

**Untersuchungen zum *in vivo* Differenzierungspotenzial muriner
und humaner hämatopoetischer sowie muriner neuraler Stamm-
zellen**

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



vorgelegt von
Friedrich Harder

Geboren in Karlsruhe

Würzburg 2002

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Bayerischen Julius-Maximilian Universität Würzburg vom März 1999 bis Juli 2002 angefertigt. Betreut wurde sie durch Prof. Dr. A.M. Müller (Fakultät für Medizin) und Prof. Dr. G. Krohne (Fakultät für Biologie).

Eingereicht am: 26.7.02

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. A. M. Müller

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Bisher habe ich keine akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Friedrich Harder

1 Zusammenfassung

Im Zuge der Säugerentwicklung entsteht aus der totipotenten Eizelle ein Organismus aus mehr als 200 verschiedenen Zelltypen. Dabei wird die Entwicklung und der Erhalt des Tieres von Stammzellen gewährleistet. Während der Embryonalentwicklung gibt es nur transient vorkommende Stammzelltypen, während der adulte Körper die Homöostase mittels permanent vorhandener somatischer Stammzellen aufrechterhält. Als kennzeichnend für die somatischen Stammzellen galt, dass sie nur die Zellen ihres Gewebes ersetzen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob SSZ tatsächlich auf die Bildung von Zellen ihres Stammzellkompartiments beschränkt sind. Dazu wurden drei verschiedene Stammzelltypen, murine hämatopoetische und humane HSZ sowie murine NSZ in murine Präimplantationsblastozysten injiziert. Da dies die Zellen mit einer Umgebung exponiert, von der die Bildung aller Zelltypen des erwachsenen Tieres ausgeht.

Es konnte gezeigt werden, dass zur Mitte der Schwangerschaft Nachkommen aller drei injizierten Stammzelltypen sich präferentiell in den fötalen hämatopoetischen Geweben befinden. Für humane hämatopoetische und murine NSZ wurde gezeigt, dass diese hämatopoetische Vorläufer in hämatopoetischen Geweben der Embryonen bilden, sowie dass Nachkommen dieser Zellen ein erythroides Genexpressionsmuster aktivieren. Der Vergleich adulter chimärer Tiere zeigte, dass HSZ zu nahezu gleichen Teilen neurale und hämatopoetische Gewebe besiedelt hatten. Nachkommen neuraler Stammzellen dagegen vor allem in neuralen Geweben adulter Tiere gefunden wurden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass SSZ durch die Exposition mit der frühen embryonalen Mikroumgebung zur Bildung heterologer Zelltypen angeregt werden können. Außerdem demonstrieren diese Ergebnisse das unterschiedliche Entwicklungspotenzial von HSZ und NSZ und grenzen es gegenüber dem pluripotenten Differenzierungspotenzial von ES-Zellen ab.

2 Summary

During mammalian ontogeny an organism develops from a totipotent zygote that is composed of more than 200 distinct cell types. The development and the maintenance of the organism is dependent on somatic stem cells. Transient stem cell types exist during early embryonic development, but homeostasis of the adult is maintained by resident somatic stem cells. The restriction in commitment to the exclusive generation of cells of their own stem cell system was considered as a hallmark of adult stem cells.

The objective of the present thesis was to investigate whether somatic stem cells are truly restricted to the generation of cells belonging to their own stem cell system only. To this end three somatic stem cell types, murine hematopoietic, human hematopoietic and murine neural stem cells were injected into murine blastocysts. The blastocyst provides the injected stem cells with a microenvironment permissive for the generation of all cell types of the adult organism.

It could be shown using this method that progeny of murine and human hematopoietic and murine neural stem cells preferentially engrafted the hematopoietic tissues of the developing embryo. Furthermore, injection of human hematopoietic and murine neural stem cells gave rise to hematopoietic progenitor cells in fetal hematopoietic tissues, and generated cells with an erythroid gene expression pattern. Comparison of adult chimeric animals revealed that progeny of hematopoietic stem cells had engrafted hematopoietic and neural tissues to a similar extent, whereas progeny of neural stem cells was preferentially detected in neural tissues.

This result indicates, that somatic stem cells can generate heterologous cells if exposed to the early embryonic environment. Furthermore, it demonstrates the distinct and different developmental potentials of hematopoietic and neural stem cells and distinguishes them from the pluripotent differentiation potential of ES-cells.

Abkürzungsverzeichnis

bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	base pairs (Basenpaare)
CD	clusters of differentiation
cDNA	coding DNA (durch reverse Transkription aus mRNA gewonnen)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
FACS	fluorescence-activated cell scanner
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung: $9,81 \text{ m/s}^2$
Gy	Gray
Std.	Stunde(n)
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
kb	kilo bases (Kilo-Basen)
LIF	leucaemia inhibitory factor
min.	Minute(n)
nm	Nanometer
NSZ	neurale Stammzelle
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR mit vorhergehender reverser Transkription der RNA)
sek.	Sekunde(n)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSZ	somatische Stammzelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
V	Volt
ZNS	Zentralnervensystem

1	Zusammenfassung	IV
2	Summary	V
3	Einleitung	5
3.1	Stammzellen im Säuger - ein erster Überblick	5
3.2	Definition von Stammzellen	5
3.3	Entwicklung und Bildung von Stammzellen	5
3.4	Stammzellen im adulten Organismus	7
3.4.1	Murine hämatopoetische Stammzellen	7
3.4.2	Humane hämatopoetische Stammzellen	7
3.4.3	Neurale Stammzellen	8
3.5	Plastizität von Zellen	9
3.6	Differenzierung von Stammzellen	11
4	Fragestellung	13
5	Ergebnisse	14
5.1	Einleitung	14
5.2	Isolation hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark adulter Mäuse	14
5.3	Isolation hämatopoetischer Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut	16
5.4	Isolation neuraler Stammzellen aus dem Vorderhirn embryonaler Mäuse	17
5.5	Injektion von SSZ in murine Blastozysten	18
5.6	Injektion muriner HSZ in murine Blastozysten	19
5.6.1	Distribution injizierter LIN ⁺ Zellen in Blastozysten nach 12 Std. <i>in vitro</i> Kultur	19
5.6.2	Analyse des Differenzierungspotenzials von HSZ in 12,5 Tage alten Embryonen	19
5.6.3	Analyse der Donoranteile in Embryonen nach Injektion wildtypischer HSZ	20
5.6.4	Injektion muriner bcl2 transgener HSZ	21

5.6.5	Analyse der Donoranteile in adulten Tieren _____	23
5.6.6	Aufschlüsselung der Besiedelung durch Nachkommen injizierter HSZ in adulten Tieren nach Gewebegruppen _____	25
5.6.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der Injektion muriner HSZ in Blastozysten _____	25
5.7	Injektion humaner HSZ in murine Blastozysten _____	26
5.7.1	Distribution humaner HSZ in murinen Blastozysten 24 Std. nach Injektion in das Blastozoelel ____	27
5.7.2	Analyse der Donorkontribution in Embryonen nach Blastozysteninjektion humaner Zellen _____	27
5.7.3	Humane Vorläuferzellen in murinen Embryonen nach Blastozysteninjektion _____	28
5.7.4	Bestimmung der Genexpression humaner Zellen in murinen hämatopoetischen Organen nach Injektion humaner HSZ in murine Blastozysten _____	30
5.7.5	Analyse der Gewebeverteilung humaner Zellen in adulten Mäusen nach Injektion humaner CD34 ⁺ Zellen in murine Blastozysten _____	31
5.7.6	Zusammenfassung der Ergebnisse mit humanen HSZ und CD34 ⁺ Zellen _____	32
5.8	Injektion muriner NSZ in Blastozysten _____	32
5.8.1	<i>In vitro</i> Inkubation mit NSZ injizierten Blastozysten _____	32
5.8.2	Effektivität der Injektion muriner NSZ in murine Blastozysten _____	33
5.8.3	Analyse der Donorkontribution in Embryonen nach Injektion wildtypischer NSZ _____	34
5.8.4	Analyse der Donorkontribution in Embryonen nach Injektion bcl2 transgener NSZ _____	34
5.8.5	Analyse der Nachkommen neuraler Stammzellen in embryonalen und fötalen hämatopoetischen Geweben _____	36
5.8.6	NSZ bilden hämatopoetische Vorläufer in frühen Mausembryonen _____	38
5.8.7	Analyse des Chimärismus in adulten Geweben nach Injektion muriner NSZ _____	40
5.8.8	Vergleich der Gewebebesiedelung durch wildtypische und bcl2 transgene NSZ in adulten Tieren _____	40
5.8.9	Analyse von Nachkommen injizierter NSZ <i>in situ</i> _____	43
5.8.10	Aufschlüsselung der Gewebeverteilung in den adulten Tieren _____	44
5.8.11	Zusammenfassung der Ergebnisse der Injektionen muriner NSZ in Blastozysten _____	45
6	Diskussion _____	46
6.1	Das Differenzierungspotenzial somatischer Stammzellen _____	46

6.2	Isolation der zu injizierenden Stammzellpopulationen	47
6.2.1	Isolation muriner HSZ	47
6.2.2	Isolation humaner HSZ	48
6.2.3	Isolation muriner NSZ	49
6.3	Injektion von Zellen in Blastozysten	50
6.3.1	Injizierte Stammzellen 12-24 Stunden nach Injektion	51
6.3.2	Donoranteile in sich entwickelnden Embryonen am Tag E12,5	51
6.3.3	Hämatopoetische Zellen aus injizierten Stammzellen	54
6.3.4	Donoranteile in adulten Tieren	56
6.4	Modell zur Transdifferenzierung	58
7	Material und Methoden	61
7.1	Zellkulturmedien und Wachstumsfaktoren	61
7.2	Antikörper	62
7.2.1	Monoklonale primäre Antikörper	62
7.2.2	Polyklonale sekundäre Antikörper	62
7.2.3	Fluorophore zum Markieren gebundener Antikörper	62
7.3	Laborchemikalien	63
7.4	Enzyme	63
7.5	Laborgeräte und Verbrauchsmittel	64
7.6	RNA Isolierung und Reverse Transkription und PCR	64
7.7	Isolierung adulter muriner Knochenmarkszellen	65
7.8	Aufreinigung hämatopoetischer Vorläufer- und Stammzellen aus dem Knochenmark adulter Mäuse	65
7.8.1	Aufreinigung hämatopoetischer Stammzellen aus der liniennegativen Zellfraktion der Knochenmarkszellen.	66
7.9	Durchführung der Methylzellulosekultur	67

7.10	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	68
7.11	Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben	68
7.12	Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen	69
7.13	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	70
7.14	Reverse Transkription	70
7.15	PCR	71
7.16	Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarose-Gele	75
7.17	Southern Blotting	76
7.17.1	Herstellung radiaktiv markierter Sonden	76
7.17.2	Elektroeluation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	76
7.17.3	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch „Nick Translation“	76
7.17.4	Übertragung von Nukleinsäuren aus dem Agarose-Gel auf Nylonmembranen	77
7.17.5	Hybridisierung der geblotteten Fragmente mit markierten Sonden	77
7.17.6	Belichtung von Filmen durch markierten Filtern	78
7.18	Versuchstiere	79
7.19	Injektion von SSZ in Blastozysten und Re-Implantation der Blastozysten in Ammenmäuse	80
7.20	Präparation embryonaler Gewebe nach Injektion von SSZ in Blastozysten	80
8	Ausblick	81
9	Curriculum vitae	82
10	Danksagung	84
11	Literaturverzeichnis	85

3 Einleitung

3.1 Stammzellen im Säuger - ein erster Überblick

Im adulten Säuger existieren Organe und Gewebe, wie z.B. die Haut, das Darmepithel oder das hämatopoetische System, die einen hohen Zellumsatz haben. Der Ersatz alter und verbrauchter Zellen wird durch Stammzellensysteme geleistet, die aufgrund vorhandener Stammzellen die Funktion der Organe und Gewebe lebenslang aufrecht erhalten. Aber nicht nur Gewebe mit hohem Zellumsatz sondern auch Organe mit geringem Zellumsatz wie z.B. das zentrale Nervensystem, enthalten Stammzellen. Stammzellensysteme dienen neben dem Erhalt der Organe auch dem Wiederaufbau nach Schädigung.

Was charakterisiert diese Zellsysteme, wann werden sie gebildet und was ist ihre Leistungsfähigkeit?

3.2 Definition von Stammzellen

- A) Stammzellen sind in der Lage Nachkommen, die ebenfalls Stammzellen sind, hervorzubringen (Selbsterneuerungspotenzial).
- B) Stammzellen können eine Vielzahl differenzierter Nachkommen bilden (Multiliniendifferenzierungspotenzial).

Von Stammzellen wird immer dann gesprochen, wenn Zellen diese zwei definierenden Eigenschaften aufweisen.

3.3 Entwicklung und Bildung von Stammzellen

Die Entwicklung eines Säugers geht auf eine befruchtete Eizelle, die Zygote, zurück. Sie ist der Ursprung aller Zellen, die den späteren Organismus aufbauen werden. Demnach wird sie als totipotente Zelle bezeichnet. Aber nicht nur die Zygote, sondern auch die Zellen, die durch die ersten Furchungsteilungen bis zum Stadium der Morula entstehen, können noch nach Trennung voneinander den gesamten Organismus bilden. So werfen z.B. Gürteltiere (M. Abs 1985) obligatorisch eineiige Vierlinge, die durch Teilung des frühen Embryos in gleichwertige, sich von nun an getrennt entwickelnde Embryonen entstehen. Dies in der Natur vorkommende Phänomen macht sich auch in der Landwirtschaft beim Embryosplitting von Rinder-

embryonen zunutze (Heyman et al. 1998). Damit erfüllen die Zellen des Embryos bis zum Stadium der Morula die für Stammzellen definierenden Eigenschaften.

Die Totipotenz, die die frühen Zellen des Embryos noch besitzen, wird bis zum Blastozystenstadium verloren. Zum Zeitpunkt der Blastozyste besteht der Embryo bereits aus untereinander verschiedenen Zelltypen (Rossant 1975; Rossant 1975; Rossant et al. 1977): dem Trophektoderm, das als einzellige Schicht das Blastozoel umgibt und der im Blastozoel befindlichen Inneren Zellmasse (IZM) auf die alle intraembryonalen sowie ein Teil der extraembryonalen Gewebe zurückgehen. Von einer Gruppe um M. J. Evans und einer parallelen Gruppe um G. R. Martin wurde aus der murinen IZM zum ersten Mal eine *in vitro* wachsende, nicht transformierte Zelllinie etabliert (Evans et al. 1981; Martin 1981). Diese Zellen können *in vitro* durch Kokultur auf embryonalen Fibroblasten oder durch Zugabe von LIF zum Kulturmedium in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden (Williams et al. 1988; Gough et al. 1989). Werden ES Zellen durch Mikroinjektion zurück in die Blastozyste gebracht und eine solche injizierte Blastozyste zum Austragen in eine Leihmutter transferiert, so entsteht ein Chimäre. Dieses Tier ist aus den Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste sowie den ES Zellen aufgebaut (Beddington et al. 1989). Diese ES-Zellen besitzen auch die Fähigkeit *in vitro* zu differenzieren und dabei eine Vielzahl von Zelltypen zu bilden, die auch im adulten Tier vorkommen. So werden z.B. Muskel-, Nerven-, Epithel- oder auch Blutzellen gebildet (Doetschman et al. 1985; Schuldiner et al. 2000). ES Zellen sind, demnach Stammzellen mit *in vitro* unbegrenztem Teilungspotenzial und der Fähigkeit zur Multiliniendifferenzierung und *in vivo* der Fähigkeit alle Zellen des erwachsenen Tieres zu bilden. Da sie aber allein nicht einen Embryo mit seinen extraembryonalen Geweben aufbauen können, sondern nur wie Zellen der inneren Zellmasse die Gewebe des Embryos selbst aufbauen, werden sie im Gegensatz zu den totipotenten, frühen embryonalen Zellen als pluripotent bezeichnet (Nagy et al. 1990; Nagy et al. 1993).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung bilden sich die drei Keimblätter, Ekto-, Meso- und Entoderm, innerhalb derer sich die Organanlagen bilden. SSZ entstehen in der Embryonalentwicklung zu bestimmten Zeitpunkten (Müller et al. 1994; Qian et al. 2000).

3.4 Stammzellen im adulten Organismus

3.4.1 Murine hämatopoetische Stammzellen

Stammzellen wurden zuerst im hämatopoetischen System gesucht und gefunden. Historisch begann die Suche nach hämatopoetischen Stammzellen in den fünfziger Jahren (Lorenz et al. 1951; Ford et al. 1956). Gesucht wurden die Zellen, die ein durch ionisierende Strahlung zerstörtes hämatopoetisches System eines Empfängertieres wieder aufbauen konnten (Makinodan 1956; Nowell et al. 1956; Porteous et al. 1965). Die gesuchten Zellen müssen dazu sich selbst erneuern können, so die zerstörte Stammzellpopulation wiederaufbauen, alle myeloiden, erythroiden und lymphoiden Zellen des Blutes bilden und so die Funktion des Blutes und des Immunsystems wiederherstellen können (Lajtha et al. 1965; Porteous et al. 1966). Dazu wurden Subfraktionen des Knochenmarks, welches sich sehr früh als Hort der hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) erwiesen hatte, isoliert (Siminovitch et al. 1963; Till et al. 1964; Jursskova et al. 1965; Fowler et al. 1966; Haskill et al. 1970). Durch Isolation anhand von physikalischen Merkmalen oder Oberflächenmarkern wurde eine Population von Zellen beschrieben, in der HSZ hoch angereichert sind (Abbildung 3) (Jones et al. 1990; Okada et al. 1991; Spangrude 1992). Aus dem Labor von I. Weissman stammen Publikationen, in denen differenziert wird zwischen kurzzeitrepopulierenden HSZ, die das hämatopoetische System zwar in allen Linien, nicht aber über einen längeren Zeitraum repopulieren können und langzeitrepopulierenden HSZ, die diese Aufgabe über die ganze Lebensspanne erfüllen können (Morrison et al. 1994). Heutzutage ist es möglich murine HSZ so hoch anzureichern, dass das hämatopoetische System syngener Tiere mit nur einer Zelle der isolierten Stammzellfraktion wiederaufgebaut werden kann (Abbildung 4) (Ogata et al. 1995).

3.4.2 Humane hämatopoetische Stammzellen

Humane HSZ werden schon seit vielen Jahren erfolgreich bei Knochenmarktransplantationen klinisch eingesetzt. Trotzdem ist das Wissen über humane HSZ geringer als über murine HSZ, was vor allem an fehlenden experimentellen Systemen liegen dürfte (McCune et al. 1989) (Verfaillie 2002). Mittlerweile ist es gelungen, humane HSZ mithilfe von *in vitro* und *in vivo* Testmodellen relativ gut zu charakterisieren (Dick et al. 1991) (Pflumio et al. 1996). Die *in vitro* Testmethoden messen die klonogene Proliferationsaktivität zu untersuchender Zellen

über einen Zeitraum von 6-8 Wochen (Conneally et al. 1997). Während sich mit *in vitro* Tests sehr schnell eine Vielzahl verschiedener Zellfraktionen untersuchen lässt, sind *in vivo* Assays besser geeignet, die komplexen Vorgänge einer Knochenmarktransplantation wiederzugeben (Dorrell et al. 2000). Daher wird zur Bestimmung humaner HSZ Aktivität, die Fähigkeit humane Hämatopoese in der Maus zu initiieren, getestet. Zellpopulationen, die auf ihren Anteil humaner HSZ untersucht werden sollen, werden in bestrahlte NOD/SCID (Non obese diabete-s/ severe combined immune deficient) Mäuse transplantiert und die sich ausbildende humane Hämatopoese wird ausgewertet (Hogan et al. 1997).

Humane HSZ können aus verschiedenen Geweben isoliert werden, so können sie aus dem Knochenmark adulter Menschen direkt, oder nach Mobilisation durch Zytokine in das periphere Blut aus diesem elutriert werden (Wang et al. 1997). Als eine besonders ergiebige Quelle für humane HSZ hat sich das Nabelschnurblut erwiesen, aber auch aus fötalen Geweben wie z.B. fötalem Knochenmark und fötaler Leber wurden humane HSZ isoliert (Zanjani et al. 1991) (Baum et al. 1992) (Vormoor et al. 1993). Die Frequenz von Zellen mit der Fähigkeit eine adulte NOD/SCID Maus zu repopulieren, wurde in der Zellpopulation mit dem höchsten Anteil humaner HSZ, der CD34⁺/CD38⁻ Nabelschnurblutzellen, auf eine in 617 Zellen abgeschätzt (Bhatia et al. 1997).

3.4.3 Neurale Stammzellen

Bis vor wenigen Jahren wurde das Zentralnervensystem als ein Organ angesehen, das Schäden an seiner zellulären Struktur nicht durch Neubildung kompensieren kann. Dagegen war erwiesen, dass Funktionseinbußen aufgrund von Zerstörung von Geweben durch Funktionskompensation anderer Hirnareale möglich ist. Zudem ist aus der Entwicklungsbiologie bekannt, dass während der Embryonalentwicklung und auch postnatal der Zelltod vieler Neuronen für die Funktionsfähigkeit des Gehirns nötig ist (Kandel et al. 2000).

Obwohl diese Sicht zum Teil heute noch zutreffend ist, wurde sie durch neue Erkenntnisse über die Neubildung von Neuronen im erwachsenen Gehirn erweitert (Mayer-Proschel et al. 1997; Mujtaba et al. 1998; Vescovi et al. 1999; Vescovi et al. 1999). Sowohl im Mensch als auch in der Maus konnte in verschiedenen Hirnarealen Neurogenese nachgewiesen werden, und die dafür verantwortlichen Stammzellen konnten aus embryonalen und adulten Teilen des Hirns isoliert und in Kultur genommen werden (Bjornson et al. 1999; Foster et al. 1999; Mehler et al. 1999). In Kultur können NSZ gehalten und vermehrt werden, sie sind in der Lage durch Induktion von Differenzierung die drei neuralen Zelllinien Astrozyten, Neurone und

Oligodendrozyten zu bilden und erfüllen damit die Kriterien für Stammzellen (Kirchhof et al. 2002).

Welche Bedeutung die Neurogenese durch NSZ im adulten Körper hat, ist noch nicht geklärt. Bekannt ist nur, dass sie abhängig von Stimuli durch die Umgebung ist (Kempermann et al. 1997).

3.5 Plastizität von Zellen

Plastizität ist die Annahme einer zellulären Identität, die nicht zu dem Differenzierungspotenzial der ursprünglichen Zelle zählt. Um Plastizität nachzuweisen, muss das Differenzierungspotenzial der Ausgangszelle und der Differenzierungszustand der daraus neu entstandenen Zelle bekannt und zudem verschieden davon sein. Die Embryologie hat durch Transplantationsexperimente zeigen können, dass schon früh während der Entwicklung das Schicksal von Zellen vorherbestimmt ist (Dale et al. 1987; Tam et al. 1987). Daher galt es als gesichert, dass Entwicklungsprozesse unidirektional sind und Plastizität somatischer Zellen nicht auftritt.

Gleichwohl ist diese Sicht von Differenzierung für manche Spezies irrelevant, so zum Beispiel in *Hydra*, deren Zellen alle zur kompletten Regeneration des Gesamtorganismus befähigt sind.

Der adulte Säuger ist nur sehr begrenzt zur Regeneration verlorener oder zerstörter Strukturen befähigt. Dabei ist die Regeneration abhängig vom Vorhandensein von Stammzellen im geschädigten Gewebe. Bei der Regeneration eines beschädigten Gewebes durch gewebeeigene Stammzellen handelt es sich nicht um Plastizität, denn die Neubildung verlorener Zellen gehört zum Differenzierungspotenzial dieser gewebespezifischen Stammzellen (Lemischka 2002).

Die für Plastizität notwendige Änderung des Differenzierungsstatus hin zu einer linienfremden Zelle wurde erstmals Ende der 80iger Jahre bei B-Zellen beobachtet. Dabei wurde in B-Zellen durch die Überexpression der v-raf Kinase ein Identitätswechsel zu Makrophagen beobachtet (Klinken et al. 1988). Anfang der 90iger wurde in erythroiden Vorläuferzellen des Hühnchens entdeckt, dass Transformation durch den E26 Virus diese zu multipotenten Zellen macht und sie anschließend zur Differenzierung in linienfremde Zellen induziert werden konnten (Graf et al. 1992). Ende der 90iger Jahre wurde beschrieben, dass das Fehlen des Homodomain Transkriptionsfaktors Pax5, der für die Entwicklung von B-Zellen notwendig ist, zur Generation von B-Zellvorläufern führt, die im Stande sind andere hämatopoetische Zellen, z.B. T-Zellen, zu bilden (Rolink et al. 1999). Es war deutlich geworden, dass durch

selektive Eingriffe in das Genexpressionsmuster die Identität von Zellen soweit aufgeweicht werden konnte, dass diese ein plastisches Verhalten und damit die Bildung linienfremder Zellen ermöglichten. Offen blieb die Frage, ob es eines so drastischen Eingriffs wie der Überexpression oder der Deletion eines Gens bedürfe, um Plastizität zu erreichen.

Im Jahre 1999 wurde von Bjornsson und Kollegen eine Arbeit publiziert, die zeigte, dass *in vitro* wachsende NSZ in der Lage sind, das hämatopoetische System bestrahlter Mäuse zu repopulieren. Erstaunlicherweise hatten NSZ, die Abkömmlinge des ektodermalen Keimblattes sind, *in vivo* mesodermale Zellen gebildet. Es entstanden nicht nur differenzierte Zellen, sondern im Knochenmark der Empfängermause auch hämatopoetische Vorläuferzellen (Bjornsson et al. 1999). Das war die erste einer ganzen Reihe von Veröffentlichungen der folgenden Jahre, die Plastizität SSZ beschrieb. Besonders herausragend war diese Arbeit wegen des klonalen Ursprungs der verwendeten NSZ und der außerordentlich hohen Frequenz, mit der hämatopoetische Zellen durch NSZ gebildet worden waren. Weitere Arbeiten beschrieben das myogene Potenzial von NSZ und schließlich wurden in Experimenten Resultate erzielt, die das Entwicklungspotenzial von NSZ nahezu dem embryonaler Stammzellen gleichstellen (Galli et al. 2000; Clarke et al. 2000). Aber nicht nur für NSZ, sondern auch über das Differenzierungspotenzial von HSZ wurden erstaunliche Berichte publiziert. So wurde die Bildung von Leberzellen und verschiedener epithelialer Zelltypen beschrieben (Lagasse et al. 2000; Krause et al. 2001). Aus Knochenmark wurden Zellen isoliert, die Muskel- oder neurale Zellen bilden konnten (Gussoni et al. 1999; Brazelton et al. 2000; Mezey et al. 2000; Orlic et al. 2001), und entsprechend aus Muskel Zellen die Blutzellen bildeten (Jackson et al. 1999). Aber während die Arbeiten von Bjornsson et al. und Lagasse et al. einen hohen Standard bezüglich der eingesetzten Zellfraktion hatten, wurden in späteren Publikationen Zellfraktionen verwendet, die nicht aufgereinigt waren. Die anfänglich große Euphorie, die Hoffnungen auf jeden beliebigen Zellersatz aus somatischen Stammzellen schürte, wurde von Berichten gedämpft, die zeigen konnten, dass ein Teil der gefundenen Resultate nicht die Plastizität einer Stammzelle beschreiben, sondern durch die Heterogenität der verwendeten Zellfraktion zu erklären sind (Kawada et al. 2001). I. Lemischka prangerte in mehreren Artikeln die Verknüpfung des Begriffes Plastizität mit Ergebnissen aus Versuchen, in denen gemischte Zellfraktionen verwandt worden waren, an (Lemischka 2002). Er warb für die Verwendung retroviral markierter Stammzellen, um eindeutig die klonale Verwandtschaft der SSZ und der differenzierten Zellen zu zeigen.

Eine, die letzten Jahre übersehene alternative Ursache für die gefundenen Ergebnisse, die Plastizität beschrieben, wurde in Studien von Ying und Kollegen und Terada und Kollegen

beschrieben (Terada et al. 2002; Ying et al. 2002). In den Arbeiten wurde darauf hingewiesen, dass NSZ und HSZ *in vitro* mit ES-Zellen fusionieren können und die daraus entstandenen Zellhybride ein ES-Zell ähnliches Differenzierungspotenzial besitzen. Wenngleich die von den beiden Gruppen verwendeten Methoden weit entfernt von der *in vivo* Situation sind, besteht doch die theoretische Möglichkeit, dass Zellfusion für die beobachteten Ergebnisse mitverantwortlich sein kann.

3.6 Differenzierung von Stammzellen

Die im vorherigen Kapitel ausgeführten Ergebnisse zur Plastizität somatischer Stammzellen widersprechen bisherigen Ergebnissen und Modellen, die das Differenzierungsverhalten von Stammzellensystemen beschreiben. Die Regulation der Differenzierung innerhalb eines Stamm-

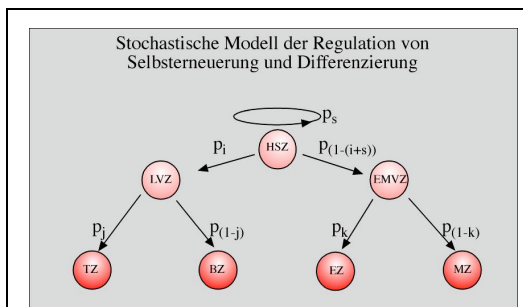


Abbildung 1: Gezeigt ist ein Modell zur stochastischen Regulation eines Stammzellensystems am Beispiel des hämatopoetischen. Die Stammzelle wird mit der Wahrscheinlichkeit p_s eine Selbsterneuerung durchführen, mit der Wahrscheinlichkeit p_i zu einer lymphoiden Vorläuferzelle, und mit der Gegenwahrscheinlichkeit für diese Ereignisse $p_{1-(i+s)}$ zu einer myloid-erythroiden Vorläuferzelle zu werden. Ebenso ist die Entscheidung der Vorläuferzellen zur Bildung einer differenzierten Zelle ein stochastisches Ereignis. Abkürzungen: HSZ, hämatopoetische Stammzelle; LVZ, lymphoide Vorläuferzelle; EMVZ, Erythroid-myeloide Vorläuferzelle; TZ, T-Zelle; BZ, B-Zelle; EZ, Erythrozyt; MZ, myeloide Zelle

zellensystems wurde durch zwei verschiedene Modelle beschrieben.

Einerseits wurde eine rein stochastische Determinierung angenommen (Abbildung 1) (Till et al. 1964; Korn et al. 1973; Enver et al. 1998; Socolovsky et al. 1998). Eine Grundlage dafür war die Erkenntnis, dass in HSZ Genloci, die charakteristisch für differenzierte hämatopoetische Zellen sind, geöffnet sind und auf einem niedrigen Niveau transkribiert werden (Hu et al. 1997; Kontaraki et al. 2000). Dies wurde dahingehend interpretiert, dass in Vorläuferzellen ein labiles Gleichgewicht der Transkription zwischen sich gegenseitig ausschließenden Expressionsmustern besteht. Durch die simultane Transkription sind HSZ offen für die Differenzierung zu allen Linien des hämatopoetischen Systems (Cross et al. 1997). Es wurde weiter

angenommen, dass durch stochastische Verschiebungen in diesem Gleichgewicht der Expressionsmuster sich eines gegen die anderen durchsetzt und sich etabliert. In der differenzierenden Zelle führt dies dann zu der exklusiven Expression der linienspezifischen Gene.

