

1 Einleitung

1.1 Theoretische Aspekte und praktische Bedeutung der Stammzelle

Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Art und den immerwährenden Neustart des Lebenszyklus ist die Fusion von Eizelle und Spermium und damit Bildung eines neuen Keimes. Durch einen rasanten mitotischen Teilungsprozeß entstehen follikelähnliche Strukturen undifferenzierter Zellen (Blastozyst). Die Zellen der Keimbahn sind noch nicht auf einen Differenzierungsprozeß festgelegt und können je nach Position im Embryo unterschiedliche Körperzellen oder Keimzellen bilden (1). Diese entscheidende Eigenschaft der Pluripotenz der Keimbahnzellen ist *in vivo* zeitlich bis zur Gastrulation begrenzt (4.-7. Tag nach der Befruchtung)(2). Die anschließende Bildung der drei Keimblätter (Ekto-, Meso- und Entoderm) stellt die embryonale Quelle jeder somatischen Zelle dar. Ab diesem Punkt durchlaufen die Zellen einen genetisch determinierten keimblattspezifischen Differenzierungs- und Proliferationsprozeß, der mit dem Verlust der Pluripotenz einhergeht. Unipotenz bedeutet in diesem Sinn die Fähigkeit der Zelle, sich in eine keimblattspezifische, organspezifische Zielzelle im Rahmen der Embryogenese zu differenzieren (3).

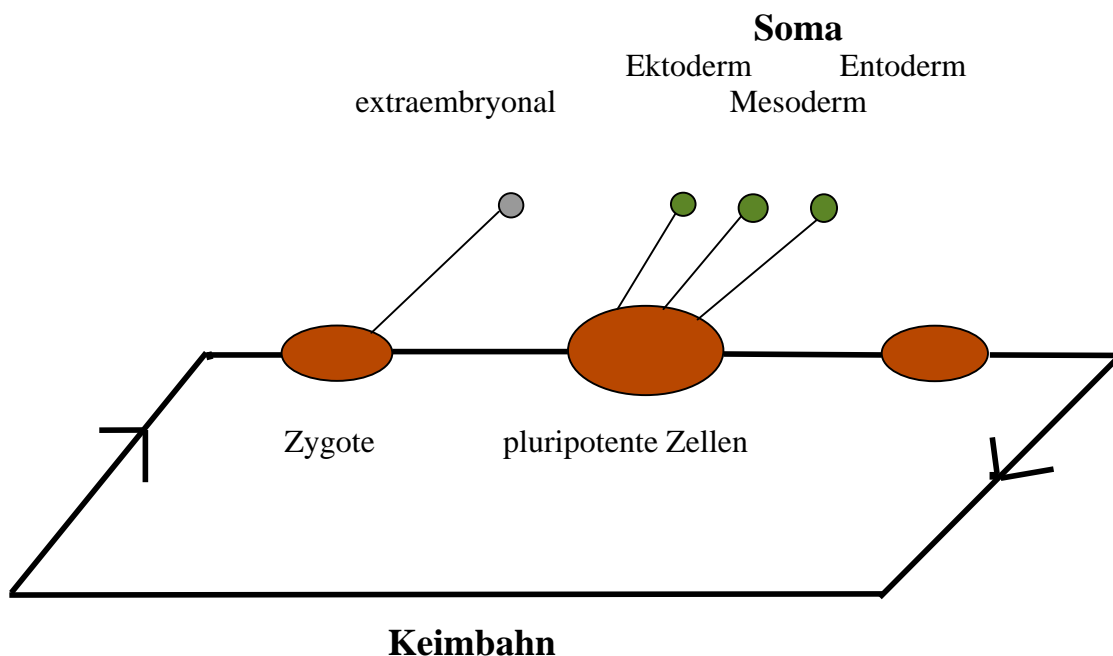


Abbildung 1.1: Die Keimbahn der Säugetiere (nach Schöler, 2004; Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin)

Zellen der frühesten embryonalen Entwicklung, wie die Zygote und deren Nachfolger, werden als Stammzellen bezeichnet und sind (zeitlich begrenzt bis zur Gastrulation) durch folgende Eigenschaften charakterisiert: Es sind undifferenzierte Zellen, die einerseits die Fähigkeit der unbegrenzten Selbstreplikation besitzen und andererseits den Impuls zur Differenzierung der Zellen in ein bestimmtes Zielgewebe geben können.

1998 gelang es erstmalig Thomson et al, menschliche embryonale Stammzellen erfolgreich zu kultivieren (4). Es entstanden embryonale Stammzelllinien, die in Kultur zeitlich unbegrenzt ihre pluripotenten Eigenschaften behielten. Embryonale Stammzellen stellen demzufolge eine kulturbedingte Transformation pluripotenter Zellen des Embryos dar (5).

Die Entdeckung, daß auch in differenzierten Geweben undifferenzierte Zellen mit allgemeinen Stammzeleigenschaften vorkommen, ergab einen großen Aufschwung der Stammzellforschung. Nach Definition des National Institut of Health handelt es sich bei adulten Stammzellen um undifferenzierte Zellen in einem differenziertem Zellverband, die die Fähigkeit zur unbegrenzten Selbstreplikation haben (6). Zweite wichtige Eigenschaft ist die mögliche Teilung in sogenannte Vorläuferzellen. Diese besitzen eine beschränkte Proliferations- und Differenzierungskapazität. Durch Impulse des umgebenden Zellmilieus und Zellkontakte, der Extrazellulärmatrix, sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren entwickeln sich aus den Vorläuferzellen differenzierte, organspezifische Zellen. Dieser Prozeß spielt eine wichtige Rolle in der Zellhomöostase und Gewebeerneuerung (7).

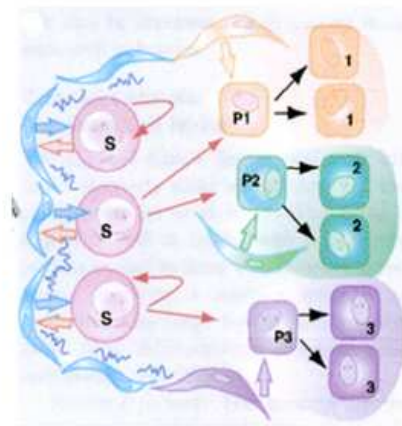


Abbildung 1.2: Modell der Stammzellpropagation und Differenzierung (Watt et al, 2000)

S: Stammzellen, P: Vorläuferzellen, 1-3 differenzierte Gewebezellen

Der Nachweis adulter Stammzellen wurde bisher für eine Reihe von Organen mit unterschiedlicher Wachstumsrate erbracht, wie Knochenmark (8,9,10), Gehirn (11,12,13), Epidermis (14,15), Leber (16,17,18), Darm (19), Pankreas (20) und Skelettmuskulatur (21,22). Erstmals konnte von unserer Arbeitsgruppe der Nachweis adulter Stammzellen in der Schilddrüse erbracht werden (23).

Kriterien einer Stammzelle
1) undifferenzierter Charakter
2) Fähigkeit zur Selbstreplikation
3) Potenz zur Entwicklung differenzierter Zellen

Tabelle 1.1: Kriterien einer Stammzelle

Unterschiede zwischen embryonaler Stammzelle und adulter Stammzelle sind in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

Zelltyp	Ursprung	Isolierung/ Kultivierung	Potenz	Literatur
<u>Embryonale Stammzelle</u>	Gewinnung aus dem Blastozyt	Standardisierte Verfahren in vitro embryonale Stammzelllinie	Pluripotenz	5, 6, 24
<u>Adulte Stammzelle</u>	Nachweis im differenziertem Zellverband	Auf molekularer und Proteinebene schwierig nachzuweisen und zu kultivieren sehr geringe Anzahl	Plastizität	6, 25, 27, 28

Tabelle 1.2: Unterschiede zwischen embryonaler Stammzelle und adulter Stammzelle

Aufgrund der geringen Anzahl adulter Stammzellen im Gewebe ist die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung eine Herausforderung. Von besonderer Bedeutung ist die Plastizität adulter Stammzellen, die unter bestimmten Bedingungen einen gerichteten Differenzierungsprozeß in Zielzellen unterschiedlicher embryonaler Herkunft erlaubt (28).

1.2 Spezielle Embryologie und Histologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse als wichtiges endokrines Organ produziert einerseits die Schilddrüsenhormone T3 und T4 durch Ionisation von Tyrosin, sowie Calcitonin- einem wichtigen Regulator des Calcium- und Phosphatstoffwechsels (29,30). Beide Hormone werden von unterschiedlichen Zellen, den Thyreozyten und C-Zellen, produziert und unterliegen getrennten biochemischen Regelkreisen. Differenzierungsmarker für die Thyreozyten sind Thyreoglobulin, der Natrium Jodid Symporter, Thyreoidperoxidase, sowie der TSH Rezeptor. C-Zellen werden durch die Calcitoninexpression charakterisiert (31).

Die größte Zellpopulation der Schilddrüse stellen die Thyreozyten dar, die im Gewebe in follikulären Strukturen angeordnet sind. Die C-Zellen sind im parafollikulären Raum zu finden. Beide Zelltypen entwickeln sich aus einem anderen embryonalen Keimblatt. Die embryonale Herkunft der Thyreozyten liegt in der Schilddrüsenanlage, die eine kleine Gruppe entodermaler Zellen umfaßt. Lokalisiert wurden sie in der embryonalen hinteren Schlundtasche. Thyreozyten entstammen somit dem Entoderm. Dagegen entwickeln sich die C-Zellen aus dem postbranchialen Körper (ultimobranchial body) und sind neuroektodermalen Ursprungs (32,33).

Ektoderm	Mesoderm	Entoderm
C Zellen der Schilddrüse	Herzmuskel	Thyreozyten der Schilddrüse
Gehirn	Skelettmuskel	Pankreas
Epidermis	Tubuluszellen der Niere	Alveolarzellen der Lunge
	Knochenmarkzellen	Urethra, Vagina

Tabelle 1.3: Unterscheidung der embryonalen Herkunft der Organe (6, 33)

Das für diese Arbeit verwendete Untersuchungsmaterial war benignes, nodulär verändertes Schilddrüsengewebe - ein Zellgemisch, das Zellen aller drei embryonalen Keimblätter enthielt. Follikuläres und parafollikuläres Gewebe, sowie Anteile von Blutgefäßen, Blut, Bindegewebe und Nervenstränge konnten aufgrund der embryonalen Herkunft und Funktion unterschieden werden (6,33,34).

Zellen im Schilddrüsengewebe	Keimblatt
Gefäße (Endothelzellen, Mesothelium, Epithelialzellen)	Mesoderm
Nerven (Neuronen)	Neuroektoderm
Blut (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten)	Mesoderm
Bindegewebe (Fibroblasten)	Mesoderm
Follikel (Thyreozyten)	Entoderm
Parafollikel (C-Zellen)	Ektoderm

Tabelle 1.4: Zellen im Schilddrüsengewebe und ihre embryonalen Herkunft

1.3 Biomarker zur Detektion adulter Stammzellen in Schilddrüsengewebe

Es gibt verschiedene Methoden, um adulte Stammzellen in differenziertem Gewebe zu entdecken. Dabei macht man sich die allgemeinen Merkmale einer Stammzelle, sowie deren spezifisches Expressionsverhalten zunutze.

Stammzellmarker kennzeichnen Stammzellen unterschiedlicher Herkunft (embryonal/ adult) und Eigenschaften (6). Sie sind auf der Zellmembran (Oberflächenrezeptoren), im Zellzytoplasma oder im Zellkern (Transkriptionsfaktoren) lokalisiert. Zur Identifikation von Stammzellen wird meist eine Kombination von Markern benutzt (35).

Oct4

Oct4 gehört zur POU- Familie (Pit- Oct- Unc) von Transkriptionsfaktoren (36). Es wurden bisher 15 POU-Gene im menschlichen Genom beschrieben. Durch Interaktion mit anderen Faktoren (zum Beispiel Oct1, Oct6, Sox2) erweitert sich das Aktivitätsspektrum (37). Oct4 kommt eine entscheidende Bedeutung während der embryonalen Entwicklung zu. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung (38).

1990 wurde Oct4 erstmalig in Mausembryonen entdeckt, im Ektoderm der Gastrula, in primordialen Keimzellen und in embryonalen Stammzellen, jedoch nicht in differenzierten Zellen. Daraus leitete sich die Schlußfolgerung ab, daß Oct4 pluripotente Zellen markiert (39).

Die Keimbahn und Oct4

Die embryonale Entwicklung wird durch verschiedene Regulationsgene, wie Oct4, kontrolliert und gesteuert. In einem eng begrenzten Zeitrahmen bis zur Entwicklung der 3 Keimblätter sind die Embryonalzellen durch ihre Pluripotenz gekennzeichnet. Zum Erhalt dieser Eigenschaft ist Oct4 notwendig. Die physiologische Abnahme der Oct4 Genaktivität bedeutet den Verlust der Pluripotenz und Entwicklung der Zellen Richtung Soma. Nach der Gastrulation läßt sich Oct4 nur noch in den Keimzellen nachweisen.

Untersuchungen der Embryonalentwicklung der Maus zeigten, daß eine Mutation, die mit dem Verlust der Oct4 Funktion einherging, zur frühen Letalität des Embryoblasts führte. Die Zellen verloren ihre Pluripotenz und entwickelten sich Richtung Trophektoderm (40). In anderen Experimenten führte eine Überexpression von Oct4 zur Differenzierung der Zellen Richtung Mesoderm oder Entoderm. Die Menge der Oct4 Expression ist demnach ein Hauptregulator der Pluripotenz der Keimbahn (37,41).

Erhalten embryonale Stammzellen *in vitro* einen Differenzierungsstimulus, beobachtet man im Verlauf veränderte Genaktivitäten. Davies et al kultivierten embryonale Stammzellen der Maus, die Oct4 positiv waren, jedoch keinen Schilddrüsenzellmarker produzierten. Nach 6 Tagen Fütterung mit einem Differenzierungsmedium war Oct4 nicht mehr nachweisbar. Differenzierungsmarker der Schilddrüse, wie der Natrium Jodid Symporter (NIS), pax8, Thyreoglobulin (Tg) und Thyreoidperoxidase (TPO) waren nach dem 6. Embryonaltag *in vitro* nachweisbar (42). Oct4 charakterisiert also pluripotente, embryonale Stammzellen. Im weiteren embryonalen Differenzierungs- und Entwicklungsprozeß erlischt die Oct4 Aktivität.

Tumore und Oct4

In einigen Tumorzellen konnte eine Reaktivierung von Oct4 nachgewiesen werden (43), so in Keimzelltumoren (44,45), im Mammakarzinom (46,47), Kolonkarzinom (48), Nieren- und Lungenkarzinome(49), sowie in Cervixkarzinomzellen (50).

Hochedlinger et al untersuchten den Effekt ektopter Oct4 Expression auf Zelldifferenzierungsprozesse und Tumorenstehung in Mausgewebe (differenziertes Intestinum und embryonales Hautgewebe) (51). Oct4 führte über eine Stimulation des Wnt/ b-catenin Signalwegs zu dysplastischem Wachstum epithelialer Zellen. Durch Unterdrückung des Differenzierungsprozesses expandierte die Zahl der Progenitorzellen, die einen möglichen Beginn der Tumorentstehung darstellten.

Adulte, sowie embryonale Stammzellen unterliegen dem gleichen WNT/ b-catenin Signalweg, der wichtig für die Homöostase der Stammzellen ist und bei Dysregulation zur Tumorentstehung (adulte Stammzellen) oder Differenzierung Richtung Trophektoderm (embryonale Stammzellen) führen kann.

Adulte Stammzellen und Oct4

Tai et al isolierten aus verschiedenen Geweben (Brust, Leber, Pankreas, Niere, Magen) humane adulte Stammzellen und wiesen in ihnen eine Oct4 Aktivität nach. Dies unterstrich die pluripotenten Eigenschaften adulter Stammzellen (50).

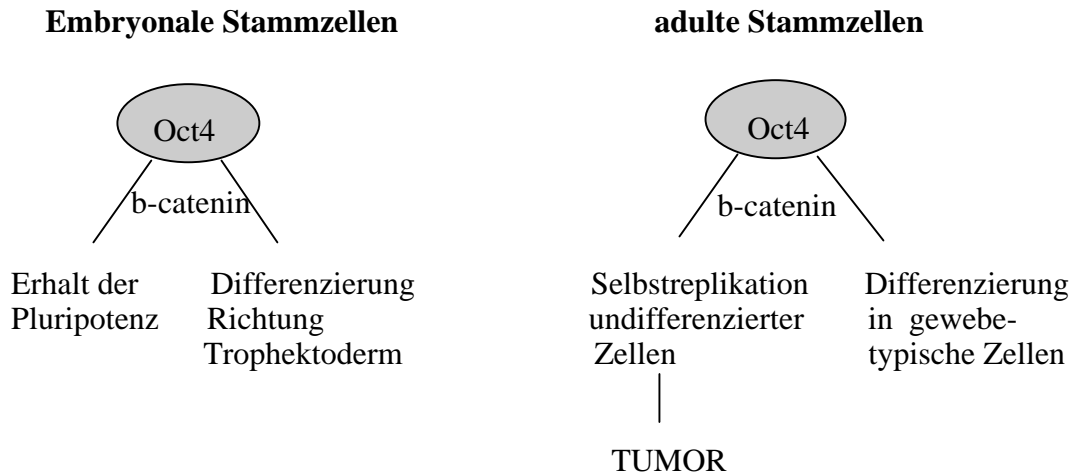


Abbildung 1.2: Vergleich des Oct4 Effektes auf embryonale Stammzellen und adulte Stammzellen, dabei wirkt der WNT/ b-catenin Signalweg als Mediator des Oct4 Effektes (51)

Aufgrund der Feststellung, daß Oct4 in verschiedenen Tumorzellen, in embryonalen Stammzellen und adulten Stammzellen, aber nicht in differenzierten Zellen nachweisbar ist, liegt die Schlußfolgerung nahe, daß Stammzellen Ausgangszellen der Tumorentstehung in differenzierten Geweben sein können.

Im Vergleich von Tumorzellen und Stammzellen finden sich mehrere wichtige Gemeinsamkeiten: Sie besitzen ein hohes Proliferationspotential und können im undifferenzierten Stadium verbleiben. Außerdem verfügen beide Zellarten über keine suffiziente Interzellkommunikation (52).

p63

p63 stellt ein Tumorsuppressorgen und wichtigen Vertreter der p53 Familie dar (53,54). In den Basalzellen verschiedener epithelialer Strukturen der Epidermis, Zervix, Urogenitaltrakt, der Brust und der Prostata fanden sich hohe Konzentrationen an p63 (55,56). Experimente mit knock-out Mäusen für das Gen p63 unterstrichen dessen Bedeutung zum Erhalt der Basalzellen, die für die Epithelentstehung und Morphogenese des Gewebes wichtig sind. Die Mäuse starben perinatal, wobei eine Reihe fehlender epithelialer Strukturen, wie Haut, Brust, Urogenitaltrakt und Prostata auffiel. Der Defekt könnte durch die fehlende Wirkung des

Gens auf das Ektoderm erklärt werden (57).

Yang et al gingen von der These aus, daß durch den Verlust von p63 das Proliferationspotential der epithelialen Stammzellen vermindert wurde (58).

p63 wird aber nicht ausschließlich von Stammzellen epithelialer Strukturen exprimiert, dort weisen sie jedoch die höchsten Konzentrationen auf (59). In terminal differenzierten Zellen läßt sich p63 nicht nachweisen (56,60).

Reis-Filho et al (2003) vermuteten eine entscheidende Bedeutung der p63 Expression in sogenannten soliden Zellnestern der Schilddrüse, die sie als geweblichen Ursprung adulter Stammzellen in Schilddrüsengewebe beschrieben (61). Sie definierten solide Zellnester als embryonale Überreste des postbranchialen Körpers (ultimobranchial body) in der Schilddrüse - und damit entodermalen Ursprungs.

Solide Zellnester der Schilddrüse mit 2 verschiedenen Zelltypen wurden erstmalig von Getzowa 1907 beschrieben (62). Die Hauptzellen besitzen einen zentralen, ovalen Zellkern, eosinophiles Zytoplasma und weisen keine interzellulären Kanäle auf. Dagegen sind die C-Zellen wesentlich seltener im Gewebeverband zu finden und haben einen kleinen, kompakten Zellkern und klares Zytoplasma (63,64).

In immunhistochemischen Untersuchungen von Reis-Filho et al stellten sich p63 positive Hauptzellen in den soliden Zellnestern dar. Die Thyreozyten und C-Zellen waren p63 negativ (61).

Preto et al wiesen, ebenfalls mit immunohistochemische Untersuchungen, eine erhöhte Telomerase Aktivität in p63 positiven Zellen nach, was auf ein erhöhtes Proliferationspotential dieser Zellen schließen ließ.

Aus diesen Ergebnissen wurde der Stammzellcharakter der p63 positiven Hauptzellen der Schilddrüse hergeleitet (65,66).

GATA-4

GATA Proteine gehören zur Familie der Zinc Finger Proteine. Sie regulieren die Genexpression, Differenzierungsprozesse und die Zellproliferation in einer Reihe von Geweben (67,68). Bei Wirbeltieren wurden bisher 6 GATA Proteine identifiziert, die DNA Sequenz zur Bindung an der Zielzelle lautet (A/T)GATA(A/G). 2 Subfamilien werden unterschieden: GATA-1-, -2, -3 werden in hämatopoetischen Zelllinien exprimiert und bedingen eine normale Hämatopoese (69,70). GATA-4, -5, -6 Aktivität findet sich in myokardialen und entodermalen Zellen (71).

GATA-4 spielt eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung des visceralen und parietalen Entoderms. Knock-out Mäuse für GATA-4 starben zwischen Embryonaltag 8-9 aufgrund morphologischer Herzdefekte. Embryonale Stammzellen ohne

GATA-4 Aktivität bildeten zwar Kardiomyozyten, jedoch fehlte ihnen die Fähigkeit, funktions- und entwicklungsfähiges viscerales Entoderm zu bilden (72,73). Dies unterstreicht die Bedeutung von GATA-4 während der Gastrulation und Formation des Entoderms.

GATA-4 Expression ist ab dem 14. Embryonaltag in der Nebennierenrinde nachweisbar. Postnatal vermindert sich die GATA-4 Aktivität. Dagegen wird GATA-6 auch postnatal exprimiert (74). GATA-4 findet man in Granulosa Zellen der Maus und des Menschen, sowie in den Thekazellen der Ovarien. Nach der Ovulation ist GATA-4 im corpus luteum jedoch nicht mehr nachweisbar (75). Außerdem wird eine GATA-4 Aktivität im fetalen Hoden beschrieben. Es erfolgt eine kontinuierliche Expression in den Sertoli- und Leydigzellen bis ins Erwachsenenalter (76). Desweiteren existieren verschiedene GATA-4 positive Ovarialtumoren (77) Dottersacktumoren (78), Sertoli und Leydigzelltumoren (76).

Schlußfolgernd läßt sich feststellen, daß sich Gata-4 in fetalen entodermalen Geweben, sowie in adulten Gewebezellen mit erhöhtem Proliferationspotential detektieren läßt, jedoch nicht in terminal differenzierten Zellen.

HNF4 α

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha gehört zu einer gemischten Gruppe von Transkriptionsfaktoren (HNF1 α , HNF3 β , γ , HNF6). Erstmals wurde HNF4 α in den Hepatozyten der Rattenleber nachgewiesen und danach benannt (79).

HNF4 α wurde im primitiven Entoderm nachgewiesen. Experimente an Knock-out Mausembryonen für HNF4 α führten wegen defekter Gastrulation zum Zelltod und unterstrichen so die Bedeutung des Gens für die normale Keimblattentwicklung (80). Analysen des Gastrulationsprozesses embryonaler Zellen ergaben eine HNF4 α Aktivität im extraembryonalen visceralen Entoderm, jedoch nicht im embryonalen Gewebe vor dem 9. Embryonaltag (81). HNF4 α spielt demnach erst in späteren Stadien der Gastrulation eine wichtige Rolle. Die früheste Differenzierung des visceralen Entoderms wird durch den Transkriptionsfaktor GATA-4 beeinflusst und übt eine regulierende Wirkung auf HNF4 α aus (82,83).

HNF4 α wurde in Darm und Niere des sich entwickelnden Mausembryonen nachgewiesen- beides Organe, die sich aus dem Entoderm formieren (84). Ebenso wurde HNF4 α in verschiedenen differenzierten Geweben, wie Leber, Darm, Niere, und Pankreas beschrieben, die sich aus dem Entoderm entwickeln (85).

Connexin 43

Zellhomöostase und Interzellommunikation stellen wichtige Eigenschaften differenzierter Gewebe dar. Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose werden so

kontrolliert (86). Dabei werden verschiedene Kommunikationsprozesse unterschieden:

- 1) die extrazelluläre Kommunikation durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Neurotransmitter und Zytokine, sie regulieren
- 2) die intrazelluläre Kommunikation, die vom pH Wert, c-AMP und Ca^{++} abhängig ist, und
- 3) die interzelluläre Kommunikation durch Zell-Zellkanäle, die von Connexinen gebildet werden.

Connexine bilden eine Familie von Transmembranproteinen, die Zell-Zellkanäle (Gap junctions) bilden. Bisher sind 15 verschiedene Connexin Untereinheiten bekannt, die in verschiedenen Geweben nachgewiesen wurden. Der Aufbau eines Zell-Zellkanals besteht aus mehreren Connexin Molekülen. Jeweils 6 Connexin Moleküle bezeichnet man als ein Connexon. 2 Connexone bilden einen Zell-Zellkanal, der aneinandergrenzende Zellmembranen durchquert und Intrazellularräume miteinander verbindet (87,88). Diese porenbildenden Proteinkomplexe ermöglichen einen passiven Transmembrantransport zwischen benachbarten Zellen. Es kommt sowohl zum Austausch von Ionen, als auch von ungeladenen Molekülen, wie Wasser, Glukose, Aminosäuren, Nukleotiden, cAMP und ATP. Die dadurch mögliche Interzellkommunikation dient der normalen Entwicklung eines differenzierten Zellverbandes, einschließlich Wachstumskontrolle, Differenzierung, Reparaturmechanismen, elektrische Kopplung und Synchronisation metabolischer Prozesse (89).

Connexin 43 wurde in Epithelzellen gefunden, ebenso in Bindegewebe, Uterus, Gehirn und Myokard (86). Es wurde in Hepatozyten nachgewiesen (90), sowie in H6C7, einer epithelialen Pankreaszelllinie (89). Connexin 43 und 32 wurden in Thyreozyten bestimmt. In Monolayern kultivierte Thyreozyten exprimierten immer Connexin 43, wogegen Connexin 32 nur von Thyreozyten in follikulären Strukturen produziert wurde (91).

Das Fehlen von Connexin und Zell-Zellkanälen erwies sich als gültiger Biomarker für eine Reihe von Stammzellen (50,92). So fand sich kein Connexin in der totipotenten Stammzelle nach Befruchtung der Eizelle (93), in isolierten humanen adulten Stammzellen aus Nierenparenchym (94), Brustepithel (95), Kornea (96), Nervengewebe (97), Pankreas (89) und Epidermis (98). Notwendige Zellregulation und Wachstumskontrollmechanismen in adulten Stammzellen wurden durch Vorläuferzellen, die Connexin exprimierten, übernommen (92).

In verschiedenen Tumoren wurde ebenfalls eine Unterregulierung der Connexinexpression beschrieben, wie beim hepatozellulären Karzinom (90,99) und Tumorzelllinien, wie HeLa, einer humanen Zervixkarzinomzelllinie (100), und MCF-7, einer humanen Mammakarzinomzelllinie (101). Der Aspekt, daß Tumorzellen, ebenso wie adulte Stammzellen, keine funktionsfähigen Interzellkanäle besitzen, und somit auch keine normale Wachstumskontrolle, Differenzierung und kontrollierte Apoptose stattfindet, unterstreicht die Theorie, daß adulte Stammzellen den Ausgangspunkt der Tumorentstehung bilden können.

1.4 Propagierung adulter Stammzellen in einer Primärzellkultur

1.4.1 Theorie der Asymmetrischen Stammzellkinetik und ihre Beeinflussung in vitro

Ein Merkmal der adulten Stammzelle ist ihr seltenes Vorkommen im differenzierten Zellverband. Die geringe Anzahl der zu isolierenden adulten Stammzellen stellt ein bedeutendes Hindernis ihrer therapeutischen Nutzung dar.

Adulte Stammzellen unterliegen der asymmetrischen Stammzellkinetik. Sherley et al. sehen in der Beeinflussung der asymmetrischen Zellkinetik einen möglichen Weg zur Stammzellproliferation in einer Zellkultur (102).

In vivo gehen aus einer adulten Stammzelle nach Teilung zwei unterschiedliche Zelltypen hervor: eine identische Ersatzstammzelle sowie eine Transittochterzelle (Vorläuferzelle), die sich wiederum in reife Gewebezellen differenzieren kann. So ermöglicht die asymmetrische Zellkinetik trotz Zellerneuerung eine Zellhomöostase im differenzierten Gewebe (103). In vitro limitiert dieser Prozeß jedoch eine Stammzellproliferation. Ziel der Arbeitsgruppe um Sherley bestand in der gerichteten Veränderung der Zellkulturbedingungen zugunsten einer symmetrischen Zellkinetik. Dadurch sollte die Propagierung der Stammzellen in vitro gelingen. Diese Methode etablierte sich unter dem Namen SACK (Suppression of Asymmetric Cell Kinetics).

Die asymmetrische Zellkinetik wird in hohem Maß von der Expression des Tumorsuppressorgens p53 bestimmt. p53 führt über die Unterregulation von Inosine-5-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) zu einer Reduktion der Guanin Nukleotid Biosynthese. Xanthosin, ein Purin Nukleotid, verhindert die IMPDH Unterregulation. Somit wird unter Xanthosineinfluß die Stammzellproliferation in einen Prozeß der symmetrischen Zellkinetik umgewandelt (104, 105). Das bedeutet, daß Stammzellen, statt einer Vorläuferzelle und sich daraus differenzierender Gewebezellen, mehrere Tochterstammzellen propagieren. Somit wäre theoretisch eine Propagierung adulter Stammzellen unter Xanthosineinfluß in vitro möglich. Da es sich um einen reversiblen Prozeß handelt, ist nach Entzug des Purin Nukleotids eine erneute Umwandlung in die asymmetrische Zellkinetik möglich (106,107).

Jedoch wird nicht nur ein Einfluß der Xanthosinkonzentration auf den Proliferationsprozeß der Stammzellen angenommen. Vielmehr spielen auch andere in vitro Bedingungen, wie Zelldichte, autokrine Faktoren, Serumkonzentration des Nährmediums und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle, die den Selektionsdruck auf die Zellkultur verändern.

Lee et al. etablierten eine Methode zur klonalen Expansion adulter Stammzellen und möglichen Gewinnung einer reinen Stammzellkultur aus Rattenleberepithelzellen durch Kombination verschiedener Kulturbedingungen (108). Ob in vivo, zum Beispiel bei Zellreparaturprozessen, ähnliche Mechanismen zu einer Veränderung der Zellkinetik und

kurzfristigen Vermehrung der Stammzellen führen, ist ungeklärt.

1.4.2 Beeinflussung der Stammzellproliferation durch Steroide

Steroidhormone regulieren Reproduktions- und Differenzierungsprozesse, sowie die Entwicklung und Homöostase verschiedener Gewebe (109). Östrogen spielt als bedeutendes Hormon nicht nur eine Rolle bei der sexuellen Differenzierung und Reproduktion, sondern beeinflusst auch verschiedene andere Organe, unter anderem das Herz und das Gehirn.

Die Präsenz von Östrogen Rezeptoren in Schilddrüsengewebe ist bekannt. Dabei wurden in einigen Studien deutlich höhere Konzentrationen in Tumorgeweben als in benignen Schilddrüsengeweben gefunden (110,111).

17 β -Östradiol wirkt als direkter Wachstumsfaktor auf die Schilddrüsenzellen, in dem es in der frühen G1 Phase des Zellzyklus die Cyclin D1 Genexpression induziert. Dies korreliert mit einer Induktion des Zellwachstums und möglichen Tumorentstehung (112). In Schilddrüsenkarzinomzellen ließ sich eine Überexpression von Cyclin D1 in einem Drittel der untersuchten Karzinomgewebe feststellen (113). Dies paßt zu der klinischen Tatsache, daß Schilddrüsenkarzinome 3mal häufiger bei Frauen auftreten.

In embryonalen Stammzellen der Maus wurden verschiedene Steroidhormone, unter anderem Östrogen, nachgewiesen (114). Einen möglichen progressiven Effekt der Steroide auf den Differenzierungsprozeß humaner embryonaler Stammzellen *in vitro* wiesen Seok et al nach. Via Polymerase-Kettenreaktion konnten Östrogen- Rezeptoren (α , β) und andere Steroidrezeptoren nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Zellen mit 17 β -Östradiol kam es zur Expression der entodermalen Marker GATA-4 und AFP im Sinne eines Differenzierungsprozesses (115).

Brannvall et al wiesen die Bedeutung von Östrogen auf den Proliferations- und Differenzierungsprozess neuronaler Stammzellen nach. Embryonale Stammzellen zeigten nach Behandlung mit 17 β -Östradiol in unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten eine erhöhte Aktivität der Bromodeoxyuridine (BrdU). BrdU ist ein Thymidinanalogon, das ausschließlich während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA aufgenommen wird und so proliferierende Zellen kennzeichnet (116).

1.5 Die Side Population und die Bedeutung des ABCG2 Transportergens

Ein Alternativverfahren zur Isolierung von Stammzellen ist die Analyse einer gesonderten Zellpopulation, der Side Population. Sie wurde 1996 von Goodell et al vorgestellt (117). Die Side Population definiert das Verhalten einer geringen Anzahl von Zellen, den fluoreszenten DNS Bindungsfarbstoff Hoechst 33342 zu exportieren. Die meisten Zellen werden

durch Hoechst 33342 angefärbt und werden als Non Side Population bezeichnet.

Goodell et al isolierten eine Side Population aus dem Knochenmark von Mäusen. Anschließend wurden diese Zellen Mäusen mit tödlich bestrahltem Knochenmark injiziert. Die wenigen Zellen der Side Population waren in der Lage, viele langlebige Knochenmarkzellen zu reproduzieren und den Gewebedefekt auszuheilen. Demnach besaß die Side Population gegenüber der Hauptpopulation eine hohe Proliferationskapazität und Differenzierungspotential.

Zellen der Side Population haben außerdem die Potenz, in ursprungsfremde Gewebezellen zu differenzieren. So wiesen Jackson et al nach, daß aus dem Knochenmark isolierte Zellen der Side Population, die in verletztes Herzmuskelgewebe injiziert wurden, proliferierten und in Kardiomyozyten differenzieren konnten (118).

Goodell et al detektierten die Side Population im Knochenmark einer Reihe von Spezies, wie Ratte, Kaninchen, Schwein, Affe und Mensch (119). Die Side Population wurde bisher in verschiedenen Geweben beschrieben und ihr Stammzellcharakter mittels weiterer spezifischer Marker nachgewiesen, so im Ösophagus (120), Skelettmuskel (121), Herzmuskelgewebe (122), Brustdrüsengewebe (123), Lebergewebe (124), Lunge (125), Pankreas (126) und Darm (127).

Das ATP- bindende Membrantransportergen ABCG2 ist für den Phänotyp der Zellen der Side Population verantwortlich. Bisher sind etwa 50 verschiedene Gene der ABC Transporterfamilie identifiziert worden. Eine ABCG2 Genexpression ließ sich in verschiedenen humanen Geweben nachweisen, wie Knochenmark, Leber, Lunge, Testis und Magen (128).

