

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Charakterisierung des Expressions- und Proliferationsverhaltens der
STRO-1-positiven und -negativen Rosenstockperiostzellen des
Europäischen Damhirsches (Cervus dama)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Lena Gaus

aus
Burgwedel

Göttingen 2015

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichtstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese
II. Berichtstatter/in:	Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Behr
III. Berichtstatter/in:	Prof. Dr. med. Ralf Dressel
IV. Berichtstatter/in:	Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön
Tag der mündlichen Prüfung:	02.11.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung.....	4
2	Material und Methoden.....	5
2.1	Versuchsaufbau	5
2.2	Zellkultur	6
2.3	Trypsinierung und Zellzählung	6
2.4	Zellsortierung mit MACS®	7
2.5	Kryokonservierung	8
2.6	Immunzytochemische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie.....	8
2.7	Ermittlung Primer und RNA-Isolation.....	9
2.8	cDNA-Synthese und PCR	10
2.9	Gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA-Amplifikate	11
2.10	Co-Kultivierung der STRO-1-positiven RPZ mit Oct4-Promotorzellen	12
2.11	Auswertung der Ergebnisse	13
3	Ergebnisse	15
3.1	Zellexpansion von STRO-1-positiven und -negativen RPZ.....	18
3.2	Expression von Transkriptions- und Pluripotenzfaktoren	21
3.3	Expressionsverhalten der mehrfach sortierten RPZ	24
3.4	Intensitäten von Cy5 und DAPI in den STRO-1-positiven RPZ.....	26
3.5	Übertragung von Oct4 im Co-Kultivierungsversuch	33
4	Diskussion.....	35
5	Zusammenfassung.....	50
6	Anhang.....	53
7	Literaturverzeichnis	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	antlerogenic periosteum
Aqua Dest.	destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
b-FGF	Basic fibroblast growth factor
cDNA	complementary DNA
CFU-F	Colony-Forming Unit-Fibroblasts
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DnMt	DNA-Methyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ESC	embryonale Stammzellen
FACS	fluorescence-activated Cell Sorting
FKS	fetales Kälberserum
for	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
I	Intensität

IGF-1	insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
iP	induzierte Pluripotenz
Klf4	Krüppel-like factor 4
KM	Knochenmark
mCGD	methylierte CG-Dinukleotide
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MSZ	mesenchymale Stammzellen
MSY	Male-specific-region-of Y-chromosome
NH	nicht-hämatopoetisch
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
PBS	phosphate buffer solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Rosenstockperiost
RS	Rosenstock
RPZ	Rosenstockperiostzellen
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sox2	sex determining region Y- box 2“
STRO-1	stromal cell surface marker 1
Tab.	Tabelle
TNT	Tunneling Nanotube

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Nativaufnahme der auswachsenden RPZ in NH- und DMEM	15
Abb. 2	Proliferation und Anzahl der STRO-1-positiven und -negativen RPZ der 14 Gewebepassagen sowie die kumulative Zellzahl im NH-Medium	16
Abb. 3	Proliferation und Anzahl der STRO-1-positiven und -negativen RPZ der 14 Gewebepassagen sowie die kumulative Zellzahl im DMEM	17
Abb. 4	Darstellung der durchschnittlich ausgewachsenen absoluten Zellzahl pro Kulturtag in NH- und DMEM	18
Abb. 5	Darstellung der durchschnittlichen ausgewachsenen absoluten Zellzahl von STRO-1-positiven Zellen in NH- und DMEM	19
Abb. 6	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und RT-PCR-Analyse der Oct4-Expression in STRO-1-positiven Zellen des Rosenstockperiosts vom Damhirsch	21
Abb. 7	Abbildung der Expression von Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4 in den STRO-1-positiven und -negativen RPZ	22
Abb. 8	Abbildung der Expression von Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4 in den mehrfach nach STRO-1 sortierten STRO-1-positiven und -negativen RPZ	25
Abb. 9	Fluoreszenzaufnahmen der mit DAPI und Cy5 angefärbten STRO-1-positiven RPZ nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 144 h Inkubation	27
Abb. 10	Darstellung des fluoreszierenden Oct4-Proteins im Zytoplasma und den Zell-zu-Zellverbindungen in den STRO-1-positiven RPZ nach 24 h und 48 h Inkubation	28
Abb. 11	Verteilung der gemessenen DAPI-Intensitäten im Zellkern der STRO-1-positiven RPZ	29
Abb. 12	Verteilung der Intensität der gemessenen Oct4-Objekte im Zellkern und im Zytoplasma der STRO-1-positiven RPZ	30
Abb.13	Darstellung der Oct4- und der DAPI-Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf	32
Abb.14	Co-Kultur von STRO-1-positiven Zellen und Oct4-Promotorzellen	34
Abb.15	Nachweis der GAPDH-Expression durch RT-PCR und Gelelektrophorese in den STRO-1-positiven und -negativen RPZ	57
Abb.16	Nachweis der c-Myc-Expression durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ	58

