waren, konnten Donorzellen häufig im peripheren Blut adulter Tiere nachgewiesen werden. Das gerichtete Besiedelungsverhalten der injizierten Zellpopulationen deutet darauf hin, dass das Expressionsprofil der Faktoren, die für die Migration und das Überleben der Zellen in bestimmten Organen notwendig sind, eine Migration in hämatopoetische Gewebe begünstigt. So ist von KG-1 Zellen beispielsweise bekannt, dass sie  $\beta$ 1-Integrin (CD29) exprimieren (Prieto et al., 1994), was die bevorzugte Besiedelung hämatopoetischer Gewebe begünstigt haben könnte.

Bei adulten chimären Tieren konnte nach Injektion humaner AML Zellen am häufigsten eine Kontribution in den hämatopoetischen Geweben detektiert werden (Tab.1). Es ist nicht davon auszugehen, dass die humanen Zellen ihre Verteilung in murinen embryonalen Geweben auch im adulten Stadium vollständig beibehalten, sondern dass die Zellen einer ebensolchen Dynamik unterworfen sind, wie die Zellen der normalen murinen Hämatopoese. Dass die Zellen, wenn auch nicht ausschließlich, so doch überwiegend in hämatopoetischen Geweben detektiert werden könnte bedeuten, dass die Nachkommen der humanen AML Zellen in den adulten Tieren Marker tragen, die ihnen diese gerichtete Besiedelung ermöglichen.

Im Einklang mit der präferentiellen Besiedelung hämatopoetischer Gewebe stehen auch die Ergebnisse aus dem immunhistochemischen Nachweis der Donorzellen. Humane Zellen in chimären Geweben exprimieren ebenso wie KG-1 Zellen aus *in vitro* Kultur den panhämatopoetischen Marker CD45 (Abb. 6). Die Donorzellen, die die hämatopoetischen Gewebe der sich entwickelnden Embryonen besiedeln, behalten also ihre hämatopoetische Zellidentität bei.

Die Ergebnisse aus der Injektion humaner leukämischer Zellen in murine Blastozysten stehen also im Einklang mit Ergebnissen aus der Injektion humaner HSZ (Harder et al., 2002), muriner HSZ (Geiger et al., 1998) und der murinen hämatopoetischen Vorläuferzelllinie FDCP-mix (Petrovic, 2004). Alle hämatopoetischen Zelltypen besiedelten in sich entwickelnden Embryonen präferentiell hämatopoetische Gewebe, was darauf schließen lässt, dass die Migrationsmechanismen in den Zellen funktionell intakt sind. Dass die Besiedelung des Ursprungsgewebes im chimären Tier einem gerichteten Prozess unterliegt und nicht etwa auf der Tatsache beruht, dass hämatopoetische Gewebe leichter zu besiedeln sind, belegen Versuche, in denen murine NSZ in Blastozysten injiziert wurden. Auch murine NSZ besiedeln in chimären Embryonen mit Gehirn und Rückenmark bevorzugt ihr Ursprungsgewebe (Kirchhof et al., 2002).

Ein Problem des hier gewählten Ansatzes zur Analyse des Chimerismus nach Injektion der humanen Zellen in murine Blastozysten bleibt dennoch die ungeklärte Identität der humanen Zellen in den nicht hämatopoetischen Geweben. Der Chimerismus in nicht hämatopoetischen Geweben könnte durch Blutreste, die in den Organen vorhanden waren, verursacht worden sein. Andererseits wäre es auch möglich, dass es sich um injizierte humane Zellen handelt, die aufgrund unzureichender interzellulärer Signalübermittlung nicht hämatopoetische Gewebe besiedeln konnten, sondern in anderen Geweben aufgenommen wurden. Es ist davon auszugehen, dass der Prozess der gerichteten Migration von Zellen von einer ganzen Reihe von Faktoren und Interaktoren abhängt (Quesenberry and Becker, 1998). Gerade im vorliegenden Modell mit der Injektion humaner Zellen in murine Umgebung ist es vorstellbar, dass die Kompatibilität der Faktoren nicht immer gegeben ist und beispielsweise ein muriner Rezeptor nicht genügend mit einem humanen Liganden interagieren kann. Dies könnte die eingeschränkte Gewebespezifität erklären.

#### 4.1.2 Differenzierung humaner leukämischer Zellen nach Injektion in murine Blastozysten

Ein interessantes Ergebnis der Injektion humaner leukämischer Zellen in murine Blastozysten war die Tatsache, dass adulte Mäuse generiert werden konnten, die Anteile humaner Zellen in verschiedenen Geweben enthielten. Die chimären Tiere entwickelten bis zum Alter von etwa 3 Monaten keine Tumoren.

Aus Versuchen, bei denen adulte murine HSZ in murine Blastozysten injiziert wurden ist bekannt, dass durch die embryonale Mikroumgebung das Genexpressionsprofil verändert wird (Geiger et al., 1998). Es scheinen in der Blastozyste demzufolge Bedingungen vorzuliegen, die durch Zell-Zell-Kontakte die Genexpression injizierter Zellen verändern können.

Ein möglicher Grund für fehlende Tumoren nach Injektion der leukämischen KG-1 Zellen könnte die Differenzierung der Zellen nach Kontakt mit der embryonalen Mikroumgebung sein. *In vitro* wurde die Induzierbarkeit der Differenzierung von KG-1 Zellen gezeigt (Koeffler et al., 1981). Embryonen, die nach Injektion von humanen KG-1 Zellen einen Chimerismus zeigten, wurden deshalb einer Analyse durch RT-PCR unterzogen.

KG-1 Zellen aus *in vitro* Kultur zeigten keine Expression von  $\beta$ - bzw.  $\epsilon$ -Globin. In chimären Embryonen hingegen wurden vor allem die embryonale und die fetale Form, das  $\beta$ - und das  $\epsilon$ -Globin exprimiert (Abb.5). Diese Daten decken sich mit Ergebnissen aus der Injektion von murinen adulten HSZ in murine Blastozysten, wobei eine Reprogrammierung der Globin-Expression vom adulten zum embryonalen Muster eingetreten ist (Geiger et al., 1998). *In situ* Analysen des Blutes chimärer Embryonen bestätigten die Induktion der Differenzierung leukämischer KG-1 Zellen. Nach Injektion in murine Blastozysten exprimierten die humanen Zellen den erythroiden Marker CD235a (Abb.7).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen lassen den Schluss zu, dass murine Blastozysten und Embryonen eine geeignete Mikroumgebung bereitstellt, die auch humanen Zellen eine entwicklungspezifische Differenzierung erlaubt. Zudem scheint die Blastozyste eine bereits aus *in vitro* Versuchen bekannte Differenzierung leukämischer Zellen zu induzieren (Amatruda et al., 1987; Dürr et al., 2003).

Fraglich ist allerdings, ob alle humanen leukämischen Zellen differenzierten. Da noch in adulten Tieren nach mehreren Monaten humane Zellen nachzuweisen waren, muss zumindest eine kleine Population humaner klonogener Zellen einen undifferenzierten Status beibehalten haben, um den Pool humaner Zellen in adulten chimären Mäusen aufrecht zu erhalten.

#### 4.1.3 Reprogrammierung humaner leukämischer Zellen durch embryonale Mikroumgebung?

Wenn nach Injektion humaner leukämischer Zellen in murine Blastozysten adulte chimäre Mäuse keine Tumore entwickeln und humane Zellen in murinen Embryonen Differenzierungsmarker exprimieren, stellt sich die Frage, welchen Einfluss die murine embryonale Mikroumgebung auf die Tumorigenität der humanen leukämischen Zellen hat.

Möglicherweise könnte die murine Mikroumgebung die Tumorigenität der leukämischen Zellen regulieren.

Die Tumorigenität von EK-Zellen ist durch epigenetische Veränderungen verursacht (Aujame et al., 1984), während in den injizierten humanen leukämischen Zellen Chromosomenaberrationen vorliegen {Koeffler, 1978 #5353}. Für die Induktion der Differenzierung in EK-Zellen könnten folglich epigenetische Mechanismen verantwortlich sein. Dies könnte auf speziellen Zell-Zell-Interaktionen und Wachstumsfaktorkombinationen

im frühen Embryo beruhen und den Epigenotyp der injizierten Zellen beeinflussen (Mintz and Illmensee, 1975). Zusätzliche Hinweise darauf, dass das Genom maligner Zellen durch Kontakt mit embryonaler Mikroumgebung normale Zellen hervorbringen kann, gaben Ergebnisse, wonach das Klonen muriner Embryonen aus Medullablastomen und EK-Zellen gesunde Tiere hervorbringt (Blelloch et al., 2004; Li et al., 2003). Nicht alle malignen Zelltypen sind jedoch als Kernspender für Klonierungen geeignet (Hochedlinger et al., 2004). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass epigenetische Reprogrammierung durch Kerntransfer den onkogenen Charakter von Zellen umkehren kann.

Im Gegensatz zu EK-Zellen entstehen AML-Zellen zumeist durch genetische Mutationen (Look, 1997). In diesem Fall ist es vorstellbar, dass durch die embryonale Mikroumgebung das Methylierungs- und Acetylierungsmuster der humanen Zellen dahingehend verändert wird, dass von Mutationen betroffene Genomabschnitte inaktiviert werden (Csankovszki et al., 2001; Surani, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen aber auch, dass die Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen in malignen Zellen häufig hypermethyliert sind (Ekmekci et al., 2004). Durch Inkubation maligner Zellen mit HDAC-Inhibitoren und Dnmt-Inhibitoren konnte *in vitro* in verschiedenen Tumorzelllinien eine Differenzierung induziert werden (Mei et al., 2004) (Creusot et al., 1982) (Christman et al., 1983). In der Tat zeigen erste klinische Studien, dass eine Behandlung von Leukämien und Lymphomen durch die Gabe von AzaC und HDAC-Inhibitoren möglich ist (Claus and Lubbert, 2003; Warrell et al., 1998) (He et al., 2001).

## 4.2 Epigenetische Modifikationen in murinen NSZ

### 4.2.1 Einfluss von HDAC-Inhibitoren und AzaC auf den Epigenotyp und das Genexpressionsprofil von NSZ

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Einfluss verschiedener HDAC-Inhibitoren in Kombination mit dem Nukleotidanalogen AzaC auf den Epigenotyp von NSZ. Es zeigte sich dabei, dass das Nukleotidanalogen AzaC ein potenter Inhibitor der DNA Methylierung ist (Abb.11, Abb.12) (Pietrobono et al., 2002). Der Vergleich der Wirkung von HDAC-Inhibitoren verschiedener Substanzklassen auf die Hyperacetylierung von Histon H4 zeigt, dass alle getesteten Substanzen gleichermaßen geeignet sind, Einfluss auf die Chromatinstruktur zu nehmen (Abb.10) (Yoshida et al., 1990) (Jung, 2001). Desweiteren hatte die Inkubation von NSZ mit den angegebenen Konzentrationen eine vergleichbare Kinetik der Hyper- und Deacetylierung von Histon H4 zur Folge. Detaillierte Analysen zur Hyperacetylierung von Histon H4 nach Inkubation mit TSA und AzaC zeigten, dass kurze Zeit nach Beginn der Inkubation mit dem HDAC-Inhibitor der Grad der Acetylierung ansteigt und ebenso rasch nach Wegnahme der Agenzien wieder auf das Niveau unbehandelter Zellen zurückgeht (Abb.9). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Publikationen, die die Kinetik der Acetylierung von Histonen an Pflanzenzellen bzw. an malignen Zellen untersuchten (Waterborg and Kapros, 2002; Wu et al., 2001).

Obwohl alle untersuchten HDAC-Inhibitoren eine Hyperacetylierung von Histon H4 induzierten, konnte nur nach Inkubation der NSZ mit TSA sowie SAHA eine Induktion der Oct-4 Expression beobachtet werden (Abb.13). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit Beobachtungen von Hattori und Kollegen (Hattori et al., 2004), die zeigten, dass die Expression von Oct-4 in ES-Zellen durch epigenetische Mechanismen, darunter DNA Methylierung und Histon Acetylierung, geregelt wird. In einer weiteren Untersuchung konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Inkubation von Zellen in TSA zu einer Dekondensation des Chromatin während der Interphase führt (Toth et al., 2004). Dennoch stellt sich die Frage, weshalb nur ein Teil der getesteten HDAC-Inhibitoren in der Lage war, in Verbindung mit AzaC eine Oct-4 Reexpression in NSZ zu induzieren. Es wurde spekuliert, dass eine HDAC-Subtypspezifität der Inhibitoren existiert, wodurch bestimmte HDAC effizienter blockiert werden. Dies könnte dann dazu führen, dass einzelne Genloci durch verschiedene HDAC-Inhibitoren unterschiedlich beeinflusst werden (Cao, 2004) (Furumai et al., 2002) (Heltweg et al., 2004). Einen Hinweis hierauf geben auch Untersuchungen, die zeigen, dass lediglich die Expression eines kleinen Teils aller Gene durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren beeinflusst wird (Van Lint et al., 1996). Aufgrund der Fähigkeit die Hyperacetylierung von

Histon H4 sowie die Reexpression von Oct-4 in NSZ zu induzieren, wurde TSA als HDAC-Inhibitor für alle weiteren Experimente ausgewählt.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich ebenfalls, dass nur ein Teil des Genexpressionsprofils von einer Inkubation mit TSA und AzaC beeinflusst wird. So konnte zwar eine deutliche Aktivierung des Hämatopoese-spezifischen Transkriptionsfaktors SCL beobachtet werden, während jedoch die Expression des Protoonkogenes Vav in NSZ nicht induziert werden konnte. Interessanterweise konnte auch die Expression von Genen, die für die Aufrechterhaltung der Totipotenz von ES-Zellen verantwortlich sind, reaktiviert werden. Zudem zeigte sich, dass TSA nicht nur bei der Hyperacetylierung von Histon H4 transient wirkt, sondern dass auch die Reaktivierung von Nanog, Oct-4 und Rex-1 nur für kurze Zeit erfolgt und nach Wegnahme von TSA und AzaC nicht mehr nachzuweisen ist (Abb.14).

