© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Ber. nat.-med. Verein Innsbruck	Band 88	S. 287 - 350	Innsbruck, Okt. 2001

Experimentelle Systeme zum Studium von Regenerationsvorgängen: Turbellarien als Modellorganismen mit einem Stammzellensystem*)

von

Roland PETER**)

Experimental Systems for Studying Regeneration Processes: Turbellarians as Model Organisms with a Stem Cell System

Synopsis: The Turbellaria, a phylogenetically old taxon of flatworms (Platyhelminthes) originating at the basis of the Bilateria, comprise species with an extraordinarily high regenerative capacity. The neoblast is the only proliferative somatic cell type and has been claimed to be a totipotent stem cell for all tissues including germ cells. However, alternative regeneration mechanisms involving dedifferentiation have been proposed. Recent studies support the role originally ascribed to neoblasts, but at the same time reveal a heterogeneity of the neoblast pool that consists of progenitor cells, differentiating cells and – probably – true stem cells.

A survey of results from studies on regeneration and reproduction in turbellarians performed together with several co-authors is presented and integrated into a review of the current knowledge on regeneration and stem cells in the platyhelminths.To contribute to a still better understanding of the functions fulfilled by neoblasts and help elucidating their still unknown origin, the asexual freshwater triclad *Dugesia tahitiensis* has been introduced as a model system and studied with respect to regeneration, reproduction and cell biology. This planarian offers the following advantages: purely asexual propagation, forming natural clones by fission; absence of germ cells that might interfere when isolating and tracing neoblasts; highest regeneration potential and largest percentage of neoblasts ever reported for a triclad turbellarian.

New methods to prepare and analyze turbellarian cells were developed, resulting in a combination of mechanical and enzymatic disintegration of tissues, centrifugation of cells in a Percoll density-gradient under isoosmotic conditions and cytochemical characterization of neoblasts. The sedimentation behaviour during centrifugation and quantitative video microscopy based on fluorescent staining of DNA and RNA confirmed the heterogeneity of these cells. By light microscopical characters, they were classified tentatively into four subtypes. Primary cultures of neoblasts from *Dugesia tahitiensis* and the related *Schmidtea* (*Dugesia*) *polychroa* were established and survived up to 31 days. Such cultures and restitution bodies forming spontaneously from cell suspensions provide a basis for further experimentation with the aim to establish a permanent neoblast line for injection experiments and differentiation studies. Transgenic planarians might be an ultimate goal.

*) Aktualisierte Fassung einer 1999 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Salzburg vorgelegten Habilitationsschrift.

**) Anschrift des Verfassers: Ao. Univ.-Prof. Dr. Roland Peter, Institut für Genetik und Allgemeine Biologie der Universität Salzburg, Hellbrunnerstraße 34, A-5020 Salzburg, Österreich, e-mail: Roland.Peter@sbg.ac.at

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

In addition, neoblasts from the marine microturbellarian *Macrostomum* were studied in a similar way. This genus offers the advantage that proliferating cells had been traced by the incorporation of bromodeoxyuridine *in situ*. Subtypes of neoblasts could be discerned by the ultrastructure of the nucleus.

The new experimental systems and the obtained results are discussed in the context of theories on regeneration, including the role of developmental genes, and compared to related phenomena in other animal phyla. As neoblasts in parasitic flatworms closely resemble those from turbellarians, the model system presented may well provide results applicable to some of the most important animal parasites in men and beasts.

Inhalt: **Seite**

1. Die untersuchten Organismen 289
2. Regeneration und asexuelle Reproduktion
   2.1. Fakten und frühe Theorien 294
   2.2. Wie läuft die Regeneration bei Turbellarien ab? 295
   2.3. Der "Alltagswert" eines außergewöhnlichen Regenerationsvermögens: Reproduktion und Zellerneuerung 296
   2.4. Fortpflanzung bei Turbellarien: ursprüngliche Verhältnisse oder ein Sonderfall in der Evolution? 297
   2.5. Eine asexuelle Planarienart als Modellorganismus 298
3. Zellbiologie der Regeneration bei Turbellarien
   3.1. Zelltypen von Turbellarien 302
   3.2. Neoblasten, ein besonderer Zelltyp: Beobachtungen und Korrelationen 304
   3.3. Neoblasten bauen neue Gewebe auf. 307
   3.4. Ist Dedifferenzierung an der Regeneration von Turbellarien beteiligt? 308
   3.5. Die Heterogenität des Neoblastenkompartiments 310
   3.6. Neoblasten und Stammzellen: Herkunft, Funktion und Totipotenz 313
   3.7. Methodeninventar zur weiteren Analyse des Neoblastenkompartiments 319
4. Anwendungen einiger neuer Methoden zur Klärung offener Fragen
   4.1. Weitere ultrastrukturelle Kriterien 321
   4.2. Isolierung und Analyse von Neoblasten 321
   4.3. Primärkulturen von Turbellarienzellen 326
   4.4. Restitutionskörper: ein *in vitro*-System für Zellwechselwirkungen 328
5. Stammzellen, Wachstum und Entwicklung bei anderen Platyhelminthes 330
6. Mechanismen der Regeneration - Felder, Muster und Gene. Konzepte für Turbellarien und den Rest der Tierwelt 330
7. Ausblick und laufende Untersuchungen 337
8. Zusammenfassung 338
9. Danksagung 340
10. Literatur 340

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Abkürzungen:

Gattungen der Tricladenfamilie Dugesiidae: *D.*: *Dugesia*
G.: *Girardia* (früher *Dugesia*)
S.: *Schmidtea* (früher *Dugesia*)

Diese Gattungen wurden früher als Subgenera des Genus *Dugesia* geführt.
BrdU: 5-Brom-2´-desoxyuridin (künstlich hergestelltes Analogon zu Thymidin)
DNA: Desoxyribonukleinsäure
EC: Enzymnummer nach dem internationalen "Enzyme Codex" zur genauen Bezeichnung der Substrat- und Wirkungsspezifität
EDTA: Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (Komplexbildner für zweiwertige Kationen)
ER: endoplasmatisches Reticulum
HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure), Puffersubstanz
RNA: Ribonukleinsäure
Tricin: N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin, Puffersubstanz

1. Die untersuchten Organismen

Die zu den Turbellarien (Strudelwürmern) zusammengefassten Taxa bilden eine paraphyletische Gruppe innerhalb des Stammes der Platyhelminthes (Plattwürmer; EHLERS, 1985). Nach verbreiteter Meinung steht dieser Stamm der Bilateria ihrem Ursprung unter allen Metazoenstämmen am nächsten (RIEGER, 1985). Diese Ansicht wird auch durch molekulare Daten bestätigt (unter anderen von CARRANZA et al., 1997). Die einzelnen Ordnungen innerhalb der Turbellarien unterscheiden sich voneinander erheblich. Das ist aus dem hohen stammesgeschichtlichen Alter der Gruppe zu erklären. Eine klassische Einführung in die Morphologie und Biologie dieser Tiere gibt z.B. HYMAN (1951), einen Überblick über ihre Organisation EHLERS (1985, 1995). Eine Übersicht über die biologische Vielfalt der Turbellarien findet man bei CANNON (1986). Plattwürmer sind triploblastische Organismen, besitzen also drei Keimblätter. Eine sekundäre Leibeshöhle ist nicht ausgebildet. Zu den wenigen Merkmalen, die allen Turbellarien-Taxa gemeinsam sind, zählen die zumindest teilweise Bewimperung des einschichtigen Epithels, die Exkretion über Protonephridien mit terminalen Flammenzellen (mit Ausnahme der Acoela) und der Besitz eines Zentralnervensystems mit Gehirn und mehreren Längsnervensträngen zusätzlich zu einem zweischichtigen peripheren Nervensystem (REUTER et al., 1998; RIEGER et al., 1991). Eigene Atemorgane und ein Zirkulationssystem fehlen. Dies ist aus der Kleinheit bzw. geringen Dicke der Tiere zu verstehen. Bei den nach ihrem dreischenkligen Darm benannten Tricladida (Bild 1, Seite 292) und bei den Polycladida übernimmt der stark verzweigte Darm die Verteilung der Nährstoffe. Bei diesen Ordnungen ist die Leibeshöhle von einem Parenchym ausgefüllt. Mit wenigen Ausnahmen sind Turbellarien frei lebende Hermaphroditen. Ungeschlechtliche Fortpflanzung und damit asexuelle Stadien oder Stämme sind von besonderer Bedeutung (s. Kapitel 2.3-5). Soweit darüber Daten bekannt sind, geht die Bildung neuer Zellen im wachsenden und im adulten Tier von einem einzigen Typ von Stammzellen aus. Er wird heute zumeist als "Neoblast" bezeichnet und gilt für viele Autoren als totipotent in dem Sinn, dass er der Vorläufer sämtlicher somatischer und

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

generativer Zellen ist (BAGUÑÀ et al., 1988, 1994; BRØNDSTED, 1969). Es ist jedoch umstritten, ob es sich hierbei tatsächlich um einen einheitlichen Zelltyp handelt und in welchem Ausmaß allenfalls auch andere Zellen zur Zellerneuerung beitragen (s. Kapitel 3.2-5). Für etliche Turbellarienordnungen stehen zellbiologische Analysen noch aus. Ein wesentliches Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen ist es, zur weiteren Klärung der Natur und des Ursprungs der Neoblasten sowie zum Verständnis ihrer Rolle für Zellerneuerung und Regeneration beizutragen. Totipotente Zellen sind innerhalb des Tierreichs nur noch von Schwämmen (Porifera) bekannt (BERGQUIST, 1978; CONNES, 1974) und im übrigen bei höheren Pflanzen verbreitet (SACHS, 1991). Diese längst evidente, aber lange nicht in ihrer zellbiologischen Bedeutung erkannte Stammzellenstrategie der Pflanzen wurde auch durch andere Autoren bestätigt und in ihrer evolutiven Bedeutung gewürdigt (VAN DER KOOY & WEISS, 2000). Eine getrennte Keimbahn ist für Plathelminthen bisher nicht beschrieben worden und jedenfalls nicht typisch, weil auf Grund zahlreicher Befunde in vielen Fällen Keimzellen aus somatischen Zellen entstehen müssen. Das folgt aus dem Wechsel sexueller und asexueller Generationen bei parasitischen Ordnungen, wie etwa den Digenea unter den Trematoden (Saugwürmern; s. EHLERS, 1985), ebenso aber auch aus der Tatsache, dass bei den paludicolen Tricladen (Planarien) die Gonaden, etwa unter Hungerbedingungen, völlig eingeschmolzen werden können und dann unter geeigneten Umständen wieder neu entstehen (STOPPENBRINK, 1905; vgl. auch GRASSO & BENAZZI, 1973, für die "Sexualisierung" asexueller Stämme durch geeignete Fütterung). Für die Tricladen gibt es auch auf Grund cytogenetischer Marker Beweise dafür, dass im adulten Tier Keimzellen und somatische Zellen aus ein und demselben Zelltyp hervorgehen können (BAGUÑÀ et al., 1989a). Man könnte nun freilich eine solche gemeinsame Stammzelle als generative Zelle bezeichnen und der Keimzelllinie zuordnen. Wenn eine solche Zuschreibung auch nicht üblich ist, wäre sie möglich und ihre Akzeptanz eine reine Definitions- bzw. Konventionsfrage. Tatsächlich ist eine solche Begriffsbestimmung für Digenea vereinzelt vorgeschlagen worden (CLARK, 1974). Dies ändert aber nichts an der Tatsache, dass eben die Keimbahn von den Linien somatischer Zellen weder durch das obligate Auftreten von Meiosen (und Zygoten) noch durch eine nachvollziehbare Abstammung aus bestimmten embryonalen Zellen getrennt ist. Vom soeben zitierten Autor werden denn auch diese "germinal cells" als Träger einer Sukzession diploider Zellen bezeichnet, aus der aufeinander folgende Larvenstadien ähnlich wie in einem Knospungsprozess hervorgehen. Auch bei Schwämmen (Porifera), Hydroiden und koloniebildenden Tunikaten ist keine eigene Keimbahn ausgeprägt (BUSS, 1987). Meristematische Gewebe höherer Pflanzen bieten übrigens eine ähnliche Situation, wenn man ihre Beziehung zu den Keimzellen betrachtet (SACHS, 1991).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden vor allem Süßwasserplanarien (Ordnung: Tricladida, Unterordnung: Paludicola) und in geringerem Ausmaß Macrostomiden (Ordnung: Macrostomida) herangezogen. Der Begriff "Planarie" wird hier in seiner ursprünglichen Bedeutung als Synonym für "Triclade" verwendet (BRØNDSTED, 1969) und nicht, wie sich das im englischsprachigen Schrifttum einzubürgern beginnt, als Synonym für Turbellar. Die beiden Planarienarten *Schmidtea* (*Dugesia*)

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

polychroa (SCHMIDT 1862) und *Dugesia tahitiensis* GOURBAULT 1977 (Bild 2, Seite 293) sind beide Süßwasserbewohner. Beide gehören, wie auch das zum Vergleich wiederholt erwähnte Genus *Girardia*, zur Familie der Dugesiidae (BALL, 1974). Die Tiere der zuerst genannten Art kamen aus der weiteren Umgebung Salzburgs (PETER & SCHÜRMANN, 1995) und entstammten einer pseudogamen, also sexuellen Population mit triplo-hexaploidem Karyotyp und rein maternalem Erbgang (Biotyp B nach BENAZZI, 1957 und BENAZZI & BENAZZI LENTATI, 1976). *D. tahitiensis* ist eine nur von Tahiti bekannte, endemische Art, von der bisher keine sexuellen Stadien beobachtet worden sind (GOURBAULT, 1977). Sie stellt somit nach heutiger Kenntnis den Idealfall einer asexuellen Planarienart ohne Keimzellen dar. Auf die Problematik der Artdefinition ohne Gonaden sei hier nur hingewiesen. Im Zusammenhang mit dem Fundort (es gibt auf Tahiti keine ähnliche Art) sind die verwendeten Tiere jedoch eindeutig definiert. Außerdem existieren populationsgenetische Daten über ihre Isoenzyme (NASCETTI et al., 1990). Auf Grund dieser Informationen und ihrer Morphologie wurde die Art in das frühere Subgenus (jetzige Genus) *Girardia* eingereiht (GOURBAULT, 1977; NASCETTI et al., 1990). Die Kulturen von *Macrostomum* (Abb. 1) stammten von Tieren, welche an der Ostküste der USA (RIEGER et al., 1988) bzw. in der Adria bei Lignano aufgesammelt wurden.

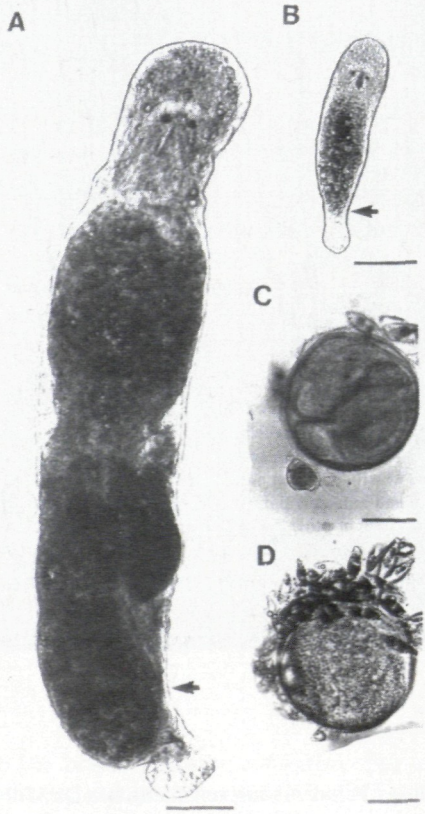


Abb. 1:
Macrostomum hystricinum marinum aus Laboratoriumskulturen.
A) Adultes Tier, B) frisch geschlüpftes Exemplar, C) Tier knapp vor dem Schlüpfen, D) Embryo etwa in der Mitte seiner Entwicklung. Balken: jeweils 100 µm. Photo: R. M. RIEGER, Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

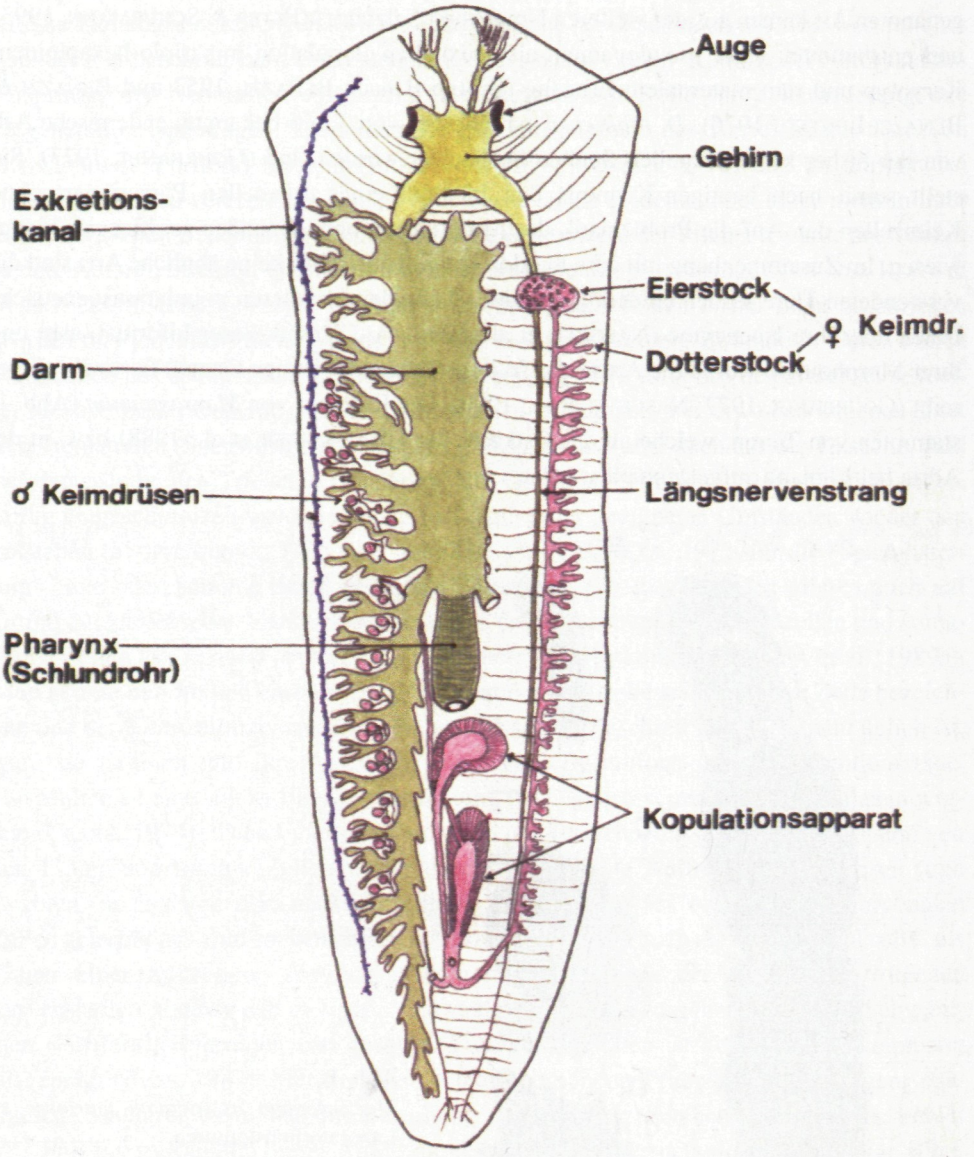


Bild 1: Bauplan einer Planarie (Turbellaria: Tricladida - Paludicola) in schematischer Darstellung.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Bild 2: Die beiden Planarien *Schmidtea* (*Dugesia*) *polychroa* **(a)** und *Dugesia tahitiensis* **(b)** in Dorsalansicht. Lebendaufnahmen (Olympus Zuiko Auto Macro 3,5 / 50mm). Balken: 2 mm.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

2. Regeneration und asexuelle Reproduktion

2.1. Fakten und frühe Theorien

Das außergewöhnlich große Regenerationsvermögen einer Turbellarienart fiel schon im 18. Jahrhundert auf: PALLAS (1774) entdeckte, dass kleine Fragmente einer Planarie [es war *Bdellocephala punctata* (PALLAS 1774)] wieder zu vollständigen Tieren heranwuchsen. MORGAN (1898) fand dann, dass noch 1/279 der Masse eines Wurmes genügte, um eine vollständige *Girardia* (*Dugesia*) *tigrina* (GIRARD 1850) zu regenerieren. Das entspricht einer Mindestzahl von etwa 10.000 Zellen (MONTGOMERY & COWARD, 1974). Wenn Planarien als Modellorganismen an der Wiege der modernen Regenerationsforschung standen, war dies somit kein Zufall. Charles Manor CHILD und Thomas Hunt MORGAN entwickelten um 1900 an Hand zahlreicher Versuchsreihen grundlegende Konzepte für die weitere Forschung (siehe z.B. CHILD, 1941; MORGAN, 1900). Eine Fülle weiterer Untersuchungen wurde durch diese bahnbrechenden Arbeiten angeregt. Man entdeckte die nahezu unbeschränkte Fähigkeit von Planarien, Gewebe und einzelne Organe sowohl nach Amputation (reparativ) zu regenerieren als auch ganze Körperteile zu ersetzen. Diesen Vorgang bezeichnete man ursprünglich als Restitution (KORSCHELT, 1927), doch hat sich mittlerweile die Bezeichnung Regeneration auch dafür eingebürgert. Planarien regenerieren sowohl in der Längsachse (vordere, hintere und bipolare Regenerate) als auch lateral nach Längsschnitten sowie interkalar, wenn man Stücke aus Tieren quer herausschneidet und die beiden Endstücke aufeinander pfropft. Eine Minimalbedingung für die Regeneration scheint lediglich ein im Stumpf verbliebenes Stück eines Nervenstranges zu sein (SPERRY & ANSEVIN, 1975; SPERRY et al., 1973). Schon früh entstanden etliche Konzepte, die den Ablauf der Regeneration bei Planarien zu erklären versuchten. Dabei standen Gradienten stofflicher oder physiologischer Art sowie die Frage nach der Bestimmung der Polarität im Mittelpunkt der Diskussionen (weitere Details im Kapitel 6). Eine Übersicht mit zahlreichen Literaturzitaten dazu findet man bei BRØNDSTED (1969). Die postulierten Gradienten, Induktions- und Hemmfelder (WOLFF et al., 1964) ließen sich jedoch so lange nicht mit realen Substanzen und Mechanismen ausfüllen, als entsprechende Methoden fehlten.

Hypothesen zur zellbiologischen Grundlage der Regeneration entstanden in der Folge der frühen Regenerationsstudien auf Grund der histologischen Befunde von regenerierenden Tieren. Die Regenerationsblasteme werden aus relativ kleinen Zellen mit stark basophilem Cytoplasma aufgebaut, welche in großer Zahl im Parenchym vorhanden sind. Diese Zellen werden heute meist als Neoblasten bezeichnet und wurden von vielen Autoren für die totipotenten Stammzellen des Regenerationsblastems gehalten (so z. B. KELLER, 1894; MORGAN, 1900; RANDOLPH, 1897). Andere hingegen machten Dedifferenzierungsvorgänge für die neu gebildeten Körperteile verantwortlich (so z.B. STEINMANN, 1925). Die Beteiligung eines als Morphallaxis bezeichneten Umbaues vorhandener Gewebe zusätzlich zur Epimorphose wurde bereits von MORGAN (1900) erkannt (s. auch Kapitel 6). Für eine Neubildung im Sinn einer Epimorphose sprechen die Ergebnisse von DUBOIS (1949), wel-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

che die Inaktivierung von Neoblasten durch Röntgenbestrahlung einführte und eine klassische Beschreibung der Regenerationsblasteme verfasste (s. auch STÉPHAN-DUBOIS, 1965). Ebenso machten Experimente, in denen Neoblasten mit tritiiertem Uridin markiert worden waren, den Aufbau des Blastems aus diesen Zellen wahrscheinlich (LENDER & GABRIEL, 1965). Auch in neuerer Zeit ist die Eignung von Planarien als Modellorganismen für das Studium der Zelldifferenzierung erkannt worden (siehe z.B. MARTELLY & FRANQUINET, 1984).

2. 2. Wie läuft die Regeneration bei Turbellarien ab?

Die größte Zahl der älteren Regenerationsstudien beschränkte sich darauf, die Wiederherstellung der fehlenden Teile nach Amputation morphologisch zu beschreiben, das Regenerationspotential verschiedener Arten und Körperregionen zu untersuchen und aus dem Verlauf der Regeneration und dem Einfluss bestimmter Substanzen Induktions- und Hemmfelder abzuleiten. Zusammenfassende Darstellungen dazu findet man bei BAGUÑÀ (1998), BRØNDSTED (1969), LENDER (1965) und WOLFF et al. (1964). Ganz überwiegend waren triclade Planarien die Untersuchungsobjekte.

Ein Gesamtbild über den Regenerationsablauf bei allen Turbellarienordnungen lässt sich zur Zeit wegen der großen Lücken im Datenmaterial nicht gewinnen. Ein Regenerationsblastem, das gegen den übrigen Körper abgrenzbar ist und in dem die verloren gegangenen Gewebe durch Differenzierung neuer Zellen gebildet werden, ist für viele Arten (siehe z. B. BRØNDSTED, 1969; DUBOIS, 1949; STÉPHAN-DUBOIS, 1965, für Triclade sowie LADURNER et al., 1998, 2000, für *Macrostomum*) beschrieben worden, kann aber auch fehlen, wie z.B. bei den Catenuliden *Stenostomum* (VAN CLEAVE, 1934) und *Catenula* (MORACZEWSKI, 1977) sowie beim Macrostomorphen *Microstomum* (PALMBERG, 1986). Wenig ist über die Regeneration bei den Acoelen bekannt, die an der Basis der Platyhelminthes stehen und neuerdings von einigen Autoren auf Grund von 18S rRNA-Sequenzen sogar als eigener, noch ursprünglicherer Stamm von den Platyhelminthes ausgegliedert und an die Basis der Bilateria gestellt wurden (RUIZ-TRILLO et al., 1999). Diese Ansicht ist jedoch umstritten. Kleinste abgeschnittene Stücke des Acoelen *Amphiscolops* regenerieren innerhalb von Minuten bis Stunden vollständige Exemplare mit den ursprünglichen Proportionen, wobei eine Formregulation (Morphallaxis) unter wesentlicher Beteiligung des Entoderms der eigentlichen Regeneration vorausgeht (STEINBÖCK, 1963). Leider fehlen dazu bisher genauere zellbiologische Beobachtungen.

Bei den Tricladen (Planarien) kann man im Ablauf der Regeneration folgende Stadien unterscheiden (BAGUÑÀ, 1998; BAGUÑÀ et al., 1994; PEDERSEN, 1972; SPIEGELMAN & DUDLEY, 1973): Nach einer Amputation schließt sich die Wunde zunächst sehr rasch innerhalb von 10 Minuten durch Muskelkontraktion. Sodann breitet sich das existierende Epithel durch Abflachung der Zellen über die Wundstelle aus. Im Verlauf dieses Wundverschlusses, der nach einer Stunde beendet ist, sind keine Zellteilungen im Wundbereich zu beobachten. Unmittelbar nach diesem schnellen Prozess bildet sich ein Blastem, in wel-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

chem innerhalb von Tagen bis Wochen die verloren gegangenen Strukturen neu gebildet werden. Dieses Blastem wird aus Neoblasten aufgebaut und enthält mit fortschreitender Regeneration in zunehmendem Maß differenzierte Zellen. Es ist nicht endgültig geklärt, ob Neoblasten aktiv ins Blastem einwandern (DUBOIS, 1949; NEWMARK & SÁNCHEZ ALVARADO, 2000) oder durch eine gesteigerte Mitoserate in der benachbarten Region passiv dorthin gelangen (BAGUÑÀ et al., 1988; s. auch Kapitel 3.3). Mitosen in der unmittelbaren Nachbarschaft des Blastems sind jedenfalls beobachtet worden. Für das Blastem selbst sind immer wieder Mitosen beschrieben worden (z.B. BEST et al., 1968; GREMIGNI & PUCCINELLI, 1977). Für die entsprechenden Präparationen wurden von den zuvor entfernten Blastemen Quetschpräparate hergestellt. Die ursprüngliche Lage der Zellen im Gewebeverband lässt sich aus solchen Präparaten nicht zweifelsfrei rekonstruieren; daher ist unsicher, ob dabei nicht auch die ans Blastem angrenzende Körperregion erfasst wurde. Die meisten neueren Arbeiten stimmen darin überein, dass es im Blastem selbst und auch im Epithel keine Mitosen gibt (siehe z. B. BAGUÑÀ, 1998; DUBOIS, 1949). Wie auch in neuerer Zeit gezeigt werden konnte (z.B. von HORI & KISHIDA, 1998, für Planarien, von RIEGER et al., 1999, für *Macrostomum*), findet man im Blastem – je nach dessen Alter - überwiegend Zellen, die in Differenzierung begriffen oder schon differenziert sind. Aus den beobachteten Stadien lassen sich von Neoblasten ausgehende Differenzierungsreihen zu einzelnen somatischen Zelltypen ableiten. Je nach der untersuchten Tricladenart und dem Umfang der amputierten Teile sind diese nach wenigen Tagen bis Wochen wiederhergestellt. Neben den Epithelzellen sind Muskelzellen die ersten neu gebildeten Zellen. Das geht aus histologischen Befunden (DUBOIS, 1949), ultrastrukturellen Beobachtungen (MORITA & BEST, 1984a) und auch aus immuncytochemischen Ergebnissen (CEBRIÀ et al., 1997; s. auch BAGUÑÀ, 1998) hervor. Allerdings weicht die äußere Gestalt des Regenerats zunächst von der Ausgangsform mehr oder weniger ab. Wenigstens bei Planarien kommt es anschließend zu einer Umgruppierung von Geweben, die als "Remodeling" einen morphallaktischen Prozess darstellt (siehe z.B. MEAD & CHRISTMAN, 1998). Nach einem Zeitraum von vier Wochen sind bei *Girardia* (*Dugesia*) *tigrina* (GIRARD 1850) die ursprünglichen Körperproportionen wiederhergestellt (BAYASCAS et al., 1997). Die daran beteiligten Prozesse und histologischen Veränderungen sind bisher erst wenig untersucht worden (siehe z.B. GABRIEL, 1970; MORITA & BEST, 1984a, b; PALMBERG, 1986; PEDERSEN, 1972).

2. 3. Der "Alltagswert" eines außergewöhnlichen Regenerationsvermögens: Reproduktion und Zellerneuerung

Beobachtungen über extreme Regenerationsleistungen in Experimenten mögen sensationell sein. Die Frage nach der biologischen Bedeutung dieser Vorgänge und somit ihrer Entstehung während der Evolution ist damit keineswegs beantwortet, jedenfalls so lange Verletzungen nicht als Ereignisse im Leben eines Organismus erkannt sind, deren erfolgreiche Reparatur die Fitness einer konkurrierenden Population entscheidend erhöht. Dazu gibt es für Turbellarien keine Daten. Eigene Freilandbeobachtungen lieferten keinen Anlass

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

zu einer solchen Annahme. Auch gibt es unter den Tieren viele erfolgreiche Fließwasserarten ohne eine vergleichbare Regenerationsmöglichkeit. Von sehr kurzlebigen Arten mit entsprechend rascher Generationenfolge (Arten mit "Zellkonstanz") abgesehen, hat jeder Organismus im Rahmen des ständigen Turnover von Geweben Bedarf an neuen Zellen. Erkenntnisse über die zellbiologischen Strategien im Lauf der Regeneration sollten daher auch für das Verständnis der Mechanismen dieser "physiologischen Regeneration" hilfreich sein, wenn auch keineswegs beide Vorgänge notwendigerweise gleich ablaufen müssen.

Ein Regenerationspotential, das höhere Proliferationsleistungen voraussetzt, als man für die ständige Zellerneuerung im Rahmen der normalen physiologischen Prozesse erwarten würde, sollte sich auch zu wesentlichen Abläufen in der Biologie der Tiere in Beziehung setzen lassen. Es gibt tatsächlich mindestens zwei derartige Vorgänge, die entscheidend von der hohen Regenerationsfähigkeit profitieren: die Fähigkeit, lange Hungerperioden zu überdauern, sowie die asexuelle Vermehrung, welche bei Turbellarien weit verbreitet ist. Planarien können wochenlang hungern, schmelzen dabei ihre Gewebe – bei den Gonaden beginnend - zunehmend ein und wachsen bei Nahrungszufuhr wieder zu voller Größe heran, sofern nicht eine bestimmte Mindestgröße unterschritten worden ist (STOPPENBRINK, 1905). Asexuelle Reproduktion in Form von Querteilungen (Fissionen) kommt in zwei Typen vor: Bei der Architomie (sie ist bei Tricladen, also bei Planarien, die vorherrschende Form der asexuellen Fortpflanzung) werden die fehlenden Teile erst nach der Durchtrennung regeneriert (BRØNDSTED, 1969). Bei der Paratomie geht eine Organogenese in Primordialanlagen der Trennung der Tochtertiere voraus, wobei es zur vorübergehenden Bildung von Tierketten kommen kann. Paratomie findet man unter anderem bei der Gattung *Microstomum*, einem Vertreter der Ordnung Macrostomida (PALMBERG & REUTER, 1983). In der Acoelen-Gattung *Convolutriloba* gibt es neben sexueller Vermehrung die Fähigkeit, neue Individuen durch Quer- und Längsteilung (ÅKESSON et al., 2001) oder auch durch Knospenbildung am Hinterende abzuschnüren, wobei deren Polarität der des Muttertieres entgegengesetzt ist (HENDELBERG & ÅKESSON, 1988). Asexuelle Fortpflanzung kommt bei sehr ursprünglichen Turbellarienarten vor und scheint somit phylogenetisch alt zu sein (RIEGER, 1986). Ein großer Stammzellenpool ermöglicht einen entsprechend raschen Ablauf derartiger Vermehrungsvorgänge, welche die Regeneration etlicher Organsysteme implizieren. Die Eigenschaften und Funktionen dieser Stammzellen (Neoblasten) werden weiter unten erörtert (s. Kapitel 3).

2. 4. Fortpflanzung bei Turbellarien: ursprüngliche Verhältnisse oder ein Sonderfall in der Evolution?

Aus den eben geschilderten Fakten lässt sich vorbehaltlich der noch nicht endgültig geklärten Herkunft und zusätzlichen Funktionen von Neoblasten folgende Hypothese ableiten: Die Existenz der asexuellen neben der sexuellen Fortpflanzung, damit aber auch die auf einem großen Neoblastenpool basierende Stammzellenstrategie der Turbellarien, ist phylogenetisch alt und zusammen mit der Existenz von ursprünglich drei und nicht, wie

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

früher in der Regel angenommen, zwei für die Fortpflanzung der Bilateria zuständigen Zelltypen zu sehen. Zu den männlichen und weiblichen Gameten tritt eine Zelle, die man als "asexual spore" bezeichnen könnte (RIEGER & WEYRER, 1998). Ihre Besonderheit ist bei den Turbellarien unter anderem, dass sie als Stammzelle im Gegensatz zur sexuell entstandenen Zygote während des gesamten adulten Lebens persistiert und im extremen Fall sogar ganz an die Stelle der Gameten treten kann. Derlei Stammzellen bilden offensichtlich einen Teil des heterogenen Neoblastenkompartiments (s. Kapitel 3.5-6). Die Evolution sexueller, parthenogenetischer (pseudogamer) und asexueller Fortpflanzungsformen lässt sich an Hand bioenergetischer und ökologischer Überlegungen aus optimalen Anpassungen an unterschiedliche Nahrungsangebote erklären (CALOW et al., 1979). Asexuelle Reproduktion durch Architomie (Querteilung mit darauf folgender Regeneration der fehlenden Teile) ist danach für das Leben in nahrungsarmen Fließgewässern optimal. Folgende Tatsachen sprechen dafür, dass die Stammform der Bilateria sich weder nur sexuell noch rein asexuell fortpflanzte, sondern über die Option oder einen regelmäßigen Wechsel zwischen sexueller und asexueller Fortpflanzung verfügte:

(1) Eine regelmäßige Abfolge zwischen diesen Reproduktionsweisen findet man in dem als Metagenese bezeichneten Generationswechsel vielfach auch bei den Coelenteraten ebenso wie unter den Platyhelminthes, so bei den parasitischen Trematoden und Cestoden (siehe z.B. EHLERS, 1985).

(2) Bei den Turbellarien treten alle drei Fortpflanzungsformen immer wieder auch bei ein und derselben Art auf. Dadurch ist ein maximales Adaptationspotential gegeben, wobei auf lange Sicht die Möglichkeit zur Rekombination und damit eine für die weitere Evolution ausreichende genetische Vielfalt gewahrt bleibt. Mitunter wechselt sogar ein und dieselbe Population zwischen sexueller und asexueller Reproduktion; das ist wiederholt unter Freilandbedingungen wie auch bei Laborhaltung beobachtet worden. Manche Arten lassen sich durch geeignete Ernährung sogar künstlich "sexualisieren" (GRASSO & BENAZZI, 1973).

(3) Die Existenz eines eigenen "somatischen" Zelltyps, der in ununterbrochener Folge ohne Meiosen das individuelle Leben überdauert und in dieser Hinsicht der Keimbahn ähnlich ist, würde die Anschauung von der ursprünglichen Existenz dreier generativer Zelltypen bei Bilateriern erhärten. Ein solcher Zelltyp entspräche der oben zitierten "asexual spore" (RIEGER & WEYRER, 1998) und wird von vielen Autoren in Form einer totipotenten Stammzelle unter den Neoblasten der Turbellarien vermutet (s. Kapitel 3). Für evolutionsbiologische Überlegungen wäre es wichtig, zu wissen, ob es ihn tatsächlich gibt. Zur Klärung dieser Frage könnten die im Kapitel 3.7 beschriebenen Methoden beitragen.

2. 5. Eine asexuelle Planarienart als Modellorganismus

Einen Extremfall unter den Tricladen stellt *Dugesia tahitiensis* dar (Bild 2b, Seite 293). Bei dieser endemischen Inselart ist bisher nur Vermehrung durch Querteilung

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

(Fissiparie) nachgewiesen. Anders als bei asexuellen Stämmen anderer Planarienarten ist auch eine künstliche Sexualisierung (GRASSO & BENAZZI, 1973) bislang nicht gelungen (GOURBAULT, 1977). Aus Nachkommen der für die Erstbeschreibung dieser Art aufgesammelten Exemplare wurde eine Laborpopulation herangezogen, an welcher Basisdaten über Regeneration und Reproduktion erhoben worden sind. Im Vergleich zu den anderen bisher untersuchten Arten ist die mittels der Neubildung der Augen bestimmte Regenerationszeit mit 43 h – 59 h (nach 50 h hatten 50% der untersuchten Tiere neue Augen) am kürzesten. Die Experimente wurden bei 23 °C durchgeführt. Die Regeneration verläuft in allen Schnittebenen vom Vorderende bis etwa 0,5 mm vor der Schwanzspitze erfolgreich (PETER, 1995a). Die "Kopffrequenz" ("head frequency") ist somit 100%. Dieser Parameter ist bei einzelnen Arten unterschiedlich und wird als Index für das Regenerationspotential verwendet (BRØNDSTED, 1969; ŠIVICKIS, 1931). Nach einer neueren Reihung der Regenerationspotentiale von Planarien (TESHIROGI et al., 1977) entspricht *D. tahitiensis* dem am besten regenerierenden Typ 8. Vergleichsweise ebenfalls rasch regenerieren *Girardia tigrina*, die bei 24 °C in frühestens 3,8 Tagen ihren Kopf neu bildet (MEAD, 1985) und *Schmidtea* (*Dugesia*) *mediterranea* (BENAZZI et al. 1975), welche bei 17 °C in 50% der Fälle ihre Augen nach ca. 80 h regeneriert hat (BAGUÑÀ, 1976b). Die Regeneration läuft bei *D. tahitiensis* in der oben (Kapitel 2.2) geschilderten Weise ab. Ein kleines, unpigmentiertes Blastem ist nach etwa 16 Stunden äußerlich erkennbar (Abb. 4).

Der Ablauf der Fission konnte beobachtet und photographisch dokumentiert werden (PETER, 1994, 1995a; PETER & SCHÜRMANN, 1995). Der Prozess verläuft so, wie er für die

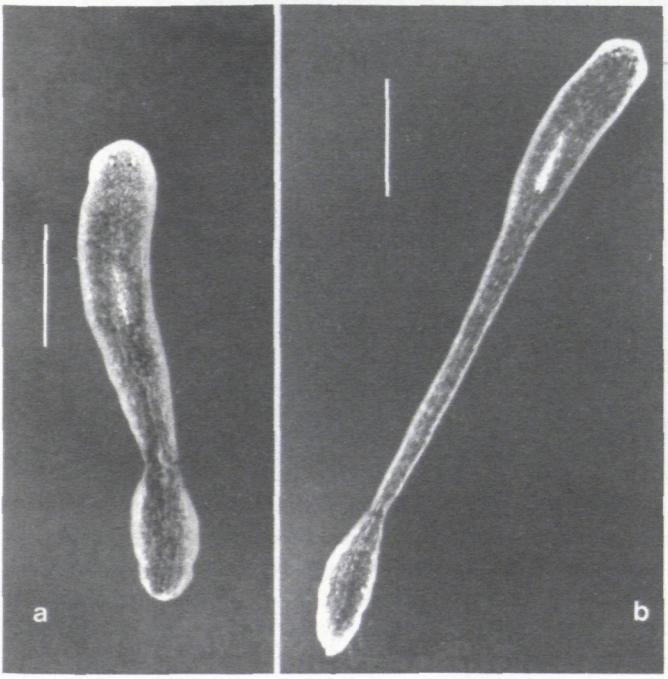


Abb. 2:
Dugesia tahitiensis, Stadien vor einer Fission (Querteilung):
a) Exemplar mit Einschnürung und stumpfem Hinterende, welches nach der vorhergegangenen Fission noch nicht vollständig regeneriert worden ist;
b) Tier mit vollständigem Hinterende und Einschnürung in extremer Streckung. Lebendaufnahmen (Zeiss Tessovar). Balken: 3mm.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

nordamerikanische *Girardia* (*Dugesia*) *dorotocephala* (WOODWORTH 1897) verbal beschrieben worden ist (MORITA & BEST, 1984c) und besteht im mechanisch bewirkten Durchreißen des Tieres an einer zuvor meist durch eine Einschnürung erkennbaren Körperstelle im Bereich des hinteren Körperdrittels (Abb. 2a). Vor der Teilung vollführen die Tiere oft extreme Dehnungen, wobei auch starke Einschnürungen häufig erst nach Stunden durchreißen (Abb. 2b). Während der hintere Teil des Körpers fest auf der Unterlage haftet, kriecht das Vorderende weiter, so dass es zum Durchtrennen des Körpers an der verengten Stelle kommt (Abb. 3). Für den Fissionsprozess bei *G. dorotocephala* wurde eine verminderte neurale Koordination zwischen Vorder- und Hinterende verantwortlich gemacht (MORITA & BEST, 1984c). Im Parenchym von *Dugesia japonica* lassen sich im Bereich der künftigen Querteilung Gap Junctions zwischen Parenchymzellen nachweisen (HORI & KISHIDA, 1998). Die auf die Querteilung folgende Regeneration (Abb. 4) erfolgt ersten Beobachtungen zufolge bei *D. tahitiensis* äußerlich gleich wie die Regeneration nach künstlichem Durchschneiden. Histologische Befunde dazu stehen allerdings für beide Vorgänge noch aus.

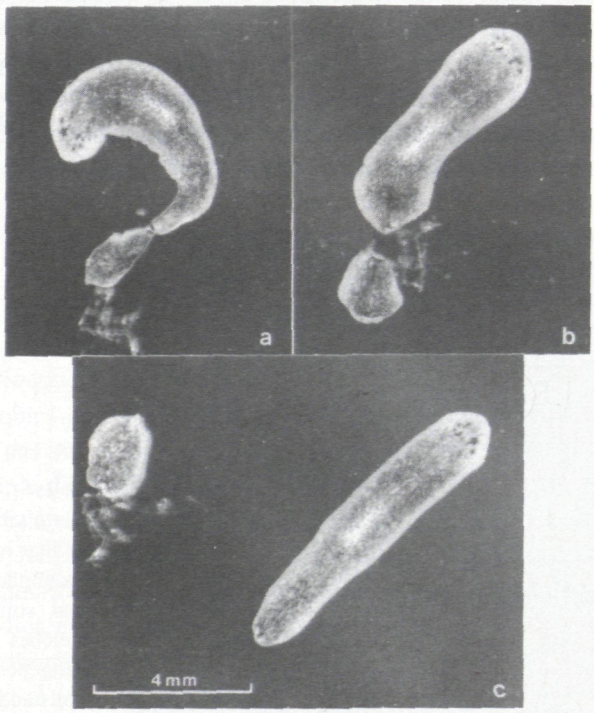


Abb. 3: Asexuelle Fortpflanzung durch Fission (Querteilung) bei *Dugesia tahitiensis*.
Drei aufeinander folgende Stadien: **a)** 3 Sekunden vor der Fission. Das Hinterende ist mit dem restlichen Körper nur noch durch eine dünne Gewebebrücke verbunden. **b)** Einen Sekundenbruchteil nach Durchreißen dieser Verbindung; **c)** 10 Sekunden später. Der Vorderteil ist mit fast unverminderter Geschwindigkeit weitergekrochen, während das hintere Fragment träge verweilt. Blitzphotos, Zeiss Tessovar. Aus PETER & SCHÜRMANN (1995).

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

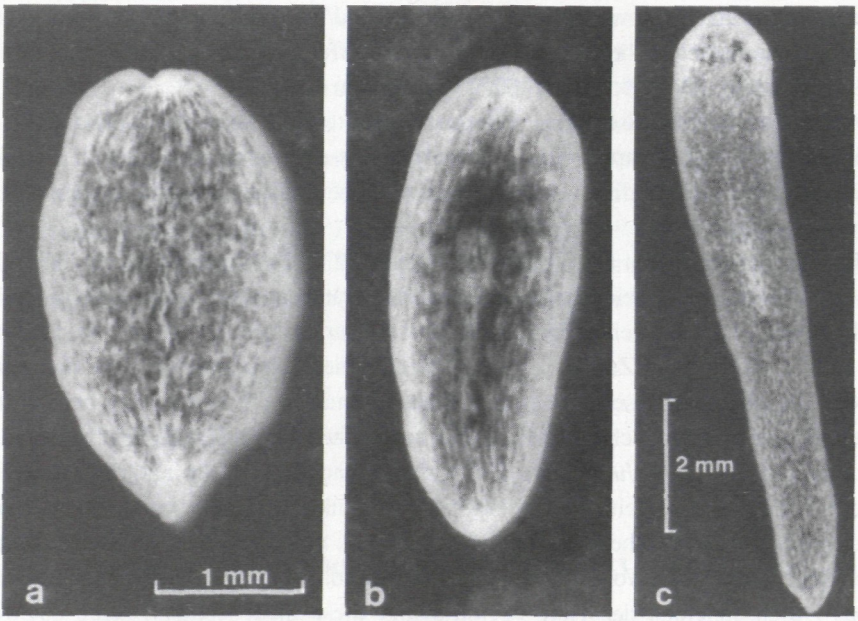


Abb. 4: *Dugesia tahitiensis*, Regenerationsstadien nach einer Fission.
Das in Abb. 3 abgespaltene Hinterende wurde **a)** 16 h, **b)** 58 h nach der Querteilung in Rückenansicht photographiert (Zeiss Tessovar). **c)** Vorderteil dazu, 41 h nach der Fission. Die Regeneration verläuft ähnlich wie nach Durchschneiden der Tiere. In (b) sind die winzigen, neu gebildeten Augen (Pigmentbecherocellen) erkennbar.

Die Populationsdichte wirkt sich auf die Fissionsrate hemmend aus (PETER, 1994, 1995a; PETER & SCHÜRMANN, 1997; PETER et al., 2001), wie dies auch für *G. dorotocephala* zutrifft (MORITA & BEST, 1984c). Auch in dieser Hinsicht erwies sich *D. tahitiensis* als extrem vermehrungsfähig, indem der hemmende Einfluss der Populationsdichte wesentlich geringer war als bei der nordamerikanischen Art. Die für diese beschriebene Hemmung der Fortpflanzung durch Melatonin bestätigte sich in den oben erwähnten Studien über *D. tahitiensis*. Der erwähnte Signalstoff ist im Organismenreich weit verbreitet und muss sehr früh in der Evolution entstanden sein (MORITA & BEST, 1993).

Auf Grund der soeben dargestellten Befunde erscheint *D. tahitiensis* als Modellorganismus für Studien über Regeneration, asexuelle Reproduktion und das Stammzellensystem von Tricladen aus den folgenden Gründen hervorragend geeignet:

(1) Einzeltiere bilden wegen der ausschließlich asexuellen Fortpflanzung ohne künstlichen Eingriff Klone. Die genetische Variabilität kann daher auf das durch neue Mutationen und einen allfälligen Mosaikcharakter des Zellbestandes der Tiere gegebene Maß beschränkt werden. Innerhalb der natürlichen Population gibt es allerdings sehr wohl Enzympolymorphismen (NASCETTI et al., 1990).

(2) Die Abwesenheit von Keimzellen erleichtert die Analyse der Neoblasten und ihrer

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Funktionen, indem sie weder deren Isolierung und Fraktionierung (s. Kapitel 4) stören noch Unsicherheiten bezüglich der Abkunft differenzierter Zellen (vgl. GREMIGNI, 1981; GREMIGNI & PUCCINELLI, 1977) verursachen können.

(3) Das extrem große asexuelle Vermehrungspotential lässt eine besonders hohe Neoblastendichte erwarten. Diese Erwartung hat sich bestätigt (Tab. 1). Neoblasten sollten sich daher aus dieser Art in besonders hoher Ausbeute gewinnen lassen (PETER & SCHÜRMANN, 1997).

(4) *Dugesia tahitiensis* lebt in tropischen Flüssen bei 23 – 24 °C (GOURBAULT, 1977). Diese Werte liegen im Bereich unserer Raumtemperaturen. Auf Tahiti ändern sich die Monatsmittel der Lufttemperatur auf Meeresniveau im Jahresgang im Bereich von 24,8 – 26,8 °C (STRETEN & ZILLMAN, 1984). Die täglichen Temperaturschwankungen sind in tropischen Urwaldflüssen sehr gering. Daher kommt die Laborhaltung bei konstanter Temperatur in thermischer Hinsicht den natürlichen Bedingungen sehr nahe. Für die einheimische *S. polychroa* trifft dies nicht zu; sie ist in ihren natürlichen Biotopen beträchtlichen jahreszeitlichen Temperaturschwankungen ausgesetzt. Gegenüber einheimischen kaltstenothermen Quellarten bietet *D. tahitiensis* neben wesentlich rascherer Regeneration den Vorteil der einfacheren Handhabung bei Raumtemperatur.

(5) Das Durchschneiden der Tiere beeinträchtigt diese nicht sichtbar. Nach österreichischem Recht fallen Turbellarien nicht unter das Tierversuchsgesetz. Entsprechende Experimente bedürfen daher keiner Anmeldung oder Genehmigung. Da ein dem künstlichen Durchschneiden verwandter Prozess, nämlich das Durchreißen der Tiere beim Fissionsvorgang, zum regelmäßigen Lebenszyklus gehört und auch die nachfolgende Regeneration in beiden Fällen ganz ähnlich abläuft, kann auf eine minimale zusätzliche Störung der Tiere durch den künstlichen Eingriff geschlossen werden. Im Gegensatz zur Situation bei höheren Tieren erscheinen daher ethische Bedenken, wie sie sonst bei Tierversuchen naheliegen, nicht angebracht.

3. Zellbiologie der Regeneration bei Turbellarien

3.1. Zelltypen von Turbellarien

Studien über die mikroskopische Anatomie der Turbellarien haben eine lange Tradition. Aktuelle Darstellungen findet man bei RIEGER (1981) und RIEGER et al. (1991). Da bei dieser Tiergruppe eine vollständige anatomische Beschreibung stets den Einsatz mikroskopischer Techniken erfordert, haben die anatomischen Untersuchungen auch zahlreiche Daten zur Cytologie und Histologie erbracht. Jedoch fehlen bislang systematische und groß angelegte cytologische Bestandsaufnahmen, wie wir sie für die Vertebraten kennen (siehe z. B. GENESER, 1986). Der Wissensstand auf diesem Gebiet muss daher in einem wesentlich größeren Maß als vorläufig gelten, als dies etwa für die Cytologie und Histologie der Säuger der Fall ist. Die in Zukunft zu erwartende Beschreibung neuer Zelltypen darf auch umso weniger überraschen, als bisher erst einige wenige Arten von Turbellarien diesbezüglich eingehend studiert worden sind. Angaben über die in Zellaus-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

strichen lichtmikroskopisch identifizierbaren Zelltypen liegen für Planarien vor (BAGUÑÀ & ROMERO, 1981; BAGUÑÀ et al., 1990; ROMERO & BAGUÑÀ, 1991). Die zitierten Autoren unterscheiden je nach Art 12-13 verschiedene Zelltypen (s. Tab. 1), wobei sie bei den Drüsenzellen eine größere Zahl von Typen vermuten, als sie in ihren Präparaten einwandfrei erkennen konnten. Untersuchungen mit monoclonalen Antikörpern haben allerdings schon jetzt eine wesentlich größere Vielfalt enthüllt. Es wurden für einzelne Zelltypen spezifische Antikörper und unter diesen regional spezifische Moleküle gefunden; davon reagierten 7% mit allen Zellen und 10% mit mehr als einer Zelle. Allerdings hat man bisher keinen Antikörper entdeckt, der sich ausschließlich gegen Neoblasten richtet (BUENO et al., 1997).

Tab. 1: Anteil verschiedener Zelltypen am Körper von 3 Planarienarten aus der Familie Dugesiidae

Die Zellen wurden nach Mazeration und Fixierung ganzer Tiere nach BAGUÑÀ & ROMERO (1981) unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt. Die Millimeterwerte beziehen sich auf die Körperlängen. Die Werte für *G. tigrina* und *S. mediterranea* wurden aus der eben zitierten Publikation übernommen und basieren auf je 10 Tieren (vgl. auch BAGUÑÀ et al., 1990). Die Zahlen für *Dugesia tahitiensis* entstammen einer Pilotstudie an 4 Tieren und sind als vorläufig einzustufen, weil für eine genaue Bestimmung entsprechende Färbeverfahren angewendet werden müssen.

Zelltypen	**Anteil in % aller Zellen einer Planarie der Art**			
	Dugesia tahitiensis	***Girardia tigrina***	***Schmidtea mediterranea***	
	8 mm	**7 mm**	**7 mm**	**16 mm**
Neoblasten	44	32	28	18
Nervenzellen	6	22	16	8
Epithelzellen	7	12	13	11
Parenchymzellen	3	10	15	25
Acidophile Drüsenzellen	4	3	6	9
Basophile Drüsenzellen	5	3	4	8
Pigmentzellen	1	1	1	2
Muskelzellen	9	2	3	2
Gastrodermalzellen	3	4	4	6
Kolbenzellen	2	1	1	1
Flammenzellen	1	–	1	2
Rhabditenzellen	3	10	2	2
"Gestreifte Zellen"	2	–	1	1
Nicht zugeordnet	10	–	5	5

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

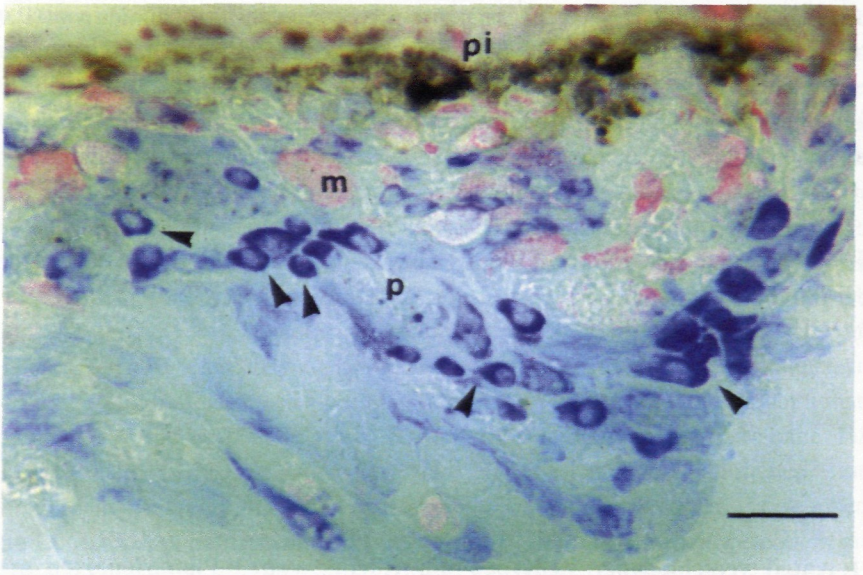


Bild 3: Histologischer Schnitt durch das Parenchym der Planarie *Schmidtea polychroa.* Nach Paraffineinbettung gefärbt mit Azur A – Eosin B (PEDERSEN, 1959a, b). Diese Färbung ist für Neoblasten spezifisch. Das Cytoplasma und der Nucleolus dieser Zellen (Pfeilköpfe) erscheinen intensiv blau, der Kern ist blass blau gefärbt; m: Muskelzellen, p: Parenchymzellen, pi: Pigmentzellen. Balken: 30 µm. Mit freundlicher Genehmigung aus SCHÜRMANN (1993).

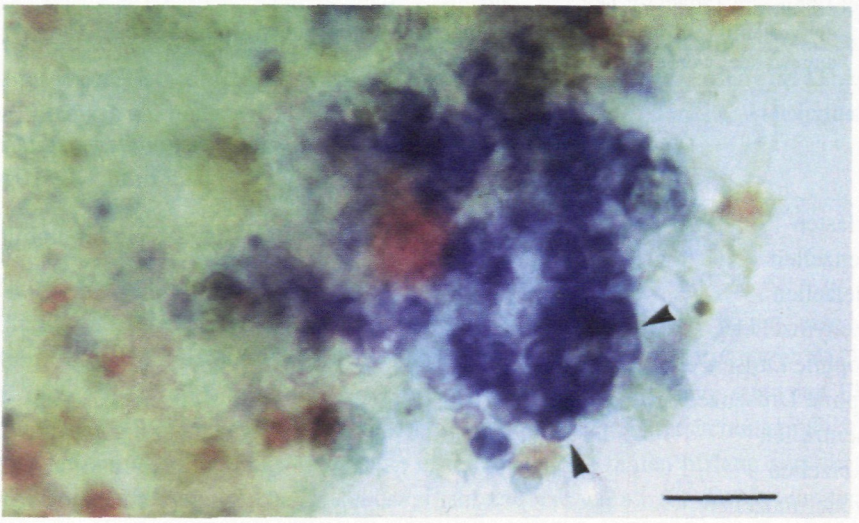


Bild 4: Neoblastenisolierung aus *Schmidtea polychroa* nach BETCHAKU (1967).
Stadium nach 24 h, gefärbt mit Azur A – Eosin B wie für Bild 3. Aus dem in hypotonem Medium (HOLTFRETER-Lösung, 5/8 - konzentriert, 77 mOsmol/kg) befindlichen Gewebefragment sind zahlreiche Neoblasten ausgetreten (Pfeilköpfe). Sie aggregieren miteinander und sind an der intensiv blauen Färbung erkennbar. Balken: 30 µm. Mit freundlicher Genehmigung aus SCHÜRMANN (1993).