Abb. 17	Nachweis der Sox2-Expression durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ	59
Abb. 18	Nachweis der Nanog-Expression durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ	60
Abb. 19	Nachweis der Oct4-Expression (335 bp) durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und negativen RPZ	61
Abb. 20	Nachweis der Kfl-4-Expression durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Primersequenzen	12
Tab. 2	Zellzahlen NH-Medium	53
Tab. 3	Zellzahlen DMEM	53
Tab. 4	Deskriptive Daten der Zellzahlen im NH- und DMEM	54
Tab. 5	Intensitäten und Flächen der gemessenen DAPI und Oct4-Fluoreszenzen	54
Tab. 6	Übersichtsdarstellung der Intensitäten und Flächen der gemessenen DAPI und Oct4-Fluoreszenz der pro Zelle	55
Tab. 7	Auflistung und Nummerierung der PCR-Proben der STRO-1-positiven und -negativen RPZ	56
Tab. 8	Medien und Zusätze	64
Tab. 9	Labormaterialien	66

1 Einleitung

Die Verwendung von Stammzellen in der modernen Medizin bringt eine Vielzahl neuer Perspektiven und Behandlungsmöglichkeiten mit sich. Insbesondere die mesenchymalen Stammzellen (MSZ) sind aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit Gegenstand derzeitiger Forschungen. Die multipotenten Zellen kommen sowohl in fetalen als auch in adulten Geweben vor und besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Selbstdifferenzierung. Ihre Funktion besteht zum einen darin, alte Zellen oder beschädigtes Gewebe zu regenerieren, zum anderen besetzen sie die Stammzellnischen im Knochenmark (KM) und nehmen so Einfluss auf die Hämatopoese (Tae et al. 2006). Sie sind durch ihre fibroblastenähnlicher Morphologie, die Expression von Oberflächenmarkern wie CD105, CD73, CD90 und STRO-1 (*stromal cell surface marker 1*) sowie durch das Fehlen von hämatopoetischen Oberflächenmarkern und des MHC-Klasse-2-Rezeptors HLA-DR charakterisiert (Shi et al. 2011). In vitro präsentieren sie eine ausgeprägte Plastikadhärenz und können unter den entsprechenden Kulturbedingungen in Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten, Myozyten und neuronale Zellen differenzieren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass MSZ immunmodulierende Eigenschaften besitzen, wie beispielsweise die Suppression der B- und T-Zellproliferation (Shi et al. 2011; Yi und Song 2012). In ihrer klinischen Verwendung sind die MSZ daher vor allem für vier Bereiche interessant: als Vehikel in der Gentherapie, zur Verbesserung des Engraftments (Anwachsen des Transplantats) im Rahmen von Knochenmarktransplantationen, für neue Therapieansätze bei Autoimmunerkrankungen und für die regenerative Medizin bzw. das sogenannte *Tissue Engineering* von Knochen, Knorpel, Bändern und Sehnen (Yi und Song 2012).

Auch bei der Regeneration des Geweihs der Cervidae spielen MSZ eine entscheidende Rolle für das schnelle Wachstum (Rolf et al. 2008). Die Hirschgeweihe sind daher ein besonders geeignetes Forschungsmodell, um die zellulären und molekularen Mechanismen der Geweberegeneration zu untersuchen. Als einzige Säugetierspezies sind die Cervidae in der Lage, ein vollständiges Organ zu regenerieren. Geweihe sind histologisch komplexe Gebilde aus Knochen, Knorpeln, Nerven, Blutgefäßen und Haut, die in einem jährlichen Zyklus aus Wachstum, Mineralisierung der Knochenstruktur und Abfegen des Bastes regenerieren und schließlich im Frühjahr durch die Aktivierung von Osteoklasten abfallen (Li 2012). Die Rosenstöcke (RS), die knöchernen Vorsprünge am Schädelknochen, bilden die Basis der Geweihe. Sie bilden sich aus dem sogenannten *antlerogenic periosteum* (AP) unter Testosteroneinfluss (Kierdorf und Kierdorf 2011). Das AP entwickelt sich vermutlich aus der Neuralleiste. Seine Zellen weisen mit ihrer Fähigkeit zu Selbsterneuerung und Selbstdifferenzierung einen embryonalen

