



## Danksagung

Mein Dank geht als erstes an Dr. Beate Volkmer und Dr. Rüdiger Greinert, die mir ermöglicht haben, Einblick in die spannenden Forschungsfelder des Labors am Dermatologischen Zentrum Buxtehude im Labor für Molekulare Zellbiologie zu erhalten und meine Bachelorarbeit dort verfassen zu dürfen.

Besonders bei Frau Dr. Beate Volkmer möchte ich mich für ihre exzellente Beratung bei wissenschaftlichen Fragestellungen und bei der Auswertung meiner Ergebnisse bedanken, womit sie mir zu einer durchdachten Fragestellung verhalf. Außerdem danke ich ihr ganz herzlich für die Motivation und das Verständnis, den sie mir entgegenbrachte. Seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften danke ich Herrn Dr. Claus-Dieter Wacker für die externe Betreuung.

Ganz besonderen Dank möchte ich an Frau Dr. Sarah Degenhardt aussprechen, die mir während der gesamten Bearbeitungszeit mit wertvollen Anregungen und Denkanstößen zur Seite stand und bei der Planung und Durchführung der Versuche unentbehrlich war. Mit ihrer großartigen Unterstützung bei der Korrektur der schriftlichen Arbeit hat sie viel zu meiner fachlichen Entwicklung beigetragen und ich danke ihr ganz herzlich für ihre Zeit und ihr großes Engagement. Ohne sie wäre die

Bachelorarbeit sicherlich nicht das geworden, was sie nun ist.

Bei Frau Dipl.-Ing. Alexandra Faust möchte ich mich für die Einführung in das Thema und für die Einweisung in die notwendigen Methoden bedanken. Ebenfalls danke ich Herrn Dipl.-Ing. Stefan Henning und Herrn Dr. I-Peng Chen für ihre fachliche Beratung und ihre Lösungsansätze in Problemstellungen.

Alle Mitarbeiter des Labors für Molekulare Zellbiologie Frau Sylke Haskiris, Frau Regina Börger-Hoppe, Frau Stefanie Balk, Frau Maren Brunsen und Frau Rebecca Keck, danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor Alltag, für ihre ständige Hilfsbereitschaft alle Fragen zu beantworten. Besonders bei Frau Börger-Hoppe möchte ich mich für ihre Geduld mit mir und die motivierenden Gespräche bedanken.

In der Summe hat jeder von Ihnen zur Entstehung und zum Erfolg meiner Bachelorarbeit beigetragen, wofür ich mich recht herzlich bedanken möchte.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	IV
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	VII
<b>Zielsetzung</b> .....	VIII
<b>1. Einleitung</b> .....	- 1 -
1.1.    Aufbau der Haut .....	- 1 -
1.2.    Hautkrebs .....	- 3 -
1.3.    Stammzellen .....	- 4 -
1.3.1.    Embryonale Stammzellen .....	- 5 -
1.3.2.    Adulte Stammzellen .....	- 6 -
1.3.2.1.    Dermale Stammzellen .....	- 6 -
1.3.2.2.    Identifikation dermalen Stammzellen .....	- 8 -
1.3.2.3.    Isolation dermalen Stammzellen .....	- 10 -
<b>2. Material</b> .....	- 12 -
2.1.    Geräte und Gebrauchswaren .....	- 12 -
2.2.    Chemikalien und Reagenzien .....	- 13 -
2.3.    Nährmedien .....	- 15 -
2.4.    Puffer und Gebrauchslösungen .....	- 16 -
2.5.    Antikörper .....	- 21 -
2.6.    Reaktionskits .....	- 22 -
2.7.    Primer .....	- 22 -
2.8.    Humane Hautproben .....	- 23 -
2.9.    Fibroblasten .....	- 23 -
2.10.    Melanomzellen .....	- 24 -
2.11.    NCCIT-Zellen .....	- 24 -
2.12.    Software .....	- 25 -
<b>3. Methoden</b> .....	- 26 -
3.1.    Zellkultur .....	- 26 -
3.1.1.    Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	- 26 -
3.1.2.    Kollagenisieren von Culture Slides .....	- 27 -
3.1.3.    Anzucht humaner, primärer Fibroblasten .....	- 27 -
3.1.4.    Kultivierung humaner, primärer Fibroblasten .....	- 28 -
3.1.5.    Isolierung humaner, dermalen Zellen nach Li et al. ....	- 29 -
3.1.6.    Isolierung humaner, dermalen Zellen .....	- 29 -
3.1.7.    Kultivierung humaner, dermalen Zellen .....	- 30 -
3.1.8.    Zellzahlbestimmung durch Trypanblau-Färbung .....	- 31 -

3.2.	Zytozentrifugation .....	- 31 -
3.3.	Immunzytochemische Färbung .....	- 31 -
3.3.1.	Einfachfärbungen der Zytozentrifugationspräparate.....	- 33 -
3.3.2.	Doppelfärbungen der Zytozentrifugationspräparate .....	- 34 -
3.4.	Fluoreszenzmikroskopie .....	- 34 -
3.5.	Molekularbiologische Methoden.....	- 35 -
3.5.1.	RNA-Isolierung und Aufbereitung .....	- 35 -
3.5.2.	RNA-Konzentrationsbestimmung mit Quibit.....	- 37 -
3.5.3.	Reverse Transkription.....	- 37 -
3.5.4.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	- 38 -
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	- 42 -
4.1.	Etablierung der Isolierung und Kultivierung humaner dermaler Zellen aus adulter Haut .....	- 42 -
4.1.1.	Kultivierungsverlauf primärer, dermaler Zellen in Stempro-Medium.....	- 42 -
4.1.2.	Zelltypen-Charakterisierung der dermalen Zellen durch Immunzytochemie.....	- 45 -
4.1.3.	Genexpressionsanalyse der dermalen Zellen in Stempro-Medium .....	- 48 -
4.2.	Kultivierung und Charakterisierung primärer, humaner Fibroblasten .....	- 51 -
4.2.1.	Kultivierungsverlauf primärer, humaner Fibroblasten.....	- 51 -
4.2.2.	Zelltypen-Charakterisierung der primären, humanen Fibroblasten .....	- 53 -
4.2.3.	Genexpressionsanalyse primärer, humaner Fibroblasten.....	- 58 -
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	- 61 -
5.1.	Anreicherung dermaler Stammzellen aus humanen, primären Hautproben..	- 61 -
5.2.	Charakterisierung der in Stempro-Medium aus Fibroblasten gebildeten Sphären .....	- 62 -
	<b>Zusammenfassung</b> .....	- 65 -
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	- 66 -
	<b>Anhang</b> .....	- 70 -
	<b>Erklärung</b> .....	- 73 -

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
$\beta$ -actin	Beta actin
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2)
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid Dihydrat
CS	Culture Slides (Zellkulturobjektträger)
Ct	Cycle threshold (Zyklen Schwellenwert)
d	days
DABCO	Triethylendiamin, 1-4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DSC	dermal stem cells (dermale Stammzellen)
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälber Serum
g	Gravitationskonstante 9,81 m/s <sup>2</sup>
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure
HESCM4	human embryonic stem cell conditioned medium 4 (menschliches, embryonales Stammzellmedium 4)
HKG	House Keeping Gene (Haushaltsgen)
HMB45	human melanoma black 45
HPRT-1	Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1
k.A.	keine Angabe
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Na-Acetat	Natrium-Acetat-Puffer
NaCl	Natriumchlorid

NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
n.d.	no data
n.e.	nicht eindeutig
NGFRp75	nerve growth factor receptor p75 (p75 Neurotrophin Rezeptor)
Oct-4	octamer binding transcription factor 4 (Oktamer bindender Transkriptionsfaktor 4)
p.a.	pro analysi (analysenrein)
PenStrep	Penicillin Streptomycin
PJ	Propidiumjodid
PBS <sup>-/-</sup>	Phosphate Buffered Solution (Phosphat-gepufferte Lösung) ohne Ca und Mg
RNase	Ribonuklease A
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (Quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt vom Roswell Park Memorial Institute
SKP's	skin-derived precursors (hautabstammende Vorläuferzellen)
Stempro	Stempro hESC SFM
StPr	Stempro hESC SF-Medium
TBP	TATA box binding protein (TATA-Box bindendes Protein)
TBS	Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
Temp.	Temperatur
Tri-Na-Citrat	Trinatriumcitrat
Tris	Tris-aminomethan
Triton-X	Octoxinol 9
Trp1	tyrosinase related protein 1 (Tyrosinase-verwandtes Protein 1)
T25-Kulturflasche	25 cm <sup>2</sup> große Kulturflaschen vom Hersteller Greiner bio-one
UV	Ultraviolett

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut.....	- 1 -
Abbildung 1-2: Die verschiedenen Differenzierungspotentiale von Stammzellen.....	- 5 -
Abbildung 4-1: Kultivierungsverlauf der Zellkultur 63/14.....	- 44 -
Abbildung 4-2: Kultivierungsverlauf der Zellkultur 63/14.....	- 45 -
Abbildung 4-3: Immunzytochemische Färbung von Vimentin und Nestin in der Zellkultur 63/14 nach 12 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium.....	- 47 -
Abbildung 4-4: Immunzytochemische Färbung von CD90 und NGFRp75 in der Zellkultur 65/14 nach 11 Tagen der Kultivierung in Stempro-Medium.....	- 48 -
Abbildung 4-5: NGFRp75-Transkription in der Zellkultur 54/14 .....	- 49 -
Abbildung 4-6: Nestin-Transkription in der Zellkultur 54/14 .....	- 50 -
Abbildung 4-7: Kultivierungsdauer der Fibroblastenzellkultur 7/11 .....	- 52 -
Abbildung 4-8: Kultivierungsverlauf der Fibroblastenzellkultur 7/11.....	- 53 -
Abbildung 4-9: Immunzytochemische Färbung von Vimentin in der Fibroblastenzellkultur 7/11 nach 10 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 7 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium .....	- 55 -
Abbildung 4-10: Immunzytochemische Färbung von Nestin in der Fibroblastenzellkultur 7/11 nach 10 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 7 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium .....	- 56 -
Abbildung 4-11: Immunzytochemische Färbung von Vimentin in der Fibroblastenzellkultur 20/02+21/11 nach 15 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 8 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium .....	- 57 -
Abbildung 4-12: Immunzytochemische Färbung von Nestin in der Fibroblastenzellkultur 20/02+21/11 nach 15 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 8 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium .....	- 58 -
Abbildung 4-13: NGFRp75-Transkription in den Fibroblastenzellkulturen .....	- 59 -
Abbildung 4-14: Nestin-Transkription in den Fibroblastenzellkulturen .....	- 60 -

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2-1: Patientendaten der Hautproben und dermalen Zellen .....	- 23 -
Tabelle 2-2: Codierung der verwendeten Fibroblasten.....	- 24 -
Tabelle 2-3: Codierung der verwendeten Melanomzellen .....	- 24 -
Tabelle 2-4: Codierung der verwendeten NCCIT-Zellen.....	- 24 -
Tabelle 4-1: Clusterbildung der primären, dermalen Zellen aus humanen Hautproben	- 43 -
Tabelle 4-2: Charakterisierung der primären, dermalen Zellen aus humanen Hautprobe.... .....	- 46 -
Tabelle 4-3: Codierung der primären Fibroblasten .....	- 51 -
Tabelle 4-4: Charakterisierung primärer, humaner Fibroblasten in RPMI-Medium .....	- 54 -
Tabelle 4-5: Charakterisierung primärer, humaner Fibroblasten in Stempro-Medium..	- 54 -



## Zielsetzung

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und zeichnet sich durch seine Komplexität und hohe Regenerationsfähigkeit aus. Sie besteht aus Epidermis, Dermis und Subkutis und ist reich an multipotenten Zellpopulationen aus verschiedenen Hautregionen. Da die Haut eine gut zugängliche Quelle von Stammzellen ist, wurden bereits epidermale, dermale und folliculäre Stammzellen isoliert. Stammzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit der Selbsterneuerung sowie die Fähigkeit der Differenzierung aus. Somit spielen sie eine entscheidende Rolle in der Gewebe-Homöostase und Regeneration. Welche Rolle sie bei malignen Transformationen von Hautzellen spielen, muss noch weitgehend erforscht werden. Daher ist es von großer Wichtigkeit, die Stammzellen der Haut zu isolieren und anzureichern, um sie letztendlich erforschen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, im Rahmen eines Bachelorprojektes zu untersuchen, ob es möglich ist, dermale Stammzellen aus adulten humanen Hautproben durch Kultivierung in einem spezifischen Stammzellmedium anzureichern. Als Grundlage dient das Protokoll von Li et al. (2010) aus dem Labor von Meenhard Herlyn, The Wistar Institute Melanoma Research Center, Philadelphia. Unter diesen stammzellspezifischen Kulturbedingungen bilden Stammzellen sogenannte dreidimensionale Sphären, deren Stammzellcharakter durch spezifische Marker (NGFRp75, Nestin, Oct4-A) nachgewiesen werden soll. Die Untersuchungen sollen unter Verwendung der Immunfärbetechnik und unter Einsatz der quantitativen RT-PCR durchgeführt werden.

In einem weiteren Versuchsansatz sollen die gleichen Methoden eingesetzt werden, um das Potenzial von Fibroblastenzellkulturen, in Stammzellmedium charakteristische Sphären auszubilden, zu untersuchen. Hierzu sollen Fibroblasten unter normalen Kulturbedingungen mit solchen verglichen werden, die in Stammzellmedium kultiviert werden.

Diese Bachelorarbeit ist Bestandteil eines größeren Forschungsprojektes zur Charakterisierung dermaler Stammzellen im Forschungslabor für molekulare Zellbiologie der Elbekliniken Stade-Buxtehude.

## 1. Einleitung

### 1.1. Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen mit einer Fläche von ca. 2 m<sup>2</sup>. Sie ist Teil der Sinneswahrnehmung, und ihre Aufgaben umfassen im Wesentlichen den Schutz vor mechanischen, thermischen und chemisch-toxischen Schäden aus der äußeren Umwelt. Sie bildet eine Barriere gegen Krankheitserreger, schützt vor Wasserverlust, reguliert die Körpertemperatur, absorbiert Strahlung und bildet Vitamin D unter dem Einfluss des solaren UV-Spektrums. Die Haut (Kutis) wird in Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut) gegliedert, die jeweils auch in mehrere Schichten unterteilt sind. Eine dritte Schicht, die Subkutis (Unterhaut), ist strukturell und funktionell eng mit der darüber liegenden Dermis verknüpft. Zugehörig zu der Haut sind auch Nerven, Sinneskörperchen, Blut- und Lymphgefäße, die in den einzelnen Schichten verteilt vorkommen, sowie Haare, Nägel und Drüsen, die als Anhangsgebilde bezeichnet werden (Welsch et al., 2010). Abbildung 1-1 stellt schematisch den Aufbau der menschlichen Haut mit den unterschiedlichen Hautschichten dar.

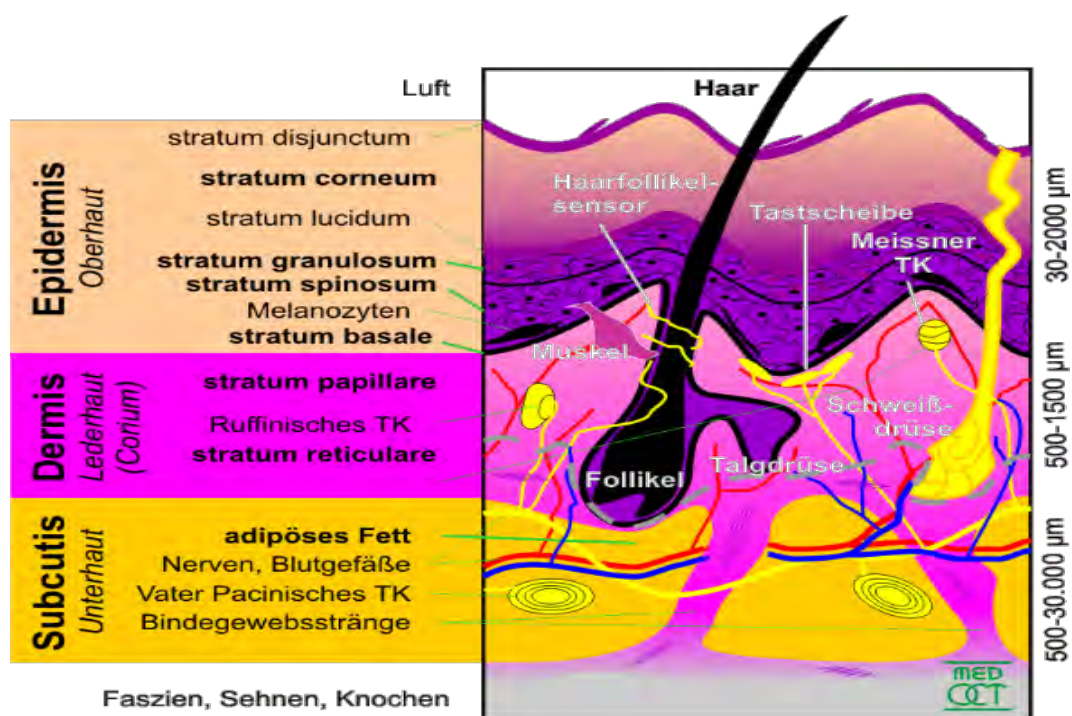


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut (Medizinische Universität Wien, Zentrum für Medizinische Physik und Biomedizinische Technik, 2005)

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel bestehend aus lebenden und toten Zellen. Sie bildet die direkte Oberfläche des Körpers. Mehr als 90 %

## Einleitung

---

der Epidermis werden aus Keratinozyten gebildet. Der restliche Anteil besteht aus Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und T-Lymphozyten. Die Epidermis wird von innen nach außen gegliedert in Stratum basale (Basalzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht) und Stratum corneum (Hornschicht). Der Unterschied dieser Schichten liegt im Differenzierungsgrad der Keratinozyten. Diese werden innerhalb von vier Wochen erneuert, wobei in den unteren Schichten neue Keratinozyten entstehen, die langsam nach oben wandern, sich in leblose Hornzellen umwandeln und unmerklich abgeschilfert werden (Welsch et al., 2010).

Die Dermis, deren Hauptbestandteil kollagene Fasern sind, ist für die mechanische Festigkeit der Haut, für die Bereitstellung von Abwehrzellen und für die Versorgung der Epidermis verantwortlich. Die Dermis wird in die Unterschichten Stratum papillare (Papillenschicht) und Stratum reticulare (Netzschicht) gegliedert (Welsch et al., 2010).

Die obere Schicht der Dermis, das Stratum papillare, besteht aus lockerem Bindegewebe und ist mit der Epidermis verzahnt. Es besteht aus dünnen kollagenen Fasern (Typ III und Typ I Kollagen) und elastischen Fasern. Sie ist reich an Kapillaren, Venen und Lymphgefäßen und hier befinden sich die meisten Zellen. Die darunter liegende Schicht, das Stratum reticulare, ist aus straffem und geflechtartigem Bindegewebe mit dicken Kollagenfasern (Typ I) und elastischen Fasern aufgebaut. Außerdem sind hier Haare, Haarfollikel, Talg-, Duft- und Schweißdrüsen lokalisiert (Lüllmann-Rauch 2009; Sterry et al., 2011).

Der Hauptzelltyp der Dermis sind die Fibroblasten, die eine spindelförmige Morphologie mit langen Fortsätzen haben und ein Netz bilden. Sie produzieren die Grundbestandteile der Bindegewebsfasern und die amorphe Interzellulärsubstanz, die zusammen als extrazelluläre Matrix bezeichnet wird (Moll et al., 2010). Die Bindegewebsfasern umfassen die kollagenen Fasern und die elastischen Fasern, die im Wesentlichen die Straffheit der Dermis gewährleisten (Sterry et al., 2011). Die amorphe Interzellulärsubstanz besteht aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und interstitieller Flüssigkeit, die den Zwischenraum der Bindegewebszellen füllt und stützt. Die Bindegewebszellen, die sich aus Mesenchymzellen ableiten, werden in ortsständige (fixe) Bindegewebszellen und bewegliche (freie) Bindegewebszellen unterteilt. Die Fibroblasten sowie die Fibrozyten gehören zu den fixen Bindegewebszellen. Der Fibrozyt ist die inaktive Form des Fibroblasten, der im Bindegewebe ruht und bei Bedarf synthetisch aktiv wird (Moll et al., 2010).

Die freien Bindegewebszellen sind nicht an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt und ihr Charakteristikum besteht in ihrer Beweglichkeit. Zu dieser Gruppe gehören die weißen Blutzellen, Plasmazellen, Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und

Mastzellen. Diese Zellen gehören zur immunologischen Abwehr. In der Dermis sind Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen ebenfalls zur immunologischen Abwehr der Kutis vertreten (Sterry et al., 2011).

Die Subkutis besteht aus Fettgewebe, das durch lockeres Bindegewebe unterteilt ist. Das Fett dient als Druckpolster und Wärmeisolator, wohingegen sich in dem dazwischen liegenden Bindegewebe Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven zur Versorgung der Dermis und Epidermis befinden (Welsch et al., 2010).

### 1.2. Hautkrebs

Unter allen Organen des Körpers verzeichnet die Haut, aufgrund ihrer Größe und der starken Exposition gegenüber Kanzerogenen, die häufigste Neuerkrankungsrate an Tumoren. Hinzu kommt in der Gesellschaft der zunehmende Wunsch nach sonnengebräunter Haut, womit ein Anstieg an malignen Neubildungen der Haut in den vergangenen Jahren zu beobachten war (Leischner, 2010).

Die Ausgangspunkte einer Tumorentwicklung sind Veränderungen der chromosomalen DNA. Faktoren, die eine Tumorentstehung begünstigen, können chemische Substanzen, genetische Disposition, chronische Infektionen, ungesunde Ernährung und energiereiche Strahlungen sein. Der bedeutsamste Risikofaktor für die Tumorentstehung der Haut ist die ultraviolette (UV) -Strahlung als Bestandteil des solaren Strahlenspektrums oder aus künstlichen Strahlenquellen wie Solarien. Die Wirkung der UV-Strahlung liegt in Abhängigkeit zu der UV-Empfindlichkeit der Haut. Beispielsweise sind hellhäutige Bevölkerungsgruppen europäischen Ursprungs weitaus mehr gefährdet, als afrikanische oder asiatische Bevölkerungsgruppen (Leischner, 2010).

Die bedeutendsten Hautkrebsarten sind das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom, die zusammen als heller Hautkrebs bezeichnet werden sowie das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs). Das Basalzellkarzinom der Haut ist der häufigste maligne Tumor der Haut und tritt meist im Gesicht und an anderen sonnenexponierten Körperteilen wie Armen, Beinen oder Kopf auf. Die Ursache der Tumorentstehung liegt in einer zeitweilig stark erhöhten (intermittierenden) UV-Exposition, aber auch die kumulative Lebenszeitdosis stellt einen Risikofaktor dar. Basalzellkarzinome metastasieren sehr selten und nur dann, wenn sie unbehandelt bleiben.

Das Plattenepithelkarzinom der Haut manifestiert sich ebenfalls bevorzugt an sonnenexponierten Teilen des Körpers. Die Hauptursache liegt in einer steigenden, lebenslang erworbenen (kumulativen) UV-Dosis, die zur Entstehung von Tumorzellen in der Epidermis führt (Leischner, 2010; Breitbart et al., 2004).

Das maligne Melanom ist der dritthäufigste Hauttumor nach Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom, ist aber aufgrund seiner frühzeitigen Metastasierung ein besonders bösartiger Tumor. Es entsteht aus Melanozyten der Haut. Dabei ist es nicht die kumulative UV-Dosis, die das Erkrankungsrisiko erhöht, sondern die intermittierende UV-Exposition und die Anzahl schwerer Sonnenbrände der Haut. Außerdem sind eine hohe Anzahl an Nävi und die familiäre Prädisposition als Risikofaktoren zu nennen (Leischner, 2010; Rassner, 2007). Die Melanom-Entstehung wird in einer graduellen Transformation der Melanozyten in der Basalzellschicht der Epidermis begründet. Welche Zielzelle genau die chromosomalen Veränderungen der DNA erworben hat und die Transformation zum Melanom verursacht, ist noch weitgehend ungeklärt. Die traditionelle Hypothese besagt, dass Melanozyten der Haut stufenweise Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen akkumulieren, die diese zum unkontrollierten Wachstum und die Fähigkeit zum Metastasieren veranlassen (Hoerter et al., 2012). Eine alternative Hypothese beschreibt die Entstehung des Melanoms in dermalen Stammzellen (vgl. Kapitel 1.3.2.1).

### 1.3. Stammzellen

Stammzellen sind nicht spezialisierte und unausgereifte Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch mitotische Kernteilung haben. Unter der Bezeichnung Selbsterneuerung von Stammzellen versteht man die Fähigkeit, zahlreiche Zellteilungen zu durchleben, ohne in einen differenzierten Zustand zu fallen (Kumar et al., 2010). Die Selbsterneuerung geschieht entweder durch eine symmetrische Teilung, bei der sich die Stammzelle in zwei weitere identische Stammzellen teilt oder durch die sogenannte asymmetrische Teilung, wobei eine Stammzelle und eine transient amplifizierende Zelle entsteht. Die transient amplifizierende Zelle teilt sich häufig und differenziert dabei aus (Sellheyer et al., 2010; Morrison et al., 1997). Stammzellen werden nach ihrem Differenzierungspotential unterteilt (Abb. 1-2).

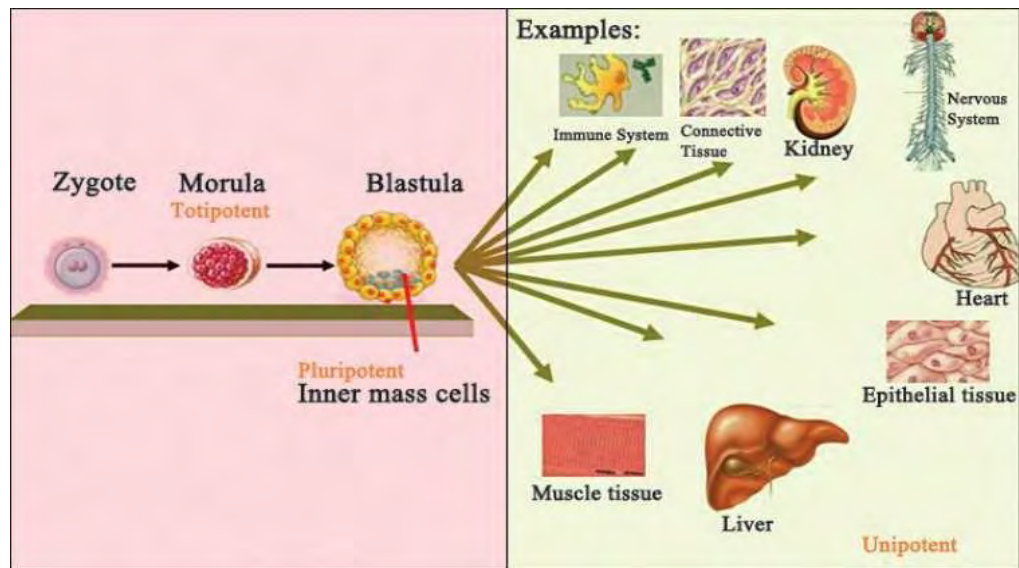


Abbildung 1-2: Die verschiedenen Differenzierungspotentiale von Stammzellen (Kumar et al., 2010).

### 1.3.1. Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden in totipotente und pluripotente Stammzellen unterteilt. Unter Totipotenz versteht man die Fähigkeit einer einzelnen Zelle, einen vollständigen Organismus hervorzubringen oder die Fähigkeit einer Stammzelle, alle Zelltypen hervorzubringen, einschließlich Keimzellen und Zellen des Trophoblasten bzw. der Plazenta. Die totipotenten Stammzellen kommen in der Embryogenese im Morulastadium vor. Aus ihnen entwickeln sich der Embryo und der Trophoblast als extraembryonaler Anteil und Vorläufer der Plazenta.

Die Pluripotenz ist die Fähigkeit von Stammzellen, Zellen verschiedenster Art hervorzubringen, die jedem der drei Keimblätter angehören können. Die pluripotenten Stammzellen kommen während der Embryogenese in der inneren Zellmasse der Blastozyste (Embryoblast) vor. Sie haben bereits die Fähigkeit zur Differenzierung in den Trophoblasten verloren (Sellheyer et al., 2010; Müller et al., 2012). In diesem Zustand können embryonale Stammzellen aus dem Embryoblasten gewonnen werden (Vazin and Freed, 2010).

### 1.3.2. Adulte Stammzellen

Im adulten Organismus kommen nur multipotente und unipotente Stammzellen vor. In erster Linie ermöglichen sie dem Organismus eine lebenslange Regeneration seiner Zellgruppen und seines Gewebes.

Die Multipotenz beschreibt die Fähigkeit einer Stammzelle, Zellen hervorzubringen, die in mehrere Zelltypen eines Keimblattes differenzieren können (Müller et al., 2012). Die Unipotenten Stammzellen können lediglich nur zu einem Zelltyp differenzieren (Sellheyer et al., 2010).

Da die Haut ein großes, komplexes und hoch regeneratives Organ ist, enthält sie eine Reihe von unterschiedlichen Vorläufer- und Stammzellpopulationen. Dazu zählen die follikulären und interfollikulären epidermalen Stammzellen, diverse Haarfollikel-Stammzellen, Endothel-Stammzellen, blutbildende Stammzellen und die dermalen Stammzellen (Hunt et al., 2009).

#### 1.3.2.1. Dermale Stammzellen

Die Bezeichnung dermale Stammzellen umfasst Stammzellen aus verschiedenen Mikroumgebungen (Nischen) der Dermis mit unterschiedlichem Differenzierungspotential. Zum einen wurden aus der menschlichen adulten Dermis die sogenannten SKP's (*skin-derived precursors*) isoliert. Dabei handelt es sich um multipotente Vorläuferzellen, die in der Lage sind, in neuronale und mesodermale Zellen wie Neuronen, Gliazellen, glatte Muskelzellen, Schwann'sche Zellen und Fettzellen zu differenzieren. In Kultur formieren sich die SKP's unter Zugabe von bFGF und EGF zu dreidimensionalen Sphären und können über einen langen Zeitraum kultiviert werden. Mit der Methode der immunzytochemischen Färbung kann die Expression der Proteine Nestin, Fibronectin und Vimentin nachgewiesen werden. Außerdem exprimieren die SKP's in einem geringen Maße einen Marker für embryonale Stammzellen aus der Neuralleiste, den Rezeptor NGFRp75 (Toma et al., 2005). Das Antigenprofil der SKP's unterscheidet sich von dem der mesenchymalen, melanozytären, epidermalen und blutzellbildenden Stammzellpopulationen. Das Expressionsmuster deckt sich lediglich mit dem der Stammzellen aus der Neuralleiste, die aber nicht das Protein Fibronectin exprimieren (Hunt et al., 2009). Melanoblasten- und Melanozytenmarker, wie Tyrosinase oder *trp1*, können in den SKP's nicht nachgewiesen werden. In der Dermis von Nagetieren wurde die Nische der SKP's in den dermalen Papillen des Haarfollikels identifiziert. Die adulte humane Vorhaut, aus der SKP's isoliert wurden, enthält keine Haarfollikel. Das weist darauf hin, dass die Nische der SKP's in der menschlichen Haut eine andere sein muss (Toma et al., 2005).

## Einleitung

---

Eine weitere Stammzellpopulation, bezeichnet als DSC's (*dermal stem cells*), wurde aus der Vorhaut von Neugeborenen isoliert (Li et al., 2010). DSC's haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind in der Lage sich zu Melanozyten, Neuronen, glatte Muskelzellen, Fettzellen, Schwann'schen Zellen und Knorpelzellen zu entwickeln (Li et al., 2013). Im menschlichen, embryonalen Stammzellmedium (HESCM4) bilden die DSC's nach 10 - 14 Kultivierungstagen dreidimensionale Sphären. Im Vergleich zu den SKP's zeigen die DSC's eine viel höhere Expression des NGFRp75-Markers. Außerdem konnte die Expression von Nestin und vom embryonalen Stammzellmarker Oct-4 nachgewiesen werden. Die Expression der Melanozyten-Marker HMB45 und trp1 waren nicht vorhanden. Dies weist darauf hin, dass sich keine reifen Melanozyten in den Sphären befanden (Li et al., 2010). Durch ihr Antigenprofil und Differenzierungspotential weisen die DSC's Eigenschaften der Stammzellen aus der Neuralleiste auf.

In einem dreidimensionalen Modell und in einem der menschlichen Haut äquivalenten Rekonstrukt, wurden dermale Stammzellen mit dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten kultiviert. Dabei sind die DSC's in die Basalzellschicht der Epidermis migriert und haben sich zu Melanozyten differenziert. Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, dass ein extrafollikulärer Speicher der epidermalen Melanozyten in der Dermis angesiedelt sein könnte, in dem die Stammzellen weniger physiologischem und chemischem Stress ausgesetzt sind als in der Epidermis (Li et al., 2011). Es wurden bereits Melanozyten-Stammzellen in den Haarfollikeln der Haut gefunden, die die Haare und die umliegende Haut mit Melanozyten versorgen. Diese verlieren mit dem Alter ihr Selbsterneuerungspotential und führen zum Ergrauen der Haare (Yu et al., 2006). Hingegen verlieren Haut-Melanozyten im Laufe des Lebens nicht ihr Proliferationspotential und lassen die Existenz eines Melanozyten-Stammzell-Reservoirs auch in kahler Haut ohne Haarfollikel vermuten (Li et al., 2010).

Die Untersuchungen von Li et al. (2010) weisen darauf hin, dass möglicherweise Melanozyten-Vorläuferzellen oder multipotente dermale Stammzellen existieren, die in der Lage sind, zu Melanozyten zu differenzieren. Wenn der Mechanismus der Selbst-Erneuerung, Ausbreitung und Differenzierung der Melanozyten-Stammzellen geklärt ist, können auch bösartige Veränderungen zum Melanom besser verstanden werden. Denn möglicherweise veranlassen UV-induzierte Mutationen Änderungen im normalen Prozess der Selbst-Erneuerung, Ausbreitung, Differenzierung und das Veranlassen des Stammzellkompartiment der Melanozyten-Stammzellen oder der multipotenten dermalen Stammzellen (Hoerter et al., 2012).



### 1.3.2.2. Identifikation dermalen Stammzellen

Zur Identifikation dermalen Stammzellen werden sich ihre Morphologie während der Kultivierung und vor allem ihr Expressionsprofil zunutze gemacht. Die Eigenschaften, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, werden im Folgenden kurz erläutert.

In der Arbeit von Li et al. (2010) wurden dermale Stammzellen in nicht konditioniertem HESCM4-Medium kultiviert. Das Stammzellmedium HESCM4 erhält menschliche, embryonale Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand.

Im HESCM4-Medium begannen einige dermale Zellen nach 5 - 7 Tagen kugelförmige Zellkolonien mit einem unregelmäßigen Rand zu bilden, die als Zellcluster bezeichnet werden. Nach 10 - 14 Tagen waren charakteristische dreidimensionale Sphären zu beobachten, die zum größten Teil adhärent wurden. Sphären sind kugelförmige Zellkolonien mit einem klaren Rand. Nur einige Sphären befanden sich im Überstand. In einigen Zellen dieser Sphären konnten Stammzellmarker nachgewiesen werden, die im Folgenden beschrieben werden.

Nestin ist ein Typ VI Intermediärfilament-Protein, das vorwiegend in neuronalen Stammzellen exprimiert wird und unerlässlich für ihr Überleben und die Selbst-Erneuerung ist. Nestin gilt somit als ein zuverlässiger Marker für Stammzellen aus der Neuralleiste.

Zusätzlich wurde Nestin in einer Reihe von Vorläuferzellen verschiedenen Zelltypus, wie in Subpopulationen von mesenchymalen, mesodermalen, neuronalen und hepatischen Zellen sowie in endokrinen Pankreas-Zellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Nestin-exprimierende Zellen haben die Fähigkeit zur Multipotenz, weisen eine hohe Vermehrungsrate und eine eher begrenztes Selbst-Erneuerungs- und Regenerations-Kapazität auf. Damit zeigen sie typische Eigenschaften von Vorläuferzellen. In der Embryogenese sind eine hohe Vermehrungs- und Migrationsrate sowie ein breites Differenzierungspotential Kennzeichen Nestin-positiver Zellen. Im adulten Gewebe sind gehäuft Nestin-positive Zellen bei Geweberegeneration vorzufinden, bei der die Fähigkeit zu Proliferation und Migration aktiviert ist. Wachstumsfaktoren wie EGF und bFGF regulieren positiv die Nestin-Expression. Nestin kann als ein zuverlässiger Multipotenzmarker eingestuft werden (Wiese et al., 2004; Tiede et al., 2009; Park et al., 2010).

Der p75 Neurotrophin-Rezeptor, auch bekannt als NGFRp75 (*nerve growth factor receptor p75*) und LNGFR (*low-affinity nerve growth factor receptor*), ist ein Rezeptor an der Membran von Nervenzellen, an den Neurotrophine binden können. Zu den Neurotrophinen zählen die vier Proteine NGF (Nervenwachstumsfaktor), NT-3 (Neurotrophin-3), NT-4/5

(Neurotrophin 4/5) und BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Der p75-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 75 kDa besteht aus 427 Aminosäuren und kann das Überleben oder den Zelltod von Nervenzellen durch das Aktivieren von intrazellulären Signalwegen einleiten (Tomellini et al., 2014). Darüber hinaus wird auf eine Korrelation zwischen der NGFRp75-Expression und der Pluripotenz von Stammzellen hingewiesen. Beispielsweise wurde eine hohe Expression des p75-Neurotrophin-Rezeptors sowohl in Oct-4-positiven Zellen der Maus-Blastozyste als auch in embryonalen Stammzelllinien der Maus gefunden (Moscatelli et al., 2009). Sowohl in fetalem als auch in adultem Gewebe ist p75 ein robuster Marker für Stammzellen, die aus der Neuralleiste stammen (Better et al., 2010). Stammzellen aus der Neuralleiste differenzieren unter anderem zu Melanozyten. In Bezug auf adulte Stammzellen scheint der Rezeptor sowohl in allen Stamm- und Vorläuferzellen, die aus der Neuralleiste stammen, vertreten zu sein als auch in mesenchymalen Stammzellen. In einigen Krebszellen, wie beispielsweise Melanomzellen, wurde ebenfalls das Vorhandensein des p75-Neurotrophin-Rezeptors nachgewiesen. Die Funktion des p75-Neurotrophin-Rezeptors in Stammzellen ist aufgrund der mit ihm verbundenen Signalwege und der fehlenden katalytischen Aktivität schwer zu definieren und zu verallgemeinern. Dennoch besteht die Annahme, dass NGFRp75 in der Erhaltung des Stammzellpotentials mitbeteiligt ist (Tomellini et al., 2014).

Ein weiterer Marker, der zur Überprüfung des Stammzellcharakters genutzt wird, ist der Oct-4-Transkriptionsfaktor. Das Oct-4-Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 6p21 und gehört zu der POU-Familie. Es wird auch als Oct-3 und Oct-3/4 bezeichnet und wird in totipotenten, embryonalen Stammzellen und in Keimzellen exprimiert, wo es als Masterregulator der Pluripotenz fungiert. Es erhält die Totipotenz der embryonalen Stammzellen, denn die Entfernung des Oct-4-Transkriptionsfaktors verursacht während der Embryogenese das Absterben der Stammzellen. In verschiedenen menschlichen, adulten Geweben wurden ebenfalls Stammzellpopulationen mit positiver Oct-4-Expression gefunden. Aufgrund dieser Daten wird vermutet, dass Oct-4 nicht nur eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen spielt, sondern darüber hinaus maßgeblich zur Selbsterneuerung somatischer Stammzellen beiträgt. Des Weiteren wurde in einer Reihe von Tumorgeweben eine Oct-4-Expression verzeichnet, die auf eine Korrelation zwischen der Reaktivierung von embryonalen, molekularen Signalwegen bei der Tumorentwicklung und eventuellen Transformationen in Stammzellen hinweisen (Tai et al., 2005). Die Oct-4-Expression wird während der Stammzellendifferenzierung herunter reguliert. Dementsprechend ist in differenzierten, somatischen Zellen keine Oct-4-Expression mehr zu erwarten (Pesce and Schöler, 2000). Dennoch wurde in diversen

Forschungsarbeiten entgegen der Erwartung die Expression des Oct-4-Transkriptionsfaktors in differenzierten, somatischen Zellen wie beispielsweise in Lymphozyten gefunden (Zangrossi et al., 2007). Es ist bekannt, dass das Oct-4-Transkript in mehreren unterschiedlichen Transkriptvarianten vorliegt, die im menschlichen Genom zwischen Oct-4A und Oct-4B unterschieden werden. Ausschließlich das Oct-4A-Transkript ist im Nukleus lokalisiert und für die Erhaltung der Stammzeleigenschaften verantwortlich (Cauffman et al., 2006). Es sind dem Oct-4-Gen äquivalente Pseudogene vorhanden, die zu falschen Ergebnissen bei der Genexpressionsanalyse über die Methode der qPCR führen können. Pseudogene sind genomische DNA-Sequenzen, die den normalen DNA-Sequenzen sehr ähnlich sind und als die erloschenen Derivate der funktionierenden Gene betrachtet werden. Hierfür müssen für die Methode der qPCR Primer genutzt werden, die alle Pseudogene ausschließen und lediglich die gespleißte Variante des Oct-4 amplifizieren. Somit ist die Anwesenheit von Oct-4 mit Vorsicht zu bewerten, da unterschiedliche Transkriptvarianten und äquivalente Pseudogene des Oct-4-Gens zu Falschinterpretationen führen können (Zangrossi et al., 2007; Liedtke et al., 2007).

Aufgrund der ungeklärten Fragestellung bei der Entstehung des malignen Melanoms ist es von großer Wichtigkeit, dermale Stammzellen zu isolieren und zu kultivieren, um Untersuchungen zur UV-induzierten malignen Transformation durchführen zu können. Außerdem ist das Interesse an dermalen Stammzellen aufgrund der guten Zugänglichkeit der Haut und deren Potential für therapeutische Zwecke sehr hoch. Dabei müssen im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen keine ethischen Probleme gelöst werden, wenn Patientenproben für die Isolierung dieser adulten Stammzellen verwendet werden.

### 1.3.2.3. Isolation dermalen Stammzellen

Die vorliegende Arbeit zur Anreicherung und Charakterisierung dermalen Stammzellen baut auf den Ergebnissen von Li et al. (2010) zur Anreicherung dermalen Stammzellen auf. Aus diesem Grund wird die Vorgehensweise bei der Isolation dermalen Stammzellen kurz erläutert.

Li et al. verwendeten für ihre Versuche Vorhaut von Neugeborenen. Nach der Trennung von Epidermis und Dermis wurden die aus der Dermis gewonnenen, vereinzelt Zellen in HESCM4-Medium kultiviert. Während der Kultivierung starb der Großteil der vereinzelt Zellen allmählich ab, wohingegen einige Zellen innerhalb von fünf bis sieben Tagen Zellcluster formten. Charakteristische dreidimensionale Sphären konnten nach 10 - 14 Tagen beobachtet werden, die als „dermale Sphären“ bezeichnet wurden. Der Großteil dieser Sphären wuchs adhärent auf dem Boden der Kulturflaschen, nur ein kleiner Anteil

## Einleitung

---

befand sich im Überstand. Auch die adhärennten Sphären konnten problemlos durch einfaches Klopfen vom Boden abgelöst und von den übrigen Zellen separiert werden, die stark an den Flaschenboden angeheftet waren. 19 von 24 (79 %) Vorhaut-Proben bildeten Sphären.

Um zu testen, ob auch andere aus der Dermis der Vorhaut stammende Zellpopulationen zur Sphärenbildung fähig sind, wurden in der Arbeit von Li et al. (2010) Melanozyten und Fibroblasten ebenfalls in HESCM4-Medium kultiviert. Nach zwei Wochen Kultivierung starben alle Melanozyten ab. Die Fibroblasten hatten in HESCM4-Medium eine hohe Wachstumsrate, bildeten jedoch keine Sphären. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die dermalen Sphären weder Melanozyten noch Fibroblasten waren, die sich zu Sphären hätten formen können.

## 2. Material

### 2.1. Geräte und Gebrauchswaren

Gerät/Gebrauchsware	Typ	Hersteller (Ort)
Analysenwaage	870-61	Kern&Sohn (Balingen-Frommern)
Abzug	7590	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Bio-Photometer	Biometra T personal	Eppendorf (Hamburg)
Bio-Vortex	V1	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Brutschrank	CB 210	Binder (Tüttlingen)
Brutschrank	BB 6220	Heraeus Instruments (Hanau)
Bunsenbrenner	Fireboy Plus	Integra Biosciences (Fernwald)
Culture Slides	BD Falcon	BD Biosciences (Heidelberg)
Falcon Filter	BD Falcon	BD Biosciences (Heidelberg)
Fettstift		DAKO (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop	DMR	Leica (Wetzlar)
Fluoreszenzmikroskopkamera	GF 20 DXC Air	Kappa (Göttingen)
Horizontal-Schüttler	KL2 Rotamix120	Edmund Bühler (Tübingen) Heidolph (Schwabach)
Kamera	E410	Olympus (Hamburg)
Magnetrührer	IKAMAG RH	Janke & Kunkel IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroskop	H500	Hund (Wetzlar)
Mr. Frosty™ Freezing Container		ThermoFischer Scientific (Waltham, MA, USA)
N <sub>2</sub> -Anlage	K-Series	Tec-Lab GmbH (Taunusstein)

## Material

PCR-Streifen		Greiner bio-one (Solingen)
Petrischalen		Greiner bio-one (Solingen)
pH-Meter	pH526	WTW (Weilheim)
Pipetten		Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen		Ratiolab (Dreieich)
Pipettierhilfe		Pipetus
Qubit Fluorometer	2.0.	Life technologies (Darmstadt)
Reaktionsgefäße		Greiner bio-one (Solingen)
Real-Time-PCR Gerät	Mastercycler Realplex <sup>2</sup>	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler	T-personal 48	Biometra (Göttingen)
Thermomixer	5437	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschrank	HS6686	Hettich (Tuttlingen)
UV-Küvetten		Eppendorf (Hamburg)
Wasserbad	1038	Heraeus Instruments (Burgwedel)
Zellkulturflaschen	CELLSTAR 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one Solingen
Zentrifugen	Rotina 46 EBA12	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson & Company	Heidelberg
Zytozentrifuge	Labofuge A	Heraeus (Hanau)

### 2.2. Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller (Ort)	Artikelnummer
Bovine Serum Albumin 25 % (BSA)	Life technologies (Darmstadt)	A10008-01
BSA	Roth (Karlsruhe)	2923225
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Roth (Karlsruhe)	5239.2
Collagenase IV-Pulver	Invitrogen (Heidelberg)	17104-019
DABCO	Sigma (München)	D-2522
DAPI	Sigma (München)	D-9542

## Material

DMEM-Pulver	Gibco (Paisley)	52100-039
DMEM/F12 + GlutaMAX	Invitrogen (Heidelberg)	13256-029
DMSO	Fluka (München)	4160
EDTA (99 %)	Merck (Darmstadt)	1.08418.0250
EtOH (100 %)	Lohmann (Seevetal)	L2104-251
FGF-basic	Invitrogen (Heidelberg)	13256-029
FKS	Biochrom (Berlin)	S0113/5
Gentamycinsulfat (576 U/mg)	Biochrom (Berlin)	A 271-23
Glucose	Merck (Darmstadt)	1.08337.0250
Glycerol (99%)	Roth (Karlsruhe)	3783.1
Goat Serum	DAKO (Hamburg)	X0907
KCl (p.a.)	Roth (Karlsruhe)	6781.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (p.a.)	Merck (Darmstadt)	4877.1000
Kollagen Typ IV		
Mercaptoethanol	Invitrogen (Heidelberg)	31350-010
NaCl (p.a.)	Roth (Karlsruhe)	3952.1
NaHCO <sub>3</sub> (p.a.)	Merck (Darmstadt)	1.06329.0500
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O (p.a.)	Merck (Darmstadt)	6346
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (p.a.)	Merck (Darmstadt)	4984.1
NaOH (p.a.)	Merck (Darmstadt)	1.06469.1000
PBS-Tabletten	Gibco (Paisley)	18912-014
PenStrep	Invitrogen (Heidelberg)	15140-122
Phenolrot	Sigma (München)	P 5530
PJ	Sigma (München)	P4170-100MG
RNase	Sigma (München)	R-5125
RPMI-Pulver	Invitrogen (Heidelberg)	51800-035
Roti-Block (10x)	Roth (Karlsruhe)	A.151.2
SensiMix SYBR	Bioline (Luckenwalde)	QT605-05
StemPro hESC Supplement	Life technologies (Darmstadt)	A10006-01
Thermolysin	Sigma (München)	T 7902
Trinatriumcitrat (p.a.)	Merck (Darmstadt)	1.06448.0500
Trypanblau	Sigma (München)	T 6146
Tris-Base (p.a.)	Merck (Darmstadt)	1.08382.0500
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)	9090.2

## Material

Triton X-100	Sigma (München)	T 8787
Trypsin	Biochrom (Berlin)	L 2103
Wasser, sterilfiltriert, nukleasefrei	Roth (Karlsruhe)	

### 2.3. Nährmedien

#### RPMI, 1000 ml

Substanz	Endkonzentration
RPMI-Pulver	10,43 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	2,4 mM
PenStrep	1 %

- mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
- pH-Wert auf 7,0 einstellen
- steril filtrieren, der pH steigt dadurch um 0,3 an
- Lagerung bei 4°C
- vor Verwendung 100 ml steril filtriertes FKS zugeben.

#### StemPro hESC SFM Complete-Medium, 10 ml

Substanz	Endkonzentration
1x DMEM/F12 + GlutaMAX	91 %
50x StemPro Growth Supplemente	2 %
25 % BSA	1,8 %
10 µg/ml FGF-basic	8 ng/ml
50 mM 2-Mercaptoethanol	0,1 mM

- Bestandteile zusammenmischen
- steril filtrieren, 7 Tage Lagerung bei 4°C möglich
- entsprechende Menge Mercaptoethanol erst vor jeder Anwendung zugeben



## Material

---

### 2.4. Puffer und Gebrauchslösungen

#### Antifade DABCO, 10 ml

Substanz	Endkonzentration
DABCO, 2 mM	2 mM
1 M Tris-HCL (pH 8,0)	2 %
Glycerol	90 %

- DABCO in destilliertem Wasser lösen
- alle anderen Bestandteile hinzugeben
- auf dem Schüttler mischen
- Lagerung bei 4°C im Dunkeln

#### BSA-Lösung, 100 ml

Substanz	Endkonzentration
BSA	3 %

- Einwaage in 100 ml PBS<sup>-</sup> lösen
- Lagerung bei 4°C

#### Collagenase IV, 100 ml

Substanz	Endkonzentration
Collagenase Typ IV	1 mg/ml

- Einwaage in 100 ml DMEM lösen
- steril filtrieren
- 10 ml Aliquots in 15 ml Röhrchen herstellen
- Stammlösung zweimal 1:100 auf die Endkonzentration 0,1 µg/ml verdünnen
- 3 Monate Lagerung bei - 20°C möglich

#### Dapi-Färbelösung, 10 ml

Substanz	Endkonzentration
DAPI	0,1 µg/ml

- Einwaage in 1 ml destilliertem Wasser lösen
- Stammlösung zweimal 1:100 auf die Endkonzentration 0,1 µg/ml verdünnen
- Lagerung bei 4°C

## Material

---

### EDTA-Lösungen, 1000 ml

Substanz	Endkonzentration
EDTA (TitriplexIII)	0,1 %

- Einwaage jeweils in 1000 ml PBS<sup>-/-</sup> lösen
- pH auf 7,3 einstellen
- steril filtrieren
- 3 Monate Lagerung bei 4°C möglich

### 70 % EtOH, 100 ml

Substanz	Endkonzentration
100 % EtOH	70 %

- Ethanol mit 30 ml destilliertem Wasser intensiv mischen
- Lagerung bei - 20°C

### Goat-Serum, 5 ml

Substanz	Endkonzentration
Goat-Serum	5 %
PBS <sup>-/-</sup>	95 %

- Bestandteile zusammenmischen
- Lagerung bei 4°C im Dunkeln

### HBSS-Puffer, 1000 ml

Substanz	Endkonzentration
NaCl	0,1368 M
KCl	5,4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,34 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44 mM
Glucose	5,6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4,7 mM
Phenolrot	0,3 mM
Pen/Strep	1 %

- Bestandteile zusammenmischen
- pH auf 7,5 einstellen
- zweimal steril filtrieren, der pH steigt dadurch um 0,3 an
- Lagerung bei 4°C

## Material

### PJ, 5 ml

Substanz	Endkonzentration
PJ-Pulver	1 mg/ml

- 15 ml Röhrchen auf der Analysenwaage austarieren
- Pulver direkt ins Röhrchen geben (ohne Spatel)
- Einwaage in 5 ml PBS<sup>-/-</sup> lösen
- Lagerung bei 4°C im Dunkeln

### PBD-Puffer, 1000 ml

Substanz	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	94 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	6 mM
Triton X 100	0,06 %

- Substanzen in 1000 ml destilliertem Wasser lösen
- pH auf 8,0 einstellen
- Lagerung bei Raumtemperatur

### PBS<sup>-/-</sup> Puffer, 1000 ml

Substanz	Endkonzentration
PBS	10 mg/ml

- PBS Tabletten in 1000 ml destilliertem Wasser lösen
- pH auf 7,3 einstellen
- Lagerung bei Raumtemperatur

### 0,1 % RNase Stammlösung, 100 ml

Substanz	Endkonzentration
RNase A	0,1 %
10 mM Na-Acetat	99,9 %
1M Tris-HCL	

- RNase A in 80 ml 10 mM Na-acetat lösen
- für 15 Minuten auf 100°C erhitzen
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- pH mit 1 M Tris-HCL auf 7,4 einstellen
- auf 100 ml mit 10 mM Na-acetat auffüllen
- 10 ml Aliquots in 15 ml Röhrchen herstellen

## Material

---

- für die 0,01 % RNase Gebrauchslösung, Stammlösung 1:10 mit PBS<sup>-/-</sup> verdünnen
- Lagerung bei - 20°C

### 1x Roti-Block Gebrauchslösung, 100,125 ml

Substanz	Endkonzentration
10x Roti-Block	10 %
Triton X-100	0,125 %

- Bestandteile in 90 ml destilliertem Wasser lösen
- da Triton X-100 sehr zähflüssig ist, den Ansatz auf einem Magnetrührer lange rühren
- Lagerung bei 4°C

### 10x TBS Stammlösung, 500 ml

Substanz	Endkonzentration
Tris-Base	0,1 M
NaCl	1,5 M

- Bestandteile in 400 ml destilliertem Wasser lösen
- pH auf 7,5 einstellen
- mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen
- Lagerung bei 4°C
- für die 1x TBS Gebrauchslösung die Stammlösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen

### Thermolysin-Lösung, 500 ml

Substanz	Endkonzentration
HEPES	11 mM
NaCl	142 mM
KCl	6,7 mM
NaOH	0,43 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Thermolysin	0,5 mg/ml

- Bestandteile bis auf Thermolysin in 500 ml destilliertem Wasser lösen
- pH auf 7,4 einstellen
- steril filtrieren, Thermolysin darin lösen
- in 10 ml Röhrchen Aliquots herstellen

## Material

---

- Lagerung bei - 20°C

### Trypanblau, 1 ml

Substanz	Endkonzentration
Trypanblau	0,4 %

- Substanz in 1 ml HBSS Puffer lösen

### Trypsin-Lösung, 500 ml

Substanz	Endkonzentration
Trypsin	0,1 %
EDTA (Titrplex III)	0,02 %
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	0,26 %
NaCl	0,6 %
Pen/Strep	1 %

- Bestandteile in 500 ml PBS<sup>-/-</sup> lösen und steril filtrieren
- pH auf 7,8 einstellen
- steril filtrieren
- in 10 ml Röhrchen Aliquots herstellen
- Lagerung bei - 20°C (Langzeitlagerung)
- nach Anbruch bei 4°C lagern

## Material

### 2.5. Antikörper

Die Primärantikörper sind monoklonal.

Primär-antikörper	Zielzelle	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung	Hersteller	Bestell-Nr.
Kaninchen Anti PAN Keratin AK	Keratinocyten	0,2 mg/ml	1:100	Zymed	18-0059
Maus Anti Vimentin AK Klon 2D1	Fibroblasten	0,1 mg/ml	1:300	Acris	AM32993PU- N
Maus Anti CD90 AK Klon AS02	Fibroblasten	0,2 mg/ml	1:100	Dianova	DIA 100
Kaninchen Anti p75 AK Klon EP1039Y	dermale Stammzellen	0,67 mg/ml	1:100	Abcam	Ab52987
Kaninchen Anti Nestin AK	dermale Stammzellen	0,25 mg/ml	1:50	Abnova	PAB3856
Maus Anti Oct-4A AK Klon C-10	dermale Stammzellen	0,2 mg/ml	1:50	Santa Cruz	sc-5279

Verdünnt werden die Primärantikörper in einer 3%igen BSA/PBS<sup>+/+</sup>-Lösung.

Die Sekundärantikörper sind polyklonal.

Sekundär-antikörper	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung	Hersteller	Bestell-Nr.
Ziege Anti Maus Alexa594	2 mg/ml	1:500	Life technologies	A11032
Ziege Anti Maus Alexa488	2 mg/ml	1:500	Life technologies	A11029
Ziege Anti Kaninchen Alexa488	2 mg/ml	1:500	Life technologies	A11008

Verdünnt werden die Sekundärantikörper in einer 3%igen BSA/PBS<sup>+/+</sup>-Lösung

## Material

### 2.6. Reaktionskits

Name	Hersteller	Ort
RNA-Aufreinigung <i>peqGOLD Total RNA kit</i>	PeqLab	Irvine, USA
<i>SensiFAST cDNA Synthesis kit</i>	Bioline	Luckenwalde
RNA HS Assay Kit	Life technologies	Darmstadt

### 2.7. Primer

Name	Target	Sequenz, 5'-3' Richtung	Annealing Temp.	Design
NGFRp75 F	NGFR p75	GCTGCTGTTGCTGCTTCTG	61,5°C	Stefan Henning
NGFRp75 R	NGFR p75	TCGGAGAACGTCACGCTG	61,5°C	Stefan Henning
Nestin F	Nestin	ACCTCAAGATGTCCCTCAGC	61,5°C	Stefan Henning
Nestin R	Nestin	TCCAGCTTGGGGTCCTGA	61,5°C	Stefan Henning
Oct4A_132bp F	Oct-4A	TTGAGTAGTCCCTTCGCAAG	61,5°C	Stefan Henning
Oct4A_132bp R	Oct-4A	CCTGGCCCATCACCTCC	61,5°C	Stefan Henning
$\beta$ -actin	HKG	TTCCTGGGCATGGAGTC	61,5°C	Szabo et al., 2004
$\beta$ -actin	HKG	CAGGTCTTTGCGGATGTC	61,5°C	Szabo et al., 2004
HPRT-1 F	HKG	TGACACTGGCAAACAATGCA	61,5°C	Vandesompele et al., 2002
HPRT-1 R	HKG	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	61,5°C	Vandesompele et al., 2002
TBP F	HKG	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	61,5°C	Vandesompele et al., 2002
TBP R	HKG	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC	61,5°C	Vandesompele et al., 2002

### 2.8. Humane Hautproben

Für die Isolierung der dermalen Zellen wurden gesunde und operativ entfernte Hautproben aus dermatologischen Eingriffen an den Elbkliniken Stade-Buxtehude genutzt, die zur Befundung nicht mehr benötigt wurden (Patientendaten in Tabelle 2-1). Die Haut wurde bis zur Bearbeitung in Transportmedium bei 4°C gelagert. Eine Einverständniserklärung der Patienten liegt vor. Aus Datenschutzgründen wurden die Hautproben mit einer Codierung gekennzeichnet, bestehend aus einer fortlaufenden Nummer und der Jahreszahl. Angegeben sind in der folgenden Tabelle die Codierung, das Alter der Patienten und die Lokalisation der Hautprobe.

**Tabelle 2-1: Patientendaten der Hautproben und dermalen Zellen.** Aufgelistet werden die fortlaufende Codierung, das Alter des Patienten, sowie die Lokalisation der Hautprobe.

Nr. der Hautprobe	Alter des Patienten	Lokalisation
22/14	80	Leiste
27/14	51	Leiste
38/14	64	Leiste
40/14	74	Axilla
44/14	47	Bauchdecke
45/14	80	k.A.
54/14	72	Axilla
55/14	46	Schulter
57/14	50	Axilla
61/14	75	Axilla
62/14	72	Axilla
63/14	35	Leiste
65/14	76	Axilla

### 2.9. Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden aus humanen Hautproben angezüchtet, die an den Elbkliniken Stade-Buxtehude aus dermatologischen Eingriffen operativ entfernt wurden (siehe 3.1.3). Die Hautproben bekamen bei Eingang eine Codierung wie in 2.8. beschrieben und haben die Buchstaben FH vorangestellt. Die verwendeten Fibroblasten sind mit der fortlaufenden Codierung und der Passage beim Ernten aus dem RPMI-Medium vor dem Umsetzen in Stempro, aufgelistet. Die Fibroblasten mit der Codierung 21/11 und 20/02 sind zwei verschiedene Kulturen, die gepoolt wurden.



## Material

---

**Tabelle 2-2: Codierung der verwendeten Fibroblasten.** Aufgelistet werden die fortlaufende Codierung und die Passage.

<b>Codierung</b>	<b>Passage</b>
FH 7/11	5
FH 33/11	5
FH 20/02 und 21/11	9 und 7

### 2.10. Melanomzellen

Melanomzellen sind bösartige veränderte Melanozyten der Haut. Ausgehend von der Tatsache, dass Krebszellen häufig Eigenschaften von Stammzellen aufweisen und das maligne Melanom aus entarteten Melanozyten entsteht, die ihren Ursprung in der Neuralleiste haben, weisen Melanomzellen eine hohe NGFRp75- und Nestin-Expression auf. Es lag bereits cDNA dieser Zellen vor, die für die Transkriptionsanalyse mittels qPCR genutzt wurde.

**Tabelle 2-3: Codierung der verwendeten Melanomzellen.** Aufgelistet sind die fortlaufende cDNA-Nummerierung und die Passage.

<b>cDNA-Nummerierung</b>	<b>Passage</b>
M 02/02	6
M 02/02	7

### 2.11. NCCIT-Zellen

NCCIT-Zellen entstammen einem nichtseminomatösen Keimzelltumor, der die Eigenschaften eines Karzinoms der Keimzellen mit denen eines embryonalen Tumors vereint. Sie weisen deshalb eine hohe Oct-4A-Expression auf. Die Zellen wurden als Positivkontrolle bei Untersuchungen der Oct-4A-Expression eingesetzt. Es lag bereits cDNA dieser Zellen vor, die für die Transkriptionsanalyse mittels qPCR genutzt wurde.

**Tabelle 2-4: Codierung der verwendeten NCCIT-Zellen.** Aufgelistet sind die fortlaufende cDNA-Nummerierung und die Passage.

<b>cDNA-Nummerierung</b>	<b>Passage</b>
<b>31/10</b>	14

### 2.12. Software

Die Software ImageJ 148.v wurde für die Bearbeitung der Immunfluoreszenz-Bilder genutzt. Für die Analyse der Schmelzkurven aus den qPCR-Läufen wurde die Software Realplex verwendet.

### 3. Methoden

#### 3.1. Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen fand in einem begasbaren Brutschrank mit einer konstanten Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % statt. Alle anderen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank der Sicherheitsklasse II durchgeführt.

##### 3.1.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen

###### Zellen auftauen

Die Zellen wurden bis zum Auftauen in Kryoröhrchen und entsprechendem Gefriermedium bei - 196°C im Stickstoffbehälter gelagert. Zum Auftauen wurden die Röhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension dann in 15 ml Röhrchen mit 10 ml vorgelegtem Medium überführt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 190xg wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Zuletzt wurde die Zellsuspension in eine 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt und auf 15 ml Medium aufgefüllt.

###### Zellen einfrieren

Als vorbereitende Maßnahme erfolgte am Vortag des Einfrierens stets ein Mediumwechsel. Im ersten Schritt des Einfrierens wurden die Zellen nach dem Ablösen mithilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und die totale Zellzahl berechnet. Aus dieser Zahl resultierte die Menge an einzufrierenden Kryoröhrchen. Je nach Zelltyp wurden 1x10<sup>6</sup> bis 2x10<sup>6</sup> Zellen pro *tube* eingefroren.

Pro Kryoröhrchen wurde 1 ml Einfriermedium in folgender Zusammensetzung angesetzt und anschließend steril filtriert:

- 70 % FKS-freies Medium je nach Zelllinie
- 10 % DMSO
- 20 % FKS

Nach der Bestimmung der totalen Zellzahl wurden die Zellen 10 Minuten bei 200xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in dem vorher steril filtrierten Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die vorbereitete und beschriftete Menge an Kryoröhrchen aufgeteilt und Schritt für Schritt jeweils 30 Minuten

bei - 4°C, bei - 20°C und - 72°C eingefroren, bevor sie bei - 196°C im Stickstoffbehälter gelagert werden konnten.

### 3.1.2. Kollagenisieren von *culture slides*

*Culture slides* können mit einem Anheftungsfaktor wie Kollagen beschichtet werden, um die Anheftung der Zellen an deren Oberfläche zu verbessern. Für einige Zellen, wie z.B. für Fibroblasten, ist eine beschichtete Oberfläche notwendig, da sie sich während der immunzytochemischen Färbung von der Oberfläche des Kulturgefäßes ablösen könnten. Für unsere Anwendungen wurden *culture slides* mit vier Kammern bzw. *wells* genutzt. Die Beschichtung der *culture slides* erfolgte mit 1 ml Kollagen IV pro *well* und einer Inkubationszeit von einer Stunde. Danach wurde das Kollagen abgenommen, mit 1 ml PBS<sup>-/-</sup> und anschließend mit 1 ml destilliertem Wasser pro *well* gespült und wieder abgesaugt. Zum Trocknen wurden die *culture slides* in die Sterilwerkbank gelegt und anschließend steril verpackt. Bis zur Anwendung wurden sie im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### 3.1.3. Anzucht humaner, primärer Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden aus gesunden Hautstücken gewonnen, die aus dermatologischen Eingriffen stammen und für die weitere Befundung für die Patienten nicht mehr von Bedeutung waren. Die Haut wurde zunächst in acht gleich große Stücke geschnitten und in eine 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt. Die Hautstücke wurden bei geöffneter Flasche eine halbe bis eine Stunde angetrocknet. Dabei lag die Seite der Epidermis auf dem Flaschenboden. Anschließend wurde die Flasche mit 15 ml RPMI mit 10 % FKS vorsichtig befüllt und im Brutschrank bei 37°C gelagert. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal die Woche. Nach vier Wochen wurden die Hautstücke vorsichtig mit einer sterilen Pinzette herausgenommen und die angewachsenen Fibroblasten umgesetzt.

Dazu wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und anschließend die Zellen mit 5 ml HBSS für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. HBSS löst die Zell-Zell Adhäsion. Darauf folgend wurde der Zellrasen mit 1 ml 0,1 % Trypsin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und die Kulturflasche anschließend leicht abgeklopft. Die Protease Trypsin spaltet extrazelluläre Proteine. Trypsin löst somit die Befestigungspunkte (Hemidesmosomen) der Zellen zum Boden des Zellkulturgefäßes und trägt zur Vereinzelung der Zellen bei. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden 9 ml RPMI mit 10 % FKS zugegeben. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Die erneute Einsaat der Zellen erfolgte je nach Vorhaben weiterhin in RPMI in Kulturflaschen oder kollagenisierten *culture slides*.

Wenn die gewünschte Zellzahl erreicht worden war, wurden die Zellen bis zur weiteren Anwendung gemäß 3.1.1. eingefroren.

### 3.1.4. Kultivierung humaner, primärer Fibroblasten

Die kryokonservierten Zellen wurden (wie in 3.1.1. beschrieben) aufgetaut, in 15 ml RPMI mit 10 % FKS aufgenommen und in eine unbeschichtete 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt. Im Verlauf der Kultivierung wurde 2x wöchentlich im Abstand von 3 - 4 Tagen das RPMI-Medium gewechselt. Die Dauer der Kultivierung fiel aufgrund des Wachstumsverhaltens der Zellen unterschiedlich aus. Bei einer Konfluenz von 90 - 100 % wurden die Zellen (wie in 3.1.3. beschrieben) abgelöst. Für die immunzytochemische Färbung wurde ein Teil der Zellen in RPMI mit 10 % FKS auf kollagenisierte *culture slides* weiter kultiviert. Dabei wurden je 7x10<sup>4</sup> Zellen in eine Kammer eines *culture slides* umgesetzt und auf 1 ml Medium aufgefüllt. Die Kultivierungsdauer betrug zwischen 3 - 4 Tagen mit einem Mediumwechsel im Abstand von 2 - 3 Tagen. Bei einer Konfluenz von 95 - 100 % wurde das Medium abgesaugt, der CS für 5 Minuten bei RT getrocknet und bis zur Färbung bei - 20°C gelagert. Die restlichen Zellen wurden vor der erneuten Einsaat für 5 Minuten bei 190xg zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml Stempro-Medium resuspendiert. Je 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden in eine 25 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche überführt und anschließend auf 5 ml Stempro-Medium aufgefüllt. Nach zwei Tagen wurde das Medium auf 7 ml aufgestockt. Die Flaschen wurden bei 37°C kultiviert und jeden Tag das Wachstum sowie die Morphologie der Zellen beobachtet und durch Fotografien alle 2 - 3 Tage festgehalten. Dreimal wöchentlich erfolgte ein halber Mediumwechsel, da die Zellen im Stempro-Medium semi-adhären waren. Vorab wurde die T25-Kulturflasche drei Minuten schräg gestellt, um möglichst die nicht adhären Zellen am Flaschenboden anzureichern und somit einen Zellverlust beim Mediumwechsel zu verhindern. Nur das obere Medium wurde vorsichtig abgenommen. Als zusätzliche Maßnahme wurde das entnommene Medium für 5 Minuten bei 190xg zentrifugiert und in 3,5 ml frisches Stempro resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in die T25-Kulturflasche überführt.

Nach 7 bis 8 Tagen wurden die Zellen in der Regel abgelöst und geerntet, da Erfahrungsgemäß kein positives Wachstum mehr zu erwarten war. Das Ablösen erfolgte problemlos, da sich die Zellen sehr leicht vom Boden lösten. Hierfür wurde die Kulturflasche leicht abgeklopft und das Medium mit den darin enthaltenen Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Flaschenboden wurde mit 1 ml PBS<sup>-/-</sup> gespült die Lösung nach wiederholtem Klopfen in das Zentrifugenröhrchen gegeben. In den meisten Fällen hat dieser Vorgang zum Ablösen der Zellen ausgereicht und die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Wenn die Zellen sich noch nicht vom Flaschenboden

lösten, wurden sie mit 1 ml 0,1 % EDTA benetzt und für 1 - 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Wenn es nötig war, wurde der Vorgang wiederholt. In seltenen Fällen waren noch einige Zellen adhärent und es wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben, die anschließend durch Klopfen vereinzelt wurden. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 9 ml RMPI mit 10 % FKS abgestoppt und die Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

### **3.1.5. Isolierung humaner, dermaler Zellen nach Li et al.**

Li et al. verwendeten für ihre Versuche Vorhaut von Neugeborenen. Im ersten Schritt wurde zur Sterilisation die Vorhaut mit 70%igem Ethanol für eine Minute gespült. Um anschließend das Ethanol aus der Vorhaut zu entfernen, wurde sie für zwei Minuten in Kalzium- und Magnesium-freiem HBSS-Medium inkubiert. Anschließend wurde die Haut in ca. 5 x 5 mm<sup>2</sup> kleine Stücke geschnitten und in einem 50 ml Falcon Röhrchen mit 5 ml 0,48%iger Dispase II bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Falcon-Röhrchen zunächst für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Haut wurde anschließend entnommen und die Epidermis von der Dermis getrennt. Die Dermis wurde möglichst fein zerkleinert. Die zerkleinerten Dermis-Stücke wurden in 2 ml Collagenase IV mit einer Konzentration von 1 mg/ml 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der nächste Verfahrensschritt beinhaltete die Zugabe von 25 ml Kalzium- und Magnesium-freiem HBSS. Um die Zellen aus den Zellklumpen zu lösen, wurde die Suspension hoch und runter pipettiert und anschließend nacheinander durch einen 100 µm, 70 µm und 40 µm Filter filtriert. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 200xg für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 5 ml HESCM4-Medium resuspendiert und bei 37°C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Nach 48 Stunden erfolgte die Zugabe von 2,5 ml HESCM4-Medium. Die Hälfte des Mediums wurde alle 3 - 4 Tage erneuert.

### **3.1.6. Isolierung humaner, dermaler Zellen**

Die Zellen wurden aus gesunden Hautstücken gewonnen, die aus dermatologischen Eingriffen stammen und für die weitere Befundung für die Patienten nicht mehr von Bedeutung waren. Zuerst wurde das Hautstück von Fett und Bindegewebe befreit und in 5 mm schmale Streifen geschnitten. Im darauffolgenden Waschvorgang wurden die Hautstreifen dreimal jeweils 10 Minuten in 5 ml PBS<sup>-/-</sup> mit 100 µl Gentamycin und 100 µl PenStrep gewaschen. Um die Trennung der Dermis von der Epidermis zu erzielen, wurden die Hautstreifen 4 Stunden in 5 ml Thermolysin bei 4°C inkubiert und anschließend voneinander getrennt. Da die Protease Thermolysin spezifisch die Verbindungen zwischen Epidermis und Dermis spaltet, lösen sich auf diese Weise die beiden Hautschichten

voneinander und können mit sterilen Pinzetten getrennt werden. Um eine gute enzymatische Trennung zu erreichen und möglichst viele Einzelzellen zu erhalten wurde danach die Dermis so klein wie möglich geschnitten und in 4 ml Collagenase Typ IV überführt, wonach sie 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und zeitweise mäßig geschüttelt wurde. Diese Vorgehensweise wurde später optimiert, indem die Inkubation durchgehend auf dem Laborschüttler stattfand, wodurch höhere Ausbeuten erzielt werden konnten.

Nach 24 h wurde die Dermis in Collagenase Typ IV mit 25 ml HBSS versetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Gewebestücke gut abgetropft und aus der Lösung entfernt. Um restlos die Gewebeklumpen und das Bindegewebe zu entfernen, wurde die Lösung nacheinander durch einen 100 µm und 40 µm Falcon-Filter filtriert und für 5 Minuten bei 190xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Stempro-Medium resuspendiert und die Ausbeute mithilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Nach Einsaat in einer T25-Kulturflasche wurde das Stempro-Medium auf 5 ml aufgefüllt. Nach zwei Tagen wurde das Medium auf 7 ml aufgestockt.

### 3.1.7. Kultivierung humaner, dermaler Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C kultiviert und jeden Tag das Wachstum sowie die Morphologie der Zellen beobachtet und durch Fotografien alle 2 - 3 Tage festgehalten. Dreimal wöchentlich erfolgte ein halber Mediumwechsel, da die Zellen in Stempro-Medium nicht adhärent wurden. Vorab wurde die T25-Kulturflasche 3 Minuten schräg gestellt, um möglichst die Zellen am Flaschenboden anzureichern und somit einen Zellverlust beim Mediumwechsel zu verhindern. Nur das obere Medium wurde vorsichtig abgenommen. Als zusätzliche Maßnahme wurde anschließend das entnommene Medium 5 Minuten bei 190xg zentrifugiert und die pelletierten Zellen in 3,5 ml frischem Stempro-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde wieder in die T25-Kulturflasche überführt.

Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Zellen in der Regel geerntet, da Erfahrungsgemäß kein positives Wachstum mehr zu erwarten war. Die Zellernte erfolgte problemlos, da die Zellen nicht am Boden angeheftet waren. Hierfür wurde die Kulturflasche leicht abgeklopft und das Medium mit den darin enthaltenen Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Flaschenboden wurde mit 1 ml PBS<sup>-/-</sup> gespült. Nach wiederholtem Klopfen wurde auch diese Zellsuspension in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Weitere Maßnahmen waren zum Ablösen der Zellen nicht erforderlich. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

### 3.1.8. Zellzahlbestimmung durch Trypanblau-Färbung

Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden die Zellen mit Trypanblau versetzt. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff aufgrund seiner chemischen Struktur auszuschließen. Somit sind ausschließlich tote Zellen im mikroskopischen Bild tiefblau gefärbt. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung in HBSS im Verhältnis 1:1 gemischt, in eine Neubauer Zählkammer überführt und die Zellen unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung ausgezählt.

### 3.2. Zytozentrifugation

Für nachfolgende immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen, die in Stempro-Medium kultiviert wurden, durch Zytozentrifugation auf polylysinbeschichteten Objektträgern fixiert. Die Zytozentrifugation erfolgte für 5 Minuten bei 750 rpm. Hierbei gelangte die Zellsuspension, die in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Loch im Boden hinein pipettiert wurde, durch dieses Loch auf den Objektträger. Ein gelochtes Filterpapier zwischen Zentrifugeneinsatz mit Reaktionsgefäß und Objektträger nahm die überschüssige Flüssigkeit auf, so dass die Zellen an einem Punkt zentriert fixiert werden konnten. Pro Objektträger standen zwei Löcher zur Verfügung, wobei pro Loch (Ø 4,5 mm) zwischen  $2,5 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  Zellen in 100 µl PBS<sup>-/-</sup> aufgetragen wurden. Die Erfahrung zeigte, dass sich die Auftragsmenge von  $3 \times 10^4$  Zellen als optimaler Wert herausstellte. Bei einer geringeren Zelldichte als  $2,5 \times 10^4$  wurde ein Vorlauf von 50 µl PBS<sup>-/-</sup> ohne Zellen vorgeschaltet, um den Filter ausreichend zu befeuchten. Nachdem die Zellen auf den Objektträgern fünf Minuten an der Luft getrocknet waren, wurden sie bei - 20°C bis zur Färbung bzw. vorheriger Fixierung gelagert.

### 3.3. Immunzytochemische Färbung

Bei der Erkennung und Charakterisierung von Zellen wird in der medizinischen Diagnostik und in vielen Bereichen der Forschung die Methode der immunzytochemischen Färbung angewendet. Mit dieser effektiven Methode ist es möglich, Zellorganellen, -bestandteile oder -proteine spezifisch zu markieren und sichtbar zu machen. Der Nachweis von immunzytochemischen Färbungen beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Zelleigenschaft (= Epitop) als Antigen-Antikörper Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Hierbei ist der Antikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt, womit das Vorhandensein des Epitops sichtbar gemacht wird. In unseren Anwendungen besteht das Detektionssystem aus einem Sekundärantikörper, der mit einem Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) konjugiert ist und



## Methoden

---

spezifisch am Primärantikörper bindet. Durch die Anwendung eines fluoreszierenden Farbstoffs spricht man auch von Immunfluoreszenz. Ziel ist es, ein Signal ausschließlich am Ort des Epitops in ausreichender Stärke zu erkennen.

Die auf Objektträgern aufgebrauchten Zellen wurden vorab 5 Minuten in PBS<sup>-/-</sup> rehydriert und jeweils 5 Minuten mit Methanol und Aceton bei - 20°C fixiert. Bei der Oct-4A- und Nestin-Färbung fand vergleichsweise eine Formalin-Fixierung statt. Das Protokoll hierfür bestand aus:

- 15 Minuten 4 % Formalin
- 1 x 5 Minuten PBS<sup>-/-</sup>
- 10 Minuten 0,5 % TritonX/PBS<sup>-/-</sup>
- 1 x 5 Minuten PBS<sup>-/-</sup>

Zur Charakterisierung der dermalen Zellen wurde zunächst jeweils einer der in Frage kommenden Zelltypen unter Verwendung zellspezifischer Antikörper visualisiert. Die in Frage kommenden Zelltypen waren in erster Linie Fibroblasten, die mit dem Vimentin- und CD90-Antikörper detektiert werden sollten. Außerdem wurde auch der Pan Keratin-Antikörper eingesetzt, um Keratinozyten aus der Epidermis auszuschließen, die möglicherweise bei der Isolierung der dermalen Zellen mit in die Zellkultur verschleppt worden sein könnten. Zur Charakterisierung der Fibroblasten in Stempro-Medium wurde unter Verwendung des Vimentin- und CD90-Antikörpers überprüft, ob die Eigenschaften der Fibroblasten in Stempro erhalten blieben. Des Weiteren wurden die Stammzellmarker NGFRp75, Nestin und Oct-4A zur Charakterisierung von Stammzellen eingesetzt. Die verwendeten Volumina für Seren, Primär- und Sekundärantikörper in den folgenden Protokollen betragen bei Zytozentrifugationspräparaten 100 µl sowie bei *culture slides* pro Kammer 200 µl. Wenn nicht anders angegeben, fand die Durchführung der Schritte bei RT statt. Die am Ende der Färbung stattfindende Beschichtung der Objektträger mit Antifade verhindert ein schnelles Ausbleichen des Fluoreszenzsignals beim Mikroskopieren. Des Weiteren wird ein luftdichtes Abschließen durch das Deckgläschen ermöglicht und so eine längere Haltbarkeit erreicht. Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe 3.4.).

## Methoden

---

### 3.3.1. Einfachfärbungen der Zytozentrifugationspräparate

- trockene Präparate mit Fettstift umranden, um ein Auslaufen der Seren und AK zu verhindern
- 5 Minuten PBS<sup>-/-</sup>
- Rehydrierung der Zellen  
30 Minuten 3 % BSA/PBS<sup>-/-</sup>
- 5 Minuten PBS<sup>-/-</sup>
- Absättigung unspezifischer Bindungsstellen  
30 Minuten 5 % *Goat*-Serum
- Inkubation mit Primärantikörper über Nacht bei 4°C:

<b>primärer AK</b>	<b>Verdünnung in 3 % BSA/PBS<sup>-/-</sup></b>
Kaninchen Anti PAN Keratin AK	1:100
Maus Anti Vimentin AK	1:300
Maus Anti CD90 AK	1:100
Kaninchen Anti p75 AK	1:100
Kaninchen Anti Nestin AK	1:50
Maus Anti Oct-4A AK	1:50

- 3 x 10 Minuten PBS<sup>-/-</sup> (nur bei der Oct-4A-Färbung: 3 x 10 Minuten PBD)
- Inkubation mit Sekundärantikörper für 30 Minuten bei 37°C:

<b>sekundärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung in 3 % BSA/PBS<sup>-/-</sup></b>	<b>Verwendung bei primärem AK</b>
Ziege Anti Maus Alexa 594	1:500	Maus Anti Vimentin AK, Maus Anti CD90 AK, Maus Anti Oct-4AK
Ziege Anti Maus Alexa 488	1:500	Maus Anti Vimentin AK, Maus Anti CD90 AK, Maus Anti Oct-4 AK

## Methoden

Ziege Anti Kaninchen Alexa 488	1:500	Kaninchen Anti PAN Keratin AK, Kaninchen Anti p75 AK, Kaninchen Anti Nestin AK
--------------------------------	-------	--

- 3 x 10 Minuten PBS<sup>-/-</sup> (nur bei der Oct4A-Färbung: 3 x 10 Minuten PBD)
- 1 Minute DAPI (0,1 µg/ml) zur Zellkernanfärbung
- 2 x 5 Minuten PBS<sup>-/-</sup>
- Beschichtung mit Antifade, Deckgläschen auflegen
- Lagerung bei - 20°C

### 3.3.2. Doppelfärbungen der Zytocentrifugationspräparate

Zur Charakterisierung der Zellen wurden neben Einfachfärbungen auch Doppelfärbungen durchgeführt. Diese hatten den Vorteil, dass die Anwesenheit zweier Markerproteine in den Zellen überprüft werden konnte. Außerdem war ein viel geringerer Verbrauch an Reagenzien und Objektträgern notwendig. Der Ablauf des Protokolls war identisch zu dem Protokoll der Einfachfärbungen. Der Unterschied lag darin, dass zwei Antikörper eingesetzt wurden. Die primären Antikörper mussten dabei aus unterschiedlichen Wirten stammen, um entsprechend unterschiedliche Sekundärantikörper in verschiedenen Farben einsetzen zu können. Dabei war beim Einsatz der Sekundärantikörper darauf zu achten, einmal einen rot fluoreszierenden sekundären Antikörper (Ziege Anti Maus Alexa 594) und einmal einen grün fluoreszierenden sekundären Antikörper (Ziege Anti Maus Alexa 488 oder Ziege Anti Kaninchen Alexa 488) einzusetzen. Andernfalls wäre unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Unterscheidung der Epitope möglich.

### 3.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beschreibt eine lichtmikroskopische Methode, die sich die Eigenschaft von fluoreszierenden Stoffen zunutze macht, UV-Strahlung oder kurzwelliges sichtbares Licht zu absorbieren und einen Teil dieser Energie in Form einer länger-welligen Strahlung zu emittieren. Anregungs- und Emissionslicht haben genügend unterschiedliche Wellenlängen, um sie optisch zu trennen. Dazu werden im Fluoreszenzmikroskop

Interferenzfilter und Sperrfilter genutzt, die nur die Fluoreszenzstrahlung bis zum Auge des Betrachters durchlassen. Nach der immunzytochemischen Färbung wird durch den Einsatz von Sekundärantikörpern, die mit einem Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) konjugiert sind, der primäre Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Dazu wurden die Zytozentrifugationspräparate und die *culture slides* unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer 630fachen Vergrößerung bildlich ausgewertet und dokumentiert. Die Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI hatte eine blaue Fluoreszenz, die Antikörper-Färbung mit dem Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoff Ziege Anti Maus Alexa 488 und Ziege Anti Kaninchen Alexa 488 fluoreszierten grün. Die Antikörper-Färbung mit dem Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoff Ziege Anti Maus Alexa 594 fluoreszierte rot.

### 3.5. Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1. RNA-Isolierung und Aufbereitung

Nach dem Umsetzen der Zellen wurden sie in einer fünfminütigen Zentrifugation bei 400xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl Lysepuffer aufgenommen. Dabei waren 400 µl Lysepuffer ausreichend für  $1 \times 10^7$  Zellen. Das Lysat wurde bis zur Aufreinigung bei -70°C gelagert. Zur RNA-Aufreinigung wurde das RNA-Aufreinigungs-Kit *peqGOLD Total RNA* eingesetzt. Besonders wichtig war bei diesem Verfahren, die Reagenzien und die Proben direkt mittig auf der Matrix der Säule aufzutragen. Andernfalls wäre mit hohen Verlusten zu rechnen, wenn diese an der Wand oder am O-Ring der Säule haften blieben.

- Laden und Binden

Im ersten Schritt wurde das Lysat auf eine *DNA-Removing Column* Minisäuleneinheit geladen und für eine Minute bei 12.000xg abzentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit demselben Volumen an 70 %igem Ethanol versetzt und durchs Vortexen sorgfältig gemischt. Anschließend wurde die Probe auf eine *PerfectBind RNA Column* transferiert und bei 10.000xg für 1 Minute abzentrifugiert.

- Waschen I

Die *PerfectBind RNA Column* wurde auf ein frisches *collection tube* gesteckt und mit 500 µl RNA Wasch Puffer I versetzt, sowie anschließend für 15 Sekunden bei 10.000xg zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und das *collection tube* weiter genutzt.

## Methoden

---

- DNase I Verdau

Für den DNA Verdau wurde für jede *PerfectBind RNA Column* folgender DNase I Reaktionsmix angesetzt:

DNase Digestion Puffer	73,5 $\mu$ l
RNase-freie DNase (20 units/ $\mu$ l)	<u>1,5 <math>\mu</math>l</u>
Gesamtvolumen	75 $\mu$ l

Dabei war es besonders wichtig die DNase ausschließlich durchs invertieren zu mischen. Nach Zugabe des DNase I Reaktionsgemisch auf die *PerfectBind RNA Column* wurde sie im Thermomixer 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 400  $\mu$ l RNA Wasch Puffer I auf die Säule aufgeladen und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert sowie im Anschluss bei 10.000xg für 5 Minuten zentrifugiert.

- Waschen II

Im Folgenden Waschschritt wurde auf die *PerfectBind RNA Column* 600  $\mu$ l des komplettierten RNA Wasch Puffer II zugegeben und für 15 Sekunden bei 10.000xg zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und der Waschschritt wiederholt.

- Trocknen

Zum Trocknen der Säule wurde das *PerfectBind RNA Column* im geleerten *collection tube* gesteckt und für 2 Minuten bei 10.000xg zentrifugiert.

- Elution

Zum Eluieren der RNA wurde 50  $\mu$ l RNase-freies Wasser mit einer Temperatur von 70°C eingesetzt. Dazu wurde das *PerfectBind RNA Column* in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und das temperierte Wasser auf die Säulenmatrix gegeben und im Anschluss für 5 Minuten inkubiert. Nach dem darauf folgenden Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 5.000xg wurde die Säule verworfen und das Eluat für eine anschließende Konzentrationsbestimmung auf Eis gelegt oder bei - 70°C gelagert.

### 3.5.2. RNA-Konzentrationsbestimmung mit Qubit

Die Konzentration der RNA-Proben wurde photometrisch mit der Qubit-Methode ermittelt. Dazu wurde das RNA HS Assay Kit verwendet. Dieses enthielt den RNA HS Puffer, das HS Reagenz sowie zwei Standards zur Kalibrierung der Messung.

Im ersten Schritt wurde pro Standard und Probe eine Arbeitslösung wie folgt angesetzt:

RNA HS Puffer	200 µl
HS Reagenz	<u>1 µl</u>
Gesamtvolumen	201 µl

In einem 0,5 ml Röhrchen wurden jeweils 190 µl Arbeitslösung und 10 µl pro Standard hinein pipettiert. Für die Messung der Proben wurde in ein 0,5 ml Röhrchen jeweils 1 bis 10 µl Probenvolumen, erfahrungsgemäß 5 µl angesetzt und auf 200 µl Arbeitslösung aufgefüllt. Vor der Messung wurden die Röhrchen mit dem Vortexer gemischt und kurz zentrifugiert.

Vorab wurde zur Kalibrierung der Messung zuerst Standard 1 und darauf folgend Standard 2 in dem Qubit Fluorometer gemessen. Bei Probenkonzentrationen über 600 ng/ml musste die Messung mit einem geringeren Probeneinsatz wiederholt werden.

Die Probenkonzentration mit der Einheit µg/ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Probenkonzentration} = \text{Messwert} \times (0,2/\text{Anzahl } \mu\text{l Probe}) [\mu\text{g/ml}]$$

Die Daten wurden in einer Datenbank erfasst. Durch Verdünnung mit RNase-freiem Wasser wurde die Konzentration der RNA-Proben nach Möglichkeit auf 100 µg/ml eingestellt.

### 3.5.3. Reverse Transkription

Durch die reverse Transkription konnte die zuvor aufgereinigte RNA mittels eines Enzyms in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde der *SensiFast™ cDNA Synthesis kit* verwendet. Das verwendete Kit bedient sich einer *Avian Myeloblastosis Virus-Reverse-Transkriptase (RT-eAMV)*, die über die Fähigkeit verfügt, durch schwierige Sekundärstrukturen bei erhöhten Temperaturen (bis 65°C) zu transkribieren. Die cDNA-Synthese erfolgte nach folgendem Protokoll.

## Methoden

---

Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis in folgender Zusammensetzung hergestellt:

aufgereinigte RNA oder mRNA	15 $\mu$ l
5x TransAmp Puffer	4 $\mu$ l
Reverse Transkriptase	<u>1 <math>\mu</math>l</u>
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l

Die Komponenten des Reaktionsgemisches wurden vor dem Pipettieren mit dem Vortexer gemischt sowie kurz zentrifugiert bevor sie in einem PCR-Röhrchen pipettiert wurden. Ein RNA-Probenvolumen von 15  $\mu$ l wurde hinzugegeben und mit dem Reaktionsgemisch durch Pipettieren sanft gemischt. Idealerweise lag die Konzentration der RNA-Ausgangslösung bei 100  $\mu$ g/ml. Nach erneutem Mischen und kurzem Abzentrifugieren lief der Assay im Gerät wie folgt ab:

- Primer Annealing 10 Minuten bei 25°C
- Reverse Transkription 15 Minuten bei 42°C
- Inaktivierung 5 Minuten bei 85°C

Abschließend kühlten die Proben auf 4°C hinunter. Nach Zugabe von 60  $\mu$ l RNase-freiem Wasser (1:4 Verdünnung) erfolgte bis zur weiterführenden Analyse eine Lagerung der Proben bei -72°C.

