

Neues aus Wissenschaft und Lehre

**Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf 2008/2009**

Heinrich Heine
HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF



d|u|p

düsseldorf university press

**Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
2008/2009**

**Jahrbuch der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
2008/2009**

**Herausgegeben vom Rektor
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Univ.-Prof. Dr. Dr. H. Michael Piper**

**Konzeption und Redaktion:
Univ.-Prof. em. Dr. Hans Süßmuth**

d|u|p

© düsseldorf university press, Düsseldorf 2010
Einbandgestaltung: Monika Uttendorfer
Titelbild: Leben auf dem Campus
Redaktionsassistentz: Georg Stüttgen
Beratung: Friedrich-K. Unterweg
Satz: Friedhelm Sowa, L^AT_EX
Herstellung: WAZ-Druck GmbH & Co. KG, Duisburg
Gesetzt aus der Adobe Times
ISBN 978-3-940671-33-2

Inhalt

Vorwort des Rektors	13
Gedenken	15
Hochschulrat	17
ULRICH HADDING und ERNST THEODOR RIETSCHEL 18 Monate Hochschulrat der Heinrich-Heine-Universität: Sein Selbstverständnis bei konkreten, strategischen Entscheidungsvorgängen	19
Rektorat	25
H. MICHAEL PIPER Ein Jahr des Aufbruchs	27
Medizinische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	33
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	35
JOACHIM WINDOLF (Dekan) Bericht der Medizinischen Fakultät	41
MALTE KELM, MIRIAM CORTESE-KROTT, ULRIKE HENDGEN-COTTA und PATRICK HORN Stickstoffmonoxid und Nitrit als Mediatoren im kardiovaskulären System: Synthesewege, Speicherformen und Wirkmechanismen	49
JULIA SZENDRÖDI und MICHAEL RODEN Die Bedeutung der mitochondrialen Funktion für die Entstehung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes	63
BETTINA POLLOK, MARKUS BUTZ, MARTIN SÜDMEYER, LARS WOJTECKI und ALFONS SCHNITZLER Funktion und Dysfunktion motorischer Netzwerke	81
WOLFGANG JANNI, PHILIP HEPP und DIETER NIEDERACHER Der Nachweis von isolierten Tumorzellen in Knochenmark und Blut von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom – Standardisierte Methodik und klinische Relevanz	95
ROBERT RABENALT, VOLKER MÜLLER-MATTHEIS und PETER ALBERS Fortschritte in der operativen Behandlung des Prostatakarzinoms	111

MARCUS JÄGER, CHRISTOPH ZILKENS und RÜDIGER KRAUSPE Neue Materialien, neue Techniken: Hüftendoprothetik am Anfang des 21. Jahrhunderts	121
CHRISTIAN NAUJOKS, JÖRG HANDSCHEL und NORBERT KÜBLER Aktueller Stand des osteogenen Tissue-Engineerings.....	137
ULLA STUMPF und JOACHIM WINDOLF Alterstraumatologie: Herausforderung und Bestandteil der Zukunft in der Unfallchirurgie	153
ALFONS LABISCH Die säkularen Umbrüche der Lebens- und Wissenschaftswelten und die Medizin – Ärztliches Handeln im 21. Jahrhundert	161
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät	
<i>Dekanat</i>	175
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	177
ULRICH RÜTHER (Dekan) Die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät im Jahr 2008/2009	181
FRITZ GRUNEWALD Primzahlen und Kryptographie	185
WILLIAM MARTIN Hydrothermalquellen und der Ursprung des Lebens	203
PETER WESTHOFF C4-Reis – Ein Turbolader für den Photosynthesemotor der Reispflanze	217
MICHAEL BOTT, STEPHANIE BRINGER-MEYER, MELANIE BROCKER, LOTHAR EGGELING, ROLAND FREUDL, JULIA FRUNZKE und TINO POLEN Systemische Mikrobiologie – Etablierung bakterieller Produktionsplattformen für die Weiße Biotechnologie	227
SUSANNE AILEEN FUNKE und DIETER WILLBOLD Frühdiagnose und Therapie der Alzheimerschen Demenz	243
ECKHARD LAMMERT Die Langerhanssche Insel und der Diabetes mellitus	251
THOMAS KLEIN Was kann man von der Fliegenborste lernen?	261
REINHARD PIETROWSKY und MELANIE SCHICHL Mittagsschlaf oder Entspannung fördern das Gedächtnis	275
PETER PROKSCH, SOFIA ORTLEPP und HORST WEBER Naturstoffe aus Schwämmen als Ideengeber für neue <i>Antifouling</i> -Wirkstoffe	281

STEPHAN RAUB, JENS ECKEL, REINHOLD EGGER und STEPHAN OLBRICH Fortschritte in der Forschung durch Hochleistungsrechnen – Kooperation von IT-Service, Informatik und Physik	291
Philosophische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	305
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	307
HANS T. SIEPE (Dekan) Die Philosophische Fakultät im Spiegel der Publikationen ihrer Mitglieder	309
BRUNO BLECKMANN Römische Politik im Ersten Punischen Krieg	315
RICARDA BAUSCHKE-HARTUNG Minnesang zwischen Gesellschaftskunst und Selbstreflexion im Alter(n)sdiskurs – Walthers von der Vogelweide „Sumerlaten“-Lied	333
HENRIETTE HERWIG Altersliebe, Krankheit und Tod in Thomas Manns Novellen <i>Die Betrogene</i> und <i>Der Tod in Venedig</i>	345
ROGER LÜDEKE Die Gesellschaft der Literatur. Ästhetische Interaktion und soziale Praxis in Bram Stokers <i>Dracula</i>	361
SIMONE DIETZ Selbstdarstellungskultur in der massenmedialen Gesellschaft	383
MICHIKO MAE Integration durch „multikulturelle Koexistenz“, durch „Leitkultur“ oder durch eine „transkulturelle Partizipationsgesellschaft“?	393
Wirtschaftswissenschaftliche Fakultät	
<i>Dekanat</i>	411
<i>Neu berufene Professorinnen und Professoren</i>	413
GUIDO FÖRSTER (Dekan) und DIRK SCHMIDTMANN Auswirkungen des Bilanzrechtsmodernisierungsgesetzes auf die steuerliche Gewinnermittlung	415
HEINZ-DIETER SMEETS Finanzkrise – Schrecken ohne Ende?	433
PETER LORSCHIED Praxisorientierte Besonderheiten der Statistik im Düsseldorfer Bachelorstudiengang „Betriebswirtschaftslehre“	457

Juristische Fakultät

Dekanat 467

DIRK LOOSCHELDERS (Dekan)

Neuregelung der Obliegenheiten des Versicherungsnehmers
durch das Versicherungsvertragsgesetz 2008 469

HORST SCHLEHOFER

Die hypothetische Einwilligung – Rechtfertigungs-
oder Strafrechtsausschließungsgrund für einen ärztlichen Eingriff? 485

ANDREW HAMMEL

Strategizing the Abolition of Capital Punishment
in Three European Nations 497

Partnerschaften der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

JIRÍ PEŠEK

Die Partnerschaft zwischen der Karls-Universität Prag
und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 513

**Gesellschaft von Freunden und Förderern der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e.V.**

OTHMAR KALTHOFF

Jahresbericht 2008 525

GERT KAISER und OTHMAR KALTHOFF

Die wichtigsten Stiftungen der Freundesgesellschaft 527

Forscherguppen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

KLAUS PFEFFER

Die Forschergruppe 729
„Anti-infektiöse Effektorprogramme: Signale und Mediatoren“ 535

PETER WERNET und GESINE KÖGLER

Die DFG-Forschergruppe 717 „Unrestricted Somatic Stem Cells from Hu-
man Umbilical Cord Blood (USSC)“/„Unrestringierte somatische Stamm-
zellen aus menschlichem Nabelschnurblut“ 545

Beteiligungen an Forschungsgruppen

DIETER BIRNBACHER

Kausalität von Unterlassungen – Dilemmata und offene Fragen 565

Sofja Kovalevskaja-Preisträger

KARL SEBASTIAN LANG

Das lymphozytäre Choriomeningitisvirus – Untersucht mittels eines
Mausmodells für virusinduzierte Immunpathologie in der Leber 583

Graduiertenausbildung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- SONJA MEYER ZU BERSTENHORST, KARL-ERICH JAEGER und
JÖRG PIETRUSZKA
CLIB-Graduate Cluster Industrial Biotechnology:
Ein neuer Weg zur praxisnahen Doktorandenausbildung 597
- JOHANNES H. HEGEMANN und CHRISTIAN DUMPITAK
Strukturierte Promotionsförderung in der Infektionsforschung durch die
Manchot Graduiertenschule „Molecules of Infection“ 607

Nachwuchsforschergruppen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- ULRICH HEIMESHOFF und HEINZ-DIETER SMEETS
Empirische Wettbewerbsanalyse 623
- WOLFGANG HOYER
Selektion und Charakterisierung von Bindeproteinen
für amyloidogene Peptide und Proteine 631