#### 4.2.2 Molekulare Voraussetzungen für die Differenzierung somatischer Stammzellen

Das Entwicklungspotential einer Stammzelle wird dadurch beeinflusst, welches Gen wann, wie lange und in welcher Höhe exprimiert wird (Cerny and Quesenberry, 2004). Ein synergistischer Effekt von TSA und AzaC wurde schon für die Reexpression von stillgelegten Genen in Krebszellen beobachtet (Cameron et al., 1999). Interessanterweise wurde demonstriert, dass verschiedene somatische Stammzelltypen sowohl ein distinktes als auch ein überlappendes transkriptionelles Repertoire besitzen (Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002). So exprimieren hämatopoetische Vorläuferzellen neurale Gene, und hämatopoetische Stammzellen sind in der Lage, in einer neuralen Mikroumgebung mikrogliale Zellen zu generieren (Goolsby et al., 2003; Vitry et al., 2003). Neben den Genen, die in allen somatischen Stammzellen gemeinsam exprimiert werden, könnten in TSA/AzaC behandelten NSZ Gene aktiviert werden, die das Überleben in heterologen Geweben ermöglichen. Tatsächlich konnte in RT-PCR Analysen behandelter NSZ die Expression von Nanog, Oct-4 und Rex-1 nachgewiesen werden, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen notwendig sind. Dies könnte darauf hinweisen, dass NSZ nach Behandlung mit TSA und AzaC einen dedifferenzierten Zustand annehmen, um anschließend nach Injektion in Blastozysten zu heterologen Geweben zu differenzieren. Als Beispiele, dass die Dedifferenzierung von Zellen zu einer Zunahme des Entwicklungspotentials führt können Experimente dienen, die zeigten, dass differenzierte Muskelzellen durch Überexpression von Msx1 Muskel-Vorläuferzellen bilden und dass Prä-B-Lymphozyten nach Ausschalten von Pax5 Selbsterneuerungs- und Multiliniendifferenzierungspotential besitzen (Odelberg et al., 2000; Schaniel et al., 2002). Ähnlich könnten murine NSZ durch transiente Behandlung mit

TSA/AzaC dedifferenziert sein und so ein erweitertes Entwicklungspotential erworben haben. Zusätzlich konnte der Hämatopoese-spezifische Transkriptionsfaktor SCL in TSA/AzaC inkubierten NSZ nachgewiesen werden. SCL spielt eine essentielle Rolle bei der Entstehung hämatopoetischer Zellen während der Ontogenese und ist ein entscheidender Regulator für den Erhalt der Hierarchie des hämatopoetischen Systems (Lecuyer and Hoang, 2004; Robb et al., 1995). Somit könnte die Expression von SCL in TSA/AzaC inkubierten NSZ darauf hinweisen, dass das Differenzierungspotential der NSZ um hämatopoetische Zellen erweitert wurde. Das Schicksal somatischer Stammzellen ist zusätzlich von der Mikroumgebung abhängig, in der die Zellen sich befinden. Sie stellt Signale zum Überleben und zur Aktivierung der Stammzellen bereit (Watt and Hogan, 2000). Dies könnte auch erklären, weshalb TSA/AzaC behandelte Zellen zwar nach Injektion in murine Blastozysten, nicht jedoch nach Kultur in Methylzellulose hämatopoetische Zellen bilden können (Schmittwolf et al., 2005). Da NSZ nach einer TSA/AzaC Behandlung zusätzlich zu ihrem neuronalen Transkriptionsrepertoire offenbar einen niedrigen Transkriptionslevel hämatopoetischer Loci besitzen (Abb.14), ist es vorstellbar, dass zusammen mit existierenden externen Signalen im weiteren die Expression der Loci verstärkt und stabilisiert wird. Dies könnte das Überleben in der neuen hämatopoetischen Mikroumgebung ermöglichen. Distinkte molekulare Interaktionen, unterstützt durch die neue Mikroumgebung, die für hämatopoetische Zellen spezifische Signale zum Überleben und zur Differenzierung liefert, können die Differenzierung hämatopoetischer Zelltypen aus NSZ steuern.

#### 4.2.3 Der Einfluss epigenetischer Modifikationen auf das Entwicklungspotential von NSZ

Ziel dieser Versuchsreihe war es zu überprüfen, ob NSZ nach Transplantation in Präimplantationsblastozysten sich entwickelnde Embryonen besiedeln können und ob eine Inkubation der NSZ mit Chromatin-verändernden Agenzien Einfluss auf das Besiedelungsverhalten und das Differenzierungspotential der Zellen hat.

Nach Injektion von 5 – 30 NSZ in Blastozysten wurden adulte Tiere im Alter von 3 Monaten auf Donorkontribution in verschiedenen Geweben untersucht. Dabei zeigte sich, dass kurzzeitig *in vitro* kultivierte NSZ in der Lage sind, fast alle Gewebe der sich entwickelnden Tiere zu besiedeln. Die Inkubation der NSZ mit TSA und AzaC vor Injektion in Blastozysten bewirkte eine Zunahme der Donorkontribution in allen untersuchten Geweben (Abb.15).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Versuchen, in denen NSZ ebenfalls in Präimplantationsblastozysten transferiert wurden (Clarke et al., 2000; Harder et al., 2004; Kirchoff et al., 2002). Andere Arbeitsgruppen berichteten jedoch, dass NSZ nicht in der Lage waren, nach Injektion in Blastozysten sich entwickelnde Tiere zu besiedeln (D'Amour and

Gage, 2003; Greco et al., 2004). Soweit nachvollziehbar wurden bei diesen Experimenten ebenfalls kurzzeitig kultivierte NSZ als Donorzellen verwendet. Da aber erfahrungsgemäß der Donoranteil in chimären Geweben gering ausfällt, könnten unterschiedliche Ergebnisse zum publizierten Besiedelungsverhalten darauf zurückzuführen sein, dass die Detektionsmethoden in einigen Untersuchungen nicht sensitiv genug waren.

Weitergehende Analysen des Knochenmarks chimärer Tiere zeigten, dass NSZ erst nach Inkubation mit TSA/AzaC und anschließende Injektion in Blastozysten CD45<sup>+</sup>/Y-Chr<sup>+</sup> hämatopoetische Donorzellen bilden können (Abb.16). Die Beobachtung, dass unbehandelte NSZ nicht in der Lage sind, hämatopoetische Zellen zu generieren, stimmt mit einigen früheren Beobachtung überein, ist aber konträr zu anderen. Bjornson et al. berichteten, dass *in vitro* kultivierte NSZ in der Lage sind, hämatopoetische Zellen nach Transplantation in bestrahlte Rezipiententiere zu bilden (Bjornson et al., 1999). Der Transfer unbehandelter NSZ in Blastozysten kann in Embryonen zur transienten Expression Hämatopoese-spezifischer Marker auf NSZ-abstammenden Donorzellen führen (Harder et al., 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es jedoch nicht, hämatopoetische Aktivität nach Transplantation unbehandelter NSZ zu beobachten. Aber auch Morshead und seine Kollegen beobachteten keinerlei NSZ-abstammende hämatopoetische Rekonstitution (Morshead et al., 2002). Der Grund für solche Diskrepanzen ist unklar, jedoch wird spekuliert, dass genetische und epigenetische Modifikationen, die durch lange Kultur der NSZ *in vitro* eventuell erworben wurden, eine Rolle spielen. Denn die Isolierung von Zellen aus ihrer normalen physiologischen Umgebung und Expansion *in vitro* kann zu Veränderungen der Genexpression führen (D'Amour and Gage, 2003). Daher wurden für die Transplantationsversuche im Rahmen dieser Arbeit nur kurzzeitig kultivierte NSZ eingesetzt. Interessanterweise zeigt sich, dass humane hämatopoetische Vorläuferzellen nach *in vitro* Kultur ihr Potential, immundefiziente NOD/SCID Tiere zu besiedeln nicht verlieren, wenn sie mit TSA und AzaC inkubiert wurden (Milhem et al., 2004; Vallabhapurapu and Müller). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Behandlung von SSZ mit Chromatin-modifizierenden Agenzien das Differenzierungspotential der Zellen erhalten oder sogar erweitert werden kann.

Da die Transdifferenzierung somatischer Stammzellen zu Effektorzellen heterologer Gewebe im Widerspruch zum bisherigen Dogma der Unidirektionalität von Entwicklungsprozessen steht, wurde heftig über die Existenz und die Bedeutung dieses Phänomens diskutiert (Anderson DJ, 2001; Lemischka, 2002; Morrison, 2001). In der Tat wurden alternative Erklärungen für die beschriebenen Ergebnisse gefunden (Dürr and Müller, 2003). Ein

Problem älterer Versuchsansätze war, dass unaufgereinigte und nicht-klonale Zellpopulationen transplantiert wurden. Dies führte dazu, dass nicht SSZ sondern kontaminierende Zellen im Transplantat für die Besiedelung heterologer Gewebe verantwortlich waren. Ein Beispiel ist die Präsenz hämatopoetischer Stammzellen im Muskelgewebe, die für die vermeintliche hämatopoetische Aktivität von Muskelzellen verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich also nicht um Konversion von Muskelzellen zu hämatopoetischen Zellen, sondern um die Differenzierungsaktivität kontaminierender hämatopoetischer Stammzellen im Transplantat (Geiger et al., 2002; McKinney-Freeman et al., 2002). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Stammzellen mit somatischen Zellen fusionieren können (Terada et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003; Ying et al., 2002). Die resultierenden chimären Zellen tragen sowohl Donormarker der transplantierten Stammzellen, als auch Differenzierungsmarker des besiedelten Gewebes, was fälschlicherweise als Transdifferenzierung von SSZ aufgefasst wurde. Zudem konnten pluripotente Stammzellen aus adulten Säugern isoliert werden. Diese pluripotenten adulten Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit, ähnlich ES-Zellen, *in vitro* und *in vivo* zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (Jiang et al., 2002; Kogler et al., 2004; Reyes and Verfaillie, 2001). In unzureichend charakterisierten Transplantaten könnten pluripotente Zellen vorgelegen haben und für die beobachtete breite Differenzierungsaktivität verantwortlich sein. Dabei ist bisher allerdings unklar, ob die Pluripotenz durch die *in vitro* Kultur entstanden ist, oder ob die Zellen Relikte embryonaler Entwicklungsstufen darstellen. Von Stammzellplastizität kann nur dann gesprochen werden, wenn organspezifische Stammzellen zu heterologen Zelltypen differenzieren. Es wurden daher Kriterien vorgeschlagen, die erfüllt sein sollten, bevor von Transdifferenzierung gesprochen wird. So wird eine direkte Transplantation isolierter Stammzellpopulationen ohne vorherige *in vitro* Kultur gefordert. Die Transplantation sollte eine Fusion von Stammzellen mit differenzierten Zellen ausschließen und zu einer stabilen und funktionellen Regeneration des Zielgewebes führen (Anderson DJ, 2001). In einer aktuellen Publikation, die den Einfluss des Chromatin-Remodelling auf das Differenzierungspotential von somatischen Stammzellen erörtert, werden diese Forderungen allerdings wieder in Frage gestellt (Cerny and Quesenberry, 2004). Cerny und Quesenberry stellen fest, dass klonale Analysen von Stammzellen wenig Sinn besitzen, da selbst hochangereicherte Stammzellpopulationen heterogen zusammengesetzt sind, was die Forderung nach Klonalität untergräbt. Zum anderen sind sie der Meinung, dass die Forderung nach stabiler Regeneration („Robustness“) bedeutungslos, da nicht genau definiert und überprüft ist. Für die Inkubation von NSZ in Chromatin-verändernden

Substanzen im Rahmen dieser Versuchsreihe war eine ausreichende Anzahl an Zellen und damit eine *in vitro* Proliferation nötig. Desweiteren sollte durch die selektiven Wachstumsbedingungen des Kulturmediums eine Kontamination durch nicht-neurale Zellen ausgeschlossen werden. Um aber andererseits Effekte der *in vitro* Kultur auf das Entwicklungspotential der NSZ zu minimieren, wurden die Zellen lediglich für 2 – 4 Wochen *in vitro* kultiviert. Metaphase-Spreitungen *in vitro* kultivierter NSZ zeigten, dass in diesem Zeitraum keine Chromosomenaberrationen auftreten, während eine Kultur der Zellen über einen Zeitraum von 6 Monaten bereits zu vielfältigen Chromosomentranslokationen führt (persönliche Mitteilung Dr. A. Jauch). Aus früheren Veröffentlichungen ist zudem bekannt, dass nach Injektion in Präimplantationsblastozysten keine Fusion von Donorzellen mit Zellen des sich entwickelnden Embryo nachgewiesen werden kann (Harder et al., 2004; Petrovic, 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass durch transiente Inkubation muriner NSZ mit den Chromatin-modifizierenden Substanzen TSA und AzaC deren Entwicklungspotential verändert werden kann, so dass NSZ nach Behandlung mit TSA und AzaC sowie der Transplantation in murine Blastozysten hämatopoetische Zellen bilden können.

### 4.3 Epigenetische Modifikationen in humanen NSZ

In der modernen Medizin wird große Hoffnung in die Therapie vieler Erkrankungen durch Stammzelltransplantationen gesetzt (Jakel et al., 2004; Lindvall et al., 2004; McBride et al., 2004). Da für autologe Transplantationen einige Zelltypen leichter verfügbar sind als andere, wäre es vorteilhaft, wenn leicht isolierbare Stammzellen auch differenzierte Zellen heterologer Gewebe bilden könnten. Daher sollten die Erkenntnisse aus der Behandlung und Transplantation muriner NSZ auf humane Stammzellen übertragen werden. Da die *in vitro* Kultur humaner NSZ ähnlich murinen NSZ unter standardisierten Bedingungen möglich ist, sollte in dieser Versuchsreihe überprüft werden, ob durch die Behandlung *in vitro* kultivierter humaner NSZ mit TSA und AzaC das epigenetische Muster der Zellen verändert werden kann. Durch die anschließende Transplantation in immun-supprimierte NOD/SCID Tiere wurde das hämatopoetische Differenzierungspotential humaner NSZ untersucht.

Humane NSZ können aus fetalem Gehirn gewonnen werden. Die Zellen bilden ähnlich murinen NSZ *in vitro* Neurosphären und differenzieren zu neuronalen Zellen und Oligodendrozyten (Abb.17) (Svendsen et al., 1999). Die humanen NSZ, die in dieser Versuchsreihe eingesetzt wurden, stammten von einem kommerziellen Anbieter (CAMBREX Bio Science, Verviers, Frankreich) und wurden gemäß den Angaben der Firma kultiviert. Allerdings zeigte sich, dass das Proliferationspotential der Zellen auf etwa zwei Zellteilungen begrenzt war. Dennoch ließ sich nachweisen, dass die Inkubation von humanen NSZ in TSA und AzaC zu einer Hyperacetylierung von Histon H4 führt (Abb.18). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Hyperacetylierung von Histonen in humanen Stammzellen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren festgestellt haben (Bottardi et al., 2003; Travers et al., 2002). Travers et al. berichten allerdings, dass in humanen HSZ nur Natriumbutyrat, nicht aber TSA eine Hyperacetylierung der Histone bewirkt. In humanen NSZ konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings eine deutliche Hyperacetylierung festgestellt werden. Eventuell waren die unterschiedlichen Konzentrationen der eingesetzten HDAC-Inhibitoren für die unterschiedlichen Resultate verantwortlich. Die Transplantation *in vitro* kultivierter humaner NSZ in NOD/SCID ergab keine Besiedelung des murinen hämatopoetischen Systems. Shih und Kollegen berichteten hingegen, dass humane NSZ nach Transplantation in SCID-Mäuse hämatopoetische Zellen bildeten (Shih et al., 2001). Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit der humanen NSZ auf epigenetischen Änderungen der Zellen während der *in vitro* Kultur beruht, wurden NSZ mit TSA und AzaC inkubiert und anschließend in NOD/SCID Tiere transplantiert. Auch nach der Transplantation TSA/AzaC

behandelter NSZ konnte keine hämatopoetische Kontribution durch humane Zellen nachgewiesen werden (Abb.19, Abb.20). Die Diskrepanz in den Ergebnissen könnte auf der Menge an transplantierten Zellen beruhen. Während in den Experimenten von Shih  $1 \times 10^6$  humane NSZ pro Maus injiziert wurde, konnten im Rahmen dieser Versuchsreihe lediglich  $2 \times 10^5$  Zellen pro Maus transplantiert werden, da aufgrund verringerter Proliferationsfähigkeit nicht mehr Zellen zur Verfügung standen. Auch die verringerte Proliferationsfähigkeit selbst könnte ein Grund für das Fehlen humaner Zellen in NOD/SCID Tieren sein. Während Shih und Kollegen von bis zu 20-facher Expansion der NSZ Kultur berichten, konnten die Zellen in unseren Versuchen nur sehr begrenzt expandiert werden. Daher wäre es denkbar, dass die Zellen nach Transplantation in die murine Umgebung nicht fähig waren zu proliferieren und folglich untergegangen sind oder lediglich vereinzelt als neurale Zellen verharrten. Offensichtlich konnte auch die Inkubation der humanen NSZ mit den Chromatin-modifizierenden Chemikalien TSA und AzaC das Differenzierungspotential der NSZ nicht erweitern, da auch nach Transplantation TSA/AzaC inkubierter NSZ keine humanen hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnten. Dies steht im Gegensatz zu Daten, die mit murinen NSZ gewonnen wurden. TSA/AzaC behandelte NSZ konnten nach Transplantation in Blastozysten hämatopoetische Zellen bilden (Harder et al., 2004) (Abb. 16). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NSZ nach Inkubation mit TSA/AzaC und intravenöse Transplantation in adulte Tiere ein hämatopoetisches System aufbauen (Schmittwolf et al., 2005). Grund für die unterschiedliche Wirkung von TSA und AzaC auf humane und murine NSZ könnte sein, dass humanes Chromatin für epigenetische Modifikationen durch TSA und AzaC weniger gut zugänglich ist. Allerdings zeigte sich bei der Überprüfung des Acetylierungsgrads von Histon H4, dass auch in humanen NSZ TSA eine Hyperacetylierung von Histon H4 bewirkt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Inkubationsbedingungen von humanen NSZ mit TSA und AzaC weiter optimiert werden könnten. Die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der humanen Zellen schränkte die weitere Analyse der Hyperacetylierung allerdings ein.