Charakter auf (Li und Suttie 2001). Die Rosenstockentwicklung aus dem AP beginnt einige Wochen bis Monate nach der Geburt mit der intermembranösen Ossifikation. Die Zellen der inneren, zellulären AP-Schicht beginnen zu proliferieren und differenzieren schließlich zu Osteoblasten. Das erste Geweih wächst spontan aus den Spitzen der RS, wenn diese eine für die Spezies spezifische Größe erreichen. Dabei geht die intermembranöse in die enchondrale Ossifikation über (Kierdorf und Kierdorf 2012; Li und Suttie 2001). Nach dem Abwurf des ersten Geweihs verbleiben die RS als permanente knöcherne Fortsätze bestehen, aus denen sich in einem festgelegten Zyklus die Geweihstangen jährlich neu bilden.

Ausgangspunkt der jährlichen Regeneration beim adulten Tier ist das Rosenstockperiost (RP), wie eine Reihe verschiedener Deletionsversuche von Li et al. (2007) zeigten. Zunächst verdicken sich die distalen Anteile des RP durch aktive Zellteilung; histologisch entspricht dies einer Zone von undifferenzierten mesenchymalen Zellen unterhalb des fibrinösen Perichondriums. Diese Zone wird als mesenchymale Wachstumszone bezeichnet (Kierdorf et al. 2007). Im Verlauf entstehen hieraus eine anteriore und eine posteriore Wachstumszone, die jeweils im Zentrum aus Knorpel bestehen und von einem hyperplastischen Rosenstockperiost umgeben sind. Sie bilden später die verschiedenen Anteile der Geweihstangen (Li 2012). In-vivo- und In-vitro-Studien zeigen, dass der Insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) in der Wachstumsphase der wichtigste Stimulator für das Geweihwachstum ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IGF-I nicht nur in der Leber der Tiere synthetisiert wird, sondern auch von den wachsenden Geweihen selbst (Kierdorf et al. 2009). Es folgt die Mineralisierung und somit die Aushärtung der Geweihstangen. Während des Sommers steigt der Testosteronlevel in Abhängigkeit der Photoperiode kontinuierlich an und löst in der Zeit von Juli bis August das Abfegen des Bastes und des Periosts, unter denen sich der blanke Knochen befindet, aus (Rolf und Fischer 1996; Kierdorf H und Kierdorf U 2011; Price et al. 2005). Es wurde seit längerem vermutet, dass es sich bei der Geweihregeneration um einen auf Stammzellen basierenden Prozess handelt (Kierdorf et al. 2007; Kierdorf et al. 2003; Li et al. 2005; Li 2012). 2008 gelang es Rolf et al. als erste, Zellen aus dem RP und verschiedenen weiteren Lokalisationen des wachsenden Geweihs als positiv für die Oberflächenmarker STRO-1, CD271, CD133 zu charakterisieren und damit als mesenchymale Stammzellen zu definieren. STRO-1 ist ein spezifischer, monoklonaler Antikörper, der als Oberflächenmarker für MSZ und Progenitorzellen dient (Dennis et al. 2002, Rolf et al. 2008). Rolf et al. zeigten weiterhin, dass das Differenzierungspotential der STRO-1-positiven Zellen nicht nur auf die osteogenen und chondrogenen Zelllinien beschränkt ist. In vitro können sie unter entsprechenden Bedingungen zusätzlich in Adipozyten differenzieren, die im Hirschgeweih im Gegensatz zu den langen Röhrenknochen nicht vorkommen. STRO-1-positive Stammzellen stellen also wenig-

tens tripotente MSZ/Progenitorzellen dar (Rolf et al. 2008). Es wird angenommen, dass sich die MSZ bzw. die Progenitorzellen in dem RP in sogenannten Stammzellnischen organisieren, die man bereits aus anderen Geweben adulter Säugetiere kennt, wie etwa dem Knochenmark, dem neuronalen Gewebe oder bei Haarfollikeln. Dabei handelt es sich um komplexe anatomische Gebilde, die als Reservoir für die MSZ fungieren. In der unmittelbaren Umgebung dieser Nischen bildet die Ansammlung verschiedener differenzierter Zellen ein spezielles Milieu an extrazellulärer Matrix und Faktoren, um die spezifischen Eigenschaften der Stammzellen aufrechtzuerhalten (Fuchs et al. 2004). Die Signalfaktoren, die von der Nische ausgehen, regulieren die Selbsterneuerung und somit die Erhaltung der Population. Die Stammzellen und die umgebenden unterstützenden Stromazellen stehen in einer speziellen räumlichen Beziehung zueinander. Die Stromazellen können die MSZ so polarisieren, dass sie für die asymmetrische Zellteilung, bei der die Progenitorzellen entstehen, optimal ausgerichtet sind. Durch Adhäsion und die extrazelluläre Matrix sind die MSZ innerhalb der Nische verankert (Jones und Wagers 2008). Obwohl mesenchymalen Stammzellen im RP nachgewiesen wurden, blieb ungeklärt, wie ein derart rapides Wachstum, das selbst embryonales Wachstum in den Schatten stellt, zustande kommen kann. Li (2012) erwog eine erhöhte Telomeraseaktivität und die Expression von Nucleostemin als mögliche Faktoren. Das Enzym Telomerase wird unter anderem mit einer erhöhten Selbsterneuerungsrate in Verbindung gebracht, während die Expression von Nucleostemin als Regulator der Stammzellproliferation gesehen wird. Dies blieb jedoch nur eine hypothetische Erklärung.

Aufgrund des Nachweises der stammzellbasierten Geweihregeneration stellt sich weiterhin die Frage, welche Rolle die Transkriptionsfaktoren, die in anderen Organismen essentiell für die Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation und deren charakteristische Eigenschaften sind, in den Stammzellen des Rosenstockperiosts und für das Geweihwachstum spielen. Von besonderer aktueller Relevanz sind die Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4. Es ist bekannt, dass diese Faktoren nicht nur entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung und die Pluripotenz von Stammzellen haben, sondern darüber hinaus auch in der Lage sind, in somatischen Zellen von Säugetieren Pluripotenz zu induzieren (Rodolfa und Eggan 2006; Park et al. 2007; Takahashi et al. 2007). Oct4 nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein; es wird als wichtigstes regulatorisches Gen für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz während der Embryonalentwicklung und als Determinante bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen angesehen (Li et al. 2010). Während einige Transkriptionsfaktoren mittlerweile durch niedermolekulare Verbindungen ersetzt werden konnten, scheint Oct4 essentiell zu sein (Li et al. 2010). Untersuchungen zeigten, dass Oct4 sogar alleine humane neuronale Stammzellen reprogrammieren kann (Kim et al. 2009 a).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das rasante Knochenwachstum bei der jährlichen Geweihregeneration ein ideales osteologisches Forschungsmodell darstellt. Die Entschlüsselung der Mechanismen, die dies ermöglichen, bringt unserer Meinung nach wichtige neue Erkenntnisse und Möglichkeiten im Bereich der regenerativen Medizin und des *Tissue Engineering*.

1.1 Zielsetzung

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit ist daher, ob die von Rolf et al. 2008 für die Geweihregeneration als wichtig erkannten STRO-1-positiven mesenchymalen Stammzellen des Rosentockperiosts die Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4 exprimieren und ob sich diese Faktoren ebenfalls in den STRO-1-negativen Zellen nachweisen lassen. Um dies zu klären, erfolgte eine molekularbiologische Untersuchung der Expressionsmuster der STRO-1-positiven und -negativen Rosenstockperiostzellen (RPZ) der Primärkultur. Es sollte weiterhin dargelegt werden, ob die Kulturdauer und die Wahl des Nährmediums Einfluss auf das Expressions- und Proliferationsverhalten der RPZ haben. Da Oct4 als Mastergen eine besondere Rolle einnimmt, sollte das Vorkommen des Oct4-Proteins in den STRO-1-positiven mesenchymalen Stammzellen eingehender untersucht werden. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage, zu welchen Zeitpunkten das Protein in den Zellen nachzuweisen ist und ob Oct4-Konzentration und DNA-Methylierung korreliert sind.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Gewebeproben stammen von einem etwa vierjährigen adulten Damhirsch (*Cervus dama*) aus dem Gehege „Am Kehr“ des Forstamts Göttingen. Aufgrund einer notwendigen Bestandsreduzierung wurde das Tier zu Beginn der jährlichen Regenerationsphase weidgerecht erlegt und die Rosenstöcke des Tieres unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden unmittelbar nach dem Erlegen entnommen, gekühlt und umgehend unter sterilen Bedingungen in das Labor überführt. Mit Hilfe von Einmal-Skalpellen wurden – ebenfalls unter sterilen Bedingungen – die Basthaut/Haut und das darunterliegende Bindegewebe vorsichtig entfernt. Das jeweilige Gewebe (Spongiosa und Periost) wurde stückchenweise mit Skalpell und Pinzette präpariert bzw. aus dem Knochengewebe gelöst, in 1-2 mm große Stückchen geteilt und sofort in sterile Petrischalen überführt. Anschließend wurde das entsprechende Nährmedium hinzugegeben und die Petrischalen in den Inkubator überführt. Es wurden Proben des Periosts, der Wachstumszone und der Spongiosa der Rosenstöcke sowie der Spongiosa und des Periosts aus dem Bereich der Tibia bearbeitet.

2.1 Versuchsaufbau

Es erfolgte zunächst die Anzucht der Primärkultur und die In-vitro-Expansion der Rosenstockperiostzellen (RPZ). Da bislang nur wenig über die Kultivierung dieser Zellen bekannt war, entschieden wir uns dazu, die Proliferation und die Anteile von STRO-1-positiven und -negativen Zellen von zwei Kulturansätzen mit unterschiedlichen Nährmedien zu vergleichen. Die eine Hälfte des RP-Gewebes wurde in DMEM kultiviert, die andere in NH-Medium. Die Gewebestücke verblieben so lange in den Kulturgefäßen, bis ein konfluentes Zellwachstum erreicht war. Erst dann wurden sie in neue Gefäße überführt. Die Kulturdauer variierte daher und betrug zwischen fünf und 12 Tage. Dieser Vorgang wiederholte sich insgesamt 14 Mal. Die im Kulturgefäß verbliebenen Zellen wurden, wie im Folgenden beschrieben, gezählt und nach dem Oberflächenmarker STRO-1 sortiert. Anschließend wurde in allen STRO-1-positiven und -negativen RPZ durch RT-PCR und Gelelektrophorese die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4 untersucht.

Im zweiten Versuch wurde die Oct4-Expression immunhistochemisch untersucht. Dafür wurden STRO-1-positive Zellen nach der Sortierung 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 144 h inkubiert, immunhistochemisch mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI und Cy5 gefärbt und mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen angefertigt. Die Intensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe, die den Zellkern und das Oct4-Protein anfärben, wurden gemessen und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

2.2 Zellkultur

Die Anzucht der Zellen erfolgte aus dem steril präparierten Rosenstockperioost in Petrischalen. Dabei wurde das für mesenchymale Stammzellen etablierte Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium (DMEM) verwendet. Parallel dazu wurde die zweite Kultur unter gleichen Bedingungen, aber in einem speziellen Proliferationsmedium für nicht-hämatopoetische Stammzellen von Miltenyi Biotec (NH-Medium), in dem bereits fetales Kälberserum (FKS) enthalten ist, angelegt.

1. 500 ml DMEM + 10% FKS + 2 % Gentamycin
2. 500 ml NH-Expansionsmedium + 2 %Gentamycin

Zur Expansion wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Der Zustand der Kulturen wurde regelmäßig mikroskopisch überprüft und das Nährmedium dreimal wöchentlich gewechselt. Dabei wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette das alte Nährmedium abgezogen, mit ca. 5 ml PBS gespült und 15-20 ml neues Nährmedium dazugegeben.

Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von circa 90 % wurden die Gewebestückchen in neuen Kulturschalen weiterkultiviert. Die verbliebenen Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und nach dem Oberflächenmarker STRO-1 sortiert. Dieser Vorgang erfolgte bei beiden Zellkulturen insgesamt 14 Mal. Alle Arbeitsschritte fanden unter einer Sterilbank statt.

2.3 Trypsinierung und Zellzählung

Um die Ausgangszellzahl zu ermitteln, wurde zunächst unter der sterilen Werkbank das Medium nach leichtem Schwenken mit einer Pasteur-Pipette abgenommen. Der konfluent gewachsene Monolayer wurde anschließend gründlich mit 5 ml PBS-Puffer gespült, da Rückstände des Nährmediums die Trypsinwirkung beeinträchtigen können. Anschließend wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen pipettiert und diese 5-10 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Als nächster Schritt wurde mikroskopisch kontrolliert, ob sich alle Zellen gelöst und abgerundet hatten. Erst dann wurde die Proteinasewirkung des Trypsins durch die Zugabe von 9 ml des jeweiligen Nährmediums gestoppt und die Zellsuspension in 50-ml-Gefäße überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (1200 rpm bei 300g für 5 min) und der Überstand abge-

saugt, um Trypsinreste zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und gezählt.

Für die Zellzählungen wurde der Casy[®]-Cell-Counter benutzt, der mittels elektronischer Pulsflächenanalyse die Zahl der vitalen Zellen bestimmt. 100 µl der Zellsuspension wurden zu 10 ml Casyton[®] gegeben und daraus die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Um die absolute Zellzahl zu ermitteln, wurde die gemessene Zellzahl mit dem entsprechenden Faktor multipliziert. Alle Messergebnisse setzten sich aus drei Einzelmessungen zusammen, so dass Mittelwerte und Standardabweichung ermittelt werden konnten. Die erhobene Gesamtzellzahl war Ausgangspunkt für die weiteren Sortierungen nach den jeweiligen Oberflächenmarkern.

2.4 Zellsortierung mit MACS[®]

Für die Sortierung der Zellen nach den Oberflächenmarkern wurde das Magnet-Sortiersystem MACS[®] Cell Separator der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Bei diesem System werden die Zielzellen mit den jeweiligen Primär-Antikörpern angefärbt, an die wiederum in einem zweiten Schritt die Sekundär-Antikörper, die MACS MicroBeads, gekoppelt werden. Die MicroBeads enthalten einen Anteil magnetischen Materials. Die Zellsuspension wird auf beschichtete Säulen gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befinden. Die nicht-markierten Zellen durchlaufen die Säule ungehindert, während die markierten Zellen in der Säule hängen bleiben. Werden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt, lassen sich die positiven Zellen leicht herausspülen.

Vor der Sortierung nach dem Oberflächenmarker STRO-1 wurden die RPZ zunächst wie oben beschrieben abgelöst und gezählt. Anschließend wurden sie mit PBS-Puffer gewaschen, in der Zentrifuge pelletiert und in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert. Bei bis zu 2×10^6 Zellen wurden 4 µl STRO-1-Antikörper hinzugegeben und diese anschließend 30 min im Kühlschrank inkubiert. Danach folgte erneut das zweimalige Waschen der RPZ mit MACS-Puffer und die Aufnahme der Zellpellets in 80 µl MACS-Puffer, zu denen 20 µl des Sekundärantikörpers anti-mouse-IgM-Beads gegeben wurden. Nach 15 min Inkubationszeit bei 4 °C und wiederum zweimaligem Waschen der Zellen wurden die Zellen in 1 ml MACs-Puffer aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde auf die in den Magneten eingespannten und mit 2 ml des MACs-Puffers äquilibrierten LS-Säulen gegeben. Die LS-Säulen wurden mit 4 ml des Puffers gespült, um die STRO-1-negativen Zellen herauszulösen. Um anschließend die STRO-1-positiven Zellen aus der Säule zu spülen, wurde diese aus dem Magnetfeld entfernt und zweimal mit jeweils 1 ml Puffer eluiert.