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

3. 2. Neoblasten, ein besonderer Zelltyp: Beobachtungen und Korrelationen

Der Zelltyp des Neoblasten fiel bereits frühzeitig auf und wurde zuerst als "Bildungszelle" bezeichnet (VON WAGNER, 1890). Die cytologische Beschreibung trifft auf den gegenwärtig meist als "Neoblast" (RANDOLPH, 1897; DUBOIS, 1949) bezeichneten Zelltyp zu; die mit dem Namen ausgedrückte Funktion wurde zunächst aus dem gehäuften Auftreten solcher Zellen in Regenerationsblastemen erschlossen. Die Bezeichnung "Regenerationszellen" findet sich bereits bei STOPPENBRINK (1905). In weiterer Folge wurde dieser Zelltyp noch mit etlichen anderen Namen bezeichnet (BRØNDSTED, 1969). Neuerdings ist, offensichtlich im Hinblick auf die noch ungeklärte Herkunft dieser Zellen und ihre nach wie vor nicht ausreichend erforschten Funktionen und Differenzierungswege, für sie der Ausdruck "undifferenzierte Zellen" ("undifferentiated cells") verwendet worden (HORI & KISHIDA, 1998). Übersichten über die Eigenschaften und Funktionen von Neoblasten geben unter anderen BAGUÑÀ (1981, 1998), BAGUÑÀ et al. (1988, 1990, 1994), GREMIGNI (1981, 1988), LANGE (1983) und PEDERSEN (1959b, 1972). Lichtmikroskopisch lassen sich Neoblasten an ihrer kugelförmigen, ovoiden oder birnenförmigen Gestalt, ihrer hohen Kern-Plasma-Relation, dem extrem basophilen Cytoplasma und einem prominenten Nucleolus erkennen. Als spezifische Färbemethoden haben sich Azur A - Eosin B und Methylgrün - Pyronin bewährt (PEDERSEN, 1959a, b). Für Planarien werden je nach Art und Vorbehandlung Zelldurchmesser von 8 – 15 µm und Kerndurchmesser von 5 – 11 µm angegeben (BAGUÑÀ & ROMERO, 1981; SAUZIN-MONNOT, 1973). Bei *S. polychroa* und *D. tahitiensis* beträgt der Zelldurchmesser frisch isolierter, lebender Neoblasten 10 – 13 µm, ihr Kerndurchmesser 9 – 11 µm; in fixierten und gefärbten Präparaten wurden 8 – 12 µm für den Zelldurchmesser und 7 – 9 µm für den Kerndurchmesser gefunden (SCHÜRMANN et al., 1998). Für das wesentlich kleinere *Macrostomum* wurden Neoblastendurchmesser von 5 – 9 µm ermittelt (RIEGER et al., 1999). Ein bis zwei Zellfortsätze sind in histologischen Schnitten (Bild 3, Seite 306) und in Zellkulturen (s. Kapitel 4.3) häufig zu beobachten. Das Cytoplasma bildet einen schmalen Saum und enthält stets Ribosomen in großer Zahl (daher auch die starke Basophilie) sowie Mitochondrien (MORITA et al., 1969). Unterschiede in der Größe und Organellenausstattung werden in aller Regel im Sinne von Stadien während der Zelldifferenzierung gedeutet (HORI, 1992, 1997; SAUZIN-MONNOT, 1973).

Bei Beginn der Differenzierung treten zuerst endoplasmatisches Reticulum und Golgiapparat auf (HORI, 1992, 1997; RIEGER et al., 1999; SAUZIN-MONNOT, 1973). Bei Planarien findet man dann auch sogenannte "chromatoid bodies" außen am Kern (PEDERSEN, 1972). Diese enthalten RNA (AULADELL et al., 1993) und wurden bei anderen Turbellarienordnungen bisher nicht gefunden (RIEGER et al., 1999). Am besten sind die Neoblasten von Planarien untersucht. Für sie wurde auch die spezifische Färbung mit Azur A - Eosin B sowie mit Methylgrün-Pyronin ursprünglich beschrieben (PEDERSEN, 1959a, b). Die spezifische Färbbarkeit mit Azur A - Eosin B konnte für die beiden Arten *S. polychroa* und *D. tahitiensis* bestätigt werden (SCHÜRMANN, 1993; SCHÜRMANN et al., 1998) und trifft auch für *Macrostomum* zu (RIEGER et al., 1999). Eine optimale Färbung wird bei pH 5 erzielt. Bisher gibt es keine Anhaltspunkte für Neoblastentypen mit unter-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

schiedlicher Differenzierungskompetenz. Aus Strukturdetails wurden früher lediglich unterschiedliche Differenzierungsstadien auf dem Weg von Neoblasten zu somatischen Zellen abgeleitet (siehe z. B. HORI, 1992). Die meisten Autoren ordnen diese Zellen daher einem einzigen Typ totipotenter Stammzellen zu. Dies folgt jedoch aus den cytologischen Befunden keineswegs zwangsläufig (s. etwa HAY & COWARD, 1975). Wie weiter unten dargelegt wird (Kapitel 3.5-6), gibt es Anzeichen für eine Heterogenität des Neoblastenpools und auch kontroversielle Ansichten bezüglich der Herkunft und der Funktionen dieser Zellen. Auch ist eine lichtmikroskopische Unterscheidung mehrerer Neoblastentypen gelungen, deren Rolle und Bedeutung allerdings noch nicht geklärt ist (SCHÜRMANN et al., 1998).

Neoblasten haben einen wesentlichen Anteil am Turbellarienkörper. Genaue Daten gibt es bisher nur für Triclade (Planarien). Dort nehmen sie in gut genährten Exemplaren bezüglich ihrer Zahl (wegen ihrer Kleinheit allerdings nicht hinsichtlich ihrer gesamten Masse) den größten Anteil unter allen Zellen ein. Ein Teil dieser Zellen wird heute überwiegend als totipotente oder wenigstens pluripotente Stammzellen interpretiert (s. Kapitel 3.3, 5, 6). Ein so hoher Anteil an Stammzellen dürfte im Tierreich eine ungewöhnliche Situation darstellen. Unter den bisher bekannten Zahlen nimmt der Neoblastenanteil in *Dugesia tahitiensis* die Spitze ein (PETER & SCHÜRMANN, 1997). Eine erste Zählung ergab einen Neoblastenanteil von 44% der gesamten Zellzahl (Tab. 1). Die Korrelation dieses Wertes mit dem extrem hohen Regenerationsvermögen von *D. tahitiensis* beleuchtet gut die für die asexuelle Fortpflanzung vermutete Bedeutung dieses Zelltyps (s. auch Kapitel 2.5). Allerdings darf daraus nicht gefolgert werden, Arten mit großem Neoblastenpool seien in jedem Fall zu asexueller Reproduktion fähig. Es gibt nahe verwandte Arten von Tricladen mit ähnlich großem Neoblastenpool, die sich entweder nur sexuell, nur asexuell oder auf beide Weisen fortpflanzen. Darüber hinaus ist asexuelle Fortpflanzung bei einer ganzen Tricladenfamilie, nämlich den Dendrocoelidae, bisher nicht bekannt, obwohl ihre Vertreter nicht wesentlich weniger Neoblasten besitzen als manche Vertreter der Planariidae und Dugesiidae (BRØNDSTED, 1969; ROMERO et al., 1991a). Ebenso ist etwa *Macrostomum* eine rein sexuelle Gattung, während sich der verwandte Macrostomorphe *Microstomum* sexuell und asexuell fortpflanzt. Es muss also noch weitere Faktoren geben, die über Regenerationsfähigkeit und Reproduktionsmodus entscheiden.

Die vorherrschende Reproduktionsweise scheint dabei in enger Beziehung zu ökologischen Faktoren zu stehen, wobei die gemeinsame Abkunft von Keimzellen und somatischen Zellen aus einem Stammzellenpool die Wahl möglicherweise erleichtert (PETER et al., 2001). Der Neoblastenanteil an der gesamten Zellzahl dürfte somit das Potential für Regeneration und asexuelle Reproduktion bezeichnen, welches – je nach den anderen Faktoren – mehr oder weniger herangezogen wird. Bei *D. tahitiensis* ist es offensichtlich unter den bisher untersuchten Planarienarten im Sinne einer maximalen Regenerations- und Reproduktionsrate und einer ausschließlich asexuellen Fortpflanzung am meisten genützt.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

3. 3. Neoblasten bauen neue Gewebe auf.

Die Funktion der Neoblasten musste lange Zeit aus den histologischen Befunden erschlossen werden. Für die Tricladen (die Planarien), deren Neoblasten am ausführlichsten beschrieben worden sind, ist der Vergleich dieser Zellen in verschiedenen Regenerationsstadien weiterhin eine Hauptquelle der Information. Man beachte, dass die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse und Argumente für sich nur etwas über das weitere Schicksal der Neoblasten, jedoch nichts über deren Herkunft aussagen. Ihre Stammzellnatur, die für die meisten Experten als sehr wahrscheinlich gilt, hängt jedoch wesentlich von der Herkunft dieser Zellen ab und wird weiter unten (Kapitel 3.6) erörtert.

Aus folgenden Beobachtungen leitete man die obligate Beteiligung von Neoblasten an der Regeneration ab:

(1) In Blastemen von regenerierenden Planarien findet man in den Neoblasten und neoblastenähnlichen Zellen mit zunehmender Regenerationsdauer ultrastrukturell eine Zunahme der Differenzierungsmerkmale, wie ER und Golgiapparat, ehe ausdifferenzierte Zellen erscheinen (s. auch Kapitel 2.2; HORI & KISHIDA, 1998; PEDERSEN, 1972). Wird eine Wunde bei *S. polychroa* durch Magnesiumionen künstlich offen gehalten, so kommt es über mehrere Tage hinweg an der Schnittfläche zu einem Verlust von Neoblasten , die durch massives Einwandern solcher Zellen in die Wundregion ersetzt werden. Auch dieser Befund unterstreicht die Beteiligung von Neoblasten an der Regeneration (SCHÜRMANN & PETER, 1998).

(2) Mitosen sind bisher, soweit überhaupt nach dem Zelltyp gefragt wurde, bei Turbellarien nur in Neoblasten gefunden worden. Sollten tatsächlich nur diese Zellen proliferationsfähig sein, so wären sie also ein notwendiges Stadium für jede Zellerneuerung. Die meisten, freilich nicht gerade zahlreichen Beobachtungen liegen für Planarien vor (siehe z.B. BAGUÑÀ, 1976a, b; MORITA & BEST, 1984b). Insbesondere sind dazu nur wenige Photographien publiziert worden. Da mitotische Zellen sich auch morphologisch von Interphasezellen unterscheiden, sind Irrtümer bei deren lichtmikroskopischer Identifizierung leicht möglich (BEST et al., 1968). Spezifische Antikörper sollten eine eindeutige Zuordnung ermöglichen, konnten aber bisher für Neoblasten nicht produziert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, welche die Diagnose des Zelltyps mit größerer Sicherheit ermöglichen als lichtmikroskopische Präparate, in denen nur die Chromosomen gefärbt sind, findet man bei MORITA & BEST (1984b) für die Planarie G. *dorotocephala* und bei RIEGER et al. (1999) für *Macrostomum hystricinum marinum* RIEGER 1977. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen unter den zitierten Arbeiten bedienten sich außerdem nicht spezifischer Neoblastenfärbungen, der Zelltyp wurde offenbar aus Größe und Gestalt erschlossen. Andererseits existiert aber auch kein eindeutiger Nachweis einer Mitose in einer differenzierten somatischen Turbellarienzelle (siehe z.B. EHLERS, 1992).

(3) Aus Bestimmungen des DNA-Gehalts von Zellkernen wurde geschlossen, dass Zellen in der G2-Phase nur unter Neoblasten zu finden sind (SALÓ & BAGUÑÀ, 1984). Unter der Voraussetzung der zuverlässigen Zuordnung der Zelltypen, die auch hier ohne spe-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

zifische Neoblastenfärbungen erfolgte, ist dies ein weiterer Beweis für die Rolle der Neoblasten als Stadien auf dem Weg zu neuen differenzierten Zellen.

Die verlässlichsten Aussagen über das Schicksal von Zellen lassen sich allerdings mit Hilfe stabiler Markierungen und mittels Transplantationsexperimenten machen (siehe z.B. BAGUÑÀ et al., 1989a, 1990). Solche Versuche, welche bei ausreichend langer Dauer auch die Herkunft der Neoblasten aufklären sollten, werden im Kapitel 3.6 beschrieben. Berücksichtigt man alle oben diskutierten Ergebnisse einschließlich der vielen Indizien für die Funktion der Neoblasten als Vorläufer differenzierter Zellen, so muss man sie nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand als die einzigen proliferationsfähigen Zellen bezeichnen. Sie müssen damit zwangsläufig Stadien auf dem Weg zu neuen differenzierten Zellen zumindest in jenen Fällen sein, in denen im Rahmen der Epimorphose durch Zellteilungen neue Gewebe gebildet bzw. im Rahmen der physiologischen Regeneration abgenützte Zellen erneuert werden. Wenn man annimmt, dass Neoblasten nur aus ihresgleichen und nicht auch durch Dedifferenzierung entstehen können, so gelangt man zur Auffassung von einem totipotenten Stammzellenpool (s. Kapitel 3.6).

3. 4. Ist Dedifferenzierung an der Regeneration von Turbellarien beteiligt?

Regenerierte Zellen entstehen nicht in allen Systemen aus Stammzellen. Bei der eingehend untersuchten Linsenregeneration der Amphibien gehen, wie in anderen Fällen auch, die neu gebildeten Teile durch Dedifferenzierung vorhandenen Gewebes und anschließende Neudifferenzierung hervor (EGUCHI, 1998). Es wird also ein Weg der Transdifferenzierung beschritten. Bereits in der Frühzeit der Turbellarienforschung gab es zwei konkurrierende Theorien zur Erklärung der Regeneration. Die Neoblastentheorien (z.B. MORGAN, 1900) leiten alle regenerierten Gewebe von Stammzellen ab und sind mit den oben (Kapitel 3.3) geschilderten zellbiologischen Befunden vereinbar. Demgegenüber machen Dedifferenzierungstheorien (z.B. STEINMANN, 1927) ausschließlich ausdifferenzierte Zellen für den Ursprung der neuen Gewebe verantwortlich (vgl. auch BRØNDSTED, 1969). Andere Hypothesen nehmen zum Teil eine direkte Dedifferenzierung oder Umdifferenzierung (Metaplasie) im lokalen Regenerationsbereich an. Als Beweise werden in der Regel Zellstrukturen angeführt, die als intermediäre Strukturen im Verlauf einer De- oder Redifferenzierung gedeutet werden (COWARD et al., 1974; HAY, 1968). Da man immer nur "Momentaufnahmen" eines Vorgangs untersucht, kann aus einer solchen Rekonstruktion nur das Stadium einer Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung wirklich eindeutig erschlossen werden. Die Reihung von Stadien auf Grund der Strukturunterschiede muss letztlich spekulativ bleiben. Außerdem müssten die betreffenden Befunde im Licht der aktuellen Kenntnisse über Nekrose und Apoptose nachgeprüft werden (TOMEI & COPE, 1991). Bereits PEDERSEN (1972) hat vermeintlich in Dedifferenzierung begriffene Stadien als nekrotische Zellen identifiziert. Den Neoblasten wird in den Dedifferenzierungshypothesen in der Regel keine Bedeutung als Regenerationszellen beigemessen. Unter anderem wurde ihr Charakter als eigener Zelltyp wegen der angeblichen Verwechslungsmöglichkeit mit Drüsenzellen

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

(großen basophilen Zellen) angezweifelt (COWARD & HAY, 1972; HAY & COWARD, 1975). Wie bereits PEDERSEN (1972) anmerkt, widerlegt diese Kritik aber nicht die Existenz von Neoblasten, die tatsächlich insbesondere mit frühen Differenzierungsstadien basophiler Drüsenzellen verwechselt werden könnten. Dies bestätigt nur die Heterogenität des Neoblastenkompartiments und die Unzulänglichkeit der Identifizierung von Neoblasten mit dem Lichtmikroskop allein. Die von COWARD & HAY (1972) beschriebenen ß-Zellen (kleine basophile Zellen) entsprechen den sonst als Neoblasten bezeichneten Zellen genau. Die erwähnten Autoren bestreiten zwar diese Identität, bezeichnen aber ihre ß-Zellen als Progenitorzellen für die physiologische Regeneration von Planarien (HAY & COWARD, 1975).

Eine cytophotometrische Analyse auf Grund der für einige Zelltypen des triplohexaploiden Biotyps B von *S. polychroa* unterschiedlichen DNA-Gehalte (3n für Neoblasten und somatische Zellen, 2n für Spermatogonien, 6n für Oogonien) zeigte, dass bei der Neubildung von Köpfen neue somatische Zellen (im untersuchten Fall Muskelzellen) nicht nur aus Neoblasten, sondern auch aus Spermatogonien entstehen können (GREMIGNI, 1981). In regenerierenden Tieren wurden außerhalb der Gonadenregion sogar hexaploide Mitosestadien gesehen (GREMIGNI & PUCCINELLI, 1977). Allerdings wurden diese an Quetschpräparaten von Blastemen beobachtet, wo nach Meinung anderer Autoren (siehe z.B. BAGUÑÀ, 1998) keine Zellteilungen ablaufen. Außerdem wurde der Differenzierungsweg derartiger Zellen nicht verfolgt. Eine ähnliche Kritik äußert BAGUÑÀ (1998), welcher die Resultate GREMIGNIS (1981) statt durch eine Transdifferenzierung von Spermatogonien damit erklärt, dass Stammzellen nach der einer Spermiogenese vorausgehenden Reduktion der Chromosomenzahl von 3n auf 2n nicht den "planmäßigen" Weg zu Keimzellen beschritten, sondern sich zu Muskelzellen differenzierten. Eine Generalisierung dieses Ergebnisses auf andere Arten war bisher nicht möglich.

Schließt man sich der Meinung vom Aufbau des somatischen Anteils einer Planarie aus zwei Kompartimenten, nämlich einem funktionellen aus differenzierten und nicht mehr teilungsfähigen und einem aus proliferierenden undifferenzierten Zellen, den Neoblasten, an (BAGUÑÀ, 1998; LANGE, 1983), dann muss die Neoblastentheorie als erwiesen gelten. Für diese Theorie sprechen auch die Ergebnisse der weiter unten (Kapitel 3.6) beschriebenen Markierungs-, Bestrahlungs-, Transplantations- und Injektionsversuche zusammen mit der Tatsache, dass Regenerationsblasteme aus Neoblasten gebildet werden. Diese Feststellung impliziert allerdings zwei wesentliche Einschränkungen:

(1) Eine zusätzliche Rolle von Transdifferenzierungen beim Regenerationsprozess von Turbellarien ist bisher nicht ausgeschlossen worden. Neuere Beobachtungen an Säugerzellen lassen eine Beteiligung von Dedifferenzierungsprozessen durchaus plausibel erscheinen. So entwickelten sich transplantierte Neuralzellen bei Bedarf zu hämatopoietischen Zellen, aus Knochenmarks- und Blutzellen entstanden *in vivo* Gefäßendothelzellen und Muskelzellen (WEISSMAN, 2000).

(2) Die Beteiligung von Stammzellen am Neoblastenkompartiment (BAGUÑÀ, 1998) ist zwar sehr wahrscheinlich, aber bisher nicht endgültig bewiesen. Dazu müsste mit Hilfe von stabilen Langzeitmarkierungen die Herkunft der Neoblasten verfolgt werden (s.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Kapitel 3.6-7). So ließe sich ein sich selbst erneuernder Stammzellenpool eindeutig nachweisen. Die zur Zeit vorliegenden Ergebnisse lassen sich auch durch die Hypothese erklären, Neoblasten seien identische (oder auch nur morphologisch ähnliche bis gleiche) Durchgangsstadien auf verschiedenen Transdifferenzierungswegen und zugleich die einzigen proliferationsfähigen Zellen.

Eine obligate Beteiligung von Neoblasten trifft jedenfalls dort zu, wo verloren gegangenes Material durch Neubildung, also in einer Epimorphose, entsteht. Dies gilt nicht unbedingt für morphallaktische Prozesse, also Umbauten existierender Gewebe durch ein Rearrangement von Zellen, allenfalls unter Änderung des Differenzierungszustandes. Solche Vorgänge finden in Planarien zusätzlich zu den Neubildungen im Regenerationsblastem statt (siehe z.B. MEAD & CHRISTMAN, 1998; MORGAN, 1900).

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Wenigstens ein Großteil der im Rahmen der Regeneration und Zellerneuerung in Turbellarien neu gebildeten Zellen geht aus Neoblasten hervor. Herkunft und Differenzierungswege der Neoblasten sind ebenso wie die Zusammensetzung des Neoblastenpools (insbesondere auch in Bezug auf den Anteil an echten Stammzellen) noch nicht hinreichend geklärt. In einigen Fällen wurden zusätzlich zur Beteiligung der Neoblasten Transdifferenzierungsprozesse für Regenerationsvorgänge verantwortlich gemacht. Ältere, auf mikroskopische Befunde gegründete Anschauungen über eine ausschließliche Rolle von Transdifferenzierungsprozessen bei der Regeneration von Planarien wären mit modernen Methoden nachzuprüfen.

3. 5. Die Heterogenität des Neoblastenkompartiments

Die oben erwähnte Verteilung der somatischen Zellen eines Turbellars auf zwei Kompartimente gründet sich auf zellkinetische Befunde. Alle differenzierten Zellen sind nicht mehr teilungsfähig. Diesen steht ein proliferierendes Kompartiment gegenüber, das man als Neoblastenpool bezeichnen könnte (BAGUÑÀ, 1998; BAGUÑÀ et al., 1988). Aus den oben (Kapitel 3.3) dargelegten Beobachtungen über den Ursprung regenerierter Zellen und Gewebe aus Neoblasten ist deren Totipotenz abzuleiten. Diese bezieht sich entweder auf einen einzigen Zelltyp, falls es einen einzigen Stammzelltyp innerhalb des Neoblastenkompartiments gibt, oder auf ein Stammzellensystem für den Fall mehrerer Linien von Stammzellen. Wie bereits diskutiert wurde (s. Kapitel 3.4), könnten wenigstens manche Neoblasten Transdifferenzierungsstadien sein. Neoblasten- und Dedifferenzierungstheorien schließen einander also nicht zwangsläufig aus.

Da Neoblasten lichtmikroskopisch definiert wurden und sich frühe, bereits determinierte Blastemzellen, wie schon erwähnt, auf diese Weise nicht unbedingt von undifferenzierten Stammzellen unterscheiden lassen (siehe z.B. PEDERSEN, 1972), muss der Neoblastenpool heterogen sein. Aus zellkinetischen Befunden (mindestens zwei Zellzyklen mit unterschiedlicher Dauer) wurden für Süßwasserplanarien darüber hinaus folgende Details über diesen Zellpool abgeleitet (BAGUÑÀ, 1998): 20-30% der Neoblasten sind tatsächlich undifferenzierte Zellen; diese sind etwa je zur Hälfte wahre Stammzellen mit unbe-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

schränkter Teilungsfähigkeit und beschränkt teilungsfähige Progenitorzellen auf dem Weg zu differenzierten Zellen (BAGUÑÀ & ROMERO, 1981). Zur Zeit kann nichts darüber gesagt werden, in welcher Weise sich die Differenzierungswege solcher Progenitorzellen auftrennen und ob es Übergänge zwischen diesen Wegen gibt, wenn z.B. ein bestimmter Zelltyp vermehrt gebraucht wird.

Bei Turbellarien ist – anders als sonst – nicht die G1-, sondern die G2-Phase in der Länge variabel (PALMBERG, 1990; SALÓ & BAGUÑÀ, 1984). Unter geeigneten Bedingungen (Nahrungsaufnahme) bzw. im Bedarfsfall (Regeneration und Wachstum) können daher rasch und ohne vorherige DNA-Synthese Mitosen ablaufen und sich anschließend allenfalls neue Zellen differenzieren. Aus dem Auftreten von zwei Mitosemaxima nach dem Dekapitieren von *G. tigrina* und *S. mediterranea* (vgl. auch MORITA & BEST, 1984b) im Zusammenhang mit dem Einfluss, den Hydroxyharnstoff, welcher die DNA- Synthese in der S-Phase hemmt, auf diese Maxima hat, haben SALÓ und BAGUÑÀ (1984) auf mindestens zwei Zellzyklen mit unterschiedlicher Dauer geschlossen. Aus denselben Daten wurde folgende geschätzte Aufteilung der Neoblasten auf die einzelnen Zellzyklusphasen abgeleitet: 70% in der G1-Phase und je 15% in der S-Phase und der G2-Phase. Allerdings wurde ein so hoher Anteil von Zellen in der G2-Phase neuerdings in Frage gestellt (NEWMARK & SÁNCHEZ ALVARADO, 2000). Interessanterweise liegen die Verhältnisse bei *Microstomum* ähnlich (PALMBERG, 1990): Die Kinetik der Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin (s. auch Kapitel 3.6) lässt einen schnellen Übergang des Labels aus Neoblasten in differenzierte Zellen innerhalb von 6 h und zugleich einen noch nach 45 h markierten Neoblastenanteil mit langsamem Zellzyklus erkennen.

Für *Microstomum* wurden diese beiden unterschiedlich langen Zyklen den zwei nach der Centriolenzahl unterscheidbaren Neoblastentypen (s. unten) zugeordnet. Zwei Neoblastentypen sind nach ihren cytologischen Merkmalen und der Lage im Körper wiederholt unterschieden worden. Angaben über ihre gegenseitige Beziehung (getrennte, unabhängige Zelllinien oder Bildung aus gemeinsamen Mutterzellen) lassen sich derzeit allerdings nicht machen. Neoblasten mit Bündeln von Centriolen rekrutieren bei *Catenula* neue Epithelzellen, solche ohne diese Strukturen sind für alle übrigen Zellen kompetent (MORACZWESKI, 1977). Die gleichen beiden Typen fand PALMBERG (1990) beim Macrostomorphen *Microstomum* und beim Catenuliden *Stenostomum*. Bei diesen beiden Gattungen liefert der Zelltyp mit mehreren Centriolen alle bewimperten Zellen (also auch die Flammenzellen), der zweite (gastrodermale) Typ bildet alle übrigen Zellen. Dies konnte durch Autoradiographien nach ^{3}H-Thymidininkorporation nachgewiesen werden. Bei *Macrostomum* lassen sich auf Grund der Lokalisation ebenfalls zwei Neoblastentypen unterscheiden: gastrodermale, basiepithelial angeordnete Neoblasten im Darmbereich und solche entlang der Längsnervenstränge (RIEGER et al., 1999). Die an den Längsnervensträngen liegenden Neoblasten dieser Gattung inkorporieren BrdU, das sich bei regenerierenden Tieren später im Regenerationsblastem nachweisen lässt (LADURNER et al., 1998, 2000). Im Gegensatz zu *Microstomum* konnte allerdings keine unterschiedliche Centriolenzahl festgestellt werden. Der Vergleich der beiden Macrostomorphen *Microstomum* und

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Macrostomum zeigt ebenso wie jener zwischen den Catenuliden *Catenula* (MORACZWESKI, 1977) und *Stenostomum* (PALMBERG, 1990), wie sehr das Neoblastenkompartiment offenbar selbst zwischen verschiedenen Gattungen innerhalb einer Ordnung differieren kann.

