

3 Ergebnisse

3.1 Detektion der Stammzellmarker Oct4, p63 und entodermaler Transkriptionsfaktoren GATA-4 und HNF4 α in der Durchflußzytometrie

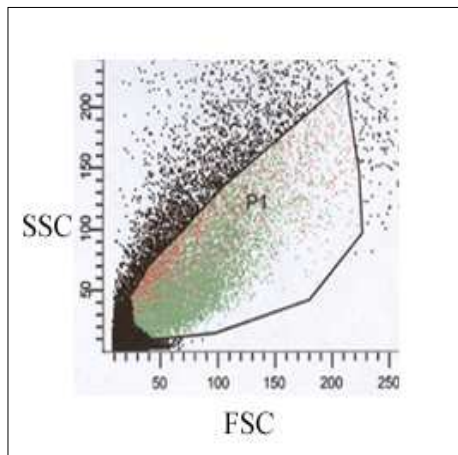
Um die Ergebnisse der Durchflußzytometrie vergleichen zu können, wurden in einer Experimentreihe die Faktoren Patient (Alter, Geschlecht), Passageanzahl und Zellkulturbedingungen nacheinander variiert oder belassen. So konnte die Bedeutung jedes einzelnen Faktors auf die Quantität der Stammzellmarkerexpression in der Durchflußzytometrie untersucht werden.

3.1.1 Prinzip der durchflußzytometrischen Analyse von Gewebezellen

Um eine möglichst homogene Zellpopulation zu erhalten, wurde im ersten Schritt der Analyse die Größe und Granularität der Zellen verglichen. Durch das Schleusen (Gaten) wurde die Zellpopulation, ähnlich in Größe und Granularität, eingeschlossen. So konnten vereinzelte gewebefremde Zellen, Zellfragmente und Verschmutzungen von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Nur die eingeschlossenen Zellen wurden weiter analysiert.

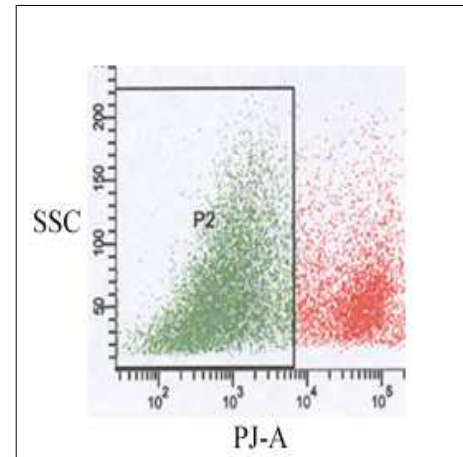
Im zweiten Schritt erfolgte die Selektion von Propidium Jodid (PJ) gefärbter Zell-DNA, als Hinweis auf Zellfragmente und Zelltod. Zur weiteren Analyse wurden wiederum nur die positiv eingeschlossenen Zellen verwendet.

Differenzierung nach Granularität – Größe



A

Exklusion von Zellfragmenten



B

Abbildung 3.1: Dot-Plot Grafiken der Durchflußzytometrie von Schilddrüsenzellen

A) Im Streulicht-Dot-Plot stellte die vertikale Achse das Seitwärtsstreulicht dar, die horizontale Achse stellte das Vorwärtsstreulicht in linearer Funktion dar. Jeder Punkt definierte eine in der Durchflußkammer gemessene Zelle, P1 schließt die Zellen ein, die zur weiteren Analyse benutzt wurden

B) Propidium Jodid (PJ) hat ein Emissionsmaximum von 350 nm, die Darstellung erfolgte in logarithmischer Funktion, PJ gefärbte Zell-DNA, im Sinne von Zellfragmenten, wurden ausgeschlossen, P2 enthielt die vitalen Zellen, die zur weiteren Analyse benutzt wurden

3.1.2 Entodermale und stammzelltypische Marker in einer Schilddrüsenzellkultur

Von der Hauptpopulation der differenzierten, Thyreoglobulin produzierenden Schilddrüsenzellen ließ sich eine kleine Subpopulation abgrenzen, die für entodermale und stammzelltypische Marker positiv war.

Patientengeschlecht, Alter des Patienten, Zelllokalisierung (nodulär und paranodulär), sowie Passagehäufigkeit der Schilddrüsenprimärzellkultur hatten keinen Einfluß auf die Stammzellmarkerexpression. Bis zur 10. Passage einer Primärzellkultur ließen sich Oct4, GATA-4, HNF4 α und p63 in 0,1-1,5 % der Gesamtzellpopulation darstellen.

Einfachbestimmungen

Oct4

Oct4 (Primärantikörper) wurde an das Fluorochrom Fitc (Sekundärantikörper) gekoppelt. In der Einfachfärbung konnten 1,2 % Oct4 positive Zellen von der Gesamtzellpopulation detektiert werden.

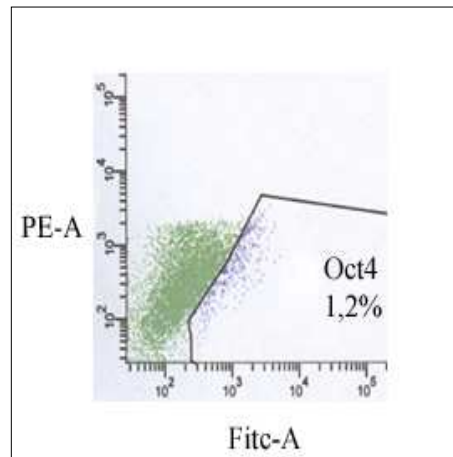


Abbildung 3.2: Durchflußzytometrie von Schilddrüsenzellen, Darstellung von Oct4/ Fitc gekoppelten Zellen auf der horizontalen Achse in logarithmischer Funktion, Detektion von 1,2 % Oct4 positiven Zellen, Emissionsmaximum des Fluorochroms Fitc: 520 nm

GATA-4

GATA-4 positive Zellen konnten in der PE Färbung in 1,2 % der untersuchten Gesamtzellpopulation detektiert werden.

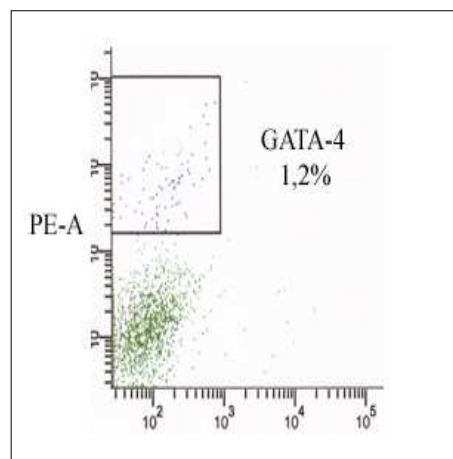


Abbildung 3.3: Darstellung von GATA-4 positiven Zellen nach der Durchflußzytometrie von Schilddrüsenzellen , GATA-4/PE gekoppelte Zellen zeigen sich auf der vertikalen Achse in logarithmischer Funktion, Detektion von 1,2 % GATA-4 positiven Zellen, Emissionsmaximum von PE: 580 nm,

HNF4 α

HNF4 α , gekoppelt an das Fluorochrom Fitc, wurde in 0,6 % der Gesamtzellpopulation detektiert.

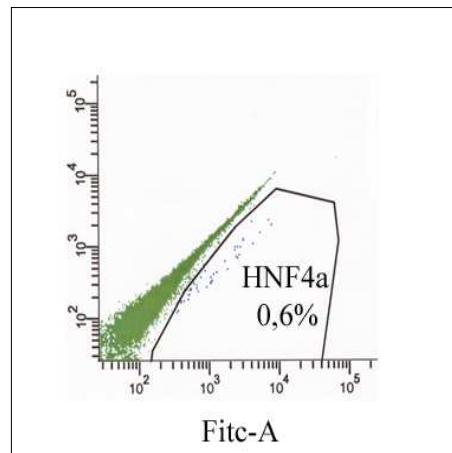


Abbildung 3.4: Durchflußzytometrie von Schilddrüsenzellen, 0,6 % der Gesamtzellpopulation waren positiv für HNF4 α , Darstellung von HNF4 α /Fitc gekoppelten Zellen

p63

p63, gekoppelt an das Fluorochrom PE, wurde in 0,7 % der Gesamtzellpopulation detektiert.

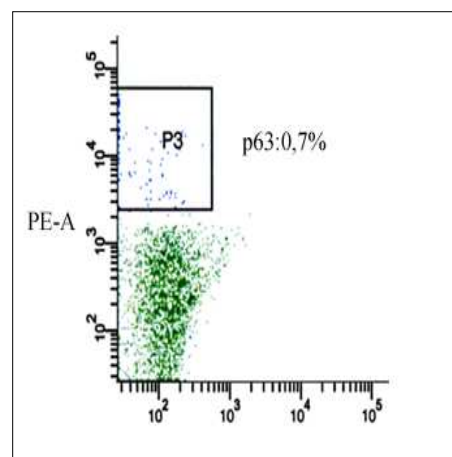
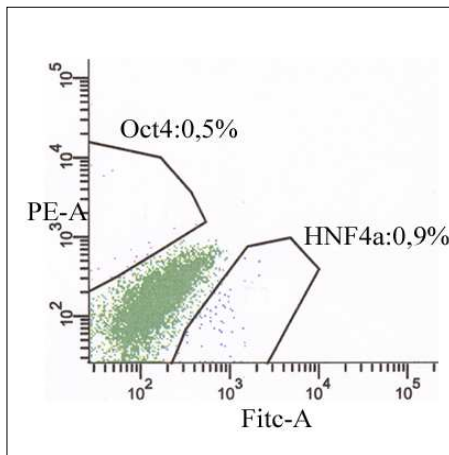


Abbildung 3.7: Durchflußzytometrie von Schilddrüsenzellen, 0,7 % der Gesamtzellpopulation waren p63 positiv, Darstellung von p63/PE gekoppelte Zellen

Kombinationsbestimmungen

Nach Doppelfärbung der Zellen für mehrere Marker stellten sich in der Durchflußzytometrie Zellen dar, die jeweils einen Stammzellmarker exprimierten. Aufgrund der ausgeprägten Eigenfluoreszenz der Gewebezellen kam es zu einer Überstrahlung der doppelt positiven Zellen in der Diagrammspitze, die damit nicht eindeutig zuzuordnen waren.

Oct4-HNF4 α



Oct4-p63

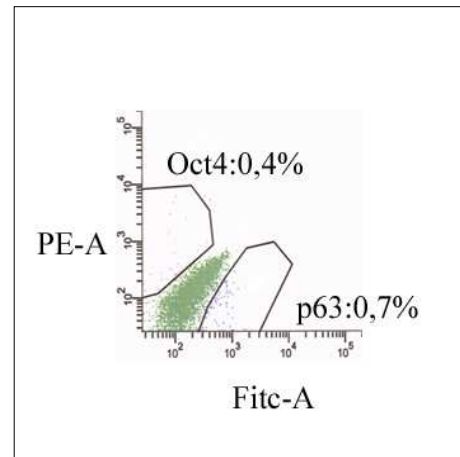
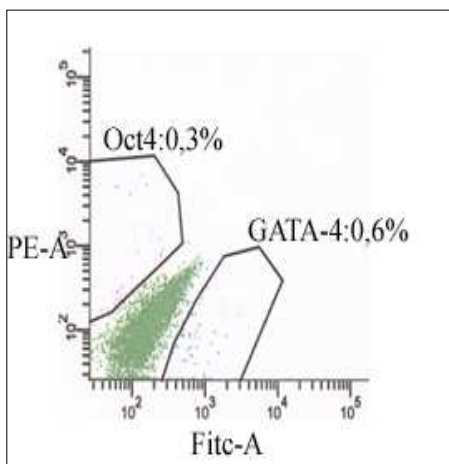
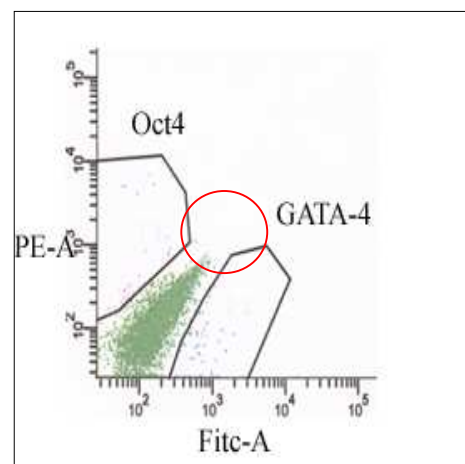