Die zweite Theorie zur Differenzierung von Stammzellen geht von einer extrinsischen Regulation der Linienentscheidung in einem Stammzellensystem aus (Abbildung 2). Ursächlich sind

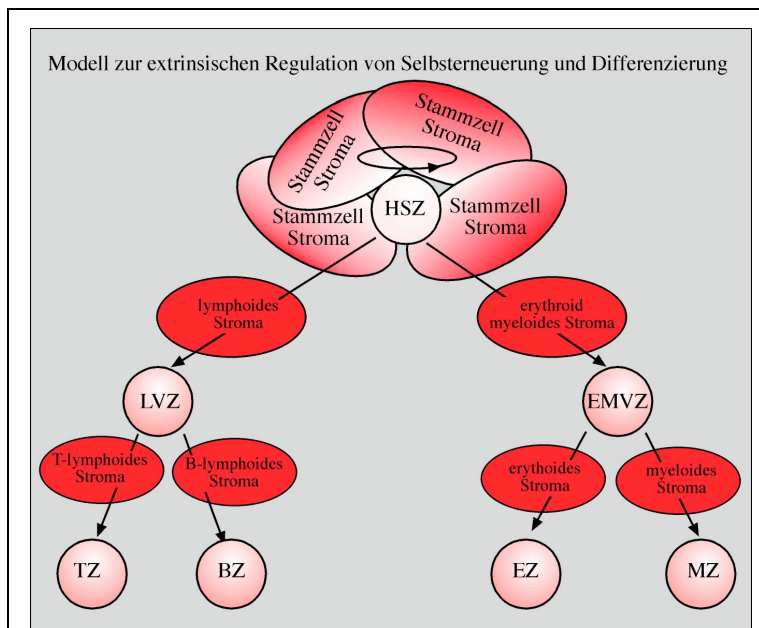


Abbildung 2: Gezeigt ist ein Modell der extrinsischen Regulation in einem Stammzellensystem am Beispiel des hämatopoetischen. Die HSZ wird durch Stromazellen in der sogenannten Stammzellnische als Stammzelle erhalten, Einflüsse des Stroma bestimmen, welche Effektorzellen aus der Stammzelle gebildet werden. Abkürzungen: HSZ, hämatopoetische Stammzelle; LVZ, lymphoide Vorläuferzelle; EMVZ, Erythroid-myeloide Vorläuferzelle; TZ, T-Zelle; BZ, B-Zelle; EZ, Erythrozyt; MZ, myeloide Zelle.

nicht Verschiebungen im Gleichgewicht des Genexpressionsmusters, sondern die Einflüsse des Stroma (Dorshkind 1990; Friedrich et al. 1996). Dabei wird das Stroma durch umgebende Zellen gebildet, die durch die Sekretion löslicher, sowie der Präsentation membranständiger Faktoren und Komponenten das Schicksal der Stamm- und Vorläuferzellen bestimmen (Ohneda et al. 1990; Gunji et al. 1991). Der Erhalt von Stammzellen erfolgt in sogenannten Stammzellnischen, welche Stammzellen als Stammzellen erhalten können, während die Differenzierung zu

Effektorzellen durch andere Stromazellumgebungen reguliert wird (Williams et al. 1992; Wineman et al. 1996; Geiger et al. 1998; Whetton et al. 1999).

Die Hypothese der extrinsischen Regulation von Stammzellen erhält vor dem Hintergrund der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Phänomene der Stammzellplastizität besonderes Gewicht. Es wäre denkbar, dass Plastizität somatischer Stammzellen nur im Kontext von Mikroumgebungen möglich ist, da diese über SSZ gemeinsamen Signaltransduktionswegen die Änderung von Identitäten bewirken können.

4 Fragestellung

SSZ dienen dem Erhalt von Funktionsfähigkeit und Integrität von Organen und Geweben. Dazu wird von den Stammzellen Zellverlust, bedingt durch Trauma oder physiologischen Zellumsatz, ausgeglichen und so die Gewebestase aufrechterhalten. SSZ besitzen die Fähigkeit klonal alle Zellen ihres Stammzellsystems zu bilden. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob das Differenzierungspotenzial von SSZ auf die Bildung von Zellen ihres Stammzellsystems beschränkt ist, oder ob SSZ daneben noch andere Zelltypen bilden können.

Durch Exposition dreier verschiedener SSZ-Typen mit der embryonalen Mikroumgebung der murinen Blastozyste sollte untersucht werden, ob die Mikroumgebung der frühen Embryonalentwicklung SSZ zur Bildung heterologer Zelltypen anregen kann. Durch die Analyse der von den SSZ gebildeten Zelltypen sollte das Differenzierungspotenzial humaner HSZ aus dem Nabelschnurblut, muriner adulter HSZ und muriner fötaler NSZ ermittelt werden.

Das diesen Experimenten zugrunde liegende Ziel war, neue Erkenntnisse über das Entwicklungspotenzial von SSZ zu finden. Ferner sollten die in diesen Studien erhaltenen Ergebnisse helfen einzuschätzen, ob und für welche Art heterologen Zellersatzes sich die untersuchten SSZ-Typen eignen.

5 Ergebnisse

5.1 Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Differenzierungspotenzial dreier somatischer Stammzelltypen, nämlich muriner hämatopoetischer, humaner hämatopoetischer und muriner neuraler Stammzellen durch Blastozysteninjektion untersucht. Die Donoranteile injizierter SSZ in Chimären wurden exemplarisch zu drei Zeitpunkten evaluiert: nach 12- bis 24- stündiger *in vitro* Kultur, nach Retransfer injizierter Blastozysten in Ammen am Tag 12,5 der Schwangerschaft und bei adulten Tieren im Alter von 3-5 Monaten.

Der erste Zeitpunkt wurde gewählt, um zu überprüfen, ob die injizierten Zellen direkt nach der Injektion in der Blastozyste verbleiben. Der zweite Zeitpunkt zur Mitte der Schwangerschaft wurde gewählt, um zu untersuchen, welche Zelltypen durch die Anforderungen, die während der Embryonal- und Fötalentwicklung herrschen, gebildet werden. Die Analyse adulter Tiere sollte Aufschluss darüber geben, zu welchen Geweben und Organen Nachkommen injizierter SSZ auf Dauer beitragen.

Um Ergebnisse aus der Analyse chimärer Tiere eindeutig interpretieren zu können, ist es nötig, eine genau definierte, möglichst homogene Zellpopulation für die Injektion in Blastozysten zu verwenden. Daher wurden SSZ zuerst so aufgereinigt, dass es sich um eine nahezu homogene Zellpopulation handelte.

5.2 Isolation hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark adulter Mäuse

HSZ sind seltene Zellen im adulten Knochenmark und kommen nur mit einer Frequenz von 1-10 Zellen pro 100.000 kernhaltiger Knochenmarkzellen vor (Morrison et al. 1994). Bis heute gibt es keine Möglichkeit, HSZ mittels eines einzigen Kriteriums zu isolieren. Allerdings ist ein, nach den von Spangrude und Okada entwickelten Methoden, modifiziertes Zweischrittverfahren sehr gut geeignet, um HSZ zu isolieren (Spangrude et al. 1988; Okada et al. 1993). Dazu werden Femora und Tibiae präpariert und das Knochenmark aus den Langknochen ausgespült. Zuerst werden all diejenigen Zellen des Knochenmarks depletiert, die Marker spezifisch für reife Zelltypen des hämatopoetischen Systems exprimieren. Im zweiten Schritt werden die so erhaltenen linienmarker - negativen Zellen (LIN⁻ Zellen) mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Tyrosinkinase c-kit und das Oberflächenantigen Sca1 inkubiert. Die so markierten Zellen werden in einem FACSort Gerät aufgetrennt. Die für

beide Oberflächenantigene positiven Zellen stellen HSZ dar und wurden weiter verwendet (Abbildung 3).

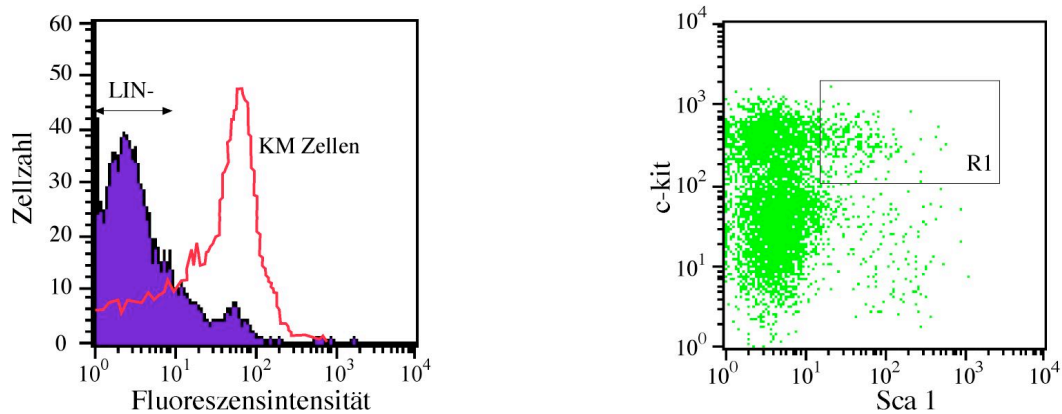


Abbildung 3: Gezeigt sind links ein Histogramm und rechts ein Dot-Blot eines FACSsort Experiments. Knochenmarkszellen wurden mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen Marker reifer Zellen (LIN Cocktail) inkubiert. Im Histogramm ist in rot das Ergebnis der Färbung von Knochenmarkszellen mit dem LIN Cocktail gezeigt. In violett ist die Analyse der LIN⁻ Zellen, gefärbt mit dem LIN Cocktail, abgebildet und der Anteil der Zellen, die für den FACSsort verwendet wurden (LIN⁻). Die LIN⁻ Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen Sca1 (Ordinate) und c-kit (Abszisse) inkubiert und mit einem FACSsort aufgetrennt. Im Dot Blot sind LIN⁻ Zellen nach Expression von c-kit und Sca 1 aufgetrennt. HSZ befinden sich in der Sca1 positiven und c-kit stark positiven Population (R1).

Dass es sich bei einer Zellpopulation um HSZ handelt, kann nur in Retrospektive nach einem funktionellen Test gezeigt werden. Im Fall von HSZ ist der stringenteste funktionelle Test die Repopulation eines zerstörten hämatopoetischen Systems (Kubanek et al. 1970; Jordan et al. 1990; Szilvassy et al. 1993). Dazu wurden weibliche Mäuse mit 12,5 Gray Gammastrahlung aus einer Cäsiumquelle bestrahlt. Dies schädigt das hämatopoetische System der Mäuse soweit, dass sie innerhalb von 14 Tagen an den Folgen der Bestrahlung sterben (Salomon et al. 1990). Den bestrahlten Mäusen wurden limitierende Zellzahlen einer LIN⁻, c-kit⁺, Sca1⁺ Zellpopulation injiziert und nach 12 Wochen wurde der Grad an Chimärismus im hämatopoetischen System der Rezipienten bestimmt (Szilvassy et al. 1990). Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, ist eine LIN⁻, c-kit⁺, Sca1⁺ Zellen ausreichend, um das hämatopoetische System lethal bestrahlter Mäuse zu repopulieren. Dies zeigt, dass sich unter den 20 injizierten Zellen mindestens eine befunden haben muss, die in der Lage war, das hämatopoetische System wieder aufzubauen.

Für die Injektion in murine Blastozysten wurden daher Zellen der LIN⁻, c-kit⁺, Sca1⁺ Zellfraktion verwendet.

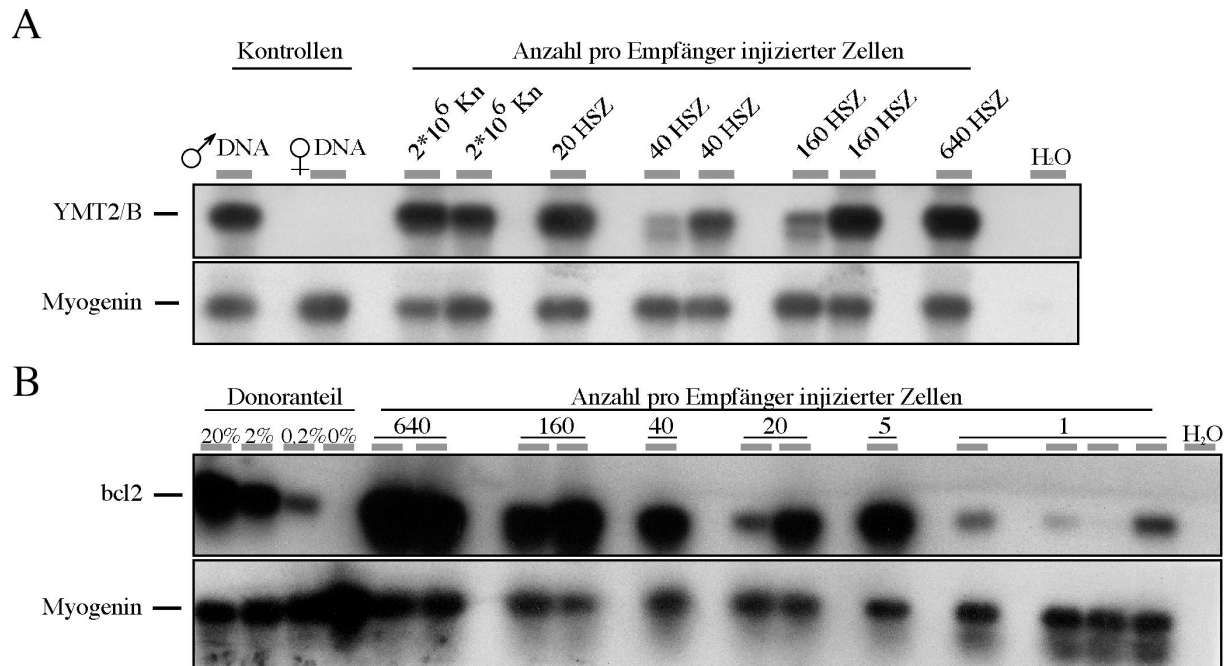


Abbildung 4: Donorspezifische PCR Analyse genomischer DNA aus dem peripheren Blut bestrahlter weiblicher Mäuse, denen limitierende Zellzahlen muriner LIN⁻, c-kit⁺, Sca1⁺ gewonnen aus männlichen bcl2 transgener Spendern transplantiert wurden. Es wurden in A 640, 160, 40, 20, in B zusätzlich 5 und 1 LIN⁻, c-kit⁺, Sca1⁺ Zellen transplantiert. In Rezipienten konnte 3 Monate nach Transplantation im peripheren Blut weiblicher Empfängertiere männliche Zellen detektiert werden (A). In B ist der Nachweis des Bcl2 Transgens in DNA, gewonnen aus dem peripheren Blut von Empfängertieren, gezeigt. Zur Kontrolle der Transplantation wurden 2 Millionen männliche Knochenmarkzellen transplantiert, die ebenso zur Besiedelung des hämatopoetischen Systems der weiblichen Rezipienten führten. Als PCR-Kontrollen wurden für A DNA, gewonnen aus männlichen bzw. weiblichen Tieren (links), und Wasser eingesetzt, für B eine Verdünnung bcl2 transgener DNA in wildtypischer DNA. Zu sehen ist das Autoradiogramm eines PCR-Southern Blots.

5.3 Isolation hämatopoetischer Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut

Ebenso wie für die murinen HSZ gibt es für die humanen HSZ keinen eindeutig definierenden Zelloberflächenmarker. Die Isolation humaner HSZ erfolgt deswegen auch in einer Zweischrittmethod. Heutiger Stand der Forschung ist, dass es sich bei der Fraktion der CD34-positiven und gleichzeitig CD38-negativen Zellen aus humanem Knochenmark und Nabelschnurblut um die Zellpopulation mit der höchsten Frequenz an hämatopoetischen Stammzellen handelt. So konnten CD34⁺/CD38⁻ Zellen nach Transplantation in bestrahlte NOD/SCID Mäuse das hämatopoetische System der Rezipienten dauerhaft repopulieren (Vormoor et al. 1993; Junghahn et al. 1998; Verstegen et al. 1998). Durch die Injektion limitierender Zahlen von CD34⁺/CD38⁻ Zellen in bestrahlte NOD/SCID Mäuse konnte gezeigt werden, dass statistisch eine unter 617 dieser Zellen eine bestrahlte NOD/SCID Maus repopulieren kann (Bhatia et al. 1997).

Im ersten Schritt wurden in einem diskontinuierlichen Ficollgradienten mononukleäre Zellen angereichert, anschließend wurden aus dieser Fraktion die Zellen, die den Oberflächenmarker

CD34 trugen, isoliert. Die Aufreinigung humaner CD34⁺ Zellen aus dem Nabelschnurblut wurde im Rahmen einer Kollaboration im Labor von Dr. Reinhard Henschler am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Deutsches Rotes Kreuz in Frankfurt, durchgeführt. Durch Zugabe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper gegen die Marker CD34 bzw. CD38 wurden am Institut für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg mittels FACSsort die für CD34⁺ angereicherten Zellen in CD34⁺/CD38⁻ und CD34⁺/CD38⁺ Populationen aufgetrennt (Abbildung 5). Die so isolierten CD34⁺/CD38⁻ Zellen aus humanem Nabelschnurblut wurden für die Injektion in murine Blastozysten verwendet.

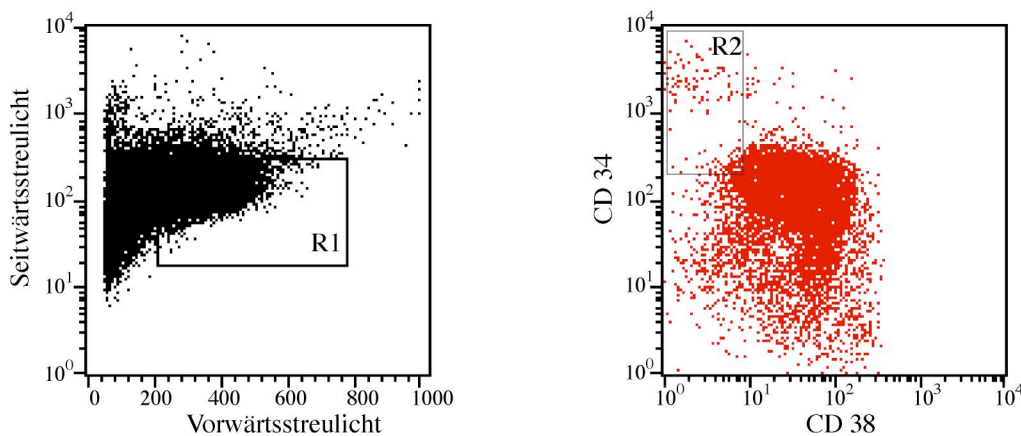


Abbildung 5: FACSsort humaner HSZ aus Nabelschnurblutzellen aufgrund ihrer CD34 und CD38 Expression. Im linken Dot Blot sind mononukleäre Zellen des Nabelschnurblutes im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht des FACSsort aufgetrennt. Im R1 befinden sich die nach morphologischen Kriterien lebenden Zellen. Im rechten Dot Blot sind die lebenden Zellen aus R1 aufgrund ihrer Expression von CD34 und CD38 aufgetrennt. Dazu wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD34 und CD38 gerichteten Antikörpern markiert. R2 im rechten Dot Blot umschließt Zellen mit dem CD34⁺/CD38⁻ Phänotyp, diese Population ist hoch angereichert für humane HSZ Aktivität (Bhatia et al. 1997; Conneally et al. 1997).

5.4 Isolation neuraler Stammzellen aus dem Vorderhirn embryonaler Mäuse

NSZ können aus verschiedenen Geweben des adulten Gehirns isoliert werden, darunter sind der Dentate Gyrus des Hippocampus, die subventrikuläre Zone und der Bulbus olfactorius (Reynolds et al. 1992; Morshead et al. 1994; Weiss et al. 1996). NSZ können auch aus den Cortices fötaler Mäuse gewonnen werden. Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit NSZ wurden mit NSZ, gewonnen aus murinem fötalen Hirn durchgeführt (McKay 1997).

Murine NSZ wurden von Frau Dr. Kirchhof gewonnen, kultiviert und zur Verfügung gestellt. Für die Isolation der NSZ wurden Mäuse verpaart, am Tag 14 der Schwangerschaft wurde das Muttertier getötet, die Embryonen entnommen, das Vorderhirn präpariert und durch Trituration und Trypsinverdau in eine Einzelzellsuspension überführt. Diese Zellen wurden in Ge-

genwart von bFGF und EGF kultiviert. Dabei bilden NSZ kleine, nicht adhärierende Kügelchen, so genannte Neurosphären (Reynolds et al. 1992). Neurosphären bestehen aus neuronalen Vorläufer- und Stammzellen (Weiss et al. 1996). Nach Vereinzelung einer Neurosphäre können die Zellen entweder differenzieren oder klonal neue Neurosphären bilden und so ihren Stammzellcharakter zeigen. Limitierende Verdünnungsreihen zeigten, dass etwa 3% der aus Neurosphären gewonnenen Einzelzellen neue Neurosphären bilden können und somit Stammzellcharakter besitzen. Vereinzelt man eine solche klonale Neurosphäre und induziert Differenzierung, so entstehen sowohl Neurone, Oligodendrozyten als auch Astrozyten. So können die beiden definierenden Charakteristika von Stammzellen für NSZ (vgl. Kapitel 3.2) nachgewiesen werden. Für die Injektion in Blastozysten, wurden Neurosphären vereinzelt und am folgenden Tag diejenigen Zellen verwandt, die bis dann zu kleinen Mikrosphären herangewachsen waren. Somit wurden nur Zellen mit dem Potenzial zur Bildung einer neuen Neurosphäre, und damit vermehrt NSZ, injiziert.

5.5 Injektion von SSZ in murine Blastozysten

Eine wichtige Frage bezüglich der Biologie somatischer Stammzellen ist, in wie weit sich somatische Stammzelltypen gleichen bzw. voneinander verschieden sind. Außerdem sind ihre zellbiologischen Charakteristika als auch ihr *in vivo* Differenzierungspotenzial von zentralem Interesse. NSZ weisen ebenso wie HSZ Stammzellcharakter auf, das heißt sie sind beide in der Lage, zu den Zellen ihres Stammzellkompartiments zu differenzieren und sich selbst zu erneuern. Während NSZ in Kultur vermehrt werden können, ist dies trotz intensiver Forschung bis heute bei HSZ nicht möglich (Weiss et al. 1996; Miller et al. 1997).

Genexpressionsanalysen von HSZ und Knochenmarkzellen sowie NSZ und differenzierten neuronalen Zellen ergaben, dass große Unterschiede zwischen den differenzierten Zellen der beiden Stammzellsysteme existieren (Kirsch, Müller und Zenke pers. Mitteilung) (Phillips et al. 2000; Geschwind et al. 2001). Auf Ebene der Stammzellen wurden aber eine Reihe von Genen gefunden, die in HSZ und NSZ exprimiert werden (Terskikh et al. 2001). Dieser Überlapp im Genexpressionsmuster der beiden SSZ könnte die molekulare Ursache für Ergebnisse sein, die zeigen, dass sowohl neurale Zellen aus HSZ und hämatopoetische Zellen aus NSZ hervorgehen können (Bjornson et al. 1999; Mezey et al. 2000). Durch den Vergleich des *in vivo* Differenzierungspotenzials von HSZ und NSZ nach Injektion in murine Blastozysten können Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden SSZ in demselben experimentellen System untersucht werden.

5.6 Injektion muriner HSZ in murine Blastozysten

Blastozysten wurden aus zeitlich angepaarten Tieren am Tag 3,5 der Schwangerschaft (E3,5) gewonnen. In die Blastozysten wurden mittels Mikroinjektion je nach Größe des Blastozoels 30-50 HSZ injiziert.

5.6.1 Distribution injizierter LIN^{-} Zellen in Blastozysten nach 12 Std. *in vitro* Kultur

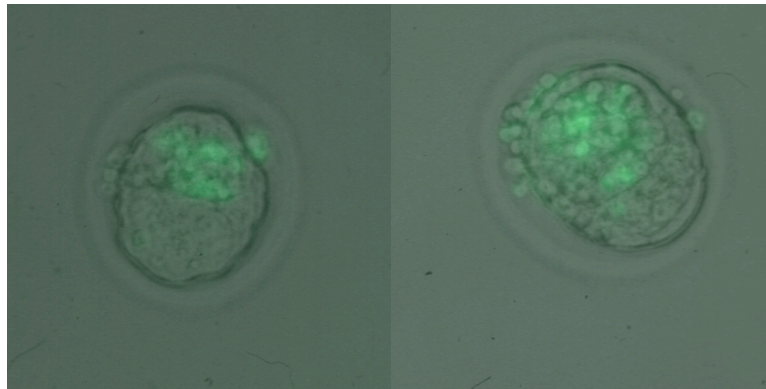


Abbildung 6: Aufnahmen zweier verschiedener Blastozysten nach Injektion eGFP transgener LIN^{-} Knochenmarkzellen. Abgebildet ist die Überlagerung des unter Fluoreszenzbedingungen aufgenommenen Bildes (grüne Fluoreszenz) mit einem unter Weißlicht aufgenommenen (400 fache Vergrößerung).

In Abbildung 6 sind zwei Blastozysten zu sehen, in die LIN^{-} Zellen injiziert wurden. Die LIN^{-} Zellen wurden aus dem Knochenmark eGFP transgener Mäuse, die das eGFP Gen ubiquitär exprimieren, gewonnen (Okabe et al. 1997). Dabei ist zu sehen, dass sich die meisten der injizierten Zellen im Blastozoel befinden, einige wenige Zellen jedoch aus dem Blastozoel herausgedrückt wurden und sich zwischen dem Trophektoderm und der Zona Pellucida befinden. Außerdem wird deutlich, dass trotz ubiquitärer eGFP Proteinexpression nicht alle Zellen fluoreszieren. Dies wurde auch von Dr. H. Geiger und Dr. G. de Haan beobachtet (pers. Kommunikation).

5.6.2 Analyse des Differenzierungspotenzials von HSZ in 12,5 Tage alten Embryonen

Da bis heute keine Möglichkeit existiert, Säugerembryonen *in vitro* ab dem Blastozystenstadium sich weiter entwickeln zu lassen, wurden die injizierten Blastozysten in scheinchwangere Ammen transferiert (Hsu 1979). Am Tag E12,5 wurde die Anzahl der sich entwickelnden Embryonen bestimmt. Die Effektivität der Injektion bezüglich der wachsenden Embryo-

nen und geborenen Mäuse im Verhältnis zur Anzahl transferierter Blastozysten ist in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Anteil wachsender Embryonen und geborener Tiere an transferierten Blastozysten

<u>Injizierte Blastozysten</u>	<u>Embryonen (E12.5)</u>	<u>Anteil</u>
527	187	35%
<u>Injizierte Blastozysten</u>	<u>Adulte (3-5 Monate)</u>	<u>Anteil</u>
236	86	36%

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich wird, ist der Anteil der Embryonen am Tag E12,5 in etwa so hoch wie der Anteil adulter Tiere, die sich aus injizierten Blastozysten entwickelten.

5.6.3 Analyse der Donoranteile in Embryonen nach Injektion wildtypischer HSZ

Um zu untersuchen, welche Gewebe die HSZ und ihre Nachkommen in dem sich entwickelnden Embryo besiedeln, wurden am Tag E12,5 die Ammen getötet, die Embryonen entnommen und der Dottersack, die fötale Leber, der Kopf, das Hinterbein und das fötale Blut als individuelle Gewebe isoliert. Genomische DNA der Gewebe weiblicher Embryonen wurden mittels einer PCR, die spezifisch für eine repetitive Sequenz auf dem Y-Chromosom ist (YMT2/B PCR), auf Donoranteile hin untersucht.

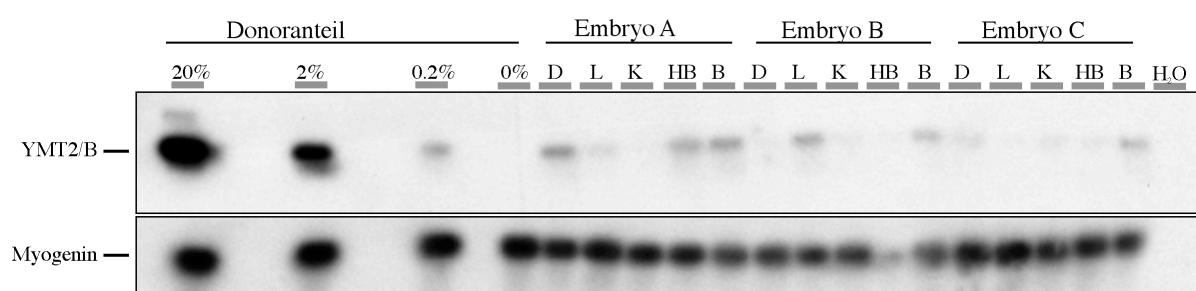


Abbildung 7: Abgebildet ist die gewebespezifische Analyse auf Donorkontribution am Tag E12,5 nach Injektion wildtypischer männlicher HSZ in murine Blastozysten. Genomische DNA, gewonnen aus Geweben weiblicher Embryonen wurde mittels YMT2/B PCR auf Donoranteile hin untersucht. Im linken Teil der Abbildung ist eine Verdünnungsreihe männlicher DNA in weiblicher DNA zur Quantifizierung der Signalstärken aufgetragen. Als Negativkontrolle diente weibliche DNA und eine Wasserkontrolle. Abkürzungen: D, Dottersack; L, fötale Leber; K, Kopf; HB, Hinterbein; B, fötales Blut. Als Ladekontrolle wurde eine PCR für das als Einzelkopie im murinen Genom vorliegende Myogenin Gen durchgeführt. Zu sehen ist ein Autoradiogramm eines PCR Southernblots.

Wie in Abbildung 7 und Tabelle 2 zu sehen ist, waren Nachkommen injizierter HSZ präferenziell in den hämatopoetischen Geweben Dottersack, fötale Leber und fötales Blut zu finden (Embryo A und Embryo B) und zu einem geringeren Anteil in nicht hämatopoetischen Geweben wie Kopf und Hinterbein (z.B. Embryo A und C). Allerdings war der Anteil der von den injizierten Zellen abstammenden Nachkommen in den Geweben mit etwa 0,2% am Gewebe gering.

5.6.4 Injektion muriner bcl2 transgener HSZ

Vergleichend zu den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Versuchen wurden zudem HSZ, isoliert aus dem Knochenmark dieser Mauslinie, in murine Blastozysten injiziert. Am Tag E12,5 wurde der Donorchimärismus bestimmt (Abbildung 8).