Interdisziplinäre Forscherverbände an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- ULRICH VON ALEMANN und ANNIKA LAUX
Parteimitglieder in Deutschland.
Die Deutsche Parteimitgliederstudie 2009 641
- JULIA BEE, REINHOLD GÖRLING und SVEN SEIBEL
Wiederkehr der Folter? Aus den Arbeiten einer interdisziplinären Studie
über eine extreme Form der Gewalt, ihre mediale Darstellung und ihre
Ächtung 649
- KLAUS-DIETER DRÜEN und GUIDO FÖRSTER
Düsseldorfer Zentrum für
Unternehmensbesteuerung und -nachfolge 663
- KLAUS-DIETER DRÜEN
Der Weg zur gemeinnützigen (rechtsfähigen) Stiftung –
Stiftungszivilrechtliche Gestaltungsmöglichkeiten
und steuerrechtliche Vorgaben 665
- GUIDO FÖRSTER
Steuerliche Rahmenbedingungen für Stiftungsmaßnahmen 677

Kooperation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und des Forschungszentrums Jülich

- ULRICH SCHURR, UWE RASCHER und ACHIM WALTER
Quantitative Pflanzenwissenschaften – Dynamik von Pflanzen
in einer dynamischen Umwelt am Beispiel der Schlüsselprozesse
Photosynthese und Wachstum 691

Ausgründungen aus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

DETLEV RIESNER und HANS SÜSSMUTH

Die Gründung des Wissenschaftsverlags *düsseldorf university press
GmbH* 709

Zentrale Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zentrale Universitätsverwaltung

JAN GERKEN

Der Umstieg auf das kaufmännische Rechnungswesen:
Die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nutzt als
Vorreiter die Chancen der Hochschulautonomie 729

Universitäts- und Landesbibliothek

IRMGARD SIEBERT

Sammelleidenschaft und Kulturförderung.
Die Schätze der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf 737

GABRIELE DREIS

Das Kulturgut Buch für die Zukunft bewahren:
Bestandserhaltung in der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf ... 751

Zentrum für Informations- und Medientechnologie

MANFRED HEYDTHAUSEN und ROBERT MONSER

Die Entwicklung eines Portals für
die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 769

STEPHAN RAUB, INGO BREUER, CHRISTOPH GIERLING und STEPHAN
OLBRICH

Werkzeuge für Monitoring und Management von Rechenclustern –
Anforderungen und Entwicklung des Tools <myJAM/> 783

Sammlungen in der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf

KATHRIN LUCHT-ROUSSEL

Die Düsseldorfer Malerschule in der
Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf 795

Ausstellungen

ANDREA VON HÜLSEN-ESCH

Jüdische Künstler aus Osteuropa und die
westliche Moderne zu Beginn des 20. Jahrhunderts 813

JENS METZDORF und STEFAN ROHRBACHER

„Geschichte in Gesichtern“ 827

Geschichte der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

SVENJA WESTER und MAX PLASSMANN

Die Aufnahme des klinischen Unterrichts an der
Akademie für praktische Medizin im Jahr 1919 853**Forum Kunst**

HANS KÖRNER

Frömmigkeit und Moderne.
Zu einem Schwerpunkt in Forschung und Lehre
am Seminar für Kunstgeschichte 865**Chronik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

ROLF WILLHARDT

Chronik 2008/2009 897

Campus-Orientierungsplan 919**Daten und Abbildungen aus dem
Zahlenspiegel der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf** 925**Autorinnen und Autoren** 937

PETER WERNET und GESINE KÖGLER

**Die DFG-Forschergruppe 717 „Unrestricted Somatic Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood (USSC)“/
„Unrestringierte somatische Stammzellen aus
menschlichem Nabelschnurblut“**

Einleitung

In den letzten Jahren hat die Stammzellforschung beachtliche Fortschritte gemacht, und einige der Signalwege, die für die Stammzellentwicklung wichtig sind, konnten aufgeklärt werden. So wurde es offensichtlich, dass eher ein komplexes Orchester von Signalkaskaden als individuelle Signalwege die Stammzellspezifikation, -expansion und -differenzierung kontrollieren und regulieren. Bestimmte Signalwege können sich gegenseitig aktivieren, hemmen oder modulieren, wodurch unterschiedliche biologische Antworten hervorgerufen werden. Daher ist es essenziell, die wesentlichen Schüsselschalter im Netzwerk solcher Signalwege zu identifizieren, die Pluripotenz kontrollieren sowie das jeweilige Differenzierungspotenzial und Schicksal eines bestimmten Stammzelltyps zu einem bestimmten Zeitpunkt und an einem bestimmten Ort festlegen. Um dieses Ziel zu erreichen, sollte eine funktionale und molekulare Definition des biologischen Potenzials der Stammzelle *in vitro* und *in vivo* in Kombination mit modernen Methoden erfolgen, um damit deren funktionelles, genomisches und proteomisches Arsenal beurteilen zu können sowie kritische Kandidatenmoleküle zu identifizieren.

Generell zeigt die Erfahrung, dass es hilfreich ist, mit Zellkulturexperimenten an gut definierten Stammzellkandidaten zu beginnen. Dies hat auch in unserem Beispiel zur Aufklärung der Funktion von Kandidatenfaktoren mit Relevanz für Pluripotenz und/oder Differenzierungspotenzial geführt. Solche Experimente erlauben, den Einfluss multipler Faktoren auf das Schicksal der Zellen in definierten, aber veränderbaren Kontexten zu untersuchen. Im vorliegenden Beispiel hat dieser Ansatz zur Entdeckung einer intrinsischen unrestringierten somatischen Stammzellpopulation (USSC) im menschlichen Nabelschnurblut und deren Differenzierungspotenzial in Zelltypen aller drei Keimblätter geführt. Auf der Basis einer regelmäßigen Versorgung mit frischem Nabelschnurblut durch unsere José Carreras Cord Blood Bank am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika konnte ein gemeinsamer Forschungsfokus initiiert werden, um grundlegende Fragen bezüglich der USSC zu klären, wie die zelluläre Homogenität sowie funktionale und molekulargenetische Analysen auf klonaler Ebene einschließlich ihres entsprechenden Differenzierungspotenzials in gut definierten perinatalen und postnatalen Tiermodellen.

Mit der USSC waren wir in der Lage, einen frühen somatischen Stammzellkandidaten zu identifizieren, der *in vitro* zu großen Zellzahlen expandiert werden kann, ohne spontane Differenzierung zu zeigen. Mehr noch bewies die USSC im Entwicklungstiermodell des

präimmunen fötalen Schafes und/oder im Maus-Verletzungsmodell ihr einzigartiges Potenzial, je nach der entsprechenden biologischen Nische in Osteoblasten, Chondroblasten, hämatopoetische Zellen, Kardiomyozyten sowie Leber- und Nervenzellen, also Zelltypen aller drei Keimblätter, zu differenzieren. Das mögliche Phänomen von Zellfusionen konnte dabei experimentell ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu anderen Stammzellquellen haben die USSC lange Telomere und ein hohes proliferatives Potenzial, das eine außergewöhnliche Expansion der Zellen *in vitro* erlaubt, ohne dass sie ihr Differenzierungspotenzial spontan verlieren oder karyotypische Abnormitäten auftreten. In keinem bisher eingesetzten Tiermodell konnte eine Tumorbildung der USSC beobachtet werden. Die wichtige Frage nach der Klonalität, nämlich ob diese verschiedenen Zelltypen aus einem oder mehreren Progenitoren hervorgehen, konnte überzeugend durch lentivirale Markierung der USSC, Klonierung und Integrationsanalyse geklärt werden. Diese Untersuchungen bestätigten, dass die USSC als klonale Zelle existiert und *in vitro* in mesodermale, ektodermale und endodermale Zelltypen differenziert. Abbildung 1 dokumentiert dieses Ergebnis, indem sie die Existenz von multipotenten USSC als eine individuelle Zelle und nicht als eine Mischung unterschiedlicher Ausgangszellpopulationen beweist.

Die USSC wurde in einem Kommentar der Fachzeitschrift *Science* als einer von vier international akzeptierten somatischen Stammzellkandidaten aufgeführt, die das Potenzial besitzen, eine Vorreiterrolle für die Stammzellbiologie und -therapie zu übernehmen.¹

Wie aus den spezifischen USSC-Publikationen ersichtlich wird, die in unseren entsprechenden Projekten zitiert werden, wurde die systematische Reproduzierbarkeit unserer ersten Publikation² in verschiedenen experimentellen Ansätzen bewiesen.

Inzwischen haben mindestens drei andere Gruppen über nichthämatopoetische Stammzellkandidaten aus Nabelschnurblut veröffentlicht. Dadurch wurde unsere erste Entdeckung der USSC von anderen Forschern gut reproduziert und bestätigt. Unsere DFG-Gruppe stellt sich diesem internationalen Wettbewerb.

Ein wichtiges Ziel unserer Forschergruppe ist der Vergleich der USSC zum biologischen Potenzial und den genetischen Regulationsmechanismen humaner embryonaler Stammzellen (huES). Wegen der existierenden legalen Beschränkungen in Deutschland werden die Experimente mit intakten huES von Kollegen im Ausland durchgeführt.

