
Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **1**

Abkürzungen **4**

1 Einleitung **6**

- 1.1 Theoretische Aspekte und praktische Bedeutung der Stammzelle
- 1.2 Spezielle Embryologie und Histologie der Schilddrüse
- 1.3 Biomarker zur Detektion adulter Stammzellen in Schilddrüsengewebe
- 1.4 Propagierung adulter Stammzellen in einer Primärzellkultur
 - 1.4.1 Theorie der Asymmetrischen Stammzellkinetik und ihre Beeinflussung in vitro
 - 1.4.2 Beeinflussung der Stammzellproliferation durch Steroide
- 1.5 Die Side Population und die Bedeutung des ABCG2 Transporter Gens
- 1.6 Ziel der Arbeit

2 Methoden und Materialien **21**

- 2.1 Zellkultur
 - 2.1.1 Anlage einer primären Schilddrüsenzellkultur
 - 2.1.2 Kultivierung und Passagierung von Schilddrüsenprimärzellen
 - 2.1.3 Kultivierung von Kontrollzelllinien
 - 2.1.4 Veränderung der Kulturbedingungen nach der SACK Methode
 - 2.1.5 Östrogenstimulation von Schilddrüsenprimärzellkulturen
 - 2.1.6 Kultivierung von Zellen auf Objektträgern
- 2.2 mRNA Isolierung von Schilddrüsenprimärzellen und FACS Zellen
- 2.3 Konzentrationsbestimmung von mRNA
- 2.4 Reverse Transkription
- 2.5 Polymerase- Kettenreaktion
 - 2.5.1 Amplifikation von cDNA durch die Polymerase- Kettenreaktion
 - 2.5.2 Kombinierte Reverse Transkription und Polymerase- Kettenreaktion der mRNA von FACS Zellen
- 2.6 Agarosegel Elektrophorese
- 2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegel
- 2.8 Restriktion von DNA
- 2.9 Immunzytochemie
- 2.10 Durchflußzytometrie und Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)

-
- 2.10.1 Methoden zur Erhöhung der Zellmembranpermeabilität
 - 2.10.2 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung
 - 2.10.3 Präparierung der Zellen vor FACS
 - 2.10.4 Methoden zur Qualitätskontrolle der Durchflußzytometrie und FACS
 - 2.10.5 Auswertung und Interpretation der Durchflußzytometrie und FACS
 - 2.11 Isolation der Side Population
 - 2.12 Materialien
 - 2.12.1 Allgemeine Lösungen
 - 2.12.2 Zellkulturbedarf
 - 2.12.3 Enzyme und Chemikalien zur mRNA Gewinnung, Reverse Transkription und Polymerase- Kettenreaktion
 - 2.12.4 Materialien für die Immunzytochemie
 - 2.12.5 Materialien für die Durchflußzytometrie und FACS
 - 2.12.6 Plastikmaterialien
 - 2.12.7 Geräte
 - 2.12.8 Software

3 Ergebnisse

41

- 3.1 Detektion der Stammzellmarker Oct4, p63 und entodermaler Transkriptionsfaktoren GATA-4 und HNF4 α in der Durchflußzytometrie
 - 3.1.1 Prinzip der durchflußzytometrischen Analyse von Gewebezellen
 - 3.1.2 Entodermale und stammzelltypische Marker in einer Schilddrüsenzellkultur
- 3.2 Polymerase-Kettenreaktion nach FACS zur weiteren Analyse des Expressionsprofils adulter Stammzellen
- 3.3 Expression von Connexin 43 in Schilddrüsenzellen, Kontrollzelllinien und adulten Stammzellen
- 3.4 Expressionsprofile adulter Stammzellen nach Veränderung der Kulturbedingungen
 - 3.4.1 Der Einfluß von Xanthosin auf die Stammzellproliferation
 - 3.4.2 Der Einfluß von 17 β -Östradiol auf die Stammzellproliferation
- 3.4 Die Isolation der Side Population und die ABCG2 Expression
- 3.6 Morphologie der FACS Zellen