Interessanterweise konnte Shih et al. zwar zeigen, dass humane NSZ *in vivo* hämatopoetische Zellen bilden. Die hämatopoetische Differenzierung humaner NSZ *in vitro* war allerdings nicht möglich. Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen an murinen NSZ aus unserem Labor. Murine NSZ bilden nach Behandlung mit TSA und AzaC und anschließende Transplantation in Blastozysten bzw. adulte Tiere hämatopoetische Zellen. Die Kultur behandelter NSZ in Methylzellulose, die mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren versetzt war, brachte hingegen keine hämatopoetischen Zellen hervor.

Die Verwendung humaner NSZ beruhte auf der Annahme, dass die Kultivierung humaner NSZ unter standardisierten Bedingungen leichter möglich sei, als die Kultur alternativer somatischer Stammzellpopulationen. Es zeigt sich aber zum einen, dass humane NSZ ein sehr eingeschränktes Proliferationspotential besitzen. Zum anderen wurden zwischenzeitlich Stammzellpopulationen und Kulturbedingungen beschrieben, die es möglich erscheinen lassen, dass andere SSZ für die dargestellten Experimente geeigneter wären. So wurde eine Methode beschrieben, humane HSZ *in vitro* zu kultivieren ohne dass die Zellen ihre Stammzellcharakteristika verlieren (Kuci et al., 2003). Eine weitere Veröffentlichung berichtet von der Isolation pluripotenter Stammzellen aus dem Nabelschnurblut, die *in vitro* expandiert werden kann und pluripotentes Differenzierungspotential besitzt (Kogler et al., 2004). Diese Stammzellpopulationen könnten besser geeignet sein, das Entwicklungspotential von SSZ nach epigenetischer Modifizierung zu untersuchen.

#### 4.4 Ausblick

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass das Differenzierungspotential von murinen neuralen Stammzellen und humanen leukämischen Zellen durch externe Stimuli verändert werden kann. Durch Transplantation in embryonale Mikroumgebung wurde die Differenzierung von humanen leukämischen Zellen angeregt. Epigenetische Modifikationen verbunden mit Transplantation in Präimplantationsblastozysten bewirken eine Differenzierung von NSZ zu hämatopoetischen Zellen.

Legt man diese Erkenntnisse zugrunde, lassen sich gegensätzliche Ansichten zur Existenz von Transdifferenzierung von SSZ (Bjornson et al., 1999; Morshead et al., 2002) mit Unterschieden im epigenetischen Status der eingesetzten Zellpopulationen erklären. Der Einfluß des epigenetischen Codes auf den Differenzierungsstatus von Zellen rückt erst in jüngster Zeit in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen (Jenuwein and Allis, 2001). Dennoch existieren bereits zahlreiche Veröffentlichungen, die den Einfluss epigenetischer Modifikationen während der Differenzierung von Zellen untersuchen (Arney and Fisher, 2004; Bonifer, 2005; Hsieh and Gage, 2004). Aufbauend darauf zeigen die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass der epigenetische Code von NSZ durch transiente Inkubation mit Chromatin-modifizierenden Substanzen verändert werden kann. Durch diese Behandlung kann das Differenzierungspotential von NSZ erweitert werden.

Letztendlich könnte die gezielte Veränderung des Differenzierungspotentials von SSZ in der regenerativen Medizin genutzt werden, um aus leicht zugänglichen SSZ Effektorzellen eines anderen Kompartimentes zu gewinnen.

Bevor dieses Verfahren therapeutisch genutzt werden kann, sollten aber weitere Daten zur Effektivität der Behandlung von SSZ gewonnen werden. So wäre es interessant zu untersuchen, welchen Einfluß TSA und AzaC auf das gesamte Genexpressionsprofil der Zellen haben und ob gezielt Einfluss auf die Aktivität bestimmter Genloci genommen werden kann. Vor einem Einsatz in der Therapie muss auch die Gefahr der malignen Transformation der Zellen durch die epigenetische Modifikation ausgeschlossen werden.

Sobald weiterführende Erkenntnisse zum Mechanismus der Veränderung des Differenzierungspotentials von SSZ vorliegen, könnte die Behandlung von SSZ mit Chromatin-modifizierenden Substanzen den Einsatz autologer Stammzellen bei der Therapie schwerwiegender Erkrankungen ermöglichen.

Da einige Forscher bereits die Ära der ‚Chromatinomics‘ ausgerufen haben (Cerny and Quesenberry, 2004), werden in naher Zukunft Antworten auf die aufgeworfenen Fragen zu erwarten sein.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Mäusstämme

Mauslinie	Verwendung	Herkunft
NMRI	Blastozystendonoren/Rezipienten	Charles River, Sulzfeld
hu bcl-2	NSZ-Donoren	Domen et al.
hu $\beta$ -Globin	Isolation embryonaler Erythrozyten	Grosveld et al.
NOD/SCID	Intravenöse Transplantation humaner Zellen	The Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME

### 5.2 Antikörper

#### 5.2.1 Primäre Antikörper

Antikörperspezifität	Klonbezeichnung	Isotyp	Konjugat	Hersteller
GFAP	polyklonal	Kaninchen-IgG		DAKO
$\beta$ -Tubulin III	TU-20	IgG1		Chemicon
O4	81	IgM		Chemicon
Histon H4	polyklonal	Kaninchen IgG		Upstate
acetyl-Histon H4	Antiserum	Kaninchen		Upstate
MeCP2	polyklonal	Kaninchen IgG		Upstate
murine CD45.2	104	IgG2a	Biotin	BD Bioscience
human CD45	HI30	IgG1	FITC	BD Bioscience
human CD235a	YTH89.1	Ratte-IgG2b		DPC Biermann
human CD45	polyklonal	Ziege-Ig		Santa Cruz

#### 5.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörperspezifität	Wirt	Konjugat	Hersteller
Maus	Ziege	Cy3	Chemicon
Kaninchen	Rind	HRP	Santa Cruz
Ziege	Kaninchen	AP	Dianova
Ratte	Ziege	FITC	Dianova

#### 5.2.3 Fluorophore zum Markieren biotinylierter Antikörper

Konjugat	Hersteller
Streptavidin-AP	BD Bioscience

## 5.3 Lösungen und Chemikalien

### 5.3.1 Zellkultur-Medien und Zusätze

RPMI 1640	GibcoBRL
Neurobasalmedium	GibcoBRL
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL
L-Glutamin	GibcoBRL
Natriumpyruvat	GibcoBRL
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich
Pferdeserum	Sigma-Aldrich
B27-Supplement	GibcoBRL
7,5%ige BSA-Lösung	GibcoBRL
Trypsin-EDTA (1x konzentriert)	GibcoBRL
AccumaxTM	PAA
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich
5-Aza-2'-desoxycytidin (AzaC)	Sigma-Aldrich

### 5.3.2 Wachstumsfaktoren

rekombinantes humanes FGF-basic	PeptoTech Inc
rekombinantes humanes EGF	PeptoTech Inc

### 5.3.3 Chemikalien

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Dextran T500	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem
Natriumdesoxycholat (Na-DOC)	Applichem
Natriumfluorid (NaF)	Applichem
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Applichem
Glycerol	Applichem
TRIZMA (Tris)	Applichem
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Roth
Dithiotreitol (DTT)	Applichem
Proteinmolekulargewichtsstandard	MBI Fermentas
Tween 20	Applichem
Magermilchpulver	Roth
Isopropanol	Applichem
Ethanol absolut	Applichem
Chloroform-Phenol	Applichem
Essigsäure	Applichem
Borsäure	Applichem

Neomycin-Sulfat	Applichem
Agarose NEEO (Ultra-Qualität)	Roth
Ethidiumbromid	Merck
di-Natriumtetraborat	Applichem
Schafserum	Sigma-Aldrich
Triton® X-100	Fluka BioChemika
Methanol	Applichem
Paraformaldehyd (PFA)	Applichem
L-Glycin	Sigma-Aldrich
Einbettmedium	DAKO
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Geschenk von S. Petrovic

#### 5.3.4 Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Restriktionsenzyme:	MBI Fermentas
- HpaII	
- MspI	
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
SUPER TAQ Polymerase	HT Biotechnology Ltd.
DNase I	Roche Diagnostics
dNTP Mix	Qiagen
Hexamer Primer Mix	Roche

#### 5.3.5 Radioaktivität

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-CTP	Amersham
-----------------------------------	----------

#### 5.3.6 Puffer und Lösungen

20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat*2H <sub>2</sub> O, pH 7,0
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,3
10x TBE	890 mM Tris base 890 mM Borate 20 mM EDTA, pH 8.0
Lysis-Puffer	10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 % SDS, pH 8.0
Gey's Lösung	120 ml [650 mM NH <sub>4</sub> Cl, 25 mM KCl, 0.7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4.2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O, 28 mM Glucose, 140 mM Phenolrot] + 30 ml [5.7 mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 21 mM MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O, 16 mM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O] + 30 ml [268 mM NaHCO <sub>3</sub> ] + 420 ml H <sub>2</sub> O
Histon-Isolations- Puffer	10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O, 250 mM Sucrose, 1 % Triton X-100, 20 mM NaHSO <sub>3</sub> , pH 6.5
Eluationspuffer	28.5 mM Tris-HCl, 47 mM EDTA, pH 7.4, 1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz.

## 5.3.7 Kits

QuantiPro BCA Assay Kit	Sigma-Aldrich
ECL-Kit	Amersham
Genomic DNA Purification Kit	Qiagen
DNA-Purification Kit	Roche

## 5.4 Verbrauchsmaterial

Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark
Pipettenspitzen	Universitäts Lager
Plastikmaterial für die Zellkultur	Falcon, Greiner, Nunc, Sarstedt
FACS-Röhrchen	Elkay
Sterilfilter	Schleicher & Schüll
Zellsiebe	BD, Falcon
Kanülen	Braun
Spritzen	Braun, Dispomed
Skalpelle	Ratiomed
Einmalküvetten	Sarstedt
3MM-Whatmanpapier	Scheicher & Schüll
Nitrozellulosemembran	Scheicher & Schüll
Röntgenfilme	Fuji
Ohrmarken	Hauptner
Deckgläschen	Hartenstein
Super-Frost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser

## 5.5 Geräte

Brutschrank	Forma Scientific
Sterilwerkbank	Heraeus
Zentrifugen	Hettich, Eppendorf, Sorvall
CytoSpin	ThermoShandon
Wasserbäder	GFL
Mikroskop	Zeiss
Neubauer-Kammer	Marienfeld
Einfrierboxen	Nalgene®
FACSCalibur	Becton Dickinson
digitale Kamera	Olympus
Bio Photometer	Eppendorf
pH-Meter	Knick
Vortexer	Scientific Industries
Agarose Gelkammer	Werkstatt, MSZ
Protein-Gel- und Blottingkammer	BioRad
Entwicklermaschine	AGFA
T3 Thermocycler	Biometra
Netzgerät	Pharmacia
Waage	Sartorius
Rotlichtlampe	Horten
Ohrmarkenzange	Hauptner
Cäsium-Quelle	MSZ
Injektionsnadeln	Biomedical Instruments
Mikromanipulator	Eppendorf

## 5.6 Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden mit Zellkulturplastikflaschen, -multilochplatten oder -schalen in Brutschränken bei 37 °C in einer humidifizierten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt durchgeführt. Die verwendeten Medien waren mit Natriumpyruvat (1 mM) gepuffert und mit Penicillin/Streptomycin (100 U/ml) und L-Glutamin (2 mM) versetzt.

### 5.6.1 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Für längere Lagerung von Zelllinien wurden  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 1,5 ml eiskaltem Einfriermedium (FKS mit 10 % DMSO) resuspendiert und durch schrittweise Abkühlen auf 80 °C in einer Einfrierbox (1 °C/min) schonend eingefroren und durch anschließenden Transfer in flüssigen Stickstoff langfristig gelagert. Um die Zellen zu rekultivieren, wurden die eingefrorenen Zellsuspensionen schnell bei 37 °C aufgetaut, mit einem Überschuss an entsprechendem Kulturmedium gewaschen und in frischem Medium ausgesät.

### 5.6.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Ein zu untersuchende Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. 10 µl der Suspension wurden entnommen und mit 90 µl Trypanblau- Lösung gemischt. 10 µl dieses Gemisches wurden auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Lebende Zellen transportieren das Trypanblau aktiv aus dem Zytoplasma. Aufgrund ihrer hellen Färbung können die lebenden Zellen deshalb unter dem Mikroskop von den toten Zellen und den Zellfragmenten unterschieden werden. Es wurde ein großes Quadrat der Neubauer- Kammer ausgezählt. Die Konzentration der Zellen in der ursprünglichen Suspension ergibt sich demnach:

[lebende Zellen / ml] = Anzahl der Zellen im Großquadrat x 10.000 x 10

### 5.6.3 Kultur von KG-1 Zellen

Ein Aliquot von KG-1 Zellen wurde ursprünglich von Dr. Ilse Junghahn, Max-Delbrück-Zentrum Berlin, bezogen. Die Zellen wachsen als nicht-adhärende Einzelzellsuspension in RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FCS, L-Glutamin sowie Penicillin/Streptomycin.

### 5.6.4 Isolierung und Kultur muriner neuraler Stammzellen (NSZ)

Zur Isolierung fötaler neuraler Stammzellen wurden Elterntiere verpaart und die Embryonen am Tag 14,5 aus dem Uterus der durch zervikale Dislokation getöteten Mutter entnommen. Den Embryonen wurde der Kopf abgetrennt und das Gehirn durch Entfernen der Kopfhaut und der Schädeldachanlagen freigelegt. Nach Abtrennen des vorderen Drittels der Großhirnhemisphären wurden diese in wenig PBS mechanisch in kleine Stücke zerteilt. Der entstandene Gewebepulver wurde in Neurobasalmedium mit 2 % B27-Supplement und den humanen Wachstumsfaktoren bFGF (20 ng/ml) und EGF (20 ng/ml) kultiviert. Nach der Ausbildung von charakteristischen Neurosphären wurden diese mittels Accumax vereinzelt und 1 zu 2 verdünnt in frischem Medium weiter kultiviert.

### 5.6.5 *In vitro* Differenzierung neuraler Stammzellen

Durch Entzug von Wachstumsfaktoren und Zugabe von Pferdeserum differenzieren NSZ nach ca. einer Woche zu neuronalen und glialen Zellen aus. Um das Differenzierungspotential einer NSC Kultur zu testen, wurde folgender Versuchsansatz gewählt. Bei 4 °C wurden Deckgläschen über Nacht mit Polyornithin (10 mg/ml Polyornithin verdünnt in 150 mM Natriumboratpuffer, pH 8,3) beschichtet. Für die Differenzierung wurden  $1 \times 10^6$  NSZ in 5 ml Neurobasalmedium ohne Wachstumsfaktoren, jedoch mit 1 % Pferdeserum aufgenommen. Auf die zweimal mit PBS gewaschenen Polyornithin beschichteten Deckgläschen wurden 0,5 bis  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät und diese für 7 bis 11 Tage inkubiert. Das Medium wurde entsprechend dem Verbrauch ca. jeden zweiten Tag gewechselt.

### 5.6.6 Kultur und Differenzierung humaner neuraler Vorläuferzellen

Humane neurale Vorläuferzellen (normal human neural progenitors, NHNP) wurden über die Firma CAMBREX bezogen. Die Zellen wurden in Neural Progenitor Minimal Medium (NPMM) supplementiert mit hFGF, hEGF, neural cell survival factor-1 und Gentamycin, das ebenfalls von der Firma CAMBREX geliefert wurde, kultiviert. Da die Proliferationsrate der humanen Zellen sehr gering war, wurde maximal einmal pro Woche Medium gewechselt. Eine Zerkleinerung der Neurosphären war wegen des langsamen Wachstums nicht nötig. Zur Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen wurden Glasplättchen über Nacht mit 0.05 % Polyethylenimin in Bortapuffer inkubiert. Nachdem die Plättchen dreimal mit Wasser gewaschen wurden, wurden 0.5 ml der neuralen Vorläuferzellen mit den Plättchen in 24-well Platten kultiviert. Nach ca. zwei Wochen konnte eine Adhäsion und Differenzierung der Neurosphären beobachtet werden.

### 5.6.7 Trichostatin A (TSA) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (AzaC) Behandlung neuraler Stammzellen

Um den Epigenotyp von NSZ zu modifizieren, wurden diese mit dem Histondeacetylaseinhibitor TSA und parallel mit dem Nukleotidanalogen AzaC, das als DNA Methylierungsinhibitor wirkt, behandelt. Vor der Behandlung wurde aus Neurosphären eine Einzelzellsuspension hergestellt und  $2 - 4 \times 10^5$  Zellen pro ml ausgesät. Zur Behandlung wurden 150 nM TSA und 500 nM AzaC für 48 h dem Kulturmedium zugegeben, während parallel Kontrollzellen unbehandelt blieben.

### 5.6.8 Zentrifugation von Zellen auf Objektträger (Zytospin)

Eine Einzelzellsuspension von Zellen wurde mit 4% PFA für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in PBS gewaschen und anschließend in 350 µl PBS aufgenommen. Mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge wurde die Zellsuspension bei 500 U/min für 2 min auf einen Objektträger geschleudert.

## 5.7 Tierexperimentelle Arbeiten

### 5.7.1 Intravenöse Injektion in die Schwanzvene subletal bestrahlter Mäuse

Zur Vorbereitung von 2 bis 5 Monate alten NOD/SCID Mäusen auf eine letale Bestrahlung wurde diesen 2 Tage vor der Bestrahlung Neomycin-Sulfat (1,7 g/l) zum Trinkwasser hinzugefügt. Die Mäuse wurden mit 3,0 Gray aus einer Cäsium 137 Quelle bestrahlt. Vor Injektion wurden die Mäuse ca. 10 min mit einer Rotlichtlampe zur Venenerweiterung erwärmt. Der Schwanz der Mäuse, die in einem kleinen Plexiglas Käfig fixiert wurden, wurde desinfiziert und die entsprechenden Zellen in die rechte oder linke Schwanzvene in einem Volumen von 500 µl PBS injiziert. Zur Verbesserung der Besiedelung durch humane Zellen wurden jeder Maus  $5 \times 10^6$  Rattenfibroblastenzellen, die humanes IL-3 exprimieren in 200 µl einer EHS-Matrix intraperitoneal transplantiert. Anschließend wurden die Mäuse über weitere 4 Wochen hinweg mit Neomycin-haltigem Trinkwasser versorgt und täglich ihr Gewicht und ihr Verhalten überprüft und protokolliert.

### 5.7.2 Blutabnahme an der Schwanzvene von Mäusen

Zur Bestimmung der Donorkontribution in repopulierten Mäusen wurde diesen frühestens vier Wochen nach Transplantation zum ersten Mal peripheres Blut an einer Schwanzvene entnommen. Dazu wurden die mit Rotlicht erwärmten Mäuse mit einem Skalpell leicht an der Vene eingeschnitten und 3 bis 6 Blutropfen direkt in 500 µl 5 mM EDTA/PBS aufgefangen. Zur Aufreinigung der Leukozyten wurde anschließend das gleiche Volumen PBS/2% Dextran

zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach Sedimentation der Erythrozyten wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. aufgenommen. Die 5 minütige Inkubation des Zellpellet in hypotoner Gey's Solution auf Eis führte zum Platzen der restlichen Erythrozyten. Nach Unterschichtung von FCS wurden die Leukozyten durch Zentrifugation pelletiert und in PBS aufgenommen.

### 5.7.3 Injektion von SSZ in Blastozysten und Re-Implantation der Blastozysten in Ammenmäuse

Zur Gewinnung der Blastozysten wurden von der Firma Charles River 5 Wochen alte NMRI Weibchen erworben. Den Weibchen wurde im Abstand von 46 Stunden zuerst 10 U PMS (pregnant mare serum) und anschließend 10 U HCG (humanes Choriogonadotropin) intraperitoneal injiziert. In der auf die zweite Injektion folgenden Nacht wurden die so superovulierten Weibchen mit Männchen verpaart und am nächsten Vormittag auf Vorhandensein des vaginalen Pfropf überprüft. Die Weibchen, die einen Pfropf aufwiesen wurden am dritten Folgetag durch zervikale Dislokation getötet und die Blastozysten durch spülen des Eileiters und des Uterus mit M2 isoliert und in einen M16 Tropfen, unter Öl überführt. Die zu injizierenden Zellen wurden zunächst in eine Einzelzellsuspension überführt und in Injektionsmedium mit 3 U/ $\mu$ l DNase I aufgenommen. Die Zellen wurden unter visueller Kontrolle an einem inversen Leicamikroskop in eine Injektionsnadel (Biomedical Instruments) aufgenommen und in das Blastozoele injiziert. Anschließend wurden die Blastozysten in ein Uterushorn scheinchwangerer NMRI Ammenmäuse, welche 2 Tage zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart worden waren, transferiert.

### 5.7.4 Präparation embryonaler Gewebe nach Injektion von SSZ in Blastozysten

Die Ammentiere wurden am 12,5 Tag der Entwicklung der Embryonen durch zervikale Dislokation getötet. Der Bauchraum wurde durch zwei Schnitte von der Leistenengegend nach dorsocranial geöffnet. Die Uterushörner, in denen sich die Embryonen befinden, wurden distal am Uterus communis und cranial am Ovidukt durchtrennt. Unter dem Binokular wurden die Embryonen einzeln ohne den Dottersack zu verletzen aus dem Uterus präpariert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass nach dem Abtrennen der Nabelschnur von der Plazenta mit einer Pinzette die Nabelschnur abgeklemmt wird, damit kein Blut austritt. Jeder Embryo wurde in einem separaten mit eiskalten PBS gefüllten Schälchen mehrmals geschwenkt um außen anhaftenden Zellen zu entfernen. Danach wurden die Embryonen in individuelle PBS-gefüllte 3,5 cm-Schalen überführt. Durch Punktieren der Carotiden wurde das Ausbluten des Embryo beschleunigt. Bei 12,5 Tage alten Embryonen ließen sich Dottersack, fötale Leber, Kopf, Hinterbein, der kopflose Rumpf-Körper und das embryonale Blut isolieren, das durch Ausblutung des Embryos in das umgebende PBS nach Abtrennung des Dottersackes und nach Abtrennung des Kopfes und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 200 g erhalten wurde.

### 5.7.5 Isolierung adulter muriner Knochenmarkszellen

Zur Isolierung adulten Knochenmarks wurde ein Tier durch zervikale Dislokation getötet und mit 70% EtOH das Fell desinfiziert. Femura und Tibiae wurden von Fell, Haut und Muskeln befreit und danach an den Gelenkenden eröffnet. Das Knochenmark wurde durch Spülen der Röhrenknochen mit PBS unter sterilen Bedingungen gewonnen. Anschließend wurde das im PBS befindliche Knochenmark auf Eis resuspendiert und mechanisch (durch Auf und Abpipettieren der Suspension in einer 1000  $\mu$ l Pipette) in eine Einzelzellsuspension überführt. Danach wurde für 6 min bei 200 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde in 5-10 ml Gey's-Solution resuspendiert und auf Eis stehen inkubiert. Durch die Zugabe der hypotonischen Gey's-Solution werden die Erythrozyten in der Zellsuspension lysiert. Nach 6 min. wurde die Zellsuspension mit 1,5 ml

FCS unterschichtet und für 7 min. bei 200g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem der Überstand abgesaugt war, wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und zum Abtrennen eventuell entstandener Klumpen durch einen Zellsieb mit 50µm Maschenweite gedrückt. Anschließend wurde die Lebendzellzahl pro Volumen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

## 5.8 Molekularbiologische Methoden

### 5.8.1 Enzymatischer Verdau genomischer DNA

Genomische DNA aus NSC Kulturen wurde mit Hilfe des ‚QIAGEN genomic DNA purification kit‘ gewonnen. Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. NSC wurden abzentrifugiert und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. 0.5 ml Zellsuspension wurden mit 0.5 ml Puffer C1 sowie 1.5 ml Wasser vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 1300 g wurde der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde in 0.25 ml Puffer C1 sowie 0.75 ml Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 1 ml Buffer G2 resuspendiert und anschließend 25 µl einer Proteinase K Lösung zugegeben. Die Zellen wurden bei 50 °C für 30 min lysiert. In der Zwischenzeit wurden die zugehörigen Säulen mit 2 ml Puffer QBT äquilibriert. Nachdem das Zelllysate auf die Säule gegeben war, wurde diese dreimal mit 1 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit Puffer QF aus der Säule eluiert. Die abschließende Aufreinigung der DNA erfolgte durch Isopropanolfällung sowie zweimaligem Waschen in 70 % Ethanol. Nachdem die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt war, wurde ein Aliquot auf einem 1.5 % Agarosegel aufgetragen um die Integrität der DNA zu überprüfen. Jeweils 5 µg DNA wurden mit 100 U des Restriktionsenzym in 50µl Volumen bei 37 °C über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurde der Ansatz nach Zugabe von 5 µl Ladepuffer auf ein 1 % Agarosegel gegeben und wiederum über Nacht bei 40 V aufgetrennt.

### 5.8.2 Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben

Um genomische DNA aus Zellen und Geweben zu isolieren, wurde zunächst die Zellstruktur durch Proteinase-Verdau und Detergenzbehandlung zerstört. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Chloroform Extraktion von den Proteinen gereinigt. Durch die Fällung in Isopropanol und das Waschen mit Ethanol wurden Salze aus der DNA ausgewaschen und die Konzentration erhöht.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Gewebe oder Zellpellet wird in 700 µl Lysispuffer mit Proteinase K aufgenommen
- Inkubation über Nacht bei 56 °C im Rotationsinkubator
- Zugabe von 7 µl RNase um sämtliche RNA zu degradieren
- 30 min. Inkubation bei 37°C
- Zugabe des gleichen Volumens Phenol-Chloroform, 5 min kräftiges Schütteln
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g
- Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß; die hydrophile DNA befindet sich im wässrigen Überstand, während sich die Proteine an der Interphase zum Phenol anlagern, deshalb sollte keinesfalls die Interphase mit überführt werden
- Zugabe des gleichen Volumens Phenol-Chloroform, 5 min kräftiges Schütteln
- Erneute Zentrifugation für 10 min bei 20.000g
- Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol, kräftiges schütteln
- Inkubation für 20 min bei -80 °C

- Zentrifugation für 15 min bei 20.000g, die DNA sollte als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar sein
- Entfernen des Überstandes und Zugabe von 700 µl 70 %igem Ethanol
- Kräftig vortexen um das Pellet vom Reaktionsgefäß zu lösen
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g
- Zugabe von 700 µl 70 %igem Ethanol
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g
- Vollständiges Entfernen des Ethanol; das DNA Pellet nicht trocken fallen lassen, da sich die DNA sonst nicht mehr vollständig löst
- Lösung des DNA Pellets in ddH<sub>2</sub>O

### 5.8.3 Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen

Zur Isolierung wurde die peqGold RNAPure Lösung der Firma PEQLAB, Erlangen verwendet. Diese Lösung enthält Guanidinisothiocyanat, ein chaotrophes Salz, das die Zellen lysiert und gleichzeitig RNasen denaturiert. Sämtliche Schritte wurden zudem auf Eis durchgeführt um eine Aktivität der RNasen möglichst zu unterbinden.

- Zerkleinern des Gewebes in einem Reaktionsgefäß mit einem Pistill (entfällt bei einem Zellpellet)
- Zugabe von 700 µl peqGold RNAPure, kräftig schütteln, 5 min inkubieren
- Zugabe von 70 µl RNase freies Chloroform, kräftig schütteln
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g und 4 °C
- Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe von 700 µl Isopropanol (RNase frei)
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g und 4 °C
- Zweimaliges Waschen mit 70%igem Ethanol
- Aufnehmen des RNA Pellets in DEPC-H<sub>2</sub>O

Um die Integrität der RNA zu überprüfen, kann eine Probe auf einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die 28s und 18s RNA sollten als distinkte Banden sichtbar sein.

### 5.8.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren führen in einer wässrigen Lösung zu einer starken Absorption des Lichtes bei einer Wellenlänge von 260 nm. Daher kann die Konzentration von Nukleinsäuren anhand des Extinktionswertes einer wässrigen Lösung bei 260 nm bestimmt werden. Da die Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration linear ist, lässt sich letztere über eine einfache Formel berechnen:

$$C = OD_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \text{ bei doppelsträngiger DNA}$$

$$C = OD_{260 \text{ nm}} \times 40 \mu\text{g/ml} \text{ bei einzelsträngiger DNA}$$

$$C = OD_{260 \text{ nm}} \times 33 \mu\text{g/ml} \text{ bei einzelsträngiger RNA}$$

Zur Messung der Extinktionswerte wurde ein Biophotometer der Firma Eppendorf verwendet.

### 5.8.5 Reverse Transkription

- 1 mg RNA wird in 14,5 µl RNase-freiem Wasser gelöst
- die RNA wird für 5min bei 70°C inkubiert um eine Denaturierung von doppelsträngigen Sequenzen zu erreichen
- die RNA wird anschließend sofort auf Eis gestellt um eine Renaturierung zu verhindern
- 5,5µl der Stock Solution werden zugegeben
- die Stock Solution besteht aus:

- o 2 µl RT-Puffer
- o 1 µl dNTP's
- o 2 µl Hexamer-Primer
- o 0,5 µl Omniscript Reverse Transkriptase
- der Ansatz wird 1 Std. bei 37 °C inkubiert

Hexamer-Primer sind ein Gemisch aus einzelsträngigen Hexameren mit statistisch verteilter Sequenzfolge. Es sind  $4^6 = 4096$  verschiedenen Hexamer-Sequenzen möglich. Statistisch gesehen sollte also für jede mRNA-Sequenz ein komplementärer Primer vorhanden sein.

### 5.8.6 PCR

Die Amplifikation durch PCR wurde entweder in einem Trio Thermoblock, einem Uno Thermoblock oder einem T3 Thermoblock (Biometra Göttingen) durchgeführt. Es wurden grundsätzlich 200ng genomische DNA eingesetzt. Alle Oligonukleotide, die als Primer in die PCR eingesetzt wurden, wurden von MWG Biotech synthetisiert.

### Myogenin-PCR

#### PCR-Ansatz:

- 5 µl Puffer (10x)
- 1 µl dNTPs (2,5 mM each)
- 100ng sense Primer ( 5'-TTA CGT TCG TGG ACA GC-3')
- 100ng antisense Primer ( 5'-TGG GCT GGG TGT TAG TCT TA-3')
- 0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- 200 ng DNA
- add 50µl H2O

#### Zyklus:

- 5 min 95 °C
- 30 sec 95 °C
- 30 sec 58 °C 36 Zyklen
- 90 sec 72 °C
- 2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: 245 bp

Die Primersequenzen und Bedingungen für die PCR entstammen der Literatur(Muller et al., 1994).

17 $\alpha$ mod

PCR-Ansatz:

5  $\mu$ l Puffer (10x)

1  $\mu$ l dNTPs (2,5 mM each)

1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM/ $\mu$ l)

100ng sense Primer ( 5'-GGATAATTCAG CTG ACT AAA CAG A-3')

100ng antisense Primer ( 5'-TTCCGTTTAGTT AGG TGC AGT TAT-3')

0,05  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

200 ngDNA

add 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Zyklus:

5 min 94 °C

1 min 94 °C

1 min 60 °C 40 Zyklen

1 min 72 °C

5 min 72 °C

Größe des Fragmentes: 850 bp

Die Primersequenzen und die Bedingungen der PCR entstammen der Literatur(Warburton et al., 1991).

humanes Aktin

PCR-Ansatz:

5  $\mu$ l Puffer (10x)

1  $\mu$ l dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'-CTC GGG AGC CAC ACG CAG CTC-3')

100ng antisense Primer ( 5'-AGG CCG GCT TCG CGG GCG-3')

0,05  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

abgeglichene Menge cDNA

add 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Zyklus:

5 min 95 °C

40 sec 95 °C

40 sec 54 °C 35 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: 200 bp

Die Primersequenzen und die Bedingungen stammen aus dem Labor von R. Henschler.

## HPRT (Hypoxanthyl Phosphoribosyl Transferase)

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer (200 ng/µl; 5'-CAC AGG ACT AGA ACA CCT-3')

100ng antisense Primer (200 ng/µl; 5'-GCT GGT GAA AAG GAC CTC T-3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

abgeglichene Menge cDNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 94 °C

40 sec 94 °C

40 sec 57 °C 35 Zyklen

60 sec 72 °C

3 min 72 °C

Größe des Fragmentes: 249 bp (cDNA); 1100 bp (genomische DNA)

Die Primersequenzen und die Bedingungen entstammen der Literatur(Keller et al., 1993).

## Humane Hämoglobinketten

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

40ng β-Globin sense Primer (200 ng/µl; 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GCA ACC TCA-3')

40ng β-Globin antisense Primer (200 ng/µl; 5'-GGT TGC CCA TAA CAG CAT CAG GAG T-3')

120ng ε-Globin sense Primer (200 ng/µl; 5'-CTT TGG AGA TGC TAT TAA AAA CAT G-3')

120ng ε-Globin antisense Primer (200 ng/µl; 5'-CCA GAA TAA TCA CCA TCA CGT TAC-3')

40ng γ-Globin sense Primer (200 ng/µl; 5'-GAC CGT TTT GGC AAT CCA TTT C3')

40ng γ-Globin antisense Primer (200 ng/µl; 5'-GTA TTG CTT GCA GAA TAA AGC C-3')

0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

abgeglichene Menge cDNA

add 50 µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 94 °C

60 sec 95°C

60 sec 58 °C 35 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: β-Globin: 212 bp

ε-Globin: 165 bp

γ-Globin: 135 bp

Die Primersequenzen und die Bedingungen stammen aus der Literatur(Bungert et al., 1995).

## Hu bcl2-PCR

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'- CGC GGA CGC TGG ATA TAA AGT -3')

100ng antisense Primer ( 5'- ACA TCT CCC GCA TCC CAC TC -3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

200 ngDNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 95 °C

30 sec 95 °C

30 sec 62 °C 36 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: circa 260 bp

Die Primersequenzen und die Bedingungen wurden von R. Götz am MSZ etabliert.

## YMT2/B-PCR

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'- CTG GAG CTC TAC AGT GAT GA -3')

100ng antisense Primer ( 5'- CAG TTA CCA ATC AAC ACA TCA C -3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

200 ngDNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 95 °C

30 sec 95 °C

30 sec 62 °C 36 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: circa 260 bp

Die Primersequenzen und Bedingungen für die PCR entstammen der Literatur(Muller et al., 1994).

## Oct-4

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'- AGC TGC TGA AGC AGA AGA GG -3')

100ng antisense Primer ( 5'- CTT AAG GCT GAG CTG CAA GG -3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

200 ngDNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 94 °C

60 sec 94 °C

60 sec 61 °C 35 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: cDNA 134 bp, gDNA 318 bp

Die Primersequenzen und Bedingungen für diese PCR wurden im Labor Müller etabliert.

## Rex-1

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'- GGC CAG TCC AGA ATA CCA GA -3')

100ng antisense Primer ( 5'- GAA CTC GCT TCC AGA ACC TG-3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

200 ng DNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 95 °C

60 sec 95 °C

60 sec 60 °C 44 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: 232 bp

Die Primersequenzen und Bedingungen für die PCR entstammen der Literatur(Ginis et al., 2004).

## Nanog

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'- AGG GTC TGC TAC TGA GAT GCT CTG -3')

100ng antisense Primer ( 5'- CAA CCA CTG GTT TTT CTG CCA CCG -3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

200 ngDNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 94 °C

60 sec 94 °C

60 sec 61 °C 35 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: cDNA 364 bp, gDNA 464 bp

Die Primersequenzen und Bedingungen für die PCR entstammen der Literatur(Mitsui et al., 2003).

## SCL

## PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'- CGC ATG GTG CAG CTG AGC -3')

100ng antisense Primer ( 5'- GGC TGT TGG TGA AGA TGC -3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

200 ngDNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

## Zyklus:

5 min 94 °C

60 sec 94 °C

60 sec 58 °C 36 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: cDNA 235 bp, gDNA 335 bp

Die Primersequenzen und Bedingungen für die PCR wurden im Labor Müller etabliert.

Vav

PCR-Ansatz:

5 µl Puffer (10x)

1 µl dNTPs (2,5 mM each)

100ng sense Primer ( 5'- GTA TAA CGT GGA GGT CAA GC -3')

100ng antisense Primer ( 5'- GGA GGA CTG GAG AAA ATC AG -3')

0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

200 ngDNA

add 50µl H<sub>2</sub>O

Zyklus:

5 min 95 °C

60 sec 95 °C

60 sec 61 °C 35 Zyklen

60 sec 72 °C

2 min 72 °C

Größe des Fragmentes: 254 bp

Die Primersequenzen und Bedingungen für die PCR wurden im Labor Müller etabliert.

### 5.8.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarose-Gele

Die im Rahmen einer PCR entstandenen DNA-Fragmente wurden über ein 1,5%iges Agarose- Gel aufgetrennt. Hierzu löste man unter Kochen in der Mikrowelle 6g Agarose in 400 ml TBE-Puffer und gab 20 µl 0,5% Ethidiumbromid-Lösung dazu. Mit dieser Agarose Lsg. wurden anschließend Gele gegossen. Das erstarrte Agarose-Gel wurde mit TBE-Puffer überschichtet und je nach Versuch 10-20 µl der PCR-Ansätze nach Zugabe von ca. 2 µl Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach erwarteter

Fragmentgröße in einem elektrischen Feld mit 5-8V/cm für ca. 30-60 min. Die durch Interkalation in die DNA-Doppelhelix verstärkte Fluoreszenz des zugesetzten Ethidiumbromids bei 590 nm ermöglichte die Visualisierung der entsprechend ihrer Größe exponentiell aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht. Zur Standardisierung und Einschätzung der Fragmentgrößen der Banden wurden DNA Fragmente bekannter Größe parallel zu den jeweiligen Proben aufgetragen. Hierzu wurde das Plasmid ptz mit dem Restriktionsenzym HinfI sowie das Plasmid pSM mit HindIII verdaut. Die erhaltenen DNA-Fragmente lagen bei ptz im Bereich von 44 bis 1202 bp, bei pSM zwischen 145 und 3440 bp

### 5.8.8 Southern Blotting

Herstellung radiaktiv markierter Sonden

Für die spezifische Hybridisierung von auf Filter transferierten DNA-Fragmenten mussten zunächst die gesuchten Fragmente isoliert und radioaktiv markiert werden. Hierzu wurden sie im Anschluss an die PCR und die Auftrennung über ein Agarose-Gel aus letzterem herausgelöst und anschließend einzelne Basen des Fragmentes im Rahmen einer „Nick Translation“ gegen radioaktiv markierte Basen ausgetauscht.

Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die im UV-Licht gut sichtbaren Banden des gewünschten Fragmentes wurden mit einem Skalpell möglichst fein herausgeschnitten, der Gelstreifen in einen Dialyseschlauch überführt und letzterer luftblasenfrei mit 2 ml TBE gefüllt und verschlossen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes von ca. 8 V/cm im TBE-Bad wanderten die DNA-Fragmente aus dem Gel an die Wand des Dialyseschlauches. Dieser Vorgang ließ sich gut im UV-Licht kontrollieren.

Abschließend wird die Polarisierung des elektrischen Feldes zur Ablösung der DNA von der Membran für einige Sekunden umgekehrt, die Flüssigkeit aus dem Dialyseschlauch entnommen, das Innere mit ca. 1 ml TBE gespült. Zu der resultierenden Lösung von DNA Fragmenten

wurde die doppelte Menge 100%iger Ethanol sowie 10 Vol% 3M Natriumacetat zugegeben. Durch kräftiges Schütteln und Inkubation für 15 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden die Fragmente aus der Lösung gefällt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in 75 %igem Ethanol bevor die DNA in einem möglichst geringem Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen wurde.

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch „Nick Translation“

Zur radiaktiven Markierung der DNA-Fragmente wurden 40 ng DNA mit einem Enzymgemisch aus DNase I und DNA-Polymerase I versetzt und in Anwesenheit von dATP, dGTP, dTTP, und  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  ( $\gamma$ -Strahler) für 45 min bei  $15^{\circ}\text{C}$  inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich aufgrund der Spaltung der inneren Phosphodiesterbindungen durch DNase I (Endonuklease) Einzelstrangabschnitte, deren Komplementärstränge anschließend von der DNA-Polymerase I unter Verwendung der freien – und zu einem Viertel  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -markierten – Nukleotide synthetisiert wurden. Um die so markierten Sonden von den aktiven Enzymen und freien Nukleotiden des Reaktionsansatzes zu befreien, wurde die Lösung anschließend über Sephadex G50-Säulen aufgetrennt. Hierzu wurde eine Insulinspritze mit Glaswolle und Sephadex G50 luftblasenfrei gefüllt, bei 400 g 2 min zentrifugiert und die Reaktionslösung auf die Oberfläche der Säule gegeben. Bei der folgenden erneuten Zentrifugation (400 g, 2 min) wanderten die vergleichsweise großen DNA-Fragmente schnell durch die Gelmatrix und ließen sich anschließend

in der sich unter der Säule absetzenden Flüssigkeit auffangen, während kleinere Moleküle wie freie Nukleotide oder Enzyme in die Innenräume der matrixbildenden Strukturen eindringen konnten und so zurückgehalten wurden (Molekularsieb-Prinzip).

Übertragung von Nukleinsäuren aus dem Agarose-Gel auf Nylonmembranen

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Gele für ca. 15 min in Denaturierungspuffer geschwenkt, um die strukturelle Konsistenz des Agarosegels zu schädigen und die folgende Eluation der DNA-Fragmente zu erleichtern. Diese erfolgte im Rahmen eines Halbtrocken-Blots, bei dem das Gel auf ein auf einer Glasplatte liegendes und in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt, die Nylonmembran luftblasenfrei auf der Rückseite des Gels positioniert und mit einem weiteren Filterpapier und einer Lage Papiertücher überdeckt wurde. Ein aufliegendes geringes Gewicht (ca. 500 g) verstärkte den Kontakt zwischen den verschiedenen Schichten des Blottes. In dieser Anordnung wurde der im unteren Filterpapier

gespeicherte Transferpuffer aufgrund von Kapillarkräften langsam durch das Gel, die Nylonmembran und den oberen Filter hindurch in die Papiertücher gesogen. In dem das Gel durchlaufenden Flüssigkeitsstrom wurden die im Gel befindlichen DNA-Fragmente mitgerissen,

bis sie an der dichten Struktur der Nylonmembran hängen blieben. Der gesamte Prozess des Blottings verlief in der Regel innerhalb von ca. zwölf Stunden. Die mit Nukleinsäuren beschichtete Membran wurde anschließend zweimal für ca. 5 min in 2x SSC geschwenkt und zum Crosslinking der Nukleinsäuren mit der Membran in 60 sec mit  $120\text{ mJ/cm}^2$  im UV-Licht belichtet.

Hybridisierung der geblotteten Fragmente mit markierten Sonden

Zur Hybridisierung der auf die Nylonmembranen geblotteten Fragmente wurden die Membranen zunächst für wenige Minuten nacheinander in  $\text{H}_2\text{O}$ dest. und 6x SSC gebadet,

anschließend in Gruppen von maximal sechs Membranen zusammengerollt und in ein gläsernes

Hybridisierungsrohr gesteckt. Um ein festes Aneinanderheften oder gar Übertreten von DNA Fragmenten bei den Membranen zu verhindern, wurden sie durch Trennlagen von Nylonvlies, welches zuvor ebenfalls in 6x SSC gebadet worden waren, separiert. Nach Zugabe von 20 ml Prähybridisierungspuffer rotierten die Filter in den verschlossenen Hybridisierungsrohren bei für 1 Std. im 65°C Ofen, um durch die im Puffer enthaltene Lachssperma-DNA unspezifische DNA-Bindungsstellen auf den Membranen zu maskieren. Zur Denaturierung partieller Doppelstränge wurden die radioaktiv markierten DNA-Sonden für 5 min bei 100°C inkubiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer aus dem Hybridisierungsrohr entfernt und durch Hybridisierungspuffer ersetzt, dem die radioaktiv markierte Sonde zugesetzt worden war. Es folgte zur spezifischen Hybridisierung der geblotteten DNA-Fragmente die Inkubation der Membranen unter Rotation bei 65°C über Nacht.

Abschließend wurden die Membranen zweimal mit 2XSSC/0.1 % Tween 20 und einmal mit 0.2XSSC/0.1 % Tween 20 gewaschen (jeweils 20 min), auf Filterpapier gelegt und mit Zellophanfolie umhüllt.

#### Belichtung von Filmen durch markierten Filtern

Zur Belichtung der Filme wurden die Membranen mit der geblotteten Seite auf einen Kodak Biomax MR-1-Röntgenfilm gelegt und in einer Metallkassette mit reflektierendem Hintergrund eingeschlossen. Je nach Stärke der radioaktiven Strahlung, die zuvor mit einem Geigerzähler abgeschätzt wurde, wurden die Kassetten für wenige Stunden bis zu einer Woche bei Raumtemperatur oder bei -80°C im Gefrierschrank (da bei -80°C aufgrund der Wirkung der Verstärkerfolie, die Signalintensität steigt) inkubiert. Die Entwicklung der belichteten Filme erfolgte in einem Kodak M35 XOMat Prozessor.

## 5.9 Proteinbiochemische Methoden

Durch Verwendung einer diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese können Proteine in einem Gelträger nach Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Nach Transfer der Proteine aus dem Gel auf proteinbindende Membranen können unter Einsatz von Antikörpern spezifische Proteinbanden dargestellt werden.

### 5.9.1 Herstellung von Zelllysaten

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. in einer vorgekühlten Zentrifuge durchgeführt. Die zu lysierenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde zur Lyse in Histon-Isolationspuffer in einer Konzentration von  $1 - 2 \times 10^7$  Zellen/ml aufgenommen, durch mehrmaliges Pipettieren aufgeschlossen. Die Lösung wurde 6 min bei 1000g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde insgesamt dreimal in Histon-Isolationspuffer aufgenommen. Anschließend wurde das Pellet in Tris/EDTA-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 1% konz. Schwefelsäure für min. 1h bei 4°C inkubiert. Letztendlich wurde das Lysat bei 20000g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand bis zur Weiterverwendung bei 20 °C eingefroren.

### 5.9.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Ermittlung der Proteinmenge in den Zelllysaten wurde ein Proteinbestimmungskit (QuantiPro BCA ASSAY KIT; Sigma) verwendet, dessen Prinzip auf der durch Proteine verursachten Reduktion zweiwertigen Kupfers ( $\text{Cu}^{2+}$ ) zu einwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^{1+}$ ) beruht.

Das hierbei entstehende  $\text{Cu}^{1+}$  bildet mit der zugefügten Bizinchoninsäure einen farbigen Komplex, so dass die Absorption der Proteinlösung bei 562 nm als direkt proportional zur Proteinkonzentration angenommen werden kann.

5  $\mu\text{l}$  des Zellysats wurden mit 1 ml einer  $\text{CuSO}_4$ -Lösung, wie in der Produktinformation des Kits beschrieben, versetzt und 60 min bei 60 °C inkubiert. Die Proben wurden parallel mit einer Proteinstandardlösung (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA) gemessen und mittels dieser die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate berechnet.

### 5.9.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu analysierenden Proben wurden in einem reduzierenden SDS Probenpuffer aufgenommen und pro Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Durch das denaturierende Agens SDS werden die Proteine in eine zylindrische Form aufgefaltet und mit einer Hülle aus SDS Molekülen umgeben. Dadurch erhalten die Proteine ein etwa proportional ihrer Größe entsprechende negative Ladung und können in einem elektrischen Feld innerhalb einer Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erlaubt die Aufkonzentration der verschiedenen Proben an der Grenze zwischen dem sogenannten Sammelgel und dem folgenden Trenngel. Das im Sammelgel und im Probenpuffer enthaltene Glyzin liegt aufgrund des pH-Wertes im Sammelgel als Zwitterion vor. Somit werden die Proteine zwischen den sogenannten Leitonen, den Chloridionen, und den Folgeionen, den Glyzinionen, gefangen und unter dem Einfluß des elektrischen Feldes fokussiert. Bei Erreichen des Trenngels kommt es zu einem pH-Sprung von pH 6,8 auf 9,0. Das Glyzin liegt dann als Anion vor und wandert als kleines Molekül zusammen mit den Chloridionen den größeren Proteinanionen voraus. Die Proteinanionen werden nun im Trenngel unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes innerhalb der Gelmatrix entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Es wurde stets ein 12%iges Trenngel und ein 3,75%iges Sammelgel verwendet, deren Polymerisation durch 10 % w/v APS induziert wurde. Nach Polymerisation wurden die Gele in die beiden mit 1x SDS-PAGE Puffer gefüllten Puffertanks einer Gelapparatur gesetzt, wobei die Proben unter einer konstanten Stromstärke von 22,5 mA je Gel aufgetrennt wurden.

### 5.9.4 Western Blot-Analyse

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wurden in einer Naß-Elektroblotkammer die Proteine aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der anschließend die immobilisierten Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper und geeigneter Detektionssysteme dargestellt wurden.

Das Gel, mehrere 3MM-Whatmanpapiere<sup>TM</sup>, 2 Schwämme und eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrozellulosemembran wurden in Transferpuffer getränkt. Auf einen Schwamm wurden 2 3MM-Whatmanpapiere<sup>TM</sup>, das Gel, die Nitrozellulosemembran, 2 weitere 3MM-Whatmanpapiere<sup>TM</sup> und erneut ein Schwamm luftblasenfrei gelegt. Dieser Stapel wurde in ein Plastikgehäuse geklemmt und anschließend in eine Naß Elektroblotkammer (BioRad) mit Transferpuffer gefüllt eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte unter konstantem Stromfluß bei 200 mA für 30 min.

Nach Beendigung des Transfers wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch 60 minütige Inkubation bei RT in einer Blockierungs-Lösung (5 % Magermilchpulver in TBS/T) abgesättigt. Der Immunonachweis verschiedener Proteine auf der Membran erfolgte durch spezifische Antikörper. Die Antikörperverdünnungen wurden in Blockierungs-Lösung angesetzt. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Membran dreimal mit TBS/T gewaschen und der primäre Antikörper über einen sekundären, Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper nachgewiesen (verdünnt in Blockierungs-Lösung). Nach 45 min Inkubation bei RT wurde die Membran erneut 3 bis 5mal gewaschen und die Proteine mittels des ECL<sup>TM</sup>-Systems von Amersham detektiert.

Die Meerrettichperoxidase setzt dabei ein Substrat um, wobei ein Röntgenfilm an der Stelle der spezifisch markierten Proteinbanden über die Freisetzung von Photonen geschwärzt wird.

#### 5.9.5 Stripping einer Nitrozellulosemembran

Um auf einer bereits markierten Nitrozellulosemembran weitere Proteine nachzuweisen, muß der vorher gebundene Antikörper entfernt werden. In 20 ml frisch angesetztem Stripping-Puffer wurde die Membran 30 min bei 50 °C inkubiert. Im Anschluß wurde diese mindestens 5 mal für 10 min mit einem Überschuß an TBS/T gewaschen, um nach erneutem Blockieren weitere Proteine nachweisen zu können.

### 5.10 Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierungen

#### 5.10.1 Immunhistochemischer Nachweis humaner Erythrozyten

Der monoklonale Antikörper  $\alpha$ CD235a erkennt spezifisch das Transmembranprotein Glycophorin A des Menschen, das von Erythroblasten und reifen Erythrozyten exprimiert wird.

Die Färbung von humanem peripheren Blut, von KG-1 Zellen, bzw. von peripherem Blut chimären muriner Embryonen wurde nach folgendem Protokoll gefärbt:

- Zellen in 4 % PFA für 30 min bei Raumtemperatur fixieren
- Zellen abzentrifugieren und mit PBS waschen
- Zellen auf Objektträger zentrifugieren
- 30 min mit 10%igem Mausserum blockieren
- Objektträger zweimal 5min mit PBS waschen
- Zellen mit Antikörper  $\alpha$ CD235a 1:100 verdünnt in PBS/3%BSA für 1 h inkubieren
- Zellen dreimal mit PBS waschen
- Mit Antikörper Ziege-antiMaus-FITC gekoppelt für 30 min inkubieren
- Zellen dreimal mit PBS waschen
- Zellkerne mit 1 % DAPI in PBS anfärben
- Zellen dreimal mit PBS waschen
- Objektträger mit Einbettmedium eindeckeln

#### 5.10.2 Kombinierte Immunfärbung von murinem CD45 mit *in situ* Hybridisierung des Y-Chromosom

Zum Nachweis von männlichen CD45-positiven Donorzellen in weiblichen Rezipiententieren wurden Einzelzellsuspensionen von Knochenmarkzellen einer Immunfärbung von CD45 sowie einer anschließenden *in situ* Hybridisierung des Y-Chromosoms unterzogen.

- Leukozyten aus dem Knochenmark isolieren
- Zellen mit 4 % PFA in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixieren
- Zellen abzentrifugieren und in PBS waschen
- Zellen für 10 min in 2 mM Levamisol inkubieren um endogene Phosphatasen zu inhibieren
- Zellen 30 min mit Antikörper Maus-antiMaus-CD45-Biotin 1:100 in PBS bei 4 °C inkubieren
- Zellen zweimal mit PBS waschen
- Zellen 30 min mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase 1:50 in PBS bei 4 °C inkubieren
- Zellen zweimal mit PBS waschen
- Zellen auf Objektträger zentrifugieren
- Zellen 20 min mit Vector Red (Linaris GmbH) inkubieren

- Zellen zweimal mit PBS waschen
- Präparate eintrocknen lassen oder 20 min bei 56 °C trocknen
- Objektträger für 10 min in 1M NaSCN bei 80 °C inkubieren
- Objektträger dreimal mit Wasser waschen
- Objektträger einmal mit PBS waschen
- 0.1 M HCl auf 37 °C erwärmen, 0.2 % w/v Pepsin zugeben und 1 min inkubieren
- Objektträger für 5 min zugeben, anschließend in 0.2 % Glycin abstoppen
- Objektträger einmal mit PBS waschen
- Zellen erneut mit 4 % PFA für 10 min fixieren
- Objektträger einmal mit PBS waschen
- Objektträger einmal mit Wasser waschen
- Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 90, 100 %) für jeweils 2 min entwässern
- Präparate eintrocknen lassen
- 3 µl FITC-gekoppelte Y-Chromosom-Probe (CAMBIO) mit 12 µl Hybridisierungspuffer vermischen und auf Zellpräparat geben
- Präparat mit Deckgläschen und Photokleber luftblasenfrei eindeckeln
- Objektträger für 10 min bei 60 °C inkubieren, anschließend über Nacht bei 37 °C inkubieren
- Dreimal mit 2 x SSC (37 °C) waschen
- Dreimal mit 0.5 x SSC (37°C) waschen
- Zellkerne mit 1 % DAPI in PBS anfärben
- Objektträger dreimal mit PBS waschen
- Präparat mit Einbettmedium eindeckeln

### 5.10.3 Herstellung einer Digoxigenin-gekoppelten DNA-Sonde

Zum Nachweis humaner Zellen sollte mittels der 17 $\alpha$ mod PCR eine Sonde hergestellt werden, die repetitive Sequenzen des humanen Chromosom 17 detektiert. Hierzu wurde eine 17 $\alpha$ mod PCR mit menschlicher DNA durchgeführt, wobei der PCR-Ansatz Digoxigenin-gekoppeltes UTP enthielt.

Rezeptur für den PCR-Ansatz:

- 5 µl 10x Puffer
- 200 ng sense Primer
- 200 ng antisense Primer
- 1 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 1 U Taq Polymerase
- 200 ng humane DNA
- 5 µl dNTP-Lösung (2 mM dATP; 2 mM dGTP; 2 mM dCTP; 1.3 mM dTTP; 0.7 mM Dig-11-dUTP)
- add 50 µl H<sub>2</sub>O

Die Sonde wurde anschließend mit dem DNA-Purification Kit von ROCHE aufgereinigt

### 5.10.4 Kombinierte Immunfärbung des humanen CD45 mit *in situ* Hybridisierung des humanen Chromosom 17

Um humane Leukozyten in murinen Rezipienten nachweisen zu können, wurde eine Antikörperfärbung von Leukozyten mit einer *in situ* Hybridisierung gegen humanes Chromosom 17 kombiniert. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Leukozyten auf Objektträger zentrifugieren
- Zellen für 10 min in 95 % Ethanol fixieren
- Zellen für 30 sec in 70 % Ethanol inkubieren
- Zweimal mit PBS waschen

- Unspezifische Bindungen für 30 min in PBS/1 % BSA / 0.1 % Tween 20 blockieren
- Antikörper Ziege-anti-human-CD45 1:100 in Blockierungslösung zugeben
- Über Nacht bei 4 °C in feuchter Kammer inkubieren
- Dreimal mit PBS waschen
- Sekundären Antikörper Kaninchen-anti-Ziege-AP 1:100 in Blockierungslösung zugeben und für 30 min inkubieren
- Dreimal mit PBS waschen
- 1 Fast Red Tablette (ROCHE) in 2 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 lösen
- Fast Red Lösung auf die Zellen gegeben und 15 min inkubieren
- Dreimal mit PBS waschen
- Präparat eintrocknen lassen
- Mit 4 % PFA für 20 min fixieren
- Zweimal mit PBS waschen
- In 100, 90 und 70 % Methanol für jeweils 5 min inkubieren
- 5 min in Wasser aufnehmen
- 5 min in PBS aufnehmen
- für 3 min in TE-Puffer mit 10 ng/µl Proteinase K verdauen
- Zweimal mit Wasser waschen
- Mit 4 % PFA für 2 min fixieren
- Zweimal mit Wasser waschen
- 4 µl Digoxigenin-gekoppelte Sonde mit 16 µl Hybridisierungslösung mischen und auf Zellen geben
- mit Deckgläschen abdecken und mit Photokleber versiegeln
- Objektträger für 5 min bei 95 °C inkubieren anschließend bei 37 °C über Nacht inkubieren
- Deckgläschen entfernen und zweimal mit 2x SSC waschen
- Einmal in 0.1x SSC waschen
- Zweimal 5 min in PBS inkubieren
- Antikörper Schaf-anti-Digoxigenin-AP 1:10 in PBS/10% Schafserum/3% Triton X-100 zugeben und 90 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Dreimal mit PBS waschen
- NBT/BCIP Lösung ansetzen (50 µl NBT/BCIP + 2.5 ml 100 mM Tris-HCl pH 7.4)
- NBT/BCIP Lösung auf Zellen geben und für 60 min inkubieren
- Dreimal mit Wasser waschen
- Zellkerne mit 1 % DAPI in PBS färben
- Dreimal mit Wasser waschen
- Präparate in Einbettmedium eindeckeln

## 6 Literaturverzeichnis

**Amatruda, T. T., 3rd, Bohman, R., Ranyard, J., and Koeffler, H. P. (1987).** Pattern of expression of HLA-DR and HLA-DQ antigens and mRNA in myeloid differentiation. *Blood* 69, 1225-1236.

**Anderson DJ, G. F., Weissman IL (2001).** Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 7, 393-395.

**Arney, K. L., and Fisher, A. G. (2004).** Epigenetic aspects of differentiation. *Journal of Cell Science* 117, 4355-4363.

**Aujame, L., Craig, J., and McBurney, M. W. (1984).** DNA methylation in differentiating mouse teratocarcinoma and erythroleukemia cells. *Can J Biochem Cell Biol* 62, 584-591.

**Avots, A., Harder, F., Schmittwolf, C., Petrovic, S., and Muller, A. M. (2002).** Plasticity of hematopoietic stem cells and cellular memory. *Immunol Rev* 187, 9-21.

**Beddington, R. S., and Robertson, E. J. (1989).** An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105, 733-737.

**Bez, A., Corsini, E., Curti, D., Biggiogera, M., Colombo, A., Nicosia, R. F., Pagano, S. F., and Parati, E. A. (2003).** Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 993, 18-29.

**Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999).** A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579-583.

**Bird, A., and Wolffe, A. P. (1999).** Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454.

**Bjornson, C. R. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., and Vescovi, A. L. (1999).** Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.

**Blelloch, R. H., Hochedlinger, K., Yamada, Y., Brennan, C., Kim, M., Mintz, B., Chin, L., and Jaenisch, R. (2004).** Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13985-13990.

**Bock, T. A., Orlic, D., Dunbar, C. E., Broxmeyer, H. E., and Bodine, D. M. (1995).** Improved engraftment of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice carrying human cytokine transgenes. *Journal of Experimental Medicine* 182, 2037-2043.

**Bonifer, C. (1999).** Long-distance chromatin mechanisms controlling tissue-specific gene locus activation. *Gene* 238, 277-289.

**Bonifer, C. (2005).** Epigenetic Plasticity of Hematopoietic Cells. *Cell Cycle* 4, 211-214.

- Bonifer, C., Faust, N., Geiger, H., and Müller, A. M. (1998).** Developmental changes in the differentiation capacity of haematopoietic stem cells. *Immunology Today* *19*, 236-241.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997).** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* *3*, 730-737.
- Bottardi, S., Aumont, A., Grosveld, F., and Milot, E. (2003).** Developmental stage-specific epigenetic control of human beta-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. *Blood* *102*, 3989-3997.
- Bungert, J., Dave, U., Lim, K.-C., Lieu, K. H., Shavit, J. A., Liu, Q., and Engel, J. D. (1995).** Synergistic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4. *Genes & Development* *9*, 3083-3096.
- Camerini-Otero, R. D., Sollner-Webb, B., and Felsenfeld, G. (1976).** The organization of histones and DNA in chromatin: evidence for an arginine-rich histone kernel. *Cell* *8*, 333-347.
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999).** Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* *21*, 103-107.
- Candido, E. P., Reeves, R., and Davie, J. R. (1978).** Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* *14*, 105-113.
- Cao, H. (2004).** Pharmacological induction of fetal hemoglobin synthesis using histone deacetylase inhibitors. *Hematology* *9*, 223-233.
- Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P., and Rao, M. S. (2001).** Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* *172*, 383-397.
- Cashman, J. D., Lapidot, T., Wang, J. C., Doedens, M., Shultz, L. D., Lansdorp, P., Dick, J. E., and Eaves, C. J. (1997).** Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood* *89*, 4307-4316.
- Cedar, H. (1988).** DNA methylation and gene activity. *Cell* *53*, 3-4.
- Cerny, J., and Quesenberry, P. J. (2004).** Chromatin remodeling and stem cell theory of relativity. *J Cell Physiol* *201*, 1-16.
- Chahal, S. S., Matthews, H. R., and Bradbury, E. M. (1980).** Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function. *Nature* *287*, 76-79.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003).** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643-655.
- Christman, J. K., Mendelsohn, N., Herzog, D., and Schneiderman, N. (1983).** Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res* *43*, 763-769.

- Chung, Y. S., Zhang, W. J., Arentson, E., Kingsley, P. D., Palis, J., and Choi, K. (2002).** Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 129, 5511-5520.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000).** Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-1663.
- Claus, R., and Lubbert, M. (2003).** Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 22, 6489-6496.
- Cook, M. A., and Tyers, M. (2004).** Cellular differentiation: the violin strikes up another tune. *Curr Biol* 14, R11-13.
- Copelan, E. A., and McGuire, E. A. (1995).** The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 85, 1151.
- Creusot, F., Acs, G., and Christman, J. K. (1982).** Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem* 257, 2041-2048.
- Cross, M. A., and Enver, T. (1997).** The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 7, 609-613.
- Crossley, M., and Orkin, S. H. (1993).** Regulation of the beta-globin locus. *Curr Opin Genet Dev* 3, 232-237.
- Csankovszki, G., Nagy, A., and Jaenisch, R. (2001).** Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153, 773-784.
- Damjanov, I. (1990).** Teratocarcinoma stem cells. *Cancer Surv* 9, 303-319.
- D'Amour, K. A., and Gage, F. H. (2003).** Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 *Suppl* 1, 11866-11872.
- Dick, J. E., Lapidot, T., and Pflumio, F. (1991).** Transplantation of normal and leukemic human bone marrow into immune-deficient mice: development of animal models for human hematopoiesis. *Immunological Reviews* 124, 25-43.
- Dillon, N., and Festenstein, R. (2002).** Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 18, 252-258.
- Doetsch, F. (2003).** A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13, 543-550.
- Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985).** The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 87, 27-45.

- Domen, J., Gandy, K. L., and Weissman, I. L. (1998).** Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* 91, 2272-2282.
- Dorshkind, K. (1990).** Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annual Review of Immunology* 8, 111-117.
- Drach, J., Zhao, S., Malavasi, F., and Mehta, K. (1993).** Rapid induction of CD38 antigen on myeloid leukemia cells by all trans-retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 545-550.
- Dürr, M., Harder, F., Merkel, A., Bug, G., Henschler, R., and Müller, A. (2003).** Chimerism and erythroid marker expression after microinjection of human acute myeloid leukemia cells into murine blastocysts. *Oncogene* 22, 9185-9191.
- Dürr, M., and Müller, A. M. (2003).** Plasticity of somatic stem cells: dream or reality?. *Med Klin (Munich)* 98 Suppl 2, 3-6.
- Ekmekci, C. G., Gutierrez, M. I., Siraj, A. K., Ozbek, U., and Bhatia, K. (2004).** Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 77, 233-240.
- Enver, T., Heyworth, C. M., and Dexter, T. M. (1998).** Do stem cells play dice? *Blood* 92, 348-351; discussion 352.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fisher, A. G. (2002).** Cellular identity and lineage choice. *Nat Rev Immunol* 2, 977-982.
- Friedrich, C., Zausch, E., Sugrue, S. P., and Gutierrez-Ramos, J. C. (1996).** Hematopoietic supportive functions of mouse bone marrow and fetal liver microenvironment: dissection of granulocyte, B-lymphocyte, and hematopoietic progenitor support at the stroma cell clone level. *Blood* 87, 4596-4606.
- Fuchs, E., and Segre, J. A. (2000).** Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100, 143-155.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K. H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (2002).** FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 62, 4916-4921.
- Gage, F. H. (2000).** Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Geiger, H., Sick, S., Bonifer, C., and Muller, A. M. (1998).** Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts [See News and Views in *Nature Medicine* 4: 896-897]. *Cell* 93, 1055-1065.
- Geiger, H., True, J. M., Grimes, B., Carroll, E. J., Fleischman, R. A., and Van Zant, G. (2002).** Analysis of the hematopoietic potential of muscle-derived cells in mice. *Blood* 100, 721-723.

- Gerschenson, M., Graves, K., Carson, S. D., Wells, R. S., and Pierce, G. B. (1986).** Regulation of melanoma by the embryonic skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 7307-7310.
- Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerecht-Nir, S., Amit, M., Hoke, A., Carpenter, M. K., Itskovitz-Eldor, J., and Rao, M. S. (2004).** Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269, 360-380.
- Goolsby, J., Marty, M. C., Heletz, D., Chiappelli, J., Tashko, G., Yarnell, D., Fishman, P. S., Dhib-Jalbut, S., Bever, C. T., Jr., Pessac, B., and Trisler, D. (2003).** Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14926-14931.
- 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. *Reproduction, Fertility, & Development* 1, 281-288.
- Greco, B., Low, H. P., Johnson, E. C., Salmons, R. A., Gallant, J., Jones, S. N., Ross, A. H., and Recht, L. D. (2004).** Differentiation prevents assessment of neural stem cell pluripotency after blastocyst injection. *Stem Cells* 22, 600-608.
- Greiner, D. L., Shultz, L. D., Yates, J., Appel, M. C., Perdrietz, G., Hesselton, R. M., Schweitzer, I., Beamer, W. G., Shultz, K. L., Pelsue, S. C., and et al. (1995).** Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *American Journal of Pathology* 146, 888-902.
- Gunji, Y., Sudo, T., Suda, J., Yamaguchi, Y., Nakauchi, H., Nishikawa, S., Yanai, N., Obinata, M., Yanagisawa, M., Miura, Y., and et al. (1991).** Support of early B-cell differentiation in mouse fetal liver by stromal cells and interleukin-7. *Blood* 77, 2612-2617.
- Hakelien, A. M., Landsverk, H. B., Robl, J. M., Skalhegg, B. S., and Collas, P. (2002).** Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* 20, 460-466.
- Harashima, A., Suzuki, M., Okochi, A., Yamamoto, M., Matsuo, Y., Motoda, R., Yoshioka, T., and Orita, K. (2002).** CD45 tyrosine phosphatase inhibits erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cells associated with selective inactivation of Lyn. *Blood* 100, 4440-4445.
- Harder, F., Henschler, R., Junghahn, I., Lamers, M. C., and Muller, A. M. (2002).** Human hematopoiesis in murine embryos after injecting human cord blood-derived hematopoietic stem cells into murine blastocysts. *Blood* 99, 719-721.
- Harder, F., Kirchhof, N., Petrovic, S., Wiese, S., and Muller, A. M. (2004).** Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts. *Exp Hematol* 32, 673-682.
- Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1997).** Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol* 1, 300-308.

- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y. G., Ohgane, J., Tanaka, S., and Shiota, K. (2004).** Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 279, 17063-17069.
- He, L. Z., Tolentino, T., Grayson, P., Zhong, S., Warrell, R. P., Jr., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Richon, V. M., and Pandolfi, P. P. (2001).** Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 108, 1321-1330.
- Heltweg, B., Dequiedt, F., Marshall, B. L., Brauch, C., Yoshida, M., Nishino, N., Verdin, E., and Jung, M. (2004).** Subtype selective substrates for histone deacetylases. *J Med Chem* 47, 5235-5243.
- Hirsch, E., Iglesias, A., Potocnik, A. J., Hartmann, U., and Fässler, R. (1996).** Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of  $\beta 1$  integrins. *Nature* 380, 171-175.
- Hochedlinger, K., Belloch, R. H., Brennan, C., Yamada, Y., Kim, M., Chin, L., and Jaenisch, R. (2004).** Reprogramming of melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes & Development* 18, 1875-1885.
- Hsieh, C. L. (1994).** Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 14, 5487-5494.
- Hsieh, J., and Gage, F. H. (2004).** Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* 14, 461-469.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. (1997).** Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes & Development* 11, 774-785.
- Huang, S., Law, P., Francis, K., Palsson, B. O., and Ho, A. D. (1999).** Symmetry of Initial Cell Divisions Among Primitive Hematopoietic Progenitors Is Independent of Ontogenic Age and Regulatory Molecules. *Blood* 94, 2595-2604.
- Hulspas, R., and Quesenberry, P. J. (2000).** Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* 40, 245-250.
- Illmensee, K., and Mintz, B. (1976).** Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 549-553.
- Ivanova, N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. A., Moore, K. A., and Lemischka, I. R. (2002).** A stem cell molecular signature. *Science* 298, 601-604.
- Jaenisch, R., Harbers, K., Jahner, D., Stewart, C., and Stuhlmann, H. (1982).** DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 20, 331-336.
- Jakel, R. J., Schneider, B. L., and Svendsen, C. N. (2004).** Using human neural stem cells to model neurological disease. *Nat Rev Genet* 5, 136-144.

- Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M., and Sharkis, S. J. (2004).** Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 6, 532-539.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001).** Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002).** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Johnstone, R. W. (2002).** Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 1, 287-299.
- Jordan, C. T., and Lemischka, I. R. (1990).** Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes & Development* 4, 220-232.
- Jung, M. (2001).** Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents. *Curr Med Chem* 8, 1505-1511.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., and Wiles, M. V. (1993).** Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Molecular and Cellular Biology* 13, 473-486.
- Kirchhof, N., Harder, F., Petrovic, S., Kreutzfeldt, S., Schmittwolf, C., Durr, M., Kirsten, J., Muhl, B., Merkel, A., and Muller, A. M. (2002).** Developmental potential of hematopoietic and neural stem cells: unique or all the same? *Cells Tissues Organs* 171, 77-89.
- Koeffler, H. P., Bar-Eli, M., and Territo, M. C. (1981).** Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation. *Cancer Res* 41, 919-926.
- Koeffler, H. P., and Golde, D. W. (1980).** Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 56, 344-350.
- Kogler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V., Fischer, J., Rosenbaum, C., *et al.* (2004).** A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200, 123-135.
- Kontaraki, J., Chen, H.-H., Riggs, A., and Bonifer, C. (2000).** Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: Reorganization of the lysozyme locus before trans-activator binding and gene expression. *Genes & Development* 10, 1-17.
- Korn, A. P., Henkelman, R. M., Ottensmeyer, F. P., and Till, J. E. (1973).** Investigations of a stochastic model of haemopoiesis. *Exp Hematol* 1, 362-375.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. J. (2001).** Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.

- Kuci, S., Wessels, J. T., Buhring, H. J., Schilbach, K., Schumm, M., Seitz, G., Loffler, J., Bader, P., Schlegel, P. G., Niethammer, D., and Handgretinger, R. (2003).** Identification of a novel class of human adherent CD34<sup>-</sup> stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 101, 869-876.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., and Grompe, M. (2000).** Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234.
- Lapidot, T. (2001).** Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci* 938, 83-95.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Lapidot, T., Sher, G., Furukawa, T., Li, Q., and Shultz (1995).** Engraftment of immune-deficient mice with primitive hematopoietic cells from. *Human Molecular Genetics* 4, 163-172.
- Lassar, A. B., Paterson, B. M., and Weintraub, H. (1986).** Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* 47, 649-656.
- Lecuyer, E., and Hoang, T. (2004).** SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* 32, 11-24.
- Lemischka, I. (2002).** A few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol* 30, 848-852.
- Li, L., Connelly, M. C., Wetmore, C., Curran, T., and Morgan, J. I. (2003).** Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Res* 63, 2733-2736.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., and Martinez-Serrano, A. (2004).** Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl, S42-50.
- Liu, L. (2001).** Cloning efficiency and differentiation. *Nat Biotechnol* 19, 406.
- Loeffler, M., and Potten, C. S. (1997).** Stem cells and cellular pedigrees-a conceptual introduction. In *Stem cells*, C. S. Potten, ed. (London, Academic Press), pp. 1-27.
- Look, A. L. (1997).** Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, 1059-1064.
- Magrassi, L., Castello, S., Ciardelli, L., Podesta, M., Gasparoni, A., Conti, L., Pezzotta, S., Frassoni, F., and Cattaneo, E. (2003).** Freshly dissociated fetal neural stem/progenitor cells do not turn into blood. *Mol Cell Neurosci* 22, 179-187.
- Martin, G. R. (1981).** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7634-7638.

- Mayer-Proschel, M., Kalyani, A. J., Mujtaba, T., and Rao, M. S. (1997).** Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 19, 773-785.
- McBride, J. L., Behrstock, S. P., Chen, E. Y., Jakel, R. J., Siegel, I., Svendsen, C. N., and Kordower, J. H. (2004).** Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J Comp Neurol* 475, 211-219.
- McKay, R. (1997).** Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66-71.
- McKinney-Freeman, S. L., Jackson, K. A., Camargo, F. D., Ferrari, G., Mavilio, F., and Goodell, M. A. (2002).** Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1341-1346.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996).** Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993).** An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.
- Mehler, M. F., and Gokhan, S. (1999).** Postnatal cerebral cortical multipotent progenitors: regulatory mechanisms and potential role in the development of novel neural regenerative strategies. *Brain Pathol* 9, 515-526.
- Mei, S., Ho, A. D., and Mahlknecht, U. (2004).** Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review). *Int J Oncol* 25, 1509-1519.
- Milhem, M., Mahmud, N., Lavelle, D., Araki, H., DeSimone, J., Sauntharajah, Y., and Hoffman, R. (2004).** Modification of hematopoietic stem cell fate by 5aza 2'deoxyctidine and trichostatin A. *Blood* 103, 4102-4110.
- Mintz, B., and Illmensee, K. (1975).** Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 3585-3589.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003).** The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Moore, M. A., and Metcalf, D. (1970).** Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.
- Morrison, S. J. (2001).** Stem cell potential: can anything make anything? *Curr Biol* 11, R7-9.
- Morrison, S. J., Uchida, N., and Weissman, I. L. (1995).** The biology of hematopoietic stem cells. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 11, 35-71.
- Morshead, C. M., Benveniste, P., Iscove, N. N., and van der Kooy, D. (2002).** Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 8, 268-273.

- Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Craig, C. G., McBurney, M. W., Staines, W. A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994).** Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* *13*, 1071-1082.
- Mujtaba, T., Mayer-Proschel, M., and Rao, M. S. (1998).** A common neural progenitor for the CNS and PNS. *Dev Biol* *200*, 1-15.
- Mujtaba, T., Piper, D. R., Kalyani, A., Groves, A. K., Lucero, M. T., and Rao, M. S. (1999).** Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Dev Biol* *214*, 113-127.
- Müller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994).** Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* *1*, 291-301.
- Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E. M., Prideaux, V. R., Ivanyi, E., Markkula, M., and Rossant, J. (1990).** Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* *110*, 815-821.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993).** Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8424-8428.
- Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1998).** FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp Cell Res* *241*, 126-133.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998).** Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* *393*, 386-389.
- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., and Bird, A. (1999).** MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* *23*, 58-61.
- Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P., and Bradbury, E. M. (1989).** Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* *57*, 449-457.
- Odelberg, S. J., Kollhoff, A., and Keating, M. T. (2000).** Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell* *103*, 1099-1109.
- Ohneda, O., Yanai, N., and Obinata, M. (1990).** Microenvironment created by stromal cells is essential for a rapid expansion of erythroid cells in mouse fetal liver. *Development* *110*, 379-384.
- Outram, S., Amess, J. A., and Horton, M. A. (1988).** Erythromyeloid lineage fidelity is conserved in erythroleukaemia. *Leuk Res* *12*, 651-657.
- Palis, J., and Yoder, M. C. (2001).** Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* *29*, 927-936.

- Passegue, E., Jamieson, C. H., Ailles, L. E., and Weissman, I. L. (2003).** Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1*, 11842-11849.
- Pesce, M., Anastassiadis, K., and Scholer, H. R. (1999).** Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs 165*, 144-152.
- Peterson, C. L., and Laniel, M. A. (2004).** Histones and histone modifications. *Curr Biol 14*, R546-551.
- Petrovic, S., Cross, M., Müller, A.M. (2004).** Differentiation potential of FDCPmix cells following injection into blastocysts. *Cells Tissues Organs 178*, 78-86.
- Petrobono, R., Pomponi, M. G., Tabolacci, E., Oostra, B., Chiurazzi, P., and Neri, G. (2002).** Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. *Nucleic Acids Res 30*, 3278-3285.
- Ploemacher, R. E., Van der Loo, J. C., and Van der Sluijs, J. P. (1992).** In vitro assays for primitive hematopoietic cells [letter; comment]. *Blood 79*, 834-837.
- Podesta, A. H., Mullins, J., Pierce, G. B., and Wells, R. S. (1984).** The neurula stage mouse embryo in control of neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91*, 7608-7611.
- Potocnik, A. J., Brakebusch, C., and Fässler, R. (2000).** Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cells Require  $\beta 1$  Integrin Function for Colonizing Fetal Liver, Spleen, and Bone Marrow. *Immunity 12*, 653-663.
- Potten, C. S., and Loeffler, M. (1990).** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development 110*, 1001-1020.
- Prieto, J., Eklund, A., and Patarroyo, M. (1994).** Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol 156*, 191-211.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A., and Temple, S. (2000).** Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron 28*, 69-80.
- Quesenberry, P. J., and Becker, P. S. (1998).** Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci U S A 95*, 15155-15157.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R. C., and Melton, D. A. (2002).** "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science 298*, 597-600.
- Ramchandani, S., Bhattacharya, S. K., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999).** DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A 96*, 6107-6112.

**Rao, M. S., and Mayer-Proschel, M. (1997).** Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev Biol* 188, 48-63.

**Reckewell, A. (2004).** Impact of HDAC-Inhibitors on proliferation and differentiation of murine neural stem cells. Bachelor-Thesis.

**Reyes, M., and Verfaillie, C. M. (2001).** Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938, 231-233; discussion 233-235.

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

**Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., and Marks, P. A. (1998).** A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3003-3007.

**Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R. P., Metcalf, D., and Begley, C. G. (1995).** Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7075-7079.

**Robinson, J., Sieff, C., Delia, D., Edwards, P. A., and Greaves, M. (1981).** Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation. *Nature* 289, 68-71.

**Rosfjord, E., and Rizzino, A. (1994).** The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 1795-1802.

**Rossant, J. (1975a).** Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. I. Aggregation of isolated inner cell masses with morulae. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 33, 979-990.

**Rossant, J. (1975b).** Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 33, 991-1001.

**Rossant, J., and Ofer, L. (1977).** Properties of extra-embryonic ectoderm isolated from postimplantation mouse embryos. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 39, 183-194.

**Russell, E. S. (1979).** Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Advances in Genetics* 20, 357-459.

**Santi, D. V., Norment, A., and Garrett, C. E. (1984).** Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6993-6997.

**Schaniel, C., Gottar, M., Roosnek, E., Melchers, F., and Rolink, A. G. (2002).** Extensive in vivo self-renewal, long-term reconstitution capacity, and hematopoietic multipotency of Pax5-deficient precursor B-cell clones. *Blood* 99, 2760-2766.

- Schmittwolf, C., Kirchof, N., Jauch, A., Durr, M., Harder, F., Zenke, M., and Muller, A. M. (2005).** In vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents. *Embo J* 24, 554-566.
- Schmutte, C., and Jones, P. A. (1998).** Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. *Biol Chem* 379, 377-388.
- Scholer, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H., and Gruss, P. (1990).** Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *Embo J* 9, 2185-2195.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., and Benvenisty, N. (2000).** From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11307-11312.
- Shih, C. C., Weng, Y., Mamelak, A., LeBon, T., Hu, M. C., and Forman, S. J. (2001).** Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood* 98, 2412-2422.
- Sieweke, M. H., and Graf, T. (1998).** A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 8, 545-551.
- Socolovsky, M., Lodish, H. F., and Daley, G. Q. (1998).** Control of hematopoietic differentiation: lack of specificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6573-6575.
- Spangrude, G. J., Aihara, Y., Weissman, I. L., and Klein, J. (1988).** The stem cell antigens Sca-1 and Sca-2 subdivide thymic and peripheral T lymphocytes into unique subsets. *Journal of Immunology* 141, 3697-3707.
- Surani, M. A. (2001).** Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414, 122-128.
- Sutherland, H. J., Eaves, C. J., Eaves, A. C., Dragowska, W., and Lansdorp, P. M. (1989).** Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74, 1563-1570.
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., and Ostenfeld, T. (1999).** Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* 9, 499-513.
- Svendsen, C. N., ter Borg, M. G., Armstrong, R. J., Rosser, A. E., Chandran, S., Ostenfeld, T., and Caldwell, M. A. (1998).** A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* 85, 141-152.
- Szilvassy, S. J., Humphries, R. K., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C., and Eaves, C. J. (1990).** Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8736-8740.
- Tamaki, S., Eckert, K., He, D., Sutton, R., Doshe, M., Jain, G., Tushinski, R., Reitsma, M., Harris, B., Tsukamoto, A., et al. (2002).** Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res* 69, 976-986.

- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E., and Scott, E. W. (2002).** Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* *416*, 542-545.
- Terskikh, A. V., Easterday, M. C., Li, L., Hood, L., Kornblum, H. I., Geschwind, D. H., and Weissman, I. L. (2001).** From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7934-7939.
- Till, J. E., and McCulloch, E. A. (1961).** A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* *14*, 213-222.
- Till, J. E., McCulloch, E. A., and Siminovitch, L. (1964).** A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *PNAS* *51*, 29-36.
- Toth, K. F., Knoch, T. A., Wachsmuth, M., Frank-Stohr, M., Stohr, M., Bacher, C. P., Muller, G., and Rippe, K. (2004).** Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* *117*, 4277-4287.
- Travers, H., Spotswood, H. T., Moss, P. A., and Turner, B. M. (2002).** Human CD34+ hematopoietic progenitor cells hyperacetylate core histones in response to sodium butyrate, but not trichostatin A. *Exp Cell Res* *280*, 149-158.
- Trosko, J. E., and Ruch, R. J. (1998).** Cell-cell communication in cancerogenesis. *Frontiers in Biosciences* *3*, 208-236.
- Uchida, N., and Weissman, I. L. (1992).** Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* *175*, 175-184.
- Vallabhapurapu, D., and Müller, A. M.** nicht publizierte Daten.
- Van Lint, C., Emiliani, S., and Verdin, E. (1996).** The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* *5*, 245-253.
- Vassilopoulos, G., Wang, P. R., and Russell, D. W. (2003).** Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* *422*, 901-904.
- Vescovi, A. L., Parati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frolichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A., and Galli, R. (1999).** Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* *156*, 71-83.
- Vescovi, A. L., and Snyder, E. Y. (1999).** Establishment and properties of neural stem cell clones: plasticity in vitro and in vivo. *Brain Pathol* *9*, 569-598.
- Vitry, S., Bertrand, J. Y., Cumano, A., and Dubois-Dalcq, M. (2003).** Primordial hematopoietic stem cells generate microglia but not myelin-forming cells in a neural environment. *J Neurosci* *23*, 10724-10731.

- Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2002).** Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003).** Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.
- Warburton, P. E., Greig, G. M., Haaf, T., and Willard, H. F. (1991).** PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* 11, 324-333.
- Warrell, R. P., Jr., He, L. Z., Richon, V., Calleja, E., and Pandolfi, P. P. (1998).** Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 90, 1621-1625.
- Waterborg, J. H., and Kapros, T. (2002).** Kinetic analysis of histone acetylation turnover and Trichostatin A induced hyper- and hypoacetylation in alfalfa. *Biochem Cell Biol* 80, 279-293.
- Watt, F. M. (1998).** Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 353, 831-837.
- Watt, F. M., and Hogan, B. L. (2000).** Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427-1430.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C., and Reynolds, B. A. (1996a).** Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599-7609.
- Weiss, S., Reynolds, B. A., Vescovi, A. L., Morshead, C., Craig, C. G., and van der Kooy, D. (1996b).** Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? [see comments]. *Trends in Neurosciences* 19, 387-393.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Gough, N. M. (1988).** Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997).** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Mar 13;386(6621):200]. *Nature* 385, 810-813.
- Wong, P. M., Chung, S. W., Chui, D. H., and Eaves, C. J. (1986).** Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3851-3854.
- Wu, J. T., Archer, S. Y., Hinnebusch, B., Meng, S., and Hodin, R. A. (2001).** Transient vs. prolonged histone hyperacetylation: effects on colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G482-490.

**Wurmser, A. E., Nakashima, K., Summers, R. G., Toni, N., D'Amour, K. A., Lie, D. C., and Gage, F. H. (2004).** Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* *430*, 350-356.

**Yang, Y. C., Ciarletta, A. B., Temple, P. A., Chung, M. P., Kovacic, S., Witek-Giannotti, J. S., Leary, A. C., Kriz, R., Donahue, R. E., Wong, G. G., and et al. (1986).** Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* *47*, 3-10.

**Ye, M., Iwasaki, H., Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., Heck, S., Clausen, B., Akashi, K., and Graf, T. (2003).** Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential. *Immunity* *19*, 689-699.

**Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P., and Smith, A. G. (2002).** Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* *416*, 545-548.

**Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990).** Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* *265*, 17174-17179.

**Zhang, R., Tsai, F. Y., and Orkin, S. H. (1994).** Hematopoietic development of *vav*<sup>-/-</sup> mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 12755-12759.

**Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., and Thomson, J. A. (2001).** In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 1129-1133.

**Zon, L. I. (1995).** Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* *86*, 2876-2891.

## 7 Veröffentlichungen

### Zeitschriftenartikel:

Kirchhof, N.; Harder, F.; Petrovic S.; Kreutzfeld, S.; Schmittwolf, C.; **Dürr, M.**; Kirsten, J.; Mühl, B.; Merkel, A. and Müller, A.M. (2002): Developmental potential of hematopoietic and neural stem cells: unique or all the same? *Cells Tissues Organs* 171:77-89.

Harder, F.; Kirchhof, N.; Petrovic, S.; Schmittwolf, C.; **Dürr, M.**; Müller, A.M. (2002): Developmental potentials of hematopoietic and neural stem cells following injection into pre-implantation blastocysts. *Annals of Hematology* 81: 20-21.

**Dürr, M.**; Kalb, R.; Jung, K.; Gross, M.; Wagner, M.; Heterich, S.; Schindler, D. (2002): Zeigen primäre Fibroblastenkulturen von Patienten mit Fanconi Anämie eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV- und Röntgenbestrahlung? *medgenetik edition 2 ,Fanconi Anämie'*: 57-63.

**Dürr, M.**; Harder, F.; Merkel, A.; Bug, G.; Henschler, R. and Müller, A.M. (2003): Chimaerism and erythroid marker expression after micro-injection of human acute myeloid leukaemia cells into murine blastocysts. *Oncogene* 22(57): 9185-91

**Dürr, M.**; Müller, A.M. (2003): Plastizität somatischer Stammzellen: Traum oder Wirklichkeit? *Med. Klin* 98(Suppl. II): 3-6

Kalb, R.; **Dürr, M.**; Wagner, M.; Herterich, S.; Gross, M.; Digweed, M.; Joenje, H.; Hoehn, H.; Schindler, D. (2004): Lack of Sensitivity of Primary Fanconi's Anemia Fibroblasts to UV and Ionizing Radiation. *Radiat Res.* Mar;161(3):318-25

Schmittwolf, C.; Kirchhof, N.; Jauch, A.; **Dürr, M.**; Harder, F.; Zenke, M.; Müller, A.M. (2005): In vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents. *EMBO J.* 24(3):554-66

### Buchartikel:

**Dürr, M.**; Harder, F.; Müller, A.M. (2005): Developmental potential of somatic stem cells following injection into murine blastocysts. In: Ho, Hoffman, Zanjani (Eds.) *Stem Cell Transplantation*, WILEY-VCH (accepted)

### Vortrag/Poster:

Höhn, H.; **Dürr, M.**; Kalb, R.; Drexler, K.; Wagner, M.; Herterich, S.; Digweed, M.; Joenje, H.; Schindler, D.: Uniform response of Fanconi Anemia (FA) fibroblasts from 7 complementation groups to various DNA-damaging agents. *32<sup>nd</sup> Annual Meeting der European Society of human genetics* in Amsterdam, Niederlande 27. - 30. May 2000

**Dürr, M.**: Analysis of human leukemic cells after injection into murine blastocysts. *31th Annual Meeting der International Society of Experimental Hematology* in Montreal, Kanada 07.07.2002

## 8 Curriculum vitae

Michael Dürr  
geboren am 21.04.1977  
in Würzburg

### Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Bütthard  
1987 – 1996 Wirsberg-Gymnasium Würzburg  
1996 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Studium

1997 – 1999 Grundstudium Biologie an der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

1999 Diplom-Vorprüfung

1999 – 2002 Hauptstudium Biologie an der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

2001 Diplomprüfung

2001 – 2002 Diplomarbeit am Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung,  
Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Albrecht Müller

Thema: Analyse humaner leukämischer Zellen nach Injektion in murine  
Blastozysten

2002 – 2005 Dissertation am Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der  
Universität Würzburg

Thema: Analyse des in vivo Differenzierungspotentials humaner leukämischer  
Zellen sowie humaner und muriner neuraler Stammzellen

Bütthard, 29.04.05

Michael Dürr

## Danksagung

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Albrecht Müller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die sehr freundliche und hilfsbereite Unterstützung, die ich während der gesamten Arbeit erfahren durfte.

Herrn Prof. Georg Krohne danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Vertretung der Arbeit gegenüber der Fakultät für Biologie.

Ohne die finanzielle Unterstützung durch den Universitätsbund der Universität Würzburg, die GlaxoSmithKline-Stiftung, die Wilhelm-Sander-Stiftung sowie die Novartis-Stiftung für therapeutische Forschung hätte diese Arbeit nicht durchgeführt werden können.

Besonderer Dank geht an Dr. Reinhard Henschler, Dr. Ludwig Aigner und Prof. Dr. Manfred Jung für die Überlassung von Zellen und Chemikalien, verbunden mit den bereitwilligen Austausch von Wissen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller möchte ich für drei abwechslungsreiche und freundschaftliche Jahre der Zusammenarbeit danken.

Den Mitarbeitern des MSZ, insbesondere Gunther Tietsch und Jaqueline Schreiber danke ich für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung alltäglicher Aufgaben.

Dr. Friedrich Harder, Dr. Nicole Kirchhof und Dr. Matthias Porsch haben mich durch zahllose Tipps und die Weitergabe eigener Erfahrung bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt.