

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

**R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratten als Tiermodell
für Fragestellungen zur Zelltherapie mit
mesenchymalen Stammzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Nina Unger
aus
Haselünne

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Scholz

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Stammzellen	3
2.2 Mesenchymale Stammzellen	3
2.3 Zelltherapie mit adulten mesenchymalen Stammzellen	4
2.4 Geweberegeneration mit mesenchymalen Stammzellen.	5
2.4.1 Knochen.....	5
2.4.2 Knorpel	6
2.4.3 Sehnen und Bänder.....	7
2.4.4 Skelettmuskulatur	8
2.4.5 Herzmuskel.....	8
2.4.6 Blutgefäße	9
2.4.7 Nieren	9
2.4.8 Leber.....	9
2.4.9 Zentrales Nervensystem.....	10
2.4.10 Lunge.....	10
2.5 Genetische Marker und Tiermodelle	11
2.5.1 LacZ.....	11
2.5.2 GFP	12
2.5.3 hPLAP.....	12
2.6 Die R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratte	13
3 Material und Methoden	15
3.1 Versuchstiere	15
3.2 Tierhaltung	16
3.3 Genotypisierung	16
3.3.1 Histochemische Genotypisierung	16
3.3.2 Genotypisierung durch PCR	17
3.4 Schwanzveneninjektion.....	18
3.5 Intraartikuläre Injektion	19
3.6 Gewinnung von transgenen Spenderzellen.....	19
3.6.1 Isolierung von weißen Blutzellen	20
3.6.2 Gewinnung von Knochenmarkzellen	20
3.7 Transplantation von transgenen Zellen	21
3.8 Bestrahlung.....	22
3.9 Methoden zur Fixierung und Entkalkung von Gewebeproben.....	23
3.10 Einbettungsmethoden	23
3.11 Herstellung der Schnitte für die Histologie	24
3.12 Färben der Schnitte für die Histologie	25
3.13 Durchflusszytometrie.....	26
3.14 Zellkultur.....	28
3.14.1 Osteoblasten.....	28
3.14.2 Osteoklasten.....	28

4	Ergebnisse	30
4.1	Einfluss der Fixierung auf die Enzymaktivität von hPLAP	30
4.2	Einfluss der Einbettungsmethode auf die Enzymaktivität von hPLAP	32
4.3	Expression von hPLAP in Knochenzellen der hPLAP-transgenen Ratten..	34
4.4	Syngene Transplantation transgener Zellen in Wildtyp-Tiere	38
4.5	Knochenmarktransplantation in bestrahlte Ratten.....	40
4.6	Verwendbarkeit dieses Modells für Studien über Knorpelschäden	43
5	Diskussion	44
5.1	Das R26-hPLAP-transgene Rattenmodell.....	44
5.2	Knorpelregeneration mit mesenchymalen Stammzellen	45
5.3	Potenzial von Zelltherapien mit mesenchymalen Stammzellen für andere Organe	46
5.4	Transplantation von mesenchymalen Zellen im Rahmen von Knochenmark- Transplantationen?	48
5.5	Ausblick.....	49
6	Zusammenfassung	51
6	Summary	53
7	Literaturverzeichnis	55
	Danksagung	71
	Lebenslauf	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zuchtschema für R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratten.....	15
Abbildung 2: Histochemische Genotypisierung.....	17
Abbildung 3: Genotypisierung durch PCR.....	18
Abbildung 4: Bestrahlungsanordnung.....	22
Abbildung 5: Einfluss der Fixierung auf die Enzymaktivität von hPLAP: 40% EtOH im Vergleich zu 4% PFA.....	31
Abbildung 6: Paraffin- und MMA-Einbettung im Vergleich.....	33
Abbildung 7: Ubiquitäre Expression von hPLAP in Knochenzellen (proximale Tibia).....	35
Abbildung 8: Histologie von Wildtyp-Tieren als Negativ-Kontrolle (proximale Tibia).....	36
Abbildung 9: Expression des Transgens in kultivierten Zellen.....	37
Abbildung 10: Expression von hPLAP in der FACS-Analyse.....	38
Abbildung 11: Darstellung der Antikörperbildung in der FACS-Analyse.....	40
Abbildung 12: Knochenmarktransplantierte Tiere in FACS-Analyse und Histologie.....	41
Abbildung 13: Transgene Zellen in der Kniegelenkshöhle nach Injektion in das Kniegelenk	43

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APES	3-Amino-Propylethoxysilan
aqua dest.	destilliertes Wasser
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BMC	Knochenmarkzellen
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F ₁ - Generation	erste Nachkommen-Generation
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein (aus <i>Aequorea victoria</i>)
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (Neuherberg)
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
hPLAP	humane plazentäre alkalische Phosphatase
I.E.	internationale Einheiten
IGF II	Insulin-like Growth Factor II
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
LacZ	Galaktosidase Z (aus <i>E. coli</i>)
M	molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter

mM	millimolar
MMA	Methylmethacrylat
MnSO ₄	Mangansulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaNO ₂	Natriumnitrit
NBT	Nitroblautetrazolium
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
nM	nanomolar
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNM-Puffer	Tris-NaCl-MgCl ₂ -Puffer
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

1 Einleitung

Ein Organismus entwickelt sich aus einer einzigen befruchteten Eizelle. Daraus entstehen nach und nach etwa 300 verschiedene Zelltypen mit spezifischen Aufgaben. Unter Stammzellen versteht man die teilungsfreudigen Vorläufer der differenzierten Körperzellen. Sie können sich unbegrenzt teilen, wobei immer eine neue Stammzelle und eine Tochterzelle entstehen. Letztere kann sich dann zu einer der unterschiedlichen Zellarten ausdifferenzieren. Diese Fähigkeit haben Stammzellen nicht nur im embryonalen Leben, sie bleibt weitgehend auch im adulten Organismus erhalten.

Embryonale Stammzellen sind unbegrenzt teilungsfähig und omnipotent. Sie können sich also zu jeder beliebigen Zellart entwickeln. Daher sind sie theoretisch ideal für Zelltherapien geeignet. Dieses Forschungsgebiet ist allerdings ethisch stark umstritten. Aus diesem Grund sind adulte Stammzellen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (ZANDER et al., 2002). Auch adulte Stammzellen können sich zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren, wenn auch nicht mehr in demselben Ausmaß wie embryonale Stammzellen. Sie werden daher multipotent genannt. Zu den adulten Stammzellen gehören auch die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Sie sind schon lange bekannt und ihre Verwendung ist im Rahmen der Krebstherapie etabliert. Auch in den Organen kommen Stammzellen vor, welche dem Ersatz abgestorbener Zellen und der Reparatur von Verletzungen in diesen Organen dienen. Die Stammzellen dienen also der Entstehung eines Organismus sowie der Regeneration und Reparatur von Geweben im erwachsenen Leben.

In der jüngeren Vergangenheit wurden in immer mehr Organen Stammzellen nachgewiesen. Des Weiteren häuften sich Berichte über die Fähigkeit von adulten Stammzellen, sich auch über Keimblattgrenzen hinweg zu transdifferenzieren. In der jüngsten Vergangenheit werden allerdings Zweifel an dieser Möglichkeit geäußert und andere Mechanismen als Erklärung für viele beobachtete Phänomene angenommen (GOODELL, 2003, ALISON et al., 2004; CAMARGO et al., 2004; SCOTT, 2004).

Die Stammzelltherapie stellt den Versuch dar, geschädigte Gewebe oder Organe zu reparieren oder zu ersetzen. Allerdings ist bei vielen Zellarten noch nicht in ausreichendem Maße bekannt, aus welchen Stammzellen und über welche Vorläuferzellen sie sich entwickeln und welche Faktoren an dieser Differenzierung beteiligt sind. Transplantationsexperimente sind ein sinnvoller Ansatz, die Entstehung und Herkunft einzelner Zellpopulationen zu verfolgen (KISSEBERTH et al., 1999; MUJTABA et al., 2002).

Transplantationsexperimente können aber nur dann mit Erfolg eingesetzt werden, wenn gewährleistet werden kann, dass die transplantierten Zellen im Empfänger auch als solche

wiedererkannt werden können. Dies stellt hohe Ansprüche an Tiermodelle für Transplantationsexperimente, da die Zellen für die Transplantation dem Empfängerorganismus einerseits möglichst ähnlich sein müssen, um keine Abstoßungsreaktionen hervorzurufen, andererseits jedoch mindestens einen deutlichen Unterschied aufweisen müssen, um eine spätere Differenzierung zu erlauben. Für die Durchführung von Transplantationsexperimenten existieren diverse Tiermodelle.

Ein solches Tiermodell ist die R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratte. Dieses Rattenmodell wurde von der Arbeitsgruppe um E. P. Sandgren, Madison, Wisconsin, USA, erzeugt (KISSEBERTH et al., 1999). Bei dem Transgen handelt es sich um das Enzym humane plazentäre alkalische Phosphatase (hPLAP), welches bei Transplantationsexperimenten als Marker verwendet werden kann.

hPLAP ist äußerst hitzestabil, was es geeignet erscheinen lässt, die hohen Temperaturen, welche bei der routinemäßigen Paraffineinbettung von Organen entstehen, zu überdauern. Damit sollte dieses Enzym insbesondere für Studien, in denen histologische Techniken verwendet werden, einen brauchbaren Marker darstellen. hPLAP wird in den transgenen Tieren während der Embryonalphase und auch postnatal ubiquitär in allen Körperzellen gleichmäßig exprimiert.

Es handelt sich bei diesem Tiermodell um einen Inzuchtstamm, die Tiere weisen also eine große genetische Einheitlichkeit auf. Diese Eigenschaft ist von großem Vorteil, da auf diese Weise Transplantationen zwischen den Tieren dieses Stammes ohne Gefahr von Abstoßungsreaktionen durchgeführt werden können. Die einzige Ausnahme zu der genetischen Identität innerhalb der Linie stellt das Transgen selbst dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, die Nutzbarkeit von R26-hPLAP-transgenen Fischer 344 Ratten als Tiermodell für Studien über Zelltherapien mit mesenchymalen Zellen zu überprüfen.

Ferner sollten die hierfür notwendigen Methoden erarbeitet werden.

Ein praktischer Nutzen dieses Modells könnte in der Entwicklung neuer Therapiemethoden für Arthropathien unterschiedlicher Genese liegen, die in der Kleintiermedizin, insbesondere bei Hunden, aber auch in der Pferdemedizin eine große Rolle spielen. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise die autologe Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in Gelenke mit Knorpelschäden oder Verletzungen zur Beschleunigung der Heilungsprozesse.

2 Literaturübersicht

2.1 Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die nicht auf die Entwicklung zu einer bestimmten Zell-Linie festgelegt sind. Erst ihre Nachkommen entwickeln sich zu definierten Zellpopulationen. Stammzellen spielen in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle. Embryonale Stammzellen sind multipotent und daher theoretisch ideal für Zelltherapien geeignet. Dieses Forschungsgebiet ist allerdings ethisch stark umstritten. Aus diesem Grund sind adulte Stammzellen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

Im Jahr 2000 hielt WEISSMAN es für möglich, dass alle Organe nicht nur von (embryonalen) Stammzellen abstammen, sondern auch später noch teilungsfähige multipotente Zellen gefunden werden können. Die Existenz von Stammzellen in adulten Geweben wurde seither für immer mehr Organe nachgewiesen.

Adulte Stammzellen sind fast ebenso gut expandierbar wie embryonale Stammzellen, leicht gewinnbar, autolog transplantierbar und gut verträglich sowie nicht mit ethischen Bedenken verbunden (ZANDER et al., 2002). Sie proliferieren nach einem asymmetrischen Schema. Eine Tochterzelle entwickelt sich weiter, die andere ist eine neue Stammzelle.

Die Nachkommen können verschiedenen Zell-Linien angehören. Aus den verschiedenen Linien entwickeln sich zuletzt differenzierte Zellpopulationen, die bestimmte Gewebe bilden. Jeder dieser Entwicklungsschritte wird durch ein spezifisches Zusammenspiel von Einflüssen durch die Zelle selbst (z.B. durch ihr Genom), von äußeren Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren wie TGF- β oder IGF II) (CAPLAN, 1991; BRUDER et al., 1994; JAISWAL et al., 2000) sowie der unmittelbaren Umgebung der Zellen (TSAI und MC KAY, 2000) bestimmt.

2.2 Mesenchymale Stammzellen

Neben hämatopoetischen Stammzellen enthält Knochenmark auch Stammzellen für das Stromazell-System, welche die Fähigkeit haben, sich zu verschiedenen mesenchymalen Zell-Linien zu entwickeln. Diese Fähigkeit haben nicht nur embryonale Zellen, sie bleibt auch beim ausgewachsenen Organismus erhalten. Die mesenchymalen Stammzellen bilden den Stammzellpool für nicht-hämatopoetische Zellen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Fibroblasten, die Knochen, Knorpel, Sehnen und Bänder, Fettgewebe und Muskulatur aufbauen können (FRIEDENSTEIN et al., 1976; BRUDER et al., 1998b; MAJUMDAR et al., 1998; PITTENGER et al., 1999; GAO et al., 2001; JACKSON et al., 2002).

Solche multipotenten Zellen können aus dem Knochenmark gewonnen und in Kultur expandiert werden. In Kolonien, die aus einer einzelnen Knochenmark-Stromazelle entstehen, können drei Zelltypen unterschieden werden, von denen sich die Population der kleinsten Zellen am schnellsten vermehrt. Diese Population scheint das größte Potenzial für multipotente Differenzierung aufzuweisen und ist damit sehr interessant für die Erforschung adulter Stammzellen (COLTER et al., 2001). In Zellkulturen können durch Zugabe spezieller Faktoren Knochenmark-Stromazellen in ihrer weiteren Differenzierung zu osteoblastären, chondrozytischen, adipozytischen oder anderen mesenchymalen Zell-Linien beeinflusst werden (OWEN et al., 1988).

Möglicherweise lassen sich pluripotente mesenchymale Zellen auch aus anderen Geweben als dem Knochenmark bei einem adulten Organismus isolieren. Berichtet wird dies zum Beispiel von Periost (NAKAHARA et al., 1990 und 1992), Skelettmuskulatur (DEASY et al. 2001), Synovialmembran (DE BARI et al., 2001), sowie Fettgewebe (GRONTHOS et al., 2001).

2.3 Zelltherapie mit adulten mesenchymalen Stammzellen

Die Forschung der letzten Jahre auf dem Gebiet der Stammzellen hat ergeben, dass pluripotente mesenchymale Vorläuferzellen, welche in bestrahlte Empfängermäuse injiziert werden, dort nicht nur überleben, sondern auch in vielen Geweben (Knochen, Knorpel, Lunge, Milz und Knochenmark) proliferieren (PEREIRA et al., 1995, 1998).

Darüber hinaus ist bereits gezeigt worden, dass die Transplantation von Wildtyp- Knochenmark in transgene Mäuse mit einem Osteogenesis imperfecta-Phänotyp (PEREIRA et al., 1998) oder in Hyp-Mäuse mit hypophosphatämischer Rachitis (MIYAMURA et al., 2000) zu einer deutlichen Verbesserung der Knochenphänotypen dieser Mäuse geführt hat. Auch GUSSONI et al. (1999) berichten von deutlicher Verbesserung des Muskel-Phänotyps durch die Transplantation von Wildtyp-Knochenmark in einem Mausmodell für muskuläre Dystrophie.

All dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass diesen Empfängertieren mesenchymale Zellpopulationen erfolgreich transplantiert werden konnten. Es scheint einiges dafür zu sprechen, dass native oder bis zu 24 Stunden kultivierte Zellen hierfür besser geeignet sind als länger kultivierte mesenchymale Stammzellen (ROMBOUTS und PLOEMACHER, 2003). Mesenchymale Stammzellen bieten vielfältige Möglichkeiten für Therapieansätze. Es könnte sich als lohnenswert erweisen, mesenchymale Vorläuferzellen auch für ex vivo Gen- und Zelltherapien zu nutzen (PROCKOP, 1997).

2.4 Geweberegeneration mit mesenchymalen Stammzellen.

Die hierzu vorliegenden Daten aus der Literatur sollen im Folgenden für die verschiedenen Organsysteme im Einzelnen geschildert werden.

2.4.1 Knochen

Die zellulären Bestandteile des Knochens leiten sich überwiegend von einer gemeinsamen Progenitorzelle ab, aus welcher (unter anderem) Osteoblasten, Chondroblasten und Fibroblasten entstehen. In Zellkulturen differenzieren sich diese Vorläuferzellen durch den Einfluss von Dexamethason bevorzugt zu Osteoblasten aus (MANIATOPOULOS et al., 1988; LEBROY et al., 1991; KASUGAI et al., 1991). JAISWAL et al. (1997) beschreiben eine Methode, mit der die osteogenetische Entwicklung von humanen mesenchymalen Stammzellen in Zellkultur beobachtet werden kann. Osteoblasten bilden an ihrer basalen Seite die organische, extrazelluläre Knochenmatrix, das Osteoid. Diese Matrix besteht aus ca. 90% Collagen I und 10% Nicht-Collagen-Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen. Das Osteoid wird durch die Aktivität der Osteoblasten mineralisiert. Danach kann die Knochensubstanz aus bis zu 65% Mineralien bestehen (v.a. Hydroxylapatit, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$). Osteoblasten mauern sich auf diese Weise selbst ein und werden so zu Osteozyten. Diese bleiben über feine Fortsätze in Kanälchen der extrazellulären Knochensubstanz miteinander in Verbindung und dienen der Versorgung des sie umgebenden Gewebes.

Es wurde nun angenommen, dass mesenchymale Stammzellen zur Unterstützung der Knochenheilung eingesetzt werden könnten. OLMSTEDT-DAVIS et al. (2003) berichten von einer aus dem Knochenmark von Mäusen isolierten Stammzell-Population, die bei letal bestrahlten Mäusen zur Regeneration des Osteoblasten-Vorläufer-Pools geführt hat. Darüber hinaus kann der Phänotyp von Mausmodellen mit genetischen Osteoblastendefekten durch Knochenmarktransplantation verbessert werden (PEREIRA et al., 1998; MIYAMURA et al., 2000). HAYNESWORTH et al. (1992) berichten, dass menschliche Knochenmarkzellen nach Expansion in Zellkultur und Zucht von Subpopulationen in Maus-Empfängern Knochengewebe bilden können. WERNTZ et al. (1996) legen einen Bericht über Knochenheilung unter Verwendung von Knochenmarkzellen bei Ratten vor. Nach Implantation von autologen lebenden Knochenmarkzellen in einen frischen Knochendefekt im Femur konnte nach drei Wochen die Bildung von Geflechtknochen und nach sechs Wochen dessen Umbildung in lamellären Knochen nachgewiesen werden. Auch PALEY et al. (1986) konnten eine schnellere Frakturheilung nach Implantation von mesenchymalen Zellzubereitungen nachweisen.

Ein weiterer Ansatz in Experimenten über die Beeinflussung von Knochenheilung beinhaltet die Kombination von Keramikimplantaten mit Zellzubereitungen aus Knochenmarkzellen (OHGUSHI et al., 1989; GOSHIMA et al., 1991; GRUNDEL et al., 1991; DENNIS et al., 1992; KADIYALA et al., 1997; BRUDER et al., 1998a). Obwohl diese Versuche an verschiedenen Tierarten (meist Ratten oder Hunde) und mit unterschiedlichen Keramikimplantaten (massive oder poröse Blöcke) durchgeführt wurden, lassen die verschiedenen untersuchten Parameter auf bessere Einheilung der Keramikimplantate in den Knochen bei Anwendung von Stammzell-Zubereitungen schließen. In histologischen und histomorphometrischen Analysen wurden signifikant größere Mengen von Geflechtknochen und lamellärem Knochen in den Implantaten der Tiergruppen nachgewiesen, die mit mesenchymalen Stammzellen behandelt worden waren, als in den Kontrollgruppen.

Aus den genannten Resultaten ergeben sich vielfältige Forschungsansätze im Hinblick auf Therapiemöglichkeiten von Knochenerkrankungen. Es sollte allerdings Beachtung finden, dass offenbar deutliche Unterschiede zwischen den Spezies bestehen (JOHNSON et al., 1988), so dass nach Übertragung einer Methode auf eine andere Art nicht immer mit entsprechenden Erfolgen gerechnet werden kann.

2.4.2 Knorpel

Chondroblasten leiten sich unter dem Einfluss anderer Wachstumsfaktoren aus derselben Progenitorzelle ab wie Osteoblasten. JOHNSTONE et al. (1998) zeigen, dass sich aus dem Knochenmark von Kaninchen isolierte mesenchymale Vorläuferzellen unter dem Einfluss von TGF- β 1 und Dexamethason zu chondrogenen Zellen differenzieren. Die Zellen produzieren Typ II-Collagen und ähneln hypertrophen Chondrozyten. Auch DENKER et al. (1995) und YOO et al. (1998) berichten von chondrogener Wirkung von TGF- β 1, KADIYALA et al. (1997) von der chondrogenen Wirkung von Dexamethason. Durch Zusatz von TGF- β 3, Dexamethason und Thyroxin in veränderlichen Mengen zum Kulturmedium waren auch MACKAY et al. (1998) in der Lage, adulte, humane mesenchymale Stammzellen zur Knorpelsynthese anzuregen. Die Zellen synthetisierten eine extrazelluläre Matrix, welche Typ II-Collagen und knorpelspezifische Proteine enthielt. Entsprechend berichten auch BARRY et al. (2001) von chondrogener Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter dem Einfluss von TGF- β 2 oder - β 3, die in Kultur knorpelspezifische Proteine und Collagen Typ II und X synthetisierten.

Chondroblasten produzieren Chondroid, mauern sich auf ähnliche Weise selbst ein wie die Osteoblasten und werden so zu Chondrozyten. Das Chondroid kann unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen, je nach der Art des gebildeten Knorpels. Hyaliner Knorpel

enthält zum Beispiel viel Chondroitinschwefelsäure, welche die kollagenen Fasersysteme „maskiert“, so dass sie nur in polarisiertem Licht sichtbar sind. Elastischer Knorpel enthält starke elastische Fasern und weniger Grundsubstanz. Faserknorpel schließlich besteht aus stark miteinander verflochtenen Kollagenfaserbündeln. Seine Chondroblasten erzeugen kein Chondroitinsulfat.

WAKITANI et al. überprüfen bereits 1994 den Einfluss von osteochondralen Vorläuferzellen auf den Heilungsverlauf von Knorpelsubstanzverlusten auf der Gelenkfläche in Knien von Kaninchen. Die Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark und aus Periost gewonnen und in einem Typ I-Collagen-Gel in die Knorpeldefekte transplantiert. Als Kontrollen wurden Knorpeldefekte entweder mit zellfreiem Collagen-Gel versorgt oder nicht behandelt. Das Narbengewebe der unter Verwendung von Zellen versorgten Defekte war nach Abschluss der Untersuchungen deutlich fester und belastbarer als die ohne Zellzubereitung behandelten oder die unbehandelten Kontrollen, wenn auch nicht so belastbar wie unverletzter Gelenkknorpel. Auch JOHNSTONE und YOO beschreiben 2001 verschiedene Möglichkeiten, verletztes Knorpelgewebe durch Transplantation von Chondrozyten und ihren mesenchymalen Vorläuferzellen in der Heilung zu unterstützen. In einem Ziegen-Modell für Osteoarthritis wurden autologe mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark gewonnen, in Kultur vermehrt und mit GFP transfiziert. Diese Zellen wurden dann in die Kniegelenke injiziert und konnten dort die Regeneration von Meniskus-Gewebe verbessern sowie progressive Knorpeldegenerationsprozesse verlangsamen (MURPHY et al., 2003). Zu ähnlich lautenden Resultaten gelangen auch PASCHER et al. (2004). Die Zellen wurden in der letztgenannten Studie mit adenoviralen Vektoren und Markergenen versehen und in die Kniegelenkshöhle von Kaninchen implantiert.

Zusammengenommen lassen diese Resultate hoffen, dass sich die Zelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen in naher Zukunft zu einer sehr interessanten Therapieform für Osteoarthrosen entwickeln könnte.

2.4.3 Sehnen und Bänder

Neben Knochen und Knorpel, den wichtigsten Stützgeweben in Säugerorganismen, sind auch Sehnen und Bänder mesenchymalen Ursprungs. Auch auf diesem Gebiet liegen Berichte über die Verwendung von Stammzellen zur Zelltherapie vor. So führt zum Beispiel die Implantation von mesenchymalen Stammzellen zu deutlichen Verbesserungen im Heilungsverlauf von Sehnenverletzungen (YOUNG et al., 1998). Einen ähnlich lautenden Bericht le-

gen KANEMARU et al. (2003) vor. Sie zeigen die Anwendung von mesenchymalen Stammzellen bei der Therapie von verletzten Stimmbändern.

2.4.4 *Skelettmuskulatur*

Eine weitere Zellpopulation mesenchymaler Herkunft bildet die quergestreifte Skelettmuskulatur. WAKITANI et al. (1995), FERRARI et al. (1998) und BITTNER et al. (1999) konnten in unterschiedlichen Versuchen mit Ratten (WAKITANI) oder Mäusen (FERRARI und BITTNER) nachweisen, dass myogene Vorläuferzellen aus dem Knochenmark stammen. GALLI et al. konnten 2000 sogar bei neuralen Stammzellen das Potenzial zur Differenzierung zu Skelettmuskulatur nachweisen.

2.4.5 *Herzmuskel*

Ein weiteres Forschungsgebiet für die Zelltherapie stellt das Herz dar, das ebenfalls mesenchymalen Ursprungs ist. ORLIC et al. (2001a und 2001b) zeigen, dass lokale Injektionen von adulten Maus-Knochenmarkzellen bei Tieren derselben Mauslinie zur de novo Genese myokardialer Zellen führen. Für dieses Experiment wurden durch Ligatur von Koronararterien Infarkte ausgelöst und die Knochenmarkzellen in gesundes Gewebe direkt neben den infarzierten Arealen injiziert. Erste Versuche, humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in den Herzventrikel von Mäusen zu injizieren und dort ihre Entwicklung zu beobachten, scheinen zu zeigen, dass diese Zellen dort anwachsen und sich weiterentwickeln, wenn auch nur in geringer Anzahl (TOMA et al., 2002). Die Zellen, die länger als eine Woche überlebten, entwickelten im Laufe der Zeit die gleiche Morphologie wie die sie umgebenden Kardiomyozyten.

In einer anderen Studie wurden Kardiomyozyten in Herzen von Frauen gefunden, die ein Y-Chromosom aufwiesen. Die Frauen hatten zuvor Knochenmarktransplantationen von männlichen Spendern erhalten. Dies zeigt, dass die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark der Spender in der Lage sind, sich auch zu Kardiomyozyten zu differenzieren (DEB et al., 2003). Bestätigt wurde dies auch durch die Studie von BITTIRA et al. (2003), in der Ratten markierte Knochenmark-Stromazellen intravenös injiziert bekamen. Bei einigen dieser Ratten wurde künstlich ein myokardialer Infarkt verursacht und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, ob sich in den verletzten Herz-Regionen markierte Stromazellen nachweisen lassen. Dies war bei allen operierten Tieren der Fall. SHAKE et al. (2002) kommen mit ihren Experimenten an Schweinen zu ähnlichen Ergebnissen.

2.4.6 Blutgefäße

Interessant sind auch die Ergebnisse der Experimente von MAJKA et al. (2003), die zeigen, dass sich aus dem Knochenmark stammende Zellen in Skelettmuskulatur zu Gefäßendothel und glatter Muskulatur von Blutgefäßwänden differenzieren können.

2.4.7 Nieren

Um zu erforschen, ob extrarenale Zellen bei der Regeneration von Nierengewebe eine Rolle spielen, untersuchen POULSOM et al. (2001) die Nieren weiblicher Mäuse, die von männlichen Mäusen Knochenmarkzellen erhalten hatten, sowie menschliche Nierenproben von männlichen Patienten, welche weibliche Nieren transplantiert bekommen hatten. Durch in situ Hybridisierung wurde in beiden Fällen das Y-Chromosom nachgewiesen. Auch ITO et al. (2001) kommen in ihren Experimenten mit einem transgenen Rattenstamm zu dem Ergebnis, dass Knochenmarkzellen in vivo an der Regeneration von Glomerula beteiligt sein können. Diese Ergebnisse führen zu der Hoffnung, dass Knochenmarkzellen bei Nierenerkrankungen therapeutisch eingesetzt werden können.

2.4.8 Leber

In den letzten Jahren sind einige Studien publiziert worden, die vermuten lassen, dass sich Stammzellen aus dem Knochenmark auch zu epithelialen Gewebe transdifferenzieren können. Ob es sich dabei um mesenchymale Stammzellen handelt, ist derzeit unklar. THEISE et al. (2000a) und LAGASSE et al. (2000) berichten von Mäuse-Experimenten, in denen die Abstammung der Hepatozyten von Knochenmarkzellen nachgewiesen werden konnte. Nur wenig später veröffentlichten THEISE et al. (2000b) eine Studie über weibliche Patienten, die von männlichen Spendern Knochenmark transplantiert bekommen hatten, und über männliche Patienten, welche von weiblichen Spendern Lebergewebe empfangen hatten. Bei Untersuchungen von Leberbiopsien beider Gruppen wurden Y-Chromosom-positive Leberzellen sowohl in den weiblichen Knochenmark-Empfängern sowie den männlichen Empfängern weiblichen Lebergewebes nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Hepatozyten und eventuell auch Cholangiozyten durch extrahepatische Stammzellen, wahrscheinlich aus dem Knochenmark, regeneriert werden können. In ihren Experimenten mit verschiedenen Mausmodellen kommen auch FUJII et al. (2002), JIANG et al. (2002) und POULSOM et al. (2003) zu dem Ergebnis, dass Knochenmarkzellen an der Regeneration von Leberzellen teilhaben können. Auch im Blut zirkulierende Stammzellen können sich angeblich zu Hepatozyten differenzieren (KORBLING et al., 2002). So ergeben sich vielleicht auch auf dem Gebiet der Lebererkrankungen Chancen durch Zelltherapien.

2.4.9 *Zentrales Nervensystem*

MAHMOOD et al. (2003) berichten von Ergebnissen, die darauf schließen lassen, dass Zelltherapien unter Verwendung von Stromazellen auch für Erkrankungen des ZNS möglich sein könnten. In dieser Studie wurden Ratten 24 Stunden nach einem Hirntrauma menschliche Knochenmark-Stromazellen injiziert. Diese Zellen wanderten in die betroffenen Areale ein und differenzierten sich zu Glia- und Nervenzellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch BONILLA et al. (2002), die Knochenmarkzellen intrazerebral injizierten und ihre weitere Entwicklung beurteilten. Dies bestätigte frühere Berichte von KENNEDY und ABKOWITZ (1997) und von PRILLER et al. (2001), welche die Herkunft von Glia- und Nervenzellen aus Knochenmarkzellen beschrieben. Von MEZEY et al. (2000; 2003) liegen mehrere Berichte vor, nach denen sich aus transplantierten Knochenmarkzellen Zellen mit neuronalem Phänotyp entwickelten.

2.4.10 *Lunge*

In der retrospektiven Analyse von Lungenproben von knochenmarktransplantierten Patientinnen, die von männlichen Spendern Zellen erhalten hatten sowie bei der Übertragung dieser Gegebenheiten auf einen Tierversuch konnten Zellen nachgewiesen werden, die eindeutig vom Spender stammen (SURATT et al., 2003). Auch KENNEDY und ABKOWITZ (1997), KOTTON et al. (2001) und JIANG et al. (2002) berichteten von der Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von adulten Spendertieren zu epithelialen Lungenzellen. Es wird daher angenommen, dass adulte Stammzellen in Zukunft eine Rolle bei der Therapie von Lungenerkrankungen spielen könnten.

2.5 Genetische Marker und Tiermodelle

Für die Beantwortung von Fragen zum therapeutischen Potential von Zelltherapien sind Tiermodelle von enormer Wichtigkeit. Transplantationsexperimente erfordern eine Methode, die es erlaubt, einzelne Zellen oder ganze Gewebe so zu markieren, dass später Rückschlüsse auf die Herkunft dieser Zellen möglich werden. Die zur Verfügung stehenden Techniken zur in vivo Markierung von Zellen waren lange Zeit unbefriedigend. Ein Ansatz für die Lösung dieser Probleme ist es, einen stabilen genetischen Marker in alle Körperzellen eines Tieres einzubauen. Wenn erreicht werden kann, dass ein solcher genetischer Marker auch in allen Abkömmlingen der Zellen exprimiert wird, wäre dies eine besonders sinnvolle Herangehensweise.

Ein idealer genetischer Marker sollte den folgenden Kriterien entsprechen: Er sollte keinen Einfluss auf die Ontogenese des Tieres haben, in dem er exprimiert wird; er sollte in allen Körperzellen und während des ganzen Lebens des Tieres gleichmäßig exprimiert werden und er sollte in diesen Körperzellen eindeutig nachweisbar sein, und zwar in lebenden Zellen sowie in verschiedenen fixierten Zell- oder Gewebe-Präparationen.

Zu den am häufigsten verwendeten genetischen Markern gehören das *LacZ*-Gen aus dem Bakterium *Escherichia coli*, welches für β -Galaktosidase (ein sensitiver histochemischer Marker) codiert, GFP (green fluorescent protein) aus der Qualle *Aequorea victoria* und hPLAP (humane plazentäre alkalische Phosphatase). All diese genetischen Marker haben spezifische Vor- und Nachteile.

2.5.1 *LacZ*

LacZ wird häufig als Reportergen in Knockout-Mäusen und als Marker für Promotor-Fallen-Experimente sowie für transfizierte Zell-Linien verwendet. Allerdings kann die postnatale Expression von *LacZ* unzuverlässig sein (CUI et al., 1994). Außerdem ist *LacZ* nicht hitzestabil und daher wird durch die Paraffineinbettung die Enzymaktivität zerstört (GOSSLER und ZACHGO, 1993). Ein weiterer Nachteil von *LacZ* bei Fragestellungen zu Knochenzellen ist die Tatsache, dass Osteoklasten selbst über eine sehr hohe β -Galaktosidase-Aktivität verfügen, was den Nachweis von *LacZ*-Expression in Knochen schwierig macht (ZHENG et al., 1991). Die Einsatzmöglichkeiten von *LacZ* sind also beschränkt.

2.5.2 GFP

Ein wichtiger Vorteil von GFP ist, dass es im Gegensatz zu LacZ und hPLAP auch in lebenden Zellen direkt sichtbar zu machen ist, da die Fluoreszenz vom bioluminiszenten chromophoren Protein selbst ausgeht und nicht erst durch Färbung oder Markierung sichtbar gemacht werden muss (CUBITT et al., 1995). Allerdings ist GFP für histologische Untersuchungen nur eingeschränkt verwendbar.

Temperaturen über 15°C führen zu mangelhafter Ausbildung von GFP. Erst wenn das Protein fertig ausdifferenziert vorliegt, ist es stabil und verträgt auch Temperaturen bis zu 65°C. Dennoch kann während der Paraffineinbettung ein großer Teil der Fluoreszenz verloren gehen (TAKEUCHI et al., 2003). Außerdem müssen für eine deutliche Fluoreszenz sehr viele (etwa 10^6) GFP-Moleküle pro Zelle exprimiert werden. Ein indirekter Marker, der eine Reaktion katalysiert, deren Produkt dann nachgewiesen werden kann, müsste in sehr viel geringerem Umfang exprimiert werden und könnte dennoch zu denselben Ergebnissen führen.

Dessen ungeachtet wurden sowohl GFP-transgene Mäusestämme (OKABE et al., 1997) als auch transgene Rattenstämme (HAKAMATA et al., 2001) generiert und bei einigen Fragestellungen mit Erfolg verwendet. In jüngeren Studien wird über einen weiteren GFP-transgenen Rattenstamm berichtet (TAKEUCHI et al., 2003). Die GFP-Expression war nicht in allen Organen gleichmäßig und wurde im Laufe der Ontogenese der transgenen Tiere immer schwächer. Die Expression des Transgens konnte sogar von Zelle zu Zelle in derselben Population unterschiedlich ausfallen. Dies wird von den Autoren durch den verwendeten Promotor (Cytomegalovirus enhancer, chicken β -actin enhancer-promoter, and rabbit β -globin poly (A) signal; CAG) erklärt.

2.5.3 hPLAP

hPLAP wurde ursprünglich als Reporterenzym in Genexpressionstudien an transfizierten Zellen entwickelt (HENTHORN et al., 1988). Später wurde mit Erfolg versucht, hPLAP als histochemisch nachweisbares Reporterenzym in transgenen Mäusen zu verwenden (DEPRIMO et al., 1996). Es handelt sich um ein Enzym, welches spezifisch in nur einigen Geweben weniger Säuger vorgefunden wird. Zu nennen sind hier die Plazenta von Primaten sowie manche maligne Zell-Linien. Daher wird hPLAP auch als Tumormarker verwendet (BENHAM et al., 1981; O'CONNOR und CULP, 1994; CULP et al., 1998).

Die Eigenschaft, die hPLAP zu einem interessanten Markerenzym macht, ist seine Hitzestabilität. Sie wird ausgenutzt, um das Enzym von anderen alkalischen Phosphatasen unterscheiden zu können. Die meisten alkalischen Phosphatasen überstehen Temperaturen nicht, die im Verlauf einer normalen Paraffineinbettung entstehen. Dieser Unterschied zwischen

hPLAP und alkalischen Phosphatasen aus anderen Geweben wird durch strukturelle Unterschiede zwischen den Isozymen erklärt (LE DU und MILLAN, 2002). Darüber hinaus liegen die Gene für diese Enzyme auf verschiedenen Chromosomen (FISHMAN, 1990). hPLAP verliert seine Enzymaktivität bei einer Paraffineinbettung nicht (KISSEBERTH et al., 1999). Die Enzymaktivität von hPLAP kann also nach der Einbettung noch in Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Dazu werden histochemische Methoden angewendet. Diese Methoden wurden bisher nur an Weichteil-Organen erprobt, welche routinemäßig in Paraffin eingebettet werden. Bisher ist nicht bekannt, ob hPLAP seine Enzymaktivität auch während einer Einbettung in Methylmethacrylat (MMA) behält. Die Einbettung in MMA aber ist zur Bearbeitung von histologischen Fragestellungen an Knochen von entscheidendem Vorteil, da der Knochen nicht entkalkt werden muss. Nicht nur in Knochenproben bleiben außerdem morphologische Details besser erhalten.

2.6 Die R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratte

Für die Herstellung von transgenen Tiermodellen sind insbesondere Mäuse und Ratten geeignet. Sie sind mit relativ geringem Aufwand zu halten und vermehren sich schnell. Für einige Experimente werden Ratten bevorzugt, weil ihre Körpergröße verschiedene Eingriffe einfacher durchführbar macht.

Die ubiquitäre Expression eines genetischen Markers in allen Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für ein vielseitig einsetzbares Tiermodell mit genetisch markierten Zellen. Der CAG-Promotor, den TAKEUCHI et al. (2003) einsetzten, scheint keine ubiquitäre Expression von GFP zu gewährleisten, was dazu führt, dass GFP in Gehirn, Lunge, Leber und Pankreas-Inselzellen nur in frühen Entwicklungsstadien der transgenen Tiere exprimiert wird. Dagegen hat sich gezeigt, dass insbesondere der ROSA β geo 26 (ROSA26) Genpromotor ubiquitäre Expression von Markergenen in Mäusen und Ratten erzeugt (ZAMBROWICZ et al., 1997 und KISSEBERTH et al., 1999). hPLAP- oder GFP-transgene Ratten und Mäuse, die ihr Transgen unter der Kontrolle des R26-Promotors (ein 0.8 kb-Stück der ROSA26 Promotor-Sequenz) exprimieren, zeigen ubiquitäre, einheitliche und stabile Expression ihres jeweiligen Transgens (KISSEBERTH et al., 1999).

Sowohl für das R26-hPLAP- als auch für das R26-GFP-Konstrukt konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Transgens im Verlauf der Ontogenese von transgenen Ratten und Mäusen nicht verändert wird (KISSEBERTH et al., 1999).

Die R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratte ist ein Inzuchtstamm, die Tiere sind also genetisch sehr einheitlich. Die einzige Ausnahme zu ihrer genetischen Identität stellt das transgene Enzym selbst dar. Diese genetische Einheitlichkeit der Tiere ist vorteilhaft, da auf diese

Weise Transplantationen zwischen Tieren dieses Stammes ohne Gefahr von Abstoßungsreaktionen durchgeführt werden können.

Die R26-hPLAP-transgene Ratte wurde hergestellt, indem das DNA-Fragment, welches für das Enzym codiert, zusammen mit dem R26-Promotor und einem SV40-poly-A-Signal aus dem entsprechenden Plasmid isoliert und dann in befruchtete Eizellen von F-344-Ratten mikroinjiziert wurde. Diese Eizellen wurden dann in hormonell vorbereitete weibliche Ratten übertragen, die so die erste Generation von transgenen Tieren austrugen. Diese Nachkommen wurden durch PCR-Screenings auf Anwesenheit des Transgens überprüft.

Die vorliegenden Experimente wurden entworfen, um zu erkunden, welches Potential sich für Zellabstammungsstudien, insbesondere im Hinblick auf Knochen- und Knorpelzellen, in den ingezüchteten R26-hPLAP-transgenen Fischer-344-Ratten verbergen könnte.

Von diesem Modell wurde angenommen, dass es sich als höchst nützlich für die Markierung von Spenderzellen in syngenem Transplantationsversuchen erweisen würde (KISSEBERTH et al., 1999).

Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, welche für die optimale Nutzung dieses Tiermodells für Zell-Lineage-Studien von mesenchymalen Zellen benötigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes geplant und ausgeführt. Der Tierversuch wurde unter der Nummer 209.1/211-2531-92/01 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Ausgehend von drei jungen, weiblichen R26-hPLAP-transgenen Fischer-344-Ratten, die uns Eric P. Sandgren aus Madison, Wisconsin, USA, dankenswerterweise überließ, wurde eine eigene hPLAP-transgene Zuchtlinie etabliert. Da berichtet wurde, dass heterozygote Tiere das Transgen in für den Nachweis ausreichendem Umfang exprimieren (MUJTABA et al., 2002), wurde folgendes Zuchtschema angewendet: heterozygote Tiere (tg / wt) wurden mit Wildtyp F-344-Ratten (wt / wt) verpaart, so dass in der F₁-Generation mit ca. 50% heterozygoten, transgenen Tieren und 50% Wildtyp-Tieren zu rechnen ist (siehe Abb. 1). Um dabei den Inzuchtgrad des Rattenstammes zu erhalten, wurden Bruder/Schwester-Verpaarungen vorgenommen.

Welches Geschlecht in der Eltern-Generation das Transgen trägt, ist für die Zucht ohne belang, da es sich um einen autosomalen Erbgang handelt. Dieses Zuchtschema wurde seither weitergeführt.

	wt / wt	
tg / wt	tg / wt	tg / wt
wt / wt	wt / wt	wt / wt

Abbildung 1: Zuchtschema für R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratten

3.2 Tierhaltung

Die Ratten wurden in den institutseigenen, fensterlosen Tierhaltungsräumen paarweise in Makrolon Typ III Käfigen gehalten, die in Käfigständern von jeweils 48 Käfigen pro Ständer angeordnet waren. Die Raumtemperatur im Tierraum lag stets bei ca. 24°C, die relative Luftfeuchtigkeit bei ca. 55%. Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurde ein konstantes Lichtprogramm mit jeweils 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit im Wechsel eingehalten.

Die Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Leitungswasser sowie kommerziell erhältlichen Alleinfuttermitteln (Altromin 1324 als Erhaltungsfutter, Altromin 1314 als Zuchtfutter; Altromin, Lage).

3.3 Genotypisierung

3.3.1 Histochemische Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde den Tieren im Alter von ca. 3 Wochen ein Tropfen Blut aus einer Schwanzvene entnommen und auf Filterpapier aufgebracht. Das Filterpapier wurde sodann zur Inaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatasen 30 Minuten auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde das Filterpapier in TNM-Puffer (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂, pH 9.5) kurz inkubiert. Das Filterpapier wurde nun erneut in TNM-Puffer, welcher jedoch jetzt mit 0.17 mg/ml des Substrates 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) sowie dem Farbstoff Nitroblautetrazolium (NBT) versetzt wurde, für etwa 5 Minuten inkubiert.

Bei Anwesenheit von alkalischen Phosphatasen wird BCIP dephosphoryliert und oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt. Als Oxidationsmittel dient NBT, welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert. NBT wirkt also farbverstärkend.

Blau gefärbte Blutstropfen auf dem Filterpapier zeigen also ein transgenes Tier an, solche, die blass rötlich erscheinen, ein Wildtyp-Tier.

Diese histochemische Methode wurde anfänglich bei einem Teil der Tiere durch Anwendung einer PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) verifiziert.

Da die Ergebnisse vollständig übereinstimmten, wurde später nur noch die einfachere Methode, die Histochemie, angewendet.

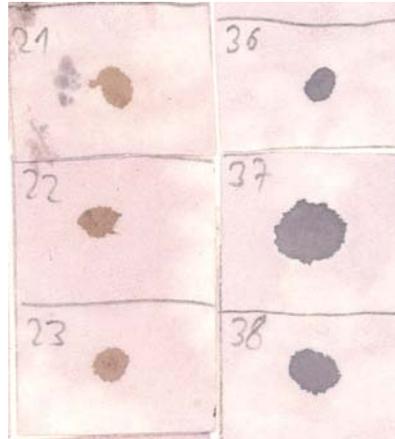


Abbildung 2: Histochemische Genotypisierung.

Filterpapier mit Blutstropfen von Wildtyp-Tieren (## 21, 22, 23) und hPLAP transgenen Tieren (## 36, 37, 38).

3.3.2 Genotypisierung durch PCR

Zunächst wurde ein kleines Schwanzstück (0.5 cm) von ca. 3 Wochen alten Tieren unter kurzer Ethernarkose abgesetzt und mit Proteinase K (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) über Nacht verdaut. Anschließend wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Isopropanol gefällt und in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Zu den Ansätzen wurden nun DNA-Polymerase und ein Nukleotidgemisch (HotStarTaq™, QIAGEN, Hilden) sowie die folgenden Primer gegeben:

SVpoly-1f (5'-CTGATGAATGGGAGCAGTGGGGAATG-3') und

SVpoly-2r (5'-GCAGACACTCTATGCCTGTGTGGAG-3').

Die eigentliche Kettenreaktion wurde nun in einem Biometra® TRIO-Thermoblock™-Cycler (Göttingen) durchgeführt:

Dabei fand die Denaturierung bei 90°C statt, bei 60°C wurden dann die Primer an die entstandenen Einzelstränge angelagert. Nun wurden die Primer durch die Polymerase bei 72°C in 5'-3'-Richtung verlängert. Das Produkt wurde nun erneut bei 90°C denaturiert und der Zyklus begann von neuem. Dieser PCR-Zyklus wurde 30 Mal durchlaufen und dann durch Abkühlen der Proben auf 4°C abgebrochen. Die Probenansätze wurden nun in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (90 min, 80 V).

In Proben von transgenen Tieren war ein 360 bp langes Produkt nachweisbar, das den Wildtyp-Tieren (wt) fehlt.

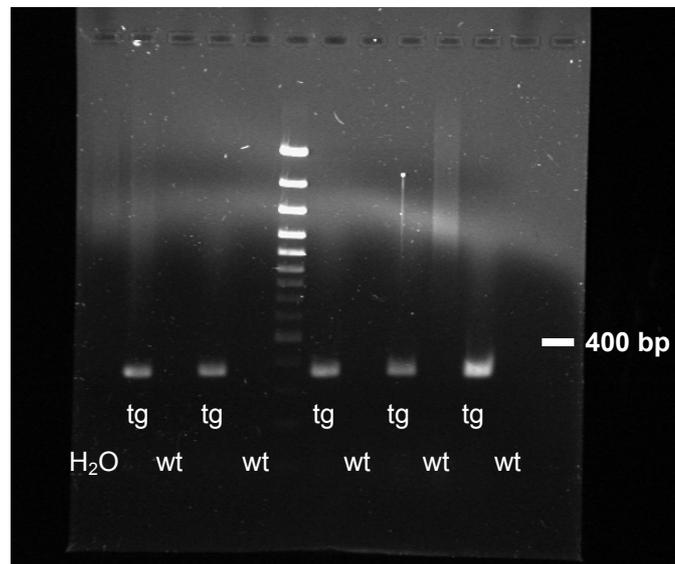


Abbildung 3: Genotypisierung durch PCR

Bei fünf transgenen (tg) Tieren ist eine Bande bei 360 bp sichtbar.

3.4 Schwanzveneninjektion

Um den Empfängertieren bei den verschiedenen Teilerperimenten die Spenderzellen systemisch verabreichen zu können, kam nur die intravenöse Applikation in Frage. Auf einfachste und sicherste Weise lässt sich eine solche intravenöse Injektion bei Ratten an der Schwanzvene durchführen.

Zur Fixierung der Tiere wurde eine Kriechröhre verwendet, aus welcher der Schwanz der Tiere hinten hinausschaut. Um die Venen besser sichtbar zu machen, wurde der gesamte Schwanz kurz in warmes Wasser getaucht. Während dieser kurzen Zeitspanne wurde ein Stauschlauch angelegt. Nach kurzem Abtrocknen wurde die Haut nun mit Sterillium®-Lösung (Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert, was die Hyperämisierung des Gewebes noch verstärkte. Nach erneutem kurzem Abtrocknen wurde in eine der lateralen Schwanzvenen eine Venenverweilkanüle der Größe 24 G (Braun, Melsungen) eingeführt. Bei erfolgreicher Punktion der Vene wurde der Stauschlauch entfernt. Nun konnten je nach Bedarf kleine Blutmenngen entnommen werden und/oder Injektionen durchgeführt werden.

Nach Beendigung der entsprechenden Prozedur wurde die Venenverweilkanüle wieder entfernt und eventuelle kleine Blutungen aus der Punktionswunde durch leichten Druck gestillt. Die Ratten tolerierten diese Vorgänge nach kurzer Eingewöhnungszeit.

3.5 Intraartikuläre Injektion

Da die lokale Applikation von Spenderzellen in die Kniegelenkshöhle zeitlich und methodisch etwas aufwendiger ist, wurde entschieden, die intraartikuläre Injektion unter einer kurzen antagonisierbaren Narkose vorzunehmen.

Den Empfängertieren wurde eine Mischung aus Medetomidin (0.15 mg/kg; Domitor[®], Pfizer, Karlsruhe), Midazolam (0.2 mg/kg, Dormicum[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) und Fentanyl (0.005 mg/kg, Fentanyl[®]-Janssen, Neuss) intramuskulär verabreicht. Innerhalb weniger Minuten erreichten die Tiere ein für diesen Eingriff ausreichend tiefes Narkosestadium. Die das Kniegelenk umgebende Haut wurde nun geschoren, für die Injektion vorbereitet und desinfiziert (Sterillium[®]-Lösung). Die Ratten wurden in Rückenlage verbracht, das Knie gebeugt, die Haut über der Punktionsstelle sanft verschoben und eine Kanüle der Größe 27G schräg latero-medial in Richtung auf das gegenüberliegende Hüftgelenk eingeführt.

Nach Entfernung der Kanüle aus der Gelenkhöhle rutschte die Haut wieder in ihre natürliche Lage zurück, so dass der Stichkanal weitgehend verschlossen wurde. Zur Analgesie erhielten die Tiere nun 100 µl Buprenorphin (Temgesic[®] Essex Pharma, München) pro Tier subkutan verabreicht, im Anschluss wurde die Narkose mit Atipamezol (0.37 mg/kg, Antisedan[®], Pfizer, Karlsruhe), Flumazenil (0.1 mg/kg, Anexate[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) und Naloxon (0.06 mg/kg, Naloxon-ratiopharm[®], Ratiopharm, Ulm) antagonisiert. Diese sanfte Antagonisierung lässt die Tiere langsam und ohne Exzitationen wieder erwachen.

Es hat sich als sinnvoll erwiesen, den so anästhesierten Tieren unmittelbar post operationem einige aufgeweichte Futterpellets in direkt erreichbarer Nähe anzubieten, da sie in der Aufwachphase zu Allotriophagie neigen. Auf diese Weise können die Tiere davon abgehalten werden, Einstreu aufzunehmen.

3.6 Gewinnung von transgenen Spenderzellen

Für die Gewinnung von transgenen Spenderzellen wurden die R26-hPLAP-transgenen Spendertiere unter Ketamin (50 mg/kg; Hostaket[®], Intervet, Unterschleißheim)/ Xylazin (10 mg/kg; Xylazin 2% Bernburg, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg)-Narkose durch Entbluten aus der Aorta abdominalis getötet. Dazu wurden mit EDTA beschichtete Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Damit aus dem so gewonnenen Blut die peripheren Blut-Leukozyten zur Transplantation isoliert werden können, wurde bei diesem Vorgang peinlich genau darauf geachtet, die Vollblutproben der Spendertiere nicht zu verunreinigen.

Aus dem Vollblut der Spender wurden dann die weißen Blutzellen gewonnen.

3.6.1 Isolierung von weißen Blutzellen

Zur Präparation der peripheren Blut-Leukozyten (PBL) aus dem Spender-Vollblut wurde ein Dichtegradienten-Zentrifugations-Kit (NycoPrep™ 1.077 A, Oslo, Norwegen) nach Anleitung verwendet.

Die Auftrennung der verschiedenen Zellarten erfolgt unter der Ausnutzung ihrer jeweils spezifischen Dichte. Bei Suspension von Blutzellen in einer Lösung mit der passenden Dichte lassen sich die bei Zentrifugation entstehenden Zellschichten deutlich voneinander trennen. Diese Dichte ist abhängig von den zu trennenden Zellpopulationen. Es gibt dementsprechend unterschiedliche, kommerziell erhältliche Kits.

Den Spendertieren wurde Vollblut in ein EDTA-beschichtetes Röhrchen abgenommen und dieses mit demselben Volumen 0.9% NaCl-Lösung verdünnt. Diese Mischung wurde dann vorsichtig auf die in einem anderen Gefäß vorgelegte NycoPrep™ -Lösung geschichtet. Das Gefäß wurde verschlossen und 20 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Anschließend konnten die peripheren Blutleukozyten aus der oberen Schicht abpipettiert werden. Vor der weiteren Verwendung der Zellen wurden sie noch zweimal in 0.9% NaCl-Lösung gewaschen. Der Anteil an lebenden Zellen nach dieser Prozedur wurde mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt und lag bei über 90%. Bis zur anschließenden Zelltransplantation wurden die Zellsuspensionen auf Eis gekühlt gehalten.

3.6.2 Gewinnung von Knochenmarkzellen

Die Gewinnung von Knochenmarkzellen (BMC) ging folgendermaßen vonstatten: Unverzüglich nach der Entblutung der Spendertiere wurden die Femora und Tibiae zügig freipräpariert und entnommen. Die Markhöhle wurde eröffnet, indem die Knochen etwa in der Mitte des Schaftes durchgesägt wurden. Es wurden die beiden Hälften der Femora und die proximale Hälfte der Tibiae verwendet. Um das Knochenmark aus den Knochenhälften herauszulösen, mussten diese an beiden Enden eröffnet sein. Dies wurde entweder durch Aufbohren mit einer Kanüle oder durch Absägen der Epiphysen erreicht.

Die Knochenmarkzellen wurden durch vorsichtiges, kurzes Zentrifugieren in Probengefäße überführt und in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) aufgenommen. Dann wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, indem die Zellen mehrfach in PBS resuspendiert wurden und schließlich durch ein engmaschiges Sieb sowie durch eine Kanüle der Größe 21G gedrückt wurden. Der Anteil an lebenden Zellen nach diesen Präparationsschritten wurde durch Trypanblau-Exklusion bestimmt und lag in allen Ansätzen bei über 95%. Die so gewonnenen Knochenmarkzellen wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

3.7 Transplantation von transgenen Zellen

Dieses Experiment wurde entworfen, um das Schicksal von transplantierten Zellen im Empfängerorganismus verfolgen zu können. Als Spender- und Empfängertiere wurden ausschließlich männliche Tiere ausgewählt. Neun Wildtyp-Empfängertiere erhielten von transgenen Tieren isolierte periphere Blutleukozyten (PBL), neun weitere Wildtyp-Empfänger erhielten Knochenmarkzellen (BMC); PBL-Empfänger erhielten ca. 25×10^6 Zellen, BMC-Empfänger ca. 5×10^6 Zellen pro Tag. Für die Gewinnung der transgenen Blut- und Knochenmarkzellen wurden insgesamt 63 Spendertiere benötigt: Über einen Zeitraum von 7 Tagen hinweg wurden täglich neun Spender durch Blutentzug aus der Aorta abdominalis getötet. Blut- und Knochenmarkzellen wurden dann präpariert wie bereits beschrieben. Die Empfänger erhielten die transgenen Spenderzellen täglich als Schwanzveneninjektion (Tage 1 bis 7 des Experiments). Nach der Punktion der Schwanzvene wurden den Tieren an jedem Tag einige Tropfen Blut entnommen und dieses für die Durchflusszytometrie auf Eis gelegt. Dies sollte es erlauben, einen detaillierten Zeitverlauf bei der erwarteten Zunahme von transgen markierten Zellen in den Wildtyp-Empfängern zu dokumentieren.

Nach Abschluss der Zell-Transplantationsperiode wurden an den Tagen 8, 15 und 22 jeweils drei Empfängertiere beider Gruppen durch Blutentzug aus der Aorta abdominalis unter Ketamin/Xylazin-Narkose getötet. Allen Empfängertieren wurde eine große Anzahl an Proben der verschiedenen Organe entnommen (Knochen: Tibia und der erste Lendenwirbel; außerdem Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Darm, Niere, Nebenniere, Milz, Skelettmuskel, Thymus und Gehirn) und für die spätere histologische Untersuchung asserviert.

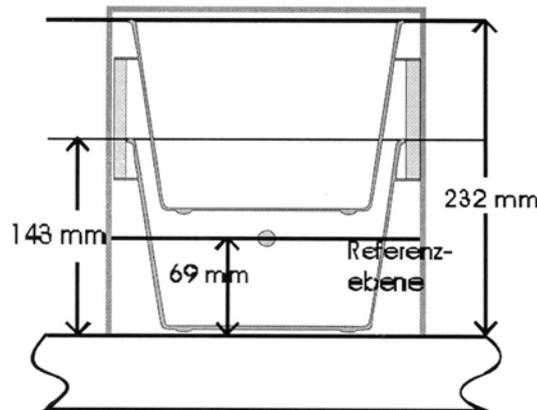
3.8 Bestrahlung

Um eine Ausgangslage herzustellen, die es ermöglichen sollte, Wildtyp-Tieren transgene, markierte Zellen zu transplantieren, wurden die Empfängertiere bestrahlt.

Die Tiere erhielten eine letale Dosis von 8.5 Gy bei 0.9473 Gy/min im Eldorado, einer Cobalt-60-Quelle der GSF in Neuherberg. Die Bestrahlungsanordnung wurde so gewählt, dass die Tiere möglichst wenig fixiert werden mussten, andererseits jedoch möglichst in einer Position bleiben mussten, um gewährleisten zu können, dass die Tiere alle dieselbe Dosisleistung erhalten würden. Dazu wurde eine spezielle Bestrahlungsbox gebaut. Die Bestrahlungsanordnung wird aus Abbildung 4 ersichtlich.

Ungefähr 4 Stunden später erhielten die Ratten ca. $3 - 4 \times 10^6$ transgen markierte Knochenmarkzellen, die nach dem bereits beschriebenen Verfahren gewonnen worden waren. Um sicherzugehen, dass die Tiere Zellen in ausreichender Menge erhalten würden, um ihr Überleben zu sichern, wurde die Transplantation am Tag nach der Bestrahlung mit frisch präparierten Zellen noch einmal wiederholt.

Anordnung :



Feldgröße: ~ 50 cm × 50 cm (maximale Feldgröße, ~ Tischgröße)
 Abstand: ~ 64 cm (Tisch – Unterkante Filterhalterung)
 → Quellenabstand ~130 cm

Kalibrierung in Bestrahlungsanordnung mit Streu im unteren Käfig
 Zur Sicherstellung von Sekundärteilchengleichgewicht bei Bestrahlung, befindet sich eine zusätzliche Perspexschicht von 3 mm Dicke im Strahlengang

Abbildung 4: Bestrahlungsanordnung

3.9 Methoden zur Fixierung und Entkalkung von Gewebeproben

Zunächst musste die am besten geeignete Fixierungsmethode sowohl für Knochen als auch für Proben von anderen Organen ermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden ein transgenes und ein Wildtyp-Tier euthanasiert und beiden Tieren jeweils mehrere Proben von Knochen, Leber, Niere und diversen weiteren Organen entnommen. Die Proben wurden entweder in 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0.1M Phosphatpuffer bei pH 7.4 und 4°C für 24 h oder aber in 40% Ethanol (EtOH) bei 4°C für 48 h fixiert. Die PFA-fixierten Proben wurden anschließend mit 0.1M Phosphatpuffer mit 10% Sucrose 12 h lang gewaschen.

Wenn von in Paraffin eingebetteten Knochen histologische Schnitte angefertigt werden sollen, ist es notwendig, die Knochenproben nach erfolgter Fixierung zu entkalken. Hierzu wurde eine Lösung aus 0.5M Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) von pH 8.0 mit 5% EtOH als Konservierungsmittel in PBS verwendet. Die Entkalkungslösung wurde wöchentlich ausgetauscht. Die Entkalkung wurde ebenfalls bei 4°C durchgeführt.

3.10 Einbettungsmethoden

Es wurden zwei verschiedene Einbettungsprotokolle getestet. Insbesondere musste der Erhalt der Enzymaktivität von hPLAP überprüft werden.

Ein Teil der Organe wurde in Paraffin eingebettet, für den anderen Teil der Proben wurde ein modifiziertes Methylmethacrylat (MMA)-Einbettungsprotokoll verwendet, welches Enzymaktivitäten weitgehend erhalten sollte (ERBEN, 1997).

Das Protokoll für die Paraffineinbettung sah wie folgt aus:

70% EtOH	2 Tage
95% EtOH	1 Stunde
100% EtOH	1 Stunde
Xylol	1 Stunde
Paraffin	2 x 1 Stunde (ca. 60°C, Vakuum)

Dann wurden die mit Wachs infiltrierten Organe unter Verwendung von Metallförmchen in Blockform gegossen und abgekühlt. Die in Paraffin (Medite, Burgdorf) eingegossenen Proben waren nunmehr bereit zum Schneiden.

Die MMA-Einbettung wurde wie folgt ausgeführt:

70% EtOH	2 Tage
95% EtOH	2 Tage
100% 2-Propanol	2 x 1 Tag
Xylol	2 x 2 Tage
MMA I	3 Tage
MMA II	3 Tage
MMA III	3-4 Tage

Dabei bestanden 100 ml MMA I-Lösung aus 60 ml MMA (VWR, Darmstadt), 35 ml Butylmethacrylat (Sigma), 5 ml Methylbenzoat (VWR) und 1.2 ml Polyethylenglykol 400 (VWR). Die MMA II-Lösung enthielt 100 ml MMA I-Lösung und 0.4 g trockenes Benzoylperoxid (VWR); MMA III-Lösung bestand aus 100 ml MMA I-Lösung mit 0.8 g trockenem Benzoylperoxid.

Für die Einbettung wurden zunächst Schnappdeckelgläschen mit einem Fassungsvermögen von 10 ml mit ca. 3 ml MMA III-Lösung beschickt. Die hierzu verwendete MMA III-Lösung wurde mit 600 µl N,N-Dimethyl-*p*-Toluidin pro 100 ml vermischt, welches als Polymerisationsbeschleuniger wirkt. Nun wurden die Gläschen für ca. 30 Sekunden mit CO₂ begast, um Luftsauerstoff zu entfernen, dann schnell verschlossen und bei 4°C bis zur vollständigen Aushärtung belassen. Auf die solcherart hergestellten Böden wurden nun die entwässerten und mit MMA infiltrierten Organe oder Knochen platziert, und das Volumen der Gläschen mit MMA III-Lösung aufgefüllt. Zu diesem Zweck wurden je 100 ml der MMA III-Lösung mit 400µl des Polymerisationsbeschleunigers vermischt. Diese Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Danach wurden die Gläschen sofort verschlossen und in eine Klimakammer (Binder, Tuttlingen) zur Polymerisation bei ca. - 23°C verbracht.

Nach erfolgter Aushärtung wurden die Gläschen mit leichten Hammerschlägen zerstört und entfernt. Der MMA-Block konnte nun unter Verwendung von Säge und Feile in die für das Schneiden optimale Form gebracht werden („trimmen“).

Die so getrimmten Blöcke waren nunmehr ebenfalls bereit, geschnitten zu werden.

3.11 Herstellung der Schnitte für die Histologie

Von den so hergestellten Paraffin- und MMA-Blöcken wurden nun mit einem Mikrotom (HM 360, Mikrom, Walldorf) 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Für die in Paraffin eingebetteten Organe wurden Einwegklingen (Leica, Bensheim) verwendet. Die Schnitte wurden erst kurz in raumwarmes, dann in ca. 37°C warmes aqua dest. überführt, um sie zu strecken.

Für die in MMA eingebetteten Organe wurden Hartmetallmesser (Mikrom) verwendet. Während des Schneidens wurden Messer und MMA-Blöcke mit Schneideflüssigkeit (WIV, Schwetzungen) feucht gehalten. Zum Strecken der Schnitte wurde in diesem Falle 70% EtOH sowie eine Stachelschweinborste und ein sehr feines Pinselchen verwendet.

Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, welche mit 3-Amino-Propyltriethoxysilan (APES, Sigma) vorbehandelt wurden. Diese Behandlung dient der Aufrauung der Oberfläche und führt zu besserer Haftung der Schnitte auf dem Objektträger. Die fertig gestreckten MMA-Schnitte wurden zu ihrem Schutz mit einer Plastikfolie bedeckt und dann zum Pressen aufgestapelt.

Anschließend wurden sowohl die Paraffinschnitte als auch die in der Presse befindlichen MMA-Schnitte für 2 Tage bei ca. 45°C getrocknet.

3.12 Färben der Schnitte für die Histologie

Aus allen Schnitten wurde vor der Färbeprozedur das jeweilige Einbettmedium wieder entfernt.

Das Entparaffinierungsprotokoll sah dabei folgendermaßen aus:

Xylol	2 x 10 Minuten
100% EtOH	5 Minuten
70% EtOH	5 Minuten
40% EtOH	5 Minuten
aqua dest.	5 Minuten

Das Entplasten ging auf folgende Art und Weise vonstatten:

2-Methoxyethylacetat	3 x 20 Minuten
Aceton	2 x 5 Minuten
aqua dest.	2 x 5 Minuten

Anschließend wurden alle Schnitte in aqua dest. für 30 Minuten auf 65°C erhitzt, um endogene alkalische Phosphatasen zu inaktivieren. Hiernach wurden die Schnitte waagrecht in einer „feuchten Kammer“ in TNM-Puffer mit BCIP und NBT wie bereits beschrieben inkubiert. Es wurden verschiedene Inkubationsmethoden miteinander verglichen: Die Schnitte wurden jeweils im Dunklen für 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 Stunden bei 37°C inkubiert, sowie über Nacht bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Schnitte kurz mit aqua dest. gespült und 5 Minuten mit Kernechtrot (Sigma) gegengefärbt, überschüssiger Farbstoff danach mit aqua dest. abgewaschen (2 x 5 Minuten). Dann wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

Das folgende Dehydrierungsprotokoll wurde dafür verwendet:

30%	EtOH	5 Minuten
60%	EtOH	5 Minuten
80%	EtOH	5 Minuten
100%	EtOH	5 Minuten
Xylol		15 Minuten

Schließlich wurden alle Schnitte mit Vectamount™ (Vector, Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

3.13 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Untersuchungen oder FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Untersuchungen können unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. FITC, PE) zur Analyse von Molekülen auf Zelloberflächen oder von intrazellulären Molekülen verwendet werden. Außerdem können Aussagen zur Größe und Ausstattung mit Organellen von Zellen gemacht werden. Da diese Parameter alle gleichzeitig betrachtet werden können, eignen sich FACS-Analysen hervorragend zur Charakterisierung und Abgrenzung von unterschiedlichen Zellpopulationen oder Subpopulationen.

Das Prinzip der FACS-Analyse ist folgendes:

Zellen werden in einem laminaren Fluss in einer Trägerflüssigkeit hydrodynamisch so fokussiert, dass sie einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden können. Sodann wird die Streuung des Laserlichtes, die durch eine Zelle hervorgerufen wird, opto-elektronisch erfasst. Streuung in Richtung des Laserstrahls gibt Aufschluss über die Größe der Zelle, Streuung quer zum Laserstrahl macht Aussagen über die Ausstattung der Zelle mit Organellen möglich. Werden die Zellen vor der Messung mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen markiert, können diese durch ein System von optischen Filtern, welche Lichtstrahlen spezifischer Wellenlängen auf bestimmte Detektoren lenken, ebenfalls gemessen werden.

Durchflusszytometrische Messungen wurden sowohl an Blutzellen als auch an Knochenmarkzellen durchgeführt. Die Blutmengen, die für diese Messungen benötigt werden, sind sehr klein (50 µl). Sie wurden unter kurzer Ethernarkose entweder unter Verwendung heparinierter Mikrohämatokrit-Röhrchen (Brand, Wertheim) aus dem Retroorbitalsinus der Tiere oder aber aus der Schwanzvene entnommen und in Probengefäße überführt, in welche EDTA (1.6 mg/ml Blut) als Anticoagulans vorgelegt worden war. Knochenmarkzellen wurden gewonnen wie bereits beschrieben.

Für die Markierung von hPLAP auf der Oberfläche von Blut- und Knochenmarkzellen wurden für jeden Ansatz ca. 10^6 Zellen in Einzelzellsuspension verwendet. Nach jeder Antikörperzugabe werden die Ansätze geschüttelt, um die Zellen in Einzelzellsuspension zu halten. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis und im Dunklen mit einem monoklonalen Maus IgG_{2a} anti-hPLAP Antikörper (1:2 verdünnt in PBS, 1 µl pro Ansatz, clone 8B6, Dako, Hamburg) inkubiert. Maus IgG₁ (1:10 verdünnt in PBS, 10 µl pro Ansatz, MOPC-21, Sigma) sowie Zellsuspensionen von Wildtyp-Tieren dienten als Negativkontrollen. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden die Ansätze nach der Inkubation zweimal gewaschen (je 1 ml PBS mit 2% FCS und 0.02% Natriumacid; 3500 U/min, 4 min). Anschließend wurden die Zellen erneut auf Eis und im Dunklen mit FITC-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:40 verdünnt in PBS, 50 µl pro Ansatz, Serotec, Harwell, UK) inkubiert. Bevor die so markierten Zellen gemessen werden konnten, wurden nicht gebundene Antikörperreste wie oben beschrieben ausgewaschen und die Zellen mit 500 µl PFA-Lösung (1% in PBS) je Ansatz fixiert.

In Vollblutproben wurden vor der Fixierung die Erythrozyten unter Verwendung von FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) lysiert. Dazu wurden die Ansätze nach dem letzten Waschen erneut gründlich geschüttelt. Danach wurden alle Ansätze mit 1 ml der FACS lysing solution versetzt, noch einmal sehr gründlich geschüttelt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und einmal zentrifugiert (3500 U/min, 4 min). Der Überstand war nach dem Zentrifugieren von Blutfarbstoff aus den zerstörten Erythrozyten rot gefärbt.

Die FACS Lysing Solution wurde dann in zwei Wasch-Schritten wie bereits oben beschrieben entfernt. Sollte die Lyse einmal nicht vollständig genug ausgefallen sein, wurde die Prozedur wiederholt.

Die Messungen wurden auf einem FACScan Durchflusszytometer unter Zuhilfenahme von CellQuest Pro Software (Becton Dickinson) durchgeführt.

3.14 Zellkultur

3.14.1 Osteoblasten

Um die Expression von hPLAP in kultivierten osteoblastären Zellen untersuchen zu können, wurden Knochenmarkzellen von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren gewonnen wie beschrieben. Die Zellen wurden nun unter speziellen, auf die osteoblastäre Differenzierung von Zellen ausgelegten Bedingungen kultiviert. Hierzu wurde das folgende Kulturmedium (ERBEN et al., 1997) verwendet:

DMEM (high Glucose) mit 15% FCS und 100 I.E./ml Penicillin/Streptomycin (P/S) sowie 1 mM Natrium-Pyruvat und 10 nM Dexamethason. Nach einigen Tagen wurden demselben Medium 50 µg/ml Ascorbinsäure und 10 mM β-Glycerophosphat zugegeben, was zur Kalzifizierung der osteoblastären Zellen führte.

Die Zellen wurden für 1, 2, 3, 7 oder 14 Tage kultiviert und anschließend für 10 Minuten mit 40% EtOH fixiert. Nach Inaktivierung der endogenen Phosphatasen durch Erhitzen auf 65°C für 30 Minuten wurden die kultivierten Zellen mit BCIP und NBT in TNM-Puffer inkubiert. Nachdem eine ausreichende Farbintensität zu erkennen war, wurde die Färbelösung abgekippt und überschüssige Reste mit aqua dest. kurz abgewaschen. Die Gegenfärbung wurde auch in den Zellkulturen mit Kernechtrot vorgenommen. Nach Erreichen einer zufrieden stellenden Färbung wurde das Kernechtrot entfernt und die Zellen luftgetrocknet.

3.14.2 Osteoklasten

Für die Beurteilung der Expression von hPLAP in Osteoklasten-Vorläuferzellen sowie in reifen Osteoklasten wurden Knochenmarkzellen auf folgende Art und Weise kultiviert:

Das Kulturmedium bestand in diesem Falle aus DMEM (high Glucose) mit 15% FCS, 100 I.E./ml P/S und 1 mM Natrium-Pyruvat mit 10 nM Calcitriol (nach TAKAHASHI et al., 1988). Die Zellen wurden auf diese Weise für 7 bis 10 Tage kultiviert und nach der Fixierung mit 40% EtOH weiter ebenso behandelt und mit BCIP/NBT sowie Kernechtrot gefärbt wie die Osteoblasten.

Im Unterschied dazu wurden die Kulturschalen zum Teil aber auch mit einer Doppelfärbung versehen. Dabei wurden die Zellen nach der Fixierung und Hitzeinaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatasen zunächst für den Nachweis von Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP) gefärbt. TRAP kommt in hohen Konzentrationen in Osteoklasten vor, so dass seine Anwesenheit zum Nachweis von Osteoklasten genutzt werden kann (ERBEN, 1997).

Die TRAP-Färbung sah im Einzelnen wie folgt aus:

Acetat-Puffer (0.1 M, pH 5.0, 100 mM Tartrat)	5 Min.
Inkubation mit TRAP-Reagenz	30 Min bis 2 Stunden
aqua dest.	5 Min
70% EtOH	30 Min
aqua dest.	2 x 2 Min
Hämalaun	2 Min
Abspülen in Leitungswasser	1 x
Fließendes Leitungswasser	15 Min
Abspülen in aqua dest.	1 x

Anschließend konnte für die Doppelfärbung die bekannte BCIP/NBT-Färbung durchgeführt werden.

Für das TRAP-Reagenz wurden das folgende Rezept verwendet:

Pararosanilin	und
4% wässriges NaNO ₂	werden zu gleichen Teilen vermischt.
65 µl dieser Mischung	werden zu
1.25 ml Acetatpuffer	gegeben. Dazu kommen
16 mg Naphtol-ASTR-Phosphat	in
1 ml Dimethylformamid (DMF)	sowie
12.5 µl MnSO ₄ .	

Das TRAP-Reagenz wurde immer frisch angesetzt und innerhalb einer Stunde verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Fixierung auf die Enzymaktivität von hPLAP

Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, dass die Enzymaktivität von hPLAP in Schnitten von in Paraffin eingebetteten Leber-Proben einer R26-hPLAP-transgenen Ratte während der Einbettung erhalten wurde.

In allen Schnitten wurden die endogenen alkalischen Phosphatasen stets vor dem Färben durch Erhitzen auf 65°C für 30 Minuten inaktiviert, dann die histochemische Färbung mit BCIP/NBT und die Gegenfärbung mit Kernechtrot vorgenommen.

Es wird aus der Abbildung erkennbar, dass die Enzymaktivität in der mit 40% EtOH fixierten Probe (Abb. 5 a) viel besser erhalten bleibt als in der mit 4% PFA fixierten Probe (Abb. 5 b). Zum Vergleich ist eine ebenfalls mit 40% EtOH fixierte und in Paraffin eingebettete Leberprobe einer nicht-transgenen Ratte abgebildet (Abb. 5 c).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Gewebeproben in allen weiteren Versuchen mit 40% EtOH fixiert.

Abbildung 5: Einfluss der Fixierung auf die Enzymaktivität von hPLAP: 40% EtOH im Vergleich zu 4% PFA

Abb. 5 a: Paraffinschnitt der Leberprobe eines transgenen Tieres.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach

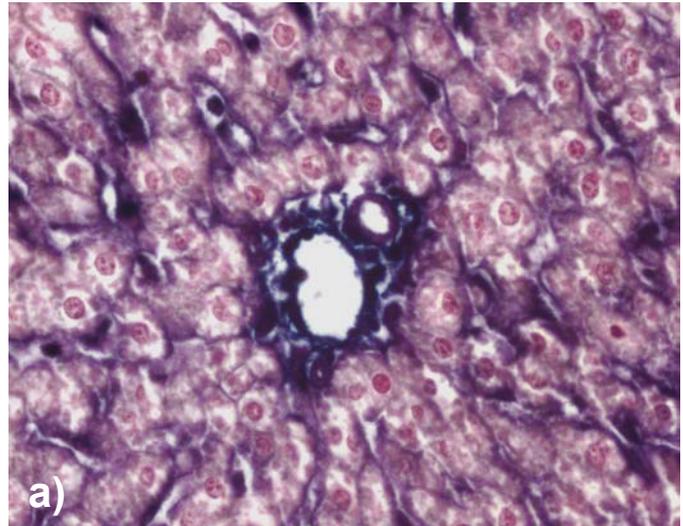


Abb. 5 b: Paraffinschnitt der Leberprobe eines transgenen Tieres.
Fixierung: 4% PFA
Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach
Die Enzymaktivität ist nur noch teilweise erhalten.

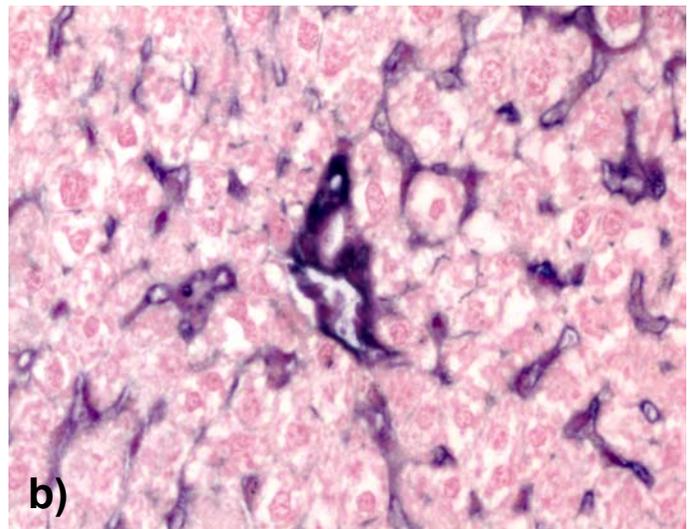
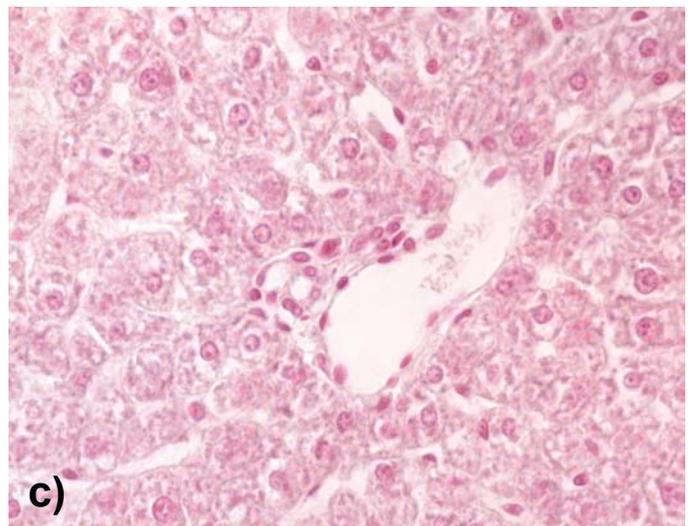


Abb. 5 c: Paraffinschnitt der Leberprobe einer Fischer-344-Wildtyp-Ratte als Negativ-Kontrolle.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach



4.2 Einfluss der Einbettungsmethode auf die Enzymaktivität von hPLAP

Aus Abbildung 6 wird ersichtlich, dass auch die Einbettung mit MMA verwendet werden kann, ohne dass die Enzymaktivität von hPLAP verloren geht. Hier können anhand von Nierenproben die beiden Einbettungsmethoden miteinander verglichen werden: In Abbildung 6 a wurde die Probe in MMA eingebettet, in Abbildung 6 b in Paraffin. Abbildung 6 c zeigt wieder zum Vergleich eine Nierenprobe einer nicht-transgenen Ratte. Alle Proben wurden mit 40% EtOH fixiert und alle Schnitte sind vor dem Färben auf die bereits beschriebene Weise erhitzt worden.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass in den mit MMA eingebetteten Gewebeproben die Zellmorphologie besser erhalten werden kann als in den Paraffin-eingebetteten Proben. Es können so genauere Aussagen darüber gemacht werden, wo genau das Transgen exprimiert wird. Zum Beispiel kann Abbildung 6 a entnommen werden, dass hPLAP am stärksten in der luminalen Membran des Tubulusepithels exprimiert wird. Die etwas diffusere Färbung in der in Paraffin eingebetteten Probe lässt solch detaillierte Schlüsse nicht zu.

Abbildung 6: Paraffin- und MMA-Einbettung im Vergleich

Abb. 6 a: MMA-Schnitt einer Nierenprobe eines transgenen Tieres.

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

Beachtenswert ist insbesondere die gute Erhaltung der Gewebemorphologie.

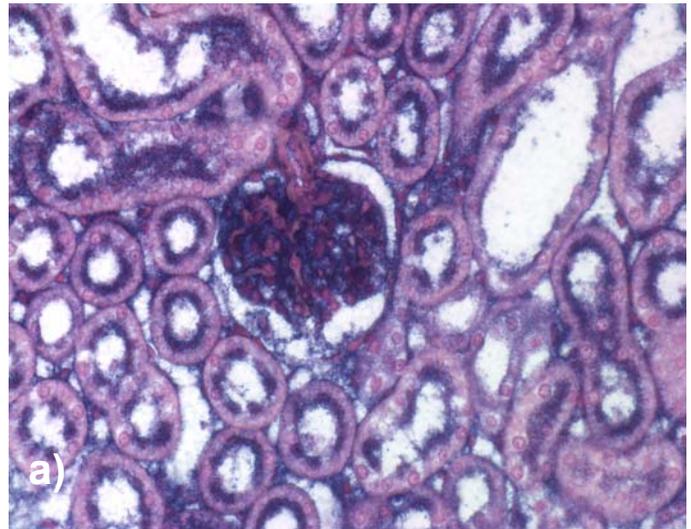


Abb. 6 b: Paraffinschnitt einer Nierenprobe einer transgenen Ratte.

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

Die Enzymaktivität bleibt in gleichem Maß erhalten wie in der MMA-eingebetteten Probe, die Zellmorphologie ist dagegen weniger deutlich erkennbar.

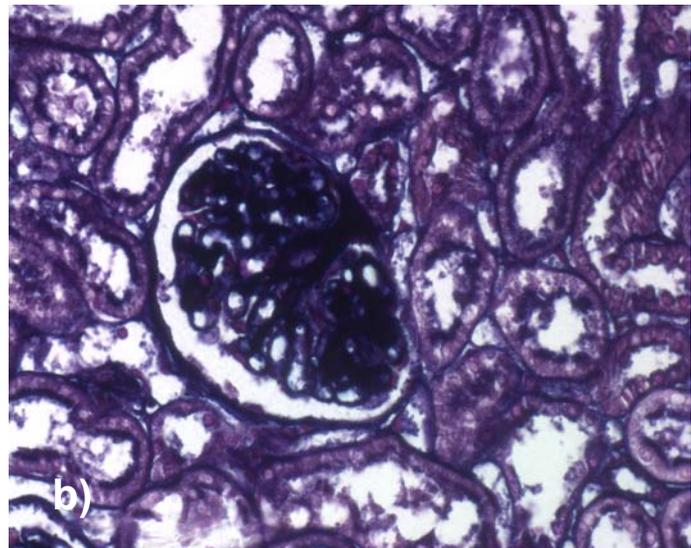
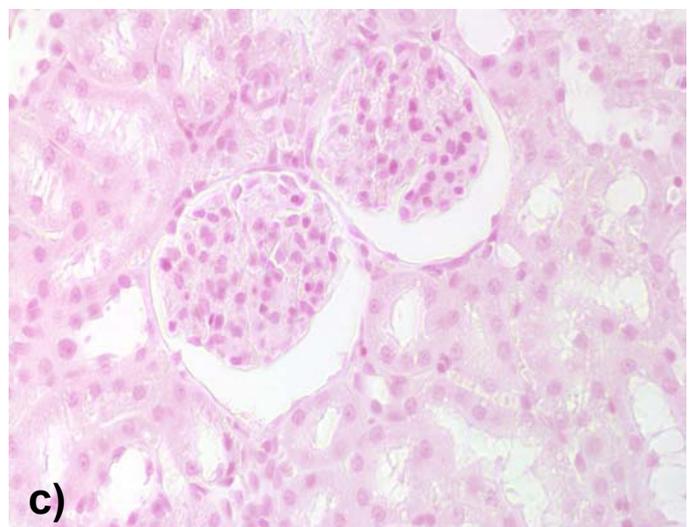


Abb. 6 c: MMA-Schnitt einer Nierenprobe eines Wildtyp-Tieres als Negativ-Kontrolle.

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach



4.3 Expression von hPLAP in Knochenzellen der hPLAP-transgenen Ratten

Bei der Beurteilung von Knochen transgener Ratten, welche in MMA eingebettet worden waren, stellte es sich heraus, dass alle mesenchymalen Knochenzellen eine starke Expression von hPLAP aufweisen (Abb. 7 a bis e). Osteoblasten und Osteozyten, aber auch die Chondrozyten des Gelenkknorpels sind gleichermaßen stark angefärbt. Die Osteoblasten zeigen eine deutliche membranständige Expression von hPLAP. Osteoklasten dagegen zeigen eine nur schwache Expression des Transgens in der Zellmembran und keine zytoplasmatische Expression von hPLAP. Die hämatopoetischen Zellen im Knochenmark der transgenen Ratten zeigen eine deutliche Färbung (Abb. 7 e). Ganz besonders deutlich ausgeprägt ist die Expression von hPLAP im Zytoplasma der Megakaryozyten.

Im Knochenmark und in Knochen- und Knorpelzellen von Wildtyp-Tieren kann keine Färbung erkannt werden (Abb. 8 a bis d). Alle Proben wurden auch hier mit 40% EtOH fixiert und vor der Färbung der Hitzebehandlung unterzogen.

Eine interessante Frage war es, ob die Enzymaktivität von hPLAP auch nach der Entkalkung von Knochen und der Einbettung in Paraffin noch nachgewiesen werden könnte. Zur Entkalkung wurde 0.5M EDTA verwendet, um die Enzymaktivität zu erhalten. Da wir herausgefunden hatten, dass PFA die Enzymaktivität angreift, wurde es in diesem Fall durch EtOH als Konservierungsmittel für die Entkalkungslösung ersetzt. Trotz all dieser Maßnahmen stellte es sich aber heraus, dass die Entkalkung die Enzymaktivität von hPLAP massiv beeinträchtigt. Es konnte so gut wie keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden.

Adhärente mesenchymale Zellen in Zellkulturen von Knochenmarkzellen transgener Tiere zeigen ebenfalls in allen Stadien der Differenzierung eine starke Expression von hPLAP (Abb. 9).

Ebenso kann in kultivierten Vorläuferzellen von Osteoklasten und reifen Osteoklasten von transgenen Tieren die Expression von hPLAP in der Membran gezeigt werden (ohne Abbildung).

Abbildung 7: Ubiquitäre Expression von hPLAP in Knochenzellen (proximale Tibia)

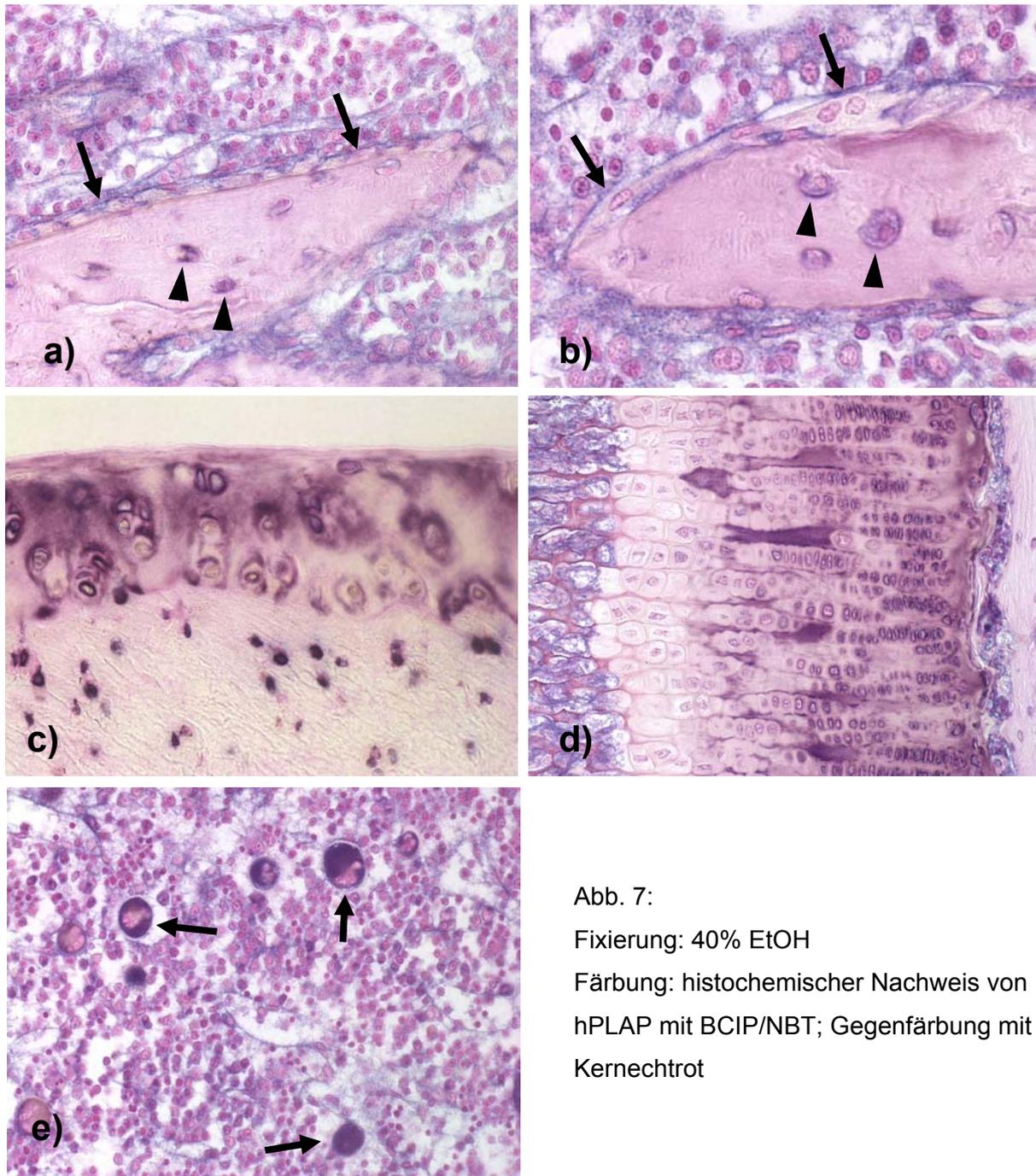


Abb. 7:

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Abb. 7 a: Osteoblasten (Pfeile) und Osteozyten (Pfeilspitzen). Originalvergrößerung: 400fach

Abb. 7 b: Osteoklasten (Pfeile) u. Osteozyten (Pfeilspitzen). Originalvergrößerung: 400fach

Abb. 7 c: Chondrozyten im Gelenkknorpel. Originalvergrößerung: 400fach

Abb. 7 d: Chondrozyten in der Wachstumsfuge. Originalvergrößerung: 200fach

Abb. 7 e: Hämatopoetische Knochenmarkszellen; insbesondere Megakaryozyten (Pfeile)

Originalvergrößerung: 400fach

Abbildung 8: Histologie von Wildtyp-Tieren als Negativ-Kontrolle (proximale Tibia)

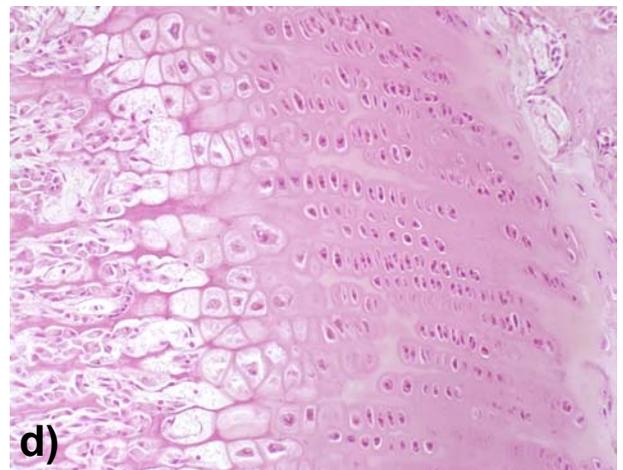
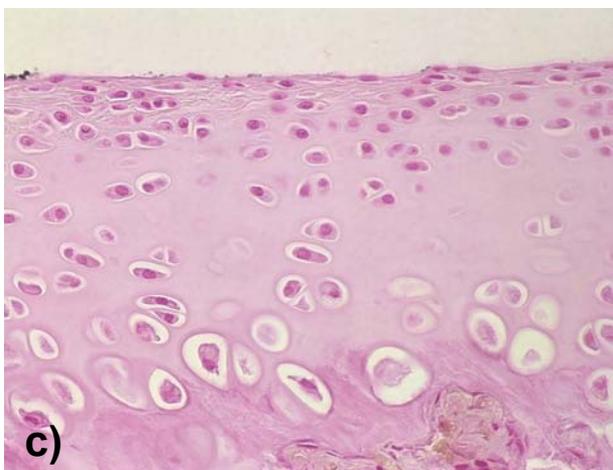
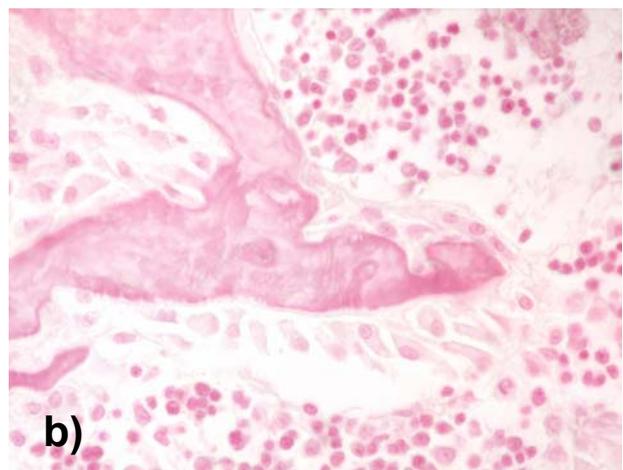
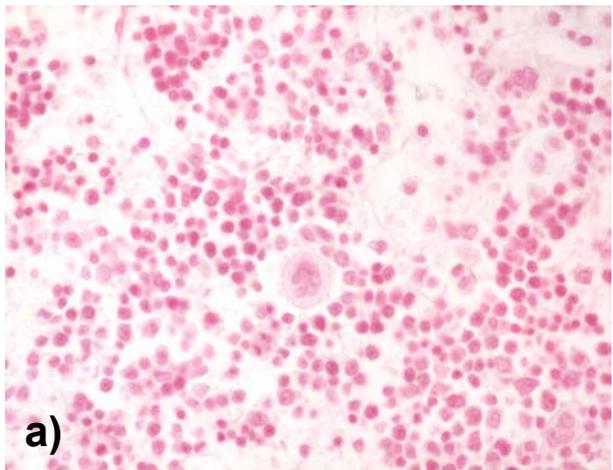


Abb. 8 a:
Knochenmarkzellen eines Wildtyp-Tieres.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach

Abb. 8 b:
Knochenzellen eines Wildtyp-Tieres.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach

Abb. 8 c:
Gelenkknorpelzellen eines Wildtyp-Tieres.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach

Abb. 8 d:
Wachstumsfuge eines Wildtyp-Tieres.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot
Originalvergrößerung: 200fach

Abbildung 9: Expression des Transgens in kultivierten Zellen

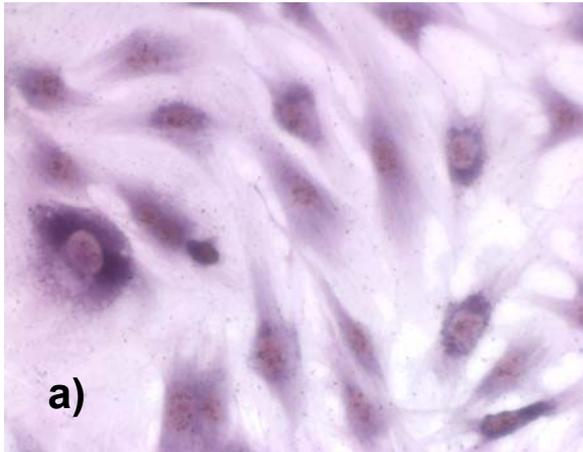


Abb. 9a:
Adhärenente Zellen, 14 Tage
kultiviert aus dem Knochenmark eines
transgenen Tieres.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von
hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit
Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach

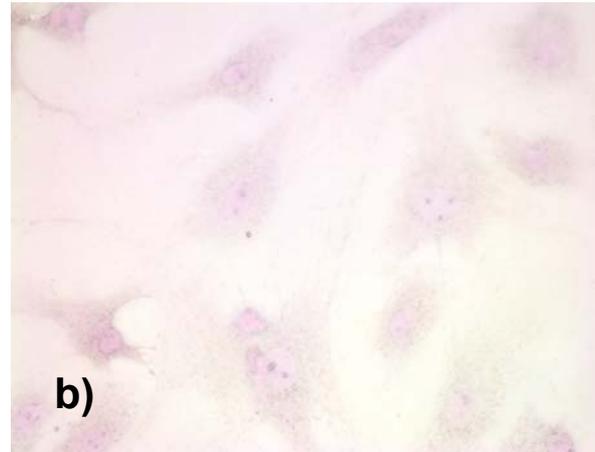


Abb. 9a:
Adhärenente Zellen, 14 Tage kultiviert aus
dem Knochenmark eines Wildtyp-Tieres
als Negativ-Kontrolle.
Fixierung: 40% EtOH
Färbung: Histochemischer Nachweis von
hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit
Kernechtrot
Originalvergrößerung: 400fach

4.4 Syngene Transplantation transgener Zellen in Wildtyp-Tiere

Um herauszufinden, ob Blut- und Knochenmarkzellen transgener Spenderratten in nicht-transgenen (Wildtyp) Empfängertieren derselben Zuchtlinie überleben und proliferieren können, wurden folgende Transplantationen vorgenommen: Wildtyp-Empfänger erhielten eine Woche lang täglich 25×10^6 periphere Blut-Leukozyten (PBL) oder 5×10^6 Knochenmarkzellen (BMC) von transgenen Spendertieren intravenös injiziert.

Interessanterweise konnten bei Auswertung der histologischen Schnitte und der FACS-Analysen die transgenen Zellen in keinem Fall wieder gefunden werden. Es war also offenbar nicht möglich, eine syngene Transplantation in dieser Weise vorzunehmen. Dieses überraschende Ergebnis führte zu der Frage, ob die membranständige Expression des Transgens zu einer Antikörperbildung bei den nicht-transgenen Empfängern führt.

Untersuchungen mittels der Durchflusszytometrie bestätigten die Annahme, dass beinahe alle peripheren Bluteleukozyten und Knochenmarkzellen von transgenen Tieren das Transgen auf der Zellmembran exprimieren (Abb. 10 a und b). Immunisierungsphänomene könnten also zur Zerstörung von hPLAP-exprimierenden Zellen in Wildtyp-Empfängern führen. Grundsätzlich wäre dies denkbar, da das humane Enzym hPLAP für das Immunsystem der Ratte ein körperfremdes Protein darstellt.

Abbildung 10: Expression von hPLAP in der FACS-Analyse

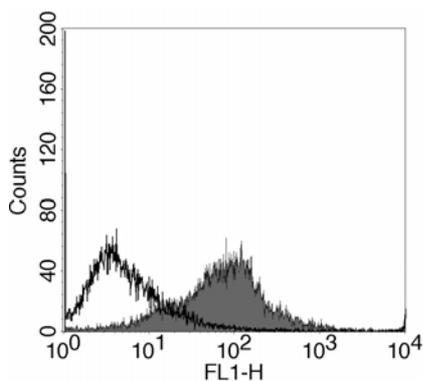


Abb. 10 a: Immunofluoreszenz-Färbung von Blutzellen einer transgenen (grau) und einer Wildtyp-Ratte (weiß). Die Zellen wurden zunächst mit Maus IgG_{2a} anti-hPLAP-Antikörper und dann mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper markiert. Das Histogramm zeigt, dass hPLAP auf dem Großteil der PBL der transgenen Tiere exprimiert wird.

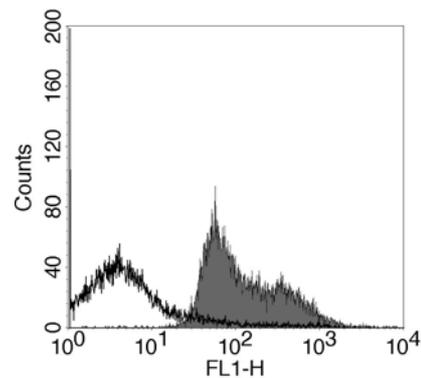


Abb. 10 b: Immunofluoreszenz-Färbung von Knochenmarkzellen einer transgenen (grau) und einer Wildtyp-Ratte (weiß). Die Zellen wurden zunächst mit Maus IgG_{2a} anti-hPLAP-Antikörper und dann mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper markiert. Annähernd alle BMC des transgenen Tieres exprimieren hPLAP.

Um zu untersuchen, ob Wildtyp-Tiere nach der Injektion von Zellen von transgenen Spender-tieren desselben Stammes wirklich Antikörper entwickeln, wurde der folgende Versuch un-ternommen:

Periphere Blutleukozyten von transgenen Ratten wurden mit Serum von Wildtyp-Tieren, die 3 Monate zuvor transgene Zellen erhalten hatten, inkubiert. Durchflusszytometrisch wurde dann überprüft, ob Antikörper an der Zelloberfläche von transgenen Zellen gebunden worden waren. Wie erwartet reagierte Serum von Wildtyp-Ratten, die noch nie mit dem Transgen in Berührung gekommen waren, nicht mit den transgenen PBL (Abb. 11 a). Das Serum der Tiere hingegen, die bereits Kontakt mit transgenen Zellen gehabt hatten, zeigte einen kleinen aber doch deutlich zu erkennenden Anstieg der Zellen, die mit einem FITC-konjugierten Anti-Ratten-IgG-Antikörper markiert werden konnten (Abb. 11 b).

Dies weist auf die Anwesenheit von zirkulierenden Antikörpern gegen hPLAP oder andere Oberflächenantigene im Serum dieser Tiere hin. Auch wenn dieser Anstieg nach einmaligem Kontakt zu den transplantierten transgenen Zellen nur klein ist, erklärt dieses Ergebnis vermutlich die Resultate der Experimente, bei denen die transgenen Zellen in den Empfängern nicht wieder gefunden werden konnten. Es ist wahrscheinlich, dass wiederholter oder ständiger Kontakt mit dem Transgen diese immunvermittelte Zerstörung der transplantierten Zellen verstärkt.

Abbildung 11: Darstellung der Antikörperbildung in der FACS-Analyse

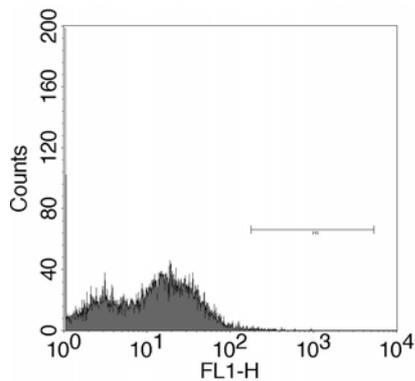


Abb. 11 a: Immunfluoreszenzfärbung von Serum einer Wildtyp-Ratte, welches mit Blutzellen eines transgenen Tieres inkubiert und mit FITC-konjugiertem Anti-Ratten-IgG-Antikörper markiert wurde. Das Histogramm zeigt keine Färbung der Zellen.

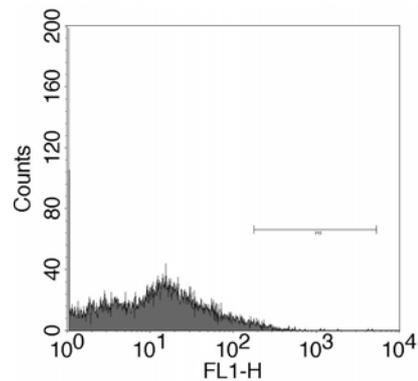


Abb. 11 b: Immunfluoreszenzfärbung von Serum eines Wildtyp-Empfängertieres, welches zuvor mit transgenen PBL injiziert worden war. Dieses Serum wurde mit Blutzellen einer transgenen Ratte inkubiert und anschließend mit FITC-konjugiertem anti-Ratten-IgG-Antikörper markiert. Das Histogramm zeigt eine deutliche Rechtsverschiebung. Das heißt, dass die transgenen Zellen von Antikörpern im Serum des Wildtyp-Empfängertieres erkannt werden.

4.5. Knochenmarktransplantation in bestrahlte Ratten

Bisher mussten die Erfahrungen mit den R26-hPLAP-transgenen Ratten zu dem Schluss führen, dass dieses Tiermodell in besonderem Maße geeignet ist, Fragen zur Zellabstammung von Knorpel- und Knochenzellen zu beantworten. Die ubiquitäre und starke Expression des Transgens besonders in mesenchymalen Knochenzellen und die gute Haltbarkeit des Markerenzym in Knochen während der MMA-Einbettung führten zu dieser Annahme. Die Antikörperbildung von Wildtyp-Tieren gegen transgene Zellen machte es allerdings unmöglich, das Tiermodell für die eindeutige Beantwortung solcher Fragen zu nutzen. Es musste also ein Ausweg aus dieser Situation gefunden werden.

Um immunvermittelte Reaktionen der Empfängertiere zu vermeiden, wurden die Wildtyp-Empfängertiere letal bestrahlt und anschließend mit Knochenmarkszellen von transgenen Tieren transplantiert.

Die Abbildungen 12 a bis f zeigen, dass vier Wochen nach dieser Transplantation alle hämatopoetischen Zellen in den bestrahlten und transplantierten Tieren das Transgen exprimieren und somit von den Spenderzellen abstammen. Der Zeitraum von vier Wochen lässt auf eine stabile Expression des Transgens schließen. Insbesondere bei Vergleich der Abbildungen 10 und 12 wird deutlich, dass die Expression von hPLAP auf den hämatopoetischen Zellen in transgenen Tieren und in den bestrahlten und transplantierten Tieren annähernd dieselbe ist. Auffallend ist in der Histologie der bestrahlten Tiere, dass die mesenchymalen Zellen (z.B. Osteozyten, Chondrozyten) nicht vom transgenen Spendertier abstammen (Abb. 12 c bis f). Die bestrahlten und transplantierten Tiere überleben viele Monate ohne erkennbare Krankheitsanzeichen.

Abbildung 12: Knochenmarktransplantierte Tiere in FACS-Analyse und Histologie

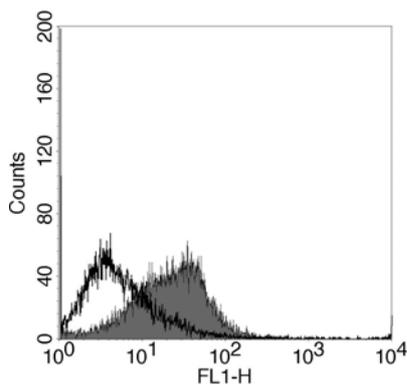


Abb. 12 a: Immunofluoreszenz-Färbung von Blutzellen einer bestrahlten und transplantierten Wildtyp-Ratte (grau) und einer Kontroll-Wildtyp-Ratte (weiß). Die Zellen wurden zunächst mit Maus IgG_{2a} anti-hPLAP-Antikörper und dann mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper markiert. Das Histogramm zeigt, dass hPLAP auf dem Großteil der PBL des Knochenmarktransplantierten Tieres exprimiert wird.

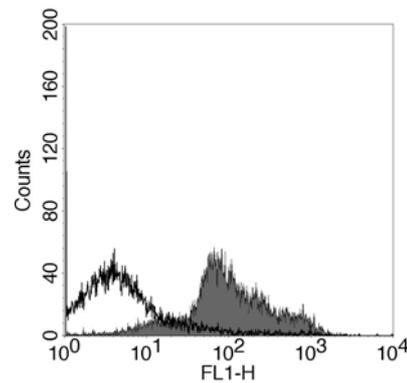


Abb. 12 b: Immunofluoreszenz-Färbung von Knochenmarkszellen eines bestrahlten und transplantierten Wildtyp-Tieres (grau) und einer Kontroll-Wildtyp-Ratte (weiß). Die Zellen wurden zunächst mit Maus IgG_{2a} anti-hPLAP-Antikörper und dann mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper markiert. Das Histogramm zeigt, dass annähernd alle BMC in diesem transplantierten Tier hPLAP exprimieren.

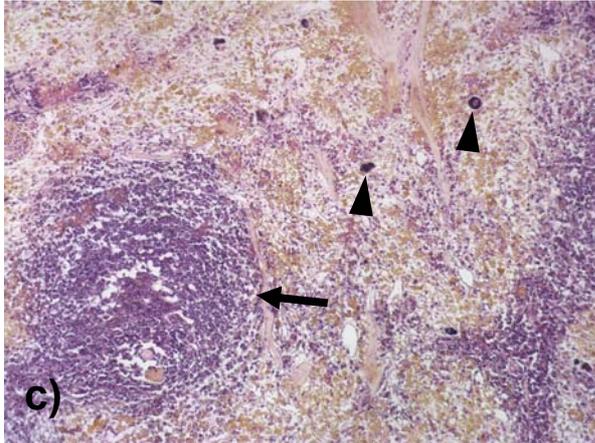


Abb. 12 c: Paraffinschnitt der Milz eines transplantierten Tieres.

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

Pfeil: Lymphozyten in Lymphfollikeln

Pfeilspitzen: Megakaryozyten

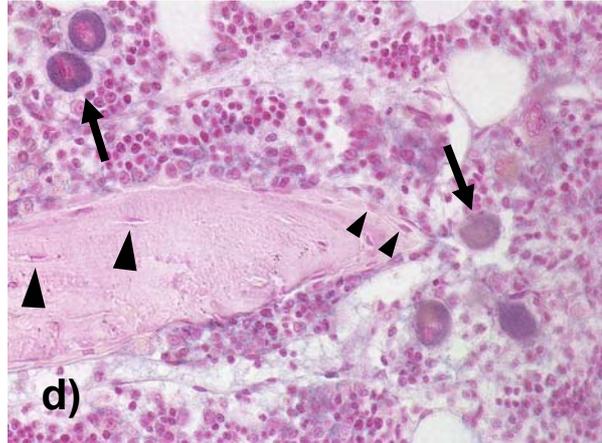


Abb. 12 d: MMA-Schnitt der Tibia eines transplantierten Tieres.

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

Pfeile: Megakaryozyten im Knochenmark

Kleine Pfeilspitzen: Osteoblasten

Große Pfeilspitzen: Osteozyten

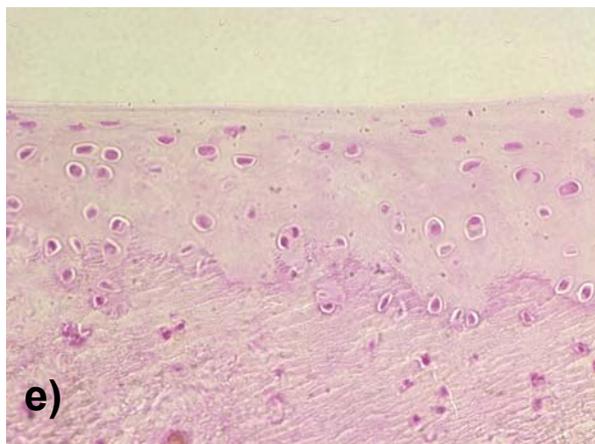


Abb. 12 e: MMA-Schnitt vom Gelenkknorpel eines transplantierten Tieres.

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

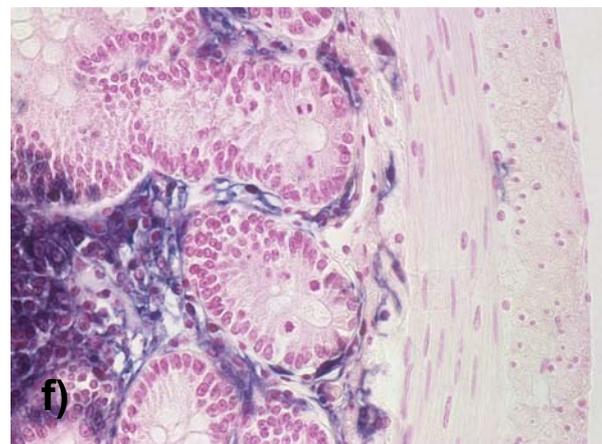


Abb. 12 f: Ileum-Querschnitt eines transplantierten Tieres.

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

4.6 Verwendbarkeit dieses Modells für Studien über Knorpelschäden

Ein Beispiel dafür, dass dieses Modell für mesenchymale Zell-Abstammungsfragen nützlich sein kann, ist Abbildung 13. Für dieses Experiment wurden bestrahlten und transplantierten Tieren transgene Knochenmarkszellen in das Kniegelenk injiziert. Eine Woche nach der Injektion bilden die transgenen Knochenmarkszellen eine dichte, ca. 2 bis 3 Zellen dicke Schicht auf der intakten Knorpeloberfläche im Gelenk (Abb.13 a). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass sich diese Zellen zuvor auf der Knorpeloberfläche geteilt und vermehrt haben müssen. Nach vier Wochen zeigen die genetisch markierten Zellen eine deutlicher differenzierte Ausprägung: Ihre Phänotypen ähneln denen von Fibroblasten und Chondrozyten und die Zellen scheinen in das sie umgebende nicht-transgene Knorpelgewebe integriert zu sein (Abb. 13 b).

Dieses Experiment zeigt sehr deutlich die Vorteile und Stärken dieses Modells auf. Es beweist, dass mesenchymale transgene Vorläuferzellen an nativem Gelenkknorpel von Wildtyp-Tieren nicht nur anwachsen können, sondern dass sie sich dort dann auch zu Fibroblasten- und Chondrozyten-ähnlichen Zellen weiterentwickeln können.

Abbildung 13: Transgene Zellen in der Kniegelenkshöhle nach Injektion in das Kniegelenk

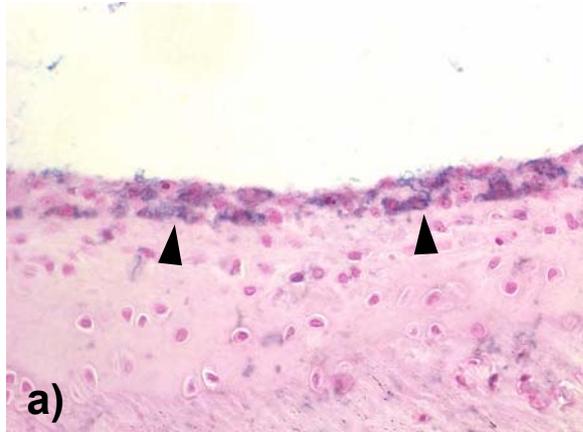


Abb. 13 a: Kniegelenk eine Woche post injectionem

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

Pfeilspitzen: transgene Zellen

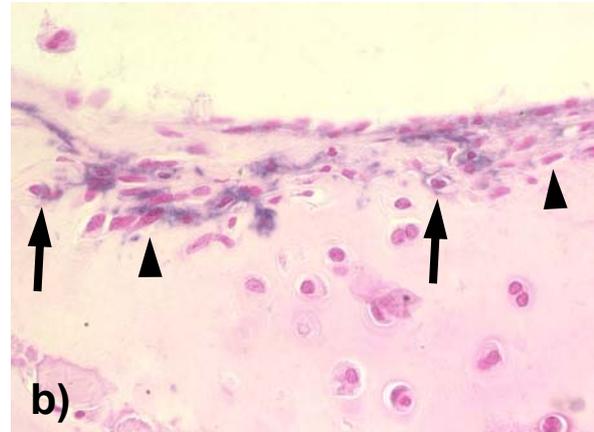


Abb. 13 b: Kniegelenk vier Wochen post injectionem

Fixierung: 40% EtOH

Färbung: Histochemischer Nachweis von hPLAP mit BCIP/NBT; Gegenfärbung mit Kernechtrot

Originalvergrößerung: 400fach

Pfeile: Chondrozyten-ähnliche Zellen

Pfeilspitzen: Fibroblasten-ähnliche Zellen

5 Diskussion

5.1 Das R26-hPLAP-transgene Rattenmodell

Die vorliegende Studie zeigt deutlich, dass hPLAP ein sehr gut geeignetes Markerenzym für Experimente ist, bei welchen transplantierte, genetisch markierte Zellen in Knorpel und Knochen wieder aufgefunden werden sollen. Besonders wichtig für die gute Verwendbarkeit von hPLAP ist, dass seine Enzymaktivität während der MMA-Einbettung erhalten bleibt und dass endogene alkalische Phosphatasen durch einfache Hitzebehandlung inaktiviert werden können, während die Enzymaktivität von hPLAP durch diese Prozedur nicht zerstört wird. Daher können mit Hilfe dieses Markerenzyms genetisch markierte Zellen hervorragend identifiziert werden.

Die Überlegenheit von 40% EtOH gegenüber 4% PFA als Fixierungsmittel ist typisch für die alkalischen Phosphatasen (DOTY und SCHOFIELD, 1984; ERBEN, 1997). Es ist bekannt, dass die Enzymaktivität von alkalischen Phosphatasen auf Fixierungsmittel sehr empfindlich reagiert (DOTY und SCHOFIELD, 1984).

Darüber hinaus bestätigen unsere Daten den Bericht von KISSEBERTH et al. (1999), in welchem beschrieben wird, dass der R26-Promotor sehr gut geeignet ist, um stabile und gleichmäßige Expression von Markergenen in fast allen Körperzellen zu erreichen. Auch in unseren Experimenten konnten wir in allen untersuchten Proben eine sehr gleichmäßige Expression des Transgens innerhalb der einzelnen Organe und Zellpopulationen bei R26-hPLAP-transgenen Tieren nachweisen. Allerdings scheinen Osteoklasten das Markerenzym nur schwach zu exprimieren.

Ein bedeutender Nachteil der R26-hPLAP-transgenen Ratte ist die membranständige Expression des Transgens in den meisten Zellen, welche in dieser Studie sowohl in der Histologie als auch in den durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen werden konnte. Es stellte sich heraus, dass diese Membranexpression des genetischen Markers eine Immunantwort der Empfängertiere hervorruft, welche zur Abstoßung der intravenös applizierten transgenen Zellen führt. Obwohl die transplantierten Wildtyp-Tiere nur auf zirkulierende Antikörper untersucht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass auch T-Zell-vermittelte Vorgänge bei den Abstoßungsreaktionen eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass die Membranexpression körperfremder Proteine zu immunvermittelten Abstoßungsreaktionen unter Beteiligung von B- und T-Zellen führen kann (SARUKHAN et al., 2001; GROSS et al., 2003). Obwohl hPLAP für das Immunsystem der Ratten nur ein schwaches Immunogen darzustellen scheint, wird die Anzahl der Fragestellungen, die mit dem R26-hPLAP-transgenen Rat-

tenmodell bearbeitet werden können, durch diese Problematik doch stark eingeschränkt. Eindeutige Ergebnisse können mit Transplantationsexperimenten auf diese Weise nicht erreicht werden.

Die vorliegende Studie zeigt allerdings einen Weg auf, mit dem diese Probleme gelöst werden können: die Transplantation von hPLAP-transgenem Knochenmark in bestrahlte Wildtyp-Empfängertiere. Nach dieser Transplantation ist es möglich, den so vorbereiteten Empfängertieren transgene nicht-hämatopoetische Zellen zu verabreichen, ohne dass es zu immunvermittelter Abstoßung kommt. Die Resultate der vorliegenden Experimente zeigen, dass die Expression des Transgens nach der Transplantation von transgenem Knochenmark in Wildtyp-Tiere in allen hämatopoetischen Zellen stabil bleibt.

Das Vorkommen von hPLAP-markierten hämatopoetischen Zellen im ganzen Körper der bestrahlten und transplantierten Tiere führt natürlich dazu, dass Zell-Abstammungsfragen mit diesem Modell nur für nicht-hämatopoetische Zellen sinnvoll zu klären sind. Es wäre zwar theoretisch möglich, für Untersuchungen von hämatopoetischen Zellen den umgekehrten Weg zu beschreiten und nicht genetisch markierte Zellen in transgene Empfänger zu transplantieren, um sie dort zu studieren. Allerdings wird dieser Weg doch eher von geringerem Interesse bleiben.

5.2 Knorpelregeneration mit mesenchymalen Stammzellen

Als ein Beispiel für die vielseitigen Möglichkeiten, die sich mit dem R26-hPLAP-transgenen Ratten-Modell bieten, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass transgene Knochenmarkzellen, die in das Kniegelenk von bestrahlten und mit R26-hPLAP-transgenem Knochenmark transplantierten Tieren injiziert werden, dort anwachsen, sich vermehren und sich zu Fibroblasten- und Chondrozyten-ähnlichen Zellen differenzieren können. Diese Befunde stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von WAKITANI et al. (1994), die in einem Kaninchenmodell mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und aus Periost in einem Typ I Collagen-Gel in Knorpeldefekte transplantierten und bei diesen Tieren eine schnellere Knorpelregeneration feststellten als bei Kontrolltieren, die keine Zelltherapie erhielten. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in einem Ziegen-Modell für Osteoarthritis gemacht werden. Dabei wurden autologe mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark gewonnen, in Kultur vermehrt und mit GFP transfiziert. Diese Zellen wurden dann in die Kniegelenke injiziert und konnten dort die Regeneration von Meniskus-Gewebe verbessern sowie progressive Knorpeldegenerationsprozesse verlangsamen (MURPHY et al., 2003). PASCHER et al. (2004) konnten ebenfalls in vivo und ex vivo mit Markergenen transduzierte

Knochenmarkszellen bis zu 21 Tage lang in Knorpeldefekten der Femurkondylen beim Kaninchen nachweisen.

Insgesamt betrachtet scheint also eine Zelltherapie mit Knochenmarkszellen oder mesenchymalen Stammzellen eine sehr aussichtsreiche Therapieform sowohl für akute Knorpel-läsionen als auch für chronisch-degenerative Knorpelerkrankungen darzustellen.

5.3 Potenzial von Zelltherapien mit mesenchymalen Stammzellen für andere Organe

Man geht heute davon aus, dass eine Zelltherapie mit adulten mesenchymalen Stammzellen nicht nur für die Regeneration von Knorpel, sondern auch für die Reparatur von Schäden an anderen Organen genutzt werden kann (PROCKOP et al., 2003). Diese Vorstellung basiert zum einen auf Daten, die gezeigt haben, dass Knochenmark-Stromazellen in der Lage sind, sich zu Knochen-, Knorpel-, Fett- und verschiedenen Muskelzellen zu differenzieren. Es liegen auch Berichte vor, nach denen sich Knochenmark-Stromazellen –zumindestens in vitro– sogar zu nicht-mesenchymalen Zellen wie Gefäßendothelien und verschiedenen epithelialen Zellarten (Leber, Lunge, Gastrointestinaltrakt; JIANG et al., 2002) entwickeln können sollen. Möglicherweise gibt es auch zirkulierende mesenchymale Stammzellen im Blut (KORBLING et al., 2002). Zum anderen hat eine Fülle von tierexperimentellen und klinischen Daten aus der Humanmedizin nahe gelegt, dass Zellen aus dem Knochenmark an der physiologischen Zellregeneration von verschiedenen Organen beteiligt sein könnten. Viele Studien werteten hier Patientendaten retrospektiv aus. Häufig wurden Daten von Patienten genutzt, die im Rahmen einer (Krebs-)Therapie Knochenmarktransplantationen erhalten hatten. Wenn Frauen von männlichen Spendern Zellen erhalten, kann das Y-Chromosom als natürlicher Marker verwendet werden. In Patientinnen, die eine Knochenmarktransplantation von männlichen Spendern erhielten, wurden später männliche, ein Y-Chromosom enthaltende Hepatozyten (THEISE et al., 2000b), Cholangiozyten (THEISE et al., 2000b), Kardiomyozyten (DEB et al., 2003), Neurone und Gliazellen (MEZEY et al., 2003), Lungenepithelzellen (SURATT et al., 2003) und Nierenzellen (POULSOM et al., 2003) gefunden. Häufig wurden auch Daten von Patienten ausgewertet, die andere Organspenden (Herz, Niere, Leber) erhalten hatten. Wenn männlichen Empfängern weibliche Organe oder Teile davon transplantiert werden, kann auch in diesem Fall das Y-Chromosom als natürlicher Marker verwendet werden: In Biopsien der weiblichen Organe können so männliche Zellen nachgewiesen werden (THEISE et al., 2000b; POULSOM et al., 2001). Darüber hinaus wurden Ergebnisse aus diesen Studien dann häufig im Tierversuch überprüft. Tierexperimentelle Daten haben gezeigt, dass Knochenmarkszellen an der Regeneration von Leberzellen (LAGASSE et al., 2000; THEISE et al., 2000a; FUJII et al., 2002; JIANG et al., 2002; POULSOM et al., 2003) und von Nierenzellen (ITO et al., 2001; POULSOM et al., 2001) teilhaben können. Ähnliches gilt

auf für neuronale Zellen (MEZEY et al. 2000; 2003) und epitheliale Zellen in der Lunge (KENNEDY und ABKOWITZ, 1997; KOTTON et al., 2001; JIANG et al., 2002). Die Tatsache, dass eine Knochenmarktransplantation den Phänotyp von Mausmodellen mit genetischen Osteoblastendefekten verbessert, spricht ebenfalls dafür, dass sich mesenchymale, osteogene Zellen aus den Spender-Knochenmarkzellen entwickeln können (PEREIRA et al., 1998; MIYAMURA et al., 2000). Auch aus der Humanmedizin liegt ein Bericht über die Therapie von Kindern, die an Osteogenesis imperfecta leiden, mit allogenen mesenchymalen Stammzellen vor. Die Kombination der therapeutischen Knochenmarktransplantation mit zusätzlichen Gaben kultivierter Knochenmarkzellen von demselben Spender schien zu einem größeren Therapieerfolg zu führen als die Knochenmarktransplantation allein (HORWITZ et al., 2002).

Die Hypothese, dass Stammzellen aus dem Knochenmark in der Lage sind, adulte Gewebezellen zu regenerieren, wird auch durch Berichte gestützt, in denen Knochenmarkzellen direkt in verschiedene Organe injiziert wurden:

Nach lokaler Injektion von humanen mesenchymalen Knochenmark-Stammzellen in das Myokard von Mäusen wächst ein Teil der Zellen dort an und differenziert sich offenbar zu Kardiomyozyten (TOMA et al., 2002). Auch für nicht-mesenchymale Gewebe liegen Berichte über den Erfolg von lokalen Injektionen von Knochenmark vor. BONILLA et al. (2002) injizierten Knochenmarkzellen intrazerebral, und beobachteten die Entwicklung der transplantierten Zellen nicht nur zu Gliazellen, sondern auch zu Neuronen.

Eine wachsende Zahl von Experimenten hat zusätzlich gezeigt, dass intravenös oder lokal applizierte Knochenmarkzellen oder kultivierte Stromazellen sich an der Reparatur von Geweben nach Traumatisierung beteiligen können: In einem Ratten-Myokardinfarkt-Modell ließen sich nach intravenöser Infusion markierte Knochenmark-Stromazellen in den Infarktgebieten nachweisen, die sich später zu Myozyten-ähnlichen Zellen differenzierten (BITTIRA et al., 2003). ORLIC et al. (2001a und 2001b) machten ähnliche Beobachtungen nach lokaler Applikation von Knochenmarkzellen in einem Myokardinfarkt-Modell in der Maus. Wurden humane Knochenmark-Stromazellen 24 Stunden nach einer experimentell induzierten Hirnläsion bei Ratten intravenös verabreicht, so ließen sich humane Zellen im Bereich der Läsionen wieder finden, die sich im weiteren Verlauf des Experiments zu Glia- und Nervenzellen differenzierten (MAHMOOD et al., 2003). Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass die lokale Implantation von mesenchymalen Stammzellen zu deutlichen Verbesserungen im Heilungsverlauf von Sehnen- und Stimmbandverletzungen führt (YOUNG et al., 1998; KANEMARU et al., 2003).

Aus diesen Resultaten ergeben sich vielfältige Forschungsansätze und große Hoffnungen im Hinblick auf die Therapiemöglichkeiten einer ganzen Reihe von Organerkrankungen. Neuerdings ist ein Teil dieser Befunde jedoch wieder in Frage gestellt worden, da in der Regel keine genauen Aussagen über die den beobachteten Phänomenen zugrunde liegenden Mechanismen gemacht werden konnten. Die in den Organen oder Traumatisierungsgebieten nachgewiesenen Spenderzellen könnten somit vielleicht nicht aus der Proliferation von Stammzellen, sondern durch Zellfusionen oder Gentransfer entstanden sein (ALISON et al., 2004; CAMARGO et al., 2004 und SCOTT, 2004).

5.4 Transplantation von mesenchymalen Zellen im Rahmen von Knochenmark-Transplantationen?

Obwohl es, wie oben beschrieben, eine Fülle von tierexperimentellen und auch klinischen, meist retrospektiv erhobenen Daten aus der Humanmedizin gibt, die nahe legen, dass im Knochenmark vorhandene Stromazellen nach einer Knochenmarktransplantation im Empfänger nicht nur überleben sondern auch proliferieren können, liegen auch eine Reihe von gegensätzlichen Beobachtungen vor.

KEATING et al. (1982) berichteten von einer Gruppe von Patienten, die Knochenmarkspenden vom jeweils anderen Geschlecht erhalten hatten. Als natürlicher Marker wurde auch in dieser Studie das Y-Chromosom verwendet. Immer mehr Stromazellen dieser Patienten schienen im Laufe der Zeit von den transplantierten Zellen abzustammen.

Spätere Untersuchungen kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass die Stromazellen von Patienten, die allogene Knochenmarktransplantationen erhalten hatten, auch nach der Transplantation von ihnen selbst stammten und nicht vom Knochenmarkspender (SIMMONS et al., 1987; LAVER et al., 1987; AGEMATSU und NAKAHORI, 1991; LEE et al., 2003). Die Methoden, die in diesen Studien angewendet wurden, um die Herkunft der Stromazellen zu ermitteln, waren unterschiedlich. LAVER et al. (1987) kombinierten in situ Hybridisierung mit Fluoreszenz-Markierungen. Auch SIMMONS et al. (1987) sowie AGEMATSU und NAKAHORI (1991) verwendeten in situ Hybridisierung mit einer Y-Chromosom-spezifischen DNA-Sonde, LEE et al. (2003) verglichen die Telomerlänge von Empfänger- und Spenderzellen. Die letztgenannten Studien scheinen dafür zu sprechen, dass mesenchymale Vorläuferzellen in Knochenmark in zu geringer Anzahl vorhanden sind, um sie unter den Bedingungen einer „normalen“ Knochenmarktransplantation (mit der Intention der Transplantation von hämatopoetischen Zellen) in Empfängergewebe verpflanzen zu können.

In Übereinstimmung dazu zeigten auch die Resultate aus der hier vorliegenden Studie vier Wochen nach der Transplantation keinen Hinweis auf transgene mesenchymale Zellen in den bestrahlten und transplantierten Wildtyp-Tieren. Längere Zeiträume konnten zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht berücksichtigt werden. Unsere vorläufigen Daten sprechen jedoch dafür, dass die mesenchymalen Vorläuferzellen, die im Knochenmark stets zu finden sind, nach syngener Transplantation nicht im Empfänger Knochenmark oder anderen Organen nachweisbar sind. Die Tatsache, dass wir mit einem identischen Protokoll für die Gewinnung von Knochenzellen nach Injektion in das Kniegelenk transgene mesenchymale Zellen nachweisen konnten, die an der Knorpeloberfläche hafteten, proliferierten und differenzierten, zeigt, dass unsere Knochenmarkpräparationen sehr wohl mesenchymale Vorläuferzellen enthielten. Ausgehend von den humanen Daten aus Knochenmarktransplantierten Patienten und unseren eigenen Experimenten muss es - insgesamt betrachtet - also als eher unwahrscheinlich gelten, dass Stromazellen, die in Knochenmark enthalten sind, bei einer Knochenmarktransplantation unter Standardbedingungen mit verpflanzt werden.

5.5 Ausblick

Obwohl somit noch immer nicht sicher gesagt werden kann, ob Stromazellen bei Knochenmarktransplantationen beim Menschen oder bei Tieren mit verpflanzt werden, sprechen viele der genannten Studien dennoch deutlich für die Tatsache, dass zirkulierende Stromazellen an Heilungsprozessen von verletzten Organen teilhaben könnten. FANG und POULSOM (2003) sehen auch Möglichkeiten bei der Therapie von Geburtsschäden. Zelltherapien unter Verwendung von mesenchymalen Zellen könnten also eine sehr gut brauchbare Alternative darstellen, um Heilungsvorgänge in verschiedenen Geweben zu fördern (PROCKOP et al., 2003).

Mittlerweile werden viele dieser natürlich große Hoffnungen weckende Berichte wieder in Zweifel gestellt (GOODELL, 2003). Dies liegt unter anderem daran, dass einige sehr faszinierende Beobachtungen nicht wiederholt werden konnten. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass die transplantierten Zellen sich in den Empfängern nicht im Sinne von Stammzellen teilen, um so zur Regeneration der unterschiedlichen Gewebe beizutragen, sondern dass sie mit anderen Zellen verschmelzen und so deren Genotyp annehmen (ALISON et al., 2004). Auch CAMARGO et al. (2004) und SCOTT (2004) stellen die Hypothese auf, dass Zellfusionen und ein damit verbundener Gentransfer ebenfalls als Erklärung für viele Beobachtungen in Betracht kommt. Ferner gibt es auch einen Bericht über „Nebenwirkungen“ von mesenchymalen Stammzellzubereitungen. Es wird unter speziellen Bedingungen von

einer systemischen immunsupprimierenden Wirkung mit damit verbundener erhöhter Tumorzinzidenz gesprochen (DJOUAD et al., 2003).

Aus diesen Ausführungen wird deutlich, dass sich auf diesem Forschungsgebiet in naher Zukunft eine sehr große Dynamik entwickeln wird. Es bleibt sicherlich gerechtfertigt, in der Anwendung insbesondere von adulten mesenchymalen Stammzellen viele neue Möglichkeiten in Bezug auf die Therapie der unterschiedlichsten Krankheitsbilder zu sehen. Es ist allerdings von großer Dringlichkeit, zu diesem Zweck die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu erforschen. Für diese Forschungsarbeit könnte der in dieser Arbeit vorgestellte R26-hPLAP-transgene F-344-Rattenstamm von großem Nutzen sein. Insbesondere das hier beschriebene Modell, die bestrahlte und mit hPLAP-transgenem Knochenmark transplantierte Wildtyp-F344-Ratte, dürfte in Zukunft sehr nützlich sein, um viele weitere Fragen zur Zell- und Gentherapie mit mesenchymalen Zellen beantworten zu können.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratte auf ihre Verwendbarkeit für Studien über Zelltherapien unter Verwendung von mesenchymalen Zellen überprüft. Besondere Berücksichtigung fanden dabei Knochen- und Gelenkknorpelzellen. Es wurden diverse Techniken und Methoden auf ihre Anwendbarkeit bei diesem Tiermodell hin getestet.

Das für humane plazentäre alkalische Phosphatase (hPLAP) transgene Rattenmodell sollte insbesondere für Transplantationsexperimente geeignet sein, da die Tiere einer Inzuchtlinie entstammen und demzufolge eine große genetische Einheitlichkeit aufweisen. Transplantationen zwischen den Tieren sollten also ohne Abstoßungsreaktionen möglich sein. Das Transgen, ein menschliches Enzym, das als Marker verwendet werden kann, stellt den einzigen Unterschied zwischen den Tieren dar.

Es wurde angenommen, dass jede beliebige Zellpopulation aus den das Transgen exprimierenden Tieren isoliert werden und den ansonsten genetisch weitgehend identischen Wildtyp-Tieren verabreicht werden kann. Dort sollten die transgenen Zellen anhand ihres Markers zu jeder Zeit wieder lokalisiert werden können. So sollten die unterschiedlichsten Fragen zu Abstammung, Herkunft und Schicksal von Zellen beantwortet werden können. Aufgrund dieser Voraussetzungen wurden an dieses Tiermodell hohe Erwartungen geknüpft.

Zunächst wurden verschiedene Fixierungs- und Einbett-Protokolle daraufhin überprüft, wie sie die Enzymaktivität des Markerenzym hPLAP beeinflussen. 40% Ethanol konnte als sehr gut geeignetes Fixierungsmittel bestimmt werden. Paraformaldehyd hingegen verminderte die Enzymaktivität von hPLAP stark.

Erwartungsgemäß überstand das Enzym die routinemäßige Paraffineinbettung gut. Vorteilhafterweise konnte auch ein Protokoll für eine Plastikeinbettung in Methylmethacrylat gefunden werden, die für dieses Tiermodell geeignet ist. Knochen können mit dieser Methode ohne vorherige Entkalkung (welche die Enzymaktivität fast vollständig zerstört) eingebettet und histologisch aufgearbeitet werden. Auch für Weichteil-Organen ist die Plastikeinbettung gut geeignet, denn die Morphologie der Gewebe bleibt außerordentlich gut erhalten.

Bei Transplantationen von transgenen Zellen in Wildtyp-Empfängertiere konnten überraschenderweise die transgenen Spenderzellen in den Empfängertieren nicht wieder aufgefunden werden. Bei weitergehenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Transgen in hohem Maße auf der Zellmembran exprimiert wird und dass diese membranständige Expression offenbar ausreicht, um eine immunvermittelte Abstoßungsreaktion bei den Empfängertieren auszulösen.

Es wurde daher nach einer Lösung gesucht, wie Transplantationsexperimente mit diesem Tiermodell dennoch durchgeführt werden können.

Die Empfängertiere wurden durch Bestrahlung und anschließende Transplantation von transgenen Knochenmarkzellen auf weitere Transplantationen vorbereitet. Ihr Immunsystem wurde auf diese Art so manipuliert, dass später injizierte, das Transgen exprimierende Zellen nicht mehr als fremd erkannt und abgestoßen wurden. Allerdings stammen nach dieser Vorbereitung alle hämatopoetischen Zellen im Empfänger von den transgenen Spenderzellen ab. Das Tiermodell kann also vor allen Dingen für Fragestellungen zu nicht-hämatopoetischen Zellen eingesetzt werden und ist nicht in dem Maße vielseitig einsetzbar wie ursprünglich erwartet worden war.

Trotzdem stellt das Modell der R26-hPLAP-transgenen Fischer-344-Ratte ein wertvolles Werkzeug für die Erforschung von mesenchymalen Zellen dar. Ein Beispiel hierfür bietet die lokale Injektion von transgen markierten Knochenmarkzellen in ein Gelenk. Die Ergebnisse dieses Telexperiments lassen darauf schließen, dass durch solche Zelltherapien die Heilung von Knorpelschäden positiv beeinflusst werden kann.

6 Summary

R26-hPLAP transgenic Fischer 344 rats as a model for questions towards cell therapy using mesenchymal stem cells

The examination of the utility of R26-hPLAP transgenic Fischer 344 rat as a model for mesenchymal cell lineage experiments was the aim of the present study. Special attention was paid to cells of bone and cartilage. Different methods and techniques were tested on their applicability in this model.

The rat model carrying human placental alkaline phosphatase (hPLAP) as a transgene was expected to be highly suitable for experiments involving transplantations of cells or tissues, because the animals are genetically largely identical, coming from an inbred rat strain. Therefore, transplantations among these animals should be possible without any rejection phenomena. The transgene, an enzyme that can be used as a marker, is the only exception to the genetic identity of the animals.

It was expected to be possible to isolate any given cell population of the transgenic animals and to inject them into wildtype recipient animals, where these cells should be easily detectable at any time. Thus it was assumed that cell lineage questions could be answered for many types of cells with this model. Based on these assumptions, high hopes were tied to this model.

Initially, different methods of fixation and embedding methods were tested on their influence on the activity of the marker enzyme. Ethanol proved to be a good fixative. Paraformaldehyde, on the other hand, strongly reduced the enzyme activity.

As expected, the enzyme activity was preserved well during routine paraffin embedding. Fortunately, it was also possible to find a plastic-embedding protocol (methylmethacrylate) suitable for this model. Employing this method, bones can be embedded and processed for histology without the need of prior decalcification, which severely diminishes enzyme activity. This method is also highly suitable for soft tissue samples, as it preserves morphological details better than paraffin embedding.

Surprisingly, no transgenic cells could be tracked in wild type recipient animals after transplantation. Further investigations revealed the transgene being expressed on the membranes of many cells. This membrane expression seems to be sufficient to produce immune-mediated rejection of transgenic cells in wildtype recipients.

Therefore, a way was being searched for to make transplantation experiments possible with this model. The recipients were lethally irradiated and subsequently received a bone marrow cell transplantation of transgenic origin, and were thereby prepared for further transplantations. Their immune system was manipulated in a way that prevented transgenic cells to be recognized as being non-self and being destroyed afterwards.

However, after this kind of preparation, all haematopoietic cells in recipient animals are of donor origin. This limits the utility of the hPLAP-transgenic rat to questions towards non-haematopoietic cells, the model therefore not being as versatile as expected.

Nevertheless, the R26-hPLAP-transgenic Fischer-344-rat promises to be a very useful tool for the investigation of mesenchymal cells. One example is the local injection of transgenic bone marrow cells into joint cavities. The results in these experiments suggest that cell therapies could positively influence the healing of joint injuries.

7 Literaturverzeichnis

AGEMATSU, K. und NAKAHORI, Y. ,1991

Recipient origin of bone marrow-derived fibroblastic stromal cells during all periods following bone marrow transplantation in humans.

Br J Haematol 79: 359-365

ALISON; M.R., POULSON, R., OTTO, W.R., VIG, P., BRITTAN, M., DIREKZE, N.C.,
LOVELL, M., FANG, T.C., PRESTON, S.L., WRIGHT, N.A., 2004

Recipes for adult stem cell plasticity: fusion cuisine or readymade?

J Clin Pathol 57: 113-20

BARRY, F., BOYNTON, R.E., LIU, B., MURPHY, J.M., 2001

Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components

Exp Cell Res. 268: 189-200

BENHAM, F.J., FOGH, J., HARRIS, H., 1981

Alkaline phosphatase expression in human cell lines derived from various malignancies

Int J Cancer 27: 637-644

BITTIRA, B., SHUM-TIM, D., AL- KHALDI, A. und CHIU, R.C., 2003

Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction.

Eur J Cardiothorac Surg 24: 393-398

BITTNER, R.E., SCHOFER, C., WEIPOLTSHAMMER, K., STREUBEL, B., HAUSER, E.,
FREILINGER, M., HOGER, H., ELBE-BURGER, A., WACHTLER, F., 1999

Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice

Anat Embryol (Berl) 199: 391-6

BONILLA, S., ALARCON, P., VILLAVARDE, R., APARICIO, P., SILVA, A., MARTINEZ, S.,
2002

Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain

Eur J Neurosci 15: 575-82

BRUDER S.P., FINK, D.J., CAPLAN, A.I., 1994

Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy

J Cell Biochem 56: 283-94

BRUDER, S.P., KRAUS, K.H., GOLDBERG, V.M., KADIYALA, S., 1998 (a)

The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects

J Bone Joint Surg Am 80: 985-96

BRUDER, S.P., JAISWAL, N., RICALTON, N.S., MOSCA, J.D., KRAUS, K.H.,

KADIYALA, S., 1998 (b)

Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration

Clin Orthop 355: S247-56

CAMARGO, F.D., CHAMBERS, S.M., GOODELL, M.A., 2004

Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion

Cell Prolif 37: 55-65

CAPLAN, A.I., 1991

Mesenchymal stem cells

J Orthop Res 9: 641-50

COLTER, D.C., SEKIYA, I., PROCKOP, D.J., 2001

Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human bone marrow stromal cells

Proc Natl Acad Sci USA 98: 7841-5

CUBITT, A.B., HEIM, R., ADAMS, S.R., BOYD, A.E., GROSS, L.A., TSIEN, R.Y., 1995

Understanding, improving and using green fluorescent proteins.

Trends Biochem Sci 20: 448-455

CUI, C., WANI, M.A., WIGHT, D., KOPCHICK, J., STAMBROOK, P.J., 1994

Reporte genes in transgenic mice

Transgenic Res 3: 182-94

- CULP, L.A., LIN, W.C., KLEINMANN, N.R., CAMPERO, N.M., MILLER, C.J.,
HOLLERAN, J.L., 1998
Tumor progression, micrometastasis, and genetic instability tracked with histochemical
marker genes
Prog Histochem Cytochem 33: XI-XV, 329- 48
- DEASY, B.M., JANKOWSKI, R.J., HUARD, J., 2001
Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy
Blood Cells Mol Dis 27: 924-33
- DEB, A., WANG, S., SKELDING, K.A., MILLER, D., SIMPER, D., CAPLICE, N.M., 2003
Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gen-
der mismatched bone marrow transplantation patients
Circulation 107: 1247-9
- DE BARI, C., DEL ÁCCIO, F., TYLZANOWSKI, P., LUYTEN F.P., 2001
Multipotent stem cells from adult human synovial membrane
Arthritis Rheum 44: 1928-42
- DENKER, A.E., NICOLL, S.B., TUAN, R.S., 1995
Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures murine C3H10T1/2 cells upon
treatment with transforming growth factor-beta 1
Differentiation 59: 25-34
- DENNIS, J.E., HAYNESWORTH, S.E., YOUNG, R.G., CAPLAN, A.I., 1992
Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites trans-
planted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of os-
teogen expression
Cell Transplant 1: 23-32
- DEPRIMO, S.E., STAMBROOK, P.J., STRINGER, J.R., 1996
Human placental alkaline phosphatase as a histochemical marker of gene expression in
transgenic mice
Transgenic Res 5: 459-66

DJOUAD, F., PLENCE, P., BONY, C., TROPEL, P., APPARAILLY, F., SANY, J., NOEL, D., JORGENSEN, C., 2003

Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favours tumor growth in allogeneic animals

Blood 102: 3837-44

DOTY, S.B. und SCHOFIELD, B.H., 1984

Ultra histochemistry of calcified tissues.

In DICKSON, G.R., ed. Methods of Calcified Tissue Preparation.

Amsterdam, Elsevier, 149-198

ERBEN, R.G., 1997

Embedding of bone samples in methylmethacrylate: An improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry.

J Histochem Cytochem 45: 307-313

ERBEN, R.G., SCUTT, A.M., MIAO, D.S., KOLLENKIRCHEN, U., HABEREY, M., 1997

Short-term treatment of rats with high dose 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow. Endocrinology 138: 4629-4635

FANG, T.C. und POULSOM, R., 2003

Cell-based therapies for birth defects: a role for adult stem cell plasticity?

Birth Defects Res Part C Embryo today 69: 238-49

FERRARI, G., CUSELLA-DE ANGELIS, G., COLETTA, M., PAOLUCCI, E.,

STORNAIUOLO, A., COSSU, G., MAVILIO, F., 1998

Muscle regeneration by bonemarrow-derived myogenic progenitors

Science 279: 1528-30

FISHMAN, W.H., 1990

Alkaline phosphatase isozymes: Recent progress

Clin Biochem 23: 99-104

FRIEDENSTEIN, A.J., GORSKAJA, J.F., KULAGINA, N.N., 1976

Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.

Exp Hematol 4: 267-274

- FUJII, H., HIROSE, T. OE, S., YASUCHIKA, K, AZUMA, H., FUJIKAWA, T.,
NAGAO, M., YAMAOKA, Y., 2002
Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice
J Hepatol 36: 653-9
- GALLI; R., BORELLO, U., GRITTI, A., MINASI, M., BJORNSON, C., COLETTA, M.,
MORA, M., DE ANGELIS M.G., FIOCCO, R., COSSU, G., VESCOVI, A.L., 2000
Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells
Nat Neurosci 3: 986-91
- GAO, J., DENNIS, J.E., MUZIC, R.F., LUNDBERG, M., CAPLAN, A.I., 2001
The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after
infusion
Cells Tissues Organs 169: 12-20
- GOODELL, M.A., 2003
Stem-cell "plasticity": befuddled by the muddle
Curr Opin Hematol 10: 208-13
- GOSHIMA, J., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I., 1991
The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in
vivo in calcium phosphate ceramic blocks
Clin Orthop 262: 298-311
- GOSSLER, A. und ZACHGO, J., 1993
Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras.
In Joyner CJ, ed. Gene Targeting: A Practical Approach.
New York, NY Oxford University Press, 181-227
- GRONTHOS, S., FRANKLIN, D.M., LEDDY, H.A., ROBEY, P.G., STORMS, R.W.,
GIMB, J.M., 2001
Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells
J Cell Physiol 189: 54-63
- GROSS, D.A., LEBOEUF, M., GJATA, B., DANOS, O. und DAVOUST, J., 2003
CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit immune-mediated transgene rejection.
Blood 102: 4326-4328

GRUNDEL, R.E., CHAPMAN, M.W., YEE, T., MOORE, D.C., 1991

Autogeneic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna

Clin Orthop 266: 244-58

GUSSONI, E., SONEOKA, Y., STRICKLAND, C.D., BUZNEY, E.A., KHAN, M.K., FLINT A.F., KUNKEL, L.M., MULLIGAN, R.C., 1999

Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation

Nature 401: 390-4

HAKAMATA, Y., TAHARA, K., UCHIDA, H., SAKUMA, Y., NAKAMURA, M.,

KUME, A., MURAKAMI, T., TAKAHASHI, R., HIRABAYASHI, M., UEDA, M., MIYOSHI, I.,

KASAI, N., KOBAYASHI, E., 2001

Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research

Biochem Biophys Res Commun 286: 779-85

HAYNESWORTH, S.E., GOSHIMA, J., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I., 1992

Charakterization of cells with osteogenic potential from human marrow

Bone 13: 81-8

HENTHORN, P., ZERVOS, P., RADUCHA, M., HARRIS, H. und KADESCH, T., 1988 Expression of a human placental alkaline phosphatase gene in transfected cells: use as a reporter for studies of gene expression.

Proc Natl Acad Sci U S A 85: 6342-6346

HORWITZ, E.M., GORDON, P.L., KOO, W.K., MARX, J.C., NEEL, M.D., MC NALL, R.Y., MUUL, L., HOFMANN, T., 2002

Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymale cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone

Proc Natl Acad Sci USA 99: 8932-8937

ITO, T., SUZUKI, A., IMAI, E., OKABE, M., HORI, M., 2001

Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling

J Am Soc Nephrol 12: 2625-2635

- JACKSON, K.A., MAJKA, S.M., WULF, G.G., GOODELL, M.A., 2002
Stem cells: a mini review
J Cell Biochem Suppl 38: 1-6
- JAISWAL, N., HAYNESWORTH, S.E., CAPLAN, A.I., BRUDER, S.P., 1997
Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal cells in vitro
J Cell Biochem. 64: 295-312
- JAISWAL, R.K., JAISWAL, N., BRUDER, S.P., MBALAVIELE, G., MARSHAK, D.R.,
PITTENGER, M.F., 2000
Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase
J Biol Chem 275: 9645-52
- JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B.N., REINHARDT, R.L., SCHWARTZ, R.E., KEENE, C.D.,
ORTIZ-GONZALEZ, X.R., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., Du, J.,
ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W.C., LARGAESPADA, D.A., VERFAILLIE, C.M.,
2002
Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow
Nature 418: 41-9
- JOHNSON, K.A., HOWLETT, C.R., BELLENGER, C.R., ARMATI-GULSON, P., 1988
Osteogenesis by canine and rabbit bone marrow in diffusion chambers
Calcif Tissue Int 42: 113-8
- JOHNSTONE, B., HERING, T.M., CAPLAN, A.I., GOLDBERG, V.M., YOO, J.U., 1998
In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchym progenitor cells
Exp Cell Res. 10: 265-72
- JOHNSTONE, B., YOO, J., 2001
Mesenchymal cell transfer for articular cartilage repair
Expert Opin Biol Ther 1: 915-21
- KADIYALA, S., YOUNG, R.G., THIEDE, M.A., BRUDER, S.P., 1997
Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro
Cell Transplant 6: 125-34

- KANEMARU, S., NAKAMURA, T., OMORI, K., MAGRUFOV, A., HIRATSUKA, Y.,
HIRANO, S., ITO, J., SHIMIZU, Y., 2003
Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells
Ann Otol Rhinol Laryngol 112: 915-20
- KASUGAI, S., TODESCAN, R., NAGATA, T., YAO, K.L., BUTLER, W.T.,
SODEK, J., 1991
Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult
rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic
phenotype
J Cell Physiol 147: 111-20
- KEATING, A., SINGER, J.W., KILLEN, P.D., STRIKER, G.E., SALO, A.C.,
SANDERS, J., THOMAS, E.D., THORNING, D. und FIALKOW, P.J., 1982
Donor origin of the in vitro haematopoietic microenvironment after marrow transplantation
in man.
Nature 298: 280-283
- KENNEDY, D.W., und ABKOWITZ, J.L., 1997
Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using
a transgenic bone marrow transplantation model
Blood 90: 986-93
- KISSEBERTH, W.C., BRETTINGEN, N.T., LOHSE, J.K. und SANDGREN, E.P. ,1999 Ubiquitous
expression of marker transgenes in mice and rats.
Dev Biol 214: 128-138
- KORBLING, M., KATZ, R.L., KHANNA, A., RUIFROK, A.C., RONDON, G.,
ALBITAR, M., CHAMPLIN, R.E., ESTROV, Z., 2002
Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells
N Engl J Med 346: 738-46
- KOTTON D.N., MA, B.Y., CARDOSO, W.V., SANDERSON, E.A., SUMMER, R.S.,
WILLIAMS, M.C., FINE, A., 2001
Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium
Development 128: 5181-8

- LAGASSE, E., CONNORS, H., AL-DHALIMY, M., REITSMA, M., DOHSE, M., OSBORNE, L., FINEGOLD, M., WEISSMAN, I.L., GROMPE, M., 2000
Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo
Nat Med 6: 1229-34
- LAVER, J., JHANWAR, S.C., O'REILLY, R.J. und CASTRO-MALASPINA, H. 1987
Host origin of the human hematopoietic microenvironment following allogeneic bone marrow transplantation.
Blood 70: 1966-1968
- LEBOY, P.S., BERESFORD, J.N., DEVLIN, C., OWEN, M.E., 1991
Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures
J Cell Physiol 146: 370-8
- LE DU, M.H. und MILLAN, J.L., 2002
Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases
J Biol Chem 277: 49808-14
- LEE, J.J., NAM, C.E., KOOK, H., MACIEJEWSKI, J.P., KIM, Y.K., CHUNG, I.J., PARK, K.S., LEE, I.K., HWANG, T.J. und KIM, H.J. 2003
Constitution and telomere dynamics of bone marrow stromal cells in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation.
Bone Marrow Transplant 32: 947-952
- MACKAY, A.M., BECK, S.C., MURPHY, J.M., BARRY, F.P. Chichester C.O., PITTENGER, M.F., 1998
Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from bone marrow
Tissue Eng. 4: 415-28
- MAHMOOD, A., LU, D., LU, M. und CHOPP, M. 2003
Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells.
Neurosurgery 53: 697-702

- MAJKA, S.M., JACKSON, K.A., KIENSTRA, K.A., MAJESKY, M.W., GOODELL, M.A., HIRSCHI, K.K., 2003
Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration
J Clin Invest 111: 71-9
- MAJUMDAR, M.K., THIEDE, M.A., MOSCA, J.D., MOORMAN, M., GERSON, S.L., 1998
Phenotypic and functional comparison of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells
J Cell Physiol 176: 57-66
- MANIATOPOULOS, C., SODEK, J., MELCHER, A.H., 1988
Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats
Cell Tissue Res 254: 317-30
- MEZEY, E., CHANDROSS, K.J., HARTA, G., MAKI, R.A., MC KERCHER, S.R., 2000
Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow
Science 290: 1779-82
- MEZEY, E., KEY, S., VOGELSANG, G., SZALAYOVA, I., LANGE, G.D., CRAIN, B., 2003
Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains
Proc Natl Acad Sci 100: 1364-1369
- MIYAMURA, T., TANAKA, H., INOUE, M., ICHINOSE, Y. und SEINO, Y., 2000
The effects of bone marrow transplantation on X-linked hypophosphatemic mice.
J Bone Miner Res 15: 1451-1458
- MUJTABA, T., HAN, S.S., FISCHER, I., SANDGREN, E.P., RAO, M.S., 2002
Stable Expression of the Alkaline Phosphatase Marker Gene by Neural Cells in Culture and after Transplantation into the CNS Using Cells Derived from a Transgenic Rat
Experimental Neurology 174: 48-57
- MURPHY, J.M., FINK, D.J., HUNZIKER, E.B. und BARRY, F.P., 2003
Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis.
Arthritis Rheum 48: 3464-3474

NAKAHARA, H., BRUDER, S.P., HAYNESWORTH, S.E., HOLECEK, J.J., BABER, M.A.,
GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I., 1990

Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum

Bone 11: 181-8

NAKAHARA, H., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I., 1992

Culture-expanded periosteal cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo

Clin Orthop 276: 291-8

O`CONNOR, K.L., CULP, L.A., 1994

Quantitation of two histochemical markers in the same extract using chemiluminiscent substrates

Biotechniques 17: 502-6; 508-9

OHGUSHI, H., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I., 1989

Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats

Acta Orthop Scand 60: 334-9

OKABE, M., IKAWA, M., KOMINAMI, K., NAKANISHI, T., NISHIMUNE, Y., 1997

„Green mice“ as a source of ubiquitous green cells

FEBS Lett 407: 313-9

OLMSTEDT-DAVIS, E.A., GUGALA, Z., CAMARGO, F., GANNON, F.H.,

JACKSON, K., KIENSTRA, K.A., SHINE, H.D., LINDSEY, R.W., HIRSCHI, K.K.,

GOODELL, M.A., BRENNER, M.K., DAVIS, A.R., 2003

Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors

Proc Natl Acad Sci USA 100: 15877-82

ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., JAKONIUK, I., ANDERSON, S.M., LI, B.,

PICKEL, J., MCKAY, R., NADAL-GINARD, B., BODINE, D.M., LERI, A.,

ANVERSA, P., 2001 (a)

Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium

Nature 410: 701-5

- ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., BODINE, D.M., LERI, A., ANVERSA, P., 2001 (b)
Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice
Ann N Y Acad Sci 938: 221-9
- OWEN, M. und FRIEDENSTEIN, A.J., 1988
Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors
Ciba Found Symp 136: 42-60
- PALEY, D., YOUNG, M.C., WILEY, A.M., FORNASIER, V.L., JACKSON, R.W., 1986
Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study
in rabbits
Clin Orthop 208: 300-12
- PASCHER, A., PALMER, G.D., STEINERT, A., OLIGINO, T., GOUZE, E., GOUZE, J.-N.,
BETZ, O., SPECTOR, M., ROBBINS, P.D., EVANS, C.H., GHIVIZZANI, S.C., 2004
Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate
Gene Ther 11: 133-141
- PEREIRA, R.F., HALFORD, K.W., O'HARA, M.D., LEEPER, D.B., SOKOLOV, B.P.,
POLLARD, M.D., BAGASRA, O., PROCKOP, D.J., 1995
Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone,
cartilage, and lung in irradiated mice.
Proc Natl Acad Sci U S A 92:4857-4861
- PEREIRA, R.F., O'HARA, M.D., LAPTEV, A.V., HALFORD, K.W.,
POLLARD, M.D., CLASS, R., SIMON, D., LIVEZEY, K., PROCKOP, D.J., 1998
Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in trans-
genic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta.
Proc Natl Acad Sci U S A 95:1142-1147
- PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C., JAISWAL, R.K., DOUGLAS, R., MOSCA,
J.D., MOORMAN, M.A., SIMONETTI, D.W., CRAIG, S.,
MARSHAK, D.R., 1999
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells
Science 284: 143-7

- POULSOM, R., FORBES, S. F., HODIVALA-DILKE, K., RYAN, E., WYLES, S., NAVARATNARASAH, S., JEFFERY, R., HUNT, T., ALISON, M., COOK, T., PUSEY, C., WRIGHT, N.A., 2001
Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration
J Pathol 195: 229-235
- POULSOM, R., ALISON, M.R., COOK, T., JEFFERY, R., RYAN, E., FORBES, S.J., HUNT, T., WYLES, S., WRIGHT, N.A., 2003
Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney
J Am Soc Nephrol Suppl. 1: S48-54
- PRILLER, J., PERSONS, D.A., KLETT, F.F., KEMPERMANN, G., KREUTZBERG, G.W., DIRNAGL, U., 2001
Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo
J Cell Biol 155: 733-8
- PROCKOP, D.J., 1997
Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.
Science 276: 71-74
- PROCKOP, D.J., GREGORY, C.A. und SPEES, J.L., 2003
One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues.
Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1: 11917-11923
- ROMBOUTS, W.J.C. und PLOEMACHER, R.E., 2003
Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture
Leukemia 17: 160-170
- SARUKHAN, A., SOUDAIS, C., DANOS, O. und JOOSS, K. 2001
Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors.
J Gene Med 3: 260-270

SCOTT, E.W., 2004

Stem cell plasticity or fusion: two approaches to target cell therapy

Blood Cells Mol Dis 32: 65-7

SHAKE, J.G., GRUBER, P.J., BAUMGARTNER, W.A., SENECHAL, G., MEYERS, J.,

REDMOND, J.M., PITTENGER, M.F., MARTIN, B.J., 2002

Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects

Ann Thorac Surg 73: 1919-25

SIMMONS, P.J., PRZEPIORKA, D., THOMAS, E.D. und TOROK-STORB, B., 1987

Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. Nature 328: 429-432

SURATT, B.T., COOL, C.D., SERLS, A.E., CHEN, L., VARELLA-GARCIA, M., SHPALL,

E.J., BROWN, K.K., WORTHEN, G.S., 2003

Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation

Am J Respir Crit Care Med 168: 318-22

TAKAHASHI, N., YAMANA, H., YOSHIKI, S., ROODMAN, G.D., MUNDY, G.R.,

JONES, S.J., BOYDE, A. und SUDA, T., 1988

Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures.

Endocrinology 122: 1373-1382

TAKEUCHI, K., SEREEMASPUN, A., INAGAKI, T., HAKAMATA, Y., KANEKO, T.,

MURAKAMI, T., TAKAHASHI, M., KOBAYASHI, E., OOKAWARA, S., 2003

Morphologic characterization of green fluorescent protein in embryonic, neonatal, and adult transgenic rats

Anat. Rec 274(A): 883-6

THEISE, N.D., BADVE, S., SAXENA, R., HENEGARIU, O., SELL, S., CRAWFORD, J.M.,

KRAUSE, D.S., 2000 (a)

Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation

Hepatology 31: 235-40

- THEISE, N.D., NIMMAKAYALU, M., GARDNER, R., ILLEI, P.B., MORGAN, G.,
TEPERMAN, L., HENEGARIOU, O., KRAUSE, D.S., 2000 (b)
Liver from bonemarrow in humans
Hepatology 32: 11-6
- TOMA, C., PITTENEGER, M.F., CAHILL, K.S., BYRNE, B.J., KESSLER, P.D., 2002
Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult
murine heart
Circulation 105: 93-8
- TSAI, R.Y. und MC KAY, R.D., 2000
Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells
J Neurosci 20: 3725-35
- WAKITANI, S., GOTO, T., PINEDA, S.J., YOUNG, R.G., MANSOUR, J.M.,
CAPLAN, A.I., GOLDBERG, V.M., 1994
Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage
J Bone Joint Surg Am 76: 579-92
- WAKITANI, S., SAITO, T., CAPLAN, A.I., 1995
Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-
azacytidine
Muscle Nerve 18: 1417-26
- WEISSMAN, I.L., 2000
Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities
Science 287: 1442-6
- WERNTZ, J.R., LANE, J.M., BURSTEIN, A.H., JUSTIN, R., KLEIN, R., TOMIN, E., 1996
Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow
J Orthop Res 14: 85-93
- YOO, J.U. und JOHNSTONE, B., 1998
The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair
Clin Orthop 355: S73-S81

YOUNG, R.G., BUTLER, D.L., WEBER, W., CAPLAN, A.I., GORDON, S.L.,
FINK, D.J., 1998
Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair
J Orthop Res 16: 406-13

ZAMBROWICZ, B.P., IMAMOTO, A., FIERING, S., HERZENBERG, L.A.,
KERR, W.G. und SORIANO, P., 1997
Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to
widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 94:3789-3794

ZANDER, A.R., STUTE, N., KOLB, H.J., SEEBER, S., SCHMITZ, N., 2002
Stammzellforschung: Diesseits des Rubikon
Deutsches Ärzteblatt 99: A-341 / B-257 / C-258

ZHENG, M.H., PAPADIMITRIOU, J.M., NICHOLSON, G.C., 1990
A quantitative cytochemical investigation of osteoclasts and multinucleate cells
J Histochem 23: 180-188

Danksagung

Als erstes möchte ich mich sehr herzlich bei der Nummer 1, meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Reinhold G. Erben, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Mittel sowie die jederzeit gewährte ausgezeichnete und freundliche Unterstützung bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich auch der Nummer 2, Frau Dr. Karin Weber, für die bereitwillige, häufig sogar geduldige Anleitung bei der Arbeit im Labor ☺ und viele Tipps und Tricks aus ihrem Erfahrungsschatz, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls herzlich bei Frau Claudia Bergow, Frau Sieglinde Hirmer und Frau Karin Begsteiger, die im Zweifelsfalle immer weiterwussten, und bei allen Doktoranden der AG Erben, die mir meine doch nicht allzu kurze Zeit am Institut für Physiologie unvergesslich gemacht haben.

Ohne Euch wäre die AG Erben nicht das, was sie ist!

Für die Lehrstunde in der Technik der Schwanzveneninjektion danke ich Herrn Prof. Dr. Wolf Erhardt, von der Technischen Universität München (Klinikum Rechts der Isar). Für die Herstellung der Kriechröhren und der Bestrahlungsboxen danke ich Herrn Franz Schmitt.

Für die Versorgung „meiner“ Ratten danke ich Frau Hedviga Opitz und Herrn Fritz Meggen-dorfer.

Für die Ermöglichung der Nutzung des Eldorado an der GSF, Neuherberg, danke ich Herrn Werner Panzer.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich aber bei Carsten und natürlich bei meinen Eltern, die stets für mich da sind und es immer waren. **Danke.**

Lebenslauf

Nina Unger

16. April 1974 geboren in Haselünne im Emsland als Tochter des Dr. Gerd Unger und der Dorothee Unger, geb. Weber
- 1980 – 1984 Besuch der Grundschule im Aischbach, Tübingen
- 1984 – 1993 Besuch der Geschwister – Scholl - Schule, Tübingen
11. Mai 1993 Abitur
- 1993 – 1994 Besuch des Bicton College of Agriculture, Devon, England
24. Juni 1994 National Certificate in the Management of Horses
- bis März 1995 persönliche Studien, Praktika und Reisen
- SoSe 1995 Studium an der Georg – August - Universität Göttingen, Erlangung des Kleinen Latinums
- 1995–2001 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians–Universität München
- Oktober 2001 Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation
26. November 2001 Bestehen der Tierärztlichen Prüfung (Staatsexamen)
23. Januar 2002 Approbation als Tierärztin
23. Juli 2004 Bestehen des Rigorosums