Bis jetzt waren solche vergleichenden Experimente in Düsseldorf nur in einem sehr beschränkten Maße über eine Versorgung mit selektiven RNA-Präparationen einer klassischen huES durch den Kollegen Oliver Brüstle aus Bonn möglich. Aufgrund vielversprechender vorausgegangener Resultate wird diese Zusammenarbeit zwischen Bonn und unserer Forschergruppe weiter ausgebaut. Dabei liefert die gut etablierte und erfolgreiche Zusammenarbeit mit dem Stammzellnetzwerk Nordrhein-Westfalen Ideen und einzigartige Reagenzien sowie neue Methoden, die dem wissenschaftlichen Hauptziel unserer USSC-fokussierten Forschergruppe dienen. Dies wird weiterhin dokumentiert mit dem A3-Projekt, wodurch unsere Forschergruppe durch die enge Zusammenarbeit und den Input mit dem Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie am Max-Planck-Institut für

¹ Vgl. Holden (2007).

² Vgl. Kögler *et al.* (2004).

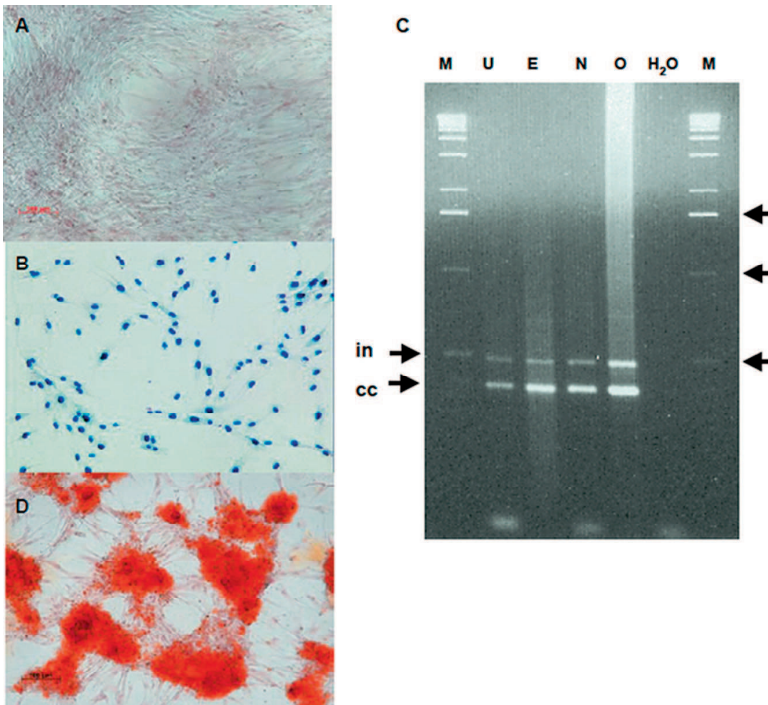


Abb. 1: Nachweis der Klonalität der USSC mittels lentiviraler Markierung; **A**: Morphologie unbehandelter USSC (10x); **B**: homogene LacZ-Überexpression (blau) in lentiviral transduzierten USSC (Klon 4) (10x); **C**: Nachweis der Klonalität von USSC-Klon4 durch LM-PCR. Genomische DNA von undifferenzierten (**U**), von endodermal differenzierten (**E**), von neuronal differenzierten (**N**) und von osteodifferenzierten (**O**) USSC-Klon-4-Zellen wurden mit Hilfe der LM-PCR analysiert und dann die PCR-Produkte auf einem 1,5-Prozent-Agarosegel separiert. **H₂O**: Wasserkontrollen, **M**: 1kb-Leiter. Das 381-bp-interne Kontrollfragment (**cc**) sowie das 490-bp-genomische Integrationsstellenfragment (**in**) sind angezeigt. **(D)** Differenzierung von Klon 4 in Osteoblasten wird gezeigt durch Anfärbung mit Alizarin-Rot.

Molekulare Biomedizin in Münster befruchtet und zugleich einer kritischen Bewertung unterzogen wird.

Für weitere *In-vivo*-Experimente mit der klonal charakterisierten USSC kooperiert die Forschergruppe mit den folgenden international gut bekannten Laboratorien:

- Arnold Caplan, Cleveland, für osteogene und chondrogene Differenzierung und Regenerierung im Rattenmodell;
- John Dick, Toronto, für osteogene und hämatopoetische Differenzierung sowie das potenzielle Auftreten von Tumorzellen im huNOD/SCID-Mausmodell;
- Esmail D. Zanjani, Reno, für die Fortführung des wichtigen großen Tiermodells des präimmunen fötalen Schafes.

Auf dem Gebiet der genetischen Faktoren, die die molekulare Regulation von Stammzellerhaltung und Differenzierung der USSC bestimmen, arbeiten die Projekte A4 und A5 seit längerem erfolgreich mit den folgenden Laboratorien zusammen:

- Ihor Lemischka, Princeton, für Transkriptionsfaktorenanalyse und *Signaling* sowie Ansätze einer molekularen Systembiologie;
- Thomas Tuschl, New York, für RNA-Biologie und microRNA-Analyse;
- Nicolaus Rajewsky, Berlin, für rechnerische und biomathematische Analyse der microRNA-Daten;
- James Adjaye, R. Herzog und Hans Lerach, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin, für objektorientiertes *Modeling* und Simulation zellulärer Prozesse;
- Thomas Jenuwein, Wien, für Marker für Analysen von Chromatinmodifikationen.

Ziele der DFG-Forschergruppe 717

Der Identifikation und initialen Charakterisierung dieser einzigartigen Stammzellpopulation (USSC) aus Nabelschnurblut folgend, fokussieren sich alle Projekte gemeinsam auf die systematische funktionale und molekulare Analyse dieses neuen Zelltyps.

Die Priorität liegt in der exakten Definition der Stammzeleigenschaften und der funktionalen und molekulargenetischen Regulationsmechanismen, mit der die Selbsterneuerung und das Differenzierungspotenzial für alle drei Keimblätter balanciert werden. Dies ist die Aufgabe der Projekte Z, A1, A2 und A3.

Ebenso wichtig ist die Frage, wie die spezifischen Stammzeleigenschaften genetisch reguliert werden. Für deren Beantwortung stellt ein gut definiertes fötales Stammzellsystem wie die USSC ein einzigartiges Werkzeug dar. Die Aufklärung der jeweiligen molekularen Untersuchungen ist nur so gut wie die biologische Definition der Zelle. USSC stellt eine solche Stammzellpopulation dar, da sie homogen in großen Mengen zur Verfügung gestellt werden kann (Selbsterneuerung), ethisch unproblematisch und in Form von klonalen Populationen verfügbar ist. Die molekularbiologischen Aspekte der USSC werden von den Projekten A3, A4 und A5 gemeinsam mit dem Projekt Z analysiert, das die Zellen und *Read-out*-Systeme zur Verfügung stellt.

Projekte

Projekt Z: Erzeugung und funktionelle Charakterisierung von Differenzierungswegen der USSC (Univ.-Prof. Dr. Gesine Kögler)

Z-Projekt – Mehr als nur zentraler Service

Im Rahmen der Forschergruppe ist es Aufgabe des Z-Projekts, allen beteiligten Arbeitsgruppen standardisiert generierte und funktionell charakterisierte USSC zur Verfügung zu stellen und gleichzeitig eine Hierarchie dieser nichthämatopoetischen Stammzellen zu definieren.

Um dies zu gewährleisten, arbeiten die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Z-Projekts an der Optimierung der Kulturbedingungen und an der Etablierung von *Read-out*-Systemen zur Beurteilung des Differenzierungspotenzials. Im Rahmen des Z-Projekts werden

mit Hilfe des Aviso CellCelectors klonale Zellpopulationen generiert und analysiert, die den anderen Gruppen der Forschergruppe 717 ebenfalls zur Verfügung stehen. Wissenschaftliches Ziel des Z-Projekts ist vor allem die weitere funktionelle Charakterisierung von Stammzellpopulationen und Subpopulationen im Nabelschnurblut und das Definieren einer Hierarchie dieser Zellen.

Die Z-Projekt-Forschungsgruppe um Univ.-Prof. Dr. Gesine Kögler setzt sich aus Dr. Anja Buchheiser als Postdoc, Simone Maria Kluth und Simon Waclawczyk als naturwissenschaftlichen Doktoranden sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen Aurelie Lefort und Daniela Stapelkamp zusammen. Darüber hinaus wird das Z-Projekt von Dr. Stefanie Liedtke, Dr. Thorsten Trapp und derzeit vier weiteren naturwissenschaftlichen Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe Kögler unterstützt. Seit Bestehen der Forschergruppe wurden in der Gruppe fünf Diplomarbeiten und eine Masterarbeit im Fach Biologie sowie eine Masterarbeit im Fach Biochemie und eine medizinische Doktorarbeit erfolgreich abgeschlossen.

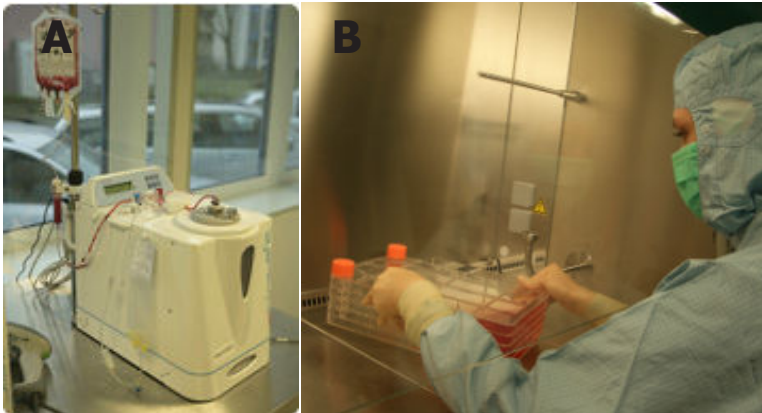


Abb. 2: USSC-Generierung unter GMP-Bedingungen; **A**: Sepax-Gerät zur vollautomatischen MNC-Gewinnung aus Nabelschnurblut; **B**: Kultivierung der USSC im Reinraum. Zur Zellexpansion werden anstelle üblicher Zellkulturflaschen so genannte *Cell Stacks* benutzt.

Nachdem die Arbeitsgruppe um Univ.-Prof. Dr. Gesine Kögler über langjährige Erfahrung in der Generierung von USSC verfügt,³ wurde inzwischen die USSC-Generierung unter GMP⁴-Bedingungen etabliert.⁵ Zellgewinnung, Passage und Kultur finden in weitgehend geschlossenen Systemen statt. Mit Hilfe des Sepax-Gerätes (Abb. 2A) werden aus dem Nabelschnurblut vollautomatisch MNC⁶ isoliert, die zur USSC-Generierung eingesetzt werden. Die USSC-Kultivierung im so genannten *Cell-Stack-System* (*Corning*) (Abb. 2B) ermöglicht das Kultivieren großer Zellmengen. Innerhalb von nur vier Passagen können aus einer einzelnen Primärkolonie bis zu 1×10^9 Zellen generiert werden. Durch

³ Vgl. Kögler *et al.* (2004).

⁴ *good manufacturing practice*

⁵ Vgl. Radke *et al.* (2007).

⁶ *mononuclear cells*

hypoxische Kulturbedingungen (fünf Prozent O₂) konnte das Wachstum nicht weiter verbessert werden. Allerdings sind neben großen Zellmengen auch klonale Zellpopulationen gefragt.

Mit dem Aviso CellCelector wurden inzwischen über 1.000 Klone aus USSC und CB MSC⁷ generiert. Inzwischen wird das Gerät auch eingesetzt, um die vom Teilprojekt A3 generierten USSC-IPSC⁸ zu passagieren (Abb. 3).

Die aus USSC reprogrammierten Zellen werden im Labor auf mit Mitomycin behandelten USSC kultiviert und im Vergleich zu ihrer Ausgangs-USSC-Linie auf ihre biologischen Eigenschaften wie das Differenzierungspotenzial, die Expression von Stammzellmarkern oder die Telomerlängen⁹ hin untersucht. In Kooperation mit den Teilprojekten A1 und A2 wird untersucht, wie sich das Differenzierungspotenzial von IPSC und USSC unterscheidet.

Die große Anzahl an unterschiedlichen Stammzelllinien aus Nabelschnurblut und korrespondierenden klonalen Populationen macht es möglich, eine Hierarchie beziehungsweise Unterschiede zwischen den verschiedenen Stammzellpopulationen zu zeigen.¹⁰ Die Auswertung von Microarray-Analysen und quantitativen PCR ergab, dass unter anderem die Expression von spezifischen HOX-Genen genutzt werden kann, um USSC von CB MSC zu unterscheiden. Die USSC ähneln aufgrund der eingeschränkten Expression von HOX-Genen eher den embryonalen Stammzellen, wo hingegen CB MSC ein vergleichbares HOX-Expressionsmuster wie adulte mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark aufweisen. Obwohl in manchen wissenschaftlichen Arbeiten so genannte *embryonic-like stem cells* im Nabelschnurblut beschrieben wurden,¹¹ wurden darauf keine Hinweise gefunden. Weder in etablierten USSC und CB-MSC-Linien noch in primären Kolonien, klonalen Populationen, MNC-, CD34+- oder unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen werden die embryonalen Stammzellmarker OCT4, NANOG, SOX2 oder hTERT exprimiert.¹²

Dennoch sind Stammzellen aus dem Nabelschnurblut multipotent. Adipogenes, chondrogenes, osteogenes, aber auch neurales und hepatogenes Differenzierungspotenzial werden vom Z-Projekt analysiert¹³ und mit dem Differenzierungsspektrum der IPSC verglichen. Das Z-Projekt arbeitet an der Optimierung der Differenzierungsprotokolle; der Einfluss hypoxischer Kulturbedingungen ist dabei ein wesentlicher Aspekt. Veränderungen im Genexpressionsmuster während und nach der Differenzierung geben Aufschluss über beteiligte *Pathways* und den Grad der Differenzierung. Darüber hinaus sind wir aber auch an funktionellen *Read-outs* interessiert. So konnte zum Beispiel in Kooperation mit dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie (Projekt A1) mit Hilfe von ¹³C-NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass endodermal differenzierte USSC tatsächlich Glykogen synthetisieren und Glukoneogenese betreiben. In Kooperation mit den Instituten für Neurologie und für Neuro- und Sinnesphysiologie (Projekt A2) arbeiten wir an der neuro-

⁷ *cord blood mononuclear cells*

⁸ *induced pluripotent stem cells*

⁹ Vgl. Houben *et al.* (2008).

¹⁰ Vgl. Buchheiser *et al.* (2009).

¹¹ Vgl. McGuckin *et al.* (2005).

¹² Vgl. Liedtke *et al.* (2008), Liedtke *et al.* (2007) sowie Buchheiser *et al.* (2008).

¹³ Vgl. Kögler *et al.* (2004), Sensken *et al.* (2007) sowie Greschat *et al.* (2008).

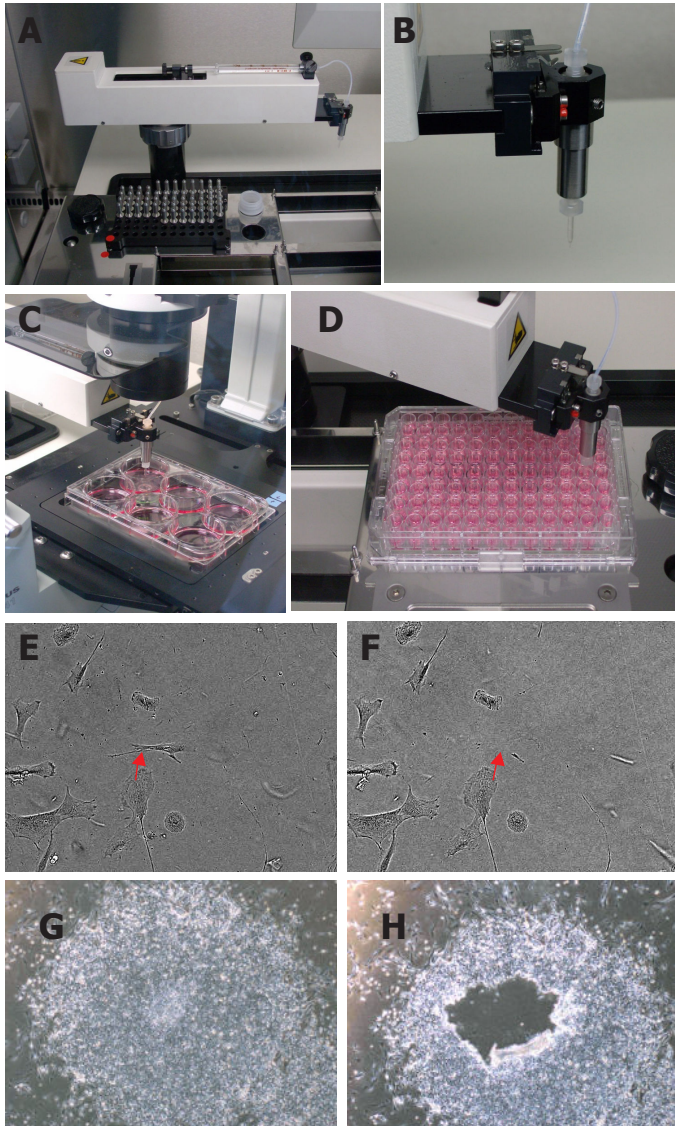


Abb. 3: Generierung von Klonen mit dem Aviso CellSelector. Es handelt sich um ein Robotersystem mit einem inversen Mikroskop, das über eine Kamera mit einem Monitor zur direkten Bildübertragung gekoppelt ist. An einem steuerbaren Roboterarm (A) ist eine Glaskapillare befestigt (B), mit der einzelne Zellen aus einer Population isoliert (C) und einzeln abgelegt werden können (D). Die Auswahl der Zellen kann sowohl manuell als auch automatisch anhand vordefinierter Parameter wie Größe, Form oder Fluoreszenzsignal erfolgen. Der erfolgreiche Pickvorgang wird fotografisch dokumentiert. USSC vor (E) und nach dem Picken (F); iPSC-Kolonie aus USSC vor (G) und nach dem Picken (H).

len Differenzierung der USSC und USSC-IPSC. Die Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Molekulare Biomedizin in Münster (Projekt A3) führte nicht nur zur erfolgreichen Reprogrammierung von USSC, sondern brachte uns auch das technische Know-how im Umgang mit humanen pluripotenten Stammzellen. Innerhalb der Forschergruppe werden die USSC-IPSC in Zukunft sicherlich einen hohen Stellenwert einnehmen und analog zur USSC intensiv untersucht werden.

Projekt A1: *In-vivo*-Differenzierungspotenzial der USSC – Perinatale und postnatale Analyse des Differenzierungspotenzials von USSC (Univ.-Prof. Dr. Jürgen Schrader)

Dieses Projekt fokussiert sich auf ein Rattenmodell kardialer Regeneration, um das regenerative Potenzial der USSC in diesem wichtigen Verletzungsmodell zu analysieren. Das A1-Projekt erhält Zellen vom Z-Projekt und stellt Ergebnisse über USSC sowie Subpopulationen bezüglich ihres Differenzierungspotenzials dem Z-Projekt zur Verfügung. Der Projektleiter ist fachlich in der kardialen Regeneration sehr ausgewiesen. Ein spezielles enges Feedback über die bestimmten Differenzierungsstadien der USSC, die hier im *In-vivo*-Herzinfarktmodell an der Ratte eingesetzt werden, erfolgt zu den anderen funktionsorientierten Projekten A2 und A3.

Obwohl die Stammzellbiologie der USSC vielleicht ein wichtiges Potenzial für eine neue Ära zellbasierter Therapien darstellt, befindet sich die translationelle Entwicklung der Stammzellforschung für Herz- und Kreislaufkrankheiten auf einer vergleichsweise primitiven Stufe. Um das experimentelle Potenzial der USSC in dieser Hinsicht voll ausschöpfen zu können, wurde gemeinsam mit Professor Wernet eine enge Zusammenarbeit mit Professor Kenneth Chien vom Cardiovascular Research Center des Massachusetts General Hospital und Professor Lee Rubin vom Harvard-Stammzellinstitut in Boston etabliert. Da das Herz ein Mosaik aus Zellen von unterschiedlichen Progenitorpopulationen ist, sollen in Analogie zur gut untersuchten hämatopoetischen Zelldifferenzierungskaskade die Differenzierungspotenziale der USSC und im Vergleich dazu der USSC-IPSC (in Zusammenarbeit mit Projekt A3) ausgelotet werden.

Projekt A2: Das neurale Differenzierungspotenzial multipotenter Stammzellen aus menschlichem Nabelschnurblut (Univ.-Prof. Dr. Hans Werner Müller, Molekulare Neurobiologie, Neurologische Klinik; Univ.-Prof. Dr. Kurt Gottmann, Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie; Univ.-Prof. Dr. Christine Rose, Institut für Neurobiologie)

Die Transplantation ethisch unbedenklicher adulter Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut (USSC) bietet einen interessanten und vielversprechenden Ansatz zur Unterstützung der Reparatur und Regeneration degenerativer und traumatischer Schädigungsprozesse im Nervensystem. Drei neurowissenschaftliche Arbeitsgruppen aus der Medizinischen und Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät untersuchen gemeinsam in diesem Teilprojekt und in enger Zusammenarbeit mit den Projekten A4 und Z das neurale Differenzierungspotenzial, das Migrationsverhalten und die funktionellen Eigenschaften

der USSC in Zellkulturstudien, in organotypischen Hirnschnitten und nach stereotaktischer Implantation in das Zentralnervensystem der Ratte.

Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass USSC *in vitro* unter dem Einfluss geeigneter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren einen neuronalen Differenzierungsweg einschlagen und neuronenspezifische Proteinmarker, wie zum Beispiel die Zytoskelettproteine Neurofilament und β III-Tubulin, Enzyme der Neurotransmitterbiosynthese (Tyrosinhydroxylase) und das Synapsenprotein Synaptophysin exprimieren. Außerdem werden die Neurotransmitter Dopamin und Serotonin von diesen Zellen synthetisiert und freigesetzt.¹⁴

Mit Hilfe von genetisch modifizierten Stammzellen, die stabil das grün fluoreszierende Protein EGFP exprimieren, wird in organotypischen Schnittkulturen aus dem Rattenhippocampus das Differenzierungs-, Migrations- und Integrationsverhalten der EGFP-USSC studiert (Abb. 4).

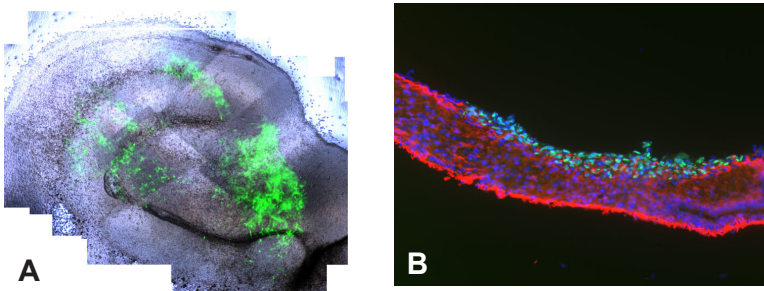


Abb. 4: Transplantierte EGFP-USSC in einer Hirnschnittkultur; **A**: Aufsicht auf eine Hippocampus-Schnittkultur mit EGFP-USSC (grüne Fluoreszenz); **B**: Querschnitt eines hippocampalen Hirnschnitts mit transplantierten USSC (grün), die in den Hirnschnitt einwandern. Kernfärbung blau (DAPI); Neurofilament/Axone (rot) (Abb. von Dipl.-Biol. Jessica Schira)

An diesen Hirnschnittpräparaten untersucht die Gottmann-Gruppe mit Hilfe der Patch-clamp-Technik die Entwicklung elektrophysiologischer Eigenschaften der transplantierten EGFP-USSC. Die funktionelle Integration dieser Zellen in neuronale Netzwerkstrukturen des Hirnschnitts wird im Rose-Labor durch moderne molekulare Imaging-Techniken wie die Messung depolarisationsinduzierter transientser Änderungen intrazellulärer Kalziumkonzentrationen mit Hilfe der Zweiphotonenmikroskopie analysiert.

Im Labor der Arbeitsgruppe Müller ist die stereotaktische Zellimplantation in Gehirn und Rückenmark der Ratte gut etabliert. Darüber hinaus stehen verschiedene Tiermodelle traumatischer Läsionen des Zentralnervensystems zur Verfügung (zum Beispiel Tiermodelle der Querschnittlähmung), an denen *In-vivo*-Studien mit implantierten USSC durchgeführt wurden. Wir konnten zeigen, dass USSC nach Implantation in das intakte Rückenmark der Ratte mindestens drei Wochen überleben, jedoch nicht migrieren und in diesem Zeitraum auch keine neuronale oder gliale Differenzierung aufweisen. Besonders interessant sind jedoch Beobachtungen nach Implantation der USSC in das verletzte Rückenmark. Wurden die Stammzellen außerhalb der Läsionsstelle implantiert, so wanderten sie zielgerichtet an den Verletzungsort und blieben dort für einige Wochen nachweisbar

¹⁴ Vgl. Greschat *et al.* (2008).

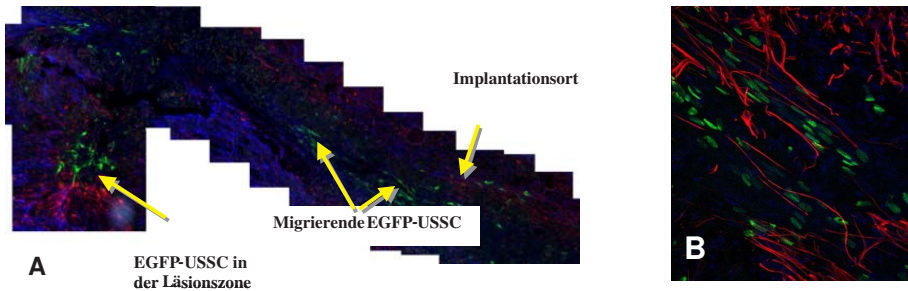


Abb. 5: Implantation der EGFP-USSC-Stammzelle in das verletzte Rückenmark der Ratte; **A**: Stammzellmigration vom Implantationsort zur Läsionsstelle; **B**: Regenerierende Axone (rot) und USSC (grün) am Läsionsort. Zahlreiche Neurofilament-immunpositive Axone (rot) sind drei Wochen nach Läsion und USSC-Implantation in den Verletzungsort eingewachsen. In verletzten Kontrolltieren ohne Stammzellimplantation ist hingegen keine Axonregeneration zu beobachten (hier nicht gezeigt). USSC (grün) sind durch einen Antikörper gegen hNUC identifiziert. (Abb. von Dipl.-Biol. Jessica Schira)

(Abb. 5A). Zu unserer Überraschung regten die Stammzellen die Nervenfasern im verletzten Rückenmark zu einem massiven regenerativen Wachstum an. In Abbildung 5B ist das Einwachsen regenerierender Nervenfasern in das Läsionsgebiet dargestellt.

In Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Trapp vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika wird derzeit mit Hilfe eines speziellen *In-vitro*-Migrationsassays und hochspezifischen Antikörpern das chemoattraktive Signal aus verletztem Rückenmarksgewebe identifiziert, das richtungsgebend ist für die Wanderung der Stammzellen *in vivo*.

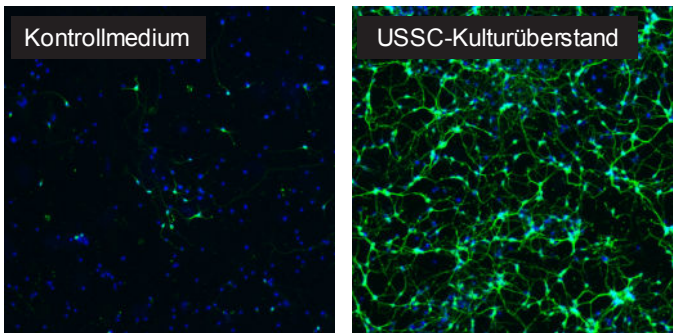


Abb. 6: Einfluss des neurotrophen USSC-Kulturüberstandes auf Hirnneurone. Im Vergleich zu einem serumfreien Kontrollmedium (N2) zeigen Hirnneurone aus dem zerebralen Kortex der Ratte unter dem Einfluss des USSC-Kulturüberstandes verbessertes Überleben und massives Neutritenwachstum. (Abb. von Dipl.-Biol. Jessica Schira)

In weiteren funktionellen Zellkulturstudien mit Neuronen aus dem zentralen und peripheren Nervensystem konnten wir erstmals nachweisen, dass der Kulturüberstand von USSC eine starke neurotrophe Aktivität enthält (Abb. 6), die von den Stammzellen freigesetzt wird und vermutlich im Rückenmark für die Anregung des regenerativen Faser-

wachstums verantwortlich ist. Der oder die neurotrophen Wachstumsfaktoren aus USSC sollen nun näher charakterisiert werden.

Zusammenfassend zeigen unsere Befunde, dass die USSC in Zellen mit neuronalen Eigenschaften (Markerproteine, Neurotransmitter) differenzieren können, dass sie *in vivo* zur Migration fähig sind und neurotrophe Aktivitäten freisetzen, die in Zukunft möglicherweise einen Beitrag zur Verbesserung der Regeneration bei traumatischen Verletzungen des Zentralnervensystems oder degenerativen neurologischen Störungen leisten können.

Projekt A3: *In-vitro*-Keimzellendifferenzierung von USSC (Dr. Holm Zaehres, Univ.-Prof. Dr. Hans R. Schöler, Dr. Tobias Cantz)

Um das Differenzierungsspektrum von nabelschnurblutabgeleiteten USSC auch im Hinblick auf Keimzellen zu untersuchen, sollten USSC unter Bedingungen wie humane embryonale Stammzellen (ES-Zellen) kultiviert und anschließend in Keimbahnzellen differenziert werden.

Mit Bekanntwerden der Möglichkeit zur Induktion einer ES-Zell-assoziierten Pluripotenz in fibroblastoiden Zellen (iPSC) erweiterten wir das Arbeitsprogramm des Projekts A3 um den Aspekt der Reprogrammierung von nabelschnurblutabgeleiteten USSC zu USSC-iPSC. Diese Zellen scheinen in den wesentlichen Aspekten die molekularen Netzwerke der ES-Zell-assoziierten Pluripotenz zu aktivieren, so dass die Plastizität der nativen USSC mit der Pluripotenz von USSC-iPSC analysiert werden kann.

Insgesamt wurden fünf verschiedene USSC-Linien mit retroviralen Vektoren für hOct4, hSox2, hKlf4 und hcMyc¹⁵ transduziert und unter humanen ES-Zellkulturbedingungen kultiviert. Dabei konnten USSC in Zellen mit humaner ES-Morphologie überführt werden (Abb. 7). Immunocytochemische und PCR-Analysen konnten die Reaktivierung der Pluripotenzenmarker Oct4, Sox2 und Nanog in diesen vorher negativen Zellen bestätigen. Weiterhin konnte eine Anschließung der aktiven Form der Telomerase hTert nachgewiesen werden. Microarray-Analysen der globalen Genexpression mit einer Illumina-Plattform am MPI-MBM zeigten die hohe Ähnlichkeit der reprogrammierten Nabelschnurzellen mit humanen ES-Zellen. Am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika konnte die Demethylierung am humanen Oct4-Gen als Nachweis der epigenetischen Reprogrammierung geführt werden (Univ.-Prof. Dr. Markus Uhrberg, Dr. Simon Santourlidis). Zukünftige Untersuchungen werden insbesondere das *In-vitro*-Differenzierungspotenzial sowie das epigenetische Profil der reprogrammierten Nabelschnurblutzellen betreffen. Auch sollen weitere Ausgangspopulationen aus dem Nabelschnurblut zur Reprogrammierung Verwendung finden. Längerfristig ist die immunologische Charakterisierung der reprogrammierten Zellen interessant.

Projekt A4: Einfluss von microRNAs auf die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC) (Univ.-Prof. Dr. Peter Wernet, Dr. Hans-Ingo Trompeter)

MicroRNAs sind im Durchschnitt 22 Nukleotide lange, kleine RNA-Moleküle, die über eine Beeinflussung der Translation einen inhibitorischen Einfluss auf die Proteinbiosynthese

¹⁵ Vgl. Takahashi *et al.* (2007) sowie Zaehres und Daley (2006).

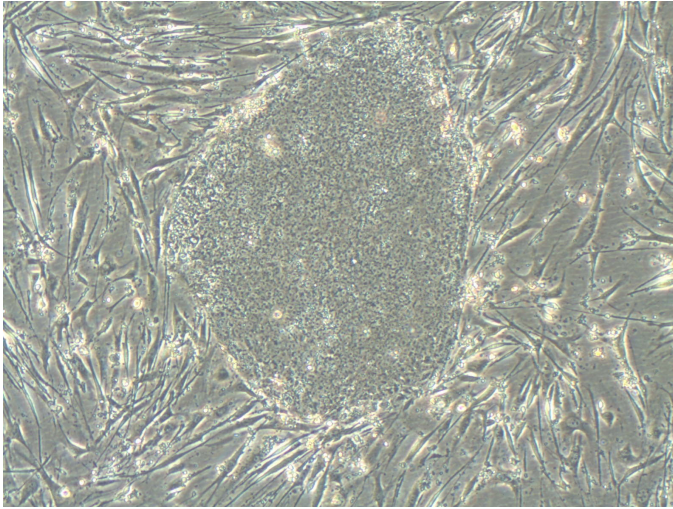


Abb. 7: Induzierte pluripotente Stammzellen aus nabelschnurblutabgeleiteten USSC nach retroviraler Transduktion mit hOct4, hSox2, hKlf4 und hcMYC und weiterer Kultivierung unter humanen ES-Zellkulturbedingungen. Die kompakte Form der USSC-IPSC-Kolonie ist morphologisch von humanen ES-Zellen nicht zu unterscheiden.

ausüben. Dies geschieht sequenzspezifisch über die 3' UTR der jeweiligen messengerRNA (mRNA), und jede microRNA kann die Synthese von bis zu mehreren Hundert Proteinen inhibitorisch beeinflussen. Gleichzeitig kann die Bildung eines jeden Proteins von mehreren microRNAs parallel gehemmt werden. Insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit, Gruppen von Proteinen zu regulieren, stellen microRNAs im Bereich der Stammzellerhaltung und -differenzierung eminent wichtige regulatorische Moleküle dar.

Als ein Beispiel wird die Bedeutung von microRNAs für die Differenzierung von USSC in eine neuronale Richtung dargestellt. Der Expressionsverlauf von 377 microRNAs wurde im Zuge dieser Differenzierung (in Kooperation mit Projekt A2) mit Hilfe einer spezifischen *real-time*-PCR-Analytik (Abb. 8) untersucht.

Dabei zeigte sich, dass in verschiedenen USSC-Linien eine Gruppe von 18 microRNAs konsistent während der Differenzierung in eine neuronale Richtung herunterreguliert wurde. Um die biologische Implikation dieser Beobachtung zu verstehen, wurde mit Hilfe internetbasierter Algorithmen eine Vorhersage potenzieller Zielgene dieser Gruppe von microRNAs durchgeführt. Die Liste dieser Zielgene umfasste knapp 10.000 Proteine, die mit Hilfe von Pathway- und Gene-Ontology-Analysen auf neuronal relevante Proteine hin analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass zum einen für die Neuroentwicklung relevante Proteine wie NEUROD1 oder NBEA (je elf von 18 microRNAs vorhergesagt) zu dem am häufigsten vorhergesagten Zielproteinen gehören, andererseits aber auch Proteine relevanter Pathways wie zum Beispiel AXON GUIDANCE vermehrt als Kandidaten auftauchen (Abb. 9).

Die biologische Konsequenz aus der Herunterregulation von microRNAs besteht in der möglichen Hochregulierung der Expression potenzieller Zielproteine. Um diese bisher nur

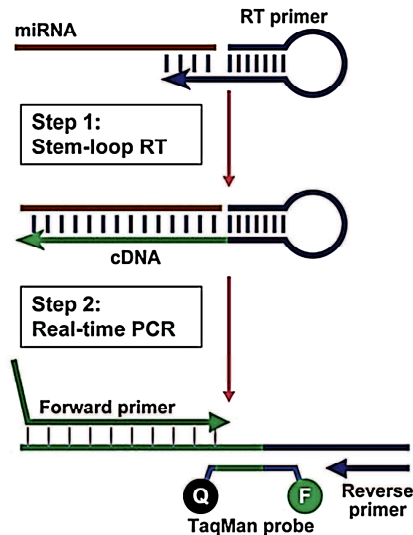


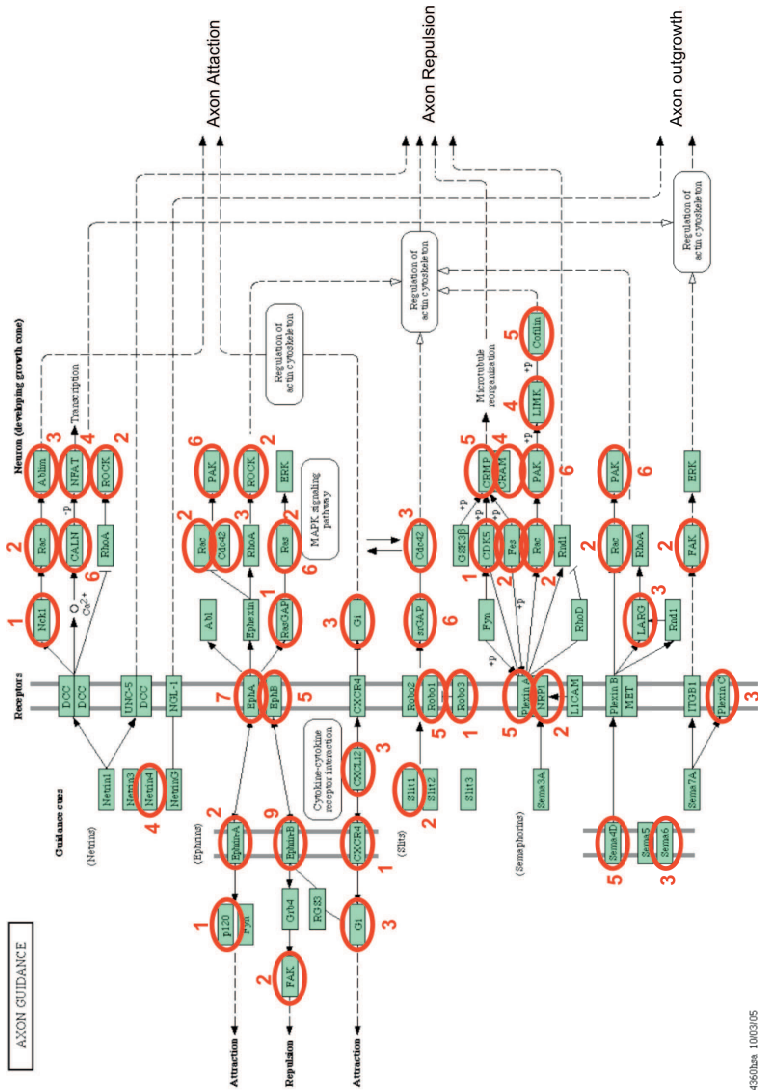
Abb. 8: Ablaufdiagramm der *stem-loop*-RT-PCR zur microRNA-Expressionsanalytik

in silico vorhergesagten microRNA-Zielgen-Beziehungen experimentell zu untermauern, werden derzeit die 3'-UTRs ausgewählter Zielgene in Reporteranalysen auf ihre Reaktion auf exogen zugegebene microRNA-*mimics* hin untersucht. Erste Ergebnisse konnten zum Beispiel deutlich machen, dass NEUROD1 durch hsa-miR-138, eine der am stärksten herunterregulierten microRNAs, inhibiert werden kann.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist festzuhalten, dass im Zuge der Differenzierung von USSC in eine neuronale Richtung ein Set von microRNAs identifiziert werden konnte, dessen Herunterregulation potenziell neuroentwicklungsrelevante Zielproteine in ihrer Expression stärken könnte. Um dies auch auf der mRNA-Ebene festzuhalten und zu bestätigen, wurde in Kooperation mit Dr. James Adjaye, Berlin, eine Gesamtexpressionsanalyse aller mRNAs mittels Illumina-Chip durchgeführt. Diese umfasst sowohl mehrere USSC-Linien nativ als auch neuro- und osteodifferenzierte USSC. Der so generierte umfassende Datensatz erlaubt eine einfache Überprüfung der differentiellen Expression komplexer Proteinnetzwerke, auf die die microRNAs als „Wegweiser“ hindeuten vermögen. Experimente zur funktionalen Bedeutung der herunterregulierten microRNAs im Zuge der Neurodifferenzierung sind derzeit in Planung.

Im Zuge der neuronalen Differenzierung unterliegen die Zellen einem konsequenten Zellzyklusarrest. In der Tat ist unter dem Set herunterregulierter microRNAs eine Familie (miR-17, -20, -106) zu finden, die für die Zellzyklusregulation wichtig ist. Es konnten einige zellzyklusrelevante, antiproliferative Proteine (RBL1, RB1 und so weiter) als Zielgene dieser microRNAs identifiziert; darüber hinaus konnte in einem ersten Versuch gezeigt werden, dass diese microRNAs einen proproliferativen Einfluss auf USSC entfalten.

Weiterhin wurde die differentielle Expression von microRNAs während der Osteodifferenzierung von USSC untersucht. Hierbei war vor allem ein Anstieg der Expression sol-



04560bae_1003105

Abb. 9: Proteine (rot umrandet) des AXON-GUIDANCE-Pathways, die von der Gruppe von 18 herunterregulierten microRNAs potenziell inhibiert werden. Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der microRNAs, die ein Protein potenziell beeinflussen.

cher microRNAs zu beobachten, die diverse Inhibitoren der Osteogenese als potenzielle Zielgene haben. Weitere Untersuchungen hierzu stehen noch aus.

Das humane hämatopoetische Stammzellkompartement weist ein spezifisches miRNA-Expressionsmuster auf

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nichtcodierende RNA-Moleküle, die eine wichtige und globale Rolle in der Inhibition der Translation sowie der Degradation von mRNA spielen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene hämatopoetische Zellpopulationen unterschiedliche miRNAs exprimieren. So ändert sich die Expressionssignatur im Verlauf einer Leukämie und korreliert mit der entsprechenden Krankheitsphase. Allerdings existieren nur unzureichende Informationen zur Expression von miRNAs in niedrigfrequenten Zellpopulationen wie zum Beispiel primären hämatopoetischen Stammzellen. Mittels eines sehr sensitiven TaqMan-Assays konnten wir eine spezifische Analyse für 330 verschiedene humane miRNAs unter Verwendung von nur 5.000 frischen Zellen durchführen. Diese Analyse beinhaltet die systematische Untersuchung der miRNA-Signaturen in frühen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie allen wichtigen leukozytären Zellpopulationen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten). Folgende Zellpopulationen wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie entsprechend ihrer Oberflächenmarker separiert: primitivste hämatopoetische Stammzellen (HSC, $CD34^+CD38^-Lin^-$), weniger primitive hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPC, $CD34^+CD38^+Lin^-$), determinierte hämatopoetische Vorläuferzellen (dHPC, $CD34^+CD38^+Lin^+$) und differenzierte hämatopoetische Zellen. Im Vergleich zu enddifferenzierten hämatopoetischen Zellpopulationen exprimieren HSC ein hochspezifisches miRNA-Repertoire, in dem für 182 der 330 gemessenen miRNAs Expression nachgewiesen werden konnte. Von diesen 182 miRNAs weisen mehr als 50 eine spezifische Expression im hämatopoetischen Stammzellkompartement (HSC/HPC) auf, die sowohl in mehr determinierten Stammzellen (dHPC) als auch primären Zellen myeloiden (Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten) oder lymphoiden Ursprungs (CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen) nicht exprimiert werden. Im Gegensatz zu den großen Unterschieden, die zwischen den miRNA-Repertoires von primitiven und differenzierten Zelltypen bestehen, weisen alle untersuchten differenzierten Blutzellpopulationen untereinander eine sehr ähnliche miRNA-Signatur auf. Trotz dieses sehr homogenen miRNA-Musters können jedoch allen Subpopulationen zelltypspezifische miRNAs zugeordnet werden.

Projekt A5: Epigenetische Kontrolle des Differenzierungspotenzials humaner adulter Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSC) (Univ.-Prof. Dr. Markus Uhrberg, Dr. Simeon Santourlidis)

Unsere bisherigen Arbeiten weisen auf eine zentrale Rolle der DNA-Methylierung für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen hin.

Die darauf aufbauende Hauptfrage im Rahmen der Forschergruppe 717 ist, wie in multi- und pluripotenten Stammzellen des Nabelschnurbluts klonale Methylierungsmuster generiert werden und die Auswahl getroffen wird, bestimmte differenzierungsspezifische Gene zu methylieren und damit zu reprimieren, während andere stammzellspezifische Gene

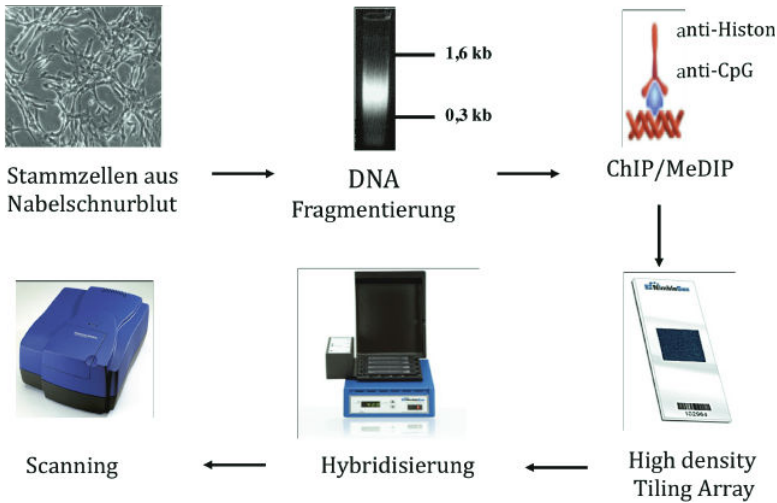


Abb. 10: Die epigenetische Array-Plattform des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika. Zur genomweiten Untersuchung somatischer sowie reprogrammierter Stammzellen aus Nabelschnurblut wurde von uns die NimbleGen-Plattform am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika etabliert. Sie basiert auf der Hybridisierung von Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP), die mit Antikörpern generiert wurden, die spezifisch für methylierte DNA sowie verschiedene Histonmodifikationen sind. Das ChIP-Material wird dann nach einem linearen Amplifikationsschritt auf *high-density*-Arrays hybridisiert, auf die 50mer-Proben synthetisiert werden, die alle bekannten Promotorregionen des humanen Genoms abdecken. Die Datenauswertung erfolgt auf Basis einer webbasierten Datenbank, in der alle relevanten Informationen auch der verschiedenen Partner zusammengeführt werden.

unmethyliert bleiben und exprimiert werden. Ein Hauptziel dieser Studie ist daher die Identifizierung der Faktoren, die die Methylierung beziehungsweise Demethylierung der wichtigsten Stammzellgene steuern. Ein weiteres Hauptziel ist es, stammzellspezifische Histonsignaturen dieser Zellen zu charakterisieren und durch Zugabe chemischer Inhibitoren der Histonacetylierung sowie Histonmethylierung zu modulieren. Der Einsatz solcher *small molecules* könnte hierbei zu neuen therapeutischen Optionen führen, bei denen ohne Integration von Fremd-DNA in das Stammzellgenom die Differenzierungspotenz von Stammzellen epigenetisch moduliert werden kann.

Zu diesem Zweck untersuchen wir mit neuen genomweiten Analysemethoden die DNA-Methylierungsmaschinerie sowie die Histonsignaturen in USSC sowie iPSC aus Nabelschnurblut sowie embryonalen Stammzellen (Abb. 11).

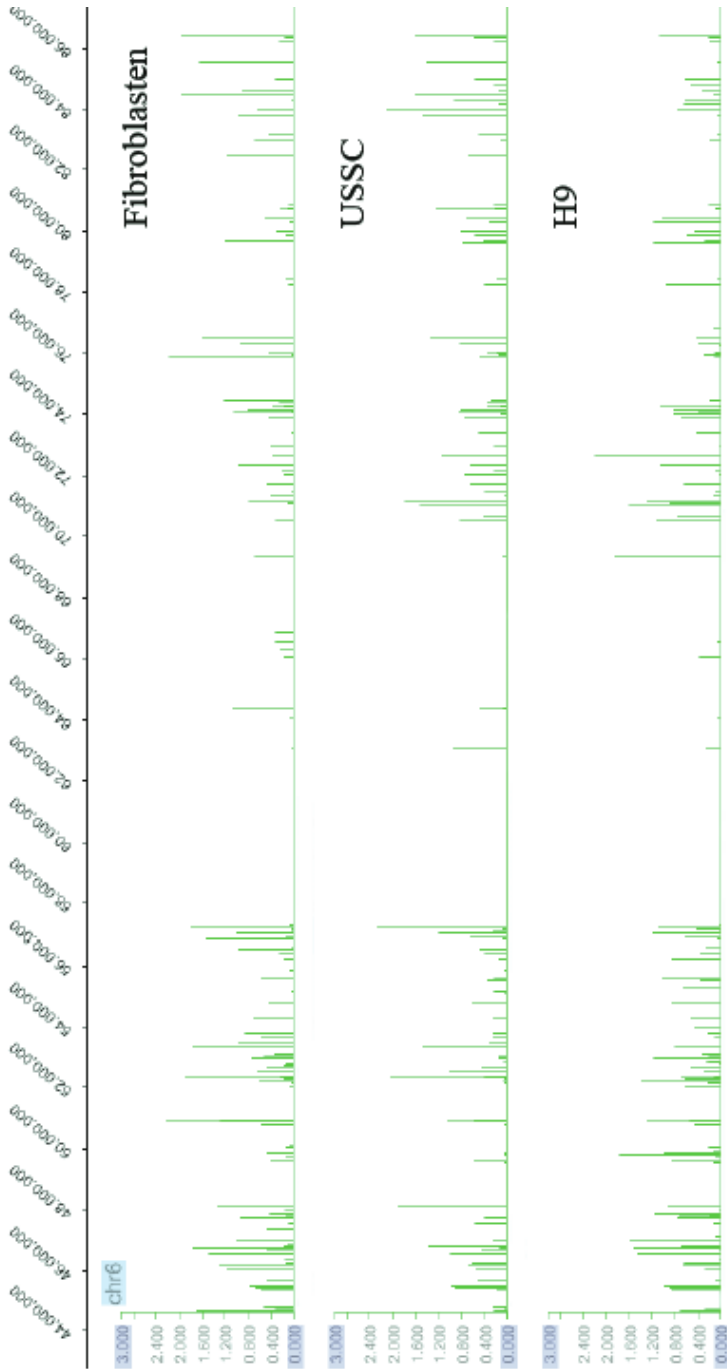


Abb. 11: Analyse eines NimbleGen-385k-Arrays, der alle CpG-Inseln des humanen Genoms repräsentiert. Die Auswertung mittels NimbleScan-Software zeigt die relative DNA-Methylierung der Gene eines Ausschnitts des Chromosoms 6 in Fibroblasten, USSC und der embryonalen Stammzelllinie H9 an. Die Signalstärke für jede 50mer-Probe der angezeigten genomischen Region wird durch die Höhe der grünen Balken dargestellt.

Literatur

- BUCHHEISER, A., S. LIEDTKE, A. P. HOUBEN, S. WACLAWCZYK, M. STEPHAN, T. F. RADKE, P. WERNET und G. KÖGLER (2008). „Cord Blood as a Very Valuable Source of Neonatal Cells but Embryonic-Like Nature Reevaluated“, *ASH Annual Meeting Abstracts* 112, 2897.
- BUCHHEISER, A., S. LIEDTKE, L. H. LOOIJENGA und G. KÖGLER (2009). „Cord blood for tissue regeneration“, *Journal of Cellular Biochemistry* 108, 762–768.
- GRESCHAT, S., J. SCHIRA, P. KÜRY, C. ROSENBAUM, M. A. DE SOUZA SILVA, G. KÖGLER, P. WERNET und H. W. MÜLLER (2008). „Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype“, *Stem Cells and Development* 17, 221–232.
- HOLDEN, C. (2007). „Stem Cell Candidates Proliferate“, *Science* 315, 761.
- HOUBEN, A. P., A. BUCHHEISER, M. AKTAS, J. FISCHER, P. WERNET und G. KÖGLER (2008). „Age-Related Differences Between Unrestricted Somatic Stem Cells from Cord Blood and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stroma Cells“, *ASH Annual Meeting Abstracts* 112, 1335.
- KÖGLER, G., S. SENSKEN, J. A. AIREY, T. TRAPP, M. MÜSCHEN, N. FELDHAHN, S. LIEDTKE, R. V. SORG, J. FISCHER, C. ROSENBAUM, S. GRESCHAT, A. KNIPPER, J. BENDER, O. DEGISTIRICI, J. GAO, A. I. CAPLAN, E. J. COLLETTI, G. ALMEIDA-PORADA, H. W. MÜLLER, E. ZANJANI und P. WERNET (2004). „A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential“, *Journal of Experimental Medicine* 200, 123–135.
- LIEDTKE, S., J. ENZMANN, S. WACLAWCZYK, P. WERNET und G. KÖGLER (2007). „Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research“, *Cell Stem Cell* 1, 364–366.
- LIEDTKE, S., M. STEPHAN und G. KÖGLER (2008). „Oct4 expression revisited: Potential pitfalls of data misinterpretation in stem cell research“, *Biological Chemistry* 389, 845–850.
- MCGUCKIN, C. P., N. FORRAZ, M. O. BARADEZ, S. NAVRAN, J. ZHAO, R. URBAN, R. TILTON und L. DENNER (2005). „Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood“, *Cell Proliferation* 38, 245–255.
- RADKE, T. F., A. BUCHHEISER, A. LEFORT, M. MALEKI, P. WERNET und G. KÖGLER (2007). „GMP-Conform Generation and Cultivation of Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC) from Cord Blood Using the SEPAX(C)-Separation Method a Closed Culture System Applying Cell Stacks“, *ASH Annual Meeting Abstracts* 110, 1211.
- SENSKEN, S., S. WACLAWCZYK, A. S. KNAUPP, T. TRAPP, J. ENZMANN, P. WERNET und G. KÖGLER (2007). „In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway“, *Cytotherapy* 9, 362–378.
- TAKAHASHI, K., K. TANABE, M. OHNUKI, M. NARITA, T. ICHISAKA, K. TOMODA und S. YAMANAKA (2007). „Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors“, *Cell* 131, 861–872.
- ZAEHRES, H. und G. Q. DALEY (2006). „Transgene expression and RNA interference in embryonic stem cells“, *Methods in Enzymology* 420, 49–63.

ISBN 978-3-940671-33-2



9 783940 671332