4 Diskussion	57
4.1 Detektion adulter Stammzellen und Vorläuferzellen in Schilddrüsengewebe	
4.2 Connexin 43 und die Bedeutung der Zell-Zellkommunikation in Schilddrüsenzellen und adulten Stammzellen	
4.3 Propagierung adulter Stammzellen in einer Schilddrüsenzellkultur	
4.3.1 Die SACK Methode als alternativer Ansatz zur Gewinnung einer Stammzellkultur	
4.3.2 Die Bedeutung von 17 β -Östradiol für das Differenzierungs- und Proliferationspotential adulter Stammzellen	
4.4 Schilddrüsentumore und Tumorstammzellen	
4.5 Adulte Stammzellen als Zellkultur	
5 Zusammenfassung	66
6 Literaturnachweis	68
7 Anhang	84

Abkürzungen

ABCG2	ATP-binding cassette superfamily G member 2
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridine
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FRTL5	Fischer rat thyroid line
FSC	Forward scatter
°C	Grad Celsius
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor
IMPDH	Inosine-5- monophosphate dehydrogenase
l	Liter
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
M	molar
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
mRNA	messenger- RNA
nm	Nanometer
non sp	Non Side Population
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrine
pH	pondus hydrogenii
PI	Propidium Jodid

RNA	Ribonucleic acid
rpm	Runden pro Minute
s	Sekunden
SACK	Suppression of Asymmetric cell kinetic
sp	Side Population
SSC	Side scatter
Tg	Thyreoglobulin
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon

7 Anhang

Densitometrische Analyse der RT- PCR Signalbanden

Die RT- PCR stellt eine wichtige Methode zur spezifischen und sehr sensitiven Detektion von Biomarkern zur Detektion adulter Stammzellen in nodulärem Schilddrüsengewebe und dar.

Dabei handelt es sich um eine qualitative Methode, die eine Aussage über das Vorhandensein eines Markers gibt. Eine Dynamik im Expressionsprofil (zum Beispiel durch veränderte Kulturbedingungen) war an einer unterschiedlichen Signalintensität der spezifischen Banden nach Proteinelektrophorese zu erkennen. Um diesen optischen Eindruck zu quantifizieren, wurde eine semiquantitative Methode verwendet. Die optische Dichte eines Bandensignals wurde mit Hilfe des Image J Programmes in eine relative Dichte, verglichen mit den anderen spezifischen Bandensignalen umgewandelt.

Für diese Analyse war von großer Wichtigkeit, daß die Proteinelektrophorese des Kontrollgens b-aktin für jede Probe Signalbanden gleicher Intensität ergab. Nur so war ein korrekter Vergleich möglich.

7.1 Stimulation der Primärzellkulturen mit 17 β - Östradiol

Marker	Gruppe 1	Gruppe 2 (Kontrolle)	Gruppe 3	Gruppe 4 (Kontrolle)
Oct4	13678.7645 102%	10960.4005 100%	23121.9569 170%	12879.0574 100%
b-aktin	18876.8650 99%	19058.2290 100%	19156.0366 100,5%	18463.5219 96,9%

Danksagung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Endokrinologischen Forschungslabor der St. Hedwig Kliniken in Berlin durchgeführt. Dort wurde auch die Arbeit geplant, Ideen gesammelt und umgesetzt. Mein besonderer Dank gilt folgenden Menschen, die zur Verwirklichung der Arbeit beigetragen haben:

...Prof. Dr. Karl-Michael Derwahl, Doktorvater und Betreuer des Forschungsprojektes, für seine stetige Unterstützung, vielen Ideen und Motivation in gewinnbringenden Gesprächen und Diskussionen.

...den Kollegen des Endokrinologischen Forschungslabors, die bei technischen und organisatorischen Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen.

...Prof. Dr. Sherley für die fachlichen Diskussionen und praktischen Tipps zur Optimierung der Sack Methode.

...Dr. Geipel von der chirurgischen Abteilung des St. Hedwig Krankenhauses Berlin, der uns freundlicherweise über Jahre mit Schilddrüsengewebe nach der Operation versorgte.

...PD Dr. Boewer, der uns die elektronischen Mikroskope zur Verfügung stellte und bei der Interpretation der Ergebnisse half.

...meiner Familie für ihre Unterstützung und Liebe.

Erklärung

„Ich, Kathrin Nowka, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Adulte Stammzellen in Schilddrüsengeweben: Isolierung, Propagierung und Analyse von Expressionsprofilen im Vergleich zu differenzierten Thyreozyten und Schilddrüsenkarzinomzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

01.06.2007

Kathrin Nowka

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.