### 3.5.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der qPCR können Genabschnitte oder Transkripte quantifiziert werden und die Zunahme der PCR-Produkte über Fluoreszenzfarbstoffe in Echtzeit verfolgt werden. Nötig für dieses Verfahren sind eine DNA-Matrize (*Template*), die als Vorlage für die Polymerase dient, zwei Primer (Oligonukleotide die jeweils zum 5'- und 3'-Ende der gewünschten DNA-Sequenz komplementär sind und als Start-Sequenzen dienen), eine thermostabile DNA-Polymerase, die die DNA kopiert, Desoxynukleotide, welche an die Primer angehängt werden und Puffer sowie RNA-freies Wasser als Reaktionslösung. Für eine exponentielle Verdopplung der DNA-Moleküle muss der folgende Zyklus, bestehend aus drei Schritten, immer wiederkehrend durchlaufen werden:

- Denaturierung bei 95°C, um die DNA-Stränge zu trennen durch die Aktivierung der DNA-Polymerase

## Methoden

---

- Hybridisierung bei 60°C, um die Primer an die komplementären Sequenz der einzelsträngigen DNA durch die Erniedrigung der Temperatur anzubinden
- Elongation bei 72°C, um die Desoxynukleotide durch die optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase zu einem neuen Strang zusammenzufügen

Die Verdopplung der DNA-Moleküle kann durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der eine hohe Affinität zur doppelsträngigen DNA besitzt, beobachtet werden. Dabei absorbiert der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex blaues Licht bei einer Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 494$  nm und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 521$  nm. Während der Phase der Temperaturerhöhung werden die beiden komplementären DNA-Moleküle getrennt und die Fluoreszenz sinkt praktisch auf null. Während der sich dann anschließenden Abkühlungsphase bindet der Primer an sein DNA-Template, dann beginnt die DNA-Polymerase mit der Synthese des neuen Stranges. Mit der Zunahme an doppelsträngiger DNA im Ansatz steigt die Fluoreszenz an, da zunehmend mehr SYBR Green eingelagert wird. Am Ende eines jeden Zyklus wird das Signal gemessen, so dass man für jede Probe den Verlauf des Fluoreszenzsignals (bzw. der DNA-Konzentration) darstellen kann. Bis zu dem Zeitpunkt, wo nicht mehr alle Komponenten der PCR zur Verfügung stehen, steigt der Verlauf exponentiell an. Danach verlangsamt sich die Zunahme der Fluoreszenz, bis schlussendlich kein Anstieg mehr verzeichnet werden kann. Proben mit einem sehr geringen DNA-Gehalt benötigen relativ viele Zyklen um einen bestimmten Fluoreszenzwert (Schwellenwert/*threshold*) zu erreichen. Für einen Wert mit derselben Strahlenintensität benötigen Proben mit einem hohen DNA-Gehalt weniger Zyklen. Eine quantitative Aussage kann also getroffen werden, indem die Zyklenanzahl verschiedener Proben miteinander verglichen wird. Hierbei wird die Zyklenzahl, die eine Probe benötigt, um den gewissen Schwellenwert zu erreichen, als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet.

Um Konzentrationsunterschiede zwischen den *Templates* zu ermitteln und auszugleichen, wurden zusätzlich zu den spezifischen Primern, *housekeeping genes* (= Haushaltsgene, HKG) eingesetzt. HKG's werden in den Zellen kontinuierlich und unabhängig exprimiert, da sie zur Aufrechterhaltung grundlegender Zellfunktionen erforderlich sind. Sie sollten nicht in den gleichen Signalwegen (*pathways*) der zu untersuchenden Zielgene involviert sein, damit eine quantitative Aussage über die Expression der Zielgene getroffen werden kann. Für die vorliegende Arbeit wurden drei verschiedene *housekeeping genes* verwendet, Beta-Actin ( $\beta$ -actin), Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase (HPRT1) und das TATA-Box bindende Protein (TBP). Die verwendeten spezifischen Primer sind in Kapitel 2.7. aufgeführt.



## Methoden

---

Für die Durchführung der qPCR wurde SensiMix SYBR verwendet. Für einen qPCR-Ansatz bzw. für eine Probe wurde folgendes Reaktionsgemisch in PCR-Röhrchen auf Eis angesetzt:

2x SensiMix	12,5 µl
10x Primer	2,5 µl
Template	3 µl
RNase-freies Wasser	<u>7 µl</u>
Gesamtvolumen	25 µl

Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die PCR-Röhrchen im Thermocycler platziert.

Das PCR-Protokoll im Thermocycler wurde wie folgt durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Initiale Denaturierung</b>	95°C	10 min	-
<b>Denaturierung</b>	95°C	20 s	-
<b>Hybridisierung</b>	61,5°C	30 s	45
<b>Elongation</b>	72°C	35 s	-

Nach dem PCR-Lauf wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Amplifikation von Primerdimeren vom spezifischen qPCR-Produkt zu unterscheiden. Wie bereits beschrieben wird bei einer spezifischen Temperatur das DNA-Fragment zu zwei einzelsträngigen Molekülen denaturiert und somit der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green freigesetzt und registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen qPCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifische Primerdimere, ist eine Unterscheidung entsprechend möglich. Darüber hinaus gibt die Höhe des Peaks der Schmelzkurve eine grobe Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. Proben, die eine unspezifische Schmelzkurve aufwiesen, wurden aus der weiteren Darstellung der Ergebnisse heraus genommen, da kein spezifisches qPCR-Produkt vorhanden war. Dies wurde in den Tabellen mit n.d. (*no data*) gekennzeichnet (siehe Anhang).

Für eine quantitative Aussage über die Amplifikation des Zielgens werden die Ct-Werte in ein vorgefertigtes *Exel-Sheet* eingegeben und in Verhältnis zu einer spezifischen Referenzprobe (Kontrolle) gesetzt.

## Methoden

---

Dabei sind die folgenden Formeln Grundlage der Rechnung:

$$\text{fold change HKG} = \frac{2^{\text{Ct Ko (HKG)}}}{2^{\text{Ct HKG}}}$$

Ct Ko (HKG) = Ct-Werte des Ansatzes mit Kontrolle (Referenzprobe)

Ct HKG = Ct-Werte des Ansatzes mit dem jeweiligen HKG

$$\text{fold change T} = \frac{2^{\text{Ct Ko (T)}}}{2^{\text{Ct T}}}$$

Ct Ko (T) = Ct-Werte des Ansatzes mit Kontrolle (Referenzprobe)

Ct T = Ct-Werte des Ansatzes mit dem *target*

Pro Probe und HKG wird das Verhältnis *fold change target* zu *fold change HKG* gebildet.

### 4. Ergebnisse

#### 4.1. Etablierung der Isolierung und Kultivierung humaner dermaler Zellen aus adulter Haut

Für eine bessere Übersicht werden zuerst die Ergebnisse der Isolierung und Charakterisierung der primären, dermalen Zellen von humanen adulten Hautproben dargestellt. Dabei werden der Kultivierungsverlauf, die Zelltypen-Charakterisierung und die Ergebnisse der qPCR erläutert. Anschließend werden die Ergebnisse der Charakterisierung der humanen, primären Fibroblasten dargestellt.

##### 4.1.1. Kultivierungsverlauf primärer, dermaler Zellen in Stempro-Medium

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 13 Hautproben verarbeitet (vgl. Kapitel 2.8.). Die Methode der Isolierung der dermalen Zellen aus adulter, humaner Haut wurde in Kapitel 3.1.6. beschrieben. Die Kultivierung der isolierten, dermalen Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.1.7. erläutert. Es wurde untersucht, ob es durch die Kultivierung der isolierten dermalen Zellen in Stempro-Medium zu einer Sphärenbildung kommt. Als Grundlage diente das Protokoll von Li et al. (2010). Für die vorliegende Arbeit wurde das Protokoll modifiziert. Durch die in dieser Arbeit verwendeten Methoden fand bei 7 von 13 (53 %) angelegten Zellkulturen eine Clusterbildung der Zellen statt. Eine Sphärenbildung war in keiner der Zellkulturen zu beobachten. Die Zellausbeute war in sechs Proben unter  $1 \times 10^6$  Zellen. In vier Proben konnten eine Zellausbeute zwischen  $1,2 \times 10^6$  bis  $1,4 \times 10^6$  Zellen erzielt werden. In drei Proben konnte zwischen  $3,4 \times 10^6$  bis  $3,7 \times 10^6$  Zellen isoliert werden. Die Kultivierungsdauer betrug in der Regel 10 - 14 Tage. In zwei Zellkulturen wurde eine Kultivierungszeit von 17 Tagen ausgetestet. In diesem Zeitraum fand keine Proliferation der Zellen statt und die Zellcluster blieben unverändert. In der folgenden Tabelle (Tabelle 4-1) sind die Ergebnisse der Clusterbildung zusammengefasst.

## Ergebnisse

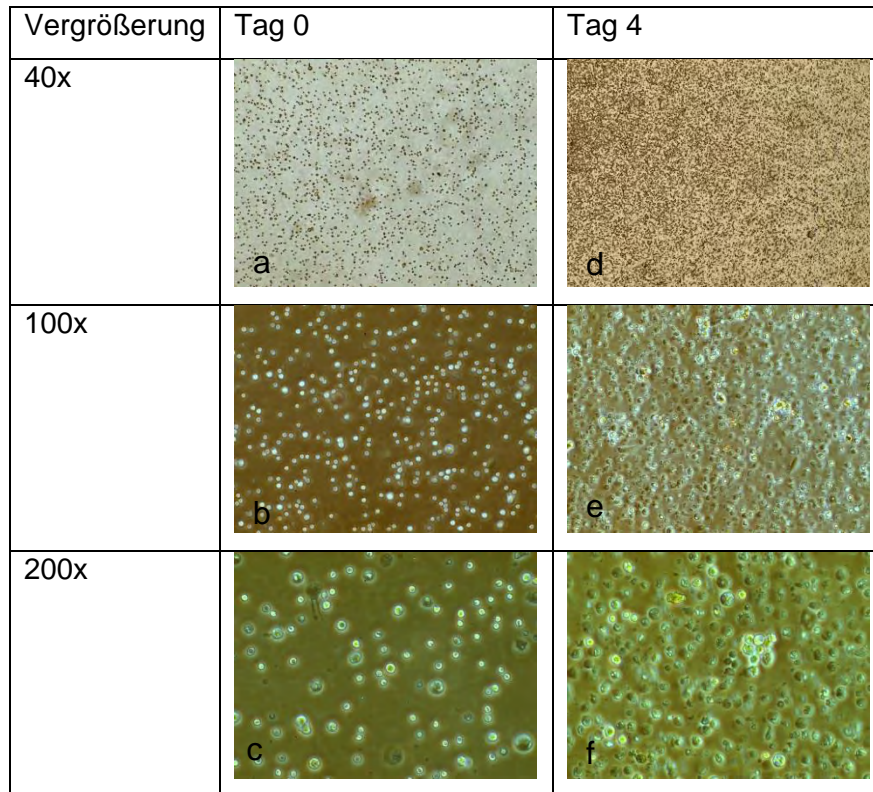
---

**Tabelle 4-1: Clusterbildung der primären, dermalen Zellen aus humanen Hautproben.** Aufgelistet ist die gewonnene Ausbeute, die Kultivierungszeit in Stempro-Medium und die Beurteilung darüber, ob eine Cluster- oder Sphärenbildung oder gar keine Proliferation stattgefunden hat.

<b>Codierung</b>	<b>Ausbeute</b>	<b>Kultivierungszeit in Stempro</b>	<b>Cluster/ Sphärenbildung</b>
22/14	3,4x10 <sup>6</sup>	10 d	Clusterbildung
27/14	3,7x10 <sup>6</sup>	11 d	Clusterbildung
38/14	3,4x10 <sup>6</sup>	11 d	Clusterbildung
40/14	1,3x10 <sup>5</sup>	12 d	Clusterbildung
44/14	1,2x10 <sup>6</sup>	13 d	Keine Proliferation
45/14	2,9x10 <sup>5</sup>	11 d	Keine Proliferation
54/14	8,5x10 <sup>5</sup>	14 d	Clusterbildung
55/14	1,9x10 <sup>5</sup>	11 d	Keine Proliferation
57/14	9,0x10 <sup>5</sup>	17 d	Keine Proliferation
61/14	8,5x10 <sup>5</sup>	17 d	Keine Proliferation
62/14	1,4x10 <sup>6</sup>	14 d	Keine Proliferation
63/14	1,3x10 <sup>6</sup>	12 d	Clusterbildung
65/14	1,3x10 <sup>6</sup>	11 d	Clusterbildung

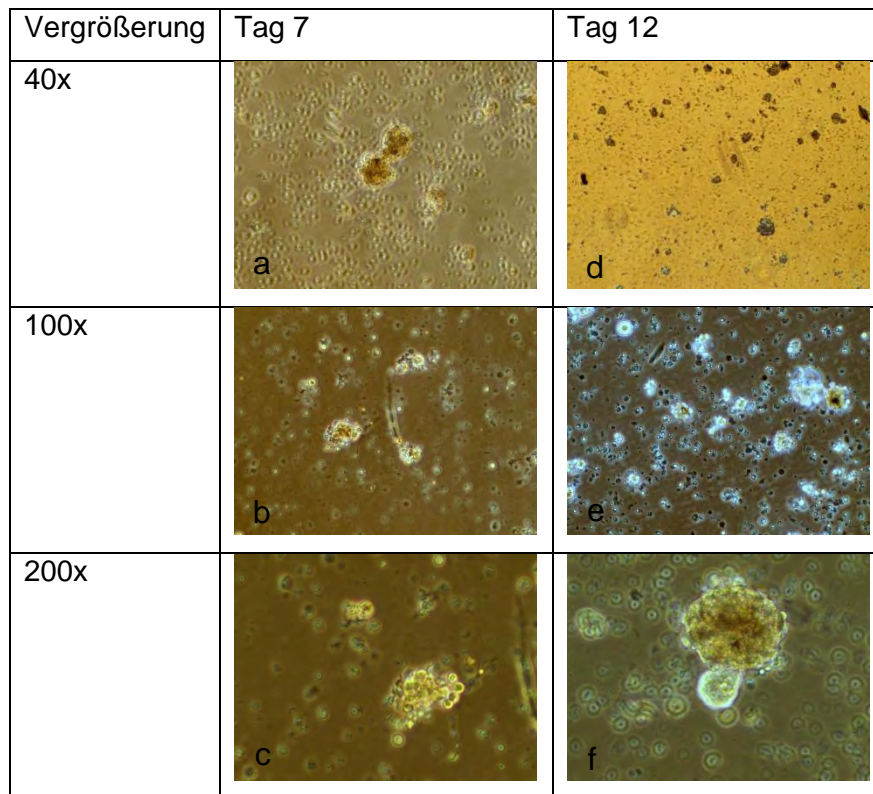
Bei allen angelegten Zellkulturen wurde die Morphologie der Zellen während der Kultivierungsdauer in Stammzellmedium Stempro regelmäßig beobachtet und dokumentiert. Im Folgenden wird der Kultivierungsverlauf exemplarisch anhand der Zellkultur 63/14 dargestellt (Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2).

## Ergebnisse



**Abbildung 4-1: Kultivierungsverlauf der Zellkultur 63/14.** Dargestellt sind die Zellen am Tag der Einsaat (Tag 0: a-c) und an Tag 4 (d-f) der Kultivierung in jeweils 40facher, 100facher und 200facher Vergrößerung.

Aus der Dermis der Hautprobe 63/14 wurden  $1,3 \times 10^6$  Zellen isoliert und in 5 ml Stempro-Medium eingesät. Es lagen zunächst nur Einzelzellen vor (Abbildung 4-1, a-c). Nach 2 Tagen wurde das Medium auf 7 ml aufgestockt. Am vierten Kultivierungstag hatten sich bereits einige Zellen aneinander gelagert und Zellaggregate hatten sich gebildet (Abbildung 4-1, f).



**Abbildung 4-2: Kultivierungsverlauf der Zellkultur 63/14.** Dargestellt sind die Zellen an Tag 7 (a-c) und an Tag 12 (d-f) der Kultivierung in jeweils 40facher, 100facher und 200facher Vergrößerung.

Am siebten Kultivierungstag waren bereits einige Zellcluster zu sehen. Diese waren nicht adhären. Dabei war zu beachten, die Zellcluster von Zellklumpen zu unterscheiden, da nur Zellcluster sich später zu Sphären ausbilden. Zellcluster haben eine rundlichere Form (Abbildung 4-2, a-c). An Tag 12 waren keine Sphären zu beobachten, sondern nur Cluster (Abbildung 4-2, d-f). Diese wurden für die weitere Analyse geerntet.

### 4.1.2. Zelltypen-Charakterisierung der dermalen Zellen durch Immunzytochemie

Um die gewonnenen Zellcluster zu charakterisieren, wurden wie in Kapitel 3.3. beschrieben die in Frage kommenden Zelltypen immunzytochemisch visualisiert. Mit einem Vimentin- und CD90-Antikörper wurde die Anwesenheit von Fibroblasten überprüft. Außerdem wurde auch ein Pan Keratin-Antikörper eingesetzt, um Keratinozyten als Kontamination aus der Epidermis auszuschließen, die bei der Isolierung der dermalen Zellen während der Trennung von Dermis und Epidermis in die Zellkultur verschleppt worden sein könnten. Um zu überprüfen, ob die gebildeten Zellcluster Stammzeleigenschaften aufweisen, wurde die Expression der typischen Stammzellmarker NGFRp75, Nestin und Oct-4A visualisiert. Dargestellt sind jeweils die Zellkulturen, in denen eine Clusterbildung stattfand (Tabelle 4-1).

## Ergebnisse

---

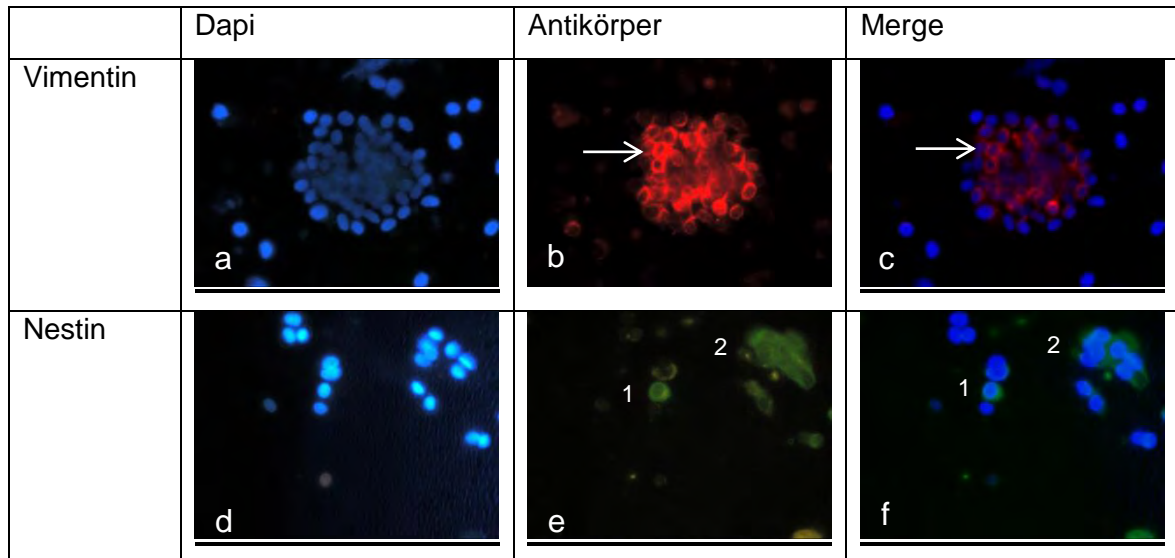
In vier Zellkulturen konnten Vimentin- und CD90-positive Zellen ermittelt werden. In den Kulturen 22/14 und 27/14 lagen nur fixierte Einzelzellen auf den Objektträgern vor, da wahrscheinlich die Zellcluster während des Erntevorganges dissoziiert wurden. In den Zellkulturen 63/14 (Abbildung 4-3, Bild b+c) und 65/14 (Abbildung 4-4, Bild b+c) waren einige Zellen in den Zellclustern Vimentin- und CD90-positiv. Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass Fibroblasten in Stempro-Medium an der Clusterformation mitbeteiligt waren. Da in allen charakterisierten Kulturen nur eine einzige PAN Keratin-positive Zelle gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es durch die enzymatische Trennung von Epidermis und Dermis kaum zu einer Verschleppung von Keratinozyten in die dermalen Zellkulturen kommt (nicht dargestellt).

Nestin-positive Zellen wurden nur in der Zellkultur 63/14 detektiert (Abbildung 4-3, Bild e+f). Eine NGFRp75-positive Expression wurde in den Kulturen 38/14 (nicht dargestellt) und 65/14 (Abbildung 4-4, Bild e+f) vorgefunden. Der embryonale Stammzellmarker Oct-4A konnte in keiner Zellkultur beobachtet werden. In der folgenden Tabelle (Tabelle 4-2) werden die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung zusammenfassend dargestellt. Anschließend werden exemplarisch die Bildaufnahmen des Fluoreszenzmikroskops der Zellkulturen 63/14 und 65/14 abgebildet (Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4).

**Tabelle 4-2: Charakterisierung der primären, dermalen Zellen aus humanen Hautproben.** Aufgelistet sind die Zellkulturen, in denen eine Clusterbildung stattfand und die jeweilige positive (+) oder negative (-) Antigen-Expression.

Codierung	Vimentin	CD90	Pan Keratin	Nestin	NGFRp75	Oct-4A
22/14	+	+	-	-	-	-
27/14	+	+	-	-	-	-
38/14	-	-	-	-	+	-
40/14	-	-	-	-	-	-
54/14	-	-	-	-	-	-
63/14	+	+	-	+	-	-
65/14	+	+	+	-	+	-

## Ergebnisse

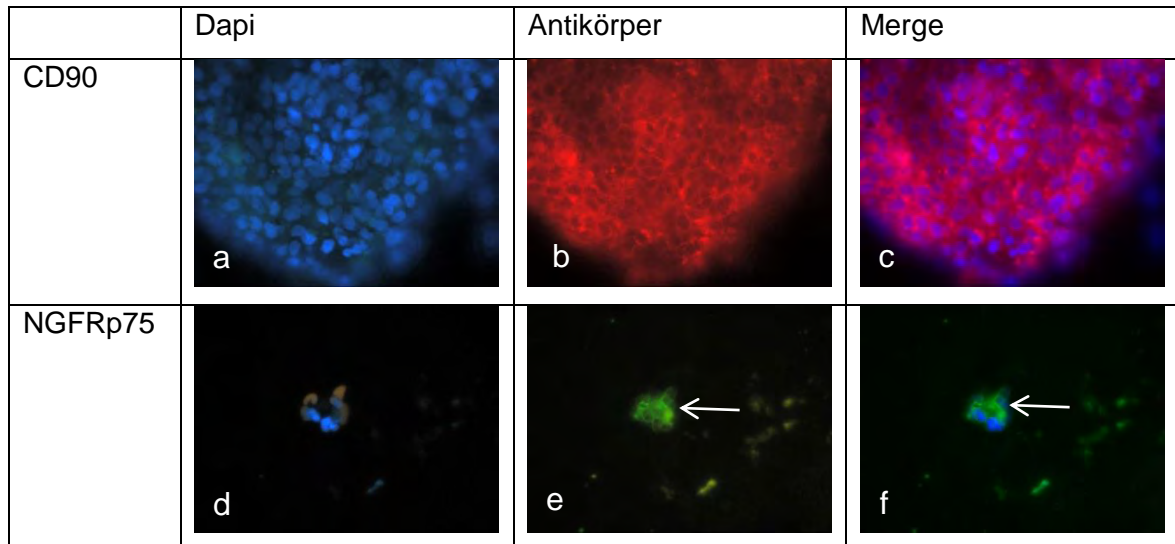


**Abbildung 4-3: Immunzytochemische Färbung von Vimentin und Nestin in der Zellkultur 63/14 nach 12 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium.** (a) Kernfärbung der dermalen Zellen mit Dapi (blau). (b) Immunzytochemische Anfärbung von Vimentin in dermalen Zellen (rot). (c) Bild (a) und (b) wurden zusammengefügt. Vimentin-positive Zellen sind vorhanden (Pfeil). (d) Kernfärbung der dermalen Zellen mit Dapi (blau). (e) Immunzytochemische Anfärbung von Nestin in dermalen Zellen (grün). (f) Bild (d) und (e) wurden zusammengefügt. Nestin-positive Zellen sind vorhanden (1+2). 630-fache Vergrößerung. Belichtungszeit: Dapi: 200 ms, Antikörper: 600 ms.

In allen vorgefundenen Zellclustern der Zellkultur 63/14 waren Vimentin-positive Zellen vorzufinden (Abbildung 4-3, b+c, Pfeil). In insgesamt 3 bis 5 Einzelzellen außerhalb der Zellcluster wurde eine Nestin-positive Färbung detektiert (Abbildung 4-3, e+f, 1+2).



## Ergebnisse



**Abbildung 4-4: Immunzytochemische Färbung von CD90 und NGFRp75 in der Zellkultur 65/14 nach 11 Tagen der Kultivierung in Stempro-Medium.** (a) Kernfärbung der dermalen Zellen mit Dapi (blau). (b) Immunzytochemische Anfärbung von CD90 in dermalen Zellen (rot). (c) Bild (a) und (b) wurden zusammengefügt. CD90-positive Zellen sind vorhanden. (d) Kernfärbung der dermalen Zellen mit Dapi (blau). (e) Immunzytochemische Anfärbung von NGFRp75 in dermalen Zellen (grün). (f) Bild (d) und (e) wurden zusammengefügt. NGFRp75-positive Zellen sind vorhanden (Pfeil). 630-fache Vergrößerung. Belichtungszeit: Dapi: 200 ms, Antikörper: 600 ms.

In den Zellclustern der Zellkultur 65/14 war der Großteil der Zellen CD90-positiv (Abbildung 4-4, b+c). Drei NGFRp75-positive Einzelzellen wurden außerhalb von Sphären gefunden (Abbildung 4-4, e+f, Pfeil). Ansonsten lagen keine NGFRp75-positiven Zellen vor.

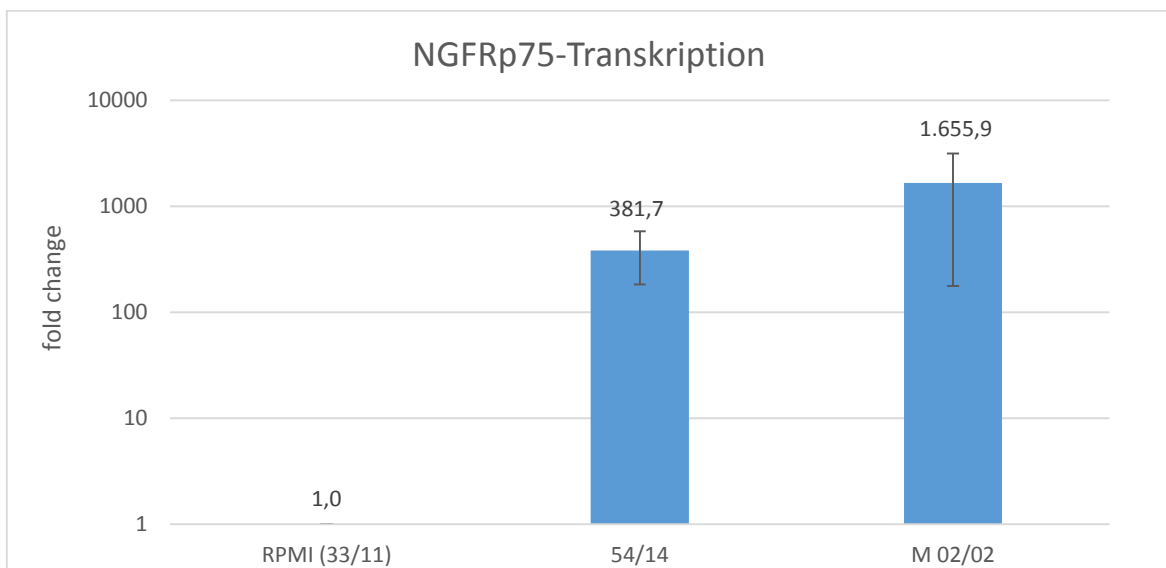
### 4.1.3. Genexpressionsanalyse der dermalen Zellen in Stempro-Medium

Um die Anreicherung dermalen Stammzellen aus den humanen Hautproben nachzuweisen, wurde die Quantifizierung der NGFRp75-, Nestin- und Oct-4A-Transkription durch die Methode der qPCR durchgeführt. Die Zellkultur 54/14, bei der eine Clusterbildung stattfand, stand für die qPCR zur Verfügung, da die Zellen der anderen Zellkulturen ausschließlich für die immunzytochemische Färbung verwendet wurden. Als Positivkontrolle für die Transkription von NGFRp75 und Nestin wurden die Melanomzellen der Kultur M 02/02 (vgl. Kapitel 2.10.) verwendet. Als Positivkontrolle für die Transkription von Oct-4A wurden NCCIT-Zellen eingesetzt (vgl. Kapitel 2.11.). Es wird angenommen, dass Fibroblasten die im Nährmedium RPMI kultiviert wurden, nicht über die Fähigkeit verfügen, die Stammzellmarker NGFRp75, Nestin und Oct-4A zu exprimieren. Deshalb wurden als Referenzzellen Fibroblasten der Kultur FH 33/11 eingesetzt, die in RPMI kultiviert wurden. Im Anhang (Abschnitt I) sind in den Tabellen die Ct-Werte der qPCR zur quantitativen Amplifikation der zu untersuchenden Gene dargestellt. Anhand der Ct-Werte der Proben in Relation zu der Referenzprobe wurde der Faktor (*fold change*) ermittelt, um den die

## Ergebnisse

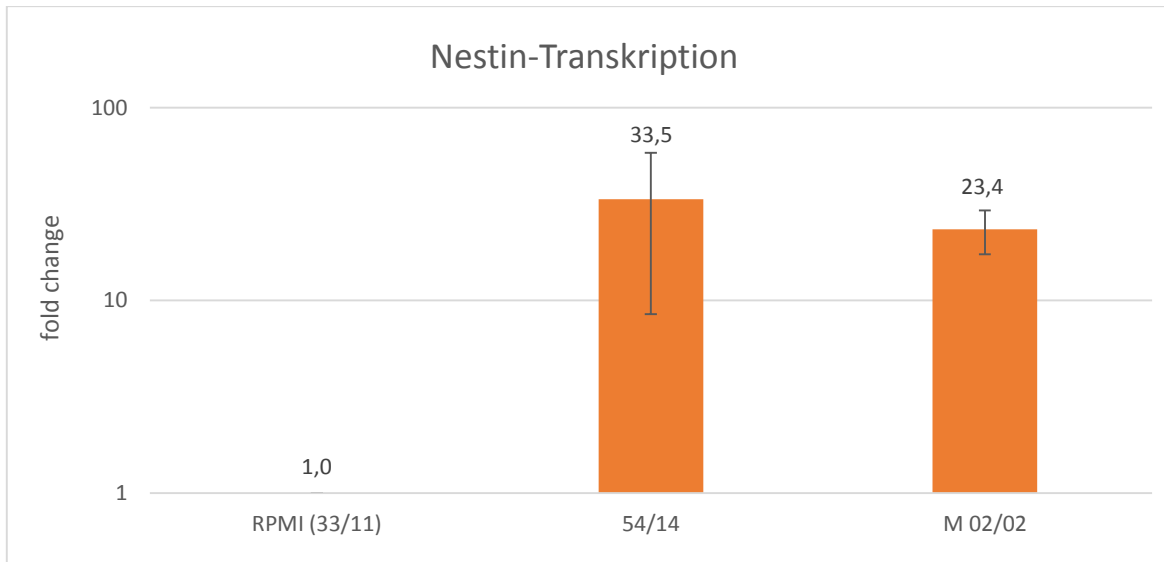
Transkription des jeweiligen Gens im Vergleich zur Referenzprobe verändert ist (vgl. Kapitel 3.5.4.).

In den Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6 ist jeweils der *fold change* im Vergleich zur Referenzprobe (33/11 Fibroblasten in RPMI) dargestellt. Die Berechnung des Faktors wird in Kapitel 3.5.4. aufgeführt. Der hier dargestellte Faktor ist der aus drei durchgeführten qPCR-Läufen gebildete Mittelwert. Die Transkription der Gene wurde jeweils in der Referenzprobe auf 1 gesetzt und in den Abbildungen zum Vergleich und zur besseren Veranschaulichung dargestellt.



**Abbildung 4-5: NGFRp75-Transkription in der Zellkultur 54/14.** Dargestellt ist der Faktor, um den die NGFRp75- Transkription im Vergleich zur Referenzprobe (Fibroblastenzellkultur 33/11 in RPMI kultiviert) verändert ist, sowie die Standardabweichung des Faktors.

In der Zellkultur 54/14 ist eine 381,7fach höhere NGFRp75-Transkription als in der Referenzprobe zu verzeichnen (Abbildung 4-5). Die Positivkontrolle (M 02/02) hingegen zeigt eine 1665,9fach höhere Transkription im Vergleich zu der Referenzprobe und stellt deutlich die hohe Transkription des NGFRp75 in Melanomzellen dar.



**Abbildung 4-6: Nestin-Transkription in der Zellkultur 54/14.** Dargestellt ist der Faktor, um den die Nestin-Transkription im Vergleich zur Referenzprobe (Fibroblastenzellkultur 33/11 in RPMI kultiviert) verändert ist, sowie die Standardabweichung des Faktors.

Die dermalen Zellen der Zellkultur 54/14 zeigen eine 33,5fach höhere Nestin-Transkription als die Fibroblasten in RPMI auf (Abbildung 4-6). Die Melanomzellen weisen eine 23,4fach höhere Transkription als in der Referenzprobe auf. Die Nestin-Transkription liegt in den dermalen Zellen im Mittel sogar etwas höher als in der eingesetzten Positivkontrolle (M 02/02), es liegt jedoch kein signifikanter Unterschied vor.

Auf die Darstellung der Oct-4A-Transkription wurde verzichtet, da nur in einem qPCR-Lauf eine eindeutige Amplifikation des Oct-4A-Gens anhand der Schmelzkurve nachgewiesen werden konnte (siehe Anhang, Abschnitt I). Da die Oct-4A-Transkription nicht reproduziert werden konnte, liegt es nahe, dass bei diesem einen qPCR-Lauf unspezifisch ein Fragment amplifiziert wurde, das eine ähnliche Größe wie das Oct-4A-Transkript hatte und somit eine ähnliche Schmelzkurve zustande kam.

Zusammenfassend konnte in der Zellkultur 54/14 eine, im Vergleich zur Referenzprobe deutlich erhöhte NGFRp75- und Nestin-Transkription nach der Kultivierung der dermalen Zellen in Stempro-Medium ermittelt werden. Oct-4A konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### 4.2. Kultivierung und Charakterisierung primärer, humaner Fibroblasten

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kultivierung und Charakterisierung der primären, humanen Fibroblasten dargestellt. Dabei werden ebenfalls der Kultivierungsverlauf, die Zelltyp-Charakterisierung und die Ergebnisse der qPCR erläutert.

#### 4.2.1. Kultivierungsverlauf primärer, humaner Fibroblasten

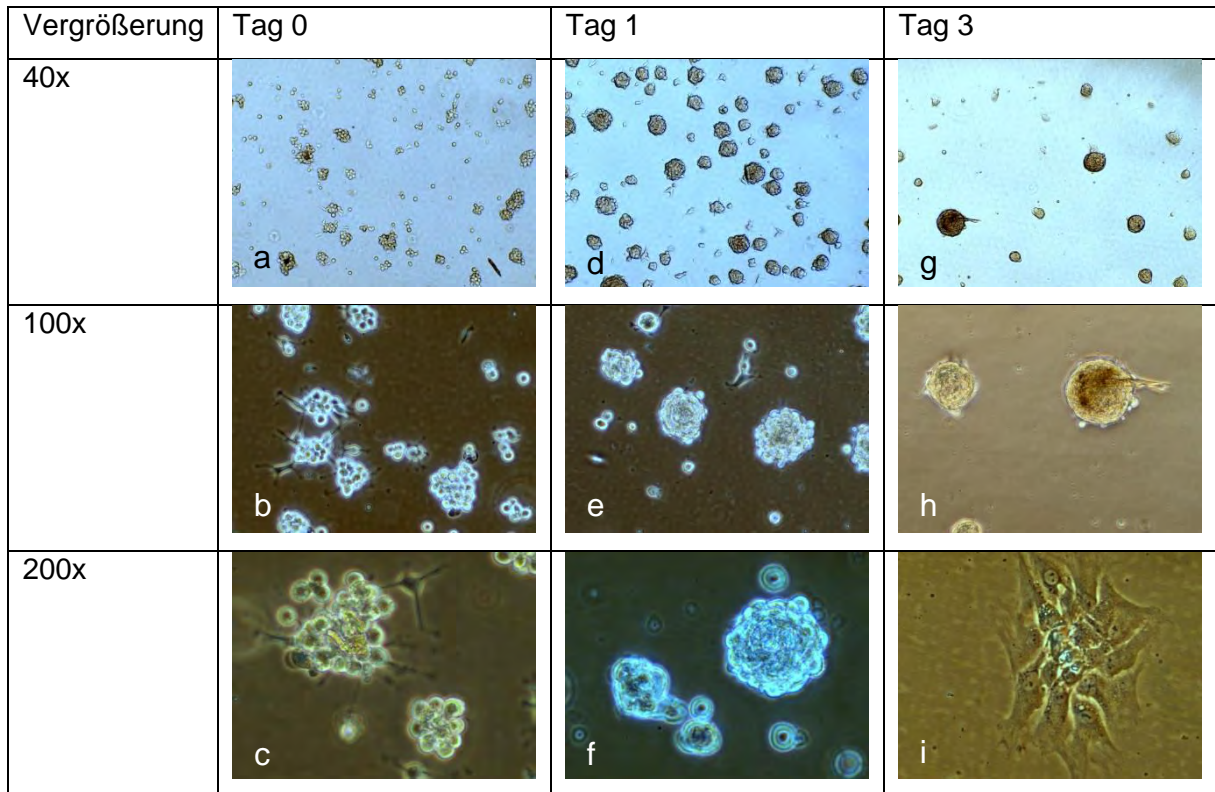
Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt drei Fibroblastenzellkulturen angelegt und im Nährmedium RPMI bis zu einer Konfluenz von 90 % bis 100 % kultiviert (vgl. Kapitel 3.1.4.). Anschließend wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in Stempro-Medium umgesetzt und darauf untersucht, ob eine Sphärenbildung stattfindet. Alle drei angelegten Fibroblastenzellkulturen bildeten in Stempro-Medium bereits nach drei Tagen deutlich erkennbare Sphären. In der folgenden Tabelle sind die Kultivierungsdaten und die Ergebnisse der Sphärenbildung zusammengefasst.

**Tabelle 4-3: Codierung der primären Fibroblasten.** Aufgelistet ist die Kultivierungszeit in den Medien, die Zellzahl bei der Einsaat in Stempro-Medium und die Beurteilung darüber, ob eine Sphärenbildung stattfand.

<b>Codierung</b>	<b>Kultivierungszeit in RPMI</b>	<b>Zelleinsaat in Stempro</b>	<b>Kultivierungszeit in Stempro</b>	<b>Sphärenbildung</b>
FH 7/11	10 d	$1 \times 10^6$	7 d	Sphärenbildung
FH 33/11	22 d	$1 \times 10^6$	7 d	Sphärenbildung
FH 20/02+21/11	15 d	$1 \times 10^6$	8 d	Sphärenbildung

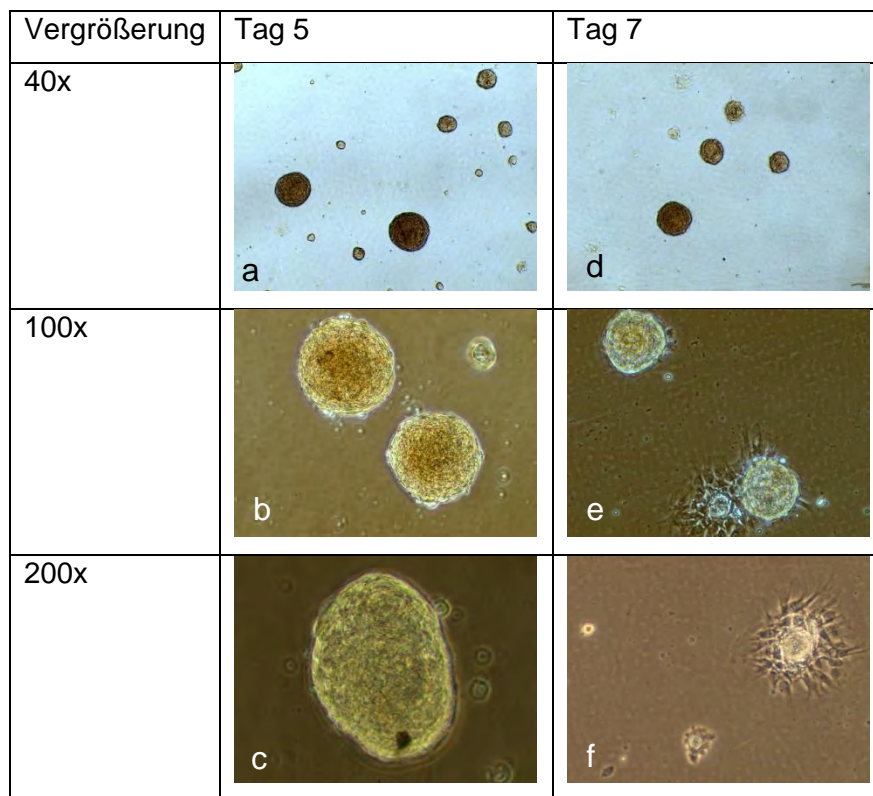
In allen drei untersuchten Fibroblastenzellkulturen wurde die Morphologie der Zellen während der Kultivierungszeit in dem Stammzellmedium Stempro regelmäßig beobachtet und dokumentiert. Da sich die Morphologie der Fibroblasten in allen drei Kulturen sehr ähnlich verhielt, wird exemplarisch die Fibroblastenzellkultur 7/11 dargestellt (Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8).

## Ergebnisse



**Abbildung 4-7: Kultivierungsdauer der Fibroblastenzellkultur 7/11.** Dargestellt sind die Zellen am Tag der Einsaat (Tag 0: a-c) an Tag 1 (d-f) und an Tag 3 (g-i) der Kultivierung in jeweils 40facher, 100facher und 200facher Vergrößerung.

Am Tag der Einsaat wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in eine T25-Kulturflasche mit dem Stammzellmedium Stempro umgesetzt. Viele Einzelzellen hatten sich bereits aneinander gelagert (Abbildung 4-7, a-c). Nach einem Tag Kultivierung waren bereits Zellcluster zu erkennen (Abbildung 4-7, d-f). Am dritten Kultivierungstag waren eindeutig Sphären mit einem klar abgegrenzten Rand zu beobachten, die zum größten Teil nicht adhärent waren (Abbildung 4-7, g+h). Es wurden auch Zellen beobachtet, die adhärent waren. Diese zeigten eine ausgebreitete, Fibroblasten-ähnliche Morphologie (Abbildung 4-7, i).



**Abbildung 4-8: Kultivierungsverlauf der Fibroblastenzellkultur 7/11.** Dargestellt sind die Zellen an Tag 5 (a-c) und an Tag 7 (d-f) der Kultivierung in jeweils 40facher, 100facher und 200facher Vergrößerung.

An Tag 5 waren die meisten Sphären semi-adhären. Einige Sphären waren noch im Überstand vorzufinden (Abbildung 4-8, a-c). An Tag 7 blieb ein großer Teil der Sphären semi-adhären erhalten und ein Teil wurde adhären (Abbildung 4-8, d+e). Der Grund zur Adhärenz der Zellen könnte in der Größe der Sphären liegen, wodurch sie auf den Flaschenboden abgesunken sind. Somit hatten sie die Möglichkeit adhären zu werden und aus der Sphäre herauszuwachsen, wodurch sie um sich herum Zellfortsätze gebildet haben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich eine Sphäre an eine adhärenente Fibroblastenkolonie angeheftet hat (Abbildung 4-8, e+f).

### 4.2.2. Zelltypen-Charakterisierung der primären, humanen Fibroblasten

Um die gewonnenen Sphären zu charakterisieren, wurden wie in Kapitel 3.3. beschrieben die in Frage kommenden Zelltypen immunzytochemisch visualisiert. Mit einem Vimentin-Antikörper wurde überprüft, ob die Vimentin-Expression der Fibroblasten in Stempro-Medium erhalten geblieben ist. Um zu überprüfen, ob die gebildeten Sphären Stammzeleigenschaften aufwiesen, wurde die Expression der typischen Stammzellmarker NGFRp75, Nestin und Oct-4A durch entsprechende Antikörper überprüft. Als Referenzproben wurden Fibroblasten eingesetzt, die im Nährmedium RPMI kultiviert worden sind. Diese wurden ebenfalls immunzytochemisch mit Vimentin, Nestin, NGFRp75

## Ergebnisse

---

und Oct-4A gefärbt. Da die Kontamination mit Melanozyten bei der Anzucht von Fibroblasten (vgl. Kapitel 3.1.3.) in RPMI-Medium nicht auszuschließen ist, sollte mit dem Vimentin-Antikörper überprüft werden, wie hoch der Anteil an Fibroblasten tatsächlich in den aufgetauten Fibroblastenzellkulturen war. Zum anderen sollte mit den Stammzellmarkern kontrolliert werden, inwieweit das Kultivieren der Fibroblasten in Stempro-Medium einen Zuwachs an Stammzellmarker-Expression hervorgerufen hat. Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen tabellarisch zusammengefasst. Färbungen, die nicht eindeutig positiv oder negativ eingestuft werden konnten, sind in den Tabellen mit n.e. (nicht eindeutig) gekennzeichnet. Exemplarisch werden die Bildaufnahmen des Fluoreszenzmikroskops der Kulturen 7/11 (Abbildung 4-9 und Abbildung 4-10) sowie 20/02+21/11 (Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12) im Vergleich mit der jeweiligen Referenzprobe abgebildet.

Alle drei Fibroblastenzellkulturen wiesen nach der Kultivierung in RPMI in der Mehrheit der Zellen eine positive Vimentin-Expression auf. In den Kulturen 7/11 und 33/11 konnte eine schwache und somit nicht eindeutige Nestin-Expression detektiert werden. NGFRp75 und Oct-4A konnten erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden (Tabelle 4-4).

**Tabelle 4-4: Charakterisierung primärer, humaner Fibroblasten in RPMI-Medium.** Aufgelistet sind die verwendeten Fibroblastenzellkulturen, die als Referenz immunzytochemisch gefärbt wurden und die jeweilige positive (+) oder negative (-) Antigen-Expression.

Codierung	Vimentin	Nestin	NGFRp75	Oct-4A
FH 7/11	+	n.e.	-	-
FH 33/11	+	n.e.	-	-
FH 20/02+21/11	+	-	-	-

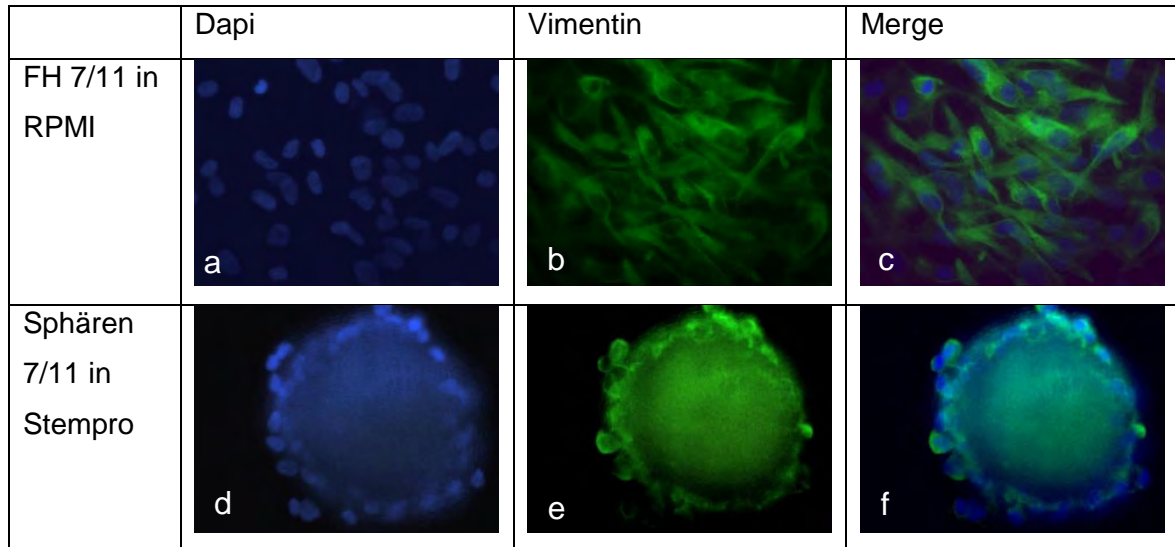
In den Zellen der Sphären aller drei Kulturen, die in Stempro-Medium kultiviert wurden, war eine positive Vimentin-Expression zu vermerken. Die Nestin-Expression konnte in der Kultur 7/11 eindeutig detektiert werden, wohingegen sie in den Kulturen 33/11 und 20/02+21/11 nicht eindeutig nachzuweisen war. Die Expression der Marker NGFRp75 und Oct-4A war in keiner Kultur immunzytochemisch zu visualisieren (Tabelle 4-5).

**Tabelle 4-5: Charakterisierung primärer, humaner Fibroblasten in Stempro-Medium.** Aufgelistet sind die Zellkulturen, in denen eine Sphärenbildung in Stempro-Medium stattfand und ob die jeweilige Antigen-Expression positiv (+) oder negativ (-) war.

Codierung	Vimentin	Nestin	NGFRp75	Oct-4A
FH 7/11	+	+	-	-
FH 33/11	+	n.e.	-	-
FH 20/02+21/11	+	n.e.	-	-



## Ergebnisse

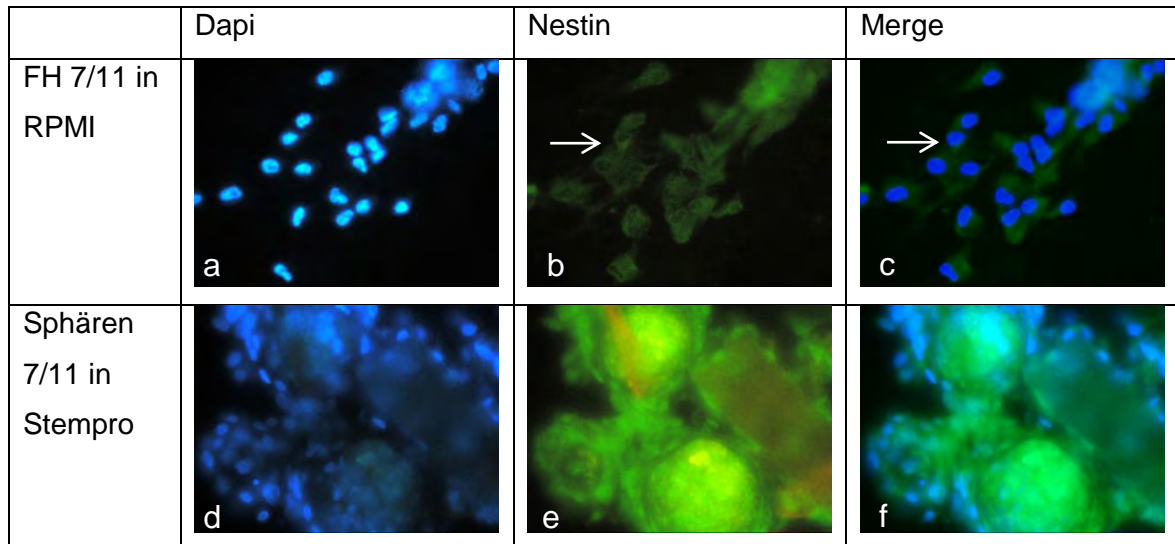


**Abbildung 4-9: Immunzytochemische Färbung von Vimentin in der Fibroblastenzellkultur 7/11 nach 10 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 7 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium.** (a) Kernfärbung der RPMI-Fibroblasten auf Culture Slides mit Dapi (blau). (b) Immunzytochemische Anfärbung von Vimentin in RPMI-Fibroblasten auf Culture Slides (grün). (c) Bild (a) und (b) wurden zusammengefügt. Vimentin-positive Zellen sind vorhanden. (d) Kernfärbung der Stempro-Sphären mit Dapi (blau). (e) Immunzytochemische Anfärbung von Vimentin in Stempro-Sphären (grün). (f) Bild (d) und (e) wurden zusammengefügt. Vimentin-positive Zellen sind vorhanden. 630-fache Vergrößerung. Belichtungszeit: Dapi: 200 ms, Vimentin: 600 ms.

Die überwiegende Anzahl an Fibroblasten der Kultur 7/11 war nach der Kultivierung in RPMI-Medium Vimentin-positiv (Abbildung 4-9, b+c). Nach Kultivierung in Stempro-Medium waren alle Zellen in den Sphären deutlich Vimentin-positiv (Abbildung 4-9, e+f).



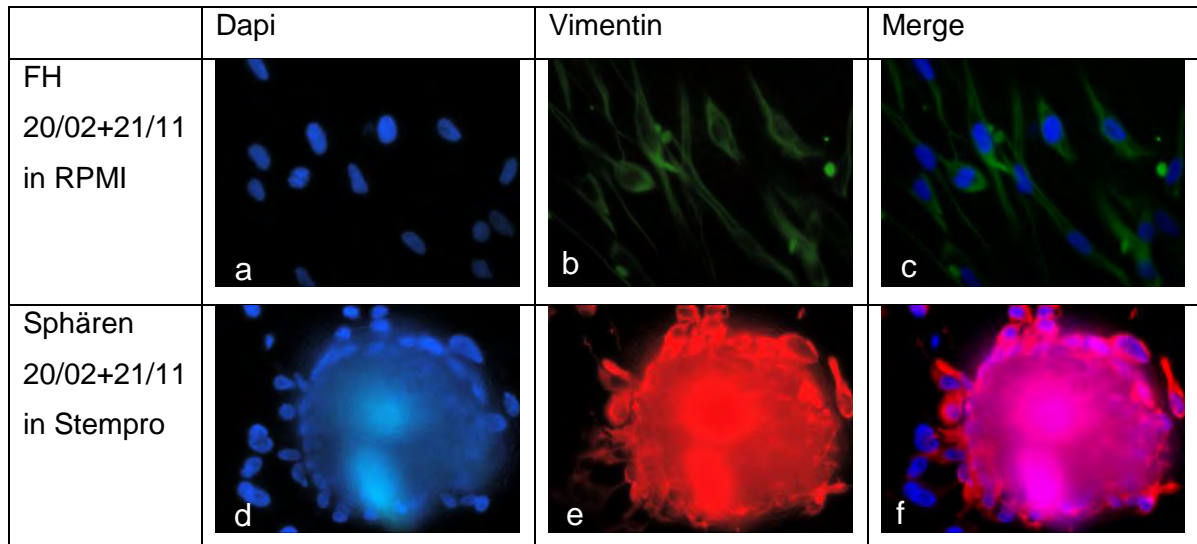
## Ergebnisse



**Abbildung 4-10: Immunzytochemische Färbung von Nestin in der Fibroblastenzellkultur 7/11 nach 10 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 7 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium.** (a) Kernfärbung der RPMI-Fibroblasten auf Culture Slides mit Dapi (blau). (b) Immunzytochemische Anfärbung von Nestin in RPMI-Fibroblasten auf Culture Slides (grün). (c) Bild (a) und (b) wurden zusammengefügt. Nestin-positive Zellen sind nicht eindeutig zu detektieren (Pfeil). (d) Kernfärbung der Stempro-Sphären mit Dapi (blau). (e) Immunzytochemische Anfärbung von Nestin in Stempro-Sphären (grün). (f) Bild (d) und (e) wurden zusammengefügt. Nestin-positive Zellen sind vorhanden. 630-fache Vergrößerung. Belichtungszeit: Dapi: 200 ms, Nestin: 600 ms.

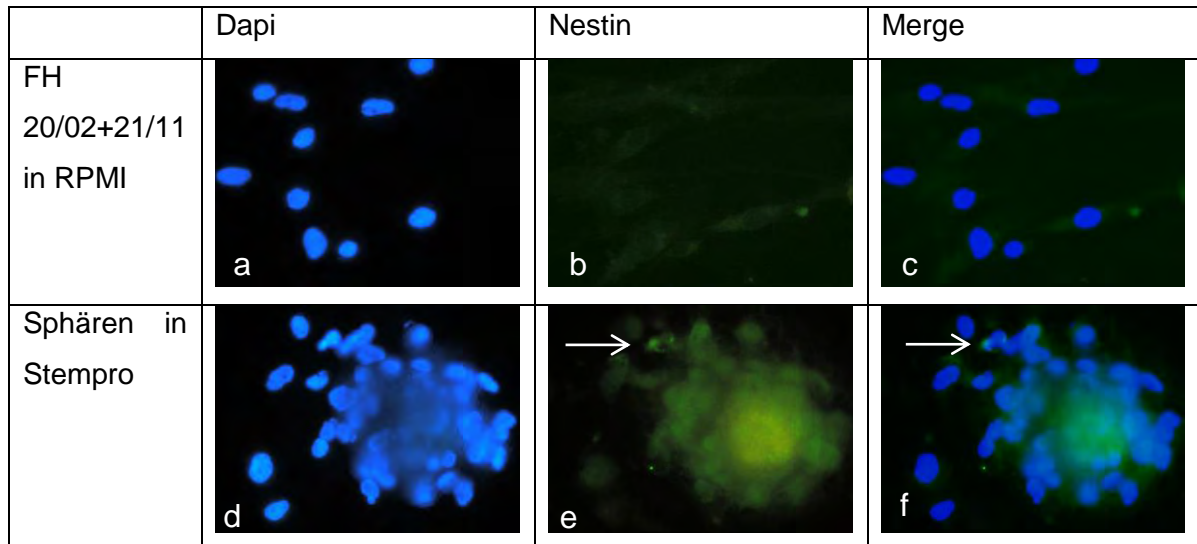
Nach der Kultivierung in RPMI-Medium ist in der Kultur 7/11 in einigen Zellen um den Zellkern vereinzelt eine grüne Fluoreszenz zu sehen. Bei der Auswertung der Nestin-Färbung wurden nur Zellen als echt-positiv eingestuft, die eine deutlich erkennbare Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma aufwiesen und nicht auf dem Zellkern. Somit können die Fibroblasten in RPMI aufgrund ihrer schwachen und vereinzelt Fluoreszenz nicht als eindeutig positiv eingestuft werden (Abbildung 4-10, b+c, Pfeil). Die Sphären waren hingegen eindeutig Nestin-positiv (Abbildung 4-10, e+f).

## Ergebnisse



**Abbildung 4-11: Immunzytochemische Färbung von Vimentin in der Fibroblastenzellkultur 20/02+21/11 nach 15 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 8 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium.** (a) Kernfärbung der RPMI-Fibroblasten auf Culture Slides mit Dapi (blau). (b) Immunzytochemische Anfärbung von Vimentin in RPMI-Fibroblasten auf Culture Slides (grün). (c) Bild (a) und (b) wurden zusammengefügt. Vimentin-positive Zellen sind vorhanden. (d) Kernfärbung der Stempro-Sphären mit Dapi (blau). (e) Immunzytochemische Anfärbung von Vimentin in Stempro-Sphären (rot). (f) Bild (d) und (e) wurden zusammengefügt. Vimentin-positive Zellen sind vorhanden. 630-fache Vergrößerung. Belichtungszeit: Dapi: 200 ms, Vimentin: 600 ms.

Nach der Kultivierung in RPMI-Medium waren alle Zellen der Fibroblastenzellkultur 20/02+21/11 Vimentin-positiv (Abbildung 4-11, b+c). Nach der Kultivierung in Stempro-Medium waren die Sphären ebenfalls deutlich Vimentin-positiv. Die Färbung fand mit dem roten Fluorochrom Alexa Fluor 596 statt, welches an seinem entsprechenden Sekundärantikörper gekoppelt ist (Abbildung 4-11, e+f). Die immunzytochemische Vimentin-Färbung in den RPMI-Fibroblasten (Abbildung 4-11, b+c) sowie die vorherigen Vimentin-Färbungen fanden mit dem grünen Fluorochrom Alexa Fluor 488 statt.



**Abbildung 4-12: Immunzytochemische Färbung von Nestin in der Fibroblastenzellkultur 20/02+21/11 nach 15 Tagen Kultivierung in RPMI-Medium und nach 8 Tagen Kultivierung in Stempro-Medium.** (a) Kernfärbung der RPMI-Fibroblasten auf Culture Slides mit Dapi (blau). (b) Immunzytochemische Anfärbung von Nestin in RPMI-Fibroblasten (grün). (c) Bild (a) und (b) wurden zusammengefügt. Nestin-positive Zellen sind nicht vorhanden. (d) Kernfärbung der Stempro-Sphären mit Dapi (blau). (e) Immunzytochemische Anfärbung von Nestin in Stempro-Sphären (grün). (f) Bild (d) und (e) wurden zusammengefügt. Eine Nestin-positive Zelle ist vorhanden (Pfeil). 630-fache Vergrößerung. Belichtungszeit: Dapi: 200 ms, Nestin: 600 ms.

Nach der Kultivierung der Fibroblasten in RPMI-Medium konnte keine Nestin-positive Zelle detektiert werden (Abbildung 4-12, b+c). Die Sphären waren, wie auch in der Kultur FH 33/11 (Tabelle 4-5), nach der Kultivierung in Stempro-Medium nicht eindeutig Nestin-positiv, denn die grüne Fluoreszenz war schwach und nur stellenweise im Zytoplasma der Zellen zu sehen. Einige wenige Zellen wiesen eine etwas höhere grüne Farbintensität im Zytoplasma auf (Abbildung 4-12, e+f, Pfeil).

#### 4.2.3. Genexpressionsanalyse primärer, humaner Fibroblasten

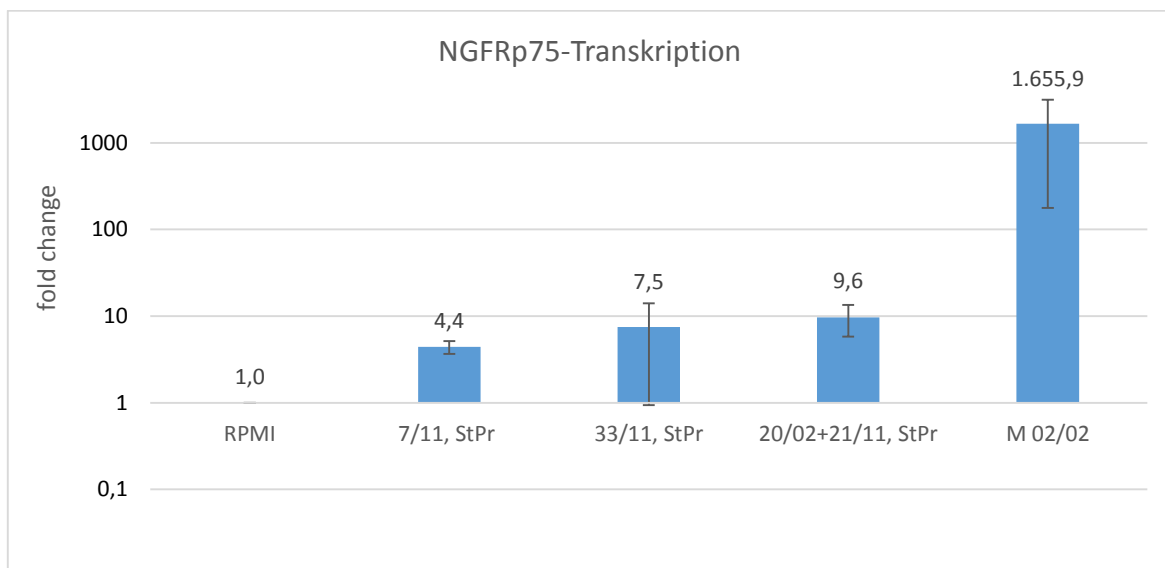
Um zu überprüfen, ob die Kultivierung in Stempro-Medium die Transkription der Stammzellmarker in den aus Fibroblasten formierten Sphären erhöht, wurde durch die Methode der qPCR die Transkription von NGFRp75, Nestin und Oct-4A quantifiziert.

In allen drei Fibroblastenzellkulturen haben sich in Stempro-Medium dreidimensionale Sphären gebildet, wodurch aus allen drei Zellkulturen ausreichend Material für die Methode der qPCR zur Verfügung stand. Als Positivkontrolle wurden für die Transkription von NGFRp75 und Nestin Melanomzellen der Kultur M 02/02 (vgl. Kapitel 2.10.) verwendet. Für die Transkription von Oct-4A wurden NCCIT-Zellen als Positivkontrolle eingesetzt (vgl. Kapitel 2.11.). Als Referenzzellen wurden die jeweiligen Fibroblasten, die im Nährmedium RPMI kultiviert worden sind, eingesetzt.

## Ergebnisse

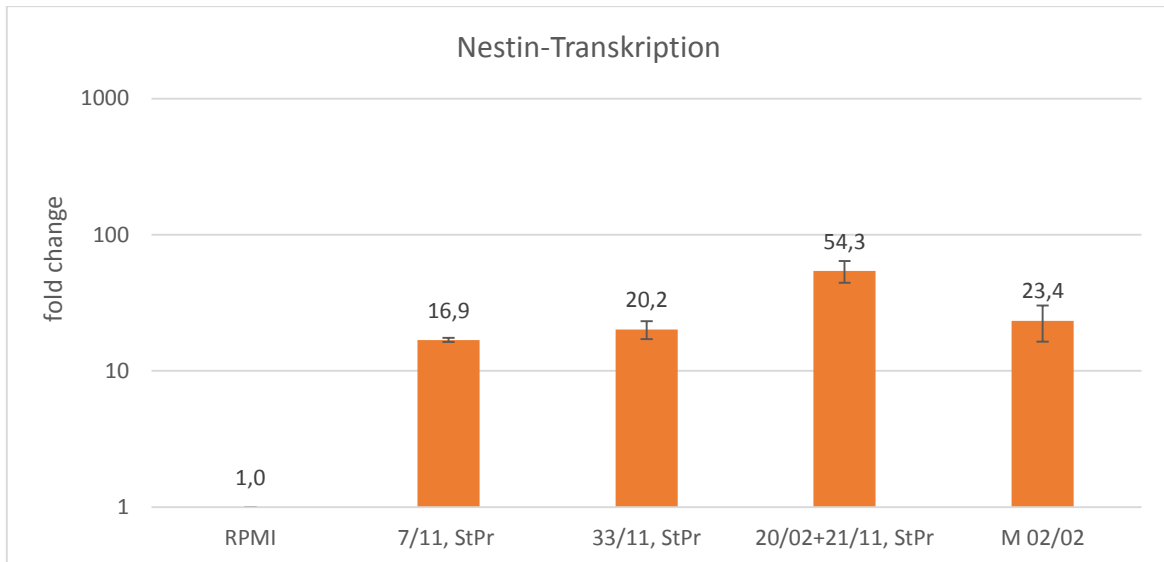
Im Anhang (Abschnitt II) sind in den Tabellen die Ct-Werte der qPCR zur quantitativen Amplifikation der zu untersuchenden Gene dargestellt. Anhand der Ct-Werte wurde der *fold change* (vgl. Kapitel 3.5.4.) ermittelt.

In Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14 ist jeweils der Faktor (*fold change*) dargestellt, um den die Transkription des jeweiligen Gens im Vergleich zur Referenzprobe verändert ist. Der hier dargestellte Faktor ist der aus drei durchgeführten qPCR-Läufen gebildete Mittelwert. Die Transkription der Gene wurde jeweils bei der Referenzprobe auf 1 gesetzt und in den Abbildungen zum Vergleich und zur besseren Veranschaulichung dargestellt.



**Abbildung 4-13: NGFRp75-Transkription in den Fibroblastenzellkulturen.** Dargestellt ist der Faktor, um den die NGFRp75-Transkription im Vergleich zur jeweiligen Referenzprobe verändert ist, sowie die Standardabweichung des Faktors.

Nach der Kultivierung in Stempro-Medium ist in allen drei Fibroblastenzellkulturen eine erhöhte NGFRp75-Transkription nachzuweisen. In Probe 7/11, StPr ist eine 4,4fach erhöhte NGFRp75-Transkription und in Probe 33/11, StPr eine 7,5fach erhöhte NGFRp75-Transkription zu detektieren. Den höchsten Zuwachs verzeichnet die Probe 20/02+21/11, StPr mit einer 9,6fach erhöhten Transkription. Die Positivkontrolle M 02/02 zeigt eine 1665,9fach höhere Transkription im Vergleich zu der Referenzprobe und stellt deutlich die hohe Transkription des NGFRp75 in Melanomzellen dar.



**Abbildung 4-14: Nestin-Transkription in den Fibroblastenzellkulturen.** Dargestellt ist der Faktor, um den die Nestin-Transkription im Vergleich zur jeweiligen Referenzprobe verändert ist, sowie die Standardabweichung des Faktors.

In allen drei Fibroblastenzellkulturen ist eine positive und erhöhte Nestin-Transkription zu detektieren. Die Proben 7/11, StPr und 33/11, StPr verzeichnen eine Erhöhung der Nestin-Transkription um das 16,9fache und 20,2fache im Vergleich zu ihrer jeweiligen Referenzprobe. In Probe 20/02+21/11, StPr ist die Nestin-Transkription durch die Kultivierung in Stempro-Medium um das 54,3fache gestiegen. Diese liegt höher als die Nestin-Transkription in der Positivkontrolle M 02/02 (23,4fach).

Eine Oct-4A-Transkription konnte in keiner Fibroblastenzellkultur nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abschnitt II). Die Schmelzkurvenanalysen der jeweiligen Proben haben auf Primerdimere hingewiesen und wurden somit aus der Bewertung ausgeschlossen.

Zusammenfassend konnte in allen drei Fibroblastenzellkulturen deutlich der Zuwachs an NGFR $\alpha$ 75- und Nestin-Transkription nach Kultivierung in Stempro-Medium nachgewiesen werden. Anhand der immunzytochemischen Färbung und der niedrigen Ct-Werte bei der qPCR wird die Expression von Nestin in Fibroblasten der Haut nach der Kultivierung in RPMI vermutet. Oct-4A konnte in keiner Fibroblastenzellkultur detektiert werden.

### 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung, Anreicherung und Charakterisierung von dermalen Stammzellen aus adulten humanen Hautproben. Als Nachweis der Anreicherung sollten die Stammzellmarker Nestin, NGFRp75 und Oct-4A mittels immunzytochemischer Färbung und qPCR ermittelt werden.

Darüber hinaus sollten Fibroblasten, die sich im Stammzellmedium Stempro zu Sphären formiert hatten, charakterisiert werden. Um zu überprüfen, ob die Fibroblasten durch das Kultivieren in Stempro-Medium Stammzeleigenschaften erworben haben, wurde auch hier die Expression der Stammzellmarker Nestin, NGFRp75 und Oct-4A mittels immunzytochemischer Färbung und qPCR ermittelt und mit einer Referenzkultur in normalem Medium verglichen.

#### 5.1. Anreicherung dermalen Stammzellen aus humanen, primären Hautproben

Das Protokoll von Li et al. (2010) wurde für die Untersuchung im Labor für molekulare Zellbiologie modifiziert (vgl. Kapitel 3.1.6.). Es konnte zu 53 % (in 7 von 13 Hautproben) eine Clusterbildung der dermalen Zellen aus humanen Hautproben in Stempro-Medium erzielt werden. Eine Sphärenbildung war in keiner der 13 angelegten Kulturen zu beobachten. Im Vergleich dazu wurde in der Arbeit von Li et al. eine Sphärenbildung zu 79 % (in 19 von 24 Hautproben) in HESCM4-Medium beobachtet.

Ein Grund für die nicht vorhandene Sphärenbildung könnte die relativ geringe Zellausbeute aus den Hautproben sein. Die Zelldichte hat einen Einfluss auf das Zellwachstum. Um die primäre Sphärenbildung zu veranlassen, sollte mit hohen Zelldichten begonnen werden. Nach dem Umsetzen der Sphären sollte mit niedrigerer Zelldichte kultiviert werden, um Zellfusion und Zellaggregation zu vermeiden (Pastrana et al. 2011). Um die Zellausbeute zu erhöhen, muss das Protokoll zur Isolierung dermalen Stammzellen in weiterführenden Versuchen modifiziert werden. In einem ersten Schritt sollte dabei zur Ablösung der Epidermis, wie bei Li et al. (2010) beschrieben, durch Inkubation in 5 ml 0,48%iger Dispase II-Lösung bei 4 °C über Nacht mit anschließender fünfminütiger Inkubation bei 37°C anstatt in Thermolysin bei 4 °C für 4 Stunden erfolgen. Eine etwas höhere Ausbeute an Zellen konnte in den Proben 63/14 und 65/14 bereits durch die Inkubation der Haut in Collagenase IV bei RT auf dem Laborschüttler erzielt werden. Dieses Verfahren sollte beibehalten werden.

Von den sieben Kulturen in denen Zellcluster nachgewiesen wurden, zeigten vier einen hohen Anteil an Fibroblasten (Vimentin- oder CD90-positive Zellen). Diese lagen sowohl als Einzelzellen als auch in den formierten Clustern vor. Die Stammzellmarker Nestin und

NGFRp75 konnten nur vereinzelt in Zellen außerhalb der Cluster nachgewiesen werden. Eine Oct-4A-Expression konnte in keiner der Kulturen nachgewiesen werden. In der Arbeit von Li et al. war die Mehrheit der Zellen in den dermalen Sphären Nestin- und NGFRp75-positiv. Außerdem waren die Zellen in den dermalen Sphären und nicht die umliegenden Einzelzellen NGFRp75-positiv. Einige NGFRp75-positive Zellen exprimierten ebenfalls das Oct-4A Protein (Li et al. 2010). Möglicherweise handelt es sich bei den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Nestin- und NGFRp75-positiven Zellen um Einzelzellen aus Clustern, die beim Spotten dissoziiert sind.

In weiterführenden Untersuchungen wurde die sehr viel empfindlichere Methode der Genexpressionsanalyse mittels PCR eingesetzt. Der Nachweis von Oct-4A erwies sich aufgrund der unterschiedlichen Transkriptvarianten und der Pseudogene sowie der niedrigen Konzentration als schwierig und konnte durch die angewendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Da das Oct-4A-Protein ein ausschlaggebendes Indiz für den Stammzellcharakter einer Zelle ist, empfiehlt es sich die Nachweismethoden zu optimieren. Allerdings zeigte die untersuchte Probe (54/14) in der Genexpressionsanalyse eine deutlich erhöhte Nestin- und NGFRp75-Expression im Vergleich zu normal kultivierten Fibroblasten. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Anreicherung dermalen Stammzellen durch Kultivierung in Stammzellmedium (Stempro) gelungen ist. Bei der Diskussion der Daten muss außerdem berücksichtigt werden, dass die dermalen Zellen in der vorliegenden Arbeit aus haarreichen Hautarealen gewonnen wurden, wodurch die Anreicherung von Haarfollikel-Stammzellen nicht auszuschließen ist. Li et al. verwendeten neonatale Vorhaut, die keine Haarfollikel aufweist.

### **5.2. Charakterisierung der in Stempro-Medium aus Fibroblasten gebildeten Sphären**

In der Arbeit von Li et al. wird beschrieben, dass Fibroblasten, die in konditioniertem Stammzellmedium (HESCM4-Medium) kultiviert wurden stark proliferierten, aber keine Sphären bildeten. Im Gegensatz dazu zeigte sich in allen drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fibroblastenzellkulturen in Stempro-Medium nach durchschnittlich drei Tagen Sphären. Um das Phänomen der Sphärenbildung von Fibroblasten zu untersuchen, wurden als Referenzzellen Fibroblasten eingesetzt, die im RPMI-Medium kultiviert wurden. So wurde ein Vergleich zwischen Wachstumsbedingungen, die das Stammzellwachstum fördern (Kultivierung in Stempro-Medium) mit normalen Kulturbedingungen möglich.

Immunzytochemisch konnte unter keiner der beiden Wachstumsbedingungen eine Expression der Stammzellmarker NGFRp75 und Oct-4A nachgewiesen werden. Dagegen zeigte sich schon in den RPMI-Kulturen eine schwache, nicht eindeutige Nestin-Expression,

die allerdings in der Genexpressionsanalyse durch PCR eindeutig nachweisbar war (siehe Anhang, Abschnitt II). Erwartungsgemäß sollte Nestin als Multipotenzmarker nur in Stamm- und Vorläuferzellen vorkommen und nicht in Fibroblasten unter normalen Kulturbedingungen. Einen möglichen Ansatz der Erklärung für dieses Ergebnis bietet der Vergleich mit der Arbeit von Lorenz et al. (2008).

In der Arbeit von Lorenz et al. wurden mesenchymale Stammzeleigenschaften von Fibroblasten aus der Dermis dargestellt. Das Resultat der Arbeit beschreibt, dass die Dermis aus einer dominierenden und den mesenchymalen Stammzellen-ähnlichen Fibroblastenpopulation (FmSCs) besteht. Hervorzuheben ist, dass FmSCs Vimentin und Nestin exprimieren, was als Indiz für deren mesenchymalen Ursprung steht. Mesenchymale Vorläuferzellen reaktivieren ihre Nestin-Expression bei Gewebeerletzung. Es wird vermutet, dass selbst durch die Isolation der Fibroblasten aus der Dermis diese Mechanismen und somit die FmSCs aktiviert werden. Die schwache Nestin-Expression der FmSCs bestätigt diese Vermutung (Lorenz et al., 2008).

Der Vergleich mit den Ergebnissen von Lorenz et al. (2008) kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass auch in der vorliegenden Arbeit die schwache Nestin-Expression auf die Anwesenheit einer mesenchymalen Stammzell-ähnlichen Fibroblastenpopulation (FmSCs) in den verwendeten Fibroblastenzellkulturen zurück zu führen ist. Dermale Fibroblasten scheinen aus einer heterogenen Population zu bestehen, die Vorläuferzellen in verschiedenen Differenzierungsstadien enthält (Chen et al., 2007).

Die Sphären aller drei Stempro-Kulturen zeigten immunzytochemisch eine positive Vimentin-Färbung. Somit haben die Fibroblasten ihre Vimentin-Expression durch die Kultivierung in Stempro nicht verloren und zeigen deutlich, dass Fibroblasten im Stammzellmedium Stempro Sphären bilden können. Immunzytochemisch konnte in einer Stempro-Kultur (7/11) eine eindeutig positive Nestin-Expression nachgewiesen werden. In den Stempro-Kulturen 33/11 und 20/02+21/11 war die Nestin-Expression schwach und somit nicht eindeutig. NGFRp75 und Oct-4A konnte in keiner Kultur durch immunzytochemische Färbung ermittelt werden. Die weit sensitivere Genexpressionsanalyse mittels qPCR zeigte für die drei Stempro-Kulturen einen Zuwachs der Multipotenzmarker Nestin und NGFRp75 im Vergleich zu den jeweiligen RPMI-Kulturen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die Kultivierung in Stempro-Medium die Expression von Nestin erhöht und die NGFRp75-Expression induziert wurde. Eine Oct-4A-Expression war in keiner Stempro-Kultur vorhanden. Auch unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Schwierigkeiten beim Nachweis der Oct-4A-Genprodukte mittels PCR, führt dieses Markerprofil zu der Annahme, dass es sich bei den gebildeten dreidimensionalen Sphären um SKP's handeln könnte (vgl. Kapitel 1.3.2.1.). Das Stempro-Medium enthält



ebenfalls den Wachstumsfaktor bFGF, der die SKP-Bildung begünstigt. Ein Vergleich mit der Arbeit von Hill et al. (2012) bestätigt diese Annahme.

So wurde in der Arbeit von Hill et al. (2012) die Fähigkeit von Fibroblastenkulturen beschrieben, sich unabhängig von ihrer Herkunft, ihrer Kryokonservierungsdauer und Passagenzahl zu SKP's zu formieren. Das Antigen-Profil deckte sich überwiegend mit den SKP's aus der Dermis, da die Expression von Fibronectin, Nestin und NGFRp75 nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 1.3.2.1.). Die NGFRp75-Expression reduzierte sich mit steigender Passagierungszahl der SKP's. Dieses Phänomen wurde auch in der Arbeit von Toma et al. (2005) beschrieben. Der Oct-4-Marker wurde jedoch nur in den Fibroblasten-SKP's und nicht in den dermalen SKP's gefunden (Hill et al., 2012).

Die Fähigkeit der dermalen Fibroblasten, Sphären zu bilden, die morphologisch und funktionell zu den SKP's aus der Haut kovalent sind, bietet eine Quelle für Vorläuferzellen der Haut, die für die Stammzellforschung und in Zellersatzstudien verwendet werden können.

Im Umkehrschluss ist es möglich, dass die SKP's an der Geweberegeneration der Haut beteiligt sind und womöglich den Ursprung der dermalen Fibroblasten darstellen (Shu et al., 2014).

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, dermale Stammzellen aus Hautproben zu isolieren und zu kultivieren, um eine stammzelltypische Sphärenbildung zu veranlassen. Die Kultivierung der dermalen Zellen fand in nicht konditioniertem Stammzellmedium Stempro hESC SFM statt. Durch immunzytochemische Färbung und durch die Methode der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion wurden die dermalen Zellen nach der Kultivierung charakterisiert und auf die Expression der Stammzell-typischen Marker Nestin, NGFRp75 und Oct-4A überprüft. In dieser Arbeit konnte durch die Kultivierung in Stempro-Medium eine Clusterbildung der dermalen Zellen erreicht werden. Eine Sphärenbildung fand unter der hier gewählten Isolierungsmethode und unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen nicht statt. Durch die immunzytochemische Untersuchung und die Genexpressionsanalyse der dermalen Zellen konnte gezeigt werden, dass eine positive Nestin- und NGFRp75-Expression in den Kulturen vorlag. Der embryonale Stammzellmarker Oct-4A war in keiner Zellkultur vorzufinden. Da die Nestin- und NGFRp75-Expression eindeutig nachzuweisen war, ist die Anreicherung dermalen Stammzellen gelungen. Aus den Untersuchungen folgt, dass die Isolierungsart der dermalen Zellen optimiert werden muss, um die Zellausbeute und somit die Sphärenbildung zu fördern, um letztendlich die Anreicherung dermalen Stammzellen zu veranlassen. Außerdem müssen die Nachweismethoden für Oct-4A optimiert werden.

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurden humane dermale Fibroblasten nach einer konventionellen Kultivierung als *Monolayer*-Schicht in Stempro-Medium umgesetzt. Dort bildeten sie stammzelltypische Sphären. In diesen aus Fibroblasten gebildeten Sphären wurde durch die Kultivierung in Stempro-Medium die Transkription von NGFRp75 induziert und die Nestin-Transkription erhöht, was durch immunzytochemische Färbung und quantitative PCR gezeigt werden konnte. Dieses Ergebnis weist auf die Anwesenheit von Vorläuferzellen in humanen dermalen Fibroblastenpopulationen hin, die ein ähnliches Markerprofil wie *skin-derived precursors* (SKP's, hautabstammende Vorläuferzellen) aufweisen.

## Literaturverzeichnis

**Better E., Liu Y., Kjaeldgaard A., Sundström E., Garcia-Castro M. (2010)** Analysis of early human neural crest development, *Development Biology* (344), pp. 578-592.

**Breitbart E. W., Wende A., Mohr P., Greinert R., Volkmer B. (2004)** Hautkrebs Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Berlin, Robert-Koch-Institut.

**Cauffman, G.; Liebaers, I.; van Steirteghem, A.; van de Velde, H. (2006)** POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and pre-implantation embryos, *Stem Cell* (24), pp. 2685-2691.

**Chen F.G., Zhang W.J., Bi D., Liu W., Wei X., Wie L., Chen F.F., Zhu L., Cui L., Cao Y. (2007)** Clonal analysis of nestin– vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis, *Journal of Cell Science* (120), pp. 2875-2883.

**Hill R. P., Gledhill K., Gardner A., Higgins C.A., Crawford H., Lawrence C., Hutchison C.J., Owens W. A., Kara B. James E., Jahoda C. A. B. (2012)** Generation and Characterization of Multipotent Stem Cells from Established Dermal Cultures, *Plos One* (7), pp. 1-10.

**Hoerter J.D., Bradley P., Casillas A., Chambers D., Denholm C., Johnson K., Weiswasser B. (2012)** Extrafollicular Dermal Melanocyte Stem Cells and Melanoma, *Stem Cells International* (2012), pp. 1-10.

**Hunt D. P. J., Jahoda C., Chandran S. (2009)** Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation, *Current Opinion in Biotechnology* (20), pp. 522–530.

**Kumar R., Sharma A., Pattnaik A.K., Varadwaj P.K. (2010)** Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease, *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 2010, pp. 43-52.

**Leischner H. (2007)** Onkologie, München, Elsevier Urban & Fischer Verlag.

**Li, L.; Fukunaga-Kalabis, M.; Hong, Y.; Xu, X.; Kong, J.; Lee, JT. (2010)** Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes, *Journal of Cell Science* 123(6), pp. 853-860.

**Li, L.; Fukunaga-Kalabis, M.; Hong, Y.; Xu, X.; Kong, J.; Lee, JT. (2011)** The Three-Dimensional Human Skin Reconstruct Model: a Tool to Study Normal Skin and Melanoma Progression, *Journal of Visualized Experiments* (54), pp. 1-5.

**Li, L.; Fukunaga-Kalabis, M.; Herlyn, M. (2013)** Isolation, Characterization and Differentiation of Human Multipotent Dermal Stem Cells, *Mol. Biol.* (989), pp. 235-246.

**Liedtke, S.; Enczmann, J.; Waclawczyk, S.; Wernet, P.; Kögler, G. (2007)** Oct4 and Its Pseudogenes Confuse Stem Cell Research, *Cell Stem Cell* (1), pp. 364-366.

**Lorenz K., Sicker M., Schmelzer E., Rupf T., Salvetter J., Schulz-Siegmund M., Bader A. (2008)** Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts, *Experimental Dermatology* (17), pp. 925–932.

**Lüllmann-Rauch R. (2009)** *Histologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.

**Müller W. A., Hassel M. (2012)** *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen und bedeutender Modellorganismen*, Berlin, Springer Spektrum.

**Moll I., Jung E.G., Augustin M. (2010)** *Dermatologie, Duale Reihe*, Stuttgart, Thieme Verlag.

**Moscattelli I., Pierantozzi E., Camaioni A., Siracusa G., Campagnolo L. (2009)** p75 neurotrophin receptor is involved in proliferation of undifferentiated mouse embryonic stem cells, *Experimental Cell Research* (315), pp. 3220-3232.

**Morisson S. J., Shah N. M., Anderson D. J. (1997)** Regulatory Mechanism in Stem Cell Biology, *Cell* (88), pp. 287-298.

**Park D., Xiang A.P., Mao F. F., Zhang L., Di C.G., Liu X.M., Shao Y., Ma B.F., Lee J.H. Ha K.S., Walton N., Lahn B. (2010)**, Nestin Is Required for the Proper Self-Renewal of Neural Stem Cells, *Stem Cells* (28), pp. 2162–2171.

**Pastrana E., Silva-Vargas V., Doetsch F. (2011)** Eyes wide open: A critical review of sphere-Formation as an Assay for stem cells, *Cell Stem Cell* (8), pp.486-498.

**Pesce M., Schöller H.R. (2000)** Oct-4: Control of Totipotency and Germline Determination, *Molecular Reproduction and Development* (55), pp. 452–457.

**Rassner G. (2007)** *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*, Münschen, Elsevier Urban & Fischer Verlag.

**Shu B., Xie J.L., Xu Y.B., Yu J.X., Shi Y., Liu J., Wang P., Liu X.S., Qi S.H. (2014)** Directed differentiation of skin-derived precursors into fibroblast-like cells, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* (7), pp. 1478-1486.

**Sellheyer K., Krahl D. (2010)** Mesenchymale Stammzellen der Haut, *Hautarzt* (61), Springer Verlag 2010, pp. 429-434.

**Sterry, W., Czaika A. V., Drecoll U. (2011)** *Kurzlehrbuch Dermatologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.

**Tai M.H., Chang C.C., Olson L.K., Trosko J.E. (2005)** Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis, *Carcinogenesis* (26), pp.495--502.

**Tiede S., Kloepper J.E., Ernst N., Poeggler B., Kruse C., Paus R. (2009)** Nestin in Human Skin: Exclusive Expression in Intramesenchymal Skin Compartments and Regulation by Leptin, *Journal of Investigative Dermatology* (129), pp. 2711–2720.

**Toma J. G., Akhavan M., Fernandes K. L. J., Barnabe´-Heider F., Sadikot A., Kaplan D. R., Miller F.D. (2001)** Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin, *Nature Cell Biology* (3), pp. 778-784.

**Toma J. G., Mckenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. (2005)** Isolation and Charakterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin, *Stem Cells* (23), pp. 727–737.

**Tomellini E., Lagadec C., Polakowska R., Le Bourhis X. (2014)** Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker, pp. 2457-2475.

**Vazin T., Fred W. J. (2010)** Human embryonic stem cells: Derivation, culture and differentiation: A review. *Restor Neurol Neuroscience* (28), pp. 589–603.

**Welsch U., Deller T. (2010)** Lehrbuch Histologie, München, Elsevier Urban & Fischer Verlag.

**Wiese C., Rolletschek A., Kania G., Blyszczuk P., Tarasov K.V., Tarasova Y., Wersto R.P., Boheler K.R., Wobus A.M. (2004)** Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells?, *Cellular and Molecular Life Science* (61), pp. 2510-2522.

**Yu H., Fang D., Kumar S.M., Li L., Nguyen T.K., Acs G., Herlyn M., Xu X. (2006)** Isolation of a Novel Population of Multipotent Adult Stem Cells from Human Hair, *American Journal of Pathology* (168), pp. 1879-1888.

**Zangrossi S., Marabese M., Brogginini M., Giordano R., D'Erasmus M. Montelatici E., Intini D., Neri A., Pesce M., Rebullia P., Lazzaria L. (2007)** Oct-4 Expression in Adult Human Differentiated Cells Challenges Its Role as a Pure Stem Cell Marker, *Stem Cells* (25), pp. 1675–1680.

## Anhang

### I. Ct-Werte der qPCR in Zellkultur 54/14

Aufgelistet sind im Folgenden die Ct-Werte der qPCR in Zellkultur 54/14 nach der Kultivierung in Stempro-Medium sowie in der Referenzprobe (FH 33/11 RPMI) und in den Positivkontrollen (Melanomzellen M 02/02 und NCCIT-Zellen).

Ct-Werte der *housekeeping genes*  $\beta$ -Actin, TBP- und HPRT-1-Transkription:

Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung									
Probe	Beta-actin			TBP			HPRT-1		
54/14	23,21	24,42	23,37	30,24	31,74	30,75	28,66	29,65	28,43
FH 33/11 RPMI	14,71	15,84	15,70	24,16	25,00	24,96	23,66	24,03	24,75
M 02/02	16,30	16,88	17,02	23,51	24,69	24,41	21,97	23,00	22,83
NCCIT	13,71	13,91	14,32	20,25	21,07	21,56	18,97	19,38	19,68

Ct-Werte der NGFRp75-Transkription:

Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung			
Probe	NGFRp75		
54/14	34,01	33,12	33,69
FH 33/11 RPMI	36,25	35,78	35,14
M 02/02	23,89	25,13	27,49

Ct-Werte der Nestin-Transkription:

Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung			
Probe	Nestin		
54/14	31,40	32,04	27,31
FH 33/11 RPMI	29,71	31,65	31,20
M 02/02	24,30	26,12	26,67

Ct-Werte der Oct-4A-Transkription:

Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung			
Probe	Oct-4A		
54/14	n.d.	33,18	n.d.
FH 33/11 RPMI	n.d.	n.d.	n.d.
NCCIT	25,10	26,34	26,54

## II. Ct-Werte der qPCR in den Fibroblastenzellkulturen

Aufgelistet sind im Folgenden die Ct-Werte der qPCR in den Fibroblastenzellkulturen nach der Kultivierung in Stempro- und RPMI-Medium sowie in den Positivkontrollen (Melanomzellen M 02/02 und NCCIT-Zellen).

Ct-Werte der *housekeeping genes*  $\beta$ -Actin, TBP und HPRT-1-Transkription:

Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung									
Probe	Beta-actin			TBP			HPRT-1		
7/11 StPr	17,61	17,82	17,36	23,36	26,26	25,84	25,90	25,70	25,65
7/11 RPMI	12,43	13,24	12,64	21,79	21,99	21,70	21,31	21,50	21,08
33/11StPr	16,58	16,93	17,45	24,69	25,08	24,76	24,56	24,51	24,58
33/11 RPMI	14,71	15,84	15,70	24,16	25,00	24,96	23,66	24,03	24,75
20/02+21/11 StPr	14,62	15,88	17,49	23,71	24,91	25,57	23,20	23,96	24,50
20/02+21/11 RPMI	13,59	14,83	14,33	22,51	23,66	22,77	21,96	22,70	21,99
M 02/02	16,30	16,88	17,02	23,51	24,69	24,41	21,97	23,00	22,83
NCCIT	13,71	13,91	14,32	20,25	21,07	21,56	18,97	19,38	19,68

Ct-Werte der NGFRp75-Transkription:

Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung			
Probe	NGFRp75		
7/11 StPr	35,39	34,92	34,52
7/11 RPMI	32,36	32,71	32,41
33/11StPr	33,12	33,74	35,29
33/11 RPMI	36,25	35,78	35,14
20/02+21/11 StPr	34,22	34,29	33,43
20/02+21/11 RPMI	33,95	36,22	33,99
M02/02	23,89	25,13	27,49

Ct-Werte der Nestin-Transkription:

Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung			
Probe	Nestin		
7/11 StPr	24,80	24,82	24,96
7/11 RPMI	24,10	24,55	24,45
33/11StPr	26,61	27,28	27,29
33/11 RPMI	29,71	31,65	31,20
20/02+21/11 StPr	22,35	23,60	22,42
20/02+21/11 RPMI	26,73	26,28	26,67
M02/02	24,3	26,12	26,67



Ct-Werte der Oct-4A-Transkription:

<b>Ct-Werte jeweils in Dreifachbestimmung</b>			
<b>Probe</b>	<b>Oct4A</b>		
7/11 StPr	n.d.	n.d.	n.d.
7/11 RPMI	n.d.	n.d.	n.d.
33/11StPr	n.d.	n.d.	n.d.
33/11 RPMI	n.d.	n.d.	n.d.
20/02+21/11 StPr	n.d.	n.d.	n.d.
20/02+21/11 RPMI	n.d.	n.d.	n.d.
NCCIT	25,1	26,34	26,54

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem im Ausgabeantrag formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 15. Dezember 2015

---

Nahid Zabihi