Abbildung 3.8: Durchflußzytometrie einer Doppelfärbung von Schilddrüsenzellen, Verwendung von jeweils zwei Primärantikörpern (Oct4, HNF4 α , p63) und zwei Fluorochromen unterschiedlicher Emissionsmaxima (PE: 580 nm, Fitc: 520 nm), Detektion von Oct4, HNF4 α und p63 einfach positiven Zellen in einer Konzentration von 0,4-0,9 % der Gesamtzellpopulation

Oct4-GATA-4



A



B

Abbildung 3.9: A: Durchflußzytometrie einer Doppelfärbung von Schilddrüsenzellen, Oct4/PE positive Zellen waren in 0,3 %, GATA-4/ Fitc positive Zellen waren in 0,6% der Gesamtzellpopulation zu finden
B: im roten Kreis sind Zellen dargestellt, die für beide Marker (Oct4 und GATA-4) positiv waren, die Eigenfluoreszenz der Gewebezellen verhinderte durch Überstrahlung in der Diagrammspitze eine eindeutige Zuordnung der spezifischen, doppelt positiven Zellen

Thyreoglobulin und Stammzellen

Zur Unterscheidung von Thyreozyten, Vorläuferzellen und adulten Stammzellen einer Schilddrüsenprimärzellkultur wurden jeweils zwei Marker ausgewählt, die unterschiedliche Zelleigenschaften hervorhoben. Thyreoglobulin als Marker der differenzierten Thyreozyten war in den meisten Zellen nachweisbar. Es stellte sich jedoch eine kleine, Thyreoglobulin negative Zellpopulation dar, die für die Stammzellmarker Oct4, HNF4 α und GATA-4 positiv war.

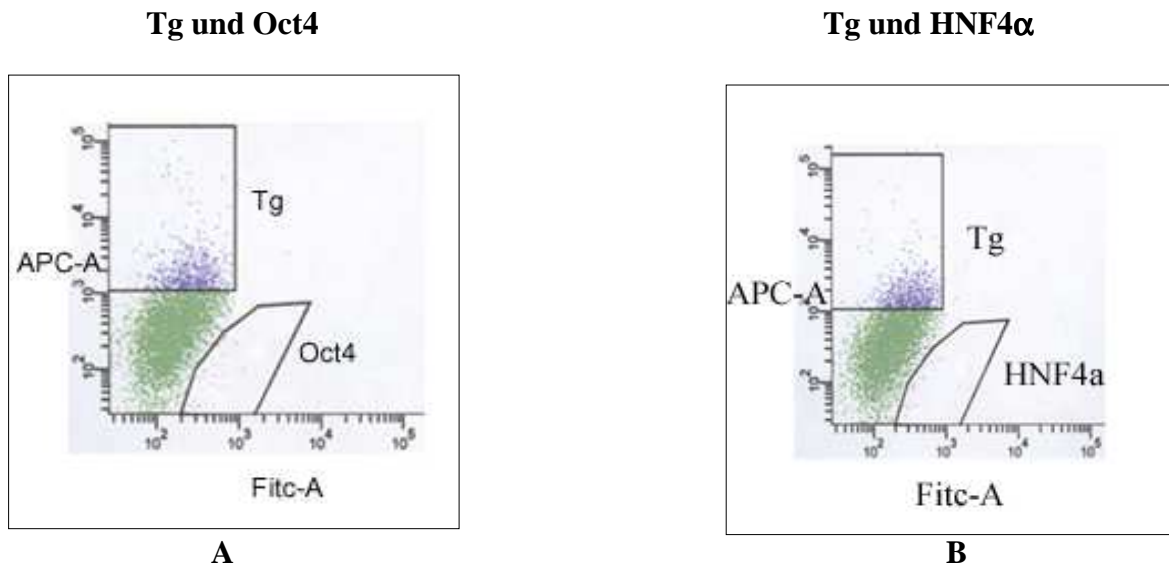


Abbildung 3.10: Grafik nach Doppelfärbung und Durchflußzytometrie von Schilddrüsenzellen **A:** die Mehrzahl der Schilddrüsenzellen waren Thyreoglobulin (Tg) positiv, eine sehr kleine Subpopulation war Tg negativ, aber Oct4 positiv, **B:** Tg positive Zellen ließen sich von Tg negativen, aber HNF4 α positiven Zellen unterscheiden

Neben vielen Thyreoglobulin positiven Zellen und wenigen GATA-4 positiven Zellen, wurden in der Durchflußzytometrie auch doppelt positive Zellen detektiert. Diese Zellen exprimierten den entodermalen, multipotenten Marker GATA-4 und waren andererseits positiv für den Differenzierungsmarker Thyreoglobulin.

Tg und GATA-4

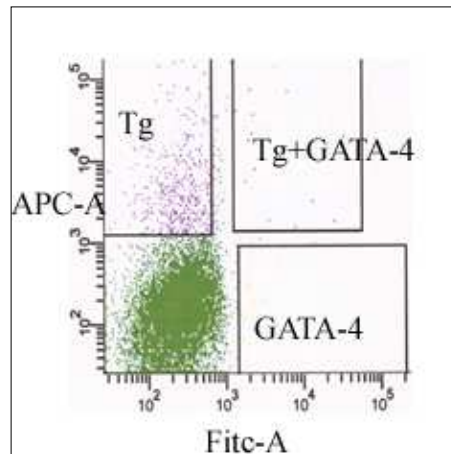


Abbildung 3.11: Doppelfärbung und Durchflußzytometrie: Thyreoglobulin (Tg) einfach positive Zellen und GATA-4 einfach positive Zellen, in der Diagrammspitze stellen sich doppelt positive Zellen für GATA-4 und Tg dar

3.2 Polymerase-Kettenreaktion nach FACS zur weiteren Analyse des Expressionsprofils adulter Stammzellen

Nach FACS zur Isolierung von Oct4, GATA-4, HNF4 α und Tg positiven Zellen erfolgte die mRNA Gewinnung, Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Die mRNA der FACS Zellen, positiv für GATA-4 und HNF4 α , wurde in der RT-PCR auf den Primer Oct4 untersucht. Sowohl GATA-4, als auch HNF4 α positive FACS Zellen waren Oct4 positiv. Dagegen waren Thyreoglobulin positive FACS Zellen, wie erwartet, Oct4 negativ.

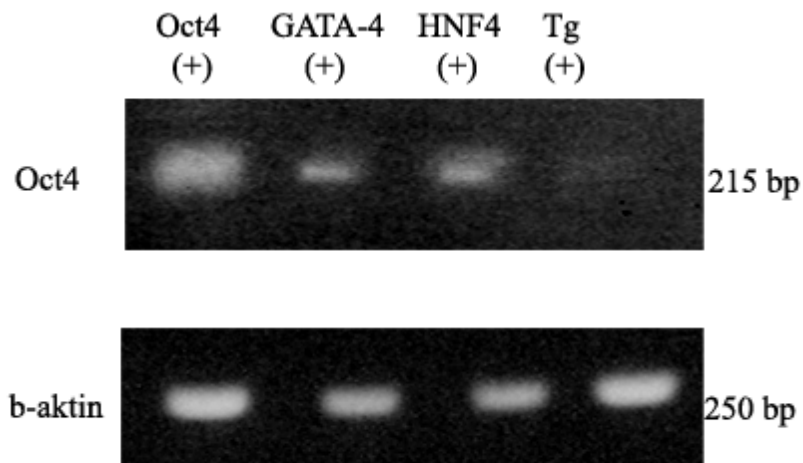


Abbildung 3.12: Expression von Oct4 mRNA in FACS Zellen; GATA-4 und HNF4 α positive Zellen zeigten ein spezifisches Oct4 Signal bei 215 Basenpaaren (bp), Thyreoglobulin (Tg) positive Zellen wiesen kein Signal für Oct4 auf, b-aktin wurde als Kontrollgen verwendet

3.3 Expression von Connexin 43 in Schilddrüsenzellen, Kontrollzelllinien und adulten Stammzellen

Zum Nachweis einer Connexin 43 Genaktivität wurde die Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Dazu wurde mRNA der Primärzellen gewonnen und nach der Reversen Transkription die Primer spezifische PCR durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden mehrfach mit den Variablen Patient und Passageanzahl wiederholt.

Als Kontrollgruppen dienten zwei Zelllinien. FRTL5 gilt als Modell einer differenzierten Schilddrüsenzelle der Ratte. Es ist jedoch bekannt, daß diese Zellen kein Connexin exprimieren und somit nicht über funktionelle Zell-Zellkanäle verfügen (91). HTh74, die Zelllinie eines humanen anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms gilt als teilweise kommunikationsdefizient.

Connexin 43 und Schilddrüsenzellen

Connexin 43 mRNA wurde in allen untersuchten primären Schilddrüsenzellkulturen nachgewiesen. Die Ergebnisse waren reproduzierbar und zeigten keine Unterschiede hinsichtlich Patientengeschlecht und Zelllokalisierung (paranodulär und nodulär). Ebenso hatte die Passagehäufigkeit der Zellkultur keinen Einfluß.

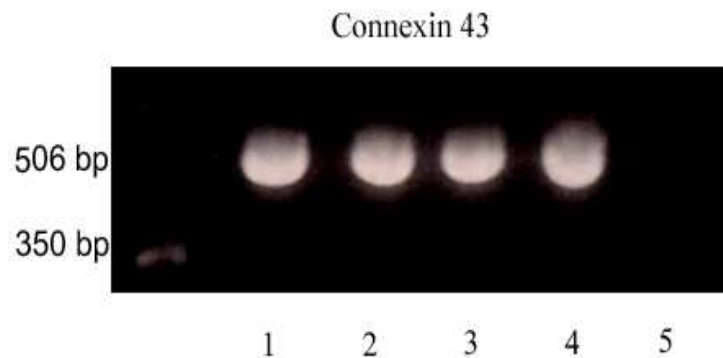


Abbildung 3.13: Connexin 43 mRNA Expression in 4 verschiedenen primären Schilddrüsenzellkulturen (1-4) und Negativkontrolle (5), Primer spezifisches Signal bei 506 Basenpaaren (bp) für Connexin 43

Connexin 43 und die Kontrollzelllinien FRTL5 und HTh74

FRTL5 diente als negative Kontrollgruppe. Da es sich bei FRTL5 um eine Schilddrüsenzelllinie der Ratte handelte, wurde ein rattenspezifischer Primer mit 527 Basenpaaren verwendet. Es stellte sich kein Primer spezifisches Signal dar. Die Expression von Connexin 43 mRNA wurde für FRTL5 ausgeschlossen.

In der humanen anaplastischen Karzinomzelllinie HTh74 konnte in der RT-PCR eine abgeschwächte Genaktivität von Connexin 43 dargestellt werden. HTh74 wies ein im Vergleich zu primären Schilddrüsenzellkulturen ein schwächeres, aber spezifisches Signal bei 506 bp auf.

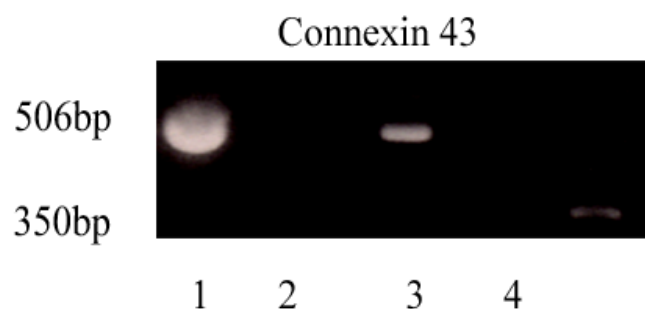


Abbildung 3.14: Connexin 43 mRNA Expression im Vergleich 1: primäre Schilddrüsenkultur, 2: FRTL5, 3: HTh74, 4: Negativprobe

Connexin 43 und adulte Stammzellen

Nach Durchflußzytometrie und FACS von Oct4, GATA-4, HNF4 α und p63 positiven Zellen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. In sämtlichen Proben fand sich keine Connexin 43 Genaktivität. B-aktin als Kontrollgen war jeweils positiv.

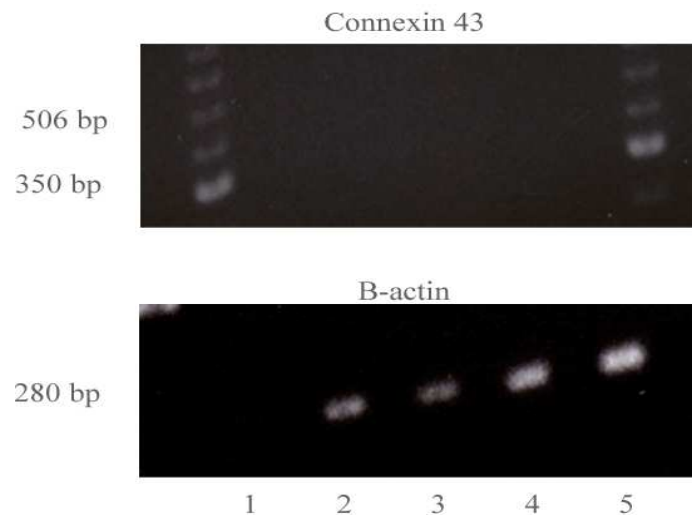


Abbildung 3.15: fehlende Connexin 43 mRNA Expression in allen FACS Zellen, b-aktin als Kontrollgen war in allen Proben positiv (außer der Negativkontrolle)

1: Negativkontrolle; 2: Oct4 positive Zellen; 3: GATA-4 positive Zellen; 4: HNF4 α positive Zellen; 5: p63 positive Zellen

3.1 Expressionsprofile adulter Stammzellen nach selektiver Veränderung der Kulturbedingungen

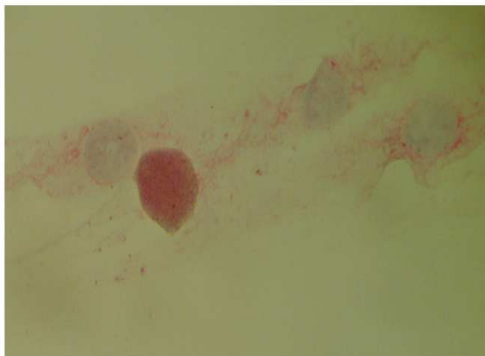
3.4.1 Der Einfluß von Xanthosin auf die Stammzellproliferation

Um die Propagierung adulter Stammzellen in vitro zu erreichen, wurde ein Protokoll zur Beeinflussung der asymmetrischen Stammzellkinetik entworfen (siehe Methoden 2.1.4).

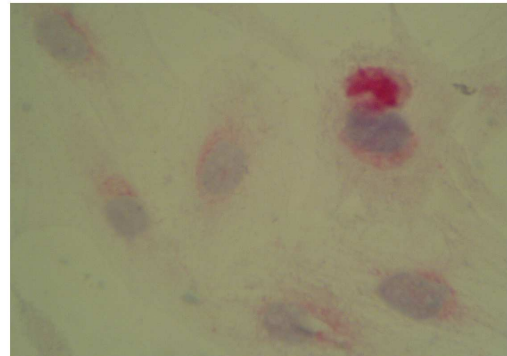
Eine Experimentreihe bestand aus Zellkulturen des gleichen Patienten und der gleichen Passageanzahl. Die Zellkulturen wurden in 5 verschiedene Gruppen eingeteilt, die 8 Wochen unterschiedlichen Kulturbedingungen ausgesetzt waren. In den Gruppen 1 und 4 enthielt das Nährmedium 1 mM Xanthosine. Weitere Variablen waren Zelldichte in den Kulturschalen, Passagehäufigkeit, Nährmediumwechsel und Serumkonzentration. Zur Sicherung der Ergebnisse erfolgte die Wiederholung der Experimentreihe mit Zellkulturen unterschiedlicher Patienten.

Mit Hilfe immunzytochemischer Anfärbungen wurden die einzelnen Gruppen auf die Anzahl der Oct4 und GATA-4 positiven Zellen untersucht. In den Gruppen mit hoher

Xanthosinkonzentration waren deutlich mehr Oct4 positive Zellen zu detektieren. Für die anderen Zellkulturbedingungen konnte kein eindeutiger Einfluß nachgewiesen werden. Die Zahl der GATA-4 positiven Zellen blieb in allen Gruppen unverändert.



A



B

Abbildung 3.16: Immunzytochemie primärer Schilddrüsenzellen für Oct4 (**A**) und GATA-4 (**B**), in beiden Abbildungen ist ein spezifisch gefärbter Zellkern, umgeben von ungefärbten Zellen, zu sehen
400x Vergrößerung

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Oct4	9	2	1	11
GATA-4	2	2	1	0

Tabelle 3.1: Quantitative Analyse der Immunzytochemie, durchschnittliche Anzahl positiv gefärbter Zellen (Oct4, GATA-4) pro Objektträger

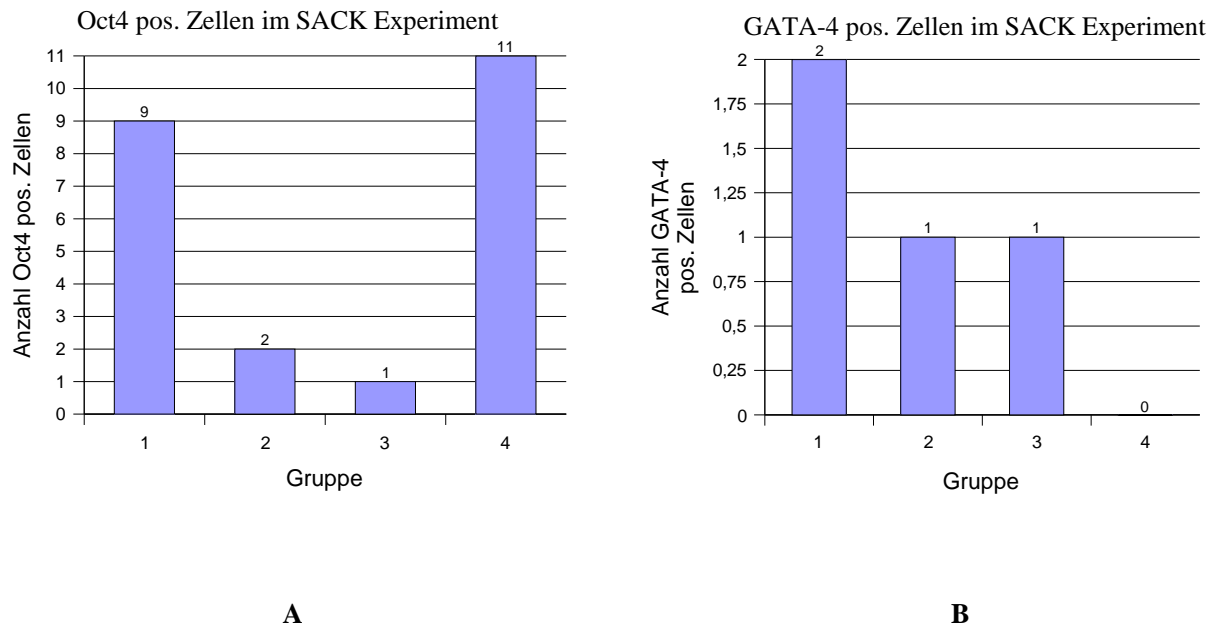


Tabelle 3.2: grafische Darstellung der Anzahl immunzytochemisch positiver Zellen,
A: Oct4 positive Zellen in Gruppe 1-4, **B:** GATA-4 positive Zellen in Gruppe 1-4

3.4.2 Der Einfluß von 17 β -Östradiol auf die Stammzellproliferation

Zellkulturen eines Patienten und gleicher Passageanzahl wurden in 4 Gruppen eingeteilt. Zur Sicherung der Ergebnisse wurde die Experimentreihe mehrfach mit Zellkulturen anderer Patienten wiederholt.

48 Stunden vor Stimulation der Schilddrüsen-zellen mit 10 nmol/l (111) oder 10 μ mol/l (115) 17 β -Östradiol (E_2) wurde das Nährmedium in ein Phenol Red freies Medium gewechselt, versetzt mit 0,5 % fötalem Kälberserum, ohne Wachstumsfaktoren und Hormone. Gruppe 1 wurde mit 10 nmol/l 17 β -Östradiol stimuliert, Gruppe 2 bildete die Kontrolle und enthielt kein Östrogen. Gruppe 3 wurde mit 10 μ mol/l 17 β -Östradiol behandelt, Gruppe 4 war wiederum die dazugehörige Kontrollgruppe. Nach 14 tägiger Stimulation erfolgte die Auswertung durch die Polymerase-Kettenreaktion mit dem Oct4 Primer.

Eine hohe 14 tägige Konzentration von 17 β -Östradiol bewirkte in der Polymerase-Kettenreaktion ein verstärktes Signal für Oct4. Dies bedeutete eine gesteigerte Expression von Oct4 unter Östrogeneinfluß.

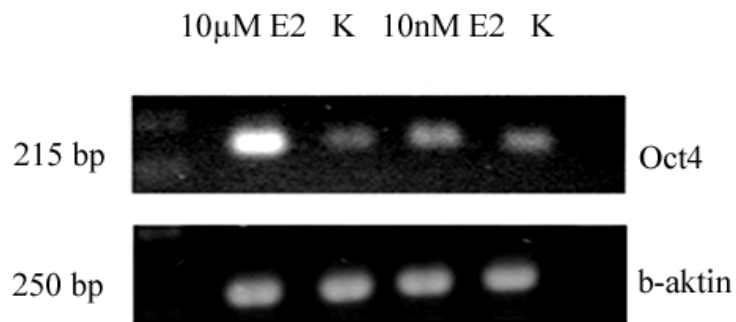


Abbildung 3.17: Oct4 mRNA Expression nach 14 tägiger Stimulation einer Schilddrüsenprimärzellkultur mit 10 µM oder 10 nM 17β-Östradiol, je höher die 17β-Östradiol Konzentration war, desto stärker war das Oct4 Signal, b-aktin diente als Kontrollgen

K: Kontrollgruppe (Zellkulturmedium ohne Östrogenzugabe),

Für die quantitative Auswertung wurde das Image J Programm benutzt. Es erfolgte die densitometrische Analyse und Vergleich der einzelnen Oct4 Signale in der Gelelektrophorese (siehe Anhang).

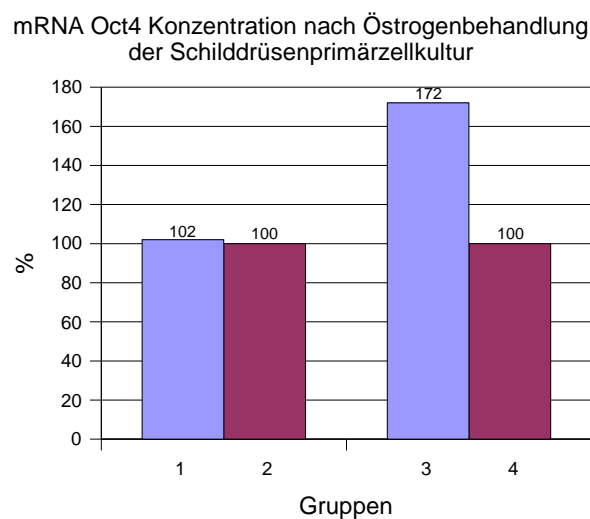


Tabelle 3.3: numerische Darstellung der 4 unterschiedlichen PCR Signalintensitäten,

Gruppe 2 und 4 (Kontrollgruppen):100 %, Gruppe 1 (10 nM E₂): 102 %, Gruppe 4 (10 µM E₂): 172 %

Als weitere Methode wurde nach Abschluß des Stimulationsprotokolls die Durchflußzytometrie zur Detektion von Oct4 positiven Zellen eingesetzt. Mit steigender Östrogenkonzentration im Nährmedium erhöhte sich die Anzahl der Oct4 positiven Zellen.

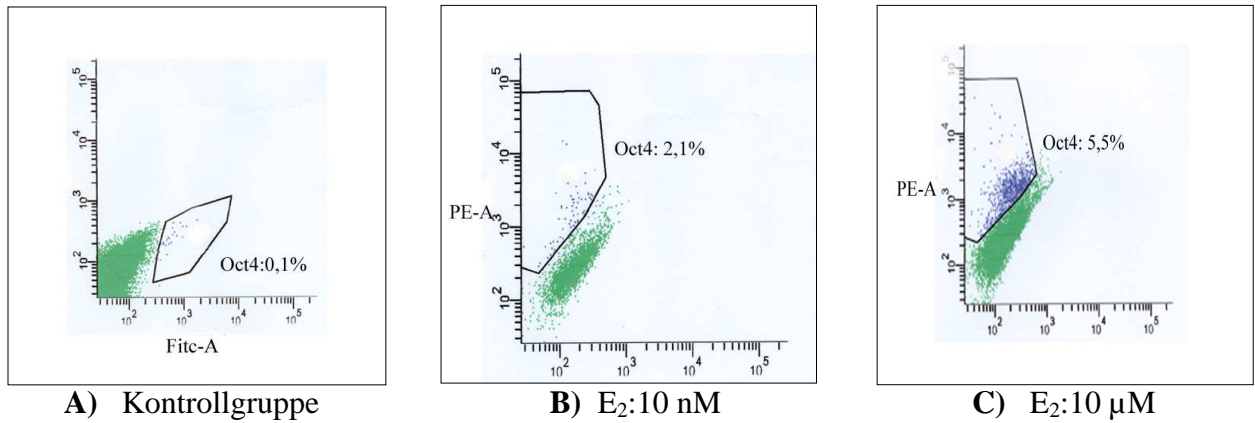


Abbildung 3.18: Grafik A-C nach Durchflußzytometrie, Schilddrüsenzellen werden in Kultur ohne (A), mit 10 nM 17β-Östradiol (B) oder mit 10 µM 17β-Östradiol (C) über 14 Tage inkubiert, A): Oct4/ Fitc positive Zellen (0,1 % der Gesamtzellzahl), B): Oct4/ PE positive Zellen (2,1 %), C): Oct4/ PE positive Zellen (5,5 %)

Konzentration Oct4 positiver Zellen in der Durchflußzytometrie nach Östrogenbehandlung der Schilddrüsenprimärzellkultur

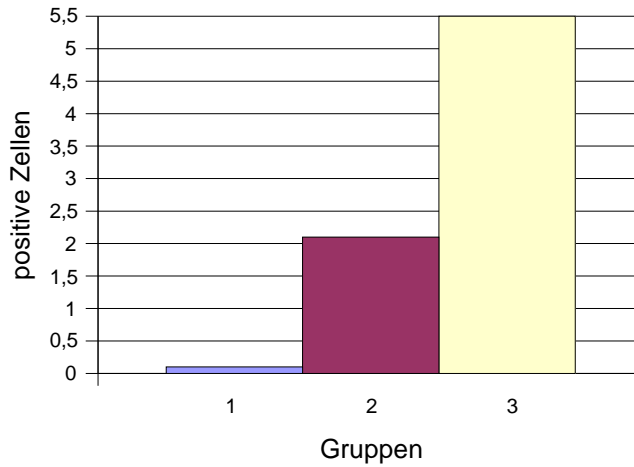


Tabelle 3.4: numerische Darstellung der Durchflußzytometrie, je höher die Konzentration von 17β-Östradiol im Nährmedium war, desto mehr Oct4 positiven Zellen ließen sich detektieren

3.2 Die Isolation der Side Population und die ABCG2 Expression

Durchflußzytometrie und FACS mit dem DNA Farbstoff Hoechst 33342

Die Vorbereitung und Färbung der primären Schilddrüsenzellen und der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie HTh74 mit dem DNA Bindungsfarbstoff Hoechst 33342 erfolgte nach dem Protokoll von Goddell et al (117).

In beiden Gruppen ließ sich eine kleine Subpopulation ungefärbter Zellen detektieren, deren Konzentration maximal 0,1 % der Gesamtzellpopulation betrug. Die Hauptpopulation bestand aus gefärbten Zellen, der sogenannten Non Side Population.

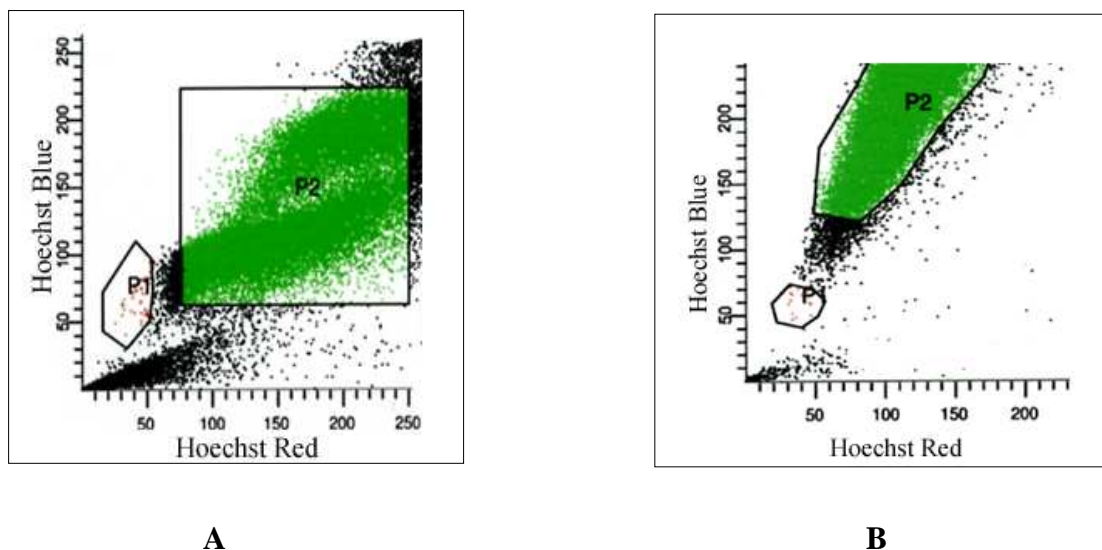


Abbildung 3.19: Grafik nach Hoechst 33342 Färbung und Durchflußzytometrie, Detektion der Side Population (P1) und Non Side Population (P2) in **A**) einer primären Schilddrüsenzellkultur und **B**) der HTh74 Zelllinie

Polymerase-Kettenreaktion der Side Population und Non Side Population

Mit den FACS Zellen der Side Population und Non Side Population wurde nach mRNA Gewinnung eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die verwendeten Primer waren Oct4, als pluripotenter Stammzellmarker, und ABCG2, das in Stammzellen mehr exprimiert wird als in differenzierten Zellen.

Die Side Population wies eine Oct4 Genaktivität, sowie eine verstärkte Expression von ABCG2 mRNA auf. Dagegen konnte in der Non Side Population keine Oct4 Aktivität und eine deutlich schwächere ABCG2 mRNA Expression beschrieben werden.

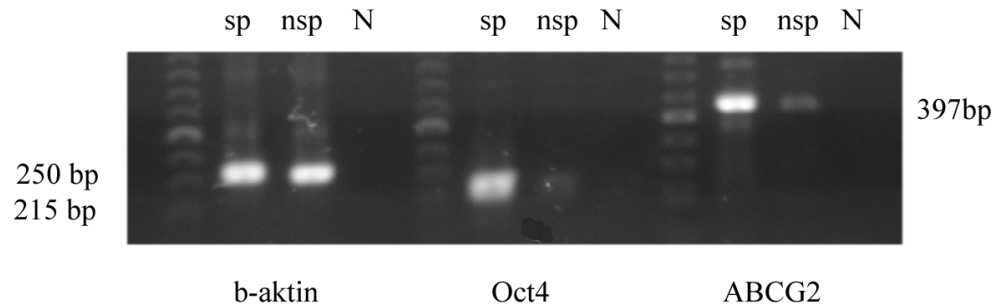


Abbildung 3.20: PCR Darstellung nach FACS der Side Population und Non Side Population einer Schilddrüsenprimärzellkultur, die Side Population exprimierte Oct4 mRNA und wies eine stärkere ABCG2 mRNA Expression auf, in der Non Side Population fand sich keine Oct4 mRNA Expression, sowie eine schwächere ABCG2 mRNA Expression

sp: Side Population, nsp: Non Side Population, N: Negativkontrolle

3.6 Morphologie der FACS Zellen

Zur Überprüfung der Zellmorphologie erfolgte die Zentrifugation (Cyto Spin Zentrifuge) der FACS Zellen auf Objektträger. Die Zellen wurden mit 100% Methanol fixiert und mit HE gefärbt. Die Zellen stellten sich in ihrer Morphologie intakt und homogen dar.

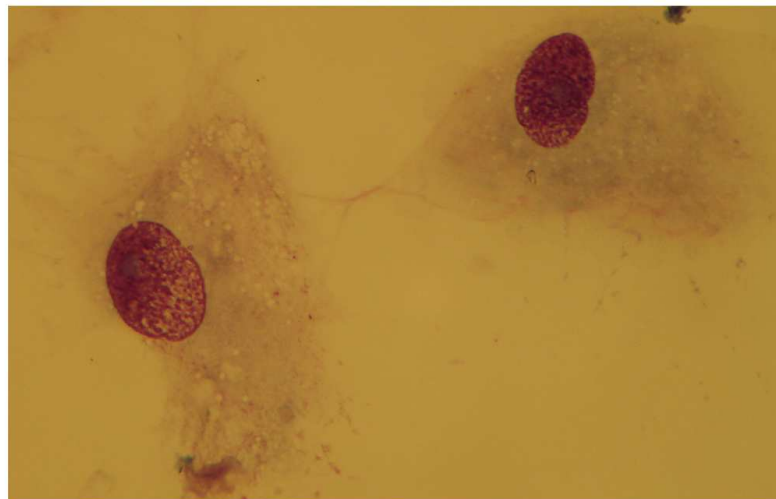


Abbildung 3.21: HE Färbung fixierter FACS Zellen, Darstellung der Morphologie der Zellen