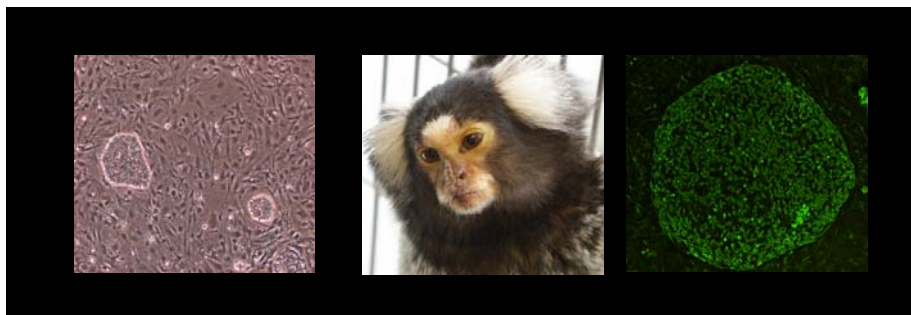


# Charakterisierung und Manipulation der Immunogenität embryonaler Stammzellen des Neuweltaffen *Callithrix jacchus*



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von  
Dipl.Biol. Gesine Fleischmann  
geboren am 27.April 1981 in Goslar

## Inhaltsverzeichnis

1.	Vorwort	1
2.	Kumulative Analyse	3
2.1.	Einleitung	3
2.1.1.	Stammzellen	3
2.1.2.	Embryonale Stammzellen	4
2.1.3.	Therapeutisches Potential	5
2.1.4.	<i>Callithrix jacchus</i>	6
2.1.5.	Die embryonale Stamzelllinie cjes001	6
2.1.6.	Feeder-Zellen	7
2.1.7.	Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	8
2.1.8.	RNA Interferenz	8
2.1.9.	Zielsetzung	10
2.2.	Ergebnisse/Diskussion	11
2.3.	Schlussfolgerung/Perspektiven	16
3.	Veröffentlichungen	18
3.1.	A novel stem cell line derived from the common marmoset monkey ( <i>Callithrix jacchus</i> ) exhibiting germ cell-like characteristics	19
3.2.	Growth characteristics of the non-human primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment	58
3.3.	Embryonic Stem Cells: MHC Expression and Immunogenicity of Stem Cell-Derived Cellular Therapeutics	88
3.4.	Meeting Report: Symposium in Stem Cell Repair and Regeneration	141
4.	Anhang	145
4.1.	Literaturverzeichnis	146
4.2.	Erklärung	150
4.3.	Lebenslauf	151
4.4.	Publikationsliste	152

## Zusammenfassung

Embryonale Stammzellen (ESC) bieten viele Möglichkeiten im Hinblick auf therapeutische Anwendungen, insbesondere in der regenerativen Medizin. Auf Grund ethischer Konflikte und gesetzlicher Vorgaben ist es in Deutschland problematisch, Versuche an humanen ESC durchzuführen. Eine Alternative bietet die Arbeit an murinen ESC. Eine andere Möglichkeit ist die Arbeit an ESC nicht humaner Primaten, die phylogenetisch gesehen mit dem Menschen enger verwandt sind. In dieser Arbeit wurde als Modell der Neuweltaffe Marmoset *Callithrix jacchus* gewählt. Die Marmoset Stammzelllinie cjes001 wurde etabliert und mit spezifischen Markern sowohl in immunhistochemischen Färbungen als auch mit spezifischen Primern in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) charakterisiert, um ihre Stammzeleigenschaften nachzuweisen. Dazu wurden gängige Marker wie Oct3/4, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-181, Sox-2 und Alkalische Phosphatase nachgewiesen. Außerdem wurde ein Pluripotenznachweis in Form einer Teratominduktion in immundefizienten NOD/SCID Mäusen erfolgreich durchgeführt.