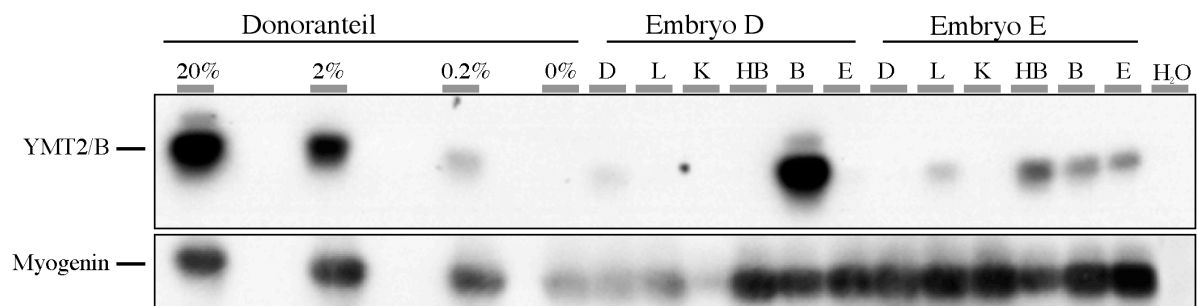


Abbildung 8: Abgebildet ist die gewebespezifische Analyse männlicher Donoranteile im E12,5 Embryo nach Injektion bcl2 transgener männlicher HSZ in murine Blastozysten. Genomische DNA, gewonnen aus Geweben weiblicher Embryonen, wurde mittels YMT2/B PCR auf Donoranteile hin untersucht. Im linken Teil der Abbildung ist zur Quantifizierung der Signalstärken eine Verdünnungsreihe aus DNA, gewonnen aus männlichen verdünnt in DNA gewonnen aus weiblichen Tieren, aufgetragen. Abkürzungen: D, Dottersack; L, fötale Leber; K, Kopf; HB, Hinterbein; B, fötales Blut. Als Negativkontrolle diente eine Wasserprobe. Als Ladekontrolle wurde eine PCR für das Myogenin Gen durchgeführt. Zu sehen ist ein Autoradiogramm eines PCR Southernblots.

In Abbildung 8 und Tabelle 2 ist zu sehen, dass HSZ, die ein bcl2 Transgen exprimieren, ebenso wie wildtypische HSZ vor allem die hämatopoetischen Gewebe sich entwickelnder Embryonen besiedeln (Embryo D, Dottersack und fötales Blut). Es werden aber nicht ausschließlich hämatopoetische Gewebe besiedelt, sondern ebenso wie bei wildtypischen HSZ zu einem geringeren Maß auch nicht hämatopoetische Gewebe wie z.B. das Hinterbein bei Embryo E. Der Anteil an Donorzellen in den Geweben ließ sich durch die Verwendung bcl2 transgener HSZ bis maximal um den Faktor 10 steigern (fötales Blut von Embryo D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Injektion muriner HSZ in Blastozysten in Embryonen zur Mitte der Schwangerschaft vor allem zu einer Besiedelung der hämatopoeti-

schen Gewebe führt, die die häufigste und höchste Rate an Nachkommen der injizierten HSZ aufweisen. Nicht hämatopoetische Gewebe weisen ebenfalls Donorchimärismus auf, der aber seltener ist und geringere Anteile zeigt. Zudem führt die Verwendung von HSZ, die als Transgen das *bcl2* Gen tragen und deren HSZ deswegen resistenter gegenüber Apoptose sind, zu einer Verstärkung in Häufigkeit und Grad des Chimärismus in den hämatopoetischen Geweben. Unbeeinflusst von der Transgenexpression bleibt die Häufigkeit von Nachkommen injizierter HSZ in nicht hämatopoetischen Geweben.

Tabelle 2: Häufigkeit der Kontribution zu embryonalen Geweben nach Injektion wildtypischer und *bcl2* transgener HSZ

		<u>Analyisierte Gewebe (positiv/gesamt)</u>						<u>mind. ein</u>
		D	L	K	HB	B	E	<u>Gewebe positiv</u>
wildtypische HSZ	E11,5	7/8	8/8	4/17	NA	5/10	NA	} 84%
	E12,5	3/9	2/9	2/9	NA	3/5	NA	
	E13,5	6/7	2/7	0/7	NA	2/3	NA	
<i>bcl2</i> -transgene HSZ	E12,5	10/14	9/14	0/12	9/14	11/12	7/14	93%
	E14,5	7/9	6/9	2/9	6/9	6/9	2/9	89%

Gezeigt ist die Anzahl positiver Gewebe gegenüber der Gesamtanzahl aller untersuchten Geweben in E12,5 Embryonen nach Injektion wildtypischer bzw. *bcl2* transgener HSZ in murine Blastozysten. Abkürzungen: D, Dottersack; L, fötale Leber; K, Kopf; HB, Hinterbein; B, fötales Blut; E, restlicher Embryo; NA, nicht analysiert.

5.6.5 Analyse der Donoranteile in adulten Tieren

Bei der Embryonalentwicklung handelt es sich um einen sehr dynamischen Prozess, der die Anlagen der Organsysteme des adulten Körpers bildet, aber auch eigene, nur während der Embryonalentwicklung benötigten Strukturen, wie z.B. den Dottersack und die Plazenta, hervorbringt. Die Reifung einiger Organe geschieht erst postnatal, wie die der Lunge, der Leber, und der Geschlechtsorgane. Um festzustellen, in welche Gewebe sich die Nachkommen der injizierten Zellen permanent integrieren können, wurden adulte Tiere, die aus Blastozysten, in die entweder wildtypische oder *bcl2* transgene HSZ injiziert worden waren, auf Nachkommen der injizierten Stammzellen hin untersucht. Um ein möglichst detailliertes Bild der Verteilung der Zellen auf die Organe des adulten Tieres zu erhalten, wurden insgesamt 18 Gewebe analysiert. Dabei handelte es sich um: Gehirn aufgeteilt in Cortex, Cerebellum, Rest und Hippocampus sowie die Gewebe Rückenmark, Nervus Ischiadicus, Leber, Lunge, Dünndarm, Herz, Muskel, Gonaden, Milz, Thymus, Knochenmark, peripheres Blut, Haut und Niere.

Abbildung 9 und Tabelle 3 zeigen, dass es möglich ist, chimäre adulte Tiere durch Injektion von HSZ in Blastozysten zu erzeugen. In 26 von 47 untersuchten Tieren konnten in mindestens einem Gewebe Donorzellen nachgewiesen werden. Dabei wiesen Tiere, die aus der Injektion *bcl2* transgener HSZ hervorgegangen waren, einen höheren Grad an Donorchimärismus auf als Tiere, die aus der Injektion wildtypischer HSZ hervorgegangen waren (A, wildtypische HSZ; B, *bcl2* HSZ). Die Häufigkeit chimärer Tiere gegenüber nicht chimären Tieren war allerdings kaum erhöht (50% gegenüber 57%). In 15 von 26 chimären Mäusen war mindestens ein hämatopoetisches Gewebe positiv, davon waren Thymus (7/15), peripheres Blut (6/15) und Knochenmark (5/15) die am häufigsten besiedelten hämatopoetischen Gewebe. Besonders auffällig ist die Häufigkeit und auch der Anteil von Donorzellen in manchen neuronalen Geweben, vor allem Rückenmark und N. Ischiadicus. Nachkommen injizierter HSZ konnten in diesen Geweben genauso häufig und überraschenderweise auch in ebenso großem Maße nachgewiesen werden wie in hämatopoetischen Geweben. Nicht blutbildende und nicht neurale Gewebe wiesen zum Teil auch Nachkommen injizierter HSZ auf. Der Grad des Chimärismus in diesen Geweben z.B. in Leber, Lunge, Herz und Ovar war allerdings viel geringer und zumeist an der Detektionsgrenze (Abbildung 9 und Tabelle 3).

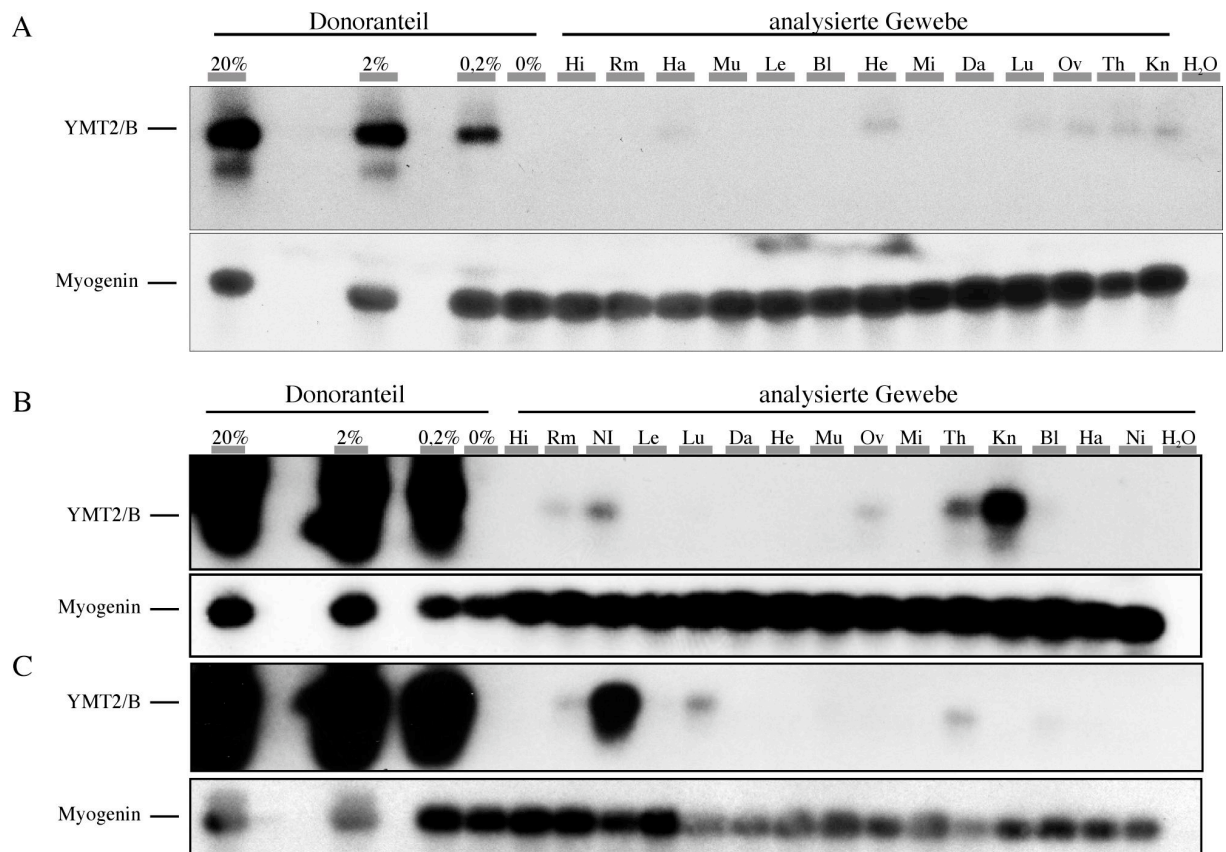


Abbildung 9: Abgebildet sind Autoradiogramme von PCR Southern Blots der Analyse adulter weiblicher chimärer Tiere, die aus der Injektion von männlichen wildtypischen HSZ (A) und männlichen *bcl2* transgenen HSZ (B und C) in Blastozysten hervorgegangen sind. Im Alter von 3-5 Monaten wurden die Tiere getötet, individuelle Gewebe wurden präpariert, genomische DNA wurde extrahiert und mittels der YMT2/B PCR auf den Anteil männlicher Zellen hin untersucht. Im linken Teil der Abbildungen ist eine Verdünnungsreihe männlicher DNA in weiblicher DNA aufgetragen. Als Negativkontrolle diente weibliche DNA und eine Wasserkontrolle. Als Ladekontrolle wurde eine PCR für das als Einzelkopie vorliegende Myogenin Gen durchgeführt. Abkürzungen Hi, Gehirn; Rm, Rückenmark; NI, Nervus Ischiadicus; Le, Leber; Lu, Lunge; Da, Darm; He, Herz; Mu, Muskel, Ov, Ovar; Mi, Milz; Th, Thymus; Kn, Knochenmark; Bl, Blut; Ha, Haut; Ni, Niere.

Tabelle 3: Häufigkeit der Kontribution in adulten Geweben nach Injektion wildtypischer bzw. *bcl2* transgener HSZ

Injizierter Zelltyp	Analysierte Gewebe (positiv/gesamt)																	
	Co	Kl	RH	Hi	Rm	NI	Le	Lu	Da	He	Mu	Ov	Mi	Th	Kn	Bl	Ha	Ni
wildtypische HSZ	0/10	0/10	0/10	2/10	2/10	3/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10
<i>bcl2</i> tg HSZ	0/8	0/8	1/37	4/8	7/37	6/37	7/37	6/37	3/37	5/37	2/37	5/37	3/37	7/37	5/37	6/37	2/37	1/37

Gezeigt ist die Anzahl positiver Gewebe gegenüber der Anzahl aller untersuchter adulter Gewebe. Sowohl adulte Mäuse, die aus der Injektion wildtypischer als auch die Ergebnisse der Analyse adulter Mäuse aus Injektionen *bcl2* transgener HSZ sind gezeigt. Abkürzungen: Co, Cortex; Kl, Kleinhirn, RH, restliches Hirn; Hi, Gehirn; Rm, Rückenmark; NI, Nervus Ischiadicus; Le, Leber; Lu, Lunge; Da, Darm; He, Herz; Mu, Muskel, Ov, Ovar; Mi, Milz; Th, Thymus; Kn, Knochenmark; Bl, Blut; Ha, Haut; Ni, Niere.

5.6.6 Aufschlüsselung der Besiedelung durch Nachkommen injizierter HSZ in adulten Tieren nach Gewebegruppen

Ziel dieser Arbeit war es das Differenzierungspotenzial verschiedener SSZ vergleichend zu untersuchen. Eine wichtige Frage ist daher, welche Gewebe und Organe durch die Nachkommen injizierter Zellen besiedelt werden. In Tabelle 4 werden die Ergebnisse der Analysen adulter Mäuse zusammengefasst. Dabei wurde die untersuchten Tiere entsprechend, des bei ihnen in ihren neuralen, hämatopoetischen oder anderen Organ gemessenen Chimärismus, unterteilt. Zu sehen ist, dass Nachkommen injizierter HSZ in etwa gleicher Häufigkeit in neuralen wie hämatopoetischen Geweben detektiert wurden, in weder hämatopoetischen noch neuralen Organen weniger häufig gefunden wurden .

Tabelle 4: Häufigkeit der Nachkommen wildtypischer und bcl2 transgener HSZ in Gewebegruppen adulter Mäuse

	N	N/n.H.	N/H	H	H/n.N.	n.N./n.H.	neg. Tiere
wildtypische HSZ	4/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/10 (%50%)
bcl2 transgene HSZ	3/37	2/37	8/37	2/37	4/37	2/37	16/37 (43%)

Gezeigt ist die Anzahl der Mäuse, die in einer oder einer Kombination zweier Gewebegruppen Nachkommen injizierter HSZ aufwiesen. Keine Doppelnennungen. Abkürzungen: N: neurale Gewebe: Cortex, Kleinhirn, restliches Hirn, Hippocampus, Rückenmark, N. Ischiadicus; H: hämatopoetische Gewebe: Milz, Thymus, Knochenmark, Blut; n.N./n.H.: Leber, Lunge, Darm, Herz, Muskel, Gonaden, Haut, Niere.

5.6.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Injektion muriner HSZ in Blastozysten

Nach Injektion hoch aufgereinigter HSZ in Blastozysten und deren Retransfer in schein-schwangere Mäuse entwickeln sich etwa 35% der injizierten Blastozysten zu E12,5 Embryonen. Sowohl wildtypische als auch bcl2 transgene HSZ besiedeln bis zu diesem Zeitpunkt präferentiell die hämatopoetischen Organe des Embryos, wobei bcl2 transgene HSZ in diesen Geweben zu einem höheren Anteil an Nachkommen injizierter Zellen führen.

Die Analyse adulter Tiere ergab, dass sich ebenfalls chimäre adulte Tiere entwickeln, sowohl mit wildtypischen als auch mit bcl2 transgenen HSZ. Unterschiede zwischen den beiden verwendeten HSZ bestehen vor allem im Grad des Chimärismus in adulten Tieren. Allerdings konnten nicht genügend adulte Tiere, die aus Injektionen von wildtypischen HSZ entstanden waren, analysiert werden, um festzustellen ob die Häufung in neuralen Geweben bei den un-

tersuchten Tieren Zufall ist oder ob es sich dabei um eine biologische Aktivität der verwendeten Zellen handelt.

In 15 der 26 chimären Tieren konnten Donorzellen in hämatopoetischen Organen nachgewiesen werden. Dagegen wurde in 11/26 Tieren ausschließlich Kontribution zu nicht hämatopoetischen Organen detektiert.

5.7 Injektion humaner HSZ in murine Blastozysten

Gemäß den Ergebnisse, die aus der Analyse der Injektionen muriner HSZ gewonnen wurden, bilden murine HSZ nach Injektion in Blastozysten chimäre Tiere, tragen embryonal vor allem zur Hämatopoese bei und können in adulten Tieren neben hämatopoetischen Geweben auch nicht hämatopoetische Gewebe besiedeln. Wenngleich die zelluläre Identität der Nachkommen in nicht hämatopoetischen Organen, wie z.B. dem Muskel oder dem N. Ischiadicus nicht eindeutig festgestellt werden konnte, so deutet die Existenz von Donorzellen in neuralen Geweben bei gleichzeitigem Fehlen einer Kontribution zu hämatopoetischen Organen auf eine nicht hämatopoetische Zellidentität der nachgewiesenen Zelle hin.

Vom klinischen Standpunkt aus gesehen sind HSZ die am leichtesten zu gewinnenden somatischen Stammzellen, über die auch am meisten bekannt ist. Wünschenswert wäre ein Gewebeersatz durch HSZ auch für nicht hämatopoetische Gewebe, wie z.B. dem Rückgrat. Dazu ist es nötig zu klären, ob humane HSZ zu nicht hämatopoetischen Zellen differenzieren können. Daher ist von großem Interesse, ob die Ergebnisse, die im Mausmodell mit murinen HSZ gewonnen werden konnten, auch für humane HSZ bestätigt werden können. Um dies zu überprüfen wurden analog zu den Versuchen mit murinen HSZ auch Experimente mit humanen HSZ durchgeführt.

Die im Kapitel 5.7.2 beschriebenen Experimente wurden von mir in meiner Diplomarbeit angefertigt und dort beschrieben (Harder 1999). Sie sind, um die Analyse humaner HSZ vollständig darstellen zu können, in dieser Arbeit aufgenommen worden (Harder et al. 2002) .

5.7.1 Distribution humaner HSZ in murinen Blastozysten 24 Std. nach Injektion in das Blastozoel

Um zu untersuchen, ob humane HSZ im Blastozoel muriner Blastozysten präferentiell an die Innere Zellmasse oder das Trophektoderm adhären, wurden humane HSZ in murine Blastozysten injiziert und 24 Std. *in vitro* inkubiert. Anschließend wurden die in Blastozysten vorhandenen humanen Zellen mit einer human spezifischen Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

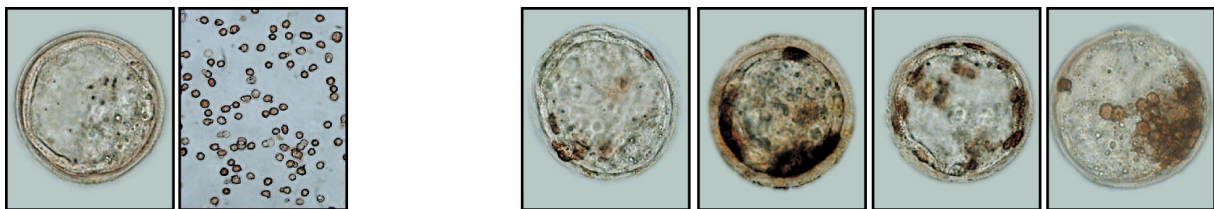


Abbildung 10: *In situ* Färbung humaner HSZ in murinen Blastozysten. Humane HSZ wurden in murine Blastozysten injiziert und anschließend die Blastozysten für 24 Std. *in vitro* inkubiert. Derart inkubierte Blastozysten wurden mit einem gegen alle humane MHC Klasse I Moleküle gerichteten murinen monoklonalen Antikörper inkubiert. Der gebundene primäre Antikörper wurde durch einen sekundären, die Meerrettichperoxidase tragenden polyklonalen Ziege anti-Maus Antikörper in Verbindung mit einem Substrat der Peroxidase sichtbar gemacht. Links ist eine nicht injizierte Mausblastozyste abgebildet, daneben sind 24 Std. kultivierte humane HSZ als Kontrolle mitgefärbt worden. In vier Blastozysten rechts waren humane HSZ injiziert worden. Abgebildet sind Aufnahmen unter Weißlicht bei 100 facher Vergrößerung.

Aus den Färbungen in Abbildung 10 ist ersichtlich, dass humane Zellen 24 Std. nach der Injektion sowohl in direktem Kontakt mit dem Trophektoderm, das prospektiv die Plazenta sowie Teile des Dottersacks aufbauen wird, als auch mit der inneren Zellmasse, die später in der Entwicklung den Embryo selbst hervorbringen wird, steht. Anscheinend gibt es keine Präferenz für eines der beiden frühen embryonalen Gewebe.

5.7.2 Analyse der Donorkontribution in Embryonen nach Blastozysteninjektion humaner Zellen

In vier unabhängigen Experimenten wurden insgesamt 98 Blastozysten injiziert, aus denen sich 66 Embryonen bis E12,5 entwickelten. Der Anteil humaner Zellen in Geweben dieser Tiere wurde mittels einer semiquantitativen, für den Zentromerbereich des humanen Chromosom 17 spezifischen PCR (17 \square mod PCR) bestimmt. Organe und Gewebe von 57 dieser Embryonen im Alter von E8,5 (14 Embryonen), E11,5 (20 Embryonen) und E16,5 (23 Embryo-

nen) wurden isoliert, genomische DNA wurde eluiert und mithilfe der 17 α mod PCR untersucht.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch, dass humane Zellen präferentiell in den hämatopoetischen Organen der Embryonen zu finden sind. So wurden am Tag E8,5 in zwei der 14 untersuchten Embryonen humane Zellen im Dottersack und im eigentlichen Embryo nachgewiesen. In Embryonen, die am Tag E11,5 isoliert wurden, wurden bei acht von 20 im fötalen Blut, bei drei von 20 im Dottersack und bei zwei von 20 in der fötalen Leber und der Plazenta humane Zellen nachgewiesen, während im Kopf nur bei einem Embryo humane Zellen gefunden werden konnten. Am Tag E16,5 konnten bei fünf von 23 im fötalen Blut und bei zwei von 23 im Thymus Donorzellen detektiert werden. Der Anteil humaner Zellen konnte anhand der Verdünnungsreihe auf 5-20 humane Zellen pro 100.000 muriner Zellen abgeschätzt werden.

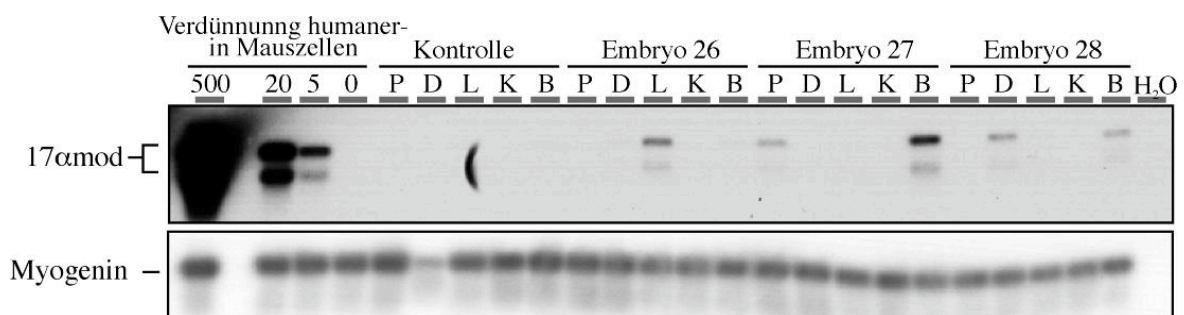


Abbildung 11: Analyse der Gewebeverteilung humaner Zellen in E12,5 Mausembryonen nach Injektion von CD34⁺/CD38⁻ HSZ in murine Blastozysten. Sich aus injizierten Blastozysten entwickelnde Embryonen wurden am Tag E12,5 präpariert und individuelle Gewebe wurden isoliert, aus denen genomische DNA eluiert wurde. Die DNA wurde mittels der human spezifischen 17 α mod PCR auf humane Donoranteile untersucht. Abkürzungen: P, Plazenta; D, Dottersack; L, fötale Leber; K, Kopf; B, fötales Blut. Zur Quantifizierung der Signalstärken wurde im linken Teil eine Verdünnung humaner Zellen in Mauszellen 500, 20, 5 und 0 humanen Zellen in 100.000 Mausmilzzellen der gleichen PCR unterzogen. Zusätzlich wurde eine Myogenin spezifische PCR durchgeführt. Abgebildet sind Autoradiogramme von PCR Southern Blots (Harder 1999; Harder et al. 2002).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass es möglich ist chimäre murine Embryonen durch Injektion humaner HSZ zu erzeugen, wobei der Anteil humaner Zellen in murinen Geweben im Gegensatz zur Injektion wildtypischer, muriner HSZ um den Faktor 100 niedriger ist. Außerdem zeigen die Nachkommen der in die Blastozysten transplantierten humanen HSZ eine deutliche Präferenz für die murinen hämatopoetischen Gewebe.

5.7.3 Humane Vorläuferzellen in murinen Embryonen nach Blastozysteninjektion

Die Daten, die durch die Analyse von Geweben aus Embryonen nach Injektionen von CD34⁺/CD38⁻ Nabelschnurblutzellen erhalten worden waren, deuten darauf hin, dass nach Injektion ein Großteil der Zellen abstirbt. Die verbleibenden humanen Zellen sind jedoch in der Lage in der murinen Umgebung zu proliferieren.

Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse, die durch Abschätzen der Anzahl humaner Zellen mittels semiquantitativer PCR erhalten worden waren, sich durch funktionelle Tests bestätigen lassen, wurden die hämatopoetischen Organe chimärer Embryonen auf klonogene hämatopoetische Vorläufer untersucht. Dazu wurden humane HSZ in murine Blastozysten injiziert. Aus den sich entwickelnden Embryonen wurden am Tag E12,5 die blutbildenden Organe Dottersack, fötale Leber und fötales Blut isoliert. Durch enzymatischen Verdau wurden von elf Embryonen die Dottersäcke und durch Trituration die fötalen Lebern in eine Einzelzellsuspension überführt. Zellen aus allen drei Geweben wurden für jeden Embryo separat in Methylzellulose mit rekombinanten humanspezifischen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren ausplattiert. Nach zehn Tagen *in vitro* Kultur wurden die Kolonien gezählt, individuelle Kolonien fotografiert und anschließend zur Gewinnung genomischer DNA aus der Methylzellulose entnommen. Insgesamt wurden 93 Kolonien auf diese Weise auf ihre Spezieszugehörigkeit untersucht. Acht Kolonien waren humanen Ursprungs (Abbildung 12). Vier der acht humanen Kolonien wuchsen aus Zellen der fötalen Leber, und vier aus Zellen des fötalen Blutes. Die Zellen, die aus den Dottersäcken gewonnen worden waren, ergaben keine humanen Kolonien. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass humane HSZ trotz der xenogenen Umgebung in murinen Embryonen überleben und proliferieren können. Zusätzlich zeigt dies, dass zur Mitte der Schwangerschaft in der fötalen Leber und dem fötalen Blut humane hämatopoetische Vorläufer vorhanden sind.

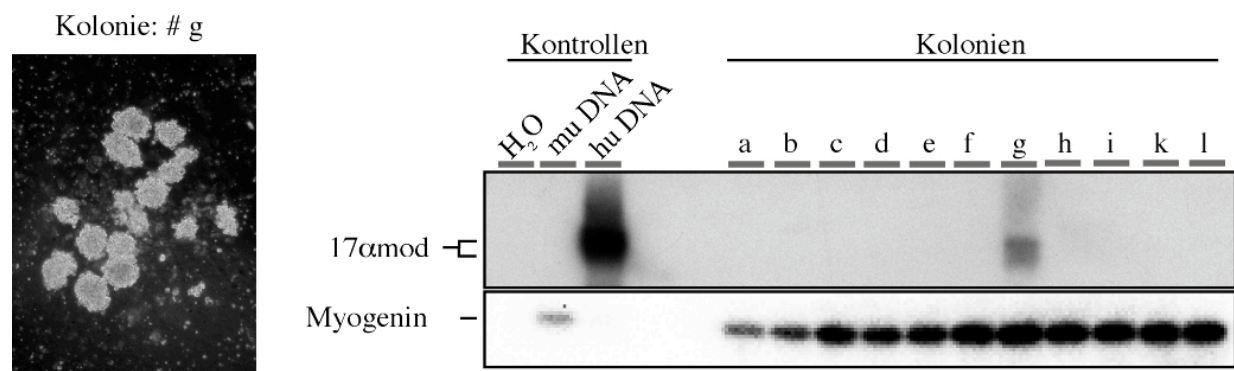


Abbildung 12: Identifizierung humaner hämatopoetischer Vorläufer in E12,5 murinen Geweben nach Injektion humaner HSZ in murine Blastozysten. Im linken Teil der Abbildung ist ein Foto einer typischen in Methylzellulose wachsenden Kolonie nach zehn Tagen *in vitro* Kultur gezeigt (25 fache Vergrößerung). Im rechten Teil der Abbildung ist ein Autoradiogramm eines Southern Blots der speziesspezifischen Identität derselben Kolonien mittels human (hu) spezifischer 17αmod PCR gezeigt. Als Ladekontrolle wurde eine murine (mu) Myogenin PCR durchgeführt. Als Negativkontrolle und wurde eine PCR Reaktion ohne DNA (H₂O), eine mit muriner DNA (mu DNA) und als Positivkontrolle eine mit humaner DNA (hu DNA) durchgeführt.

5.7.4 Bestimmung der Genexpression humaner Zellen in murinen hämatopoetischen Organen nach Injektion humaner HSZ in murine Blastozysten

Um zu bestimmen, ob humane Zellen durch die murine Mikroumgebung zur Differenzierung angeregt werden können, wurde die Expression verschiedener linienspezifischer Gene untersucht. Dabei wurde als Indikator für eine myeloische Differenzierung zu Makrophagen oder Granulozyten die Transkription des humanen Lysozyms gewählt, als Indikator für eine erythroide Differenzierung die Expression der humanen β -Globin Gene β , γ und ϵ .

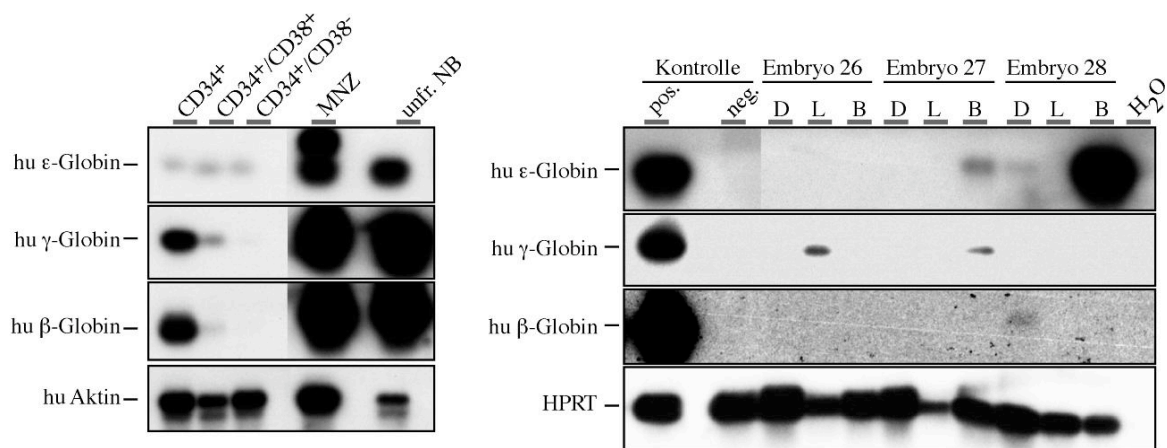


Abbildung 13: Analyse der Genexpression in humanen hämatopoetischen Vorläuferpopulationen, sowie Geweben, gewonnen aus chimären Embryonen. Es wurde die gesamte RNA aus unfraktionierten-, mononukleären-, CD34⁺, CD34⁺/CD38⁺ und CD34⁺/CD38⁻ Zellen des humanen Nabelschnurbluts, sowie aus Dottersäcken, fötalen Lebern und dem fötalen Blut chimärer Mausembryonen gewonnen. Die RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels PCR, spezifisch für die humane β , γ und ϵ -Globin Transkripte, analysiert. Als Kontrolle für die Vergleichbarkeit der eingesetzten cDNA Mengen wurde für die Zellen aus dem humanen Nabelschnurblut eine human β -Aktin spezifische PCR und für die Analyse der hämatopoetischen Organe der Mausembryonen eine murine spezifische HPRT PCR durchgeführt. Im linken Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der Experimente mit verschiedenen Vorläuferpopulationen des Nabelschnurbluts gezeigt, im rechten ist die Analyse der Globinexpression in den hämatopoetischen Organen dreier untersuchter Mausembryonen zu sehen. Abgebildet sind Autoradiogramme von PCR Southern Blots.

Aus dem linken Teil der Abbildung 13 geht hervor, dass der Anteil an humanen β - und γ -Globin Transkripten in den hoch aufgereinigten HSZ gegenüber weniger stark aufgereinigten Zellfraktionen deutlich reduziert ist, während Transkripte des humanen ϵ -Globin in allen Vorläuferpopulationen nur in geringen Mengen vorhanden sind. Der rechte Teil der Abbildung zeigt, dass RNA, gewonnen aus den hämatopoetischen Geweben chimärer Embryonen, humane Globin Transkripte enthält. Für die selben Gewebe konnte mithilfe der 17 β mod PCR an genomischer DNA nachgewiesen werden, dass sich in den hämatopoetischen Geweben humane Zellen befinden (Abbildung 11). Transkripte des Makrophagen spezifischen Lysozyngens konnten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass Nachkommen der injizierten humanen HSZ in den hämatopoetischen Geweben der Embryonen Gene aktivieren, die mit der Differenzierung zu erythroiden Zellen verbunden sind. Dies

deutet auf eine erythroide Differenzierung von humanen Zellen in murinen hämatopoetischen Geweben hin.

5.7.5 Analyse der Gewebeverteilung humaner Zellen in adulten Mäusen nach Injektion humaner CD34⁺ Zellen in murine Blastozysten

Die Untersuchung chimärer Embryonen hatte ergeben, dass humane und murine HSZ nach Injektion in murine Blastozysten vor allem die hämatopoetischen Gewebe besiedeln. Um zu bestimmen, ob humane Zellen auch auf Dauer in der Maus überleben und welche Gewebe in adulten Mäusen bevorzugt humane Zellen aufweisen, wurden vier Mäuse im Alter von fünf-zwölf Monaten untersucht, die sich aus Blastozysten entwickelten, in die CD34⁺ Zellen injiziert worden waren. Von vier untersuchten Tieren wiesen drei humane Zellen in mindestens einem der 15 untersuchten Gewebe auf.

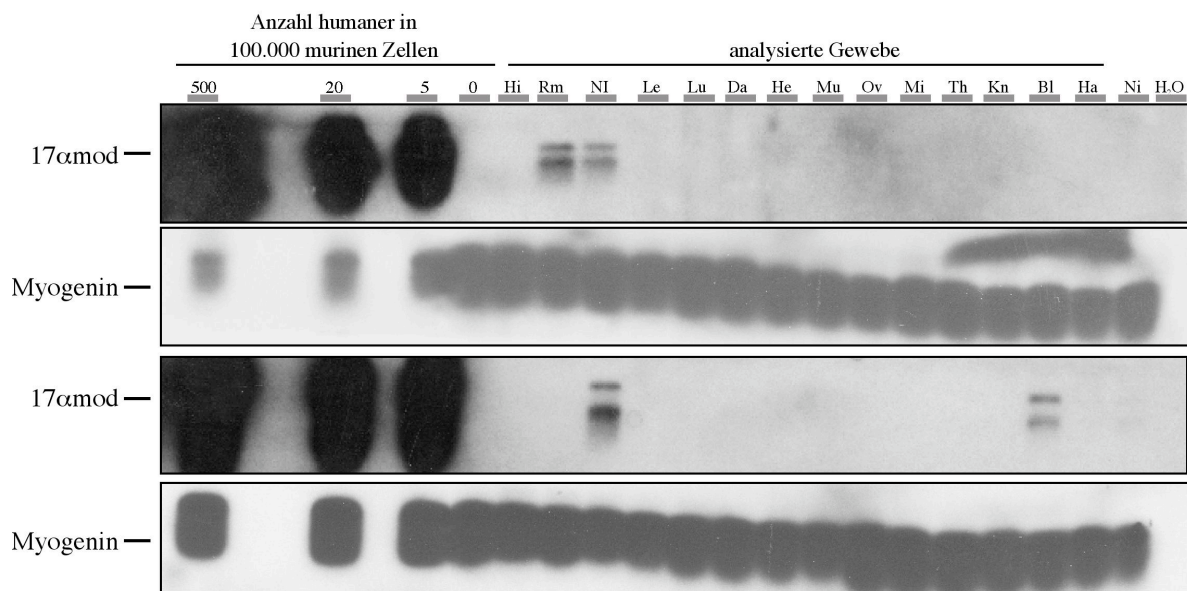


Abbildung 14: Analyse adulter Mäuse, die aus Blastozysten nach Injektion humaner CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut hervorgegangen sind. Individuelle Gewebe adulter Tiere wurden präpariert, genomische DNA isoliert und mit der 17 α mod PCR auf humane Donoranteile hin untersucht. Zum Abgleich der eingesetzten DNA Menge wurde eine Myogenin PCR durchgeführt. Im linken Teil der Abbildungen ist eine Verdünnungsreihe humaner in murinen Zellen aufgetragen (20, 5 und 0 humane Zellen in 100.000 murinen Milzzellen). Abkürzungen Hi, Gehirn; Rm, Rückenmark; NI, Nervus Ischiadicus; Le, Leber; Lu, Lunge; Da, Darm; He, Herz; Mu, Muskel, Ov, Ovar; Mi, Milz; Th, Thymus; Kn, Knochenmark; Bl, Blut; Ha, Haut; Ni, Niere. Zu sehen sind Autoradiogramme von PCR Southernblots.

Abbildung 14 demonstriert, dass in adulten Tieren, die sich aus mit humanen CD34⁺ Zellen injizierten Blastozysten entwickelten, humane Zellen nachweisbar sind. Die Gewebe, die humane Zellen aufwiesen, waren in einem Fall Rückenmark und N. Ischiadicus, bei der zweiten untersuchten Maus N. Ischiadicus und Blut (Abbildung 14) sowie bei der dritten chimären

Maus der Thymus (Daten nicht gezeigt). In allen untersuchten Geweben war der Anteil humaner Zellen mit weniger als fünf humanen Zellen pro 100.000 Mauszellen in etwa gleich, unabhängig vom untersuchten Gewebe bzw. Organsystem.

5.7.6 Zusammenfassung der Ergebnisse mit humanen HSZ und CD34⁺ Zellen

Humane HSZ überleben und proliferieren nach Injektion in murine Blastozysten. 10 Tage nach Injektion finden sich im Mausembryo humane Zellen vor allem in hämatopoetischen Organen. In diesen sind sowohl humane klonogene hämatopoetische Vorläufer vorhanden, die *in vitro* Kolonien bilden können, als auch Nachkommen der injizierten Zellen, die ein erythroides Genexpressionsmuster aktivieren.

Die Analyse auf Donorchimärismus in Geweben adulter Tiere zeigte, dass diese ebenfalls chimär sind. Der Grad des Chimärismus ist mit weniger als 5 humanen Zellen in 100.000 murinen Zellen niedrig. Im Gegensatz zur Situation im Embryo finden sich in adulten Mäusen menschliche Zellen nicht mehr präferentiell in hämatopoetischen Organen, sondern ebenso häufig in neuralen Geweben. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Resultaten, die durch die Untersuchung muriner HSZ in diesem System erhalten worden waren.

5.8 Injektion muriner NSZ in Blastozysten

Analog zur Injektion muriner HSZ wurden NSZ in E3,5 Blastozysten injiziert. Dazu wurden die als Neurosphären wachsenden NSZ am Tag vor der Injektion vereinzelt und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden für die Injektion Mikrosphären verwendet - kleine klonale Zellhaufen, bestehend aus 2-8 Zellen, die jeweils auf eine NSZ zurückgehen. Somit wurde sichergestellt, dass für die Injektion nur proliferierende Zellen mit Selbsterneuerungspotenzial verwendet wurden.

5.8.1 *In vitro* Inkubation mit NSZ injizierten Blastozysten

Um zu analysieren, ob NSZ präferentiell an einen Zelltyp in der Blastozyste adhärieren, wurden NSZ von eGFP transgenen Tieren isoliert und in Blastozysten injiziert. Diese NSZ fluoreszieren bei einer Anregungsfrequenz von 471nm grün. In Abbildung 15 ist zu sehen, dass direkt nach Injektion die NSZ einen kompakten Zellhaufen im Blastozoel bilden, der sich nach 15 Std. *in vitro* Kultur aufgrund der Expansion und der Zellmigration verteilt hat. Die

NSZ adhäreren sowohl an die Innere Zellmasse als auch an das Trophektoderm. Die NSZ zeigen demnach keine Präferenz für einen der beiden Zelltypen (Abbildung 15).

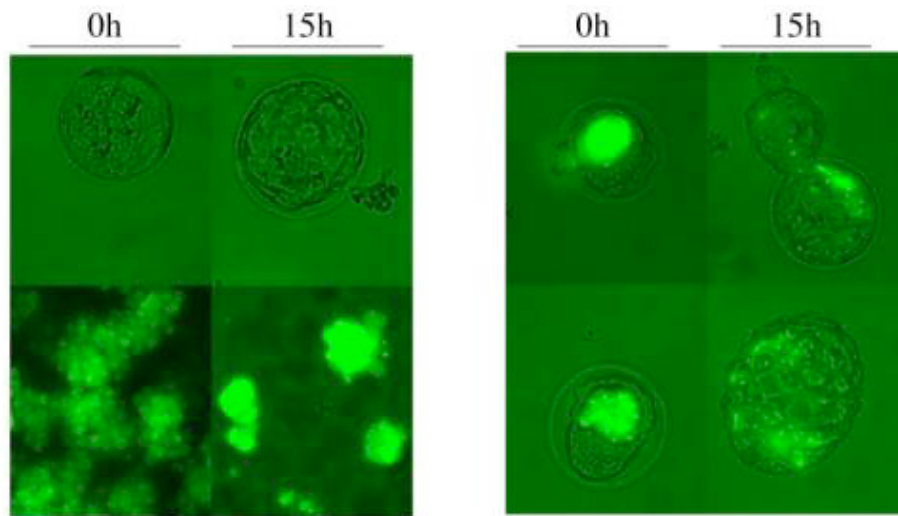


Abbildung 15: Distribution injizierter NSZ in der Blastozyste nach 15 stündiger *in vitro* Kultur. NSZ, gewonnen aus den Cortices eGFP transgener Embryonen (Okabe et al. 1997) wurden nach etwa 4 wöchiger *in vitro* Kultur in murine Blastozysten injiziert und für 15 Std. *in vitro* kultiviert. Im linken, oberen Teil der Abbildung ist eine nicht injizierte Blastozyste gezeigt, darunter NSZ in Kultur. Im rechten Teil sind zwei individuelle Blastozysten gezeigt, in die NSZ injiziert wurden. Es wurde jeweils ein Foto direkt zu Beginn nach Injektion des Versuchs, als auch 15 Std. danach aufgenommen. Dazu wurden unter Weißlicht und unter Fluoreszenzlicht gemachte Aufnahmen überlagert.

5.8.2 Effektivität der Injektion muriner NSZ in murine Blastozysten

Tabelle 5 zeigt das Verhältnis zwischen der Anzahl injizierter und transferierter Blastozysten sowie den sich entwickelnden Embryonen und adulten Tieren. Dabei ergab sich, dass der Anteil Embryonen, die sich nach Injektion muriner NSZ aus Blastozysten bis zum Tag E12,5 entwickelten, in etwa so hoch war, wie nach der Injektion muriner HSZ. Der Anteil geborener Tiere war gegenüber dem Anteil E12,5 alter Embryonen auf 27% reduziert.

Tabelle 5: Anzahl wachsender Embryonen und geborener Tiere an transferierten Blastozysten

<u>Injizierte Blastozysten</u>	<u>Embryonen (E12.5)</u>	<u>Anteil</u>
226	87	38%
<u>Injizierte Blastozysten</u>	<u>Adulte (3-5 Monate)</u>	<u>Anteil</u>
191	53	27%

5.8.3 Analyse der Donorkontribution in Embryonen nach Injektion wildtypischer NSZ

Um den Einfluss der murinen embryonalen Mikroumgebung auf die injizierten NSZ zu untersuchen, wurden neun weibliche Embryonen, die sich aus mit wildtypischen NSZ injizierten Blastozysten entwickelt hatten, am Tag E12,5 isoliert. Die Embryonen wurden präpariert um sechs verschiedene Gewebe zu isolieren und genomische DNA daraus zu gewinnen. Die DNA Proben der Embryonen wurden mittels YMT2/B PCR auf Donoranteil hin untersucht (Abbildung 16).

Erstaunlicherweise zeigte sich, dass Nachkommen der injizierten wildtypischen NSZ vor allem in den hämatopoetischen Geweben Dottersack (6/9) und dem fötalen Blut (8/9) und nur zu einem geringeren Anteil in den anderen untersuchten Geweben, fötale Leber, Kopf, Hinterbein und dem verbleibenden Rest zu finden waren. Der Grad des Chimärismus lag mit etwa 0,2% in der Größenordnung, wie er auch nach der Injektion muriner HSZ gefunden worden war. Es zeigte sich, dass sowohl die Injektion muriner HSZ als auch muriner NSZ in Blastozysten präferentiell zu einer Besiedelung der hämatopoetischen Organe sich entwickelnder Embryonen führt.

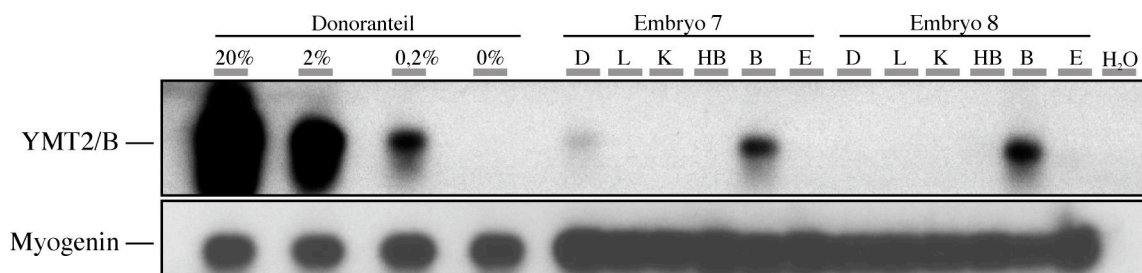


Abbildung 16: Abgebildet ist die gewebespezifische Analyse auf Donorkontribution am Tag E12,5 nach Injektion wildtypischer männlicher NSZ in murine Blastozysten. Genomische DNA gewonnen aus Dottersack, fötaler Leber, Kopf, Hinterbein, fötalem Blut und dem Rest von weiblichen Embryonen, wurde mittels YMT2/B PCR auf Anteile männlicher DNA hin untersucht. Im linken Teil der Abbildung ist eine Verdünnungsreihe männlicher DNA in weiblicher DNA aufgetragen. Als Negativkontrolle diente weibliche DNA und eine Wasserkontrolle. Als Ladekontrolle wurde eine PCR für das Myogenin Gen durchgeführt. Abkürzungen: D, Dottersack; L, fötale Leber; K, Kopf; HB, Hinterbein; B, fötales Blut; R, restlicher Embryo. Zu sehen ist ein Autoradiogramm eines PCR Southernblot.

5.8.4 Analyse der Donorkontribution in Embryonen nach Injektion bcl2 transgener NSZ

Da der Grad des Chimärismus nach Injektion wildtypischer NSZ ebenso gering war wie nach Injektion wildtypischer HSZ, lag es nahe, auch für die Analyse der NSZ bcl2 transgene NSZ zu verwenden. Die bcl2 transgenen NSZ wurden ebenso wie die wildtypischen Zellen gewonnen und kultiviert. Es wurden männliche bcl2 transgene NSZ in E3,5 Blastozysten injiziert

und anschließend in Leihmütter retransferiert. Am Tag E12,5 wurden die Leihmütter getötet und die Embryonen isoliert. Von 19 weiblichen Embryonen wurden 6 verschiedene Gewebe isoliert und daraus genomische DNA gewonnen. Diese DNA wurde mittels YMT2/B PCR auf den Anteil männlicher DNA hin untersucht (Abbildung 17).

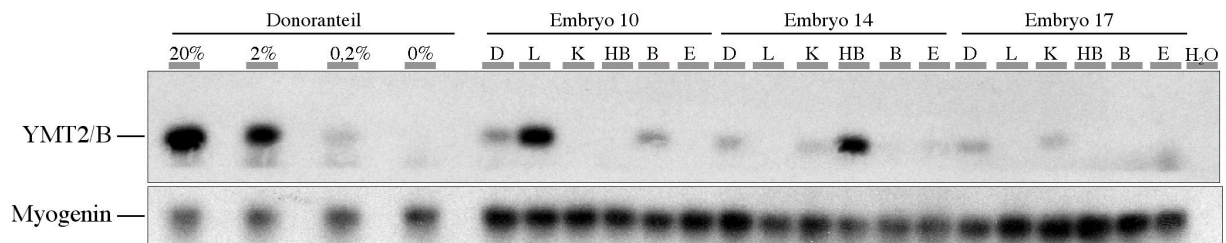


Abbildung 17: Abgebildet ist die gewebespezifische Analyse auf Donorkontribution am Tag E12,5 nach Injektion *bcl2* transgener männlicher HSZ in murine Blastozysten. Genomische DNA, gewonnen aus Dottersack, fötaler Leber, Kopf, Hinterbein, fötalem Blut und den restlichen Geweben weiblicher Embryonen, wurde mittels YMT2/B PCR auf den Anteil männlicher DNA hin untersucht. Im linken Teil der Abbildung ist eine Verdünnungsreihe männlicher DNA in weiblicher DNA aufgetragen. Abkürzungen: D, Dottersack; L, fötale Leber; K, Kopf; HB, Hinterbein; B, fötales Blut; R, restlicher Embryo. Als Negativkontrolle diente weibliche DNA und eine Wasserkontrolle. Als Ladekontrolle wurde eine PCR für das Myogenin Gen durchgeführt. Zu sehen ist ein Autoradiogramm eines PCR Southernblot.

Abbildung 17 und Tabelle 6 zeigen, dass in allen untersuchten Embryonen mindestens ein Gewebe Nachkommen injizierter Zellen aufwies. Bei 19 untersuchten weiblichen Embryonen, die aus der Injektion *bcl2* transgener NSZ in Blastozysten hervorgegangen waren, wurden am häufigsten die Gewebe Dottersack (12/19), fötale Leber (11/19) sowie fötales Blut (13/19) durch die injizierten NSZ besiedelt, während die Gewebe Kopf, Hinterbein und der verbleibende Rest seltener Anteile männlicher Zellen aufwiesen. Der maximale Donoranteil in einem Gewebe lag mit etwa 2% eine Größenordnung über der, die durch die Injektion von wildtypischen NSZ erreicht worden war, und damit im Bereich, der auch mit *bcl2* transgenen HSZ erzielt worden war.

Tabelle 6: Vergleich der Gewebedistribution der Nachkommen wildtypischer und *bcl2* transgener NSZ in 12,5 Tage alten Embryonen nach Blastozysteninjektion

	Analysierte Gewebe (positiv/gesamt)						<u>mind. ein Gewebe</u> <u>positiv</u>
	D	L	K	HB	B	E	
wildtypische NSZ	6/9	2/9	2/9	3/9	8/9	2/9	100%
<i>Bcl2</i> tg NSZ	12/19	11/19	3/19	9/19	13/19	4/19	100%

Gezeigt ist die Anzahl positiver Gewebe gegenüber allen untersuchten Geweben in E12,5 Embryonen nach Injektion wildtypischer bzw. *bcl2* transgener NSZ in murine Blastozysten. Abkürzungen: D, Dottersack; L, fötale Leber; K, Kopf; HB, Hinterbein; B, fötales Blut; R, restlicher Embryo. Zudem ist der Anteil der Embryonen die in mindestens einem Gewebe Donoranteile aufwiesen angegeben.

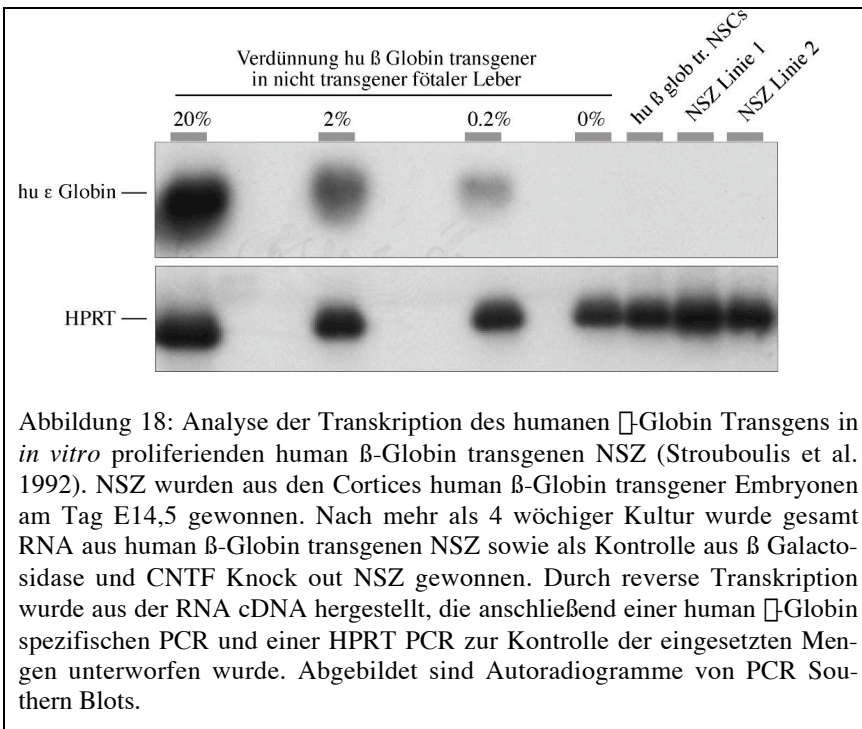
Zusammenfassend ergab sich, dass die Injektion *bcl2* transgener NSZ in Blastozysten zu einer präferentiellen Besiedlung der hämatopoetischen Gewebe sich entwickelnder Embryonen führt, während der primär neurale Kopf nur sehr selten und geringere Donoranteile aufweist (Abbildung 17 und Tabelle 6).

Im Unterschied zu wildtypischen NSZ können auch in der fötalen Leber Nachkommen *bcl2* transgener NSZ zusätzlich zu den beiden hämatopoetischen Geweben Dottersack und peripheres Blut nachgewiesen werden.

5.8.5 Analyse der Nachkommen neuraler Stammzellen in embryonalen und fötalen hämatopoetischen Geweben

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, finden sich in einem hohen Prozentsatz der untersuchten Embryonen Nachkommen injizierter NSZ in hämatopoetischen Geweben. Mit folgenden Experimenten sollte die Hypothese überprüft werden, dass es sich bei den detektierten Zellen um Zellen der primitiven Hämatopoese handelt.

Während der Embryonal- und Fötalentwicklung werden im Säuger Hämoglobine exprimiert, die verschieden sind von denen des adulten Organismus (Brotherton et al. 1979). Im Zuge der humanen Entwicklung wird embryonal die γ -, fötal die β und δ Kette exprimiert, im Erwachsenen dann fast ausschließlich die β Kette verwandt. Von Stroubolis und Kollegen wurde eine transgene Mauslinie generiert, die als Transgen den gesamten humanen β -Globin Locus mitsamt der regulatorischen Elemente trägt (Strouboulis et al. 1992). Dieses Transgen führt sowohl zur linienspezifischen als auch zur entwicklungsstadienspezifischen Expression der humanen Hämoglobine in der Maus, so dass in transgenen Mausembryonen im Dottersack zuerst das γ Globin Gen transkribiert wird. Die definitive Hämatopoese der fötalen Leber bringt Erythrozyten hervor, die sowohl β als auch δ Globine exprimieren. Im Blut erwachsener Mäuse wird nur noch das humane β Globin nachgewiesen.



Aus männlichen Embryonen dieser Linie wurden NSZ gewonnen und kultiviert. Aus den in Kultur wachsenden β -Globin transgenen NSZ wurde RNA gewonnen und auf die Expression des humanen Globin Transgens untersucht. Da der transgene Locus neben den eigentlichen Hämoglobinogenen auch die regulatorischen Elemente für die erythroid spezifische

Expression trägt, konnten in cDNA, gewonnen aus kultivierten NSZ, keine Transkripte der Globingene nachgewiesen werden (Abbildung 18).

Die β -Globin transgenen NSZ wurden in Blastozysten injiziert und die sich daraus entwickelnden Embryonen auf Donoranteile in den hämatopoetischen Geweben untersucht. Dazu wurden die Embryonen am Tag E14,5 der Schwangerschaft isoliert und aus den hämatopoetischen Geweben weiblicher Embryonen, dem Dottersack, der fötalen Leber und dem fötalen Blut sowohl genomische DNA als auch gesamt RNA gewonnen. Wie in Abbildung 19 gezeigt, konnte Kontribution mithilfe der YMT2/B PCR in den hämatopoetischen Geweben der Embryonen 195, 198, 205, 206, in Dottersack, fötaler Leber und fötalem Blut nachgewiesen werden. Dabei war der Anteil im fötalen Blut am höchsten und in der fötalen Leber am geringsten. Die parallele Analyse derselben Gewebe auf Transkripte des embryonalen humanen β -Globin Gen ergab, dass sich im fötalen Blut, dem auf DNA Ebene am höchsten besiedelten Gewebe, auch Transkripte des human β -Globin Gens nachweisen lassen. Aber auch im Dottersack und der fötalen Leber der untersuchten Embryonen wurden Transskripte des humanen Globin Gens nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass NSZ nach Injektion in Blastozysten einem Milieu ausgesetzt sind, das dazu führt, dass Nachkommen der NSZ ein erythroid-spezifisches Genexpressionsmuster aktivieren.

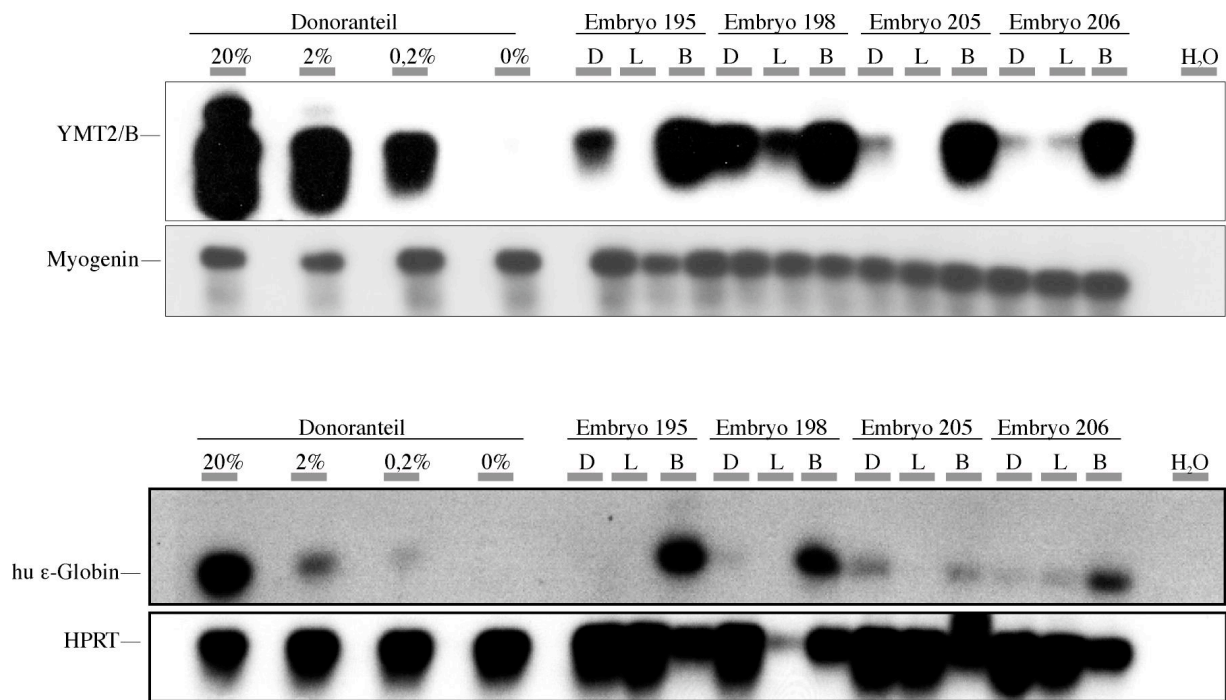


Abbildung 19: Analyse muriner embryonaler hämatopoetischer Organe auf Donorkontribution und Aktivierung eines erythroid- spezifischen Transgens nach Injektion männlicher β -Globin transgener NSZ in Blastozysten. Human β -Globin Lokus transgene NSZ wurden in Blastozysten injiziert und aus den sich entwickelnden weiblichen Embryonen am Tag E14,5 DNA und RNA aus hämatopoetischen Organen extrahiert. Die DNA wurde einer YMT2/B PCR zur Detektion von Nachkommen injizierter NSZ unterworfen, RNA aus den isolierten Geweben wurde revers transkribiert und mittels einer β -Globin spezifischen PCR analysiert. Zum Abgleich der eingesetzten Mengen wurde bei der genomischen Analyse eine Myogenin PCR durchgeführt, bei der RT-PCR Analyse wurde zum Abgleich die RT PCR Signalstärke der Transkription des Haushaltgens HPRT als Ladekontrolle eingesetzt. Abkürzungen: D, Dottersack; L, fötale Leber; B, fötales Blut. Gezeigt sind Autoradiogramme der PCR Southern Blots.

5.8.6 NSZ bilden hämatopoetische Vorläufer in frühen Mausembryonen

Die im vorhergehenden Kapitel gezeigten Expressionsdaten des embryonalen β -Globin in chimären Tieren deuten darauf hin, dass es sich bei den hämatopoetischen Zellen, die in Embryonen am Tag E14,5 gefunden werden, um Zellen der primitiven Hämatopoese handelt. Da primitive hämatopoetische Vorläuferzellen nur früh und transient embryonal vorhanden sind und später im Laufe der Ontogenese verloren gehen, wurde, um diese Hypothese zu überprüfen, ein Assay für primitive hämatopoetische Zellen durchgeführt (Dzierzak 1999; Palis et al. 2001).

Ein Charakteristikum der primitiven Hämatopoese ist, dass etwa am Tag E8,25 die höchste Aktivität primitiver erythroider Vorläuferzellen im Dottersack hervorgebracht wird. Daher sollten aus dem Dottersack von Embryonen nach Injektion von NSZ Einzelzellen gewonnen und diese *in vitro* unter hämatopoetischen Wachstumsbedingungen gehalten werden. Sollten

NSZ nach Injektion in Blastozysten primitive hämatopoetische Vorläufer bilden, die sich in den Blutinseln des Dottersackes befinden, so sollten sie *in vitro* Kolonien bilden können.

NSZ, die das eGFP Transgen exprimieren, wurden in Blastozysten injiziert und am Tag 8,25 wurden sich entwickelnde Embryonen isoliert. Aus den Dottersäcken wurde durch Collagenaseverdau eine Einzelzellsuspension hergestellt, die in semisolidem Medium, das die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Erythropoietin und IL 3) enthielt, ausplattiert. Dieses Medium erlaubt das klonale Wachstum primitiver erythroider Vorläuferzellen (EryP CFC). Als Kontrolle wurde eine Einzelzellsuspension neuraler Stammzellen in demselben Medium kultiviert. Von insgesamt 15 Embryonen mit 8-14 Somiten (E8.0-E9.0) wurden die Dottersäcke isoliert, die Zellen vereinzelt und ausplattiert. Nach sechs Tagen wurden die Kolonien, die je Dottersack gewachsen waren, ausgezählt. Abbildung 20 zeigt, dass NSZ, die direkt in Methylcellulose mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gegeben wurden, überleben, nicht aber proliferieren sondern differenzieren. Im Gegensatz dazu bildeten sich aus den Zellen, die aus den Dottersäcken chimärer Embryonen gewonnen worden waren, Kolonien mit primitiv-erythroiden Phänotyp. Ein Teil dieser Kolonien fluoreszierte, was ihre Abstammung von den injizierten eGFP transgenen NSZ zeigt. Bei den insgesamt 15 untersuchten Dottersäcken wurden bei Embryo 6 (5 fluoreszierende Kolonien von 22), Embryo 9 (3 von 47) und Embryo 10 (3 von 31) grün fluoreszierende Kolonien gefunden.

Dies zeigt, dass nach Injektion von NSZ in Blastozysten nach 6 Tagen primitive hämatopoetische Vorläuferzellen aus diesen hervorgegangen sind. Diese befinden sich in hämatopoetischen Organen und aktivieren dort erythroid spezifische Gene und bilden *in vitro* unter hämatopoetischen Wachstumsbedingungen Kolonien. NSZ dagegen, die nicht injiziert wurden, exprimieren weder erythroid spezifische Gene noch können sie unter hämatopoetischen Wachstumsbedingungen proliferieren.

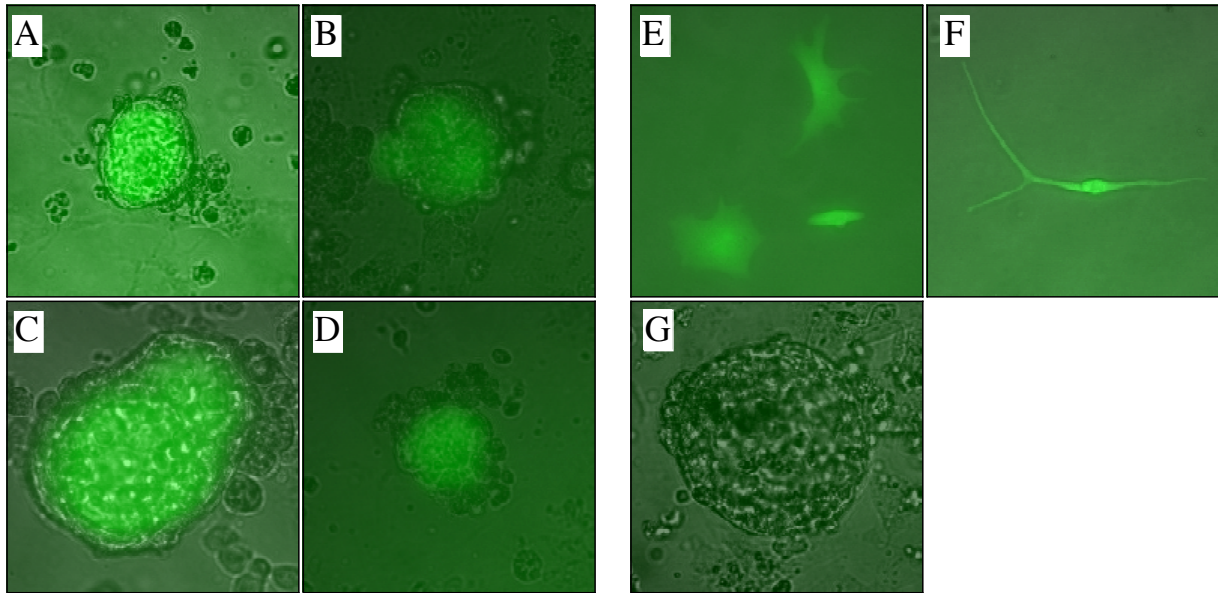


Abbildung 20: Fluoreszenzaufnahmen hämatopoetischer Kolonien gewachsen aus Dottersackzellen chimärer Embryonen. Nach Injektion eGFP transgener NSZ in Blastozysten wurden 15 sich entwickelnde Embryonen am Tag E 8,5 (Somitenstadien 8-14) isoliert. Die Dottersäcke wurden durch enzymatischen Verdau mit Collagenase in Einzelzellen überführt und anschließend in Methylzellulose, die Wachstumsfaktoren für das Wachsen von EryP CFC enthielt, ausplattiert (A-D und G). Zur Kontrolle wurden eGFP transgene NSZ direkt in dasselbe Methylzellulosemedium ausplattiert (E und F). Nach sechs Tagen wurden Aufnahmen unter Weißlicht und der Anregungsfrequenz des eGFP Proteins gemacht. Zu sehen sind digitale Überlagerungen der Weißlicht - mit der Fluoreszenzaufnahme bei 200 facher Vergrößerung.

5.8.7 Analyse des Chimärismus in adulten Geweben nach Injektion muriner NSZ

Um zu untersuchen, welche Organsysteme durch die Injektion von NSZ in Blastozysten dauerhaft besiedelt werden, wurden adulte Gewebe chimärer Tiere auf das Vorhandensein von Donorzellen hin untersucht. Für die Mikroinjektion wurden sowohl wildtypische als auch *bcl2* transgene männliche NSZ gewonnen und kultiviert.

5.8.8 Vergleich der Gewebebesiedelung durch wildtypische und *bcl2* transgene NSZ in adulten Tieren

Der Vergleich des durch wildtypische bzw. *bcl2* transgene NSZ entstandenen Chimärismus in sich entwickelnden Embryonen ergab, dass durch beide Zellen die hämatopoetischen Gewebe Dottersack und das periphere Blut präferentiell besiedelt werden. Nachkommen der *bcl2* transgenen NSZ wurden zudem noch in der fötalen Leber ebenfalls ein hämatopoetisches Organ gehäuft nachgewiesen. Die Frequenz von Donorzellen in nicht hämatopoetischen Geweben blieb von der Verwendung transgener NSZ unberührt. Der Grad des Chimärismus in den untersuchten Tieren wurde durch das *bcl2* Transgen um etwa ein Größenordnung gesteigert.

Das überraschende Ergebnis, dass Nachkommen der injizierten NSZ zur Mitte der Schwangerschaft nach Blastozysteninjektion vor allem zu hämatopoetischen Geweben beitragen, könnte auf einer Kontribution zu der transienten primitiven Hämatopoese beruhen. Die Analyse chimärer adulter Tiere kann daher Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den während der Embryonalentwicklung in den hämatopoetischen Organen nachgewiesenen Zellen um hämatopoetische Zellen der definitiven oder der primitiven Hämatopoese handelt.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob das *bcl2* Transgen einen Einfluss auf das langfristige Differenzierungspotenzial der injizierten NSZ hat.

Für diese Analyse wurden Blastozysten mit männlichen wildtypischen bzw. *bcl2* transgenen NSZ injiziert und die sich daraus entwickelnden weiblichen adulten Tiere im Alter von 3-5 Monaten analysiert.

Abbildung 21 und Tabelle 7 zeigen, dass die am häufigsten besiedelten Gewebe zu dem Zentralnervensystem und peripheren Nervensystem gehören und, dass nicht neurale Gewebe seltener durch NSZ besiedelt wurden. Besonders hervorzuheben sind im Falle der Injektion von wildtypischen NSZ der Hippocampus (7/12), das Rückenmark (4/12) und Nervus Ischiadicus (6/12). Auch der Anteil an Nachkommen injizierter Zellen war in diesen Geweben auch am höchsten. Unter den untersuchten nicht neuralen Geweben sind Muskel (2/12) und Herz (2/12) diejenigen Gewebe mit der häufigsten Kontribution durch NSZ. Auffallend ist, dass einige Gewebe nie Donoranteile wildtypischer NSZ aufweisen. Dazu zählen Dünndarm, Milz, peripheres Blut, Haut und Niere.

Gewebe, die durch Nachkommen der injizierten *bcl2* transgenen NSZ besiedelt wurden, sind ebenso wie im Falle der wildtypischen vor allem neurale Gewebe, Rückenmark (5/17) und Nervus Ischiadicus (3/17). Der Grad des Chimärismus war in den neuralen Geweben höher als in nicht neuralen und gegenüber den wildtypischen NSZ in den am stärksten besiedelten Geweben um den Faktor 10 erhöht. Nachkommen der *bcl2* transgenen NSZ fanden sich auch in nicht neuralen Geweben, z.B. in Thymus (2/17).

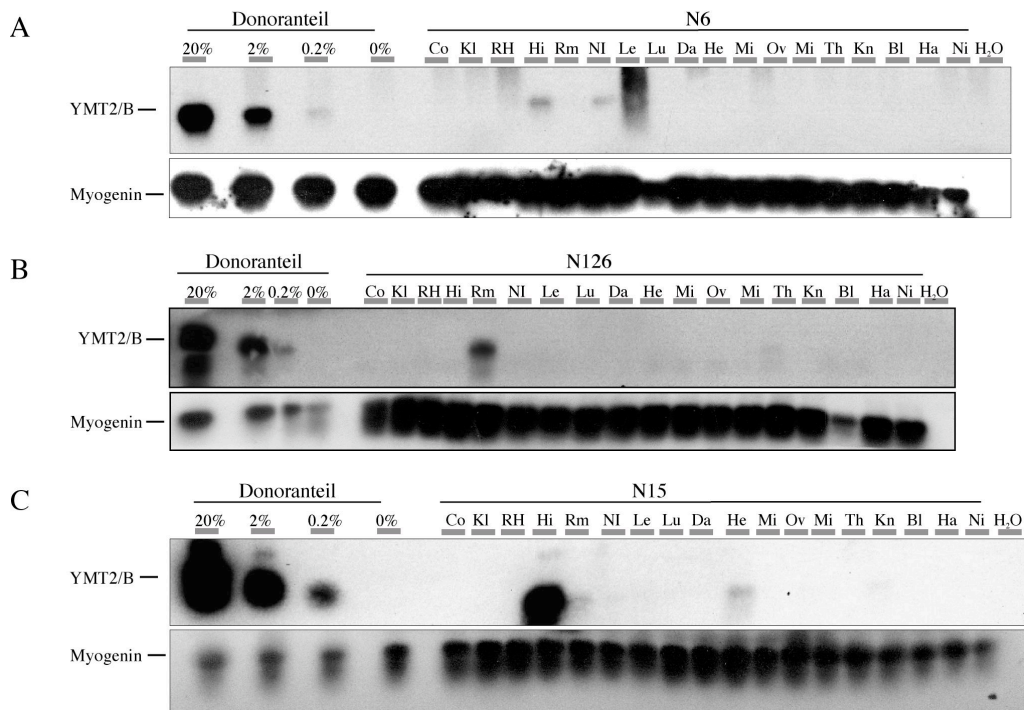


Abbildung 21: Analyse der Gewebeverteilung von Nachkommen injizierter wildtypischer (A) und bcl2 transgener NSZ (B und C) in adulten Tieren. Männliche wildtypische bzw. männliche bcl2 transgene NSZ wurden nach mindestens 4 wöchiger *in vitro* Kultur in Blastozysten injiziert. Daraus entstandene adulte Weibchen wurden im Alter von 3- 5 Monaten getötet, 18 verschiedene Gewebe wurden präpariert und genomische DNA wurde aus diesen Geweben gewonnen. DNA Proben wurden mittels YMT2/B PCR auf männliche Donoranteile hin untersucht. Abkürzungen: Co, Cortex, Kl, Kleinhirn, RH, restliches Hirn, Hi, Hippocampus, R, Rückenmark, NI, Nervus Ischiadicus, Le, Leber, Lu, Lunge, Da, Darm, He, Herz, Mu, Muskel, Ov, Ovar, Mi, Milz, Th, Thymus, Kn, Knochenmark, Bl, Blut, Ha, Haut, Ni, Niere. Zusätzlich sind Verdünnungsreihen männlicher in weiblicher DNA sowie eine Wasserkontrolle durchgeführt worden.

Tabelle 7: Häufigkeit der Kontribution in adulten Geweben nach Injektion wildtypischer bzw. bcl2 transgener NSZ

Injizierter Zelltyp	Analysierte Gewebe (positiv/gesamt)																	
	Co	Kl	RH	Hi	Rm	NI	Le	Lu	Da	He	Mu	Ov	Mi	Th	Kn	Bl	Ha	Ni
wildtypische NSZ	2/12	1/12	0/8	7/12	5/12	6/12	0/12	0/8	0/8	2/12	3/12	1/8	1/12	1/8	1/8	0/12	0/8	1/12
bcl2 transgene NSZ	1/14	0/14	1/17	1/14	5/17	3/17	0/17	0/17	0/17	1/17	1/17	0/17	0/17	2/17	1/17	1/17	0/17	0/17

Gezeigt ist die Anzahl positiver Gewebe gegenüber der Anzahl aller untersuchter adulter Gewebe. Sowohl adulte Mäuse, die aus der Injektion wildtypischer als auch die Ergebnisse der Analyse adulter Mäuse aus Injektionen bcl2 transgener NSZ sind gezeigt. Abkürzungen: Co, Cortex; Kl, Kleinhirn, RH, restliches Hirn; Hi, Gehirn; Rm, Rückenmark; NI, Nervus Ischiadicus; Le, Leber; Lu, Lunge; Da, Darm; He, Herz; Mu, Muskel, Ov, Ovar; Mi, Milz; Th, Thymus; Kn, Knochenmark; Bl, Blut; Ha, Haut; Ni, Niere.

5.8.9 Analyse von Nachkommen injizierter NSZ *in situ*

Um die Nachkommen der injizierten NSZ *in situ* in Geweben eines adulten Tieres nachweisen zu können, wurden NSZ aus Embryonen einer Mauslinie etabliert, die ubiquitär ein β -Galactosidase Transgen aus *E. coli* als nukleär lokalisiertes Protein exprimiert (Tam et al. 1994). Männliche β -Galactosidase transgene NSZ wurden in Blastozysten injiziert und daraus resultierende Tiere wurden mithilfe der YMT2/B PCR auf Donoranteile in Geweben und Organen untersucht. Abbildung 22 zeigt die Analyse des Tieres 131, das im Rückenmark und im Nervus Ischiadicus Nachkommen der injizierten Zellen aufweist, daneben noch in Leber, Lunge, Knochenmark und Haut.

Der contralaterale Ischiasnerv, zu dem durch PCR analysierten wurde mit Xgal gefärbt, einer Substanz, die durch die Aktivität des β -Galactosidaseenzym in einen unlöslichen, blauen Farbstoff umgesetzt wird. Auf Gefrierschnitten des N. Ischiadicus erkennt man die Kerne einiger Zellen blau angefärbt. Die kernhaltigen Zellen eines peripheren Nervs sind Fibroblasten, die eine Schutzschicht um den Nerv aufbauen und im Nerv selbst Schwannszellen sowie einige wenige Astrozyten (persönliche Kommunikation, Dr. S. Wiese). Die Zellkörper und damit die Kerne der Neuronen befinden sich im Rückenmark. Die Zellen, die blaue Kerne tragen, stammen von den injizierten β -Galactosidase transgenen NSZ ab und haben sich zu Schwannszellen des peripheren Nervensystems entwickelt. Ihrer Ontogenie nach stammen Schwannszellen von den Neuralleistenzellen ab, die sich vom Neuroektoderm ableiten, aber distinkt von NSZ sind. In diesem Gewebe konnte *in situ* eine Transdifferenzierung der injizierten NSZ zu einem Zelltyp, der nicht zu dem Differenzierungspotenzial der injizierten Zellen gehört, gezeigt werden.

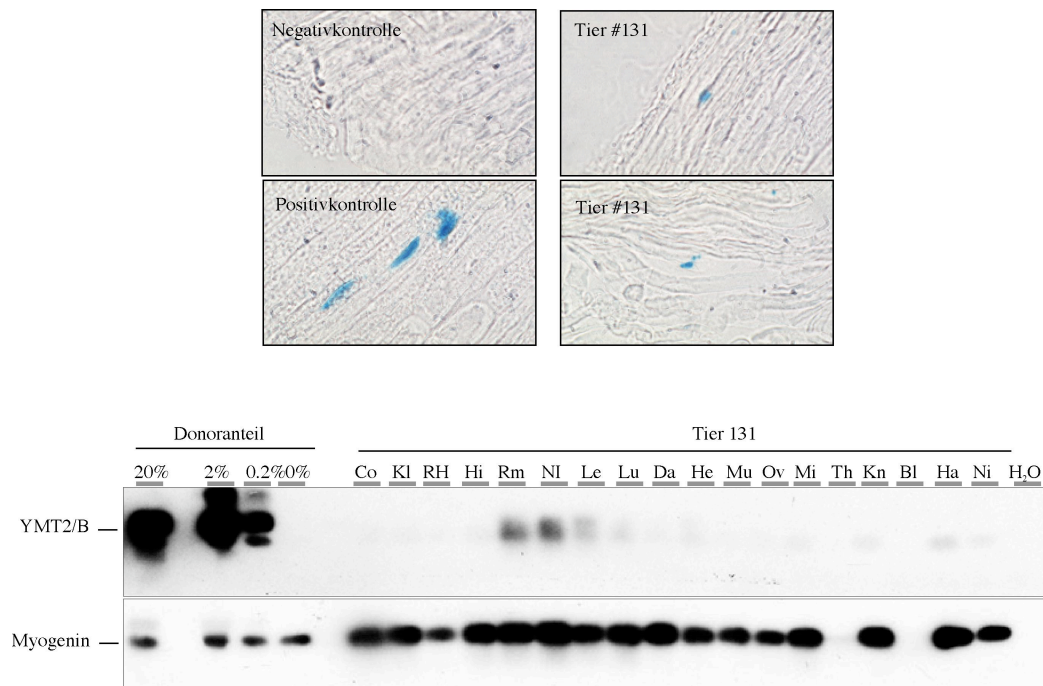


Abbildung 22: *In situ* Analyse von Nachkommen *bcl2*, β Galactosidase doppelt transgener NSZ in adulten Tieren. Männliche *bcl2*, β Galactosidase doppelt transgene NSZ wurden nach 4 wöchiger *in vitro* Kultur in Blastozysten injiziert. Das daraus entstandene Weibchen wurde im Alter von 3 Monaten getötet, 18 verschiedene Gewebe wurden präpariert und genomische DNA aus diesen Geweben gewonnen. Das kontralaterale Gewebe wurde für die LacZ Färbung verwandt. Im oberen Teil der Abbildung sind Kryoschnitte von Ischiasnerven zu sehen. In der linken Spalte ist oben eine Negativ unten eine Positivkontrolle zu sehen. In der rechten Spalte sind Schnitte des Ischiasnerven des Tieres 13, die angefärbt worden, abgebildet. Gezeigt sind Fotos der Schnitte unter 400 facher Vergrößerung. Im unteren Teil ist die PCR Analyse der Gewebe des Tieres 131 auf männliche Donorzellen hin DNA Proben wurden mittels YMT2/B PCR auf männliche Donoranteile hin untersucht. Abkürzungen: Co, Cortex, Kl, Kleinhirn, Rh, restliches Hirn, Hi, Hippocampus, Rm, Rückenmark, NI, Nervus Ischiadicus, Le, Leber, Lu, Lunge, Da, Darm, He, Herz, Mu, Muskel, Ov, Ovar, Mi, Milz, Th, Thymus, Kn, Knochenmark, Bl, Blut, Ha, Haut, Ni, Niere.

5.8.10 Aufschlüsselung der Gewebeverteilung in den adulten Tieren

Um zu bestimmen, welches Differenzierungspotenzial injizierte Zellen in einem sich entwickelnden Tier haben, wurde die Gewebeverteilung in untersuchten Tieren nach Art der besiedelten Organe aufgeschlüsselt. Tabelle 8 zeigt, zu welchen Gewebetypen die injizierten NSZ beigetragen haben und wie häufig Kontribution zu gewissen Geweben unter den analysierten Tieren vorkam. Dabei wurden Nachkommen injizierter NSZ vor allem in neuronalen Gewebetypen gefunden, während hämatopoetische und andere Organe seltener Nachkommen der injizierten NSZ aufwiesen.

Tabelle 8: Häufigkeit der Nachkommen wildtypischer und bcl2 transgener NSZ in Gewebegruppen adulter chimärer Mäuse

	<u>N</u>	<u>N/n.H/N</u>	<u>N/H</u>	<u>H</u>	<u>H/n.N</u>	<u>n.H/n.N</u>	<u>neg. Tiere</u>
Wildtypische NSZ	3/9	3/9	2/9	0/9	0/9	1/9	2/11 (19%)
Bcl2 tg NSZ	6/10	2/10	2/10	0/10	0/10	0/10	5/15 (33%)

Gezeigt ist die Anzahl der Mäuse, die in einer oder einer Kombination zweier Gewebegruppen Nachkommen injizierter NSZ aufwiesen. N: neurale Gewebe: Cortex, Cerebellum, Rest des Hirns, Hippocampus, Rückenmark, N. Ischiadicus; H: hämatopoetische Gewebe: Milz, Thymus, Knochenmark, peripheres Blut; : n.H/n.N: nicht hämatopoetische und nicht neurale Gewebe: Leber, Lunge, Darm, Herz, Muskel, Gonaden, Haut, Niere.

5.8.11 Zusammenfassung der Ergebnisse der Injektionen muriner NSZ in Blastozysten

Die Analyse chimärer Föten aus mit NSZ injizierten Blastozysten ergab, dass sich Nachkommen vor allem in den hämatopoetischen Geweben wieder fanden. Neurale Gewebe wiesen dagegen zum Zeitpunkt der Fötalentwicklung selten und nur geringe Donoranteile auf. Zudem konnte eine auf injizierte NSZ zurückgehende erythroide Genexpression in hämatopoetischen Geweben chimärer Föten beobachtet werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass sich zu Beginn der endogenen primitiven Hämatopoese *in vitro* klonogene hämatopoetische Vorläufer, abstammend von injizierten NSZ, im Dottersack befinden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die in Föten gewonnen wurden, zeigten adulte Chimäre, ein nahezu komplett anderes Bild. Donorkontribution war fast ausschließlich auf neurale Gewebe beschränkt. Dort allerdings waren Nachkommen nicht auf die Entwicklungslinien von zentralnervösen Stammzellen beschränkt, sondern es konnten auch Derivate der Neuralleistenzellen *in situ* gezeigt werden.

6 Diskussion

6.1 Das Differenzierungspotenzial somatischer Stammzellen

Das zentrale Dogma der Stammzellbiologie lautete bis vor wenigen Jahren:

Somatische Stammzellen eines Gewebes bilden nur Zellen ihres Gewebes.

Im Widerspruch zu dieser Lehrmeinung zeigten Forschungsergebnisse in der letzten Zeit, dass SSZ eines Typs Zellen bilden können, die nicht zu den Effektorzellen ihres Stammzellkompartiments gehören. 1999 konnten Bjornson und Kollegen nach Transplantation muriner NSZ in bestrahlte Mäuse hämatopoetische Zellen in den Rezipienten nachweisen. Das Gleiche konnte 2001 von einer Arbeitsgruppe um C. Shih für humane NSZ demonstriert werden (Shi et al. 1998; Bjornson et al. 1999). In einer Veröffentlichung von Lagasse et al. wurde gezeigt, dass HSZ in der Lage sind, *in vivo* Leberzellen zu bilden (Lagasse et al. 2000). Gussoni und Kollegen wiesen von transplantierten Knochenmarkzellen adulter Mäuse abstammende Muskelzellen in Rezipienten eines Muskeldystrophiemodells nach (Gussoni et al. 1999). All diesen experimentellen Systemen ist gemein, dass in einem Stammzellkompartiment ein Schaden induziert wurde oder dieser aufgrund eines Gendefekts bereits vorliegt, der durch Transplantation heterologer Stammzellen regeneriert werden sollte. Unter diesen Bedingungen konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass durch SSZ eines Typs Zellen eines anderen Stammzellsystems gebildet werden.

Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welche reifen Zelltypen von einem somatischen Stammzelltyp prinzipiell gebildet werden können ohne gleichzeitig durch Schädigung eines Gewebes die Regeneration und damit Bildung dieses einen Zelltyps zu induzieren.

Um die Frage, ob SSZ weitere Differenzierungskapazitäten haben, zu beantworten, wurde als experimentelles System die Injektion von SSZ in Blastozysten gewählt. Mikroinjektion von ES-Zellen in Blastozysten führt zur Bildung chimärer Embryonen und adulter Tiere, die Nachkommen injizierter ES-Zellen in allen Geweben aufweisen. Mit diesem experimentellen System konnte die Pluripotenz, also die Fähigkeit von ES-Zellen klonal zu allen Zellen des Embryos und des adulten Körpers zu differenzieren, bewiesen werden. (Beddington et al. 1989). Die Blastozysteninjektion ist die einzige Testmethode, die es erlaubt, Zellen bezüglich ihres Differenzierungspotenzials auf Pluripotenz zu testen, denn die Injektion von Zellen in

Blastozysten führt zur Exposition gegenüber den Stimuli, die während der Embryonalentwicklung die Bildung der Strukturen des gesamten Organismus bewirken. Durch die Analyse der Gewebe sowohl sich entwickelnder Embryonen und auch adulter Tiere auf Donoranteile hin, kann im Nachhinein auf das Differenzierungspotenzial injizierter SSZ geschlossen werden.

6.2 Isolation der zu injizierenden Stammzellpopulationen

In der Literatur sind neben den eingangs zitierten, weitere Veröffentlichungen publiziert worden (Jackson et al. 1999; Brazelton et al. 2000; Orlic et al. 2001). Bei den in diesen Studien verwendeten Zellen handelte es sich allerdings um weniger hoch aufgereinigte Fraktionen murinen Knochenmarks oder Zellfraktionen anderer Gewebe. Genauere Analysen der Versuche von Jackson et al., in denen die hämatopoetische Repopulation als eine Eigenschaft von Muskelstammzellen interpretiert worden war, ergaben, dass dies nicht zutrifft. Es konnte bewiesen werden, dass zusammen mit den Muskelzellen HSZ transplantiert worden waren, die für die gebildeten Blutzellen verantwortlich waren (Kawada et al. 2001; McKinney-Freeman et al. 2002). Es handelt sich also nicht um eine Transdifferenzierung von Muskelstammzellen zu Blutzellen.

Um eine valide Interpretation über das Entwicklungspotenzial einer Zellpopulation anhand der von ihr gebildeten Zellen in Embryonen und adulten Tieren zu treffen, ist es daher wichtig, eine homogene, definierte Zellpopulation zu verwenden.

6.2.1 Isolation muriner HSZ

Murine HSZ wurden aus dem Knochenmark adulter wildtypischer und *bcl2* transgener Mäuse gewonnen. Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, kann selbst mit nur einer LIN^{-} , $c\text{-kit}^{+}$, $Sca1^{+}$ Zelle die Repopulation des zerstörten hämatopoetischen Systems erreicht werden.

Dass eine einzelne LIN^{-} , $c\text{-kit}^{+}$, $Sca1^{+}$ Zelle in der Lage ist das hämatopoetische System eines Tieres über die gesamte Lebensspanne zu erhalten, wurde Anfang der 90iger Jahre in einer Publikation von C.T. Jordan et al. gezeigt (Jordan et al. 1990). Dies demonstriert das außerordentlich hohe Proliferationspotenzial der isolierten LIN^{-} , $c\text{-kit}^{+}$, $Sca1^{+}$ Zellen sowie die hohe Reinheit der LIN^{-} $c\text{-kit}^{+}$, $Sca1^{+}$ Population bezüglich ihrer HSZ Aktivität. Zellen des gleichen Phänotyps wurden ebenfalls von Osawa und Kollegen für die Repopulation adulter Empfängertiere verwandt, dabei wurden ähnliche Frequenzen für HSZ in der LIN^{-} $c\text{-kit}^{+}$, $Sca1^{+}$ Po-

pulation erhalten wie in der vorliegenden Arbeit (Osawa et al. 1996). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Resultate, die nach Blastozysteninjektion erhalten wurden, das Differenzierungspotenzial von HSZ darstellen und nicht durch die gleichzeitige Injektion anderer z.B. mesodermaler Stammzellen verfälscht wurde.

Die optimale Ausgangspopulation wären allerdings individuell markierte HSZ. Murine HSZ können durch die zufällige Integration eines retroviralen Genoms individualisiert werden (Capel et al. 1989; Capel et al. 1990). Anhand individueller HSZ ließe sich Plastizität unzweifelhaft nachweisen (Lemischka 2002). Die Infektion durch Retroviren erfordert aber die *in vitro* Kultur der HSZ, welche jedoch zu einer Veränderung der HSZ führt (Szilvassy et al. 2001). Die durch die Kultur entstehende Unsicherheit wurde durch die direkte Isolation und Transplantation umgangen. Eine Möglichkeit, die *in vitro* Kultur zu umgehen, wäre die Injektion von jeweils nur einer HSZ pro Blastozyste. Publierte Daten von Krause und Kollegen über die Transplantation von einer HSZ in bestrahlte adulte Tiere legen diesen Ansatz nahe (Krause et al. 2001). Dies würde auch die klonale Verwandtschaft aller detektierten Donorzellen zeigen.

6.2.2 Isolation humaner HSZ

Für die Isolation humaner HSZ gibt es noch keine Marker, mit denen eine Reinheit vergleichbar mit der im murinen System erreicht werden kann. Das hat unter anderem seinen Grund darin, dass humane HSZ Fraktionen nicht in limitierenden Verdünnungen im Menschen, sondern nur *in vitro* oder in Tiermodellen getestet werden können (Larochelle et al. 1996; Conneally et al. 1997). Publierte Daten aus dem Labor von J. Dick zeigen, dass humane HSZ in der CD34⁺/CD38⁻ Population hoch angereichert sind (Dick et al. 1997). In einem Tiermodell, in dem humane CD34⁺/CD38⁻ Zellen in bestrahlte NOD/SCID Mäuse injiziert werden, wurde von Bahtia und Kollegen eine Frequenz von statistisch einer unter 617 humanen CD34⁺/CD38⁻ Zellen mit der Fähigkeit, das hämatopoetische System einer letal bestrahlten NOD/SCID Maus zu repopulieren, ermittelt (Bhatia et al. 1997). Die tatsächliche Frequenz dürfte aber höher liegen, da die für die Migration in das Knochenmark nötigen Oberflächmoleküle und die für die Proliferation nötigen Wachstumsfaktoren der Maus nur zum Teil mit den humanen Orthologen interagieren. Deshalb ist anzunehmen, dass die gemessene Frequenz geringer als die wahre ausfällt (Shiota et al. 1992; Zanjani et al. 1992; van der Loo et al. 1995; Lapidot 2001).

In einem Bericht von Ziegler und Kollegen wurde gezeigt, dass durch Isolation von Zellen aus dem Nabelschnurblut, die den KDR Rezeptor exprimieren, eine Anreicherung über die, die mit der CD34⁺/CD38⁻ Markerkombination erreicht werden kann, erzielt wurde (Ziegler et al. 1999). Durch eine Kollaboration mit dem Labor von C. Peschle konnten wir diese Zellen ebenso in Blastozysten injizieren (Harder 2001). Wir konnten eine Steigerung der Donoranteile beobachten, während die Verteilung auf die Gewebe von E12,5 Embryonen verglichen mit Ergebnissen von CD34⁺/CD38⁻ Injektionen unbeeinflusst blieb. Dies spricht für ein höheres Proliferationspotenzial der KDR⁺ Zellen, nicht aber für einen von CD34⁺/CD38⁻ Zellen funktional verschiedenen Zelltyp.

Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Isolation der CD34⁺/CD38⁻ Zellen aus Nabelschnurblut verwandt (Bhatia et al. 1997).

6.2.3 Isolation muriner NSZ

Murine NSZ wurden für die Versuche aus den Cortices von E14,5 Föten gewonnen. Die Anreicherung von Zellen mit NSZ Aktivität erfolgte dabei durch mindestens 4 wöchige *in vitro* Kultur. Unter den verwendeten Bedingungen vermehren sich NSZ, so dass durch wiederholtes Passagieren die Zellen mit hohen Proliferationsraten angereichert werden und nicht proliferierende Zellen verloren gehen. Durch lineare Regressionsbestimmung konnte dabei eine Frequenz von 3% neue Neurosphären initiiierenden Zellen unter dissoziierten Neurosphärenzellen ermittelt werden (Kirchhof et al. 2002). Dieser Anteil klonogener Zellen in wachsenden Neurosphären entspricht den in der Literatur publizierten Werten (Reynolds et al. 1996).

Um für die Injektionsversuche den Anteil klonogener NSZ zu steigern, wurden am Vortag der Blastozysteninjektion Neurosphären vereinzelt und am Injektionstag selbst nur Mikrosphären injiziert. Mikrosphären sind kleine Zellaggregate aus zwei-acht Zellen, die auf eine vereinzelt Neurosphärenzelle zurückgehen. Durch diesen zusätzlichen Selektionschritt wurden proliferierende NSZ angereichert.

Während die *in vitro* Kultur trotz jahrelanger Forschung noch immer keine Möglichkeit bietet HSZ unverändert zu erhalten oder zu expandieren (Verfaillie 2002), können NSZ *in vitro* kultiviert werden (Reynolds et al. 1996). Es sollte daher möglich sein, NSZ retroviral zu markieren, um sie anschließend für die Blastozysteninjektion zu verwenden. Individualisierte NSZ Klone eröffneten die Möglichkeit, die klonale Verwandtschaft der in Embryos und adulten

Tieren gefunden Zellen eindeutig zu zeigen und damit Plastizität nachzuweisen (Lemischka 2002).

6.3 Injektion von Zellen in Blastozysten

Durch Injektion in Blastozysten ist es möglich die Pluripotenz von ES-Zellen zu demonstrieren (Beddington et al. 1989). Ebenso konnte dies für embryonale Karzinomazellen (EC-Zellen) und embryonale Keimzellen (EG-Zellen), die ebenso Stammzellcharakter haben, nachgewiesen werden (Mintz 1977; Matsui et al. 1992). Interessanterweise konnte in diesem System ermittelt werden, dass ES-Zellen sich in Kultur ändern und mit ansteigender Kulturdauer die Fähigkeit den ganzen Embryo zu bilden verlieren (Nagy et al. 1993). Eine weitere Beobachtung an ES-Zellen war, dass das Potenzial zu den Keimzellen chimärer Tiere beizutragen in Kultur verloren gehen kann, und dies, obgleich andere Gewebe noch hohe Anteile injizierter ES-Zellen aufweisen (Liu et al. 1997; Kondoh et al. 1999). Dies ist für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit besonders interessant, da injizierte ES-Zellen ihrem Potenzial entsprechend Zellen und Gewebe des sich entwickelnden Tier bilden. Daher kann angenommen werden, dass SSZ sich ebenso wie ES-Zellen ihrem Differenzierungspotenzial entsprechend an der Entwicklung des Embryos und des adulten Tieres beteiligen und so ihr Differenzierungspotenzial offenbaren.

Diese Ergebnisse geben den Rahmen der möglichen Resultate vor. Verhalten sich die injizierten Zellen wie ES-Zellen, sollte ein ausgewogener Chimärismus in allen Organen nachweisbar sein (Beddington et al. 1989). Sind die injizierten Zellen verschieden von ES-Zellen, so werden die Donorzellen in chimären Tieren auf wenige Gewebe beschränkt sein und von manchen Organen ganz ausgeschlossen sein (Berger et al. 1995; Shalaby et al. 1997). Fehlt den injizierten Zellen das Potenzial zur Proliferation, so werden im Embryo und im erwachsenen Tier die injizierten Zellen aufgrund des starken Wachstums während der Ontogenie verloren gehen. Andererseits dürfen die injizierten Zellen nicht zu stark proliferieren, da sonst der sich entwickelnde Embryo gestört wird und abstirbt (Hogan et al. 1994). Daneben muss die Proliferation der Zellen durch die Umgebung kontrolliert werden, z.B. durch Induktion von Differenzierung oder Apoptose, sonst entstehen letztendlich Tumore. Die Blastozyste stellt eine besondere Mikroumgebung dar, denn Zellen, die in adulten Tieren aufgrund eines Differenzierungsblocks ein tumorigenes Potenzial haben, können durch das Milieu der Blastozyste zur Differenzierung angeregt werden (Mintz et al. 1975; Mintz 1977).

Die sich daraus ableitende Vorhersage, dass Injektion transformierter Zellen mit kurzer Generationszeit und hohem Proliferationspotenzial zum Abort von mehr Embryonen als nicht transformierten Zellen führt, konnte durch den Vergleich der Anzahl wachsender Embryonen nach Injektion primärer humaner HSZ oder einer *in vitro* proliferierenden leukämischen Zelllinie gefunden werden (Dürr et al. eingereicht zur Publikation). Somatische adulte und fötale Stammzellen haben das Proliferationspotenzial und die Fähigkeit zur Differenzierung die Voraussetzungen die nötig sind um in diesem System chimäre Tiere zu bilden.

6.3.1 Injizierte Stammzellen 12-24 Stunden nach Injektion

Die Ergebnisse, unter Fluoreszenzlicht bzw. durch Immunfärbung erhalten, zeigen, dass injizierte Zellen sich im Blastozoele befinden und somit an der Entwicklung des Embryos teilnehmen können (Abbildung 6, Abbildung 10, Abbildung 15). Zudem ist der Kontakt der injizierten Zellen zur Inneren Zellmasse und dem Trophektoderm sichtbar, wodurch die Zellen den Stimuli der Mikroumgebung Blastozyste ausgesetzt werden.

6.3.2 Donoranteile in sich entwickelnden Embryonen am Tag E12,5

Alle drei untersuchten Stammzelltypen waren in Lage, mit den sich entwickelnden Embryonen chimäre Tiere zu bilden. Dabei zeigen sich zwischen den erhaltenen Ergebnissen Gemeinsamkeiten und Unterschiede.

Murine und humane HSZ und ihre Nachkommen waren präferentiell in den hämatopoetischen Geweben Dottersack, fötale Leber und fötales Blut zu finden. Im Unterschied zu wildtypischen murinen HSZ war der Anteil durch *bcl2* transgene murine HSZ um bis zu eine Größenordnung erhöht (Abbildung 7) (Geiger et al. 1998). Während für einige Genprodukte bekannt ist, dass sie die Differenzierung bzw. die Migration von HSZ beeinflussen (Hirsch et al. 1996; Rolink et al. 1999), war über die Wirkung von *bcl2* Überexpression nur bekannt, dass die Zahl der HSZ in transgenen Mäusen leicht erhöht ist (Domen et al. 2000). Die Ergebnisse der organotypischen Verteilung unterstützten die Vermutung, dass die Differenzierung von HSZ unbeeinflusst ist von der BCL2 Überexpression. Die Zunahme des Donoranteiles lässt sich durch die antiapoptotische Wirkung des BCL2 Gens erklären (Gibson et al. 1996). Für das Überleben von HSZ sind *in vivo* und *in vitro* Wachstumsfaktoren und Kontakte zu stromalen Zellen entscheidend (Williams et al. 1990; Wineman et al. 1993; Muller-Sieburg et al. 1995). Durch den Transfer in die Blastozyste werden den HSZ diese für das Überleben wichtigen

Stimuli entzogen und eine Folge davon ist Apoptose (Domen et al. 1999). Die Überexpression des BCL 2 Proteins kann dies zu einem Teil verhindern (Domen et al. 1998; Domen et al. 2000). Wahrscheinlich ist das Überleben eines größeren Anteils injizierter Zellen dafür verantwortlich, dass sich ein höherer Donoranteil ausbildete.

Der Anteil humaner HSZ in sich entwickelnden Embryonen war deutlich geringer, er lag mit maximal 20 humanen Zellen pro 100.000 murinen Zellen um den Faktor 10 niedriger als die Ergebnisse mit wildtypischen und um Faktor 100 niedriger als mit *bcl2* transgenen HSZ. Entscheidend für diese Unterschiede scheint vor allem die xenogene Umgebung, in der sich die humanen HSZ befinden zu sein (Zanjani et al. 1992; Flake et al. 1995). Murine Wachstumsfaktoren sind nur zum Teil in der Lage das Fehlen humaner Wachstumsfaktoren zu kompensieren. Dadurch sind humane HSZ in der murinen Umgebung weniger kompetitiv als murine HSZ (Dick 1991; Bock et al. 1995). Eine Möglichkeit den Anteil humaner Zellen in diesem System zu steigern wäre die Bereitstellung humaner Wachstumsfaktoren. Man könnte z.B. Mäuse verwenden, die diese als Transgene tragen (Bock et al. 1995) oder diese exogen applizieren.

Ebenso wie im Falle der humanen und murinen HSZ fanden sich die Nachkommen injizierter NSZ präferentiell in hämatopoetischen Geweben untersuchter Embryonen (Abbildung 16, Abbildung 17). Eine Ursache für dieses überraschende Ergebnis könnte sein, dass ein Teil der NSZ im sich entwickelnden Embryo in Kontakt mit Dottersackzellen gelangt ist, und dort einem Hämatopoese induzierenden Milieu ausgesetzt wurde. Dies wiederum könnte zur Bildung von hämatopoetischen Zellen durch die NSZ führen, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde (Abbildung 19, Abbildung 20). In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant zu überprüfen, ob sich ein solcher Schritt *in vitro* mithilfe von Dottersackzelllinien oder Trophektodermzelllinien nachvollziehen lässt (Yoder et al. 1995).

Die Resultate, die mit der Injektion muriner wildtypischer und *bcl2* transgener NSZ erhalten wurden, zeigten denselben Effekt auf den Grad des Chimärismus wie bei wildtypischen und *bcl2* transgenen HSZ (Abbildung 7, Abbildung 8). Wahrscheinlich spielen auch im Falle der injizierten NSZ fehlende Wachstumsfaktoren und die damit verbundene Apoptose eine entscheidende Rolle.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse stehen im Widerspruch mit im Jahr 2000 von Clarke und Kollegen publizierten Daten (Clarke et al. 2000). In dieser Arbeit wurden nach Injektion von NSZ in Blastozysten in sich entwickelnden Embryonen Nachkommen der NSZ in nahezu allen Geweben mit Ausnahme des Blutes gefunden. Die Bedingungen, die

von Clarke et al. verwendet wurden, scheinen dabei dieselben zu sein wie die in dieser Arbeit. Einen Hinweis auf eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Resultate wurde von Morshead und Kollegen veröffentlicht (Morshead et al. 2002). Sie versuchten, die Ergebnisse der Transdifferenzierung von NSZ zu Blutzellen, publiziert von Bjornson et al., zu reproduzieren (Bjornson et al. 1999). Während es ihnen nicht gelang die älteren Daten zu wiederholen, fanden sie epigenetische Veränderungen in den NSZ ihrer Kulturen. Diese Veränderungen, die zum Beispiel ein Wachstumsfaktor unabhängiges Wachstum der NSZ *in vitro* ermöglichten, könnten auch andere Expressionsmuster betroffen haben. Die von Morshead beobachteten Veränderungen wurden nicht in den für diese Arbeit verwendeten Zellen bemerkt (pers. Kommunikation Frau Dr. Kirchhof). Eine Erklärung für die Ergebnisse, die von Clarke und Kollegen gefunden wurden, wäre die Induktion eines Genexpressionsmusters ähnlich dem von ES-Zellen (Nichols et al. 1998). Hinweise, dass dies möglich ist, wurden von Arbeiten aus dem Labor von C. Verfaillie an Studien über mesodermale Stammzellen beschrieben (Reyes et al. 2001). Dadurch könnten Zellen entstehen, die funktionell ES-Zellen gleichen und nach Injektion in Blastozysten in der Lage sind, wie eine ES-Zelle zur Bildung aller Gewebe beizutragen.

Eine alternative Erklärung, die momentan kontrovers diskutiert wird, ist, dass beobachtete Plastizität von SSZ auf Zellfusion beruht. Dabei wird postuliert, dass die *in vitro* beobachtete Fusion von ES-Zellen mit HSZ oder NSZ sich ebenso *in vivo* ereignet und tetraploide Zellhybride entstehen (Terada et al. 2002; Wurmser et al. 2002; Ying et al. 2002). Die Zellhybride tragen sowohl SSZ als auch ES-Zell-Marker, haben aber ein ES-Zelldifferenzierungspotenzial und wären die Zellen, die verantwortlich für die erhaltenen Ergebnisse sind. Es gibt aber gravierende Unterschiede zwischen den Befunden über Zellfusion *in vitro* und den Ergebnissen, die nach Blastozysteninjektion erhalten wurden. Die Frequenz von Zellfusionen ist *in vitro* trotz eines applizierten Selektionsdrucks sehr gering. Im Gegensatz dazu sind die eingesetzten Zellzahlen bei Blastozysteninjektion verschwindend gering, nur etwa 30-50 SSZ werden pro Blastozyste injiziert. Die Innere Zellmasse, von der ES-Zellen abgeleitet sind, besteht zu diesem Zeitpunkt aus nur etwa 30 Zellen. Daher erscheint es als unwahrscheinlich, dass Zellfusion eine entscheidende Rolle spielt, besonders angesichts der Tatsache, dass die in dieser Arbeit beobachteten Daten mit hoher Frequenz beobachtet werden (Tabelle 2, Tabelle 6).

6.3.3 Hämatopoetische Zellen aus injizierten Stammzellen

Die Auswertung der Injektionen muriner und humaner HSZ sowie muriner NSZ in Blastozysten ergab konsistente Donoranteile in hämatopoetischen Geweben zur Mitte der Schwangerschaft. Während die Ergebnisse für murine HSZ auch von H. Geiger und Kollegen gefunden wurden (Geiger et al. 1998), konnte im Rahmen dieser Arbeit für humane HSZ gezeigt werden, dass Injektion humaner HSZ in murine Blastozysten und anschließende Entwicklung kompatibel mit der Ausbildung humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen sowie einer erythroiden Differenzierung ist (Abbildung 12, Abbildung 13). In der vorliegenden Arbeit wurde mit nur einer geringen Zahl humaner Zellen (Abbildung 10) eine Besiedelung des murinen hämatopoetischen Systems trotz der Konkurrenz mit dem endogenen murinen hämatopoetischen System erzielt (Harder et al. 2002). Zusätzlich zum Nachweis humaner Zellen in hämatopoetischen Geweben konnten humane Zellen mit *in vitro* klonogener Aktivität nachgewiesen werden. Durch RT-PCR wurden Transkripte der humanen Hämoglobingene nachgewiesen, die auf eine erythroide Differenzierung hindeuten (Harder et al. 2002). Dass eine Differenzierung humaner Zellen in erythroide Zellen in der Maus möglich ist, wurde auch von Hogan und Kollegen gezeigt (Hogan et al. 1997). Verglichen mit der in dieser Arbeit eingesetzten Anzahl humaner HSZ wurden in den adulten Transplantationsmodellen hohe Zellzahlen eingesetzt. Dies zeigt das große Proliferationspotenzial der injizierten Zellen sowie die Eignung des Systems zur Analyse humaner HSZ.

Ende der 80iger Jahre wurde von McCune und Kollegen ein Mausmodell zum Studium der humanen Hämatopoese entwickelt, das später modifiziert wurde um humane Zellen auf ihre hämatopoetische Stammzellpotenz hin zu testen (McCune et al. 1988; McCune et al. 1989; Bhatia et al. 1997; Dick et al. 1997). Die Transplantation humaner Zellen in adulte Mäuse, und die Analyse des daraus erwachsenden Chimärismus des hämatopoetischen Systems wurde als ein Tiermodell zum Testen der Stammzellpotenz injizierter Zellfraktionen etabliert. Dabei stellte aber die Abstoßung durch das murine Immunsystem ein großes Hindernis dar (McCune et al. 1989; Kyoizumi et al. 1992; Greiner et al. 1995). Um diese Problematik zu umgehen wurden humane Zellen entweder in immuninkompetente Mausmodelle injiziert, oder aber in Tiermodelle in denen der Empfänger sich in seiner Entwicklung noch vor der Ausbildung eines Immunsystems befindet, z.B. fötale Schafe (McCune et al. 1988; Zanjani et al. 1991; Srour et al. 1992; Zanjani et al. 1997). Der entscheidende Fortschritt, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemacht werden konnte, war, dass trotz weniger eingesetzter huma-

ner Zellen und ohne den Einsatz immundefizienter Modelle eine Besiedlung der murinen hämatopoetischen Gewebe erreicht wurde,.

Die Injektion humaner Stammzellen in murine Blastozysten eröffnet die Möglichkeit verschiedene murin-humane Organsystemchimären herzustellen. Auch wenn der Chimärismus gering wäre, könnte dies ausreichen um einige Fragen bezüglich der Wirkung von Medikamenten zu beantworten.

Die Analyse der hämatopoetischen Donoranteile in Embryonen nach Injektion muriner NSZ hatte gezeigt, dass an E12,5 in allen Embryonen Nachkommen der NSZ in mindestens einem der fötalen hämatopoetischen Gewebe Dottersack, Leber oder Blut zu finden sind (Abbildung 17 und Tabelle 6). Zudem konnte mithilfe von RT-PCR die Expression erythroid spezifischer Gene durch Nachkommen injizierter NSZ nachgewiesen werden (Abbildung 19). Weitere Untersuchungen demonstrierten die Existenz von Zellen, in E8,25 Dottersäcken chimärer Embryonen, mit der Fähigkeit unter hämatopoetischen Bedingungen *in vitro* wachsen zu können (Abbildung 20). Die Seltenheit von Nachkommen injizierter NSZ in hämatopoetischen Geweben adulter Tiere verglichen mit der in Embryonen ist aufgrund der Eigenheit der Entwicklung des hämatopoetischen Systems gut nachzuvollziehen. Die Ontogenie des hämatopoetischen Systems bringt zwei Wellen hervor: die erste die primitive, geht vom Dottersack aus und wird im Laufe der weiteren Entwicklung durch die zweite, die definitive, die von der AGM Region ausgeht, ersetzt (Müller et al. 1994; Dzierzak 1999). Die Expression des embryonal spezifischen β -Globin Gens, sowie das Vorhandensein klonogener Zellen im E8,25 Dottersack deuten beide auf einen primitiven Charakter der Blutzellen, entstanden aus den injizierten NSZ, hin (Strouboulis et al. 1992; Palis et al. 2001). Das Fehlen einer massiven hämatopoetischen Kontribution in adulten Tieren unterstützt die Hypothese, dass es sich bei den Blutzellen im frühen Embryo tatsächlich um Zellen der primitiven Hämatopoese handelt. Interessant wäre es zu untersuchen, ob es möglich ist, die aus den NSZ entstandenen hämatopoetischen Vorläufer durch einen sekundären Transfer zur Repopulation der definitiven Hämatopoese zu verwenden. In Arbeiten von M. Yoder wurde nachgewiesen, dass HSZ, gewonnen aus dem Dottersack, durch medikamentöse Konditionierung neugeborener Empfänger-mäuse das definitive hämatopoetische System der Neugeborenen repopuliert werden kann (Yoder et al. 1997). Von Kyba und Kollegen wurde nachgewiesen, dass durch die Überexpression von HoxB4 in primitiven HSZ diese zu adult repopulierenden gemacht werden (Kyba et al. 2002). Ebenfalls aus der Literatur ist bekannt, dass es Stromazelllinien gibt, die HSZ der primitiven Hämatopoese in HSZ mit der Potenz die definitive Hämatopoese zu bil-

den, umwandeln können. Würde dies gelingen, gäbe es eine Möglichkeit in einem Zweischrittverfahren aus NSZ HSZ mit der Potenz zu Repopulation eines definitiven hämatopoetischen Systems herzustellen.

6.3.4 Donoranteile in adulten Tieren

Injektion der drei untersuchten Stammzelltypen in Blastozysten führte zu chimären Embryonen und zum Wachsen adulter Tiere (Tabelle 4 und Tabelle 7).

Murine HSZ zeigten dabei ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis bei den Donoranteilen in neuralen und hämatopoetischen Geweben. Dies könnte an den in allen Geweben vorhandenen Blutzellen liegen, die für die positiven Signale in primär nicht hämatopoetischen Geweben verantwortlich waren.

Andererseits gab es auch chimäre Tiere, die keine Donoranteile im Blutsystem aufwiesen, aber in deren nicht hämatopoetischen Geweben Donoranteile nachweisbar waren. In diesen Fällen ist es denkbar, dass Donorzellen in nicht hämatopoetischen Geweben auf eine Transdifferenzierung der injizierten HSZ in andere Zelltypen zurückgehen. In der Literatur sind Daten über Transdifferenzierung von HSZ in hämatopoetische Zellen nach Injektion bekannt (Gussoni et al. 1999; Lagasse et al. 2000; Mezey et al. 2000). Letztendliche Klärung wird nur über die *in situ* Charakterisierung der Donorzellen in Verbindung mit der Injektion von nur einer Zelle möglich sein.

Die Ergebnisse, die durch die Analyse chimärer Tiere, die durch die Injektion humaner CD34⁺ Zellen erzielt wurden, sind qualitativ denen, gewonnen in Versuchen mit murinen HSZ, gleich. Es wurden allerdings nur vier Tiere untersucht. Bei diesen wiesen sowohl neurale als auch hämatopoetische Gewebe Donoranteile auf. Prinzipiell ist auch hier denkbar, dass es sich bei den detektierten Zellen um Blut- bzw. Nervenzellen handelt. Im Unterschied zu den Ergebnissen mit murinen HSZ wurden bei diesen Versuchen allerdings weniger stark aufgereinigte Zellen eingesetzt, die eine Kontamination durch nicht hämatopoetische Stamm- oder Vorläuferzellen möglich macht (Peichev et al. 2000). Daher ist es möglich, dass die detektierten Donorzellen in neuralen Geweben auf nicht hämatopoetische Zellen unter den injizierten zurückgehen (Abbildung 14). Dies könnten mesodermal Stammzellen sein, aus denen Bindegewebszellen hervorgegangen waren, die um periphere Nerven zu finden sind. Spekulativ bleibt die Annahme einer Transdifferenzierung zu nicht hämatopoetischen Zellen. Aus Arbeiten von Shih und Kollegen ist bekannt, dass humane NSZ *in vivo* in humane Blutzellen

transdifferenzieren können (Shih et al. 2001). Interessanterweise ergaben die Analysen erwachsener Tiere, die sich aus Blastozysteninjektionen mit humanen HSZ entwickelt hatten, dass das Muster der Donoranteile dem Muster, erhalten durch murine HSZ, nahezu gleicht. Wenngleich noch weitere Tiere analysiert werden müssen, um dies abschließend beurteilen zu können, so kann doch vermutet werden, dass sich mit diesem System humane Zellpopulationen auf ihre Entwicklungspotenz untersuchen lassen. Durch die xenogene Situation bietet der human-murine Chimärismus den Vorteil, dass sich murine Zellen selektiv abtöten lassen und im Gewebe vorhandene humane Zellen zur Amplifikation angeregt werden können. So werden z.B. anti-Maus FasL Antikörper zum abtöten muriner Hepatozyten eingesetzt (Mignon et al. 1998). In Verbindung mit der enormen Regenerationsfähigkeit von Hepatozyten ist es eine attraktive Vorstellung dadurch murines Lebergewebe *in vivo* durch humanes zu ersetzen um dadurch ein Tiermodell für humane Lebererkrankungen zu erhalten.

Die Analyse adulter Tiere, die aus mit murinen NSZ injizierten Blastozysten hervorgegangen waren, ergab, dass vor allem neurale Gewebe durch Nachkommen der injizierten NSZ besiedelt wurden. Neben dieser präferentiellen neuronalen Aktivität der NSZ wurden mit geringerer Frequenz auch Signale im hämatopoetischen System gefunden. Nicht neurale Signale waren allerdings seltener und im Grad geringer (Abbildung 21). Eine Publikation aus dem Labor von J. Frisen zeigte, dass NSZ nach Injektion in Blastozysten in Embryonen zu nahezu allen Geweben beitragen können. Leider wurden in dieser Arbeit keine Angaben über den Chimärismus in adulten Tieren gemacht (Clarke et al. 2000). In der Literatur sind daneben einige Berichte über das Differenzierungspotenzial muriner und humaner NSZ bekannt, die berichten, dass NSZ zum Beispiel Blutzellen gebildet haben (Bjornson et al. 1999; Shih et al. 2001) und dass NSZ in Kokultur mit Myoblasten zu Myozyten differenzieren können (Galli et al. 2000), so dass es möglich erscheint, dass NSZ prinzipiell zu heterologen Zellen differenzieren können.

In dieser Arbeit wurde auf Kryoschnitten des Nervus Ischiadicus (Abbildung 22) durch Anfärben der Donornuklei die Präsenz von Donorzellen gezeigt. Kernhaltige Zellen in peripheren Nerven sind zum überwiegenden Teil Astrozyten und nur zu einem kleinen Teil Oligodendrozyten. Die Hülle der Nerven wird durch Fibroblasten aufgebaut (Uni Mainz 2002). Aus der Entwicklungsbiologie der Neuralentwicklung ist bekannt, dass sich das periphere Nervensystem nicht von Stammzellen des Zentralnervensystems, sondern von den Neuralleistenzellen ableitet. Diese bilden in der Embryonalentwicklung eine Reihe sehr verschiedener Gewebe, z.B. Melanozyten die Muskulatur und Knochen des Gesichtes (Huszar et al. 1991; Sarkar

et al. 2001). Es ist daher denkbar, dass aus den injizierten NSZ Zellen der Neuralleiste geworden waren, die wiederum zu nicht neuronalen Zellen differenzieren konnten (Shah et al. 1996).

6.4 Modell zur Transdifferenzierung

Die in der Literatur beschriebenen Daten zu somatischen Stammzellen sowie die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden, können in einem Modell zusammengefasst werden:

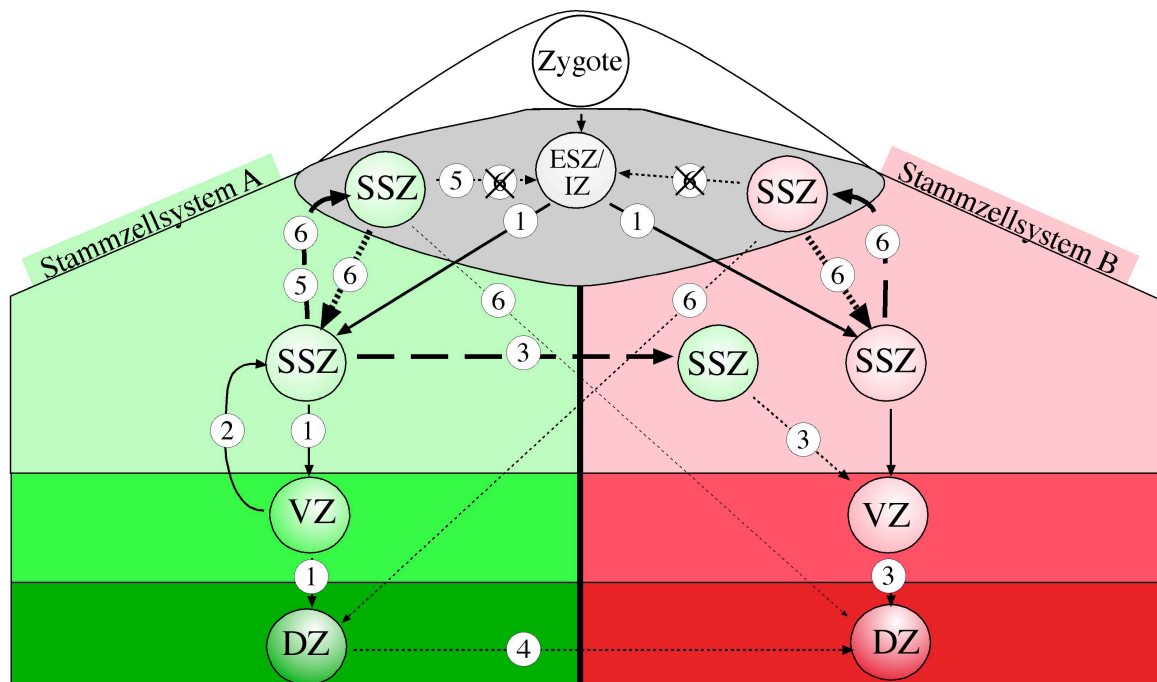


Abbildung 23: Gezeigt sind mögliche Pfade der Differenzierung von Stammzellen und ihren Nachkommen. Vier verschiedene Bereiche sind farblich gekennzeichnet: weiß: totipotente Zellen (Zygote und Zellen der Morula); grau: pluripotente Zellen (Innere Zellmasse und ES-Zellen); grün: multipotentes somatisches Stammzellensystem, (z.B. das neurale); rot: multipotentes, somatisches Stammzellensystem (z.B. das hämatopoetische). Experimentelle Eingriffe, bei denen Zellen in eine andere Mikroumgebung gebracht wurden, sind durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet, gepunktete Pfeile stellen experimentell gefundene Transdifferenzierungen dar, durchgezogene Linien stehen für Differenzierung innerhalb eines Stammzellensystems. Mit Zahlen gekennzeichnete Pfade werden im folgenden Abschnitt näher erläutert. ESZ/IZ, ES-Zelle bzw. Innere Zellmasse; SSZ, somatische Stammzelle VZ, Vorläuferzelle; DZ, differenzierte Zelle.

Die in der Literatur etablierte Sicht der Differenzierungswege in einem somatischen Stammzellensystem sind mit der Ziffer 1 gekennzeichnet. Die SSZ bringt dabei über die Zwischenstufe einer Vorläuferzelle differenzierte Zellen hervor (Abbildung 23). Die Differenzierung verläuft unidirektional von der Stammzelle hin zu den differenzierten Zellen (Morrison et al. 1995).

In Arbeiten von Kondo und Kollegen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Vorläuferzellen das Differenzierungspotenzial von Stammzellen wiedererlangen können (Kondo et al.

2000). Die Unidirektionalität der Differenzierung einer SSZ über die Vorläuferzelle hin zur Effektorzelle wurde dadurch widerlegt. In einer theoretischen Arbeit von I. Roder und M. Loeffler wurde daher inkorporiert, dass eine Vorläuferzelle mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eine weniger differenzierte Zelle, also eine Stammzelle hervorbringen kann (mit der Ziffer 2 markierter Pfeile) (Loeffler et al. 2002).

Arbeiten aus dem Labor von A. Vescovi an NSZ zeigten die Fähigkeit von NSZ, *in vivo* hämatopoetische Zellen bilden zu können (mit der Ziffer 3 markierte Pfeile) (Bjornson et al. 1999). Für diese Versuche wurden NSZ in bestrahlte Mäuse transplantiert. Nach 22 Wochen konnten von den NSZ abstammende hämatopoetische Vorläuferzellen und differenzierte Zellen nachgewiesen werden.

Arbeiten von Klinken und Kollegen zeigten, dass selbst differenzierte Zellen eine neue Identität annehmen können, wenn durch Überexpression von Oncogenen das Genexpressionsmuster gestört wird (mit der Ziffer 4 markierter Pfeil) (Klinken et al. 1988). Dies deutet darauf hin, dass nicht nur Stammzellen *in vivo*, sondern dass differenzierte Zellen durch Störung ihres Genexpressionsmusters zur Annahme einer heterologen Identität gebracht werden können.

Im Gegensatz zu den Arbeiten aus dem Labor von A. Vescovi, in denen untersucht wurde, ob NSZ ein zerstörtes hämatopoetisches System aufbauen können bearbeiteten Clarke und Kollegen die Frage, welche Zellen von NSZ prinzipiell gebildet werden können. Die Durchführung des Experiments ist in der Abbildung 23 mit der Ziffer 5 gekennzeichnet. NSZ wurden in Blastozysten transplantiert und anschließend, zur Mitte der Schwangerschaft, wurden die Donoranteile in Geweben sich entwickelnder Embryonen bestimmt. Clarke und Mitarbeiter fanden in nahezu jedem Gewebe Donoranteile der injizierten NSZ. Ihre Ergebnisse können so interpretiert werden, dass SSZ durch Exposition zu einer embryonalen Mikroumgebung das Differenzierungspotenzial von ES-Zellen erreichen, daher ist der gepunktete Pfeil von der grünen SSZ zur ESZ mit der Ziffer 5 markiert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente sind in der Abbildung mit der Ziffer 6 markiert. Es wurde das Differenzierungspotenzial zweier verschiedener SSZ-Typen, NSZ und HSZ, evaluiert. Dazu wurden die SSZ in Blastozysten transplantiert und die Donoranteile in sich entwickelnden Embryonen bestimmt. Es zeigte sich, dass NSZ und HSZ nicht das Differenzierungspotenzial von ES-Zellen erreichen. Dies wird durch eine durchgestrichenen Ziffer 6 gekennzeichnet Pfeil angedeutet. NSZ trugen in adulten Mäusen vorwiegend zu neuralen Geweben bei, während HSZ in adulten Mäusen neurale und hämatopoetische Gewebe nahezu gleich häufig besiedelten.

Die Ergebnisse von Clarke und Kollegen scheinen diesen Resultaten zu widersprechen, denn sie hatten gefunden, dass NSZ nach Mikroinjektion in Blastozysten in der Lage waren alle Zellen des Embryos zu bilden wie dies von ES-Zellen bekannt ist (mit 5 markierter Pfeil). Die Beobachtung von Clarke und Kollegen muss vorsichtig beurteilt werden, denn sowohl für NSZ, als auch für MSZ wurde bewiesen, dass diese sich in Kultur ändern (Reyes et al. 2001) (Morshead et al. 2002). Es ist daher fraglich, ob die injizierten Zellen tatsächlich NSZ waren, oder ob es sich bei den untersuchten Zellen nicht um eine *in vitro* proliferierende Zelllinie handelt, die nur noch wenig mit der anfänglichen NSZ gemein hatte.

Dass eine extensive Proliferation ganz entscheidend für Transdifferenzierung ist, wurde unabhängig schon vor langer Zeit im *Drosophila* Tiermodell gezeigt (Maves et al. 1999). In der *Drosophilalarve* gibt es Vorläuferzellen, die bis zu einem gewissen Grad festgelegt sind auf die kutikulären Strukturen, die sie im Imago bilden werden. Durch ausgedehntes Proliferieren konnten diese Einschränkungen aufgeweicht werden und es wurden durch die Vorläuferzellen heterologe Strukturen gebildet, z.B. statt eines Beines ein Flügel (Wei et al. 2000). Zudem konnte im Drosophilasystem gezeigt werden, dass die Expression von HOX- Genen notwendig ist für den Erhalt der Identität einer Vorläuferzelle (Johnston et al. 1996; Maves et al. 1998). HOX-Gene haben Einfluss auf die Identität von SSZ und könnten so ein Schlüssel zur Modifikation von SSZ sein (Sauvageau et al. 1995; Wei et al. 2000; Kyba et al. 2002).

7 Material und Methoden

7.1 Zellkulturmedien und Wachstumsfaktoren

Name	Hersteller
M2 Medium	Sigma
M16 Medium	Sigma
DMEM high Glucose	Sigma
IMDM	Pan
Fötales Kälberserum	Biochrom KG
MethoCult	Stem Cell Technologies
Rekombinantes humanes G-CSF	Stem Cell Technologies
Rekombinantes humanes SCF	Stem Cell Technologies
Interleukin 3 (IL3) , human	Stem Cell Technologies
Interleukin 3 (IL3) , murin	Stem Cell Technologies
PMS	Intervet
HCG	Intervet
Erythropoietin	Amgen
DNase	Sigma
L-Glutamine	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Bovines Serum Albumin	Boehringer Mannheim
MACS-Puffer	PBS/ 0,3% BSA (vol/vol)
Mercaptoethanol	Merck

7.2 Antikörper

7.2.1 Monoklonale primäre Antikörper

Name	Hersteller	Bezeichnung des Klons	Zelltypspezifität
Anti-GR1	aus eigener Herstellung	RB6-8C5□Ratte	Granulozyten
Anti-Mac-1	aus eigener Herstellung	M1/70; Ratte	Makrophagen CD11b
Ter119	aus eigener Herstellung	Ratte	Erythroide Zellen
Anti-CD8	aus eigener Herstellung	53-6.72□Ratte	Cytotoxische T-Zellen, und einige T-Zellvorläufer
Anti-CD4	aus eigener Herstellung	Gk1.5; Ratte	Helfer T-Zellen, und einige T-Zellvorläufer
Anti-B220	aus eigener Herstellung	RA3-6B2; Ratte	B-Zellen und B-Zellvorläufer
Anti-c-kit	aus eigener Herstellung	ACK-4	Hämatopoetische Vorläufer- und Stammzellen
Anti-Sca 1	aus eigener Herstellung	E13.161.7	Hämatopoetische Vorläufer- und Stammzellen
Anti-HLA-ABC	Pharmingen	Maus (#32219A)	Alle humanen Leukozyten

7.2.2 Polyklonale sekundäre Antikörper

Name	Hersteller	Bezeichnung des Klons	Zelltypspezifität
Anti Ziege IgG-Biotin	Jackson Immuno-research	Kaninchen	Alle Ziegenimmunglobuline
Microbeads gekoppelte Ziege anti Ratte IgG F(ab)₂	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach		Alle Rattenimmunglobuline
Anti- Maus IgG-MeerrettichPeroxidas	Dianova	Ziege	Alle Mausimmunglobuline

7.2.3 Fluorophore zum Markieren gebundener Antikörper

Name	Hersteller
Streptavidin-Red670	Gibco

7.3 Laborchemikalien

Name	Hersteller
Agrose NEEO (Ultra-Qualität)	Roth AG
Chloroform-Phenol	Applichem
Dextransulfat	Amersham Pharmacia Biotech AG
Ethanol	Applichem
Ficoll	Sigma
Isopropanol	Applichem
NaOH	Applichem
HCl rauchende	Applichem
Polyvinyl-pyrrolidone	Sigma
Natriumcitrat	Applichem
Natirumborat	Applichem
Ethylendiaminotetraessigsäure	Applichem
Natriumchlorid	Applichem
Kaliumchlorid	Applichem
Dimethylpolysiloxan 50/100 und 200 centistokes	Sigma
Wasser Ultrapure	Merck

7.4 Enzyme

Name	Hersteller	Konzentration
Collagenase	Stem Cell Technologies	10U/ μ l
Proteinase K	Sigma	10 ⁵ U/ μ l
RNase	Sigma	15 ⁵ U/ μ
DNaseI	Sigma	15U/ μ l

7.5 Laborgeräte und Verbrauchsmittel

Gerät /Verbrauchsmittel	Hersteller
T3 Thermocycler	Biometra Göttingen
Trio Thermoblock	Biometra Göttingen
Uno Thermoblock	Biometra Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank	Forma Scientific
Zentrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus
Mikroskop IMDRB	Leitz
Mikroskop Telofal 31	Zeiss
Ultraviolett Crosslinker	Amersham Life Sciences

7.6 RNA Isolierung und Reverse Transkription und PCR

Name	Hersteller	Konzentration
peqGOLD RNAPure	PeqLab	
Cloroform	Applichem	100%
Omniscript Reverse Transkriptase	Quiagen	1U/ μ l
Omniscript Puffer RT	Quiagen	10X
dNTP Mix, für RT	Quiagen	5mM
RNase-free water	Quiagen	
Hexamer Primer	Roche	200ng/ μ l
SuperTaq-Polymerase	HT Biotechnology Ltd.	5000 \square U/ml
SuperTaq-Puffer	HT Biotechnology Ltd.	10X
dNTPs, PCR	Life Technologie	10 \square mM

7.7 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 MACS Puffer unter sterilen Bedingungen gewonnen. Anschließend wurde das im MACS Puffer befindliche Knochenmark auf Eis resuspendiert und mechanisch (durch Auf und Abpipettieren der Suspension in einer 1000 μ l Pipette) in eine Einzelzellsuspension überführt. Danach wurde für 6⁵min bei 200 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde in 5-10 ml Gey-Solution resuspendiert und auf Eis stehen inkubiert. Durch die Zugabe der hypotonischen Geys-Solution werden die Erythrozyten in der Zellsuspension lysiert. Nach 6 min. wurde die Zellssuspension mit 1,5 ml 10%igem BSA unterschichtet und für 7 min. bei 200g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem der Überstand abgesaugt war, wurde das Zellpellet in MACS Puffer resuspendiert und zum Abtrennen eventuell entstandener Klumpen durch eine Spritze mit einem aufgeklebten Nylonnetz mit 50 μ m Maschenweite gedrückt. Anschließend wurde die Lebendzellzahl pro Volumen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

7.8 Aufreinigung hämatopoetischer Vorläufer- und Stammzellen aus dem Knochenmark adulter Mäuse

Als Puffer und Waschlösung wurde auf 4°C gekühlter MACS-Puffer verwendet. Sämtliche Einzelschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen und auf Eis. Aus den Hinterbeinen einer Maus wurde aus Tibiae und der Femura die Knochenmarkszellen gewonnen. Die Zellen wurden nun 20 min mit der Linienantikörpermischung inkubiert. In dieser Mischung befinden sich 6 verschiedene monoklonale Antikörper aus der Ratte, die gegen murine Epitope auf differenzierten Zellen des murinen hämatopoetischen Systems vorhanden sind, siehe Antikörperliste. Die Zellen wurden danach 2 mal in je 20 ml MACS-Puffer gewaschen. Anschließend die Knochenmarkszellen bei 4°C 20min mit kolloidalen super-paramagnetischen Microbeads, die an Ziege-anti Ratte Ig(H+L) F(ab')₂ Antikörperfragmente gekoppelt sind, inkubiert. Nicht gebundene Microbeads wurde durch zweimaliges Waschen mit je 20ml MACS Puffer entfernt. In der Zwischenzeit wurde die Trennsäule, eine Plastikröhre mit Eisenmatrix (oberflächenbehandelte Stahlwolle) darin, mit MACS-Puffer befüllt und in den Separationsmagneten gespannt. Zur Trennung wie auch zum Waschschrift wurde eine G23 Kanüle zur Regulation

der Durchflussgeschwindigkeit benutzt. Die zu trennende Zellsuspension wurde in einem Volumen von 5ml MACS Puffer auf die Säule gegeben und dreimal mit jeweils 5 ml MACS Puffer gewaschen. Linienpositive Zellen verbleiben dabei aufgrund der an ihre Oberfläche gebundenen paramagnetischen Antikörper in der Eisenmatrix der Säule, die liniennegativen Zellen wanderten durch die Säule durch. Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und die an die Säule verbliebenen Zellen wurden mit 5 ml Puffer aus einer über einen Dreiweghahn seitlich angebrachten Spritze gegen die Flussrichtung von der Matrix gespült. Diese Zellsuspension, die sich nun oberhalb der Matrix befand, wurde nochmals getrennt, nachdem die Säule wieder in das Magnetfeld verbracht worden war. Dazu wurde die Säule wieder dreimal mit je 5 ml MACS Puffer gespült. Beide Fraktionen der liniennegativen Zellen wurden danach vereinigt, da FACS-Analysen gezeigt hatten, dass die Reinheit beider Fraktionen vergleichbar war.

7.8.1 Aufreinigung hämatopoetischer Stammzellen aus der liniennegativen Zellfraktion der Knochenmarkzellen.

Die liniennegativen Zellen wurden in 250 μ l MACS Puffer aufgenommen und mit 1 μ l eines biotinlierten, polyklonalen Kaninchenserums gerichtet gegen Ziegenimmunglobuline für 15 min auf Eis inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit 20ml MACS Puffer entfernt. Anschließend wurden die Zellen wiederum in 250 μ l MACS Puffer resuspendiert und mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern, der eine gerichtet gegen Sca1, ein 18kDa Phosphatidylinositol-verankertes Membranprotein, der zweite gegen den Tyrosinkinase-rezeptor c-kit. Die fluoremetrische Isolation von HSZ erfolgte anschließend mittels eines FACSort. Die Expression beider Antigene bei gleichzeitigem Fehlen linienspezifischer Oberflächenmarker ist Merkmal hämatopoetischer Stammzellen.

7.9 Durchführung der Methylzellulosekultur

Für die Methylzellulosekultur wurde zuerst eine Basismischung erstellt, der dann in einem zweiten Schritt Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden.

Basismischung

30% vol/vol FCS

10% vol/vol BSA

100 U/ml Penicillin

100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

2mM L-Glutamin

$1 \cdot 10^{-4}$ M 2-Mercaptoethanol

40% vol/vol **MethoCult™M3134** ohne Wachstumsfaktoren

Dem Ansatz für die Quantifizierung muriner EryP wurden folgende Wachstumsfaktoren und Substanzen zugegeben, angegeben ist die Endkonzentration:

rekombinantes murines IL 3 10ng/ml

rekombinantes humanes Erythropoeitin 4U/ml

Transferrin 200 $\mu\text{g/ml}$

Insulin 10 $\mu\text{g/ml}$

In den Experimenten in denen präferentiell humane Vorläuferzellen wachsen sollten wurden folgende Faktoren eingesetzt, angegeben ist die Endkonzentration:

rekombinantes humanes IL 3 50ng/ml

rekombinantes humanes SCF 50ng/ml

rekombinantes humanes G-CSF 50ng/ml

Für einen Ansatz werden zu 2,7 ml Methylzellulosemedium mit Faktoren die dreifache Anzahl der zu testenden Zellen in 300 μl IMD-Medium gegeben. In 35mm Bakterialschalen (Greiner) werden 1ml dieser Medium-Zellmischung ausplattiert.

Die Methylzellulosekulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% relative Luftfeuchtigkeit für 6-10 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt.

7.10 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Ein zu untersuchende Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Einzellzellen überführt. 10µl der Suspension wurden entnommen und mit 10µl Trypanblau-Lösung gemischt. 10µl 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:

$$[\text{lebende Zellen / ml}] = \text{Anzahl der Zellen im Großquadrat} \times 10.000 \times 2$$

7.11 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zentrifugation für 15 min bei 20.000g, die DNA sollte als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar sein
- Entfernen des Überstandes und Zugabe von $700\ \mu\text{l}$ 70 %igem Ethanol
- Kräftig vortexen um das Pellet vom Reaktionsgefäß zu lösen
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g
- Zugabe von $700\ \mu\text{l}$ 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_2O

7.12 Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen

Zur Isolierung wurde die peqGold RNAPure Lösung der Firma PEQLAB, Erlangen verwendet. Diese Lösung enthält Guanidinisothiocyanat. Diese Reagenz lysiert die Zellen und denaturiert gleichzeitig RNasen. 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 $700\ \mu\text{l}$ peqGold RNAPure, kräftig schütteln, 5 min inkubieren
- Zugabe von $70\ \mu\text{l}$ RNase freies Chloroform, kräftig schütteln
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe von $700\ \mu\text{l}$ Isopropanol (RNase frei)
- Zentrifugation für 10 min bei 20.000g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zweimaliges Waschen mit 70%igem Ethanol
- Aufnehmen des RNA Pellets in $\text{DEPC-H}_2\text{O}$

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.

7.13 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:

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

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

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

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

7.14 Reverse Transkription

- 1 mg RNA wird in 14,5 μl RNase-freiem Wasser gelöst
- die RNA wird für 5 min 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
- 5,5 μl 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.

7.15 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 PCR eingesetzt wurden, wurden von MWG Biotech synthetisiert.

Myogenin-PCR

PCR-Ansatz:

5 μ l Puffer (10x)

1 μ l 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 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)

200 ng DNA

add 50 μ l H₂O

Zyklus:

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

Größe des Fragmentes: 245 bp

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

17 \square mod

PCR-Ansatz:

5 μ l Puffer (10x)
 1 μ l dNTPs (2,5 mM each)
 1 μ l MgCl₂ (25 mM/ μ l)
 100ng sense Primer (5'-GGATAATTCAG CTG ACT AAA CAG A-3')
 100ng antisense Primer (5'-TTCCGTTTAGTT AGG TGC AGT TAT-3')
 0,05 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
 200 ng DNA
 add 50 μ l H₂O

Zyklus:

5 min	94 °C] 40 Zyklen
1 min	94 °C	
1 min	60 °C	
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).

human Actin

PCR-Ansatz:

5 μ l Puffer (10x)
 1 μ 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 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
 abgeglichene Menge cDNA
 add 50 μ l H₂O

Zyklus:

5 min	95 °C	}	35 Zyklen
40 sec	95 °C		
40 sec	54 °C		
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 μ l Puffer (10x)

1 μ l dNTPs (2,5 mM each)

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

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

0,05 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)

abgegliche Menge cDNA

add 50 μ l H₂O

Zyklus:

5 min	94 °C	}	35 Zyklen
40 sec	94 °C		
40 sec	57 °C		
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 μ l Puffer (10x)1 μ l dNTPs (2,5 mM each)40ng β -Globin sense Primer (200 ng/ μ l; 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GCA ACC TCA-3')40ng β -Globin antisense Primer (200 ng/ μ l; 5'-GGT TGC CCA TAA CAG CAT CAG GAG T-3')120ng ϵ -Globin sense Primer (200 ng/ μ l; 5'-CTT TGG AGA TGC TAT TAA AAA CAT G-3')120ng ϵ -Globin antisense Primer (200 ng/ μ l; 5'-CCA GAA TAA TCA CCA TCA CGT TAC-3')40ng γ -Globin sense Primer (200 ng/ μ l; 5'-GAC CGT TTT GGC AAT CCA TTT C-3')40ng γ -Globin antisense Primer (200 ng/ μ l; 5'-GTA TTG CTT GCA GAA TAA AGC C-3')0,1 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)

abgegliche Menge cDNA

add 50 μ l H₂O

Zyklus:

5 min	94 °C] 35 Zyklen
60 sec	95°C	
60 sec	58 °C	
60 sec	72 °C	
2 min	72 °C	

Größe des Fragmentes: β -Globin: 212 bp
 β -Globin: 165 bp
 β -Globin: 135 bp

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

Hu bcl2-PCR

PCR-Ansatz:

5 μ l Puffer (10x)
 1 μ l 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 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
 200 ng DNA
 add 50 μ l H₂O

Zyklus:

5 min	95 °C	} 36 Zyklen
30 sec	95 °C	
30 sec	62 °C	
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.

7.16 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 400ml TBE-Puffer und gab 20 μ l 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 μ l der PCR-Ansätze nach Zugabe von ca. 2 μ l Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach erwarteter Fragmentgröße in einem elektrischen Feld mit 5-8 \sqrt V/cm für ca. 30-60min. Die durch Interkalation in die DNA-Doppelhelix verstärkte Fluoreszenz des zugesetzten Ethidiumbromids bei 590nm 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

7.17 Southern Blotting

7.17.1 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.

7.17.2 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 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Fragmente aus der Lösung gefällt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in 75 %igem Ethanol bevor die DNA in einem möglichst geringem Volumen H_2O aufgenommen wurde.

7.17.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch „Nick Translation“

Zur radiaktiven Markierung der DNA-Fragmente wurden $40 \mu\text{g}$ DNA mit einem Enzymgemisch aus DNase I und DNA-Polymerase I versetzt und in Anwesenheit von dATP, dGTP, dTTP, und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ ($\beta\text{-Strahler}$) für 45 min bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -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 $400 \mu\text{g}$ 2 min zentrifugiert und die Reaktionslösung auf die Oberfläche

der Säule gegeben. Bei der folgenden erneuten Zentrifugation (400 \bar{g} , 2 $\bar{m}in$) 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). Sämtliche Arbeiten mit freier Radioaktivität wurden im Radioaktivlabor des Instituts für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung und zum überwiegenden Teil von Bettina Mühl sowie Angela Merkel (technische Angestellte) durchgeführt.

7.17.4 Übertragung von Nukleinsäuren aus dem Agarose-Gel auf Nylonmembranen

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Gele für ca. 15 $\bar{m}in$ 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 \bar{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 $\bar{m}in$ in 2x SSC geschwenkt und zum Crosslinking der Nukleinsäuren mit der Membran in 60 \bar{sec} mit 120 $\bar{m}J/cm^2$ im UV-Licht belichtet.

7.17.5 Hybridisierung der geblotteten Fragmente mit markierten Sonden

Zur Hybridisierung der auf die Nylonmembranen geblotteten Fragmente wurden die Membranen zunächst für wenige Minuten nacheinander in H₂O_{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 Nylonfließ, welches zuvor ebenfalls in 6x SSC gebadet worden waren, separiert. Nach Zugabe von 20 $\bar{m}l$

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 gebloteten DNA-Fragmente die Inkubation der Membranen unter Rotation bei 65°C über Nacht. Abschließend wurden die Membranen zweimal mit Waschpuffer I und einmal mit Waschpuffer II gewaschen (jeweils 20 min), auf Filterpapier gelegt und mit Zellophanfolie umhüllt. Auch hier wurden die Arbeiten mit freier Radioaktivität im Radioaktivlabor zum überwiegenden Teil von Bettina Mühl und Angela Merkel durchgeführt.

7.17.6 Belichtung von Filmen durch markierten Filtern

Zur Belichtung der Filme wurden die Membranen mit der gebloteten 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.

7.18 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden entsprechend den geltenden Tierschutzvorschriften in der Versuchstieranlage des Instituts für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung gehalten.

Verwendet wurden folgende Mauslinien:

Mauslinie	Bezogen von	Transgen	Verwendung	Literaturstelle
NMRI	Charles River, Sulzfeld	keines	Blastozystendonoren, Ammenmütter	
C57/Bl6	Charles River, Sulzfeld	keines	Knochenmarksdonoren, genetischer Hintergrund der transgenen Mauslinien	
H253	Tierstall des MSZ, eigene Zucht	β -galactosidase Gen, ubiquitär exprimiert und nukleär lokalisiert	Knochenmarksdonoren	(Tam et al. 1994)
eGFP	Tierstall des MSZ, eigene Zucht	eGFP, ubiquitär exprimiert	Knochenmarksdonoren, neurale Stammzellendonoren	(Okabe et al. 1997)
Bcl2	Tierstall des MSZ, eigene Zucht	Hu bcl2, unter der Kontrolle des MHC Klasse I Promotors	Knochenmarksdonoren	(Domen et al. 1998)
Hu β Globin	Tierstall des MSZ, eigene Zucht	Gesamter hu β Globin Lokus	neurale Stammzellendonoren	(Strouboulis et al. 1992)

7.19 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 10U PMS (pregnant mare serum) und anschließend 10U 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 unter visueller Kontrolle an einem inversen Leicamikroskop in eine Injektionsnadel (Biomedical Instruments) aufgenommen und in das Blastozoel injiziert. Anschließend wurden die Blastozysten in ein Uterushorn scheinchwangere NMRI-Ammenmäuse, welche 2 Tage zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart worden waren, transferiert.

7.20 Präparation embryonaler Gewebe nach Injektion von SSZ in Blastozysten

Die Ammentiere wurden am 12,5 der Entwicklung der Embryonen durch zervikale Dislokation getötet. Der Bauchraum wurde durch zwei Schnitte von der Leistengegend 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.

8 Ausblick

Die gefundenen Ergebnisse demonstrieren das hohe Proliferations und Differenzierungspotenzial SSZ, die nach Injektion in Blastozysten chimäre Tiere bilden. Allerdings kann ausgeschlossen werden, dass SSZ dasselbe Differenzierungspotenzial wie ES-Zellen haben.

Der Traum der Transplantationsmedizin, nämlich aus der Kulturflasche in beliebiger Menge die Zellen zu erhalten, die gebraucht werden, wird wahrscheinlich nicht mit einer SSZ zu erfüllen sein, man wird differenziert vorgehen müssen. SSZ sind keine ES-Zellen und haben zelluläre Identitäten und gewebespezifischen Differenzierungspräferenzen, die sie für manches geeignet machen, für anderes aber wahrscheinlich unbrauchbar. Daher müssen auf die Experimente, die zum Ziel hatten SSZ in ihrem Entwicklungspotenzial zu charakterisieren Versuche mit dem Ziel bestimmte Zelltypen aus einer SSZ zu machen folgen. Wege müssen gesucht werden, das Wissen über das prinzipielle Differenzierungspotenzial in Wissen über ein gerichtetes Differenzieren zu gewünschten Zelltypen umzumünzen. Die Erforschung der Biologie von ES-Zellen, parallel zu somatischen Stammzellen, kann dabei die Richtung vorgeben, die gegangen werden muss um von einer somatischen Stammzelle zu einer anderen gelangen.

Um diejenige Stammzelle zu finden, die das größte Differenzierungspotenzial hat, wird man Testmethoden brauchen, die es ermöglichen selbst kleine Zellpopulationen zu untersuchen, denn Stammzellen sind nach allen bisher bekannten Ergebnisse selten (Uchida et al. 1996; Weiss et al. 1996; Reyes et al. 2001). Die Blastozysteninjektion erlaubt das Untersuchen von nur geringen Zellzahlen in einem experimentellen System, das funktionelle Daten liefern kann. Daher wird man immer wieder darauf zurückgreifen.

Von besonderem Wert schätze ich Berichte in denen gezeigt wurde, dass Knochenmarkzellen *in vivo* auch unter steady state Bedingungen zur Regeneration heterologer Gewebe beitragen (Poulsom et al. 2001; Brittan et al. 2002). Diese Berichte können nicht zeigen welche Zellen für diese Regeneration verantwortlich sind, wohl aber dass im Säuger ein Austausch zwischen den Organen stattfindet. Dies kann aber ein weiterer gangbarer Weg sein. Die *in vivo* Stimulation von SSZ zur Regeneration heterologer Organe um eine Heilung ohne den Einsatz fremder Stammzellen zu erreichen.

9 Curriculum vitae

Name: Friedrich Dieter Harder

Titel: Diplombiologe

Geburtsdatum und Ort 25. März, 1972 in Karlsruhe, Deutschland

Familienstand unverheiratet, keine Kinder

Staatbürgerschaft: deutsch

Privatadresse: Jägerstr 34
97082 Würzburg
Deutschland
Telefon: +49 931/ 45 292 45

Adresse am Arbeitsplatz: Institut für medizinische Zellforschung und Strahlenkunde
Universität Würzburg
Versbacherstr. 5
97078 Würzburg
Deutschland
Telefon: +49 931/ 201 45846
Fax: +49 931/ 201 45887
Email: friedrich.harder@mail.uni-wuerzburg.de

Ausbildung:

- 1982-1991 Werner Heisenberg Gymnasium, *Weinheim a.d. Bergstrasse*
- 1991 Abitur
- 1993-1995 Grundstudium der Biologie an der Universität Heidelberg, *Heidelberg*
- 1995 Vordiplom
- 1995-1999 Hauptstudium an der Universität Freiburg, *Freiburg*
- 1998 Graduiertenstudium in Zoologie an der University of Otago, *Dunedin, New Zealand*
- 1999 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Albrecht M. Müller am Max-Planck-Institut für Entwicklungs- und Immunbiologie, *Freiburg*
Titel der Arbeit: "Humane Hämatopoese in murinen Embryonen nach Injektion humaner hämatopoetischer Stammzellen"
- 1999 Diplom in Biologie verliehen durch die Universität von Freiburg
- 1999 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Albrecht Müller am Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, *Würzburg*
- 2002 Doktorarbeit wird voraussichtlich im Juli 2002 eingereicht.
Titel der Dissertation: „Analyse des *in vivo* Differenzierungspotenzial muriner und humaner hämatopoetischer Stammzellen sowie murine neuraler Stammzellen“
- 1991-1992 Zivildienst

Stipendien:

- 2002 Reisestipendium für einen Vortrag am ISEH Meeting in Montreal 2002, Kanada

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen besonders bedanken, die für die vorliegende Arbeit von großer Hilfe waren:

bei Prof. Albrecht M. Müller für den Rahmen, in dem diese Arbeit durchgeführt wurde sowie besonders für die Unterstützung, die sehr oft weit darüber hinaus ging.

Bei Prof. Krohne für die Vertretung der Arbeit gegenüber der Fakultät für Biologie

Bei Bettina Mühl und Angela Merkel für ausdauernde Hilfe im Laboralltag.

Bei Suzana Petrovic für Unterstützung und Horizonterweiterung.

Bei Bruce Jordan für unermüdliches Korrigieren und Feiern.

Bei Carolin Schmittwolf für spannende und lehrreiche Diskussionen.

Bei Dr. Nicole Kirchhof für Hilfe, Tatkraft und Aufmunterung.

Bei Michael Dürr für Elan und Bauernschläue.

Bei den Tierpflegern des MSZ, die sich jahrein jahraus um „meine“ Mäuseschar kümmerten.

Bei meinen Eltern für jedwede Unterstützung bis zum heutigen Tag.

Bei Sabine für das mit ertragen von Leid und Erfolg, sowie den Glauben an das Gelingen.

11 Literaturverzeichnis

- M. Abs, H. B. e. a. (1985). Lehrbuch der Zoologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Heyman, Y., X. Vignon, P. Chesne, D. Le Bourhis, J. Marchal and J. P. Renard (1998). "Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer." Reprod Nutr Dev **38**(6): 595-603.
- Rossant, J. (1975). "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**(4): 991-1001.
- Rossant, J. (1975). "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**(4): 979-90.
- Rossant, J. and L. Ofer (1977). "Properties of extra-embryonic ectoderm isolated from post-implantation mouse embryos." Journal of Embryology & Experimental Morphology **39**: 183-94.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**: 154-156.
- 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.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola and N. M. Gough (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." Nature **336**(6200): 684-7.
- Gough, N. M., R. L. Williams, D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, J. Stahl, D. P. Gearing, N. A. Nicola and D. Metcalf (1989). "LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells." Reproduction, Fertility, & Development **1**(4): 281-8.
- Beddington, R. S. and E. J. Robertson (1989). "An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo." Development **105**(4): 733-7.

- Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt and R. Kemler (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.
- Schuldiner, M., O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, D. A. Melton and N. Benvenisty (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**(21): 11307-12.
- Nagy, A., E. Gocza, E. M. Diaz, V. R. Prideaux, E. Ivanyi, M. Markkula and J. Rossant (1990). "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse." Development **110**(3): 815-21.
- Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly and J. C. Roder (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8424-8.
- Müller, A. M., A. Medvinsky, J. Strouboulis, F. Grosveld and E. Dzierzak (1994). "Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo." Immunity **1**(4): 291-301.
- Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis and S. Temple (2000). "Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells." Neuron **28**(1): 69-80.
- Lorenz, E., D. Uphoff, T. R. Reid and E. Shelton (1951). "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections." J Nat Cancer Inst **12**: 197-201.
- Ford, C. E., J. L. Hamerton, D. W. H. Barnes and J. F. Loutit (1956). "Cytological identification of radiation chimaeras." Nature **177**: 452-54.
- Makinodan, T. (1956). "Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow." Proc. Soc. Exp. Biol. **92**: 174-79.
- Nowell, P. C., C. L. J., J. G. Habermeyer and P. L. Roan (1956). "Growth and continued function of rat marrow cells in X-irradiated mice." Cancer Research **16**: 258-61.
- Porteous, D. D. and L. G. Lajtha (1965). "The effect of ionising radiations on stem-cells." Minerva Nucl **9**(6): 347-51.
- Lajtha, L. G. and D. D. Porteous (1965). "Methods for studying stem cell populations." Minerva Nucl **9**(4): 203-6.
- Porteous, D. D. and L. G. Lajtha (1966). "On stem-cell recovery after irradiation." Br J Haematol **12**(2): 177-88.

- Siminovitch, L., E. McCulloch and J. Till (1963). "The distribution of colonyforming cells among spleen colonies." Journal of Cell Comparative Physiology **62**: 327-336.
- Till, J. E., E. A. McCulloch and L. Siminovitch (1964). "Isolation of variant cell lines during serial transplantation of hematopoietic cells derived from fetal liver." J. of National Cancer Institute **33**: 707-720.
- Jursskova, V. and L. Tkadlecek (1965). "Character of primary and secondary colonies of haematopoiesis in the spleen of irradiated mice." Nature **206**: 951-2.
- Fowler, J. H., A. M. Wu, J. E. Till, E. A. McCulloch and L. Siminovitch (1966). "The cellular composition of hemopoietic spleen colonies." J. Cell. Physiol. **69**: 65-72.
- Haskill, J. S. and M. A. S. Moore (1970). "Two dimensional cell separation: Comparison of embryonic and adult haemopoietic stem cells." Nature **226**: 853-854.
- Jones, R. J., J. E. Wagner, P. Celano, M. S. Zicha and S. J. Sharkis (1990). "Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells [see comments]." Nature **347**(6289): 188-9.
- Okada, S., H. Nakauchi, K. Nagayoshi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, Y. Miura and T. Suda (1991). "Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule." Blood **78**(7): 1706-12.
- Spangrude, G. J. (1992). "Characteristics of the hematopoietic stem cell compartment in adult mice." International Journal of Cell Cloning **10**(5): 277-85.
- Morrison, S. J. and I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." Immunity **1**(8): 661-73.
- Ogata, H., W. G. Bradley, M. Inaba, N. Ogata, S. Ikehara and R. A. Good (1995). "Long-term repopulation of hemolymphoid cells with only a few hemopoietic stem cells in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9432.
- McCune, J. M., H. Kaneshima, M. Lieberman, I. L. Weissman and R. Namikawa (1989). "The scid-hu mouse: current status and potential applications." Current Topics in Microbiology & Immunology **152**: 183-93.
- Verfaillie, C. M. (2002). "Hematopoietic stem cells for transplantation." Nat Immunol **3**(4): 314-7.
- Dick, J. E., F. Pflumio and T. Lapidot (1991). "Mouse models for human hematopoiesis. [Review] [70 refs]." Seminars in Immunology **3**(6): 367-78.
- Pflumio, F., B. Izac, A. Katz, L. D. Shultz, W. Vainchenker and L. Coulombel (1996). "Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combi-

- ned immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells." Blood **88**(10): 3731-40.
- Conneally, E., J. Cashman, A. Petzer and C. Eaves (1997). "Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9836-41.
- Dorrell, C., O. I. Gan, D. S. Pereira, R. G. Hawley and J. E. Dick (2000). "Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function." Blood **95**: 102-110.
- Hogan, C. J., E. J. Shpall, I. McNiece and G. Keller (1997). "Multilineage engraftment in NOD/LtSz-scid/scid mice from mobilized human CD34+ peripheral blood progenitor cells." Biology of Blood and Marrow Transplantation **3**(5): 236-46.
- Wang, J. C., M. Doedens and J. E. Dick (1997). "Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay." Blood **89**(11): 3919-24.
- Zanjani, E. D., M. G. Pallavicini, M. R. Harrison and M. Tavassoli (1991). "Successful stable xenograft of human fetal hemopoietic cells in preimmune fetal sheep." Transactions of the Association of American Physicians **104**: 181-6.
- Baum, C. M., I. L. Weissman, A. S. Tsukamoto, A. M. Buckle and B. Peault (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(7): 2804-8.
- Vormoor, J., T. Lapidot, F. Pflumio, G. Risdon, B. Patterson and H. E. Broxmeyer (1993). "High-level multilineage engraftment of human cord blood cells in SCID mice." Journal of Hematotherapy **2**(2): 215-6.
- Bhatia, M., D. Bonnet, U. Kapp, J. C. Wang, B. Murdoch and J. E. Dick (1997). "Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture." Journal of Experimental Medicine **186**(4): 619-24.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz and T. M. Jessel (2000). Principles of Neuroscience, McGraw-Hill.
- Mayer-Proschel, M., A. J. Kalyani, T. Mujtaba and M. S. Rao (1997). "Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells." Neuron **19**(4): 773-85.

- Mujtaba, T., M. Mayer-Proschel and M. S. Rao (1998). "A common neural progenitor for the CNS and PNS." Dev Biol **200**(1): 1-15.
- Vescovi, A. L., E. A. Parati, A. Gritti, P. Poulin, M. Ferrario, E. Wanke, P. Frolichsthal-Schoeller, L. Cova, M. Arcellana-Panlilio, A. Colombo and R. Galli (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**(1): 71-83.
- Vescovi, A. L. and E. Y. Snyder (1999). "Establishment and properties of neuronal stem cell clones: plasticity in vitro and in vivo." Brain Pathology **9**: 569-598.
- Bjornson, C. R. R., R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli and A. L. Vescovi (1999). "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo." Science **283**: 534-537.
- Foster, G. A. and B. M. Stringer (1999). "Genetic regulatory elements introduced into neural stem and progenitor cell populations." Brain Pathol **9**(3): 547-67.
- Mehler, M. F. and S. Gokhan (1999). "Postnatal cerebral cortical multipotent progenitors: regulatory mechanisms and potential role in the development of novel neural regenerative strategies." Brain Pathol **9**(3): 515-26.
- Kirchhof, N., F. Harder, S. Petrovic, S. Kreutzfeldt, C. Schmittwolf, M. Durr, J. Kirsten, B. Muhl, A. Merkel and A. M. Muller (2002). "Developmental potential of hematopoietic and neural stem cells: unique or all the same?" Cells Tissues Organs **171**(1): 77-89.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." Nature **386**: 493-495.
- Dale, L. and J. M. Slack (1987). "Fate map for the 32-cell stage of *Xenopus laevis*." Development **99**(4): 527-51.
- Tam, P. P. and R. S. Beddington (1987). "The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis." Development **99**(1): 109-26.
- Lemischka, I. (2002). "Rethinking somatic stem cell plasticity." Nat Biotechnol **20**(5): 425.
- Klinken, S. P., W. S. Alexander and J. M. Adams (1988). "Hematopoietic lineage switch: v-raf oncogene converts E μ -myc transgenic B cells into macrophages." Cell **53**(6): 857-67.
- Graf, T., K. McNagny, G. Brady and J. Frampton (1992). "Chicken "erythroid" cells transformed by the Gag-Myb-Ets-encoding E26 leukemia virus are multipotent." Cell **70**(2): 201-13.

- Rolink, A. G., S. L. Nutt, F. Melchers and M. Busslinger (1999). "Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5- deficient B-cell progenitors." Nature **401**(6753): 603-606.
- Clarke, D. L., C. B. Johansson, J. Wilbertz, B. Veress, E. Nilsson, H. Karlstrom, U. Lendahl and J. Frisen (2000). "Generalized potential of adult neural stem cells." Science **288**: 1660-1663.
- Galli, R., U. Borello, A. Gritti, M. G. Minasi, C. Bjornson, M. Coletta, M. Mora, M. G. De Angelis, R. Fiocco, G. Cossu and A. L. Vescovi (2000). "Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells." Nat Neurosci **3**(10): 986-91.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. L. Weissman and M. Grompe (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." Nat Med **6**(11): 1229-34.
- Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel and S. J. Sharkis (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." Cell **105**: 369-377.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, C. D. Strickland, E. A. Buzney, M. K. Khan, A. F. Flint, L. M. Kunkel and R. C. Mulligan (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." Nature **401**: 390-394.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet and H. M. Blau (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." Science **290**(5497): 1775-9.
- Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, R. A. Maki and S. R. McKercher (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-82.
- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri and P. Anversa (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." Nature **410**(6829): 701-5.
- Jackson, K. A., T. Mi and M. A. Goodell (1999). "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 14482-14486.
- Kawada, H. and M. Ogawa (2001). "Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle." Blood **98**(7): 2008-13.
- Terada, N., T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D. M. Mastalerz, Y. Nakano, E. M. Meyer, L. Morel, B. E. Petersen and E. W. Scott (2002). "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion." Nature **416**(6880): 542-5.

- Ying, Q. L., J. Nichols, E. P. Evans and A. G. Smith (2002). "Changing potency by spontaneous fusion." Nature **416**(6880): 545-8.
- Till, J. E., E. A. McCulloch and L. Siminovitch (1964). "A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells." PNAS **51**: 29-36.
- Korn, A. P., R. M. Henkelman, F. P. Ottensmeyer and J. E. Till (1973). "Investigations of a stochastic model of haemopoiesis." Exp Hematol **1**(6): 362-75.
- Enver, T., C. M. Heyworth and T. M. Dexter (1998). "Do stem cells play dice?" Blood **92**(2): 348-51; discussion 352.
- Socolovsky, M., H. F. Lodish and G. Q. Daley (1998). "Control of hematopoietic differentiation: lack of specificity in signaling by cytokine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6573-5.
- Hu, M., D. Krause, M. Greaves, S. Sharkis, M. Dexter, C. Heyworth and T. Enver (1997). "Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system." Genes & Development **11**(6): 774-85.
- Kontaraki, J., H.-H. Chen, A. Riggs and C. Bonifer (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.
- Cross, M. A. and T. Enver (1997). "The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells." Current Opinion in Genetics & Development **7**(5): 609-13.
- Dorshkind, K. (1990). "Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products." Annual Review of Immunology **8**: 111-117.
- Friedrich, C., E. Zausch, S. P. Sugrue and J. C. Gutierrez-Ramos (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**(11): 4596-606.
- Ohneda, O., N. Yanai and M. Obinata (1990). "Microenvironment created by stromal cells is essential for a rapid expansion of erythroid cells in mouse fetal liver." Development **110**: 379-384.
- Gunji, Y., T. Sudo, J. Suda, Y. Yamaguchi, H. Nakauchi, S. Nishikawa, N. Yanai, M. Obinata, M. Yanagisawa, Y. Miura and et al. (1991). "Support of early B-cell differentiation in mouse fetal liver by stromal cells and interleukin-7." Blood **77**(12): 2612-7.
- Williams, E. D., A. P. Lowes, D. Williams and G. T. Williams (1992). "A stem cell niche theory of intestinal crypt maintenance based on a study of somatic mutation in colonic mucosa." American Journal of Pathology **141**(4): 773-6.

- Wineman, J., K. Moore, I. Lemischka and C. Muller-Sieburg (1996). "Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells." Blood **87**(10): 4082-90.
- Geiger, H., S. Sick, C. Bonifer and A. M. Muller (1998). "Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts." Cell **93**(6): 1055-65.
- Whetton, A. D. and G. J. Graham (1999). "Homing and mobilization in the stem cell niche." Trends Cell Biol **9**(6): 233-238.
- Morrison, S. J., E. Lagasse and I. L. Weissman (1994). "Demonstration that Thy(1) subsets of mouse bone marrow that express high levels of lineage markers are not significant hematopoietic progenitors." Blood **83**(12): 3480-90.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld and I. L. Weissman (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells [published erratum appears in Science 1989 Jun 2;244(4908):1030]." Science **241**(4861): 58-62.
- Okada, S., K. Nagayoshi, H. Nakauchi, S. Nishikawa, Y. Miura and T. Suda (1993). "Sequential analysis of hematopoietic reconstitution achieved by transplantation of hematopoietic stem cells." Blood **81**(7): 1720-5.
- Kubaneck, B., N. Rencricca, A. Porcellini, D. Howard and F. Stohlman, Jr. (1970). "The pattern of stem cell repopulation in heavily irradiated mice receiving transplants of fetal liver." Blood **35**(1): 64-7.
- Jordan, C. T. and I. R. Lemischka (1990). "Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse." Genes & Development **4**(2): 220-32.
- Szilvassy, S. J. and S. Cory (1993). "Phenotypic and functional characterization of competitive long-term repopulating hematopoietic stem cells enriched from 5-fluorouracil-treated murine marrow." Blood **81**(9): 2310-20.
- Salomon, O., T. Lapidot, A. Terenzi, I. Lubin, I. Rabi and Y. Reisner (1990). "Induction of donor-type chimerism in murine recipients of bone marrow allografts by different radiation regimens currently used in treatment of leukemia patients." Blood **76**(9): 1872-8.
- Szilvassy, S. J., R. K. Humphries, P. M. Lansdorp, A. C. Eaves and C. J. Eaves (1990). "Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(22): 8736-8740.

- Junghahn, I., S. R. Goan, I. Fichtner, M. Becker, D. Möbest and R. Henschler (1998). "Circulating Endothelial Cells From Adult Mobilized As Well As From Placental Blood Engraft in NOD/SCID Mice." Blood **92 Suppl. 1**(10): 705a.
- Verstegen, M. M., P. B. van Hennik, W. Terpstra, C. van den Bos, J. J. Wielenga, N. van Rooijen, R. E. Ploemacher, G. Wagemaker and A. W. Wognum (1998). "Transplantation of human umbilical cord blood cells in macrophage-depleted SCID mice: evidence for accessory cell involvement in expansion of immature CD34+CD38- cells." Blood **91**(6): 1966-76.
- Bhatia, M., J. C. Wang, U. Kapp, D. Bonnet and J. E. Dick (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5320-5.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff and S. Weiss (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." J Neurosci **12**(11): 4565-74.
- Morshead, C. M., B. A. Reynolds, C. G. Craig, M. W. McBurney, W. A. Staines, D. Morsutti, S. Weiss and D. van der Kooy (1994). "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells." Neuron **13**(5): 1071-82.
- Weiss, S., C. Dunne, J. Hewson, C. Wohl, M. Wheatley, A. C. Peterson and B. A. Reynolds (1996). "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis." J Neurosci **16**(23): 7599-7609.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**: 66-71.
- Weiss, S., B. A. Reynolds, A. L. Vescovi, C. Morshead, C. G. Craig and D. van der Kooy (1996). "Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? [see comments]." Trends in Neurosciences **19**(9): 387-93.
- Miller, C. L. and C. J. Eaves (1997). "Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(25): 13648-53.
- Phillips, R. L., R. E. Ernst, B. Brunk, N. Ivanova, M. A. Mahan, J. K. Deanehan, K. A. Moore, G. C. Overton and I. R. Lemischka (2000). "The genetic program of hematopoietic stem cells." Science **288**: 1635-1640.
- Geschwind, D. H., J. Ou, M. C. Easterday, J. D. Dougherty, R. L. Jackson, Z. Chen, H. Antoine, A. Terskikh, I. L. Weissman, S. F. Nelson and H. I. Kornblum (2001). "A genetic analysis of neural progenitor differentiation." Neuron **29**(2): 325-39.

- Terskikh, A. V., M. C. Easterday, L. Li, L. Hood, H. I. Kornblum, D. H. Geschwind and I. L. Weissman (2001). "From hematopoiesis to neuropoiesis: evidence of overlapping genetic programs." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7934-9.
- Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi and Y. Nishimune (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." FEBS Letters **407**: 313-319.
- Hsu, Y.-C. (1979). "In vitro development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage." Developmental Biology **68**: 453-461.
- Harder, F. (1999). "Humane hämatopoetische Stammzellen aus dem Nabelschnurblut besiedeln sich entwickelnde murine Embryonen nach Injektion in Blastozysten." Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- Harder, F., M. C. Lamers, I. Junghahn, R. Henschler and A. M. Müller (2002). "Human hematopoiesis in murine embryos and adults following the injection of human HSCs into blastocysts." Blood **99**(2).
- Brotherton, T. W., D. H. Chui, J. Gauldie and M. Patterson (1979). "Hemoglobin ontogeny during normal mouse fetal development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(6): 2853-7.
- Strouboulis, J., N. Dillon and F. Grosveld (1992). "Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice." Genes Dev **6**(10): 1857-1864.
- Dzierzak, E. (1999). "Embryonic beginnings of definitive hematopoietic stem cells." Ann N Y Acad Sci **872**: 256-62; discussion 262-4.
- Palis, J. and M. C. Yoder (2001). "Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man." Exp Hematol **29**(8): 927-36.
- Tam, P. P., S. X. Zhou and S. S. Tan (1994). "X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene." Development **120**(10): 2925-32.
- Shi, M. J. and J. Stavnezer (1998). "CBF alpha3 (AML2) is induced by TGF-beta1 to bind and activate the mouse germline Ig alpha promoter." J Immunol **161**(12): 6751-60.
- McKinney-Freeman, S. L., K. A. Jackson, F. D. Camargo, G. Ferrari, F. Mavilio and M. A. Goodell (2002). "Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1341-6.
- Osawa, M., K. Nakamura, N. Nishi, N. Takahashi, Y. Tokuomoto, H. Inoue and H. Nakauchi (1996). "In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells." J Immunol **156**(9): 3207-14.

- Capel, B., R. Hawley, L. Covarrubias, T. Hawley and B. Mintz (1989). "Clonal contributions of small numbers of retrovirally marked hematopoietic stem cells engrafted in unirradiated neonatal W/W^v mice [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Sep;86(18):7048]." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(12): 4564-8.
- Capel, B., R. G. Hawley and B. Mintz (1990). "Long- and short-lived murine hematopoietic stem cell clones individually identified with retroviral integration markers." Blood **75**(12): 2267-70.
- Szilvassy, S. J., T. E. Meyerrose, P. L. Ragland and B. Grimes (2001). "Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin." Exp Hematol **29**(12): 1494-502.
- Larochelle, A., J. Vormoor, H. Hanenberg, J. C. Wang, M. Bhatia, T. Lapidot, T. Moritz, B. Murdoch, X. L. Xiao, I. Kato, D. A. Williams and J. E. Dick (1996). "Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy." Nat Med **2**(12): 1329-37.
- Dick, J. E., M. Bhatia, O. Gan, U. Kapp and J. C. Wang (1997). "Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. [Review] [35]." Stem Cells **1**: 199-203.
- Shiota, Y., J. Minguell, E. D. Zanjani and M. Tavassoli (1992). "Induction of upmodulation of homing receptors in cloned hemopoietic progenitors by growth factors." Bone Marrow Transplantation **9**(2): 123-7.
- Zanjani, E. D., M. G. Pallavacini, J. L. Ascensao, A. W. Flake, M. R. Harrison and M. Tavassoli (1992). "Human-ovine xenogenic transplantation of stem cells in utero." Bone Marrow Transplantation **9**(Suppl 1): 86-9.
- van der Loo, J. C. and R. E. Ploemacher (1995). "Marrow- and spleen-seeding efficiencies of all murine hematopoietic stem cell subsets are decreased by preincubation with hematopoietic growth factors." Blood **85**(9): 2598-606.
- 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.
- Ziegler, B. L., M. Valtieri, G. A. Porada, R. De Maria, R. Muller, B. Masella, M. Gabbianelli, I. Casella, E. Pelosi, T. Bock, E. D. Zanjani and C. Peschle (1999). "KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells." Science **285**: 1553-1558.

- Harder, G. M., Lulli Valentina, Elvira Pelosi, Mauro Valtieri, Albrecht Müller, Cesare Peschle (2001). "Post-Natal CD34+KDR+ Cells Injected Into Murine Blastocysts Exhibit Multi-Tissue Plasticity in Mouse Embryos and Newborns." ASH 2001 Abstract.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1996). "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell." Dev Biol **175**(1): 1-13.
- Mintz, B. (1977). "Teratocarcinoma cells as vehicles for mutant and foreign genes." Brookhaven Symposia in Biology(29): 82-95.
- Matsui, Y., K. Zsebo and B. L. Hogan (1992). "Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture." Cell **70**(5): 841-847.
- Liu, X., H. Wu, J. Loring, S. Hormuzdi, C. M. Disteché, P. Bornstein and R. Jaenisch (1997). "Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission." Dev Dyn **209**(1): 85-91.
- Kondoh, G., Y. Yamamoto, K. Yoshida, Y. Suzuki, S. Osuka, Y. Nakano, T. Morita and J. Takeda (1999). "Easy assessment of ES cell clone potency for chimeric development and germ-line competency by an optimized aggregation method." J Biochem Biophys Methods **39**(3): 137-42.
- Berger, C. N., P. P. Tam and K. S. Sturm (1995). "The development of haematopoietic cells is biased in embryonic stem cell chimaeras." Dev Biol **170**(2): 651-63.
- Shalaby, F., J. Ho, W. L. Stanford, K. D. Fischer, A. C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein and J. Rossant (1997). "A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis." Cell **89**(6): 981-90.
- Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini and E. Lacy (1994). Manipulating the mouse embryo, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Mintz, B. and K. Illmensee (1975). "Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(9): 3585-9.
- Mintz, B. (1977). "Malignancy vs. normal differentiation of stem cells as analyzed in genetically mosaic animals." Advances in Pathobiology(6): 153-7.
- Hirsch, E., A. Iglesias, A. J. Potocnik, U. Hartmann and R. Fässler (1996). "Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of α 1 integrins." Nature **380**: 171-175.

- Domen, J., S. H. Cheshier and I. L. Weissman (2000). "The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential." J Exp Med **191**(2): 253-63.
- Gibson, L., S. P. Holmgren, D. C. Huang, O. Bernard, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, G. R. Sutherland, E. Baker, J. M. Adams and S. Cory (1996). "bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival." Oncogene **13**(4): 665-75.
- Williams, G. T., C. A. Smith, E. Spooncer, T. M. Dexter and D. R. Taylor (1990). "Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis." Nature **343**(6253): 76-9.
- Wineman, J. P., S. Nishikawa and C. E. Muller-Sieburg (1993). "Maintenance of high levels of pluripotent hematopoietic stem cells in vitro: effect of stromal cells and c-kit." Blood **81**(2): 365-72.
- Muller-Sieburg, C. E. and E. Deryugina (1995). "The stromal cells' guide to the stem cell universe." Stem Cells **13**(5): 477-86.
- Domen, J. and I. L. Weissman (1999). "Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate." Mol Med Today **5**(5): 201-8.
- Domen, J., K. L. Gandy and I. L. Weissman (1998). "Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation." Blood **91**(7): 2272-82.
- Domen, J. and I. L. Weissman (2000). "Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other." J Exp Med **192**(12): 1707-18.
- Flake, A. W., M. H. Hendrick, H. E. Rice, M. Tavassoli and E. D. Zanjani (1995). "Enhancement of human hematopoiesis by mast cell growth factor in human-sheep chimeras created by the in utero transplantation of human fetal hematopoietic cells." Experimental Hematology **23**(3): 252-7.
- Dick, J. E. (1991). "Immune-deficient mice as models for human hematopoietic disease. [Review]." Molecular Genetic Medicine **1**: 77-115.
- Bock, T. A., D. Orlic, C. E. Dunbar, H. E. Broxmeyer and D. M. Bodine (1995). "Improved engraftment of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice carrying human cytokine transgenes." Journal of Experimental Medicine **182**(6): 2037-43.

- Yoder, M. C., B. King, K. Hiatt and D. A. Williams (1995). "Murine embryonic yolk sac cells promote in vitro proliferation of bone marrow high proliferative potential colony-forming cells." Blood **86**(4): 1322-30.
- Morshead, C. M., P. Benveniste, N. N. Iscove and D. van der Kooy (2002). "Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations." Nat Med **8**(3): 268-73.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**: 379-391.
- Reyes, M. and C. M. Verfaillie (2001). "Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells." Ann N Y Acad Sci **938**: 231-3; discussion 233-5.
- Wurmser, A. E. and F. H. Gage (2002). "Stem cells: cell fusion causes confusion." Nature **416**(6880): 485-7.
- Hogan, C. J., E. J. Shpall, O. McNulty, I. McNiece, J. E. Dick, L. D. Shultz and G. Keller (1997). "Engraftment and development of human CD34(+)-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice." Blood **90**(1): 85-96.
- McCune, J. M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L. D. Shultz, M. Lieberman and I. L. Weissman (1988). "The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hemolymphoid differentiation and function." Science **241**(4873): 1632-9.
- Kyoizumi, S., C. M. Baum, H. Kaneshima, J. M. McCune, E. J. Yee and R. Namikawa (1992). "Implantation and Maintenance of Functional Human Bone Marrow in SCID-hu Mice." Blood **79**: 1704-1711.
- Greiner, D. L., L. D. Shultz, J. Yates, M. C. Appel, G. Perdrizet, R. M. Hesselton, I. Schweitzer, W. G. Beamer, K. L. Shultz, S. C. Pelsue 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**(4): 888-902.
- Srour, E. F., E. D. Zanjani, J. E. Brandt, T. Leemhuis, R. A. Briddell, N. A. Heerema and R. Hoffman (1992). "Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells." Blood **79**(6): 1404-12.
- Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, J. L. Ascensao, F. R. MacKintosh and A. W. Flake (1997). "Transplantation of hematopoietic stem cells in utero." Stem Cells **15 Suppl 1**: 79-92.

- Yoder, M. C., K. Hiatt and P. Mukherjee (1997). "In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(13): 6776-6780.
- Kyba, M., R. C. Perlingeiro and G. Q. Daley (2002). "HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors." Cell **109**(1): 29-37.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, D. J. Hicklin, L. Witte, M. A. S. Moore and S. Rafii (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood **95**(3): 952-957.
- Shih, C. C., Y. Weng, A. Mamelak, T. LeBon, M. C. Hu and S. J. Forman (2001). "Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population." Blood **98**(8): 2412-22.
- Mignon, A., J. E. Guidotti, C. Mitchell, M. Fabre, A. Wernet, A. De La Coste, O. Soubrane, H. Gilgenkrantz and A. Kahn (1998). "Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes." Nat Med **4**(10): 1185-8.
- Uni Mainz, I. (2002). "Histology of the nervous System." Internet.
- Huszar, D., A. Sharpe and R. Jaenisch (1991). "Migration and proliferation of cultured neural crest cells in W mutant neural crest chimeras." Development **112**(1): 131-41.
- Sarkar, S., A. Petiot, A. Copp, P. Ferretti and P. Thorogood (2001). "FGF2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells." Development **128**(11): 2143-52.
- Shah, N. M., A. K. Groves and D. J. Anderson (1996). "Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members." Cell **85**(3): 331-43.
- Morrison, S. J., N. Uchida and I. L. Weissman (1995). "The biology of hematopoietic stem cells." Annual Review of Cell & Developmental Biology **11**: 35-71.
- Kondo, T. and M. Raff (2000). "Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells." Science **289**(5485): 1754-7.
- Loeffler, M. and I. Roeder (2002). "Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self- organization and models - a conceptual approach." Cells Tissues Organs **171**(1): 8-26.
- Maves, L. and G. Schubiger (1999). "Cell determination and transdetermination in Drosophila imaginal discs." Current Topics in Developmental Biology **43**: 115-151.
- Wei, G., G. Schubiger, F. Harder and A. M. Muller (2000). "Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in Drosophila: common themes?" Stem Cells **18**(6): 409-414.

- Johnston, L. A. and G. Schubiger (1996). "Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination." Development **122**: 3519-3129.
- Maves, L. and G. Schubiger (1998). "A molecular basis for transdetermination in Drosophila imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling." Development **125**: 115-124.
- Sauvageau, G., U. Thorsteinsdottir, C. J. Eaves, H. J. Lawrence, C. Largman, P. M. Lansdorp and R. K. Humphries (1995). "Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo." Genes & Development **9**(14): 1753-65.
- Warburton, P. E., G. M. Greig, T. Haaf and H. F. Willard (1991). "PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis." Genomics **11**: 324-333.
- Keller, G., M. Kennedy, T. Papayannopoulou and M. V. Wiles (1993). "Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture." Molecular and Cellular Biology **13**(1): 473-486.
- Bungert, J., U. Dave, K.-C. Lim, K. H. Lieu, J. A. Shavit, Q. Liu and J. D. Engel (1995). "Synergistic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4." Genes & Development **9**(24): 3083-3096.
- Uchida, N., L. Jerabek and I. L. Weissman (1996). "Searching for hematopoietic stem cells. II. The heterogeneity of Thy-1.1(lo)Lin(-/lo)Sca-1+ mouse hematopoietic stem cells separated by counterflow centrifugal elutriation." Experimental Hematology **24**(5): 649-59.
- Poulsom, R., S. J. Forbes, K. Hodivala-Dilke, E. Ryan, S. Wyles, S. Navaratnarasah, R. Jeffery, T. Hunt, M. Alison, T. Cook, C. Pusey and N. A. Wright (2001). "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration." J Pathol **195**(2): 229-35.
- Brittan, M., T. Hunt, R. Jeffery, R. Poulsom, S. J. Forbes, K. Hodivala-Dilke, J. Goldman, M. R. Alison and N. A. Wright (2002). "Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon." Gut **50**(6): 752-757.