Für die Existenz mehr oder weniger determinierter Progenitorzellen unter den Neoblasten sprechen auch Ergebnisse über die Regenerationsfähigkeit von Planarien nach Röntgenbestrahlung. Damit ein Regenerationsblastem nicht nur gebildet wird, sondern sich dessen Zellen auch differenzieren, ist offensichtlich eine ausreichende Zahl differenzierungsbereiter Progenitor- oder Stammzellen erforderlich. Das lässt sich aus dem Verhalten von Blastemen schließen, welche von Planarien nach einer Bestrahlung mit letalen Röntgendosen von 2 – 8 kR (das sind ca. 2.000 - 8.000 cGy) gebildet wurden. So bestrahlte Tiere leben noch etwa 6 Wochen weiter, sterben aber dann. Dafür wird die irreversible Schädigung der Neoblasten durch die Bestrahlung verantwortlich gemacht. Es ist anzunehmen, dass der Nachschub an Neoblasten ausbleibt, weil diese unter dem Einfluss der Bestrahlung abgebaut werden (KRATOCHWIL, 1962). Jedenfalls sollte es bei so hohen Strahlendosen keine oder keine ungestörten Mitosen mehr geben. Dekapitiert man *Schmidtea* (*Dugesia*) *lugubris* (SCHMIDT 1862) 24 h nach einer solchen Bestrahlung, dann bauen Neoblasten zwar ein Blastem auf, doch ist dieses abortiv und wird nach 4 Tagen zurückgebildet (DUBOIS, 1949; s. auch STÉPHAN-DUBOIS, 1965). Dasselbe gilt für *D. gonocephala* (KRATOCHWIL, 1962). Eine bereits in Gang gesetzte Regeneration wird jedoch durch eine Bestrahlung nicht aufgehalten: Bestrahlt man dekapitierte Tiere frühestens 24 h nach der Wundsetzung, so läuft die Regeneration weiter ab. Dasselbe trifft für Tiere zu, die durch Einschneiden verwundet, dann bestrahlt und anschließend dekapitiert wurden. Allerdings kommt es in diesen Fällen nie zur Neubildung eines Epithels, und die Tiere überleben nur für eine begrenzte Zeit. Selbst eine neuerliche Regeneration nach nochmaliger Amputation beginnt in solchen Fällen, verläuft allerdings abortiv mit einem frühen Verfall des Blastems. Diese Ergebnisse wurden von KRATOCHWIL (1962) mit einer durch die Wundsetzung induzierten, zeitlich begrenzten Differenzierungsbereitschaft von Regenerationszellen unter möglicher Beteiligung von Calciumionen und Zellkontakten interpretiert. Diese Differenzierungsbereitschaft wird, wenn sie einmal besteht, auch durch ionisierende Strahlen nicht eliminiert. Jedoch beeinträchtigen solche Strahlen die erforderlichen Zellwechselwirkungen und verhindern so die Induktion der Differenzierungsbereitschaft. Es wäre aber auch die folgende Erklärung denkbar: Die das Blastem aufbauenden Neoblasten bedürfen zum Übergang in die Differenzierung mindestens einer Mitose; daher regenerieren vor dem Durchschneiden bestrahlte Tiere in keinem Fall. Wird jedoch kurz nach dem Ablauf solcher Mitosen bestrahlt oder durch Wundsetzung vor der Bestrahlung die mitotische Bildung ausreichend vieler differenzierungsfähiger Neoblasten induziert, dann durchlaufen die bereits determinierten Neoblasten ihren Differenzierungsweg. Der Ort der Wundsetzung hat auf die Ergebnisse keinen Einfluss. Der Übergang von der Stamm- zur Progenitorzelle scheint somit bereits vor deren Integration ins Blastem zu erfolgen. Dafür sprechen auch Beobachtungen über Genexpressionsmuster von Neoblasten regenerierender Planarien (AGATA, 2001). Tatsächlich wurden bei Planarien nach Verletzungen, wie

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

weiter oben erwähnt, zwei Mitosemaxima beobachtet: das erste nach 2 – 12 h und ein zweites nach 2 – 4 Tagen (BAGUÑÀ, 1976b; MORITA & BEST, 1984; SALÓ & BAGUÑÀ, 1984). Für beide Versuchsreihen (DUBOIS, 1949 und KRATOCHWIL, 1962) wurden sexuelle Planarienstämme eingesetzt. Asexuelle Stämme scheinen hinsichtlich ihrer Regenerationsfähigkeit resistenter gegen die Einwirkung ionisierender Strahlen zu sein. Sowohl ein asexueller Laborstamm von *Dugesia etrusca* BENAZZI 1946 (STEELE & LANGE, 1976) als auch *D. subtentaculata*, ein asexueller Stamm von *D. gonocephala* (DUGÈS 1830), lieferte differenzierte Regenerate, wenn man Tiere unmittelbar, spätestens aber 24 h nach einer letalen Röntgenbestrahlung dekapitierte (CHANDEBOIS, 1976). Eine solche Bestrahlung schloss den Ablauf von Mitosen bereits vor Beginn der Regeneration aus. Ähnliche Ergebnisse wurden mit der rein asexuellen Art *D. tahitiensis* erzielt (BUCHNER & PETER, Manuskript in Vorbereitung). Der Unterschied zwischen sexuellen und asexuellen Planarienstämmen ließe sich damit erklären, dass asexuelle Tiere in Vorbereitung der nächsten Teilung auch ohne Wundsetzung bereits über eine ausreichende Zahl differenzierungsfähiger Zellen verfügen. Bisher sind außer den Beobachtungen über in Auflösung begriffene Neoblasten (siehe z.B. CHANDEBOIS, 1976; GABRIEL, 1970; KRATOCHWIL, 1962) keine Ergebnisse über die Veränderungen im Neoblastenkompartiment unter der Einwirkung ionisierender Strahlen bekannt geworden. Sollte die oben vorgeschlagene Interpretation zutreffen und tatsächlich ein entsprechender Anteil an differenzierungsfähigen Neoblasten Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration sein, dann wären die Progenitorzellen im G1-Kompartiment zu suchen. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (Kapitel 4.2) müssten diese Zellen abzutrennen und ein entsprechender Unterschied zwischen sexuellen und asexuellen Planarienstämmen zu finden sein.

3.6. Neoblasten und Stammzellen: Herkunft, Funktion und Totipotenz

Ob nun die echten Stammzellen unter den Neoblasten tatsächlich einen einzigen Zelltyp darstellen oder in mehrere getrennte Zelllinien zu unterteilen sind, die sich bloß mit den bisher bekannten morphologischen Kriterien nicht unterscheiden lassen, ist nicht bekannt. Ein einziger totipotenter Stammzelltyp würde im Tierreich eine spezielle Situation darstellen. Man kennt bisher nur einen vergleichbaren Zelltyp, nämlich die Archäocyte der Schwämme (Porifera). Diese Zellen können jedoch nicht nur im Sinne einer echten Stammzelle aus ihresgleichen, sondern auch aus differenzierten Zellen entstehen (CONNES, 1974). Morphologisch ähneln die I-Zellen (interstitiellen Zellen) von *Hydra* den Neoblasten der Turbellarien. Sie sind aber nur eine von drei proliferationsfähigen Zelllinien (BODE, 1996; BOSCH, 1998).

Bezüglich des Ursprungs der Neoblasten gehen die Ansichten weit auseinander. Da solche Zellen bei Tricladen bereits in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung auftreten und die Organbildung von ihnen ausgehen dürfte (BAGUÑÀ & BOYER, 1990; LE MOIGNE, 1963), hat man sie auf einen embryonalen Stammzellenpool zurückgeführt. Aus der Anhäufung von Neoblasten in bestimmten Körperregionen und der Interpretation cyto-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

logisch aberranter somatischer Zellen als Dedifferenzierungsstadien wurde auf einen mehrfachen Ursprung der Neoblasten von Planarien, so etwa aus einem Stammzellenpool und von Darmzellen (TESHIROGI, 1986), geschlossen.

Der Neoblastenpool lässt sich, wie weiter oben (Kapitel 3.2, 3, 5) dargelegt wurde, zwar empirisch definieren, ist aber bezüglich der Herkunft und des Schicksals der ihm angehörenden Zellen äußerst mangelhaft charakterisiert. Schließlich ist, wie bereits erwähnt wurde, eine zusätzliche oder alternative Funktion der Transdifferenzierung im Sinne der Dedifferenzierungstheorien (s. Kapitel 3.4) beim heutigen Kenntnisstand nicht auszuschließen. Alle diese Unsicherheiten ließen sich durch Tracerstudien mit stabil markierten Zellen in Verbindung mit einer möglichst genauen Typisierung von Neoblasten beseitigen. Auch Injektions- und Transplantationsversuche ermöglichen verlässliche Aussagen über die Zellkinetik des Neoblastenpools. Verschiedene Unzulänglichkeiten früherer Versuchsansätze, so vor allem zu kurze Versuchsdauer einschließlich des Fehlens von Untersuchungen an Embryonalstadien und mangelhafte Reinheit von Neoblastenpräparationen, stehen einer allgemeinen und endgültigen Aussage über Herkunft und Differenzierungswege von Stammzellen bei Turbellarien bisher im Weg. Trotzdem liegen bereits jetzt etliche Resultate vor, welche für die Neoblastentheorien und die Existenz echter Stammzellen bei Turbellarien sprechen.

Diese Ergebnisse lassen sich nach den eingesetzten Methoden zu vier Gruppen ordnen:

(1) Markierungen mit Vitalfarbstoffen sind mehrfach durchgeführt bzw. vorgeschlagen worden (so z.B. von BAGUÑÀ, 1998). Bereits ROSE & SHOSTAK (1968) erschlossen die Herkunft von Neoblasten aus Darmzellen auf Grund von Vitalfärbungen, die bei der Planarie *Phagocata* zuerst in Darmzellen und bei regenerierenden Tieren später im Blastem auftraten. Allerdings könnte der Farbstoff zwischen den Zellen transportiert worden sein. Dies erscheint aber unwahrscheinlich, denn weder diese Autoren noch SALÓ & BAGUÑÀ (1985) beobachteten an Neoblasten von Planarien Phagocytose. Trotzdem sind die so erzielten Resultate mit Vorsicht zu betrachten, ehe nicht die Stabilität der Markierung gesichert ist und eine Weitergabe an andere Zellen zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann. Langzeitmarkierungen über viele Zellzyklen hinweg würden vermutlich an der mangelnden Beständigkeit einer solchen Markierung scheitern.

(2) Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in Zellkerne eignet sich wesentlich besser, um das Schicksal proliferierender Zellen zu verfolgen. Thymidin wird nur in DNA eingebaut. Mit Hilfe tritiierten Thymidins (^{3}H-Thymidins) lässt sich daher die DNA-Synthese nachweisen. Selbst dann, wenn eine proliferationsfähige Zelle phagocytiert wird, dürfte der Label in nennenswertem Ausmaß wiederum nur in anderen proliferierenden Zellen auftauchen. In Langzeitversuchen über mehrere Zellzyklen wird freilich auch diese Markierung ausverdünnt.

Da die Neoblasten der Tricladen (also der Planarien) bisher am besten untersucht sind, wären sie die ersten Kandidaten für solche Inkorporationsversuche. Trotz verein-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

zelten gegenteiligen Berichten herrschte jedoch lange Zeit die offensichtlich irrige Meinung vor, dass weder Thymidin noch Bromdesoxyuridin [BrdU, s. unten unter (3)] in Tricladenzellen eindringt. Diese Ansicht ist nach der in jüngster Zeit nachgewiesenen Aufnahme von BrdU durch Planarienzellen (NEWMARK & SÁNCHEZ ALVARADO, 2000) widerlegt, hat aber effiziente und sichere Markierungen solcher Zellen um Jahrzehnte hinausgezögert. Dabei fiel einer der ersten einschlägigen Versuche positiv aus, wenn auch mit sehr geringer Einbaurate (KOHL & FLICKINGER, 1966). Allerdings diente ein Fensterzählrohr zum Nachweis des radioaktiven Thymidins. BEST et al. (1965) hatten zuvor in ähnlichen Experimenten, die sich der wesentlich weniger empfindlichen Autoradiographie bedienten, keinen Erfolg. Sie setzten bereits unter anderem die letztlich erfolgreiche Methode ein, das Desoxynucleosid den Tieren während der Nahrungsaufnahme anzubieten. Den negativen Ausgang ihrer Versuche schrieben sie experimentellen Unzulänglichkeiten zu. Sie konnten auch keine Thymidinaufnahme durch frisch durchschnittene, regenerierende Tiere feststellen.

In den folgenden Jahrzehnten galten Tricladenzellen in der einschlägigen Literatur überwiegend als impermeabel für Thymidin. Diese Meinung wurde vor allem von den Arbeitsgruppen um COWARD und HAY, FRANQUINET und MARTELLY sowie BAGUÑÀ vertreten. So schrieben COWARD, HAY und andere ihre mangelnden Erfolge mit Thymidinmarkierungen der geringen Permeabilität der Zellen für Thymin, Thymidin und Desoxycytidin und dem trägen Stoffwechsel von Planarien zu (COWARD, 1968; HAY & COWARD, 1975). Als Maß für die DNA-Synthese verwendeten die zitierten Autoren die Aktivität der synchron mit der S-Phase regulierten Thymidinkinase (COWARD et al., 1970; s. auch ADAMS et al., 1992, S. 145). FRANQUINET (1976) konnte auch in kultivierten Zellen von Planarien keinen Einbau markierten Thymidins feststellen. Um die DNA-Synthese zu verfolgen, wurden daher Nukleinsäuren durch den Einbau von radioaktivem Phosphat ($^{32}PO_4^{---}$) markiert und dann die DNA abgetrennt, freilich ohne cytologische Lokalisierung (FRANQUINET, 1981; MARTELLY, 1980). Eine ausführliche Diskussion dieser Methode und der von verschiedenen Autoren verzeichneten Misserfolge beim Versuch, Thymidin in Planarienzellen einzuschleusen, geben MARTELLY et al. (1981). BAGUÑÀ und dessen Coautoren erwähnten wiederholt die Erfolglosigkeit ihrer Versuche, Thymidin in Planarienzellen zu inkorporieren (so z.B. BAGUÑÀ et al., 1988, 1989a, 1994).

Allerdings meldete BAGUÑÀ selbst bereits wesentlich früher einen erfolgreichen Einbau von Thymidin in Neoblasten nach Injektion und während der Nahrungsaufnahme (BAGUÑÀ, 1976b), ohne freilich über die Ergebnisse im einzelnen zu berichten. Die späteren Misserfolge schrieb er der mangelnden Permeabilität der Tricladenepidermis für Thymidin zu. Kurze Hinweise über die Aufnahme von Thymidin durch Planarienzellen gibt es auch von anderen Autoren. So beschrieb BETCHAKU (1975) in einem Abstract die erfolgreiche, wenn auch schwache, Markierung von Neoblasten, und ADITYA & GHOSH (1995) verfolgten die Spermiogenese von *Dugesia bengalensis* KAWAKATSU 1983 mit Hilfe des inkorporierten Thymidins. Dieses wurde den Tieren

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

während der Fütterung mit dem Kulturwasser angeboten (ADITYA, persönliche Mitteilung).

Der Autor der vorliegenden Arbeit unternahm 1989 eine diesbezügliche Versuchsreihe, wobei von den folgenden Überlegungen ausgegangen wurde: Angesichts der widersprüchlichen Aussagen über die Thymidinaufnahme durch Planarien erschien eine an sich mögliche Hemmung der DNA-Synthese durch zu hohe Strahlendosen (EVANS, 1975) unwahrscheinlich. Es ist bekannt, dass der intrazelluläre Pool an Desoxynucleotiden sehr klein und bald gesättigt ist und daher die Aufnahme von DNA-Vorstufen wie Thymidin nicht nur von der Permeabilität bzw. den Transportsystemen der Zellmembran (siehe z.B. BRESLOW & GOLDSBY, 1969; PLAGEMANN & ERBE, 1972), sondern ganz wesentlich von der DNA-Synthese abhängt (ADAMS et al., 1992, S. 142). Die wenigen Berichte über einen erfolgreichen Einbau dieses Desoxynucleosids, wenn es gleichzeitig mit der Fütterung angeboten wurde, ließen im Zusammenhang mit dem dramatischen Anstieg der Mitosen nach der Nahrungsaufnahme (BAGUÑÀ, 1976a) eine zu geringe DNA-Syntheserate während früherer erfolgloser Markierungsversuche vermuten. Analog waren die Chancen zu beurteilen, in regenerierende Tiere Thymidin einzuschleusen. In der oben erwähnten Versuchsreihe wurden daher ganze Exemplare von *Schmidtea polychroa* sowie frisch durchschnittene, regenerierende Planarien dieser Art 9 Tage lang in Kulturwasser gehalten, welches ^{3}H-Thymidin (3,45 µM/l, 100µCi/ml) sowie Desoxycytidin (10 µM/l) enthielt. Desoxycytidin hebt die im Bereich mikromolarer Thymidinkonzentrationen bereits merkbare Hemmung der DNA-Synthese auf (ADAMS et al., 1992, S. 143). Die unverletzten Tiere hatten einen Tag lang Gelegenheit zu fressen, während die Desoxynucleoside bereits im Kulturwasser enthalten waren. Frisch gewonnene Zellsuspensionen (s. Kapitel 4.2) der eben erwähnten Planarienart wurden 3 Tage lang in isotonem Kulturmedium (s. Kapitel 4.3 und Tab. 2) gehalten, welches beide Desoxynucleoside in den oben angegebenen Konzentrationen enthielt. Nach Fixierung in ZENKERS Gemisch (ROMEIS, 1989) wurden die intakten Tiere sowie die Regenerate im DOUNCE-Homogenisator desintegriert (s. Kapitel 4.2), die erhaltenen Zellsuspensionen wie auch die kultivierten Zellen auf Objektträgern ausgestrichen, mit Azur A – Eosin B gefärbt (PEDERSEN, 1959a, b) und mit Filmemulsion (Kodak Liquid Emulsion, Typ NTB 2) überschichtet. Die so erhaltenen Autoradiogramme zeigten nach vierzehntägiger Exposition bei 4 °C durch entsprechende Schwärzung über Zellen aus gefütterten ganzen Tieren und auch aus den Zellkulturen den Einbau von Thymidin und somit DNA-Synthese an. Bei den Regeneraten waren die Ergebnisse nicht eindeutig positiv. Leider konnte dieser Pilotversuch bisher nicht fortgesetzt werden.

Hingegen ist der Einbau von ^{3}H-Thymidin in Zellen von *Microstomum lineare* (MÜLLER 1774) und *Stenostomum leucops* (DUGÈS 1828) bereits länger allgemein bekannt. Nur Neoblasten bauen dieses Desoxynucleosid ein. Die Markierung wurde mittels Autoradiogrammen zwei Tage lang verfolgt und in differenzierten Zellen (Epithel-, Flammen-, Nerven- und Muskelzellen) nachgewiesen (PALMBERG, 1986, 1990; PALMBERG & REUTER, 1983). Wenigstens bei diesen Arten erfolgt also die Zell-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

erneuerung ausschließlich über Neoblasten. ^{3}H-Thymidinmarkierungen wiesen für die physiologische Regeneration im Rahmen der natürlichen Zellerneuerung Neoblasten als Vorläufer von Darmzellen bei Acoelen (DROBYSHEVA, 1986) und Epithelzellen bei Polycladen nach (DROBYSHEVA, 1988).

(3) Das Desoxynucleosidanalogon 5-Brom-2´-desoxyuridin (BrdU) wird statt Thymidin in DNA eingebaut. Da es sich immuncytochemisch nachweisen lässt, kann es statt einer radioaktiv markierten Vorstufe eingesetzt werden, um die DNA-Synthese zu verfolgen (DINJENS et al., 1992; GRATZNER, 1982). Dabei werden im Gegensatz zu Thymidin erstaunlich hohe Konzentrationen dieser Substanz toleriert, ehe toxische Effekte auftreten. Das kommt der Nachweisempfindlichkeit sehr zugute. FRANQUINET (1976) hatte keinen Erfolg mit der Aufnahme von BrdU durch die Planarie *Polycelis tenuis* (IJIMA 1884). Der erste Bericht über den Einbau von BrdU in Planarienzellen (er wird freilich in den späteren Publikationen nicht zitiert) stammt von EDELMAN & LIN (1994), die auf diese Weise den Schwesterchromatidaustausch bei *Girardia tigrina* beobachteten. Allerdings verfolgten sie nicht die DNA-Synthese. Sowohl durchschnittene als auch intakte Tiere nahmen BrdU (50µM/l Kulturwasser) auf. Die DNA-Synthese eines Turbellars wurde mit Hilfe von BrdU erstmals von LADURNER et al. (1998) in Totalpräparaten von *Macrostomum* verfolgt. Bei Tricladen wurde die DNA-Synthese mit dieser Methode zum ersten Mal von NEWMARK & SÁNCHEZ ALVARADO (2000) untersucht. Durch Mischen des Futters mit Agarose, welche BrdU enthielt, sowie durch Mikroinjektion von BrdU-Lösungen ins Parenchym konnten Neoblasten von *Phagocata* sp., *Schmidtea mediterranea* und *Girardia dorotocephala* markiert werden. Die Markierung war später in Blastemen, in sich differenzierenden Zellen sowie nach etwa 6 Tagen in Epithelzellen nachzuweisen. Diese Autoren halten das Tricladenepithel für impermeabel gegenüber BrdU. Längere Beobachtungen oder gar Langzeitmarkierungen sind mit dieser Methode bei Planarien bisher nicht beschrieben worden. Auch für den Acoelen *Convolutriloba longifissura* BARTOLOMAEUS & BALZER 1997 wurden die Neoblasten mittels der Inkorporation von BrdU als Vorläufer somatischer Zellen identifiziert (GSCHWENTNER et al., 2001).

Eine ausführliche Studie über die Aufnahme und Verteilung des BrdU-Labels durch *Macrostomum* (LADURNER et al., 2000) ergab interessante Verteilungsmuster proliferierender Zellen entlang der Längsnervenstränge, ein späteres Einwandern dieser Zellen in regenerierende Bereiche und ein Auftauchen der Markierung in differenzierten Zellen, so im Epithel, das offenbar ständig erneuert wird. Ähnlich wie bei Planarien findet man auch hier in Regenerationsblastemen weder DNA-Synthese noch Mitosen. Die eingesetzten BrdU-Konzentrationen waren mit 50 µM/l bei kontinuierlichen Markierungen und 5 mM/l bei Versuchen mit Pulsmarkierung sehr hoch.

(4) Transplantations- und Injektionsexperimente mit an Neoblasten angereicherten Zellsuspensionen haben für Planarien gezeigt, dass Neoblasten in der Lage sind, alle Gewebe zu regenerieren, und zwar sowohl nach Amputation ganzer Körperteile (DUBOIS, 1949; SALÓ & BAGUÑÀ, 1985; STÉPHAN-DUBOIS, 1965) als auch in Form der

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

physiologischen Regeneration im Rahmen des normalen Zell-Turnover (BAGUÑÀ et al., 1989a). Für beide Arten von Versuchen wurden als Empfänger Tiere verwendet, welche mit einer letalen Röntgendosis bestrahlt worden waren. Diese führte nicht zum sofortigen Tod der Tiere, sondern schädigte offensichtlich alle Zellen so stark, dass sie nicht mehr teilungsfähig waren und die Tiere nach einigen Wochen starben (s. auch Kapitel 3.5). Injizierte man in solche Exemplare mit Neoblasten stark angereicherte Zellsuspensionen, so lebten die Tiere in etwa 20% der Fälle weiter (BAGUÑÀ et al., 1989a). Transplantierte man Gewebe unbestrahlter Tiere in bestrahlte Planarien, dann lebten auch diese weiter (SALÓ & BAGUÑÀ, 1985). Mit Hilfe natürlicher cytogenetischer Marker (in Form eines chromosomalen Unterschiedes zwischen einer sexuellen bzw. asexuellen Rasse von *Schmidtea mediterranea* sowie unterschiedlicher Kerngrößen zwischen dem diploiden und dem tetraploiden Biotyp von *S. polychroa*) wurde die Herkunft der überlebenden Zellen vom Spender nachgewiesen. Die Entstehung der neu gebildeten Zellen ausschließlich aus Neoblasten wird durch die Tatsache sehr wahrscheinlich gemacht, dass Injektionen ohne Neoblasten die bestrahlten Tiere nicht retteten. Allerdings enthielten die injizierten Zellsuspensionen neben Neoblasten auch andere Zellen. Eine erfolgreiche Restitution von Planarien durch eine Wiederbesiedlung mit Neoblasten eines gesunden Spenders lässt jedoch nicht unbedingt darauf schließen, dass die physiologische Regeneration und die Neubildung von Körperteilen nach weniger radikalen Eingriffen ebenfalls von einem einzigen Stammzelltyp ausgehen. Neuere Erfahrungen an Säugern haben nicht nur eine wesentlich größere Bedeutung von Stammzellen beim Ersatz von Zellen und Geweben gezeigt, als man früher angenommen hatte (siehe z. B. FUCHS & SEGRE, 2000; GAGE, 2000), sondern auch eine erstaunliche Plastizität nicht totipotenter Stammzellen enthüllt. So können Stammzellen, deren Funktion normalerweise nur die Bildung von Blutzellen, Muskeln oder Nerven ist, bei Bedarf von ihren üblichen Differenzierungswegen abweichen und sich in ihrer Rolle gegenseitig vertreten (MC KAY, 2000; WEISSMAN, 2000).

Eine von CHANDEBOIS (1976) entwickelte Hypothese schreibt den Neoblasten eine gänzlich andere Funktion als jene von Stammzellen zu, nämlich die Aufgabe zur Bereitstellung von Material für die Regeneration. Sie wären somit im weitesten Sinne Nährzellen. Obwohl diese Hypothese nach den zahlreichen Ergebnissen, welche die Neoblastentheorie stützen, in ihrer ursprünglichen Form nicht zutreffen kann und die zu ihrer Untermauerung für das Regenerationsblastem postulierten Syncytien nicht bestätigt worden sind, könnte sie für einen Teil des Neoblastenpools gelten und eine weitere Funktion dieses Zelltyps beschreiben. Die bisherigen kinetischen Daten über die proliferierenden Zellen von *Macrostomum*, welche auf Grund der Tracerstudien mit BrdU gewonnen worden sind (LADURNER et al., 1998, 2000), lassen einen relativ hohen Turnover dieser Zellen vermuten, der den Bedarf an neuen Zellen übersteigen dürfte. Das hieße aber, dass die abgebauten Zellen (ihre Neoblastennatur ist noch endgültig zu beweisen) nutritiven Zwecken dienen könnten. Für Planarien gibt es bisher allerdings keine derartigen Befunde.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Sind schon Herkunft und Schicksal der Neoblasten nicht endgültig geklärt, so gibt es bezüglich der speziellen Strategie dieser proliferierenden Zellen bisher nur wenige Daten. Die Bereitstellung einer erheblichen Zahl von Stammzellen in der G2-Phase des Zellzyklus, deren Länge damit variabel ist (s. oben), bildet einen Unterschied zur üblichen Strategie einer in der Dauer variablen G1-Phase. Dass solche G2-Zellen jederzeit ohne weitere DNA-Synthese zur Mitose bereitstehen, begünstigt die bei Turbellarien immer wieder beobachtete große Regenerationsfähigkeit. Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, ob die Sonderung in echte Stammzellen und Progenitorzellen durch asymmetrische Teilungen oder durch Induktions- bzw. Hemmeffekte aus der Umgebung der Zellen getriggert wird (MORRISON et al., 1997; POTTEN, 1997; WEISSMAN, 2000; vgl. auch LANGE, 1983; RIEGER, et al., 1999). Auch ist völlig offen, wie viele Mitosen auf den einzelnen Wegen vom Neoblasten zu differenzierten Zellen liegen, welchem Turnover der Neoblastenpool unterliegt und welche Rolle Apoptose und Nekrose dabei spielen.

3. 7. Methodeninventar zur weiteren Analyse des Neoblastenkompartiments

Um das Neoblastenkompartiment noch besser zu charakterisieren sowie Herkunft und weiteres Schicksal einzelner Zelltypen aufzuklären, erscheinen insbesondere die folgenden Methoden geeignet:

(1) Inkorporation von BrdU *in vivo* mittels Pulsmarkierungsexperimenten mit verschiedenen Markierungs- und Untersuchungsintervallen ("pulse chase experiments") und Verfolgen des Labels in ganzen Tieren und in fraktionierten Zellen: Versuche mit *Macrostomum* (LADURNER et al., 1998, 2000) in Verbindung mit der Auftrennung von Zellen durch Zentrifugation im Dichtegradienten (s. Kapitel 4.2) könnten eine Basis für weitere diesbezügliche Studien bilden. Ein entsprechendes Versuchsprotokoll ist mittlerweile auch für Triclade publiziert worden (NEWMARK & SÁNCHEZ ALVARADO, 2000). Freilich sind der Stabilität einer solchen Markierung durch ihre Ausverdünnung mit jeder Mitose Grenzen gesetzt. Ein Zusatz von 5-Fluor-2´-desoxyuridin (GRATZNER, 1982), welches die Thymidilatsynthetase und damit den Stoffwechsel des mit dem exogen angebotenen BrdU konkurrierenden Thymidins hemmt (ADAMS et al., 1992, S. 144, 259), sollte die Aufnahme dieses Markers und damit die Nachweisempfindlichkeit noch weiter steigern.

(2) Spezifische Genexpressionsmuster: Während der Keimzelldifferenzierung kommt es zur Expression bestimmter Gene, die in keinen anderen Zellen aktiv sind. Das wurde für das *vas*-Gen von *Drosophila melanogaster* und für das *glh-2*-Gen von *Caenorhabditis elegans* gefunden. In Planarien entstehen die Keimzellen aus Neoblasten. Zwei mit dem *vas*-Gen verwandte Gene werden bei *Dugesia japonica* ICHIKAWA et KAWAKATSU 1964 sowohl in Differenzierungsstadien von Keimzellen als auch in Neoblasten spezifisch exprimiert (SHIBATA et al., 1999). Diese Genexpression ist vermutlich korreliert mit dem Auftreten von "chromatoid bodies" (s. im Kapitel 3.2 und bei PEDERSEN, 1972). Man findet diese Strukturen außer in Neoblasten, welche in

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

die Differenzierung eintreten, auch in sich differenzierenden Keimzellen. In asexuellen Tieren wird eines der beiden Gene nur in Neoblasten exprimiert und ist auch in Regenerationsblastemen aktiv. In Blastemen findet man allerdings nur Neoblasten mit "chromatoid bodies", welche den Eintritt in die Differenzierung anzeigen (MORITA et al., 1969). Es ist offen, ob auch völlig undifferenzierte Neoblasten und damit echte Stammzellen diese Gene exprimieren. Auch ein Tyrosinkinase-Gen ist in Neoblasten aktiv [AGATA, 2001; s. auch unten unter (4)]. Die quantitative Bestimmung solcher Genexpressionen und darüber hinaus des gesamten Transkriptionsmusters von Neoblasten und in Differenzierung begriffenen Zellen sollte eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von Neoblastentypen und Differenzierungswegen liefern.