2.5 Kryokonservierung

Die nicht sofort verwendeten Gewebeproben wurden auf Kryoröhrchen verteilt und mit 1 ml Einfriermedium versetzt. Das verwendete Einfriermedium setzte sich aus FKS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zusammen. DMSO verhindert die Kristallbildung und die damit verbundene Zerstörung der Zellmembranen und Dehydratation der Zellen. Um die Zellen zu schonen, wurde der NALGENE® Cryo-Freezing-Container eingesetzt, der eine konstante Abkühlrate von 1 °C/min ermöglicht. Nach 24 Stunden kontrolliertem Einfrieren im -80 °C Gefrierschrank konnten die Proben in Flüssigstickstoff bei -180 °C gelagert werden. Die STRO-1-positiven und -negativen Zellen, die für die molekularbiologischen Untersuchungen konserviert werden mussten, wurden in der Kühlzentrifuge pelletiert; der restliche Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C eingefroren.

2.6 Immunzytochemische Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

Die immunzytochemische Färbung wurde zur Detektion und Markierung von Oct4 in den kultivierten STRO-1-positiven RPZ eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen nach der Sortierung zunächst mit dem Nährmedium in sogenannte *Chamber-Slides* überführt und bei 37 °C 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 144 h inkubiert und anschließend mit 70 % Ethanol fixiert. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS-Puffer wurden sie mit eisgekühltem Methanol für 30 min bei -20°C permeabilisiert. Um das unspezifische Binden von Antikörpern zu vermeiden, wurden die Zellen nach erneutem Spülen mit PBS mit etwa 1 ml PBS-Puffer + 0.3 % Triton X100 und 10 % Schweineserum blockiert (Inkubation: 20 min bei RT auf der Rüttelplatte). Nach dem Abziehen des Puffers wurde 1:50 verdünnter Primärantikörper (anti-human Oct-3/4, H-34: sc-9081, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology Inc.) zugegeben. Der Kontrollgruppe wurde hingegen nur Antikörper-Diluent zugeführt. Die Inkubationszeit betrug mindestens zwei Stunden.

Vor dem Anfärben mit dem Sekundärantikörper [Verdünnung 1:100, Northern Lights™ Anti-rabbit IgG-NL557 (NL004, R&D Systems)] wurden drei Waschschritte à fünf Minuten mit PBS-Puffer durchgeführt. Nach 90 min Inkubation im Dunkeln und darauf folgendem Waschen wurde die Kerngegenfärbung mit DAPI durchgeführt; die Verdünnung von DAPI betrug 1:1000. Anschließend erfolgte die Inkubation für zehn Minuten im Dunkeln bei RT. Die gefärbten Präparate wurden mit einigen Tropfen Fluor Preserve Eindeckmittel und Deckgläschen fixiert und mit dem Zeiss-Mikroskopsystem Axiovert 200M und der Zeiss-Axiovision-Software fluoreszenzmikroskopiert bzw. fotografiert. Die Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden Schwarz/Weiß-Kamera unter Verwendung der entsprechenden Fluoreszenzfilter angefertigt und die Farben vom Computer-

programm anhand der Grauwertunterschiede zugeordnet (Pseudokolorierung). Die Messungen der Intensitäten wurden jedoch anhand der Grauwerte der originalen Schwarz/Weiß-Bilder durchgeführt (siehe 2.11).

2.7 Ermittlung Primer und RNA-Isolation

Aufgrund der verschiedenen bekannten Oct4-Transkriptvarianten, war es notwendig vor Versuchsbeginn Primer zu finden, die spezifisch für das als Pluripotenzfaktor wirksame Oct4A sind. Die Oct4-Sequenz von *Cervus dama* war bisher nicht bekannt. Es wurden Primer gewählt, die an die konservierten Abschnitte der bovinen und der humanen Oct4-Sequenz binden. Neben den STRO-1-positiven RPZ des Damhirsches und des Rothirsches wurden auch humane STRO-1-positive MSZ aus Kulturen von Knochenmarkspiraten verwendet, um zu zeigen, dass die Primer ebenfalls in der Lage sind, Oct4 in diesen Zellen zu detektieren. Darüber hinaus wurde aufgrund der zwei bekannten humanen Oct4-Transkriptvarianten darauf geachtet, dass die Primer für Exon 1 spezifisch ist, welches nur in Oct4A vorkommt. Anschließend wurde eine Sequenzanalyse bei *Sequence Laboratories* (Seqlab, Göttingen) durchgeführt, um die Oct4-Identität zu überprüfen.

Um die Expression von Transkriptionsfaktoren wie Oct4 molekularbiologisch nachzuweisen, wurde aus den eingefrorenen Zellproben zunächst RNA gewonnen und anschließend cDNA synthetisiert. