

I. Einleitung

Das Knochenmark enthält neben dem blutbildenden (hämatopoetischen) System ein bindegewebiges Stroma (griechisch στρομα = Lager, Decke), dessen Funktion u.a. die Regulation der Blutbildung ist. Knochenmarkstromazellen wurden ursprünglich *in vitro* als adhärente, koloniebildende Fibroblasten (CFU-F, „colony forming unit-fibroblasts“) in Kulturen von Gesamtknochenmark beschrieben (Friedenstein 1970, 1976). Sie gehören zum nicht-hämatopoetischen Kompartiment des Knochenmarks. Bereits in den siebziger Jahren (Friedenstein et al., 1976) zeigte sich der Stammzellcharakter dieser Zellen, das heißt die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Darüber hinaus haben in jüngster Zeit Arbeiten über die Differenzierung von Knochenmarkstromazellen in nicht-mesenchymale Zellen wie Kardiomyozyten, Zellen des Lungenepithels und neuron-ähnliche Zellen große Aufmerksamkeit erregt (Makino et al., 1999; Kotton et al., 2001; Pereira et al., 1995; Woodbury et al., 2000). Insbesondere die Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp wirft die Frage auf, welche Identität Knochenmarkstromazellen *in vivo* haben und welche Mechanismen den Erwerb eines entwicklungsbiologisch so unterschiedlichen Phänotyps wie den eines Neurons ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels Genexpressionsanalysen von Knochenmarkstromazellen der Maus ein Beitrag zur molekularen Charakterisierung dieser Zellen und ihrer Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp geleistet werden.

1.1 Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die sich in einem undifferenzierten Zustand befinden und in der Lage sind zu proliferieren, sich selbst zu erneuern und eine große Anzahl differenzierter Nachkommen zu bilden. Auf diese Weise tragen sie zur Bildung, Erhaltung und Regeneration von Geweben bei. Der Archetyp einer Stammzelle ist die totipotente befruchtete Eizelle, aus der alle embryonalen und adulten Zelltypen und Gewebe eines multizellulären Organismus gebildet werden. Im Laufe der Ontogenese nimmt die Fähigkeit von Zellen, sich in verschiedene Phänotypen zu entwickeln, ab. Embryonale Stammzellen (s. Abschnitt 1.2), die zwar in alle adulten Gewebe differenzieren können, jedoch nicht zur Bildung der extraembryonalen Gewebe beitragen, sind somit nur noch pluripotent (Rossant, 2001).

Auch im adulten Organismus existieren Stammzellen, die der Aufrechterhaltung und Regeneration verschiedener Gewebe dienen. Lange Zeit war man der Überzeugung, daß diese Zellen ein eingeschränktes Differenzierungspotential besitzen und nur in wenige (Multipotenz) oder nur einen (Unipotenz) Zelltypen des gleichen Gewebes differenzieren können.

Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, daß adulte Stammzellen unter bestimmten Bedingungen ein größeres Differenzierungsspektrum aufweisen als bislang angenommen (s.u.).

1.2 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Säugetierembryonen gewonnen werden. Vor etwa 20 Jahren wurden zum ersten Mal ES-Zellen der Maus isoliert und *in vitro* kultiviert (Martin, 1981; Evans and Kaufman, 1981). Werden diese Zellen in intakte Mausembryonen im Morula- oder Blastozystenstadium injiziert, tragen sie zu allen adulten Zelllinien bei, so auch Keimzellen (Bradley et al., 1984). *In vitro*-Studien haben gezeigt, daß murine ES-Zellen ohne zeitliche Beschränkung in undifferenziertem Zustand kultiviert werden können. Sie besitzen die Fähigkeit, *in vitro* nach entsprechender Stimulation in nahezu alle adulten Zelltypen zu differenzieren, unter anderem in Kardiomyozyten, hämatopoetische Zellen, endotheliale Zellen, Skelettmuskelzellen, Adipozyten und Nervenzellen (Wobus et al., 1997; Wiles und Keller, 1991; Yamashita et al., 2000; Rohwedel et al., 1994; Kramer et al., 2000; Dani et al., 1997; Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995). Damit können sie als ein Modellsystem zur Untersuchung zellulärer Differenzierungsprozesse dienen.

Vor wenigen Jahren konnten erstmals aus humanen Embryonen embryonale Stammzelllinien gewonnen werden (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). Hierdurch wurden Hoffnungen geweckt, eines Tages mit Hilfe humaner ES-Zellen Zellersatztherapien zu entwickeln, z.B. für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson. Allerdings ist die Gewinnung von ES-Zellen aus menschlichen Embryonen ethisch umstritten (Stichwort: Embryonenverbrauch) und in Deutschland verboten. Die Forschung an humanen ES-Zellen unterliegt in Deutschland strengen Auflagen und ist auf wenige Zelllinien beschränkt (Stammzellgesetz - StZG - vom 28. Juni 2002, BGBl. I S. 2277).

1.3 Stammzellen im adulten Organismus

Im adulten Organismus erfordern hoch regenerative Gewebe wie die Haut, der Darm oder das Knochenmark die Existenz von Stammzellen, die ihre Funktion während der gesamten Lebensspanne des Organismus sicherstellen. Auch in Organen wie der Skelettmuskulatur und der Leber befinden sich Gewebestammzellen, welche die Regeneration dieser Gewebe ermöglichen.

Im Folgenden sollen kurz einige Gewebe beschrieben werden, in denen Stammzellen vorkommen. Danach soll genauer auf die Zusammensetzung und die Stammzellen des Knochenmarks eingegangen werden.

Stammzellen in der Haut

Die Epidermis gehört zu den Organen, welche am stärksten schädigenden Einflüssen der Umwelt ausgesetzt sind. Gleichzeitig muß ihre Funktion als Barriere zwischen Organismus und Umwelt ein Leben lang garantiert werden. Dies wird durch ständige Erneuerung aus Stammzellen, den Keratinozyten, ermöglicht. Keratinozyten ändern ihre Eigenschaften während ihrer Differenzierung von den basalen zu den apikalen Schichten der Epidermis. Epidermale Stammzellen sind an der Grenze zwischen Dermis und Epidermis lokalisiert. Sie bilden, von basal nach apikal wandernd, über Stachelzellen und Körnerzellen die keratinisierten Hornschuppen der äußeren Epidermis (Alberts et al., 2002).

Stammzellen im Skelettmuskel

Im Skelettmuskel wurden Satellitenzellen als ruhende, mononukleäre Stammzellen beschrieben. Diese liegen in der Basallamina, welche die multinukleären Muskelfasern umgibt (Mauro, 1961). Es wird davon ausgegangen, daß sie eine Stammzellpopulation darstellen, welche zur Regeneration des Muskelgewebes beiträgt. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß Satellitenzellen proliferieren und Muskelfasern bilden können (als Übersichtsartikel s. Charge und Rudnicki, 2004). Auch eine *in vitro* Differenzierung vereinzelter Satellitenzellen in Muskelfasern konnte gezeigt werden (Bischoff et al., 1986). Allerdings ist nicht klar, ob Satellitenzellen eine homogene Population darstellen. Bezüglich verschiedener Markerproteine sind sie offenbar heterogen (Beauchamp et al., 2000).

Die Proliferationsfähigkeit von Satellitenzellen nimmt jedoch mit dem Alter ab. Bei Krankheiten, die zu einer Degeneration des Skelettmuskels führen, wie der Duchenne-Muskeldystrophie, sinkt ihre Anzahl besonders schnell (Jejurikar und Kuzon, 2003).

Zentrales Nervensystem

Lange Zeit war man der Überzeugung, daß sich Zellen des adulten Zentralen Nervensystems (ZNS) bei Säugetieren (und damit auch dem Menschen) nicht regenerieren können. Die Existenz adulter Neuroneogenese im Gehirn wurde zwar schon früh bei Ratten (Altman, 1969) und später bei Singvögeln (Goldman und Nottebohm, 1983) gezeigt, dennoch setzte sich dieses Wissen erst langsam durch. Mittlerweile haben viele Studien neuronale Stammzellen, die sich teilen, differenzieren und selbst erneuern, im adulten Gehirn nachgewiesen (Doetsch et al., 1999; Gage, 2000; van der Kooy and Weiss, 2000). Die aus den neuronalen Stammzellen gebildeten Neuroblasten wandern in Regionen erhöhter Regeneration wie den Bulbus Olfactorius bei Nagern oder den Hippocampus beim Menschen (Goldman und Luskin, 1998; Eriksson et al., 1998).

In Zellkultur können neurale Vorläuferzellen als sogenannte (engl.) „Neurospheres“ (Neuro`sphären´, d.h. nicht-adhärente, kugelförmige Kolonien neuronaler Vorläuferzellen) kultiviert werden. Diese differenzieren *in vitro* in alle drei Zelltypen des ZNS: Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone (Gage, 2000; Qian et al., 2000; van der Kooy and Weiss, 2000).

1.4 Stammzellen im Knochenmark

Das Knochenmark ist im adulten Organismus für die Bildung und Aufrechterhaltung des gesamten Blut- und Immunsystems zuständig. Es besteht aus einem locker verbundenen, stark vaskularisierten Gewebe, welches sich im Wesentlichen aus zwei verschiedenen Systemen zusammensetzt: dem blutbildenden (hämatopoetischen) Gewebe und dem es unterstützenden und regulierenden Stroma.

Hämatopoetische Stammzellen

Alle differenzierten Zellen des Blut- und Immunsystems haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Im Knochenmark garantieren daher hämatopoetische Stammzellen die ständige Bildung neuer Zellen dieser beiden Systeme.

Die adulten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) sind die am besten charakterisierten Gewebe-spezifischen Stammzellen. Zwei Typen von HSZ konnten isoliert werden: „short-term haematopoietic stem cells“ (ST-HSC), die für kurze Zeit (ca. 8 Wochen), und „long term haematopoietic stem cells“ (LT-HSC), welche für die gesamte Lebensspanne eines Organismus das hämatopoetische System wiederherstellen können (Morrison and Weissman, 1994). Durch Analyse der exprimierten Oberflächenproteine konnten die Eigenschaften dieser Zellen und ihrer Nachkommen sehr exakt beschrieben werden (s. Abb. 1.1).

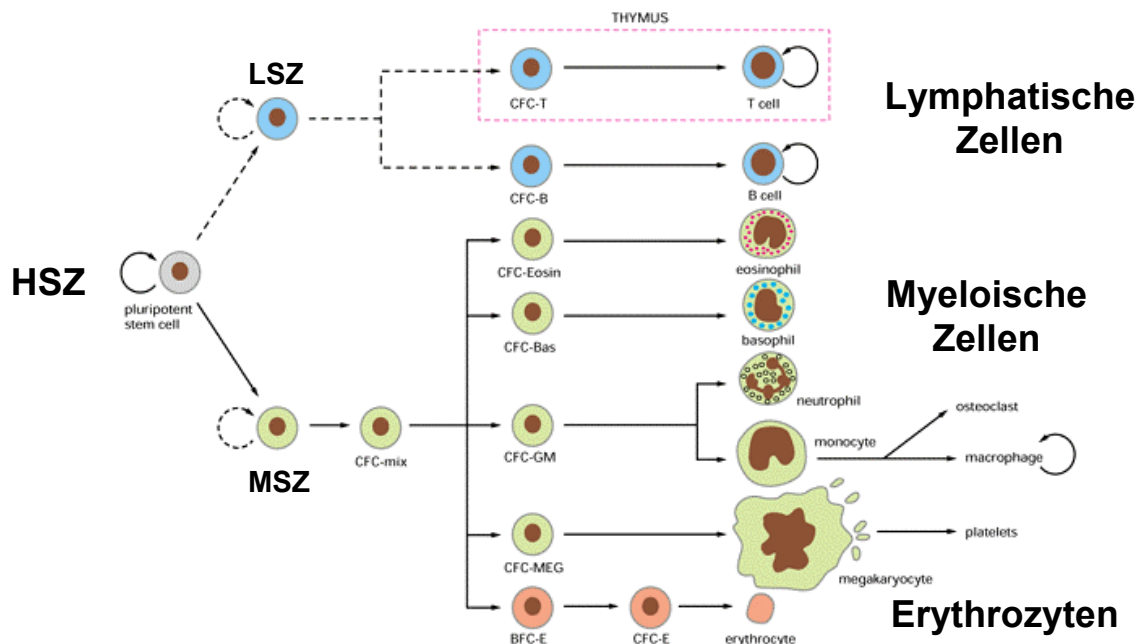
Abb. 1.1: Entwicklungslinien der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle

HSZ – HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLE

LSZ – LYMPHATISCHE STAMMZELLE

MSZ - MYELOISCHE STAMMZELLE

(ALBERTS ET AL., 1994)



Die Dynamik des Blut- und Immunsystems erfordert eine äußerst exakte Regulierung. So dürfen im Falle einer bakteriellen Infektion nur die Zelltypen proliferieren, welche für eine spezifische Immunantwort benötigt werden. Auch Blutverluste müssen schnell durch Neubildung von Blutzellen ausgeglichen werden. Eine geringfügige Abweichung in der

Produktion neuer Blut- oder Immunzellen würde schnell zum Zusammenbruch des Systems führen. Für diese beinahe „magische“ (Weissman, 2000), weil extrem sensitive Regulation, sind vor allem auch Zellen des Knochenmarkstromas zuständig.

Knochenmarkstromazellen

Die Erhaltung, Proliferation und Differenzierung der HSZ wird maßgeblich durch die Interaktion mit Zellen des bindegewebigen Knochenmarkstromas beeinflusst. Dieses stellt eine Vielzahl von Faktoren und adhäsiven Elementen bereit, z.B. den chemotaktischen Faktor SDF1 (engl. „stromal cell derived factor 1“), Faktoren, welche die Proliferation der HSZ regeln wie SCF („stem cell factor“) oder adhäsive Elemente wie Fibronectin und VCAM1 („vascular endothelial cell adhesion molecule“). Stammzellen und ihre Umgebung, die für die Erhaltung der Eigenschaften von Stammzellen bzw. deren Differenzierung verantwortlich ist, werden auch als Stammzellnische („stem cell niche“) bezeichnet (Whetton and Graham, 1999).

Nicht-hämatopoetische Zellen des Knochenmarkstromas wurden zuerst von Alexander Friedenstein als adhärente, koloniebildende, fibroblastenähnliche Zellen beschrieben („colony-forming unit-fibroblasts“, CFU-Fs, Friedenstein et al., 1968, 1970, 1974). Zwar wurde bereits damals eine spontane Differenzierung dieser Zellen in Knochen- und Knorpelzellen beobachtet, doch richtete sich das Interesse lange auf ihre Eigenschaft als Regulatoren der Hämatopoese, zum Beispiel bei *in vitro* Untersuchungen zur Hämatopoese. Ihre Fähigkeit, in mesenchymale Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Knochen-, Knorpel- und fettbildende Zellen) zu differenzieren, führte zu der Bezeichnung mesenchymale Stammzelle (mesenchymal stem cell, MSC; als Übersichtsartikel s. Prockop 1997; Bianco et al., 2000, 2001). Da jedoch der *in vivo* Phänotyp sowie die ontogenetische Herkunft dieser Zellen nicht bekannt sind, soll hier der Begriff Knochenmarkstromazelle (KMSZ, engl. „bone marrow stromal cell“, BMSC) verwendet werden.

Neben der *in vitro* Differenzierung in verschiedene mesenchymale Zelltypen (Pittenger et al., 1999) wurde auch eine Differenzierung in Muskelzellen beschrieben (Wakitani et al., 1995). Nach *in vivo* Implantation differenzierten Knochenmarkstromazellen in Osteoblasten und Chondrozyten und zeigten auch morphologische und funktionale Eigenschaften dieser Zellen (Goshima et al., 1991; Krebsbach et al., 1997; Kadiyala et al., 1997; Kon et al., 2000; Bruder et al., 1998; Pereira et al., 1998; Horwitz et al., 1999; Kuznetsov et al. 2000).

In den letzten Jahren wurde mehrfach berichtet, daß Knochenmarkstromazellen sogar in nicht-mesenchymale Zellen differenzieren können. So wurde ihre Differenzierung in Kardiomyozyten (Makino et al., 1999) und Neuronen-ähnliche Zellen *in vitro* gezeigt (Woodbury et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000; Deng et al., 2001). Nach *in vivo* Implantation durch lokale oder systemische Injektion siedelten sich Knochenmarkstromazellen in verschiedenen Organen an. Sie differenzierten in Zellen des alveolären Lungenepithels (Kotton et al., 2001; Pereira et al., 1995), Thymus (Pereira et al., 1995) und Astrozyten des Gehirns (Kopen et al., 1999).

Transplantierte oder implantierte Zellen des Knochenmarks, die jedoch nicht exakt charakterisiert wurden, differenzierten in Leberzellen (Petersen et al., 1999), Zellen des Myokards (Orlic et al., 2001), Gliazellen (Theele und Streit 1993; Eglitis und Mezey, 1997) und Zellen mit neuronalen Charakteristika (Brazelton et al., 2000).

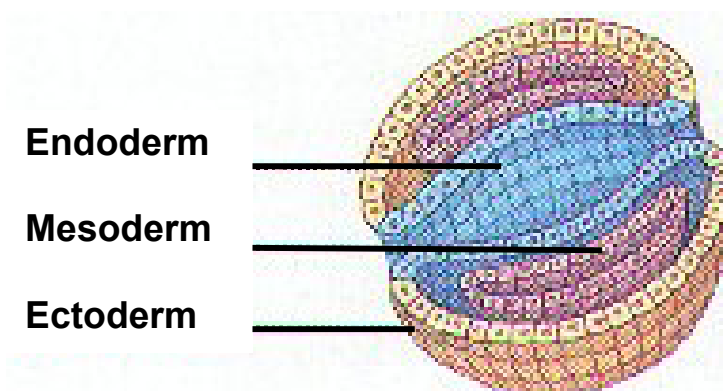
Ein weiterer Typ einer nicht-hämatopoetischen, adhärenenten und multipotenten adulten Stammzelle des Knochenmarks wurde kürzlich beschrieben: die sogenannte multipotente adulte Vorläuferzelle (MAPC, engl. „multipotent adult progenitor cell“) (Reyes and Verfaillie, 2001; Reyes et al. 2001; Schwartz et al., 2002). Diese Zellen sind eine Teilpopulation der mesenchymalen Stammzellen der Knochenmarks, die sich unter bestimmten Kulturbedingungen (sehr geringe Zelldichte, spezielles Kulturmedium) nahezu unbegrenzt teilen und in viele verschiedene Zelltypen differenzieren können (Jiang et al., 2002a). MAPC konnten aus verschiedenen Geweben isoliert werden: neben dem Knochenmark, auch aus Muskel und Gehirn (Jiang et al., 2002b). Nach Transplantation einzelner MAPC in Blastozysten wurden Nachkommen dieser Zellen in allen adulten Geweben gefunden (Keene et al., 2003). MAPC unterscheiden sich von Knochenmarkstromazellen in der Expression verschiedener Oberflächenproteine, z.B. CD44. Über eine mögliche Verwandtschaft von MAPC und Knochenmarkstromazellen lässt sich zur Zeit keine Aussage machen, da die Kulturbedingungen sich erheblich unterscheiden.

1.5 Plastizität adulter Stammzellen

Eines der frühesten Ereignisse in der Embryonalentwicklung ist die Bildung der Keimblätter: Endoderm (bildet Verdauungsorgane und Lunge), Ektoderm (bildet Haut und Nervensystem) und Mesoderm (bildet Knochen, Muskel und das Blutsystem). Lange Zeit wurde davon ausgegangen, daß Zellen der verschiedenen Keimblätter in ihrer Entwicklung Restriktionen unterworfen werden, das heißt ein Wechsel der Keimblatt-Zugehörigkeit oder Gewebespezifität zu einem späteren Zeitpunkt ist unmöglich. Anders ausgedrückt: Die Zellen sind für eine bestimmte Entwicklungsrichtung, ein bestimmtes Gewebe oder einen bestimmten Zelltyp determiniert. Hierdurch würde auch die begrenzte Regenerationsfähigkeit bei Säugetieren und den meisten anderen Vertebraten bedingt, da im adulten Organismus keine Stammzellen mit einem ursprünglichen Charakter mehr vorhanden sind, die einen Teil der Entwicklung von einem basalen Startpunkt aus noch einmal nachvollziehen könnten. Zwar weisen einige Vertebraten wie zum Beispiel der zu den Urodelen (Schwanzlurche) zählende Molch eine sehr hohe Regenerationsfähigkeit auf, die sogar ganze Gliedmaßen (und damit auch ontogenetisch verschiedene Zellen) umfaßt (Brockes 1997). Diese beruht jedoch vor allem auf einer Dedifferenzierung von voll ausdifferenzierten Zellen des betroffenen Gewebes, ihrem Wiedereintritt in den Zellzyklus und der Bildung eines regenerativen Kerns, des sogenannten Blastems. Sie beruht wahrscheinlich nicht oder nur zu einem geringen Teil auf einer Beteiligung gewebsspezifischer Stammzellen (Brockes und Kumar, 2002).

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Keimblätter im frühen Embryo

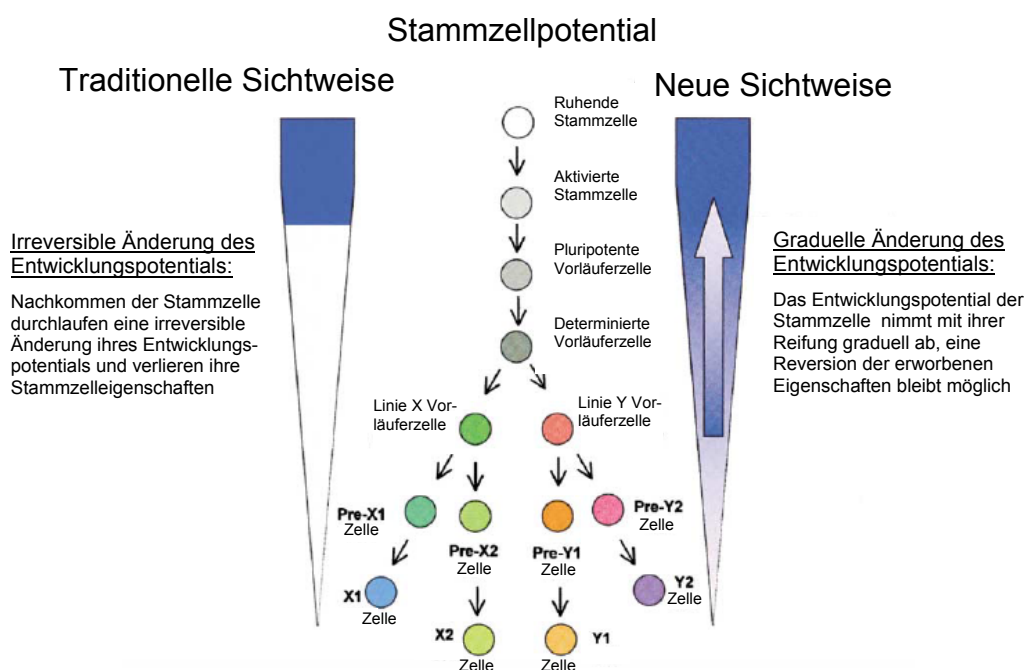
(<http://www.sirinet.net/~jgjohnso/gestation.html>)



Ansonsten galt für Stamm- und Vorläuferzellen: sie alle tragen nur in engem Rahmen und unter Beibehaltung ihrer embryonalen (endo-, meso-, ektodermalen) Herkunft zur Bildung nahe verwandter Zelltypen bei.

Diese Ansicht schien aber durch verschiedene Studien in den letzten Jahren widerlegt zu werden. Neben den oben beschriebenen unerwarteten Fähigkeiten von Zellen aus dem Knochenmark, in Zellen anderer Gewebe zu differenzieren, auch solche verschiedener Keimblätter, existiert mittlerweile eine viele Vielzahl von Hinweisen auf eine größere Plastizität von Zellen adulter Gewebe. So wandern neuronale Stammzellen in das Knochenmark subletal bestrahlter Mäuse ein und sind in der Lage, verschiedene Blutzelltypen zu bilden (Björnson, 1999). Stammzellen der Dermis zeigten *in vitro* ein Differenzierungspotential in so verschiedene Zelltypen wie glatte Muskelzellen, Adipozyten und neurale Phänotypen (Toma et al., 2001).

Abb.1.3: Vergleich zweier Modelle zur Stammzellendifferenzierung (H.M. Blau, 2001)



Diese überraschende Plastizität adulter Stammzellen, auch Zellen anderer Gewebe zu bilden, stellt die klassische Sichtweise, daß Stammzellen im adulten Organismus starken Restriktionen unterliegen und klar von „differenzierteren“ Zellen zu trennen sind, in Frage.

Nach bisheriger Ansicht ist eine Stammzelle eine diskrete Einheit, die zu einer relativ homogenen Population ähnlicher Stammzellen gehört. Während der Differenzierung gehen die Stammzeleigenschaften irreversibel verloren (s. Abb. 1.3). Helen Blau schlägt eine neue Sichtweise vor, wonach die Differenzierung ein gradueller Vorgang einer immer stärkeren Spezifizierung ist, während der die Stammzeleigenschaften abnehmen. Ein „Schritt zurück“ würde somit immer schwieriger, aber nicht unmöglich (Blau, 2001).

Die Plastizität adulter Zellen wirft verschiedene Fragen auf: Wie sehr werden die Eigenschaften der Zellen durch die Isolierung und Kultivierung *in vitro* beeinflusst? Wie nah sind die experimentellen Bedingungen an der *in vivo* Situation? Findet eine Migration und Differenzierung z.B. von Stammzellen aus dem Knochenmark in verschiedene Organe unter Normalbedingungen statt? Durch welche Eigenschaften und Mechanismen können die beobachteten Phänomene erklärt werden? Insbesondere auf die letzte Frage soll im Folgenden eingegangen werden.

1.6 Ursachen adulter Stammzellplastizität:

Transdifferenzierung, Dedifferenzierung, Zellfusion

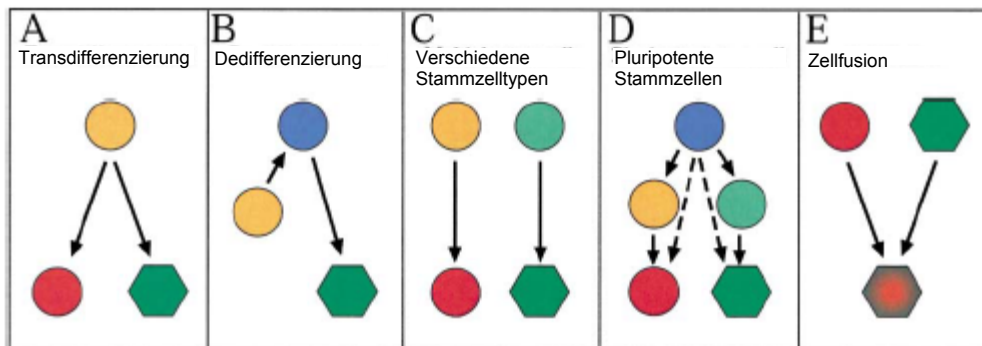
Die Plastizität adulter (Stamm-) Zellen kann durch verschiedene Ursachen und Mechanismen erklärt werden (s. Abb. 1.4):

- (A) Ein möglicher Mechanismus ist die Transdifferenzierung, das heißt die Konversion eines differenzierten bzw. determinierten Zelltyps (z.B. neuronale Stammzelle) in einen anderen (z.B. Blutzelle).
- (B) Oder aber die Zelle dedifferenziert, das heißt sie wechselt zunächst in einen weniger differenzierten Zustand, um anschließend einen anderen Phänotyp anzunehmen (ähnlich den mesenchymalen Blastemzellen bei Urodelen, s.o.).
- (C) Für die angenommene Plastizität adulter Stammzellen könnte jedoch auch die Existenz verschiedener Stammzelltypen in einem bestimmten Gewebe verantwortlich sein. So könnte die Fähigkeit neuronaler Stammzellen, das hämatopoetische System teilweise zu rekonstituieren, an einer Kontamination der Kultur mit zirkulierenden Stammzellen des Blutes liegen. Eine neuroektodermale Herkunft dermalen Stammzellen könnte deren Fähigkeit zur neuronalen Differenzierung erklären (Freda Miller, Keystone Symposium 2004).

- (D) Eine weitere Möglichkeit ist die tatsächliche Existenz pluripotenter Stammzellen, welche die Fähigkeit besitzen, in viele verschiedene Zellen, auch solche verschiedener embryonaler Herkunft, zu differenzieren. Ein Beispiel hierfür sind die oben erwähnten MAPC des Knochenmarks.

Abb. 1.4: Mögliche Mechanismen der beobachteten Plastizität von Zellen adulter Gewebe (Wagers und Weissman, 2004)

- A – TRANSDIFFERENZIERUNG
 B – DEDIFFERENZIERUNG
 C – VERSCHIEDENE STAMMZELLPOPULATIONEN
 D – EIN PLURIPOTENTER ADULTER STAMMZELLTYP
 E – ZELLFUSION



- (E) Schließlich kommt die Fusion mit gewebsspezifischen Zellen als möglicher Mechanismus infrage. Verschiedene Studien zur Plastizität von Zellen des Knochenmarks beschreiben deren Differenzierung in Hepatozyten (Lagasse et al., 2000), Kardiomyozyten (Orlic et al., 2001) oder sogar Purkinje-Neuronen des Cerebellums (Priller et al., 2001). Meist werden Knochenmarkszellen einer Spendermaus, deren Zellen ubiquitär GFP („green fluorescent protein“) oder β -Galaktosidase (β -Gal) als Marker exprimieren, in eine subletal bestrahlte Empfängermaus injiziert (bzw. in die Herzinfarktregion bei Orlic et al., 2001). Oder Spender- und Empfängermaus haben ein unterschiedliches Geschlecht, zum Beispiel Spender männlich, Empfänger weiblich. So lassen sich die Spenderzellen anhand ihrer Autofluoreszenz (GFP), β -Gal-Aktivität oder ihres Y-Chromosoms leicht in der Empfängermaus wiederfinden. Sind mit diesen Markern Zelltyp-spezifische Proteine exprimiert, liegt eine Differenzierung der Spenderzelle in den jeweiligen Zelltyp nahe. Die Arbeiten von Ying et al. und Terada et al. (beide 2002) zeigten sowohl für

neuronale Stammzellen als auch für Zellen des Knochenmarks, daß sie *in vitro* mit embryonalen Stammzellen fusionieren und deren Eigenschaften annehmen können. Alvarez-Dolado et al. (2003) zeigten die Fusion von (hämatopoetischen) Knochenmarkszellen mit Hepatozyten, Cardiomyozyten und Purkinjoneuronen *in vivo*. Zumindest ein Teil der beobachteten Plastizität adulter (Stamm-) Zellen *in vivo* beruht also nicht auf einer Differenzierung, sondern auf einer Fusion mit gewebe-spezifischen Zellen. Die Häufigkeit der beobachteten Fusionen ist allerdings zumindest *in vitro* sehr gering. (2-11 fusionierte Zellen/ 10^6 Knochenmarkszellen; Terada et al., 2002)

1.7 Knochenmarkstromazellen und Stammzelltherapie

Aufgrund der Fähigkeit von Knochenmarkstromazellen, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, und ihrer relativ einfachen Isolierung durch Knochenmarkpunktion erhofft man sich einen Einsatz in zellbasierten Therapieformen. Da sie autolog angewendet werden können, ergeben sich keine Abstoßungsreaktionen wie bei Fremdtransplantaten. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist ihre Anwendung ethisch völlig unbedenklich. Außerdem gibt es bisher keine Hinweise auf die Bildung von Tumoren im Empfängergewebe (Prockop et al., 2003).

Vielversprechende Experimente zur Stammzelltherapie mit Knochenmarkstromazellen bzw. der mononukleären Zellfraktion, zu welcher Knochenmarkstromazellen gehören, wurden bereits in Tiermodellen für verschiedene Krankheiten durchgeführt. Hierzu gehören Osteogenesis imperfecta (Pereira et al., 1998; Oyama et al., 1999; Chamberlain et al., 2004), Morbus Parkinson (Li et al., 2001; Schwarz et al., 1999), Schädigung des Rückenmarks (Hofstetter et al., 2002; Akiyama et al., 2002), Myokardinfarkt (Kudo et al., 2003) und Myelin-Defizienz (Jin et al., 2002). Die Knochenmarkstromazellen wurden entweder direkt (Rückenmark, Hofstetter et al., 2002; Herzinfarkt, Kudo et al., 2003) oder nach einer *ex vivo* Genmanipulation (Osteogenesis imperfecta, Chamberlain et al., 2004; Myelin-Defizienz, Jin et al., 2002) angewandt. Die beobachteten positiven Effekte basieren bei der Verwendung unbehandelter Knochenmarkstromazellen zum Teil wahrscheinlich auch auf einer Induktion der endogenen Regeneration und nicht einer Differenzierung der Knochenmarkstromazellen selbst.

1.8 Genexpression und cDNS-Mikroarrays

Von wenigen Ausnahmen wie zum Beispiel den B- oder T-Zellen des Immunsystems abgesehen, besitzen alle Zellen eines Organismus dasselbe Genom. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Muster an exprimierten Genen. So bilden sich im Laufe der Entwicklung in hoch regulierter Weise so unterschiedliche Zellen wie eine Knochen- oder eine Nervenzelle aus. Auch wenn eine vielfältige aktive Regulation der Genexpression eine entscheidende Rolle spielt, läßt sich vereinfachend sagen, daß die Genexpression die Zelle definiert. Eine Knochenzelle braucht und exprimiert andere Gene als eine Nervenzelle.

Die Mitte der neunziger Jahre entwickelte DNS-Mikroarray-Technologie (Schena et al., 1995) ermöglicht eine umfassende Analyse der Genexpression in verschiedenen Zelltypen, zellulären Zuständen oder Entwicklungsstadien. Zur Herstellung von DNS-Mikroarrays werden DNS-Sonden auf einen Glasobjektträger gebracht, dort kovalent gebunden und anschließend mit der zu untersuchenden Probe, zum Beispiel mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte RNS oder cDNS, hybridisiert. Durch Verwendung von Glas als Substrat zum Aufbringen der cDNS-Sonden können zwei verschiedene, unterschiedlich markierte Proben auf demselben Mikroarray kohybridisiert werden. Dies hat den Vorteil der direkten Vergleichbarkeit der zu untersuchenden Proben. Weiterhin kann das Hybridisierungsvolumen und damit die Probenmenge deutlich reduziert werden (Shalon, 1996). So besteht die Möglichkeit, relativ schnell eine größere Zahl von Proben – mit jeweiliger Analyse von bis zu mehreren zehntausend Genen gleichzeitig – zu vergleichen.

Bei der Analyse vieler tausend Gene in einem Experiment kommt der Datenverarbeitung eine besondere Bedeutung zu. Die erhaltenen Rohdaten, das heißt die ermittelte Intensität der einzelnen mit markierter cDNS hybridisierten Sonden („Spots“), müssen zunächst normalisiert werden, um eventuelle Schwankungen zwischen verschiedenen Markierungsreaktionen oder Experimenten auszugleichen. Die gemessene Intensität der Sonden (Spots) auf einem Array stellt eine komplexe Abbildung der Molekülkonzentration dar. Je nach Intention des durchgeführten Experiments muß anschließend die Wahrscheinlichkeit der Expression des jeweiligen Gens berechnet werden. Für komplexere Analysen und Vergleiche müssen differentielle Gene ermittelt und gruppiert („clustering“) werden, zum Beispiel nach Ähnlichkeiten im Expressionsniveau über einen Zeitverlauf.

Mikroarrays haben seit ihrer ersten Beschreibung große Bedeutung erlangt. Mit ihrer Hilfe wurden zum Beispiel Zellzyklus-regulierte Gene auf breiter Basis untersucht (in *S. cerevisiae*, Spellmann et al., 1998) sowie Charakteristika verschiedener Zelltypen anhand ihrer Genexpression genauer definiert (z.B. Lymphozyten oder Knochenmarkstromazellen, Alizadeh et al., 1998; Wieczorek et al., 2003). Weiterhin können sie der exakteren Beschreibung verschiedener Krebszelllinien dienen und damit zu einer möglichen besseren Bekämpfung der jeweiligen Krebsart beitragen (Ross et al., 2000). Auch Änderungen der genomischen DNS wie Duplikationen und Deletionen, die häufig Ursachen pathologischer Zustände sind, lassen sich durch Verwendung von Mikroarrays schnell und genomweit identifizieren (komparative Genomhybridisierung, engl. „CGH“, Pollack et al., 1999).

Wie oben erwähnt gehen Differenzierungsvorgänge mit Änderungen der Genexpression einher. Insofern stellen Mikroarrays eine optimale Technologie dar, um Differenzierungsvorgänge zu untersuchen und Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen ziehen zu können. Die Analyse von Genexpressionsänderungen während der Differenzierung neuraler Vorläuferzellen zeigte Ähnlichkeiten zu hämatopoetischen Stammzellen. Sie weist damit auf eventuelle Schlüsselgene für Stammzeleigenschaften hin. Außerdem zeigte sich ein enger Zusammenhang zwischen Differenzierung und Zellzyklus (Geschwind et al., 2001; Karsten et al., 2003). Auch die Differenzierung von KMSZ in Chondrozyten unter definierten Bedingungen *in vitro* wurde mit Mikroarrays untersucht. Differentiell regulierte Gene dieses Modellsystems tragen zum tieferen Verständnis der entsprechenden Entwicklungsprozesse *in vivo* bei (Sekiya et al., 2002).

1.9 Ziel der Arbeit

Knochenmarkstromazellen differenzieren *in vivo* und *in vitro* in sehr unterschiedliche Zelltypen, selbst solche unterschiedlicher entwicklungsbiologischer Herkunft (meso-, endo-, ektodermal). Bis heute ist unklar, welchem *in vivo* Zelltyp Knochenmarkstromazellen entsprechen. Die Ursachen ihres breiten Differenzierungspotentials sind bislang ebenfalls nicht eindeutig geklärt.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, über die Erstellung eines Expressionsprofils muriner Knochenmarkstromazellen mit cDNS-Mikroarrays mehr über die Biologie dieser Zellen herauszufinden. Weiterhin sollten die molekularen Grundlagen ihrer Fähigkeit, einen neuronalen Phänotyp *in vitro* zu entwickeln, untersucht werden. Hierzu mußte zunächst eine homogene Kultur muriner Knochenmarkstromazellen gewonnen werden. Anschließend sollten diese, in Anlehnung an die von Woodbury et al. (2000) beschriebene Vorgehensweise, in Zellen mit einem neuronalen Phänotyp differenziert werden. Die dabei auftretenden Änderungen im Genexpressionsprofil sollten mit Hilfe von cDNS-Mikroarrays analysiert werden, um so Einblicke in die molekularen Mechanismen dieser Differenzierung zu erhalten.