(3) Genetische Marker in Form von Reportergenen: Transposons wurden im Planariengenom gefunden; es besteht daher Hoffnung, dass transfizierte Gene stabil ins Genom integriert werden können (GARCÍA-FERNÀNDEZ et al., 1993, 1995). Auf diese Art ließen sich Zellen am stabilsten markieren. Zellkulturen von gereinigten Neoblasten (vgl. Kapitel 4.3) wären eine geeignete Voraussetzung, um durch Injektion solcherart markierter Zellen ihr Schicksal über lange Zeit zu verfolgen und – bei Kombination mit Röntgenbestrahlung – transgene Tiere zu erzeugen.

(4) Monoclonale Antikörper: Ein vielversprechender Ansatz, um Zellen zu charakterisieren und ihr Schicksal zu verfolgen, ist die Anwendung monoclonaler Antikörper (BAGUÑÀ, 1998; ROMERO et al., 1991b; SHIRAKAWA et al., 1991). In Regenerationsstudien mit Planarien wurden für bestimmte Zelltypen und Körperregionen spezifische monoclonale Antikörper gefunden. Allerdings ist es bisher trotz intensiver Suche nicht gelungen, einen für Neoblasten spezifischen Antikörper zu erhalten. Dies könnte daran liegen, dass wegen der geringen Masse der Neoblastenfraktion, von der ja nur ein Teil aus echten Stammzellen besteht, bisher keine ausreichenden Mengen an Antikörpern produziert wurden. Jener Teil der Neoblasten, der aus bereits determinierten ("committed") Progenitorzellen besteht (sie befinden sich schon auf verschiedenen Differenzierungswegen), besitzt möglicherweise keine gemeinsame Antigenausstattung mehr (BUENO et al., 1997). Auch bei *Macrostomum* gelang zwar die Herstellung monoclonaler Antikörper gegen differenzierte somatische Zellen, bisher aber nicht gegen Neoblasten (Dr. Peter LADURNER, persönliche Mitteilung). Die oben (2) erwähnten, für Neoblasten spezifischen Genexpressionen lassen hoffen, doch noch solche Antikörper produzieren zu können. Die erwähnte Expression eines Tyrosinkinase- (*PTK3*)-Gens in Neoblasten von Planarien (AGATA, 2001) verrät die Anwesenheit eines in der Zellmembran lokalisierten Rezeptors, gegen den sich Antikörper herstellen lassen sollten. Allerdings gestatten die bisher bekannt gewordenen Daten in keinem Fall eine Aussage darüber, ob sich die betreffenden Neoblasten nicht schon auf dem Weg der Differenzierung befinden.

(5) Fraktionierung und cytochemische Charakterisierung von Neoblasten: Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation ist es gelungen, Neoblasten stark anzureichern und diese in einzelne Fraktionen zu trennen (Kapitel 4.2). Eine weitere Unterscheidung ermöglichen cytochemische und immuncytochemische Methoden. Mit Hilfe der quan-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

titativen Bildanalyse können etwa nach Färbung mit Acridinorange der DNA- und der RNA-Gehalt der Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (TRAGANOS et al., 1977) und zu anderen Zellparametern, wie dem Volumen oder der Dichte, in Beziehung gesetzt werden (BEHENSKY et al., 2001). Als weitere Möglichkeit bietet sich die quantitative immuncytochemische Bestimmung von Organellen an, die für Differenzierungsstadien typisch sind, wie etwa des ER und des Golgiapparates.

(6) Zusätzlich ließen sich Neoblastenfraktionen mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese durch ihr Proteinmuster charakterisieren. Voraussetzung dafür wären ausreichende Mengen entsprechend reiner Fraktionen. Für Planarienzellen optimierte Elektrophoresemethoden dazu sind verfügbar (COLLET & BAGUÑÀ, 1993; PETER et al., 1976; s. auch BAGUÑÀ et al., 1990). Untersuchungen an Blastemen haben stadienspezifische Protein(synthese)muster enthüllt. Allerdings wurden dabei die Zellen nicht aufgetrennt (GHIRARDELLI et al., 1989, 1991).

4. Anwendungen einiger neuer Methoden zur Klärung offener Fragen

4.1. Weitere ultrastrukturelle Kriterien

Um geringfügige Änderungen zu Beginn der Differenzierung, wie etwa die Bildung der ersten Golgi–Strukturen, zu erkennen, sind Ultrastrukturstudien unerlässlich. Die Morphologie des Zellkerns birgt möglicherweise noch beträchtliche, bisher nicht ausgeschöpfte Möglichkeiten, um Zellen zu charakterisieren. Eine Studie über die Ultrastruktur der Neoblastenkerne von *Macrostomum* hat gezeigt, dass sich Neoblasten mit Hilfe der Anordnung des Chromatins und der Struktur der Kernlamina in verschiedene Subtypen unterteilen lassen (RIEGER et al., 1999). Sie wurden auf Grund der korrelierbaren cytoplasmatischen Merkmale als Stadien auf dem Weg zur Differenzierung interpretiert. Die Wahl von *Macrostomum* bietet gegenüber Planarien den Vorteil, dass diese Art BrdU inkorporiert (LADURNER et al., 1998, 2000) und außerdem so klein ist, dass sich markierte Zellen mit dem konfokalen Mikroskop auch in Totalpräparaten leicht beobachten lassen. In weiteren Untersuchungen könnten mit Hilfe geeigneter Methodenkombinationen fraktionierte Zellen durch ihre Dichte, ihre lichtmikroskopischen, cytochemischen und ultrastrukturellen Merkmale sowie auch durch die DNA-Syntheserate charakterisiert werden.

4.2. Isolierung und Analyse von Neoblasten

Erste Hinweise auf eine Heterogenität des Neoblastenpools haben die oben erwähnten zellkinetischen Befunde geliefert (PALMBERG, 1990; SALÓ & BAGUÑÀ, 1984; s. auch BAGUÑÀ, 1998; BAGUÑÀ et al., 1988, 1990, 1994). Die Suche nach weiteren Kriterien, um die Heterogenität des Neoblastenpools näher zu beschreiben, schien daher lohnend. Vorweg sei festgehalten, dass die Frage, ob eine solche Heterogenität unterschiedliche Zelllinien oder verschiedene Stadien oder aber unterschiedliche Differenzierungswege widerspiegelt, zunächst offen ist. Um sie zu beantworten, sind weitere Analysen erforder-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

lich, die aber einer Basis in Form eines geeigneten Methodeninventars bedürfen.

Anreicherung, Reinigung, Fraktionierung und Primärkultur von Neoblasten bieten sich als Wege zum genaueren Studium der Eigenschaften und des Verhaltens dieser Zellen an. Sieht man von frühen Experimenten zur Kultur von Planarienzellen (MURRAY, 1927) ab, so gehen die ersten erfolgreichen Versuche zur Anreicherung von Neoblasten aus Planarien auf BETCHAKU (1967) zurück. Er nützte die starke Adhäsion dieser Zellen an Glasoberflächen in Verbindung mit ihrer Resistenz gegenüber mäßig hypotonen Bedingungen dazu, um aus kleinen Fragmenten von Planarien relativ reine Primärkulturen von Neoblasten zu gewinnen. Dazu lässt man Gewebefragmente in 5/8-konzentrierter HOLTFRETER-Lösung desintegrieren. Diese Lösung enthält im Liter 2,19 g NaCl, 125 mg $NaHCO_3$, 31 mg KCl und 63 mg $CaCl_2$; ihre Osmolalität beträgt 77 mOsmol/kg. Wir konnten diese Methode bei *S. polychroa* gut reproduzieren (Bild 4, Seite 306). Bei *D. japonica* waren andere Autoren damit allerdings weniger erfolgreich (TESHIROGI & TOHYA, 1988). Möglicherweise hängt der Erfolg also von der verwendeten Art ab. Da außerdem die Zellausbeute dabei relativ gering ist, lag es nahe, diese Methode zu verbessern. Die Kombination der zitierten Methode mit einer vorherigen mechanischen Desintegration ganzer Tiere im DOUNCE-Homogenisator mit lose passendem Stempel (FRANQUINET, 1981) führte zu einem Verfahren, das relativ rasch Primärkulturen von Neoblasten ergab, in denen verunreinigende Zellen in wenigen Tagen degenerierten (SCHÜRMANN & PETER, 1988, 1989). Für diese Zellpräparationen und die daran anschließenden Primärkulturen wurden isotone Medien verwendet (s. Tab. 2). Die Osmolalität von *S. polychroa* wurde mit 125 – 128 mOsmol/kg bestimmt (SCHÜRMANN, 1993). Dieser Wert stimmt gut mit den früher veröffentlichten 125 mOsmol/kg für *G. dorotocephala* (PRUSCH, 1976) überein. In späteren Experimenten (s. unten) wurden aus praktischen Gründen (Verwendung fertig erhältlicher Stammlösungen) zum Teil Medien mit bis zu 139 mOsmol/kg verwendet (SCHÜRMANN et al., 1998). Sie erwiesen sich als gleichwertig mit den früheren Rezepten.

In noch größerer Menge sowie in großer Ausbeute (bis zu 55% der Neoblasten eines Tieres) und Reinheit (91%) ließen sich Neoblasten aus *S. polychroa* und *D. tahitiensis* durch Verbindung der mechanischen Desintegration unter isotonen Bedingungen mit anschließender Vorreinigung (differenzielle Zentrifugation und Siebung durch Netze) und isopyknischer Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten gewinnen (PETER & SCHÜRMANN, 1995; SCHÜRMANN, 1993; SCHÜRMANN & PETER, 1993, 1995; SCHÜRMANN et al., 1998). Percoll ist eine Suspension von Silicakügelchen mit einem Durchmesser von 15 - 30 nm, die mit einem fest haftenden Film aus Polyvinylpyrrolidon überzogen und daher nicht toxisch sind. Größe und hohe Dichte der Silicapartikeln ermöglichen die Bildung stabiler Gradienten sowohl durch Überschichten als auch durch hochtourige Zentrifugation (PERTOFT et al., 1977; WOLFF, 1975). Percoll trägt zum osmotischen Wert nur wenig bei und erlaubt daher, die Medienzusammensetzung von der Desintegration bis zur Anlage primärer Zellkulturen nur minimal zu verändern. Dieses Verfahren wurde später durch den Zusatz von Enzymen verbessert und durch die Zonenzentrifugation in einem fein abgestuften Percoll-Gradienten (SCHÜRMANN et al., 1998) sowie durch die

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Trennung von Planarienzellen in einem *in situ* gebildeten Gradienten (BEHENSKY et al., 2001) bereichert. Um die Aggregation von Zellen und deren Anheftung an Oberflächen weitestgehend zu vermeiden, hat sich das in Abb. 5 dargestellte Verfahren am besten bewährt. Wesentlich ist dabei die Kombination eines mechanischen Aufschlusses mit enzymatischer Behandlung (DNase I, EC 3.1.21.1, um Aggregation durch DNA aus geschädigten Zellen zu verhindern, Collagenase aus *Clostridium*, EC 3.4.24.3, zum Abbau der extrazellulären Matrix sowie Hyaluronidase, EC 3.2.1.35, um die reichlich vorhandenen Mucopolysaccharide abzubauen). Durch den Zusatz von EDTA am Ende wird die calciumabhängige Zellaggregation in Lösungen von Percoll verhindert. Polyvinylpyrrolidon (PVP) fördert die Aggregation von Planarienzellen (FUKUSHIMA & MATSUDA, 1991). Die Beschichtung der im Percoll enthaltenen Silicakügelchen mit PVP wirkt offensichtlich für sich allein nicht aggregierend, wohl aber in Kombination mit Calciumionen. Der Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA) zu allen während der Isolation und Fraktionierung von Zellen verwendeten Medien (5 mg/ml) erhöht die Ausbeute und verringert den Verlust durch Adhäsion von Zellen an Gefäßwänden.

Zentrifugiert man vorgereinigte Zellsuspensionen aus Planarien in fein abgestuften Gradienten (Abb. 6), so findet man Neoblasten in verschiedenen Dichtezonen. In größter Ausbeute und Reinheit erhält man diese Zellen, wie bereits erwähnt, durch isopyknische Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Gradienten, und zwar in der Zone zwischen den Dichten 1,05 und 1,07 (Abb. 7). Unter den isolierten und mit Azur A - Eosin B spezifisch gefärbten Neoblasten ließen sich vier Typen unterscheiden (SCHÜRMANN et al., 1998). Diese Beobachtungen können sowohl dahingehend interpretiert werden, dass die erhaltenen Fraktionen bzw. Subtypen verschiedene Zellzyklusphasen und / oder Entwicklungsstadien eines einzigen Zelltyps repräsentieren, als auch durch eine Mehrzahl von Subtypen erklärt werden, die jeweils getrennten Neoblastenlinien angehören. Jedenfalls rechtfertigen diese Ergebnisse weitere Anstrengungen, um die bereits darstellbaren Fraktionen näher zu charakterisieren. Das Verfahren ist mittlerweile auch für *Macrostomum* (kleinere Tiere, kleinere Zellen und ein anderes Medium) adaptiert worden (BEHENSKY et al., 2001). Somit sind geeignete Vorbedingungen für die Gewinnung und Analyse von Neoblasten gegeben.

Zur Unterscheidung von Subtypen und Entwicklungsstadien dieser Zellen sind neben cytochemischen Bestimmungen, etwa des RNA- und DNA-Gehaltes, vor allem Untersuchungen der Ultrastruktur von Interesse, wie sie für *Macrostomum*, allerdings noch ohne vorherige Zellfraktionierung, bereits begonnen worden sind (RIEGER et al., 1999; s. Kapitel 4.1).

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

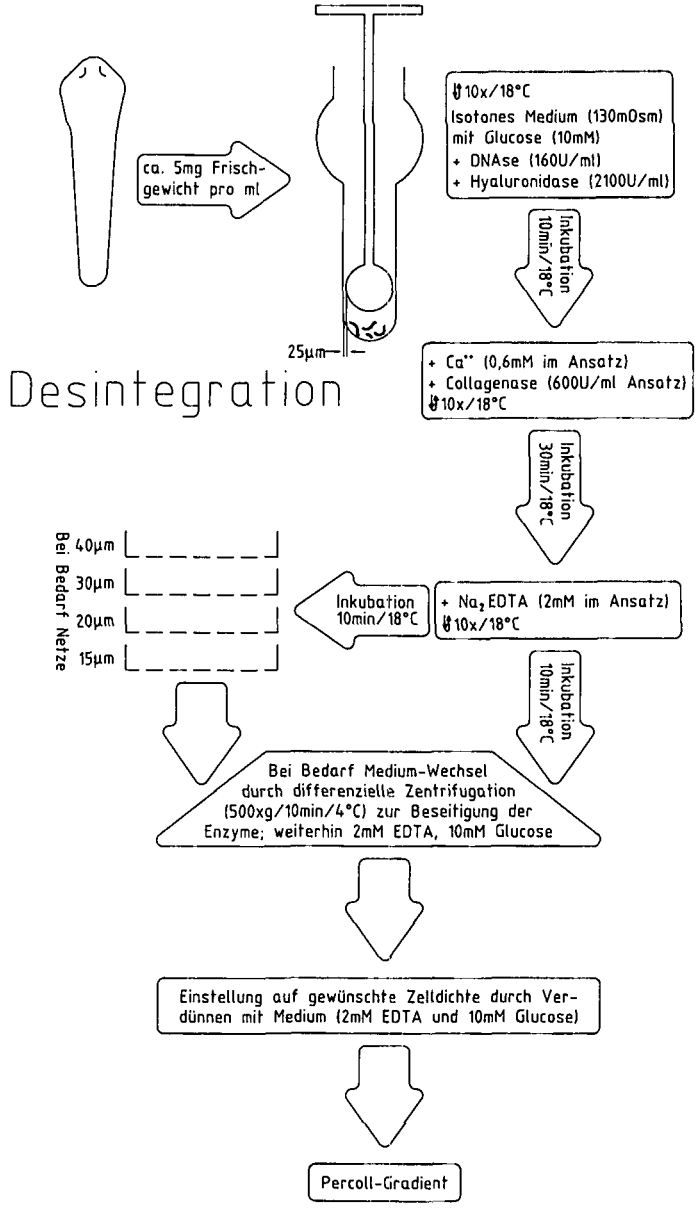


Abb. 5: Optimiertes Verfahren zur Desintegration von Planariengewebe in schematischer Darstellung. Die Enzymbehandlung muss bezüglich Konzentration, Temperatur und Einwirkungsdauer für den jeweils verwendeten Planarienstamm optimiert werden. Die mit dieser Methode gewonnenen Zellsuspensionen können zur Auftrennung durch Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 6) verwendet werden. Ausführung der Zeichnung: C. BEHENSKY.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

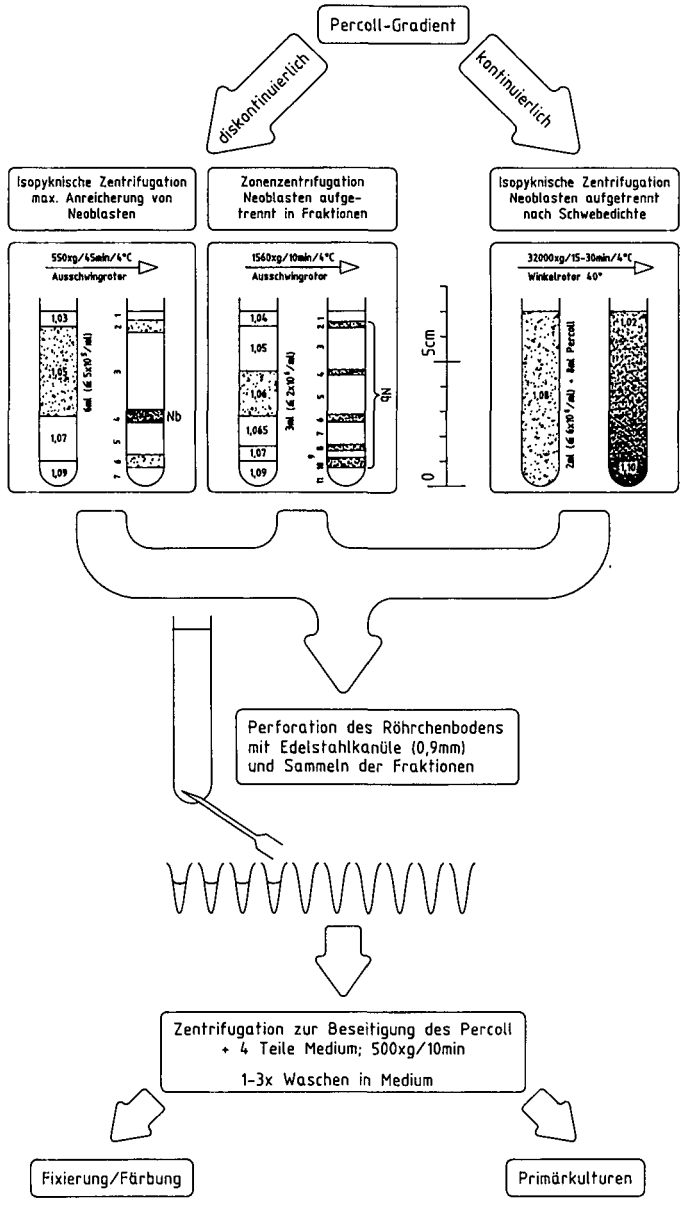
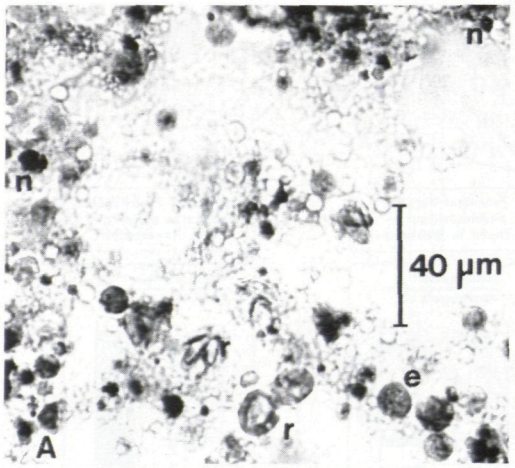
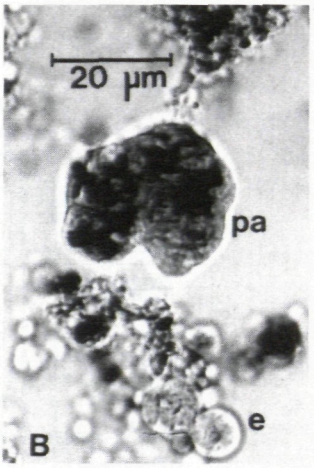


Abb. 6: Anreicherung und Auftrennung von Planarienzellen sowie Fraktionierung von Neoblasten durch Dichtegradientenzentrifugation in Lösungen von Percoll. Dargestellt sind drei Alternativen mit unterschiedlichen Zielsetzungen. Percoll kann im Kulturmedium oder auch in isotonen Pufferlösungen, wie z.B. Tricin / NaCl (FUKUSHIMA & MATSUDA, 1991) gelöst werden. Ausführung der Zeichnung: C. BEHENSKY.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at





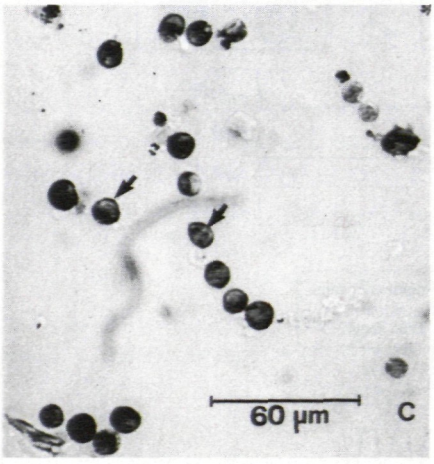


Abb. 7:
Präparationen von Planarienzellen nach dem in Abb. 5 und Abb. 6 dargestellten Verfahren (isopyknische Zentrifugation im diskontinuierlichen Gradienten).
A, B) Zellsuspension aus *Dugesia tahitiensis* unmittelbar nach der Desintegration; Epithelzellen (e) und Rhabdoide (r) sind deutlich erkennbar, die Neoblasten (n) meist durch andere Zellen verdeckt; pa: Parenchymzelle.
C) Neoblasten aus der Fraktion 4 (Dichtestufe 1,05 / 1,07). Man erkennt den schmalen, stark basophilen Cytoplasmasaum (Pfeile).
Färbung: Azur A – Eosin B, Mikroskop: Leitz Aristoplan. Photos: W. SCHÜRMANN, Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung.

4.3. Primärkulturen von Turbellarienzellen

Um Vorgänge im Organismus zu verfolgen, ist die Analyse von Zellen unverzichtbar, die unmittelbar aus lebenden Tieren isoliert worden sind. Obwohl aus dem Verhalten von Zellen in Kultur selbstverständlich keine zwingenden Schlüsse auf die Verhältnisse *in vivo* möglich sind, sind kultivierte Zellen zusätzlich zu *in vivo*-Studien doch in mehrfacher Hinsicht wertvolle Werkzeuge. So würden etablierte Neoblastenkulturen Voraussetzungen für Injektionsexperimente ohne verunreinigende Zellen, für die gezielte Herstellung von *in vitro*-Systemen zur Zelldifferenzierung und für einen Gentransfer zur Erzielung transgener Tiere schaffen (vgl. BAGUÑÀ, 1998). Es gab eine Reihe von Ansätzen zur Kultivierung von Planarienzellen (SCHÜRMANN & PETER, 2001). Der älteste publizierte Versuch stammt von MURRAY (1927) aus dem Laboratorium von Ch. M. CHILD. Auf eine Isolation oder Anreicherung bestimmter Zellen wurde dabei verzichtet, jedoch wurden einzelne isolierte und lebende Zellen von Planarien erstmals beschrieben. Die Beobachtung von amitotischen

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Zellteilungen, nicht aber von Mitosen, lässt vermuten, dass die Vitalität der Zellen mangels entsprechend optimierter Kulturbedingungen eingeschränkt war. Von den späteren Experimenten seien jene von BETCHAKU (1967, 1970), FRANQUINET (1981), FUKUSHIMA & MATSUDA (1991) und TESHIROGI & TOHYA (1988) erwähnt. Darüber hinaus gab es etliche Kulturversuche mit Fragmenten und Blastemen von Planarien (so etwa von SEILERN-ASPANG, 1958, sowie SENGEL, 1960). In keinem Fall gelang eine Kultivierung über mehr als zwei Wochen. Meist degenerierten die Zellen oder zeigten – im Fall der Neoblasten – Anzeichen einer Differenzierung. Mitosen wurden außer in Suspensionskulturen (FRANQUINET, 1981) in keinem der zuvor beschriebenen Systeme beobachtet. Auf der Grundlage früher veröffentlichter Kulturbedingungen gelang es, ein mit Planariengewebe isotones Medium zu entwickeln (Tab. 2), in welchem Primärkulturen von Neoblasten bis

Tab. 2: Kulturmedium für Planarienzellen

Isotones Kulturmedium (pH 7,4; 126 mOsmol/kg)		**Zusammensetzung von BMS (Basal Medium Supplement)**			
Komponente	**mg/l**	**Komponente**	**mg/l**	**Komponente**	**mg/l**
HEPES, freie Säure	7208,8	NaCl	6000,0	L-Methionin	70,0
HEPES, Natriumsalz	3514,0	KCl	300,0	L-Phenylalanin	90,0
NaCl	985,4	$NaH_2PO_4.2H_2O$	150,0	L-Prolin	20,0
$NaHCO_3$	800,1	$CaCl_2$	100,0	L-Serin	80,0
KCl	26,4	$MgCl_2.6H_2O$	150,0	DL-Threonin	60,0
$CaCl_2.2H_2O$	150,0	$NaHCO_3$	900,0	L-Tryptophan	20,0
$MgSO_4.7H_2O$	90,1	D-Glucose	3000,0	L-Tyrosin	50,0
$MnCl_2.4H_2O$	0,3	Phenolrot	10,0	L-Valin	100,0
KH_2PO_4	68,5	L-Alanin	60,0	Peptide	500,0
Natriumpyruvat	150,0	L-Arginin.HCl	55,0	Proteine	15000,0
D-Glucose	300,0	L-Asparagin.H_2O	10,0	Mitogene	2,5
Trehalose	50,0	L-Asparaginsäure	60,0	Cholinchlorid	4,0
Glutamin	49,0	L-Cystin	30,0	Folsäure	4,0
d-Biotin	0,3	L-Glutamin	420,0	I-Inositol	7,2
Gentamycin	50,0	L-Glutaminsäure	130,0	Niacinamid	4,0
Tricin	2,5	L-Glycin	15,0	D-Panthothensäure	
Phenolrot	2,0	L-Histidin.HCl.H_2O	10,0	(Ca-Salz)	4,0
BMS	10800,0	L-Isoleucin	150,0	Pyridoxal.HCl	4,0
MEM Essential Amino		*L-Leucin*	310,0	*Riboflavin*	0,4
Acid Solution (50x)	2000,0	L-Lysin.HCl	180,0	Thiamin.HCl	4,0
MEM Non-Essential					
Amino Acid Sol.(100x)	5000,0				
MEM Vitamine					
Solution (100x)	3000,0				

MEM = Minimum Essential Medium

BMS ist ein standardisierter Serumersatz. Die Proteine und Peptide stammen aus Rinderserum. Die angegebenen Werte sind der von Biochrom® zur Verfügung gestellten Typanalyse entnommen.

Mit freundlicher Genehmigung aus SCHÜRMANN(1993).

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

zu 31 Tage lang ohne lichtmikroskopisch sichtbare Anzeichen einer Differenzierung lebten. Nach dieser Zeit war die mit dem Farbstoffausschlusstest (Nigrosin) ermittelte Vitalität ("viability") noch 46 - 50% (SCHÜRMANN, 1993; SCHÜRMANN & PETER, 2001; SCHÜRMANN et al., 1998). Nach der angegebenen Zeit wurden die Kulturen lediglich aus technischen Gründen nicht weitergeführt. Längere Kulturzeiten sind daher durchaus zu erwarten. Allerdings traten in reinen Neoblastenkulturen Mitosen nur 1 – 2 Tage lang auf. Nach vierstündiger Behandlung mit Colcemid wurden in etwa 1% der mit Serum- und Serotoninzusatz kultivierten Zellen Metaphasen gefunden. Diese Rate war etwa sechsmal so hoch wie in Kontrollkulturen (SCHÜRMANN, 1993; SCHÜRMANN & PETER, 2001) und kommt nahe an Beobachtungen von Zellteilungsraten in lebenden Tieren heran: BEST et al. (1968) beschrieben für 48 h lang regenerierende Exemplare von *G. dorotocephala* einen maximalen Metaphaseindex von 1,5%. Die Zellform war in den Kulturen stark von der Beschichtung der Schalenböden und dem Proteingehalt des Mediums abhängig. Während Protein im Medium zu abgerundeten Zellen führte, entwickelten Neoblasten auf einer Collagenschicht zum Teil sehr lange Fortsätze (SCHÜRMANN, 1993; SCHÜRMANN & PETER, 2001). Sowohl Serotonin als auch die Nukleinsäurevorstufe Orotsäure steigerte das Zellwachstum (SCHÜRMANN & PETER, 1988). Positive Einflüsse von Noradrenalin und Serotonin (FRANQUINET, 1981) sowie verschiedener Wachstumsfaktoren (BAGUÑÀ et al., 1989b) wurden bereits früher beschrieben. Es ist bisher aber noch niemandem gelungen, eine permanente Neoblastenlinie zu etablieren.

4.4. Restitutionskörper: ein *in vitro*-System für Zellwechselwirkungen

Restitutionskörper wurden als mehr oder weniger sphärische bis ovoide oder auch komplex gestaltete Gebilde erstmals von FREISLING & REISINGER (1958) beschrieben, nachdem MURRAY (1927) sie bereits kurz erwähnt hatte. Sie bilden sich in Gewebebrei von Planarien spontan, indem eine Schicht aus bewimperten Epithelzellen unterschiedliche Aggregate anderer Zellen einschließt. Epithelzellen besitzen offensichtlich lateral eine maximale gegenseitige Affinität und basal eine ausgeprägte Neigung, sich an andere Zellen anzuheften. Später wurden derartige Aggregate beim Desintegrieren von Planariengewebe im DOUNCE-Homogenisator beobachtet (FRANQUINET, 1981). Unter Verwendung des für die Neoblastenkulturen entwickelten Mediums konnten solche Restitutionskörper mit dem in den Abb. 5 und 6 beschriebenen Verfahren hergestellt und bis zu 2 Wochen lang in Kultur gehalten werden (PETER, 1995b; PETER & SCHÜRMANN, 1999). Die beobachteten Formen und histologischen Strukturen (Abb. 8) entsprachen den Beschreibungen der Entdecker. Einige, doch nicht alle Zellverbände erschienen im Lichtmikroskop syncytial (vgl. FREISLING & REISINGER, 1958). Eine sichere Aussage darüber können jedoch erst Ultrastrukturstudien liefern. Da Planarien nur ventral bewimpert sind (das dorsale Epithel ist ohne Wimpern), entspricht die gesamte äußere Oberfläche solcher Gebilde der Ventralseite von Planarien. Eine Restitution ganzer Tiere aus Zellsuspensionen, wie sie bei Schwämmen (WILSON, 1907) und *Hydra* (GIERER et al., 1972) möglich ist, ist bei

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Turbellarien bisher nicht gelungen. In Verbindung mit kultivierten Neoblasten könnten Restitutionskörper dazu dienen, definierte Systeme zum Studium der Zelldifferenzierung aufzubauen, ähnlich wie dies mit den "embryoid bodies" aus embryonalen Stammzellen der Maus (SNODGRASS et al., 1992) und des Menschen (PERA, 2000) sowie Organoiden aus anderen Geweben (siehe z.B. SLORACH et al., 1999, für Stammzellen aus Darmkrypten und TAKEZAWA et al., 1993, für Fibroblasten) schon geschehen ist. Da Stammzellen auch für den Säugerembryo und für den Menschen von besonderer Bedeutung sind (HEATH et al., 1990; PERA, 2000), könnten derartige Modellsysteme auch in vergleichender Hinsicht interessant sein.

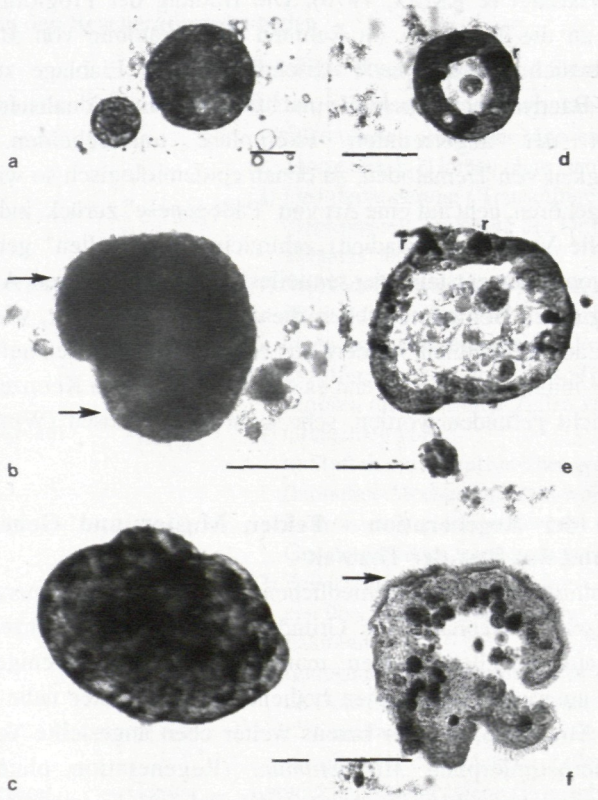


Abb. 8: Restitutionskörper aus Planariengewebe.
Die Tiere wurden in isotonem Medium (Tab. 2) desintegriert.
a - c) Totalaufnahmen in 4 %igem Formaldehyd fixierter Präparate durch ein Invertmikroskop (Reichert Biovert). **d – f)** Histologische Schnitte nach Bouin- Fixierung, Paraffineinbettung und Färbung mit Hämalaun – Eosin (Mikroskop: Leitz Aristoplan). **a, d)** verschieden große "Sphärien" von *Dugesia tahitiensis* 22 h nach Desintegration; **b)** Restitutionskörper von *Schmidtea polychroa* 32 h nach der Bildung; **c)** 12 Tage alter, stark pigmentierter Restitutionskörper von *S. polychroa*; **e)** Schnitt durch einen Restitutionskörper (1 h alt)von *D. tahitiensis*, ähnlich dem in (b) abgebildeten Totalpräparat; **f)** "Pseudogastrula" von *S. polychroa, 11 h alt.* Deutlich erkennbar sind Rhabdoide (r) in den Schnitten sowie die Bewimperung (Pfeile) in (b) und (f). Balken: 30 µm.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

5. Stammzellen, Wachstum und Entwicklung bei anderen Platyhelminthes

Es scheint, dass die bei Turbellarien und insbesondere bei den Tricladen (Planarien) beobachteten Neoblasten sowohl strukturell als auch ihrer Funktion nach den gleichnamigen Zellen bei den parasitischen Klassen Trematoda (Saugwürmer) und Cestoda (Bandwürmer) sehr ähnlich sind. Sowohl die Sprossung der Bandwurmglieder als auch die komplexen Reproduktionsvorgänge im vegetativen Teil des als Metagenese einzustufenden Fortpflanzungszyklus der Trematoden stellen asexuelle Vermehrungsprozesse dar (EHLERS, 1985). Cytologie und Entwicklung der Cestoda sind relativ gut untersucht. Tracerstudien haben auch für diese Klasse der Platyhelminthes differenzierte Zellen auf Neoblasten zurückgeführt (WIKGREN & KNUTS, 1970). Die Bildung der Proglottiden (Bandwurmglieder) erinnert an die Tierketten im Rahmen der Paratomie von *Microstomum* oder *Stenostomum*, die sich von den nach Abschnürung und Eiablage zugrundegehenden Proglottiden der Bandwürmer durch die nachfolgende Individualisierung und weitere Teilungsfähigkeit der abgetrennten Exemplare unterscheiden. Die extreme Vermehrungsfähigkeit von Trematoden, zu denen epidemiologisch so wichtige Gattungen wie *Schistosoma* gehören, geht auf eine Art von "Pädogenese" zurück, indem in den Redien (das sind asexuelle Vermehrungsstadien) zahlreiche "Keimballen" gebildet werden, in denen sich Embryonen neu entstehender sexueller Tiere differenzieren. Auf Grund der vorliegenden cytologischen Befunde bestehen diese Keimballen nicht, wie man das früher angenommen hat, aus Keimzellen, sondern aus Neoblasten. Meiosen auf dem Weg zu den Keimballen (diese müsste es geben, wenn es sich tatsächlich um Keimzellen handeln sollte) sind bisher nicht gefunden worden, sehr wohl aber Mitosen (WHITFIELD & EVANS, 1983).

6. Mechanismen der Regeneration - Felder, Muster und Gene. Konzepte für Turbellarien und den Rest der Tierwelt

Unsere Kenntnis von den unterschiedlichen Strategien der Regeneration im Tierreich ist immer noch sehr lückenhaft. Aus Gründen des Aufwands konzentrieren sich die Untersuchungen auf Modellorganismen, manchmal nur einige wenige innerhalb eines Stammes. Allein unter den Turbellarien bedienen sich mitunter nahe verwandte Arten unterschiedlicher Strategien, wie der bereits weiter oben angestellte Vergleich zwischen den beiden Macrostomorphen *Microstomum* (Regeneration ohne Blastem) und *Macrostomum* (Regenerationsblastem) zeigt (s. Kapitel 2.2). Es ist daher Vorsicht angeraten, wenn man von Modellorganismen auf die innerhalb einer größeren taxonomischen Gruppe existierenden Regenerationsmechanismen schließen will. Die umfangreichsten Informationen liegen über die Regeneration der Wirbeltiere und der Plattwürmer vor (FERRETTI & GÉRAUDIE, 1998).

Im Bemühen, verschiedene Regenerationsstrategien systematisch zu vergleichen und dabei Näheres über die grundlegenden Mechanismen zu erfahren, sind seit Begründung der modernen Regenerationsforschung sehr unterschiedliche Gesichtspunkte angewendet worden (Tab. 3). Dies entsprang dem Fortschritt der Wissenschaft. Stellt man die großen

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Konzepte einander gegenüber, so erkennt man unterschiedliche Fragestellungen und Schwerpunkte des Interesses. Obwohl sich das Verständnis der Regenerationsmechanismen mit der Entwicklung der Biologie ständig vertieft, lassen sich alte Fragen durch neuere Modelle nicht unbedingt endgültig beantworten. Während sich der Blickwinkel von der Frage nach der Herkunft der regenerierten Gewebe bis zur genetischen Basis geweitet hat, werden frühere Theorien und Hypothesen, wenn nicht falsifiziert, dann mit mechanistischen Details ausgefüllt und erweisen sich somit als entscheidende Leitlinien für die weitere Forschung. In den folgenden Zeilen soll versucht werden, eine Übersicht über die unterschiedlichen Betrachtungsebenen und wesentlichsten Fragestellungen zu geben und

Tab. 3: Theorien zu den Regenerationsstrategien

Fragestellung	**Ebene**	**Beteiligte Mechanismen und Strukturen**
1. Herkunft des Materials	Gewebe	(1) Epimorphose (Neubildung); Beteiligung von Stammzellen und / oder Mitosen (2) Morphallaxis (Umbau ohne Neubildung) (3) Dedifferenzierung / Transdifferenzierung (Metaplasie): Änderung des Differenzierungszustands ohne Zellteilungen
2. Differenzierungsstrategie	Zellen	(1) Stammzellensysteme: Differenzierung aus uni-, pluri- oder totipotenten Stammzellen. Diese bilden einen sich selbst erneuernden Pool. (2) Dedifferenzierung und Transdifferenzierung. Mitosen differenzierter Zellen können vorkommen.
3. Physiologischer Ablauf	Körper	(1) Gradienten von a) Stoffen mit Diffusion über größere Strecken (humorale Mechanismen im weitesten Sinn) b) Prozessen und Signalen (z.B. Respiration, Genexpressionen, elektrischen Potentialen) (2) Zell-Zell und / oder Zell-Matrix- Wechselwirkungen über direkte Kontakte bzw. diffundierende Faktoren (3) Endogene Programmabläufe in Zellen: zunehmende Determination im Laufe mehrerer Mitosen ("commitment" von Stammzellen erzeugt Progenitorzellen für differenzierte Zellen).
4. Genetische Steuerung	Genom	Entwicklungskontrollgene (Homeobox-Gene u.a.) Konzepte: Festlegung von Achsen durch Änderung von Genexpressionsmustern in Raum und Zeit, Setzen von Positionswerten und Bildung morphogenetischer Felder Wirkende Faktoren: primär Transkriptions- und Translationsprodukte (z.B. Transkriptionsfaktoren), in weiterer Folge Wirkungsmechanismen verschiedener Art auf allen Ebenen einschließlich der unter (1. – 4.) genannten Optionen möglich.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

dabei die Verhältnisse bei den Turbellarien in einen größeren Zusammenhang zu integrieren.

Die Frage nach der Herkunft der regenerierten Strukturen stellte sich wohl zuerst, nachdem das Ausmaß der Regenerationsfähigkeit untersucht war. Komplette Neubildungen, als Epimorphosen bezeichnet, findet man häufig bei Körperanhängen und in distalen Bereichen, so etwa bei der Extremitätenregeneration der Amphibien (GARDINER & BRYANT, 1998). Dieser Typ der Regeneration ist stets mit Zellteilungen verbunden. Die Alternative dazu stellt die Morphallaxis, ein Umbau vorhandener Gewebe ohne die Neubildung von Zellen, dar (MORGAN, 1900). Das klassische Beispiel dafür liefert der Süßwasserpolyp *Hydra*: Teilstücke regenerieren zu Exemplaren mit den ursprünglichen Körperproportionen, ohne dass dazu Zellteilungen erforderlich sind. Entsprechend verkleinerte Tiere sind das Ergebnis (BOSCH, 1998; CUMMINGS & BODE, 1984). Um die ursprüngliche Größe wieder zu erreichen, müssen natürlich Zellteilungen stattfinden, allerdings in einer späteren Phase und ohne Regenerationsblastem.

Wie weiter oben erörtert worden ist, bedienen sich Turbellarien beider Mechanismen (BRØNDSTED, 1969; MORGAN, 1900). Es gibt noch eine dritte Möglichkeit, die in vergleichenden Studien meist nicht ausdrücklich erwähnt wird: die Transdifferenzierung vorhandener Zellen ohne Zellteilungen, aber mit Änderungen in den Differenzierungszuständen. Während in jüngerer Zeit meist nur Epimorphose und Morphallaxis als die beiden Alternativen erwähnt werden (GOSS, 1969, 1974), hat bereits KORSCHELT (1927) die "Dedifferenzierung" (Metaplasie) als dritte Möglichkeit diskutiert. Manche Autoren (z.B. COWARD & HAY, 1972; HAY, 1968) postulieren diesen Mechanismus für Planarien. Es wäre somit denkbar, dass diese Tiere alle drei Wege zur Wiederherstellung ihres Körpers einsetzen. Hinsichtlich des Regenerationsausmaßes kennt man bei zwei Tierstämmen noch größere Fähigkeiten: sowohl Schwämme (THOUVÉNY & TASSAVA, 1998; WILSON, 1907) als auch der Coelenterat *Hydra* (BOSCH, 1998; GIERER et al., 1972) können aus kleinsten Fragmenten, ja, selbst aus dissoziierten Zellen, komplette Individuen restituieren.

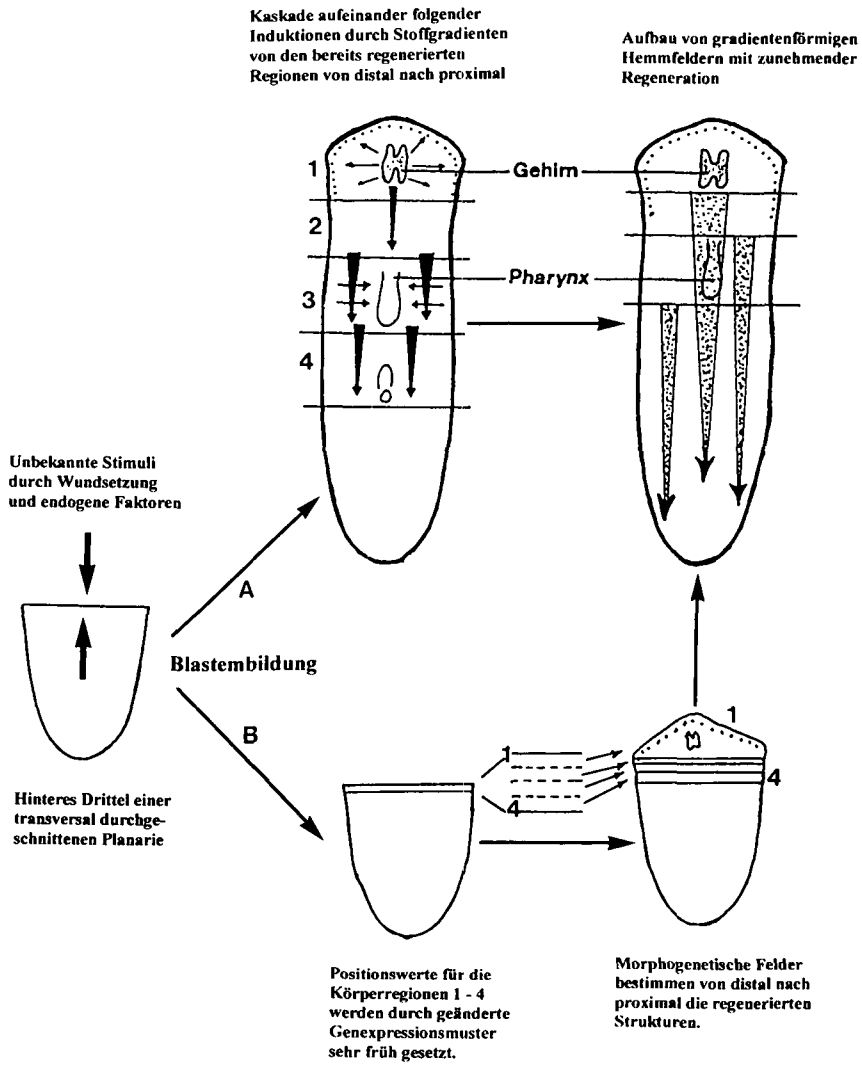
Auch die Frage nach der Steuerung der Regeneration wurde bereits von den Pionieren auf diesem Gebiet gestellt. Der Begriff des morphogenetischen Gradienten (CHILD, 1913; s. auch BRØNDSTED, 1969) ist als Konzept bis heute aktuell geblieben und folgt aus der axialen Ausrichtung und polaren Orientierung der Regenerationsvorgänge. Seine Interpretation hat sich allerdings gewandelt. Vermutete CHILD (1913) noch einen respiratorischen Gradienten, der sich später nicht bestätigen ließ, so sucht man heute die Ursache morphogenetischer Felder in zeitlich und räumlich unterschiedlicher Genexpression (GILBERT, 2000). Tatsächlich konnten bei Planarien etliche Entwicklungskontrollgene nachgewiesen werden, unter anderen 7 *Hox*-Gene (siehe z.B. BAGUÑÀ, 1998; BALAVOINE, 1997; BAYASCAS et al., 1997; GARCÍA-FERNÀNDEZ et al., 1991) und 3 *POU*-Gene (ORII et al., 1993, 1995). Da im Rahmen des großen Regenerationsvermögens von Planarien das Ausmaß von Neubildungen zum Teil mit Vorgängen während der Embryonalentwicklung vergleichbar ist, lag der Gedanke nahe, Homeobox-Gene könnten im adulten Tier in einem axialen Gradienten entweder permanent exprimiert sein oder aber bei Bedarf einen solchen Gradienten bilden. Homöotische Gene, welche während der Embryonalentwicklung die

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

spezifische Differenzierung der einzelnen Körperregionen steuern, wurden während der Evolution stark konserviert und erfüllen in so unterschiedlichen Bauplänen wie jenen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der Maus *Mus musculus* sehr ähnliche Funktionen (siehe z.B. GILBERT, 2000; LEWIN, 1998; MURTHA et al., 1991). Überraschenderweise exprimiert *Girardia tigrina* vier *Hox*-Gene ständig homogen im ganzen Körper und zwei, davon ein Homologes zum *Antennapedia*-Gen, diskontinuierlich von vorne nach hinten unterschiedlich stark. In Blastemen und ihrer unmittelbaren Nachbarschaft ist die Expression der erwähnten vier Gene erhöht, egal, ob es sich um vordere, hintere oder seitliche Blasteme handelt (BAYASCAS et al., 1998). Die beiden räumlich diskontinuierlich exprimierten *Hox*-Gene hingegen werden in vorderen Blastemen vor der Regeneration von Köpfen vom distalen zum proximalen Bereich hin sequenziell abgeschaltet, während hintere Blasteme, welche Schwänze regenerieren, eine zunehmende Aktivierung dieser beiden Gene aufweisen. So erfolgt offensichtlich die Determinierung der entsprechenden Körperregionen, und zwar bereits am ersten Tag der Regeneration in einem schmalen Bereich an der Wunde, noch bevor sich ein Blastem bildet oder Differenzierungsprozesse histologisch nachweisbar sind (BAGUÑÀ, 1998). Wenn diese Determination als morphallaktischer Prozess bezeichnet wird, so wird damit allerdings eine Abwandlung des Begriffs vollzogen, der sich in seiner ursprünglichen Fassung ja auf die Herkunft des regenerierten Gewebes und nicht auf den Mechanismus bezieht, der das neue Muster entstehen lässt. Dieses jüngste Modell zum Regenerationsablauf (Abb. 9) ist im Einklang mit der Theorie stofflicher Gradienten (BRØNDSTED, 1969; LENDER, 1965; WOLFF et al., 1964). Das neue Muster wird lediglich wesentlich früher und in einer engeren Zone festgelegt, als dies WOLFF et al. angenommen haben. Die Determination der Progenitorzellen dürfte allerdings bereits im Parenchym erfolgen, ehe sie noch das Regenerationsblastem erreicht haben. Darauf lassen Beobachtungen über die Genexpressionsmuster solcher Zellen schließen (AGATA, 2001). Leider ist das Genom der Turbellarien, von den erwähnten homöotischen Genen bei Planarien abgesehen, nur sehr mangelhaft bekannt. Eine Mutantenanalyse über Funktionsverlust ("loss of function mutants") ist daher schon aus diesem Grund zur Zeit noch nicht möglich. Dafür hat sich ein anderer Weg als geeignet erwiesen, den Ausfall einzelner Genexpressionen in ihrer Wirkung auf die Regeneration zu untersuchen. Injiziert man doppelsträngige RNA ("sense and antisense RNA"), welche mit Hilfe von cDNA-Sequenzen eines Myosin-Gens hergestellt worden ist, in Regenerationsblasteme von *Schmidtea mediterranea*, so wird spezifisch die Bildung der Körperwandmuskulatur gehemmt, ohne dass andere Strukturen beeinträchtigt werden (SÁNCHEZ ALVARADO & NEWMARK, 1999).

Wie wird nun das Muster von Genexpressionen in ein morphologisches Muster übersetzt? Die Möglichkeit dazu ist einsichtig: Die Neoblasten, welche das Blastem aufbauen, kommen vom Stumpf her und müssen also durch das Gewebe mit den bereits gesetzten Determinierungssignalen hindurch. Da die Neoblasten von einem Bereich außerhalb des determinierten Areals kommen, können sie ursprünglich keine Information über ihre Bestimmung haben. Es muss also einen Mechanismus geben, der die Information über den

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at



jeweiligen Positionswert (GILBERT, 2000; WOLPERT, 1978; WOLPERT et al., 1972) an die Neoblasten übermittelt. Dass im adulten Tier solche Positionswerte gespeichert sein müssen, folgt aus den regionalspezifisch reagierenden Antikörpern (BUENO et al., 1997) sowie aus dem Ablauf der interkalaren Regeneration. Schneidet man aus einer Planarie ein mittleres Stück quer heraus und propft die beiden Endstücke aufeinander, so werden – in diesem Fall ohne Regenerationsblastem - immer genau jene Strukturen neu gebildet, die den fehlenden Positionswerten entsprechen (BAGUÑÀ, 1998; BRØNDSTED, 1969). Es ist offen,

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Abb. 9: Modellvorstellungen zum Ablauf der Regeneration einer Planarie nach Wegschneiden des Vorderendes, illustriert am Beispiel von *Polycelis*.

A: Sequenz von Induktionen nach E. WOLFF (nach LENDER, 1965). Dekapitierte Tiere erfahren durch die Wundsetzung äußere Stimuli und endogene Reize (z.B. durch Neurosekrete). Durch deren Zusammenwirken werden Blastembildung und Differenzierung an der Wunde ausgelöst. Die Neubildung der verloren gegangenen Strukturen im Rahmen der anschließenden Epimorphose erfolgt von distal nach proximal, indem die neu gebildeten Strukturen in einer Kaskade Induktionen von vorne nach hinten ausüben (Pfeile). Auch induziert das umliegende Gewebe die darin noch fehlenden Organe (z.B. Gehirn und Pharynx). Die Körperregionen 1- 4 werden nacheinander regeneriert, sind aber zur Vereinfachung in einer einzigen Skizze dargestellt. Nach vollständiger Regeneration ist das ursprüngliche System von Hemmfeldern wiederhergestellt, die sich gradientenförmig von vorne nach hinten erstrecken (Pfeile) und die Neubildung von Strukturen verhindern, die für weiter vorne liegende Körperregionen charakteristisch sind. Ebenso hemmen vorhandene Organe (z.B. Gehirn und Pharynx) ihre Mehrfachbildung in der gleichen Region.

B: Modell morphogenetischer Felder, die durch Positionswerte definiert sind (nach BAGUÑÀ, 1998). Die durch die Verletzung ausgelösten äußeren und inneren Signale führen zu einem geänderten Expressionsmuster bestimmter homöotischer (*Dthox*-) Gene. Dadurch werden früh (innerhalb eines Tages nach der Wundsetzung) in einem schmalen Blastembereich von 200 – 300 µm in der Richtung von distal nach proximal Positionswerte gesetzt, bevor dort noch Differenzierungen erkennbar sind. So werden morphogenetische Felder determiniert, in denen sich anschließend während der Epimorphose die der jeweiligen Position in der Längsachse entsprechenden Strukturen neu bilden. Reihenfolge und Richtung dieser Vorgänge stimmen mit dem Modell A überein. Allerdings nimmt WOLFF wesentlich spätere Determinierungsprozesse an, die durch die Induktionen schrittweise erfolgen. Davon abgesehen, sind beide Modelle miteinander vereinbar. Während sich das Modell A auf den physiologischen Ablauf bezieht, beschreibt das Modell B die Genwirkungen während der Regeneration. Keines der beiden Modelle sagt etwas über den entscheidenden Stimulus für die Regeneration oder die auf Grund der Genexpressionen im einzelnen wirkenden Faktoren aus.

welche Mechanismen all diese Abläufe steuern. Eine Möglichkeit wären stoffliche Gradienten induzierender oder inhibitorischer Stoffe (also im weitesten Sinn humorale Mechanismen). Dass Extrakte von Planariengeweben die Bildung der darin vorhandenen Strukturen hemmen, ist lange bekannt (siehe z.B. BRØNDSTED, 1969; LENDER, 1955b). Ebenso sind induzierende "Organisine" beschrieben worden (LENDER, 1955a). Freilich kann die Spezifität der beobachteten Wirkungen nicht als erwiesen gelten, handelte es sich doch durchwegs um Rohextrakte. Stimulierende (FRIEDEL & WEBB, 1979; STEELE & LANGE, 1977) und hemmende Fraktionen (SHINOZAWA et al., 1995) konnten auch angereichert werden, ohne dass bisher eine Reindarstellung und molekulare Charakterisierung von Inhibitoren oder induzierenden Faktoren gelungen ist. Gradienten solcher Inhibitoren wurden unter anderem auf elektrische Felder in der Längsachse der Tiere zurückgeführt (LANGE & STEELE, 1978). Diffundierende Faktoren könnten eine Folge anderer Mechanismen sein oder zusätzlich zu diesen wirken. Zell-Zell-Kontakte direkter oder sekretorischer Art kommen hierbei ebenso in Betracht wie eine Determinierung von Zelllinien durch schrittweise Weichenstellung oder auch eine Art "Mitosen-Uhr" nach der

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Zahl der durchlaufenen Zellzyklen (BAGUÑÀ, 1998). Diese müsste freilich ablaufen, bevor die Neoblasten das Blastem aufbauen. Jüngste Daten über Genexpressionsmuster in parenchymatischen Neoblasten (AGATA, 2001) sind mit einer solchen Hypothese vereinbar. Natürlich könnten auch mehrere Mechanismen wirken. Damit mündet die Frage der Musterbildung in die Forderung, mehr über die Neoblasten, ihre Kinetik und ihre Heterogenität in Erfahrung zu bringen.

Sollten die Stammzellen unter den Neoblasten tatsächlich eine sich selbst erneuernde, homogene Population bilden, so wäre tatsächlich ein einziger Zelltyp totipotent. Dies wäre ein einzigartiger Fall im Tierreich, denn die ebenfalls totipotenten Archäocyten der Schwämme können, wie erwähnt, auch aus differenzierten Zellen entstehen (CONNES, 1974). Allerdings relativieren jüngste Erkenntnisse über Säugerzellen diese Aussage, denn auch dort können Stammzellen in geeigneter Umgebung (also z.B. infolge einer Verletzung) ihre Kompetenzen ändern und erweitern (siehe z.B. VAN DER KOOY & WEISS, 2000). Das heißt, dass bei Säugern für die physiologische Regeneration und für die Reparatur von Verletzungen offenbar unterschiedliche zellbiologische Strategien verwendet werden. Umso interessanter wird es daher auch sein, die Frage zu beantworten, ob das bei Turbellarien genauso ist oder aber eine totipotente Stammzelle universelle Kompetenz für jegliche Zellerneuerung hat. Das wäre auf Grund der Stellung der Platyhelminthes an der Basis der Bilateria zu erwarten.

Damit Regeneration überhaupt einsetzten kann, scheint die Anwesenheit eines Nervenstranges unabdingbar zu sein (siehe. z.B. SPERRY & ANSEVIN,1975; SPERRY et. al., 1973). Auch wurden Neurosekrete immer wieder für die Regeneration verantwortlich gemacht (so z.B. von LENDER, 1974). Der durch die Wundsetzung induzierte Stimulus für das einseten der Differenzierungsvorgänge ist bisher nicht aufgeklärt. Vergleicht man die histologische Struktur einer intakten Körperstelle mit einer frisch verschlossenen Wunde, so fehlt bei dieser die Basallamina. Daraus hat man die Vermutung abgeleitet, der unmittelbare Kontakt zwischen Epithelzellen und Parenchym sei an der Induktion der Differenzierung zumindest wesentlich beteiligt, wenn nicht sogar der auslösende Faktor dafür (BAGUÑÀ et al., 1994). Diese Hypothese konnte durch ein Experiment sehr wahrscheinlich gemacht werden, bei welchem der Wundverschluss so lange verzögert wurde, bis sich die Basalmembran unter dem neuen Epithel vollständig nachgebildet hatte (SCHÜRMANN & PETER, 1998): Magnesiumchlorid im Kulturwasser wirkt als Muskelrelaxans und führt zu klaffenden Wunden, die nur allmählich mit einem Epithel verschlossen werden. Dekapitierte Exemplare von *Schmidtea polychroa*, die in einer Lösung von 21 mM/l Magnesiumchlorid in Kulturwasser gehalten werden, regenerieren keinen Kopf, obwohl die Wunde – wenn auch verzögert – vollständig verheilt. Dass dies nicht auf unspezifische toxische Effekte und auf einen allgemeinen Verlust der Regenerationsfähigkeit zurückgehen kann, beweisen Versuche, in denen kopflose "Regenerate" neuerlich amputiert wurden und in normalem Kulturwasser den Kopf ebenso schnell regenerierten wie völlig unbehandelte Kontrolltiere. Der Kontakt zwischen Epithel und Parenchym der Wunde könnte auch den Ablauf der oben erwähnten sequenziellen Genaktivierung triggern. Bei verschie-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

denen Regenerations- und Entwicklungsprozessen induziert die Wechselwirkung zwischen Epithelzellen und mesodermalen Zellen die Expression von Homeobox-Genen. Dies ist etwa von der Entwicklung der Extremitätenknospen beim Huhn bekannt (siehe z.B. ROBERT et al., 1991 und ROS et al., 1996). Die Basallamina schließt sich bei der Regeneration von Planarien erst relativ spät (PEDERSEN, 1972). Der direkte Kontakt zwischen Epithel und Parenchym könnte daher für die Auslösung der Regeneration entscheidend sein. Das Zeitfenster für diesen Kontakt müssen spätere Versuche aufklären. Eine vordere Wunde (nach Dekapitieren) wird durch dorsales, eine hintere durch ventrales Epithel verschlossen (CHANDEBOIS, 1980). Dies könnte Signale für die Polarität der Regenerate setzen. Beide Epithelien sind bei Planarien allein schon an der nur ventral vorhandenen Bewimperung leicht unterscheidbar.

7. Ausblick und laufende Untersuchungen

Die Bemühungen, Regeneration und Zelldifferenzierung bei Turbellarien entwicklungsgenetisch zu erklären, haben Herkunft und Schicksal der Neoblasten erneut in den Brennpunkt des Interesses gerückt (BAGUÑÀ, 1998). Ein besseres Verständnis der Zellbiologie von Turbellarien erscheint daher auf dem Weg zu einer kausalen Erklärung der Regenerationsvorgänge unerlässlich. Insbesondere wäre es wichtig, mehr über die Heterogenität des Neoblastenpools zu erfahren, wie sie aus den oben dargelegten zellkinetischen, analytischen, immuncytochemischen und molekularbiologischen Befunden zu erschließen ist. In der Fortsetzung der hier beschriebenen eigenen Untersuchungen sollte es mit Hilfe der dauerhaften Markierung von Zellkernen mit BrdU (LADURNER et al., 1998, 2000; NEWMARK & SÁNCHEZ ALVARADO, 2000) und der Fraktionierung von Neoblasten möglich sein, Schicksal und Entwicklung dieser Zellen in verschiedenen Phasen von Wachstum und Regeneration zu verfolgen. In fernerer Zukunft könnte *Dugesia tahitiensis* als extrem regenerationsfähige asexuelle Turbellarienart dazu dienen, das Schicksal der Neoblasten im Ablauf der Differenzierung mit Hilfe injizierter, dauerhaft markierter Zellen aus Kulturen zu untersuchen. Sowohl Farbstoffe und BrdU als Marker wie auch transgene Zellen mit Reportergenen kämen dafür in Betracht (vgl. auch BAGUÑÀ, 1998; BAGUÑÀ et al., 1990).

Die Gewinnung von Neoblastenfraktionen durch Dichtegradientenzentrifugation (Kapitel 4.2) ist eine Voraussetzung für solche Experimente. Die so erhaltenen Zellfraktionen können nach einem für Neoblasten bereits adaptierten und durch Bildanalyse quantitativ auswertbaren Färbeverfahren mit Acridinorange auf ihren DNA- und RNA-Gehalt untersucht werden (BEHENSKY et al., 2001). Daraus sind Daten zur Verteilung der Zellzyklusphasen in den Neoblasten zu erwarten. Insbesondere verspricht die Kombination der Dichtegradientenzentrifugation mit BrdU-Pulsmarkierungen von *Macrostomum*-Zellen und anschließender quantitativer Bildanalyse der Zellen *in situ* sowie fraktionierter Zellen Aufschlüsse über die Dynamik der Neoblasten. In Schalenkulturen von nicht fraktionierten Zellsuspensionen aus Planarien konnten Mitosen über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet werden (SCHÜRMANN & PETER, 2001). Um aus bestimmten Neoblastenfrak-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

tionen proliferierende Primärkulturen zu erhalten, eignen sich Feeder-Layer aus röntgenbestrahlten Zellsuspensionen. Durch die Kultivierung von Zellfraktionen unter solchen Bedingungen müssten sich die wirksamen Faktoren wie auch der proliferationsfähige Anteil des Neoblastenkompartiments nach und nach einengen lassen. Damit wäre ein wesentlicher Schritt zur Etablierung einer permanenten Stammzelllinie aus Turbellarien getan, die für weitere Experimente eingesetzt werden könnte.

8. Zusammenfassung

Unter den Turbellarien, einer stammesgeschichtlich alten Gruppe der Plattwürmer (Platyhelminthes), gibt es Arten mit außergewöhnlich großem Regenerationsvermögen. Dieses kennt man vor allem von den Tricladen (Planarien). Zum Unterschied von anderen Tierstämmen, etwa den Wirbeltieren, ist bei Turbellarien nur ein einziger teilungsfähiger somatischer Zelltyp bekannt. Er wird meist als Neoblast bezeichnet und ähnelt mit seiner geringen Größe, Organellenarmut und dem stark basophilen Cytoplasma den I-Zellen (interstitiellen Zellen) von *Hydra*. Dieser Zelltyp ist für die physiologische Zellerneuerung, für das Wachstum und auch für die reparative Regeneration nach Verletzungen zuständig. Neuere Untersuchungen haben diese von Dedifferenzierungshypothesen bezweifelten Funktionen der Neoblasten bestätigt. Ihre Totipotenz unterscheidet Neoblasten von den meisten übrigen von Tieren bekannten regenerativen Zellen. Allerdings ist nicht geklärt, ob diese Fähigkeit tatsächlich einem einzigen Stammzelltyp oder dem gesamten proliferationsfähigen Kompartiment unter den Zellen eines Tieres zukommt. Ultrastrukturelle und zellkinetische Daten haben gezeigt, dass der Neoblastenpool heterogen ist. So finden sich darin neben echten Stammzellen auch Progenitorzellen und frühe Differenzierungsstadien. Die Herkunft der Neoblasten ist umstritten. Die Anschauungen reichen von einem auf embryonale Stammzellen zurückgehenden Pool bis zu Durchgangsstadien auf verschiedenen Wegen der Transdifferenzierung. Schwierigkeiten bei der dauerhaften Markierung von Turbellarienzellen sind die Ursache der trotz vielen Studien immer noch bestehenden Wissenslücken. Daran ändern auch in neuerer Zeit gewonnene beachtliche Einsichten in die Funktionen von Entwicklungskontrollgenen bei der Regeneration von Planarien nur wenig.

Gemeinsam mit mehreren Coautoren gewonnene Ergebnisse werden im Zusammenhang mit dem derzeitigen Kenntnisstand über Regeneration und Stammzellen bei Plathelminthen diskutiert. Im Bestreben, unsere Kenntnisse über die Eigenschaften und Funktionen der Stammzellen von Turbellarien zu bereichern, wurde die asexuelle Tricladenart *Dugesia tahitiensis* als Modellorganismus für Regenerationsstudien eingeführt. Dafür bietet diese Art die folgenden Vorzüge: Genetisch einheitliche Klone entstehen ohne künstliche Eingriffe. Das Fehlen von Keimzellen und der extrem hohe Anteil von Neoblasten an der Gesamtheit aller Zellen sind für die Isolierung und Untersuchung von Neoblasten entscheidende Vorteile. Eine größere Neoblastendichte ist bisher bei keiner anderen Art gefunden worden. Dies entspricht dem außergewöhnlich großen Regenerations- und Fortpflanz-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

ungspotential. Eine schnellere und umfangreichere Regeneration kennt man von keiner anderen Planarienart. Indem diese Fähigkeit auch dem natürlichen Prozess der Fortpflanzung durch Querteilung zugute kommt, tragen experimentell gewonnene Daten über die Regeneration dieser Tiere zugleich zur Kenntnis ihrer Reproduktionsbiologie bei. Experimente zur Hemmung der Regeneration durch Verzögerung der Wundheilung bei *Schmidtea (Dugesia) polychroa* haben den direkten Kontakt zwischen Epithel- und Parenchymzellen als notwendige Voraussetzung für die Blastembildung und Differenzierung bestätigt.

Als neue Möglichkeiten zur Analyse von Turbellarienzellen und zur Aufklärung ihrer Dynamik haben sich mehrere Varianten der Zentrifugation von Zellsuspensionen im Percoll-Dichtegradienten bewährt. Dazu werden Planarien zuvor mechanisch und enzymatisch desintegriert. Die verwendeten isotonen Medien erlauben Primärkulturen der hoch angereicherten Neoblasten. Solche Kulturen können ohne Anzeichen von Differenzierungsvorgängen mindestens 31 Tage lang am Leben erhalten werden. Das Verhalten der Zellsuspensionen in den verschiedenen Dichtegradienten bestätigte die Heterogenität des Neoblastenpools. Zur Analyse der gewonnenen Fraktionen wurden spezifische Färbeverfahren eingesetzt. Damit konnten 4 Subtypen von Neoblasten charakterisiert werden. Deren gegenseitige Beziehung (getrennte Linien oder Abstammung von einer gemeinsamen Stammzelle) muss allerdings noch geklärt werden. Auch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der DNA- und RNA-Gehalte von Neoblasten aus Planarien (Tricladen) mit Hilfe der quantitativen Videomikroskopie bestätigte die Heterogenität des Neoblastenpools.

Bei Macrostomiden kann das in Zellkerne statt Thymidin eingebaute 5-Brom-2´-desoxyuridin mit immuncytochemischen Verfahren sowohl in Totalpräparaten als auch in isolierten Zellen nachgewiesen werden. So lassen sich an Totalpräparaten zugleich DNA-Syntheseraten und die Verteilung der proliferierenden Zellen untersuchen. Neoblasten aus *Macrostomum* sind mit dem neu entwickelten Verfahren bereits isoliert worden. Die Fraktionierung markierter Zellen und deren quantitative Auswertung mit der Fluoreszenz-Videomikroskopie versprechen zusätzliche Einblicke in die Zellkinetik dieser Tiere. Neue ultrastrukturelle Daten zur Kernstruktur dieser Neoblasten im Gewebeverband schufen einen weiteren Parameter, um im Dichtegradienten getrennte Neoblasten zu charakterisieren.

Für Modellsysteme zum Studium der Zelldifferenzierung stehen Restitutionskörper zur Verfügung, die man aus den Zellsuspensionen unter reproduzierbaren Bedingungen erhalten kann. Neoblastenkulturen stellen eine Voraussetzung für genetisch markierte Zellen dar, welche in Injektions- und Transplantationsversuchen eingesetzt werden könnten, um die Differenzierungswege von Neoblasten aufzuklären. Dazu sollte allerdings erst eine permanente Neoblastenlinie etabliert werden.

Die mit dem beschriebenen Methodeninventar gewonnenen Erkenntnisse werden in den aktuellen Kenntnisstand über die Regeneration und ihre zellbiologischen Grundlagen bei Turbellarien integriert. Aus mehreren Gründen und nicht zuletzt wegen ihrer basalen Stellung im System der Tiere eignen sich diese Organismen als Modelle, um generalisier-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

bare Erkenntnisse über Regeneration, Stammzellensysteme und Differenzierung zu gewinnen. Die enge Verwandtschaft zu parasitischen, zum Teil epidemiologisch bedeutsamen Plattwürmern macht Kenntnisse über Stammzellen von Turbellarien auch in einem angewandten Kontext interessant. Da diese Tiere für die Regeneration mit Sicherheit sowohl Epimorphose (Neubildung von Zellen) als auch Morphallaxis (Umstrukturierung bestehender Gewebe) und vielleicht noch zusätzlich zu Stammzellen die Umdifferenzierung fertig differenzierter Zellen einsetzen, sind sie ideale Modellorganismen für einen Vergleich dieser bei anderen Tiergruppen in der Regel getrennt beschrittenen Strategien.

9. Danksagung

Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich (FWF, Projekt P13060-BIO) und der Stiftungs- und Förderungsgesellschaft der Paris-Lodron-Universität Salzburg sei für die Finanzierung eines Teils der hier beschriebenen Untersuchungen, der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Salzburg für die Anschaffung einer hoch empfindlichen 3CCD Videocamera (Hamamatsu C5810) für die quantitative Bildanalyse aufrichtig gedankt. Die Stiftungs- und Förderungsgesellschaft hat darüber hinaus durch eine großzügige Kostenbeteiligung zur Drucklegung dieser Arbeit beigetragen. Mein herzlicher Dank gilt dem Leiter des oben erwähnten Forschungsprojekts, Herrn Univ. Prof. Dr. Reinhard M. RIEGER (Institut für Zoologie und Limnologie der Universität Innsbruck), Herrn Dr. Wolfgang SCHÜRMANN, Herrn Mag. Christian BEHENSKY und allen übrigen Kolleg(inn)en, die gemeinsam mit mir als Coautoren in den hier zitierten Publikationen genannt sind. Darüber hinaus sei Frau Hilde ODER und Herrn Mag. Thomas PICHLER für die Betreuung der Laborkulturen ebenso gedankt wie dem Institut für Genetik und Allgemeine Biologie der Universität Salzburg, das die Basisstruktur und Ausrüstung für meine Arbeiten bereitgestellt hat. Auch den vielen Fachkolleg(inn)en, welche diese Arbeit durch Diskussionen und Kritik gefördert haben, gilt mein Dank. Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Studie wurde durch die Entdeckung und Erstaufsammlung von *Dugesia tahitiensis* durch Mme. Dr. Nicole GOURBAULT (Muséum d´ Histoire Naturelle, Paris) und durch die Weitergabe etlicher Exemplare dieser Art durch Herrn Prof. Dr. Mario BENAZZI (Università di Pisa, später Marina di Pisa) an mich erst ermöglicht. Beiden gebührt daher mein spezieller Dank. Besonders herzlich möchte ich meiner Frau Hedwig für ihr Verständnis für so manche Forschungsarbeit zu ungewohnter Stunde und für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

10. Literatur

ADAMS, R.P., J.T. KNOWLER & D.P. LEADER (1992): The Biochemistry of the Nucleic Acids. - Chapman & Hall, London, New York etc., XXII + 675 pp.

ADITYA, A.K. & P.N. GHOSH (1995): Autoradiographic studies of spermatogenesis in *Dugesia bengalensis*, Kawakatsu. - Hydrobiologia **305**: 227.

AGATA, K. (2001): The regeneration system of planarians. - Belg. J. Zool. **131** (Supplement 1): 101.

ÅKESSON, B., R. GSCHWENTNER, J. HENDELBERG, P. LADURNER, J. MÜLLER & R. RIEGER (2001): Fission in *Convolutriloba longifissura*: Asexual reproduction in acoelous turbellarians revisited. - Acta zool. **82**: 231 - 240.

AULADELL, C., J. GARCIA-VALERO & J. BAGUÑÀ (1993): Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique. - J. Morph. **216**: 319 - 326.

BAGUÑÀ, J. (1976a): Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation. - J. Exp. Zool. **195**: 53 - 64.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

BAGUÑÀ, J. (1976b): Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II. Mitotic studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation. - J. Exp. Zool. **195**: 65 - 80.

BAGUÑÀ, J. (1981): Planarian neoblast. - Nature **290**: 14 - 15.

BAGUÑÀ, J. (1998): Planarians. - In: P. FERRETTI & J. GERAUDIE (Hrsg.): Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans. J. Wiley & Sons, Chichester, New York etc., p.135 - 165.

BAGUÑÀ, J. & B.C. BOYER (1990): Descriptive and experimental embryology of the Turbellaria: Present knowledge, open questions and future trends. - In: H. MARTHY (Hrsg.): Experimental Embryology in Aquatic Plants and Animals. NATO ASI Series A, Vol. **195**. Plenum Press, New York, London, p. 95 - 128.

BAGUÑÀ, J. & R. ROMERO (1981): Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia (S) mediterranea* and *Dugesia (G) tigrina*. - Hydrobiologia **84**: 181 - 194.

BAGUÑÀ, J., E. SALÓ, J. COLLET, C. AULADELL & M. RIBAS (1988): Cellular, molecular and genetic approaches to regeneration and pattern formation in planarians. - Fortschr. Zool. **36**: 65 - 78.

BAGUÑÀ, J., E. SALÓ & C. AULADELL (1989a): Regeneration and pattern formation in planaria. III. Evidence that neoblasts are totipotent cells and the source of blastema cells. - Development **107**: 77 - 86.

BAGUÑÀ, J., E. SALÓ & R. ROMERO (1989b): Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. - Int. J. Dev. Biol. **33**: 261 - 264.

BAGUÑÀ, J., R. ROMERO, E. SALÓ, J. COLLET, C. AULADELL, M. RIBAS, M. RIUTORT, J. GARCÍA-FERNÀNDEZ, F. BURGAYA & D. BUENO (1990): Growth, degrowth and regeneration as developmental phenomena in adult freshwater planarians. - In: H. MARTHY (Hrsg.): Experimental Embryology in Aquatic Plants and Animals. NATO ASI Series A, Vol. **195**. Plenum Press, New York, London, p. 129 - 162.

BAGUÑÀ, J., E. SALÓ, R. ROMERO, J. GARCÍA-FERNÀNDEZ, D. BUENO, A.M. MUÑOZ-MARMOL, J.R. BAYASCAS-RAMIREZ & A. CASALI (1994): Regeneration and pattern formation in planarians: cells, molecules and genes. - Zool. Sci. **11**: 781 - 795.

BALAVOINE, G. (1997): The early emergence of platyhelminthes is contradicted by the agreement between 18S rRNA and *Hox* genes data. - C.R. Acad. Sci. Paris **320**: 83 - 94.

BALL, I.R. (1974): A contribution to the phylogeny and biogeography of the freshwater triclads (Platyhelminthes: Turbellaria). - In: N.W. RISER & M.P. MORSE (Hrsg.): Biology of the Turbellaria. McGraw-Hill, New York etc., p. 339 - 401.

BAYASCAS, J.R., E. CASTILLO, A.M. MUÑOZ-MARMOL & E. SALÓ (1997): Planarian Hox genes: novel patterns of expression during regeneration. - Development **124**: 141 - 148.

BAYASCAS, J.R., E. CASTILLO, A.M. MUÑOZ-MARMOL, J. BAGUÑÀ & E. SALÓ (1998): Synchronous and early activation of planarian Hox genes and the re-specification of body axes during regeneration in *Dugesia (G.) tigrina* (Turbellaria; Tricladida). - Hydrobiologia **383**: 125 - 130.

BEHENSKY, C., W. SCHÜRMANN & R. PETER (2001): Quantitative analysis of turbellarian cell suspensions by fluorescent staining with acridine orange, and video microscopy. - Belg. J. Zool. **131** (Supplement 1): 131 - 136.

BENAZZI, M. (1957): Cariologia di *Dugesia lugubris* (O. Schmidt) (Tricladida Paludicola). - Caryologia **10**: 276 - 303.

BENAZZI, M. & G. BENAZZI LENTATI (1976): Platyhelminthes. - Vol.**1** in Animal Cytogenetics (Hrsg. B. JOHN). Gebr. Borntraeger, Berlin, Stuttgart, V + 182 pp.

BERGQUIST, P.R. (1978): Sponges. - University of California Press, Berkeley, Los Angeles, 268 pp.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

BEST, J.B., R. ROSENVOLD, J. SOUDERS & C. WADE (1965): Studies on the incorporation of isotopically labeled nucleotides and amino acids in planaria. - J. Exp. Zool. **159**: 397 - 403.

BEST, J.B., S. HAND & R. ROSENVOLD (1968): Mitosis in normal and regenerating planarians. - J. Exp. Zool. **168**: 157 - 168.

BETCHAKU, T. (1967): Isolation of planarian neoblasts and their behavior *in vitro* with some aspects of the mechanism of the formation of regeneration blastema. - J. Exp. Zool. **164**: 407 - 434.

BETCHAKU, T. (1970): The cellular mechanism of the formation of a regeneration blastema of freshwater planaria, *Dugesia dorotocephala*. - I. The behavior of cells in a tiny body fragment isolated in vitro. - J. Exp. Zool. **174**: 253 - 280.

BETCHAKU, T. (1975): Evidence favors that planarian neoblasts are true reserve cells. - J. Cell Biol. **67**: 31a.

BODE, H.R. (1996): The interstitial cell lineage of *Hydra*: a stem cell system that arose early in evolution. - J. Cell Sci. **190**: 1155 - 1164.

BOSCH, T.C.G. (1998): *Hydra*. - In: P. FERRETTI & J. GÉRAUDIE (Hrsg.): Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans. J. Wiley & Sons, Chichester, New York etc., p.111-134.

BRESLOW, R.E. & R.A. GOLDSBY (1969): Isolation and characterization of thymidine transport mutants of chinese hamster cells. - Exp. Cell Res. **55**: 339 - 346.

BRØNDSTED, H.V. (1969): Planarian Regeneration (International Series of Monographs in Pure and Applied Biology, Vol. **42**). - Pergamon Press, Oxford, London etc., VIII + 276 pp.

BUCHNER, E. & R. PETER: Influences of ionizing radiation on regeneration and neoblasts (stem cells) in the planarian *Dugesia tahitiensis* (Turbellaria: Tricladida Paludicola). Manuskript in Vorbereitung.

BUENO, D., J. BAGUÑÀ & R. ROMERO (1997): Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. - Histochem. Cell Biol. **107**: 139 - 149.

BUSS, L.W. (1987): The evolution of individuality. - Princeton University Press, Princeton, New Jersey, XV + 203 pp.

CALOW, P., M. BEVERIDGE & R. SIBLY (1979): Heads and tails: adaptational aspects of asexual reproduction in freshwater triclads. - Am. Zool. **19**: 715 - 727.

CANNON, L.R.G. (1986): Turbellaria of the World. A Guide to Families and Genera. - Queensland Museum, Brisbane, VIII + 136 pp.

CARRANZA, S., J. BAGUÑÀ & M. RIUTORT (1997): Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. - Mol. Biol. Evol. **14**: 485 - 497.

CEBRIÀ, F., M. VISPO, P. NEWMARK, D. BUENO & R. ROMERO (1997): Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. - Dev. Genes Evol. **207**: 306 - 316.

CHANDEBOIS, R. (1976): Histogenesis and morphogenesis in planarian regeneration. - Monographs in Developmental Biology (Hrsg. A. WOLSKY), Vol. **11**. S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sidney, VIII + 182 pp.

CHANDEBOIS, R. (1980): The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II. Distalization. - Devel. Growth Differ. **22**: 693 - 704.

CHILD, C.M. (1913): Studies on the dynamics of morphogenesis. VI. The nature of axial gradients in Planaria and their relation to antero-posterior dominance, polarity and symmetry. - Arch. Entwicklungsmech. Org. **37**: 108 - 158.

CHILD, C.M. (1941): Patterns and Problems of Development. – Chicago University Press, Chicago, IX + 811 pp.

CLARK, W.C. (1974): Interpretation of life history pattern in the Digenea. - Int. J. Parasitol. **4**: 115 - 123.

COLLET, J. & J. BAGUÑÀ (1993): Optimizing a method of protein-extraction for two-dimensional elec-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

trophoretic separation of proteins from planarians (*Platyhelminthes, Turbellaria*). - Electrophoresis **14**: 1054 - 1059.

CONNES, R. (1974): L´origine des cellules blastogénétiques chez *Suberites domuncula*: L´ équilibre choanocytes-archéocytes chez les spongiaires. - Ann. Sci. Nat. Zool. **16**: 111 - 118.

COWARD, S.J. (1968): The relation of surface and volume to so-called physiological gradients in planaria. - Dev. Biol. **18**: 590 - 601.

COWARD, S.J. & E.D. HAY (1972): Fine structure of cells involved in physiological and reconstitutive regeneration in planarians. - Anat. Rec. **172**: 296.

COWARD, S.J., F.M. HIRSH & J.H. TAYLOR (1970): Thymidine kinase activity during regeneration in the planarian *Dugesia dorotocephala*. - J. Exp. Zool. **173**: 269 - 277.

COWARD, S.J., C.E. BENNETT & B.L. HAZLEHURST (1974): Lysosomes and lysosomal enzyme activity in the regenerating planarian. - Evidence in support of dedifferentiation. - J. Exp. Zool. **189**: 133 - 145.

CUMMINGS, S.G. & H. R. BODE (1984): Head regeneration and polarity reversal in *Hydra attenuata* can occur in the absence of DNA synthesis. - Wilhelm Roux´ Arch. Dev. Biol. **194**: 79 - 86.

DINJENS, N.M., J. TEN KATE, M.-H.J.J. LENDERS, E.P.M. VAN DER LINDEN & F.T. BOSMAN (1992): Bromodeoxyuridine (BrdU) immunocytochemistry by exonuclease III (Exo III) digestion. - Histochemistry **98**: 199 - 205.

DROBYSHEVA, I.M. (1986): Physiological regeneration of the digestive parenchyma in *Convoluta convoluta* and *Oxyposthia praedator* (Turbellaria, Acoela). - Hydrobiologia **132** (Dev. Hydrobiol. **32**): 189 - 193.

DROBYSHEVA, I.M. (1988): An autoradiographic study of the replacement of epidermis in polyclad turbellarians. - Fortschr. Zool. **36**: 97 - 101.

DUBOIS, F. (1949): Contribution à l´ étude de la régénération chez planaires dulcicoles. - Bull. Biol. **83**: 213 - 283.

EDELMAN, J.R. & Y.J. LIN (1994): Differential staining of *Dugesia tigrina* sister chromatids. - Cytobios **78**: 123 - 128.

EGUCHI, G. (1998): Transdifferentiation as a basis of eye lens regeneration. - In: P. FERRETTI & J. GÉRAUDIE (Hrsg.): Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans. J. Wiley & Sons, Chichester, New York etc., p. 207 - 228.

EHLERS, U. (1985): Das Phylogenetische System der Plathelminthes. - Gustav Fischer, Stuttgart, 317 pp.

EHLERS, U. (1992): No mitosis of differentiated epidermal cell in the Plathelminthes: mitosis of intraepidermal stem cells in *Rhynchoscolex simplex* Leidy, 1851 (Catenulida). - Microfauna Marina **7**: 311 - 312.

EHLERS, U. (1995): The basic organization of the Plathelminthes. - Hydrobiologia **305**: 21 - 26.

EVANS, E.A. (1975): Purity and stability of radiochemical tracers in autoradiography. – In: D.M. PRESCOTT (Hrsg.): Methods in Cell Biology **10**, p. 291 - 324.

FERRETTI, P. & J. GÉRAUDIE, Hrsg. (1998): Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans. - J. Wiley & Sons, Chichester, New York etc., XX + 458 pp.

FRANQUINET, R. (1976): Etude comparative de l´ évolution des cellules de planaires d´eau douce *Polycelis tenuis* (Iijima) dans des fragments dissociés en culture *in vitro* – aspects ultrastructuraux, incorporations de leucine et d´uridine tritiée. - J. Embryol. Exp. Morphol. **36**: 41 - 54.

FRANQUINET, R. (1981): Synthèse d´ADN dans les cellules de Planaires cultivées *in vitro*. Rôle de la sérotonine. - Biol. Cell. **40**: 41 - 46.

FREISLING, M. & E. REISINGER (1958): Zur Genese und Physiologie von Restitutionskörpern aus Planarien-Gewebsbrei. - W. Roux´ Arch. Entwicklungsmech. Org. **150**: 581 - 606.

FRIEDEL, T. & R.A. WEBB (1979): Stimulation of mitosis in *Dugesia tigrina* by neurosecretory fraction. - Can. J. Zool. **57**: 1818 - 1819.

FUCHS, E. & J.A. SEGRE (2000): Stem cells: a new lease on life. - Cell **100**: 143 - 155.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

FUKUSHIMA, T. & R. MATSUDA (1991): Experiments with culture media for planarian cells. – Hydrobiologia **227**: 187 - 192.

GABRIEL, A. (1970): Etude morphologique et évolution biochimique des néoblastes au cours des premières phases de la régénération des planaires d´eau douce. - Annls. Embryol. et Morphogenèse **3**: 49 – 69.

GAGE, F.H. (2000): Mammalian neural stem cells. - Science **287**: 1433 - 1438.

GARCÍA-FERNÀNDEZ, J., J. BAGUÑÀ & E. SALÓ (1991): Planarian homeobox genes: cloning, sequence analysis and expression. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 7338 - 7342.

GARCÍA-FERNÀNDEZ, J., G. MARFANY, J. BAGUÑÀ & E. SALÓ (1993): Infiltration of mariner elements. - Nature **364**: 109 - 110.

GARCÍA-FERNÀNDEZ, J., J.R. BAYASCAS-RAMÍREZ, G. MARFANY, A.M. MUÑOZ-MARMOL, A. CASALI, J. BAGUÑÀ & E. SALÓ (1995): High copy number of highly similar mariner-like transposons in planarians (Platyhelminthes): evidence for a trans-phyla horizontal transfer. - Mol. Biol. Evol. **12**: 421 - 431.

GARDINER, D.M. & S.V. BRYANT (1998): The tetrapod limb. - In: P. FERRETTI & J. GÉRAUDIE (Hrsg.): Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans. J. Wiley & Sons Chichester, New York etc., p. 187 - 205.

GENESER, F. (1986): Textbook of Histology. - Munksgaard, Copenhagen, 831 pp.

GHIRARDELLI, E., R. MARZARI, M. BITTOLO & E.A. FERRERO (1989): Protein synthesis in isolated frag-ments of planarian blastemas. - Acta Embryol. Morphol. Exper. **10**: 129 - 132.

GHIRARDELLI, E., R. MARZARI & E.A. FERRERO (1991): Differences in blastema-associated proteins according to position along body axis in regenerating planarians. - Hydrobiologia **227**: 41 - 45.

GIERER, A., S. BERKING, H. BODE, C.N. DAVID, K. FLICK, G. HANSMANN, H. SCHALLER & E. TRENKNER (1972): Regeneration of Hydra from reaggregated cells. - Nature New Biol. **239**: 98 - 100.

GILBERT, S.F. (2000): Developmental Biology, 6th Ed. - Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, XVIII + 749 pp.

GOSS, R.J. (1969): Principles of regeneration. - Academic Press Inc., New York, IX + 287 pp.

GOSS, R.J. (1974): Regeneration. Probleme – Experimente – Ergebnisse. - Thieme, Stuttgart, VI + 288 pp.

GOURBAULT, N. (1977): Etude déscriptive et cytotaxonomique d´une planaire polynésienne *Dugesia tahitiensis* n. sp. [Turbellarié, Triclade]. - Annls. Limnol. **13**: 211 - 220.

GRASSO, M. & M. BENAZZI (1973): Genetic and physiologic control of fissioning and sexuality in planarians. - J. Embryol. Exp. Morphol. **30**: 317 - 328.

GRATZNER, H.G. (1982): Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. - Science **218**: 474 - 475.

GREMIGNI, V. (1981): The problem of cell totipotency, dedifferentiation and transdifferentiation in Turbellaria. - Hydrobiologia **84**: 171 - 179.

GREMIGNI, V. (1988): Planarian regeneration: an overview of some cellular mechanisms. - Zool. Sci. **5**: 1153 - 1163.

GREMIGNI, V. & I. PUCCINELLI (1977): A contribution to the problem of the origin of the blastema cells in planarians: a karyological and ultrastructural investigation. - J. Exp. Zool. **199**: 57 - 72.

GSCHWENTNER, R., P. LADURNER, K. NIMETH & R. RIEGER (2001): Stem cells in a basal bilaterian: S-phase and mitotic cells in *Convolutriloba longifissura* (Acoela, Platyhelminthes). - Cell Tissue Res. **304**: 401 - 408.

HAY, E.D. (1968): Dedifferentiation and metaplasia in vertebrate and invertebrate regeneration. In: H. URSPRUNG (Hrsg.): The Stability of the Differentiated State. Springer, Berlin, p. 85 - 108.

HAY, E.D. & S.J. COWARD (1975): Fine structure studies on the planarian, *Dugesia*. I. Nature of the "neoblast" and other cell types in noninjured worms. - J. Ultrastruct. Res. **50**: 1 - 21.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

HEATH, J.K., A.G. SMITH, L.W. HSU & P.D. RATHJEW (1990): Growth and differentiation factors of pluripotential stem cells. - J. Cell Sci. Suppl. **13**: 75 - 85.

HENDELBERG, J. & B. ÅKESSON (1988): *Convolutriloba retrogemma* gen. et sp. n., a turbellarian (Acoela, Platyhelminthes) with reversed polarity of reproductive buds. - Fortschr. Zool. **36**: 321 - 327.

HORI, I. (1992): Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. I. Cell behavior during blastema formation. - J. Submicrosc. Cytol. Pathol. **24**: 75 - 84.

HORI, I. (1997): Cytological approach to morphogenesis in the planarian blastema. II. The effect of neuropeptides. - J. Submicrosc. Cytol. Pathol. **29**: 91 - 97.

HORI, I. & Y. KISHIDA (1998): A fine structural study of regeneration after fission in the planarian *Dugesia japonica*. - Hydrobiologia **383**: 131 - 136.

HYMAN, L.H. (1951): The Invertebrates. II. Platyhelminthes and Rhynchocoela. The Acoelomate Bilateria. - McGraw-Hill, New York, VII + 550 pp.

KELLER, J. (1894): Die ungeschlechtliche Fortpflanzung der Süßwasser-Turbellarien. - Jen. Zeitschr. f. Naturwiss. **28**: 370 - 407.

KOHL, D.M. & R.A. FLICKINGER (1966): The role of DNA synthesis in the determination of axial polarity of regenerating planarians. - Biol. Bull. **131**: 323 - 330.

KORSCHELT, E. (1927): Regeneration und Transplantation, Bd. I: Regeneration. - Gebr. Borntraeger, Berlin, XII + 818 pp.

KRATOCHWIL, K.W. (1962): Die Einwirkung von Röntgenstrahlen auf die Differenzierung in der Regeneration von *Euplanaria gonocephala*. - Z. wiss. Zool. **167**: 215 - 237.

LADURNER, P., D. REITER, D. RIEDL & R.M. RIEGER (1998): Stem cells in turbellarian development, growth and regeneration. - Dev. Biol. **198**: 209.

LADURNER, P., R. RIEGER & J. BAGUÑÀ (2000): Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum* sp.: a bromodeoxyuridine analysis. - Dev. Biol. **226**: 231 - 241.

LANGE, C.S. (1983): Stem cells in planarians. - In: C.S. POTTEN (Hrsg.): Stem Cells: Their Identification and Characterisation. Churchill, Livingstone, Edinburgh, p. 28 - 66.

LANGE, C. S. & V. STEELE (1978): The mechanism of anterior-posterior polarity control in planarians. - Differentiation **11**: 1 - 12.

LE MOIGNE, A. (1963): Etude du développement embryonnaire de *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). - Bull. Soc. Zool. Fr. **88**: 403 - 422.

LENDER, T. (1955a): Sur quelques propriétés de l´organisine de la régénération des yeux chez la planaire *Polycelis nigra*. - C. R. Acad. Sci. Paris **240**: 1725 - 1728.

LENDER, T. (1955b): Sur l´inhibition de la régénération du cerveau de la planaire *Polycelis nigra*. - C. R. Acad. Sci. Paris **241**: 1863 - 1865.

LENDER, T. (1965): La régénération des planaires. - In: V. KIORTSIS & H.A.L. TRAMPUSCH (Hrsg.): Regeneration in Animals and Related Problems. North Holland Publ. Comp., Amsterdam, p. 95 - 111.

LENDER, T. (1974): The role of neurosecretion in freshwater planarians. - In: N. W. RISER & M.P. MORSE (Hrsg.): Biology of the Turbellaria. McGraw-Hill, New York, p. 460 - 475.

LENDER, T. & A. GABRIEL (1965): Les néoblastes marqués par l´ uridine tritiée migrent et édifient le blastème de régénération des Planaires d´ eau douce. - C. R. Acad. Sci. Paris **260**: 4095 - 4097.

LEWIN, B. (1998): Molekularbiologie der Gene. - Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, XVI + 1020 pp.

MARTELLY, I. (1980): Variations des synthèses d´ADN et des activités déoxyribonucléases acide et alkaline au cours de la régénération des Planaires *Polycelis tenuis*. - C.R. Sci. Acad. Paris, D, **290**: 1571 - 1574.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

MARTELLY, I. & R. FRANQUINET (1984): Planarian regeneration as a model for cellular activation studies. - Trends Biochem. Sci. **8**: 468 - 471.

MARTELLY, I., C. REY & A. LE MOIGNE (1981): Planarian regeneration: DNA metabolism in adults. - Int. J. Invertebr. Reprod. **4**: 107 - 121.

MC KAY, R. (2000): Stem cells – hype and hope. - Nature **406**: 361 - 364.

MEAD, R.W. (1985): Proportioning and regeneration in fissioned and unfissioned individuals of the planarian *Dugesia tigrina*. - J. Exp. Zool. **235**: 45 - 54.

MEAD, R.W. & J. CHRISTMAN (1998): Proportion regulation in the planarian, *Dugesia tigrina*, following regeneration of structures. - Hydrobiologia **383**: 105 - 109.

MONTGOMERY, J.R. & S. J. COWARD (1974): On the minimal size of a planarian capable of regeneration. - Trans. Am. Microsc. Soc. **93**: 386 - 391.

MORACZEWSKI, J. (1977): Asexual reproduction and regeneration of *Catenula* (Turbellaria, Archoophora). - Zoomorphology **88**: 65 - 80.

MORGAN, T.H. (1898): Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. - Arch. Entwicklungsmech. Org. **7**: 364 - 397.

MORGAN, T.H. (1900): Regeneration in planarians. - Arch. Entwicklungsmech. Org. **10**: 58 - 119.

MORITA, M. & J.B. BEST (1984a): Electron microscopic studies of planarian regeneration. III. Degeneration and differentiation of muscles. - J. Exp. Zool. **229**: 413 - 424.

MORITA, M. & J.B. BEST (1984b): Electron microscopic studies of planarian regeneration. IV. Cell division of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. - J. Exp. Zool. **229**: 425 - 436.

MORITA, M. & J.B. BEST (1984c): Effects of photoperiods and melatonin on planarian asexual reproduction. - J. Exp. Zool. **231**: 273 - 282.

MORITA, M. & J.B. BEST (1993): The occurrence and physiological functions of melatonin in the most primitve eumetazoans, the planarians. - Experientia **49**: 623 - 626.

MORITA, M., J.B. BEST & J. NOEL (1969): Electron microscopic studies of planarian regeneration. I. Fine structure of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. - J. Ultrastruct. Res. **27**: 7 - 23.

MORRISON, S.J., N.M. SHAH & D.J. ANDERSON (1997): Regulatory mechanisms in stem cell biology. - Cell **88**: 287 - 298.

MURRAY, M.R. (1927): The cultivation of planarian tissues in vitro. - J. Exp. Zool. **47**: 467 - 505.

MURTHA, M.T., J.F. LECKMAN & F.H. RUDDLE (1991): Detection of homeobox genes in development and evolution. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 10711 - 10715.

NASCETTI, G., L. BULLINI & M. BENAZZI (1990): Genetic divergence in Northamerican freshwater planarians of the *Dugesia dorotocephala* group (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). - Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. **28**: 261 - 268.

NEWMARK, P.A. & A. SÁNCHEZ ALVARADO (2000): Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. - Dev. Biol. **220**: 142 - 153.

ORII, H., K. AGATA & K. WATANABE (1993): POU-domain genes in planarian *Dugesia japonica*: the structure and expression. - Biochem. Biophys. Res. Comm. **192**: 1395 - 1402.

ORII, H., T. MIYAMOTO, K. AGATA & K. WATANABE (1995): cDNA cloning and partial sequencing of homeobox genes in *Dugesia japonica*. - Hydrobiologia **305**: 277 - 279.

PALLAS, P.S. (1774): Spicilegia zoologica quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur, Fasc. **X**. Berolini, 42 pp. + 4 Tafeln.

PALMBERG, I. (1986): Cell migration and differentiation during wound healing and regeneration in *Microstomum lineare* (Turbellaria). - Hydrobiologia **132**: 181 - 188.

PALMBERG, I. (1990): Stem cells in microturbellarians. An autoradiographic and immunocytochemical study. - Protoplasma **158**: 109 - 120.

PALMBERG, I. & M. REUTER (1983): Asexual reproduction in *Microstomum lineare* (Turbellaria). I. An autoradiographic and ultrastructural study. - Int. J. Invertebr. Reprod. **6**: 197 - 206.

PEDERSEN, K.J. (1959a): Some features of the fine structure and histochemistry of planarian subepi-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

dermal gland cells. - Z. Zellforsch. **50**: 121 - 142.

PEDERSEN, K.J. (1959b): Cytological studies on planarian neoblasts. - Z. Zellforsch. **50**: 799 - 817.

PEDERSEN, K.J. (1972): Studies on regeneration blastemas of the planarian *Dugesia tigrina* with special reference to differentiation of the muscle-connective tissue filament system. - W. Roux´ Arch. Entwicklungsmech. Org. **169**: 134 - 169.

PERA, M.F. (2000): Human embryonic stem cells. - J. Cell Sci. **113**: 5 - 10.

PERTOFT, H., K. RUBIN, L. KJELLÉN, T.C. LAURENT & B. KLINGEBORN (1977): The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll (TM). - Exp. Cell Res. **110**: 449 - 457.

PETER, R. (1994): Fissiparity in the planarian *Dugesia tahitiensis*: a highly efficient mode of reproduction only moderately influenced by population density. - Verh. Dtsch. Zool. Ges. **87.1**: 312.

PETER, R. (1995a): Regenerative and reproductive capacities of the fissiparous planarian *Dugesia tahitiensis*. - Hydrobiologia **305**: 261.

PETER, R. (1995b): Restitution bodies from planarian cell suspensions: formation and survival in an isotonic culture medium. - Hydrobiologia **305**: 265.

PETER, R. & W. SCHÜRMANN (1995): Ein neuer Kopf in zwei Tagen. Spitzenleistungen der Regeneration und ihre zellbiologischen Grundlagen bei Planarien. - Jahrbuch der Universität Salzburg 1991-1993, p. 325 - 334.

PETER, R. & W. SCHÜRMANN (1997): Extreme regenerative and reproductive capacities originating from a common cellular basis: fission in the planarian *Dugesia tahitiensis*. - Verh. Dtsch. Zool. Ges. **90.1**: 134.

PETER, R. & W. SCHÜRMANN (1999): Restitution bodies from defined planarian cell fractions. - Zoology **102**, Suppl. II: 23.

PETER, R., D.I. WOLFRUM & V. NEUHOFF (1976): Micro-electrophoresis in continuous polyacrylamide gradient gels for the analytical separation of protein extracts from planarians (Platyhelminthes: *Turbellaria tricladida*). - Comp. Biochem. Physiol. **55B**: 583 - 589.

PETER, R., P. LADURNER & R. RIEGER (2001): The role of stem cell strategies in coping with environmental stress and choosing between alternative reproductive modes: Turbellaria rely on a single cell type to maintain individual life and propagate species. – Marine Ecology **22**: 35 - 51.

PLAGEMANN, P.G.W. & J. ERBE (1972): Thymidine transport by cultured Novikoff hepatoma cells and uptake by simple diffusion and relationship to incorporation into deoxyribonucleic acid. - J. Cell Biol. **55**: 161 - 178.

POTTEN, C.S., Hrsg. (1997): Stem Cells. - Academic Press, London etc., XIII + 474 pp.

PRUSCH, R.T. (1976): Osmotic and ionic relationships in the freshwater flatworm, *Dugesia dorotocephala*. - Comp. Biochem. Physiol. **54A**: 287 - 290.

RANDOLPH, H. (1897): Observations and experiments on regeneration in planarians. - Arch. Entwicklungsmech. Org. **5**: 352 - 372.

REUTER, M., K. MÄNTYLÄ & M.K.S. GUSTAFSSON (1998): Organization of the orthogon – main and minor nerve cords. - Hydrobiologia **383**: 175 - 182.

RIEGER, R.M. (1981): Morphology of the Turbellaria at the ultrastructural level. - Hydrobiologia **84**: 213 - 229.

RIEGER, R.M. (1985): The phylogenetic status of the acoelomate organization within the Bilateria: a histological perspective. - In: S. CONWAY-MORRIS, J.D. GEORGE, R. GIBSON & H.M. PLATT (Hrsg.): The Origins and Relationships of Lower Invertebrates. Clarendon Press, Oxford, p. 101 - 122.

RIEGER, R.M. (1986): Asexual reproduction and the turbellarian archetype. - Hydrobiologia **132**: 35 - 45.

RIEGER, R.M. & S. WEYRER (1998): The evolution of the lower Metazoa: evidence from the phenotype. - In: W.E.G. MÜLLER (Hrsg.): Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. **21**.

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

Springer, Berlin, Heidelberg, p. 21 – 43.

RIEGER, R.M., M. GEHLEN, G. HASZPRUNAR, M. HOLMLUND, A. LEGNITI, W. SALVENMOSER & S. TYLER (1988): Laboratory cultures of marine Macrostomida (Turbellaria). - Fortschr. Zool. **36**: 523.

RIEGER, R.M., S. TYLER, J.P.S. SMITH III & G.E. RIEGER (1991): Platyhelminthes: Turbellaria. - In: F.W. HARRISON & B.J. BOGITSCH (Hrsg.): Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. **3**: Platyhelminthes and Nemertinea. Wiley-Liss, New York, p. 7-140.

RIEGER, R.M., A. LEGNITI, P. LADURNER, D. REITER, E. ASCH, W. SALVENMOSER, W. SCHÜRMANN & R. PETER (1999): Ultrastructure of neoblasts in microturbellaria: significance for understanding stem cells in free-living Platyhelminthes. - Invertebr. Reprod. Dev. **35**: 127 - 140.

ROBERT, B., G. LYONS, B.K. SIMANDL, A. KUROIWA & M. BUCKINGHAM (1991): The apical ectodermal ridge regulates *Hox-7* and *Hox-8* gene expression in developing chick limb buds. - Genes and Dev. **5**: 2363 - 2374.

ROMEIS, B.(1989): Mikroskopische Technik, 17. Auflage, P. BÖCK (Hrsg.). - Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 697 pp.

ROMERO, R. & J. BAGUÑÀ (1991): Quantitative cellular analysis of growth and reproduction in freshwater planarians (Turbellaria, Tricladida). I. A cellular description of the intact organism. - Invertebr. Reprod. Dev. **19**: 157 - 165.

ROMERO, R., J. BAGUÑÀ & P. CALOW (1991a): Intraspecific variation in somatic cell turnover and regenerative rate in the freshwater planarian *Dendrocoelum lacteum*. - Invertebr. Reprod. Dev. **20**: 107 - 113.

ROMERO, R., J. FIBLA, D. BUENO, L. SUMOY, M.A. SORIANO & J. BAGUÑÀ (1991b): Monoclonal antibodies as markers of specific cell types and regional antigens in the freshwater planarian *Dugesia* (*G.*) *tigrina*. - Hydrobiologia **227**: 73 - 79.

ROS, M.A., A. LÓPEZ-MARTÍNEZ, B.K. SIMANDL, C. RODRIGUEZ, J.C. IZPISÚA BELMONTE, R. DAHN & J.F. FALLON (1996): The limb field mesoderm determines initial limb bud anteroposterior asymmetry and budding independent of *sonic hedgehog* or apical ectodermal gene expressions. - Development **122**: 2319 - 2330.

ROSE, C. & S. SHOSTAK (1968): The transformation of gastrodermal cells to neoblasts in regenerating *Phagocata gracilis*. - Exp. Cell Res. **50**: 553 - 561.

RUIZ-TRILLO, I., M. RIUTORT, D.T.J. LITTLEWOOD, E.A. HERNIOU & J. BAGUÑÀ (1999): Acoel flatworms: earliest extant bilaterian metazoans, not members of Platyhelminthes. - Science **283**: 1919 – 1923.

SACHS, T. (1991): Pattern Formation in Plant Tissues. - Development and Cell Biology Series. P.W. BARLOW, D. BRAY, P.B. GREEN & J.M.W. SLACK (Hrsg.). Cambridge University Press, Cambridge etc., XII + 234 pp.

SALÓ, E. & J. BAGUÑÀ (1984): Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia* (*G*) *tigrina*, and a new proposal for blastema formation. - J. Embryol. Exp. Morphol. **83**: 63 - 80.

SALÓ, E. & J. BAGUÑÀ (1985): Cell movement in intact and regenerating planarians. Quantitation using chromosomal, nuclear and cytoplasmic markers. - J. Embryol. Exp. Morphol. **89**: 57 - 70.

SÁNCHEZ ALVARADO, A.S. & P.A. NEWMARK (1999): Double-stranded RNA disrupts gene expression during planarian regeneration. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 5049 - 5054.

SAUZIN-MONNOT, M.J. (1973): Etude ultrastructurale des néoblastes de *Dendrocoelum lacteum* au cours de la régénération. - J. Ultrastruct. Res. **45**: 206 - 222.

SCHÜRMANN, W. (1993): Isolierung von Neoblasten aus Planarien. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Salzburg, VII + 169 pp.

SCHÜRMANN, W. & R. PETER (1988): Isolation and cultivation of planarian neoblasts by a novel com-

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

bination of methods. - Fortschr. Zool. **36**: 111 - 114.

SCHÜRMANN, W. & R. PETER (1989): Isolation and primary culture of planarian cells. - Cytotechnology, Suppl., August 1989: 13.

SCHÜRMANN, W. & R. PETER (1993): Primärkulturen von Neoblasten (Stammzellen) aus *Dugesia polychroa* (Turbellarien: Tricladida paludicola). - Verh. Dtsch. Zool. Ges. **86.1**: 208.

SCHÜRMANN, W. & R. PETER (1995): Separation of planarian neoblasts based on density gradient centrifugation. - Hydrobiologia **305**: 267.

SCHÜRMANN, W. & R. PETER (1998): Inhibition of regeneration in the planarian *Dugesia polychroa* (Schmidt) by treatment with magnesium chloride: a morphological study of wound closure. - Hydrobiologia **383**: 111 - 116.

SCHÜRMANN, W. & R. PETER (2001): Planarian cell culture: a comparative review of methods and an improved protocol for primary cultures of neoblasts. - Belg. J. Zool. **131** (Supplement 1): 123 - 130.

SCHÜRMANN, W., S. BETZ & R. PETER (1998): Separation and subtyping of planarian neoblasts by density-gradient centrifugation and staining. - Hydrobiologia **383**: 117 - 124.

SEILERN-ASPANG, F. (1958): Zum Problem von Organisationsvorgängen bei dreidimensionalem Wachstum in Gewebekulturen. - Zool. Anz. **160**: 1 - 7.

SENGEL, C. (1960): Culture in vitro de blastèmes de régénération de Planaires. - J. Embryol. Exp. Morphol. **8**: 468 - 476.

SHIBATA, N., Y. UMESONO, H. ORII, T. SAKURAI, K. WATANABE & K. AGATA (1999): Expression of *vasa* (*vas*)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. - Dev Biol. **206**: 73 - 87.

SHINOZAWA, T., S. SHIOZAKI, M. EZAKI, H. FUJINO, T. TANAKA & T. SAHEKI (1995): Regulation factor for planarian regeneration. - Hydrobiologia **305**: 247 - 253.

SHIRAKAWA, T., A. SAKURAI, T. INOUE, K. SASAKI, Y. NISHIMURA, S. ISHIDA & W. TESHIROGI (1991): Production of cell- and tissue-specific monoclonal antibodies in the freshwater planarian *Phagocata vivida*. - Hydrobiologia **227**: 81 - 89.

SIVICKIS, P.B. (1931): A quantitative study of regeneration along the main axis of the triclad body. - Arch. Zool. Ital. **16**: 430 - 449.

SLORACH, E.M., F.C. CAMPBELL & J.R. DORIN (1999): A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. - J. Cell Sci. **112**: 3029 - 3038.

SNODGRASS, H.R., R.M. SCHMITT & E. BRUYNS (1992): Embryonic stem cells and in vitro hematopoiesis. - J. Cell. Biochem. **49**: 225 - 230.

SPERRY, P.J. & K.D. ANSEVIN (1975): Determination in regenerating tissues of *Dugesia dorotocephala*: the influence of nerve cord grafts. - J. Embryol. Exp. Morphol. **33**: 85 - 93.

SPERRY, P.J., K.D. ANSEVIN & F.K. TITTEL (1973): Inductive role of the nerve cord in regeneration of isolated postpharyngeal body sections of *Dugesia dorotocephala*. - J. Exp. Zool. **186**: 159 - 174.

SPIEGELMAN, M. & P.L. DUDLEY (1973): Morphological stages of regeneration in the planarian *Dugesia tigrina*: A light and electron microscopic study. - J. Morph. **139**: 155 - 184.

STEELE, V.E. & C.S. LANGE (1976): Effects of irradiation on stem cell response to differentiation inhibitors in the planarian *Dugesia etrusca*. - Radiat. Res. **67**: 21 - 29.

STEELE, V.E. & C.S. LANGE (1977): Characterization of an organ-specific differentiator substance in the planarian *Dugesia etrusca*. - J. Embryol. Exp. Morphol. **37**: 159 - 172.

STEINBÖCK, O. (1963): Regenerations- und Konplantationsversuche an *Amphiscolops* spec. (Turbellaria Acoela). - W. Roux´ Arch. Entwicklungsmech. Org. **154**: 308 - 353.

STEINMANN, P. (1925): Das Verhalten der Zellen und Gewebe im regenerierenden Tricladenkörper. - Verh. Naturforsch. Ges. Basel **36**: 133 - 162.

STEINMANN, P. (1927): Prospektive Analyse von Restitutionsvorgängen. II. Über Reindividualisation,

© Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck; download unter www.biologiezentrum.at

d.i. Rückkehr von Mehrfachbildungen zur einheitlichen Organisation. - W. Roux´ Arch. Entwicklungsmech. Org. **112**: 333 - 349.

STÉPHAN-DUBOIS, F. (1965): Les néoblastes dans la régénération chez les planaires. - In: V. KIORTSIS & H.A.L. TRAMPUSCH (Hrsg.): Regeneration in Animals and Related Problems. North Holland Publ. Comp., Amsterdam, p. 112 - 130.

STOPPENBRINK, F. (1905): Der Einfluß herabgesetzter Ernährung auf den histologischen Bau der Süßwassertricladen. - Z. wiss. Zool. **79**: 496 - 547.

STRETEN, N.A. & J.W. ZILLMAN (1984): Climate of the South Pacific Ocean. - In: H. VAN LOON (Hrsg.): Climates of the Ocean, Vol. **15** in World Survey of Climatology (Hrsg. H.E. LANDSBERG et al.). Elsevier, Amsterdam etc., p. 414.

TAKEZAWA, T., Y. MORI, T. YONAHA & K. YOSHIZATO (1993): Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts. - Exp. Cell Res. **208**: 430 - 441.

TESHIROGI, W. (1986): On the origin of neoblasts in freshwater planarians (Turbellaria). - Hydrobiologia **132**: 207 - 216.

TESHIROGI, W. & K. TOHYA (1988): Primary tissue culture of freshwater planarians in a newly devised medium. - Fortschr. Zool. **36**: 91 - 96.

TESHIROGI, W., S. ISHIDA & H. YAMAZAKI (1977): Regenerative capacities of transverse pieces in the two species of freshwater planarian, *Dendrocoelopsis lactea* and *Polycelis sapporo*. - Sci. Rep. Hirosaki Univ. **24**: 55 - 72.

THOUVÉNY, Y. & R.A. TASSAVA (1998): Regeneration through phylogenesis. - In: P. FERRETTI & J. GÉRAUDIE (Hrsg.): Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans. J. Wiley & Sons, Chichester, New York etc., p. 9 - 43.

TOMEI, L.D. & F.O. COPE, Hrsg. (1991): Apoptosis. The Molecular Basis of Cell Death. - Current Communications in Cell and Molecular Biology, Vol. **3**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, IX + 321 pp.

TRAGANOS, F., Z. DARZYNKIEWICZ, T. SHARPLESS & M.R. MELAMED (1977): Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. - J. Histochem. Cytochem. **25**: 46 - 56.

VAN CLEAVE, C.D. (1934): The effects of X-radiation on the restitution of *Stenostomum tenuicauda* and some other worms. - Biol. Bull. **47**: 304 - 314.

VAN DER KOOY, D. & S. WEISS (2000): Why stem cells? - Science **287**: 1439 - 1441.

VON WAGNER, F. (1890): Zur Kenntnis der ungeschlechtlichen Fortpflanzung von *Microstoma* nebst allgemeinen Bemerkungen über Teilung und Knospung im Tierreich. - Zool. Jahrb. **4**: 349 - 423.

WEISSMAN, I.L. (2000): Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. – Cell **100**: 157 - 168.

WHITFIELD, P.J. & N.A. EVANS (1983): Parthenogenesis and asexual multiplication among parasitic platyhelminths. - Parasitology **86**: 121 - 160.

WIKGREN, B.-J. & C.M. KNUTS (1970): Growth of subtegumental tissue in cestodes by cell migration. - Acta Acad. Aboensis Ser. B **30**: 1 - 6.

WILSON, H.V. (1907): Some phenomena of coalescence and regeneration in sponges.- J. Exp. Zool. **5**: 245 - 258.

WOLFF, D.A. (1975): The separation of cells and subcellular particles by colloidal silica density gradient centrifugation. - In: D.M. PRESCOTT (Hrsg.): Methods in Cell Biology **10**, p. 85 - 104.

WOLFF, E., T. LENDER & C. ZILLER-SENGEL (1964): Le rôle de facteurs autoinhibiteurs dans la régénération des Planaires. - Rev. Suisse Zool. **71**: 75 - 98.

WOLPERT, L. (1978): Pattern formation in biological development. - Sci. Am. **239**: 154 - 164.

WOLPERT, L., M.R. CLARKE & A. HORNBRUCH (1972): Positional signalling along Hydra. - Nature New Biol. **239**: 101 - 105.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck

Jahr/Year: 2001

Band/Volume: 88

Autor(en)/Author(s): Peter Raimund

Artikel/Article: Experimentelle Systeme zum Studium von Regenerationsvorgängen: Turbellarien als Modellorganismen mit einem Stammzellensystem 287-350