ESC wachsen üblicherweise auf einem Feeder-Zellrasen aus Fibroblasten von 13,5 Tage alten Mausembryonen (MEF), dessen Proliferation entweder chemisch durch Mitomycin C oder durch Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen gehemmt ist. Es ist unklar, welche Auswirkungen die Behandlung der MEF auf das Wachstum und die Pluripotenz bzw. die Differenzierung der ESC hat. In dieser Studie wurden beide Methoden der Inaktivierung gegenüber gestellt und analysiert. Zum Einen wurde eine quantitative Abschätzung der sezernierten Faktoren mit Hilfe eines *bead-based multiplex arrays* (Rules Based Medicine, Austin, Texas, USA) vergleichend an mit Mitomycin C behandelten MEF und bestrahlten MEF durchgeführt. Bestrahlte MEF sezernieren höhere Mengen verschiedener Faktoren wie IP10, Insulin and Eotaxin als MEF, die chemisch durch Mitomycin C inaktiviert wurden. Außerdem wurde ein MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durchgeführt, um die metabolische Aktivität der Zellen beurteilen zu können. Bestrahlte MEF weisen eine signifikant höhere metabolische Aktivität auf als chemisch inaktivierte MEF. Ferner wurde die Proliferationsrate der ESC sowie deren Morphologie beurteilt. Embryonale Stammzellen, die auf bestrahlten MEF kultiviert werden, zeigen eine geringere Tendenz zu differenzieren als ESC, die auf Mitomycin C behandelten MEF wuchsen.

Die Manipulation embryonaler Stammzellen bietet einen vielversprechenden Ansatz therapeutische Anwendungen zu vereinfachen. Insbesondere im Hinblick auf die Immunogenität und die damit verbundenen Probleme bei Transplantationen könnte die Manipulation von ESC weiterhelfen. Eines der größten Probleme in der regenerativen Medizin und den zell-basierten Therapien ist der Haupthistokompatibilitätskomplex (Abk. MHC von engl. Major Histocompatibility Complex) transplanteder Zellen. Die Herunterregulierung des MHC mittels shRNA durch RNA Interferenz wurde bereits erfolgreich an anderen Zelltypen durchgeführt. Diese Methode steht in der Diskussion, auch die Immunogenität von Marmoset ESC kontrollieren zu können. Der Silencing-Effekt wurde durchflusszytometrisch sowie durch Real Time PCR bestimmt und zeigte eine Reduzierung der MHC-Expression um bis zu 85%.

Stichworte: Embryonale Stammzellen, *Callithrix jacchus*, Maus embryonale Fibroblasten (MEF), Mitomycin C,  $\gamma$ -Bestrahlung, Hauptkompatibilitätskomplex, shRNA

## Abstract

Embryonic stem cells (ESC) hold tremendous potential for therapeutic applications, including regenerative medicine. Many experiments cannot be conducted in human ESC in Germany because of ethical or practical limitations. An alternative is the work with murine ESC. Another possibility is the work with non human primate ESC. They are phylogenetic closer to humans. In this study the new world monkey marmoset *Callithrix jacchus* was chosen as a model.

The marmoset embryonic stem cell line cjes001 was established. To show the stem cell characteristics of this cell line it was stained with specific makers in immunohistochemistry and characterized by PCR with specific primers. Current markers like Oct3/4, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, Sox-2 and alkaline phosphatase were detected. Furthermore a teratoma induction in immune deficient NOD/SCID mice was performed.

ESC are typically grown on mouse embryonic fibroblasts (MEF) of 13,5 day old mouse embryos as feeder cells whose proliferation is arrested either by treatment with Mitomycin C or by  $\gamma$ -irradiation. Until now it is unclear which effect treatment of MEF has on proliferation and differentiation of ESC.

In this study both methods of inactivation were compared and analysed. To assess the impact of these treatments on the ability of MEF to support growth of undifferentiated ESC, we quantified cytokines and growth factors in the supernatant of both Mitomycin-treated and  $\gamma$ -irradiated MEF by *bead-based multiplex array* (Rules Based Medicine, Austin, Texas, USA). Comparing  $\gamma$ -irradiated and Mitomycin-treated MEF suggested higher amounts of some cytokines including IP10, Insulin and Eotaxin by the former.

We also assessed whether the method of inactivation had an effect on growth kinetics and differentiation of primate ESC. First, we used an MTT assay to evaluate the cellular metabolic activity of growth arrested feeder cells. There was a significant ( $p < 0.02$ ) difference between the different ways of inactivation with  $\gamma$ -irradiated cells displaying a higher metabolic activity. There appeared to be a trend to a lower number of differentiated ESC colonies on the  $\gamma$ -irradiated feeder cells, suggesting that this may be a preferable method of growth arrest.

Genetic modification of embryonic stem cells or adult stem cells is expected to significantly advance the use of stem cell based regenerative treatments. Especially in terms of immunogenicity and the risks in transplantation manipulation of ESC could help to avoid the immune barrier. The expression of the highly polymorphic major histocompatibility complex (MHC) on transplanted cells is a huge problem in this field of work. Silencing of MHC by RNA interference using shRNA was shown successful in human cells. In marmoset cells this method should work too. The achievement of the expression of MHC class I was followed by RT-PCR and flow cytometry. The transduction of RNAi cassettes containing the sequences for shRNAs targeting  $\beta$ 2m suppressed MHC class I protein expression by up to 85%.

Keywords: Embryonic stem cells, *Callithrix jacchus*, mouse embryonic fibroblasts (MEF), Mitomycin C,  $\gamma$ -irradiation, major histocompatibility complex, shRNA

## 2. Kumulative Auswertung

### 2.1. Einleitung

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung und Charakterisierung, der Optimierung von Kulturbedingungen und Manipulation der Immunogenität embryonaler Stammzellen des Neuweltaffen Marmoset (Weißbüschelaffe) *Callithrix jacchus*.

Embryonale Stammzellen (ESC) bieten großes Potential im Hinblick auf therapeutische Anwendungen, insbesondere in der regenerativen Medizin, aber auch für das Verständnis von Grundlagen in der Stammzellforschung. Insbesondere ihre Fähigkeit in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können bietet große Möglichkeiten (Wobus 2001; Mountford 2008). Aufgrund ethischer und gesetzlicher Limitationen ist es in Deutschland häufig nicht möglich Versuche an humanen ESC durchzuführen. Eine Alternative bietet die Arbeit an ESC nicht humaner Primaten. In dieser Arbeit wurde als Modellorganismus der Neuweltaffe *Callithrix jacchus* gewählt.

#### 2.1.1. Stammzellen

Stammzellen können aufgrund ihres Differenzierungspotentials in vier Gruppen unterschieden werden: totipotent, pluripotent, multipotent oder unipotent (Gage 2000). Als totipotent werden Stammzellen bezeichnet, die in der Lage sind wieder einen vollständigen Organismus auszubilden. Beim Durchlaufen des Morulastadiums verlieren die Zellen ihre Totipotenz und gehen in das Stadium der Pluripotenz über (Donovan and Gearhart 2001). Pluripotente Stammzellen sind in der Lage in über 200 verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Sie können aus der Blastozyste in den Tagen 5 bis 14 entnommen werden. Weiter differenzierte Zellen werden als multipotent bezeichnet. Dazu gehören Zellen, die in der Lage sind in zwei bis drei Zelltypen zu differenzieren. Die letzte Gruppe bilden die unipotenten Zellen, die lediglich in der Lage sind, gleiche Zellen hervorzubringen und nicht weiter zu differenzieren, wie z.B. Fibroblasten.

### **2.1.2. Embryonale Stammzellen (ESC)**

Embryonale Stammzellen werden im Allgemeinen als pluripotent bezeichnet. Sie werden aus der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste an Tag 5 bis 6 gewonnen (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Sie sind in der Lage in alle drei Keimblätter zu differenzieren. ESC wurden erstmals 1981 aus der Blastozyste einer Maus isoliert (Evans and Kaufman 1981).

Durch ihre Fähigkeit in alle Zelltypen differenzieren zu können, bieten ESC ein enormes Potential für die regenerative Medizin und für eine therapeutische Nutzung. Die Fähigkeit der Pluripotenz ist nicht nur in vivo sondern auch in vitro gegeben, sofern die Kulturbedingungen optimal und konstant gehalten werden. Die Differenzierung in verschiedene Zelltypen lässt sich durch unterschiedliche Kulturbedingungen induzieren (Baylink 1983; Jaiswal, Haynesworth et al. 1997; Pittenger, Mackay et al. 1999; Soukas, Socci et al. 2001).

### **2.1.3. Therapeutisches Potential und Limitationen**

Für die Weiterführung der Forschung an embryonalen Stammzellen in den klinischen Bereich, müssen die Versuche in nicht-murinen Modellen, die phylogenetisch näher am Menschen sind durchgeführt werden.

Um die kontrovers diskutierte Forschung an human ESC zu umgehen, bietet der nicht humane Primat *Callithrix jacchus* durch die nahe Verwandtschaft zum Menschen eine gute Alternative zu der Arbeit mit humanen ESC (Nakatsuji and Suemori 2002; Fischbach and Fischbach 2004; Horn, Tani et al. 2006; Suemori and Nakatsuji 2006; Nikol'skii, Gibai et al. 2007; Mountford 2008).

Ein Problem zeigt sich in der Generierung maligner Tumore bei der Injektion embryonaler Stammzellen in den Organismus (Wakitani, Takaoka et al. 2003; Teramoto, Asahina et al. 2005) als auch in ihrer Immunogenität, wenn diese auch weitaus geringer scheint als bisher angenommen. Der Vorteil embryonaler Stammzellen gegenüber adulten Stammzellen liegt dabei in der verhältnismäßig geringen Expression von MHC Klasse I sowie in der Abwesenheit von MHC Klasse II (s. 2.1.7. MHC) (Drukker, Katz et al. 2002) . Somit ist die Gefahr der Abstoßung deutlich minimiert.



#### **2.1.4. *Callithrix jacchus***

Der Neuweltaffe Marmoset *Callithrix jacchus*, das Weißbüscheläffchen, gehört zur Familie der Krallenaffen. Er ist aufgrund seiner geringen Größe (18cm-30cm), seines geringen Gewichts (300g-500g) und seiner nahen Verwandtschaft zum Menschen ein sehr gut geeignetes Tierversuchs-Modell. Ein weiterer Vorteil ist die kurze Generationszeit und zumeist werden Zwillinge geboren. Im Vergleich zum Rhesus-Affen ist die Haltung von Marmoset durch ihre geringe Größe wesentlich kostengünstiger. Marmosets sind außerdem unkompliziert im Umgang. Ihre Lebenserwartung beträgt in freier Wildbahn ~10 Jahre und in menschlicher Obhut ~20 Jahre (Wurm 2007).

#### **2.1.5. Die embryonale Stammzelllinie cjes001**

Die embryonale Stammzelllinie cjes001 wurde uns für unsere Arbeiten von PhD Erika Sasaki, Central Institute for *Experimental Animals (CIEA), Laboratory of Applied Developmental Biology, Department of Marmoset Research, Kawasaki, JAPAN* zur Verfügung gestellt (Sasaki, Hanazawa et al. 2005). Die Linie wurde in Kooperation mit der Forschergruppe „Stammzelle“ des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) in Göttingen charakterisiert.

Der Stammzellcharakter und somit die Pluripotenz embryonaler Stammzellen wird durch die Expression verschiedener charakteristischer Marker wie Oct 3/4, Sox-2 nachgewiesen (Berstine, Hooper et al. 1973; Scholer, Hatzopoulos et al. 1989; Cai, Wu et al. 2002; Henderson, Draper et al. 2002; Avilion, Nicolis et al. 2003). Eine weitere Bestätigung der Pluripotenz ist die Induktion von Teratomen in immundefizienten Mäusen. Außerdem wird zur vollständigen Charakterisierung neu etablierter ESC-Linien eine Karyotypisierung vorgenommen.

Eine weitere Eigenschaft embryonaler Stammzellen ist die spontane Differenzierung in diverse Zelltypen über Embryoid bodies. Über verschiedene Differenzierungsmarker wie VASA, SCP3 oder GCNF als Beispiel für Keimzellmarker lässt sich die Differenzierung nachweisen (Castrillon, Quade et al. 2000).

#### **2.1.6. Feeder-Zellen**

Embryonale Stammzellen werden üblicherweise auf Fibroblasten kultiviert, die aus 13,5 Tage alten Maus-Embryonen gewonnen werden. Diese müssen in ihrer Proliferation arretiert werden, um ein Überwachsen der Stammzellkolonien zu

verhindern. Zur Inaktivierung der MEF kann entweder eine chemische Inaktivierung mittels Mitomycin C oder eine Bestrahlung mit einer  $\gamma$ -Strahlenquelle verwendet werden. Dass die MEF einen Einfluss auf die ESC ausüben ist zu erwarten, wenn man bedenkt, dass die Feeder-Zellen verschiedene Faktoren sezernieren und die ESC direkten Kontakt zu ihnen haben. Der genaue Einfluss den die MEF auf die ESC ausüben scheint bisher jedoch unklar.

Die meistgenutzten Stämme zur Gewinnung von MEF sind CF1 und NMRI. Ob es Unterschiede in der Qualität der MEF bezüglich der verschiedenen Mausstämme gibt ist bis jetzt auch noch unklar. Ebenso ist bisher nicht untersucht worden, welchen Einfluss die Art der Inaktivierung auf das Wachstum und den Erhalt des Stammzellcharakters hat.

### **2.1.7. Hauptkompatibilitätskomplex (MHC)**

Der Hauptkompatibilitätskomplex (Abk. MHC von engl. Major Histocompatibility Complex) umfasst eine Gruppe von Genen, die Proteine für die Immunerkennung kodieren. Die Proteinkomplexe des MHC sind Antigene, die auf der Oberfläche jeder Körperzelle zu finden sind. Die Zellen sind somit als eigen gekennzeichnet und können von den Leukozyten als körpereigen erkannt werden. Werden körperfremde Zellen transplantiert, werden über den MHC diese Zellen als solche erkannt und eliminiert. Eine Möglichkeit diesen Mechanismus zu umgehen bietet die Behandlung des Patienten mit Immunsuppressiva. Eine andere Möglichkeit mit einem geringeren Risiko stellt die Manipulation embryonaler Stammzellen dar. Denkbar wäre eine Herunterregulierung des MHC in embryonalen Stammzellen, die dann gezielt in die benötigte Richtung differenziert werden können. Dieser Ansatz bietet gute Möglichkeiten die therapeutische Behandlung mit ESC zu vereinfachen. Die Herunterregulierung des MHC mittels shRNA durch RNA Interferenz wurde bereits erfolgreich an anderen Zelltypen durchgeführt. (Figueiredo, Horn et al. 2006). Der Silencing-Effekt kann durchflusszytometrisch sowie durch Real Time PCR bestimmt werden.

### **2.1.8. RNA-Interferenz**

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürliches Phänomen einer posttranskriptionellen Hemmung der Genexpression. Sie wurde ursprünglich in Pflanzen als *post transcriptional gene silencing* beschrieben (Al-Kaff, 1998). Ausgelöst wird dieser

Vorgang durch doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA), die über small hairpin RNA (shRNA) zu sogenannten small interfering RNA (siRNA) abgebaut werden. Die dsRNA wird durch den Proteinkomplex Dicer in siRNA geteilt (Hunter 2000; Bernstein, Caudy et al. 2001). RISC (RNA induced silencing complex) ist ein weiterer Proteinkomplex, der eine wichtige Rolle in der RNAi spielt. RISC enthält ein 20-23 Basenpaare langes Nukleomer. Er wirkt als Einzelstrang-RNase und bindet spezifisch an die Ziel-mRNA. Die Spezifität ist bedingt durch die sequenzidentische siRNA. Der komplementäre Antisense-Strang liegt an der Außenseite des RISC, so dass dieser an die Ziel-mRNA binden und diese degradieren kann.

### 2.1.9. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Charakterisierung der Marmoset Stammzelllinie cjes001. Außerdem sollen die Kultivierungsbedingungen im Hinblick auf den Erhalt der Pluripotenz und die Undifferenziertheit optimiert werden. Dazu sollten die unter den ESC als Kokultur kultivierten MEF auf ihren Einfluss bezüglich auf das Differenzierungsverhalten der ESC und im Vergleich zwischen unterschiedlichen Inaktivierungsmethoden untersucht werden.

Ein weiterer Teil ist die Manipulation der embryonalen Stammzellen mittels shRNA im Hinblick auf die Immunogenität.

### Literatur:

- (1999). "Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium." Nature **401**(6756): 921-3.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev **17**(1): 126-40.
- Baylink, D. J. (1983). "Glucocorticoid-induced osteoporosis." N Engl J Med **309**(5): 306-8.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-6.
- Berstine, E. G., M. L. Hooper, et al. (1973). "Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(12): 3899-903.
- Cai, J., Y. Wu, et al. (2002). "Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell)." Dev Biol **251**(2): 221-40.
- Castrillon, D. H., B. J. Quade, et al. (2000). "The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9585-90.
- Donovan, P. J. and J. Gearhart (2001). "The end of the beginning for pluripotent stem cells." Nature **414**(6859): 92-7.

- Drukker, M., G. Katz, et al. (2002). "Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9864-9.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Figueiredo, C., P. A. Horn, et al. (2006). "Regulating MHC expression for cellular therapeutics." Transfusion in press.
- Fischbach, G. D. and R. L. Fischbach (2004). "Stem cells: science, policy, and ethics." J Clin Invest **114**(10): 1364-70.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-8.
- Henderson, J. K., J. S. Draper, et al. (2002). "Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens." Stem Cells **20**(4): 329-37.
- Horn, P. A., K. Tani, et al. (2006). "Nonhuman primates: embryonic stem cells and transgenesis." Cloning Stem Cells **8**(3): 124-9.
- Hunter, C. P. (2000). "Gene silencing: shrinking the black box of RNAi." Curr Biol **10**(4): R137-40.
- Jaiswal, N., S. E. Haynesworth, et al. (1997). "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." J Cell Biochem **64**(2): 295-312.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-8.
- Mountford, J. C. (2008). "Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy." Transfus Med **18**(1): 1-12.
- Nakatsuji, N. and H. Suemori (2002). "Embryonic stem cell lines of nonhuman primates." ScientificWorldJournal **2**: 1762-73.
- Nikol'skii, N. N., I. A. Gibai, et al. (2007). "[Human embryonic stem cells. Problems and perspectives]." Tsitologija **49**(7): 529-37.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Sasaki, E., K. Hanazawa, et al. (2005). "Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*)." Stem Cells **23**(9): 1304-13.
- Scholer, H. R., A. K. Hatzopoulos, et al. (1989). "A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor." Embo J **8**(9): 2543-50.
- Soukas, A., N. D. Socci, et al. (2001). "Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro." J Biol Chem **276**(36): 34167-74.
- Suemori, H. and N. Nakatsuji (2006). "Generation and characterization of monkey embryonic stem cells." Methods Mol Biol **329**: 81-9.
- Teramoto, K., K. Asahina, et al. (2005). "Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells." J Hepatobiliary Pancreat Surg **12**(3): 196-202.
- Wakitani, S., K. Takaoka, et al. (2003). "Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint." Rheumatology (Oxford) **42**(1): 162-5.
- Wobus, A. M. (2001). "Potential of embryonic stem cells." Mol Aspects Med **22**(3): 149-64.
- Wurm, M. (2007). "Transduktion hämatopoetischer Stammzellen von Neuweltaffen mit Foamyviren."