Zhou et al (2001) bewiesen, daß eine höhere ABCG2 Konzentration mit einer Vermehrung der Side Population einhergeht. Durch die Transduktion von Knochenmarkszellen mit einem Vektor für die Expression des ABCG2 Gens und anschließende Passagierung der Knochenmarkszellkultur kam es nach 12 Tagen zu einer deutlichen Vermehrung der Side Population. In der Durchflußzytometrie wurde ein Anstieg von 0,05% auf 62,5% beschrieben.

Kim et al (2002) isolierten die Side Population aus dem Knochenmark von Mäusen. Via Polymerase-Kettenreaktion konnten sie zeigen, daß die Side Population eine höhere ABCG2 Genaktivität als die Non Side Population hatte (129).

Eine erhöhte Konzentration von ABCG2 kann somit als ein Stammzellmarker angesehen werden (130). Jedoch ist die Funktion des ABCG2 Gens in adulten Stammzellen unklar. Verschiedene ABC Gene dienen dem Transport von lipophilen zytotoxischen Stoffen. Möglicherweise schützen sie so Stammzellen vor Zytotoxien. Nach Bunting et al besteht die Bedeutung der erhöhten Expression des ABCG2 Gens im Beibehalten der Zellhomöostase der Stammzellpopulation (131).

In Experimenten mit Knock-out Mäusen für das Gen ABCG2 wurde nach Färbung mit dem Hoechst Farbstoff und Durchflußzytometrie keine Side Population im Knochenmark der

Mäuse nachgewiesen. Ungeachtet dessen fand sich eine gesunde, normal große Population von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Dies spricht dafür, daß ABCG2 ein Stammzellmarker ist, jedoch nicht die Funktionalität der Stammzellen beeinflusst (132).

1.6 Ziel der Arbeit

Adulte Stammzellen der Schilddrüse wurden durch unsere Arbeitsgruppe erstmalig charakterisiert (23). Ausgesuchte pluripotente und entodermale, multipotente Stammzellmarker konnten via Polymerase-Kettenreaktion und Immunzytochemie adulte Stammzellen und Vorläuferzellen von differenzierten Gewebezellen unterscheiden. So konnte in wenigen Zellen einer Schilddrüsenprimärzellkultur Oct4, GATA-4, HNF4 α und p63 nachgewiesen werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der weiterführenden Analyse des Expressionsprofils adulter Stammzellen und Vorläuferzellen. Außerdem sollte der Einfluß einer gerichteten Veränderung der Kulturbedingungen auf die Stammzellpropagierung untersucht werden.

Untersuchungsmaterial waren noduläre Schilddrüsenngewebe von 41 Patienten beiden Geschlechtes und verschiedenen Alters. Malignität galt als Ausschlußkriterium. Als Kontrollgruppen dienten etablierte Schilddrüsenkarzinomzelllinien (Hth74, HTC) und die Schilddrüsenzelllinie FRTL5 als ein anerkanntes Modell einer differenzierten Schilddrüsenzelle.

1) Einen wesentlichen Teil dieser Arbeit stellte die Optimierung der Durchflußzytometrie der Schilddrüsenngewebezellen dar. Durch diese Methode waren Einfach- und Mehrfachbestimmungen von Stammzellmarkern möglich. Außerdem sollten nach Isolierung der adulten Stammzellen und Vorläuferzellen weiterführende mRNA-Expressionsanalysen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und eine Kultivierung der Zellen möglich sein.

2) Alternativ ließen sich adulte Stammzellen durch ihr fehlendes Färbeverhalten gegenüber dem DNS Bindungsfarbstoff Hoechst 33342 in der Durchflußzytometrie von differenzierten Thyreozyten unterscheiden. Ob die Zellen der sogenannten Side Population noch andere Stammzellcharakteristika, wie Oct4 Expression und erhöhte ABCG2 Konzentration aufwiesen, sollte durch eine anschließende Expressionsanalyse mittels Polymerase-Kettenreaktion geklärt werden.

3) Die Expression von Connexin 43 wurde in Schilddrüsenngeweben, sowie Tumorzelllinien untersucht. Ob adulte Stammzellen, isoliert durch FACS, ebenso Connexin 43 exprimieren, sollte geklärt werden. Als Technik wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

4) Schilddrüsenzellkulturen wurden veränderten Kulturbedingungen ausgesetzt und der Selektionsdruck auf die Zellen erhöht. So sollte eine mögliche Dynamik der

Stammzellkinetik veranschaulicht werden. Angelehnt an die SACK Theorie wurden folgende Faktoren variiert: Xanthosineinfluß, Zelldichte, Passagehäufigkeit, Wechsel des Nährmediums und Serumkonzentration im Kulturmedium.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluß von 17β -Östradiol auf adulte Stammzellen und ihr Expressionsmuster untersucht. Mit Hilfe der Immunzytochemie, Durchflußzytometrie und Polymerase-Kettenreaktion wurden die behandelten Schilddrüsenzellen auf die Protein- und mRNA Expression des Stammzellmarkers Oct4 und des entodermalen Markers GATA-4 untersucht.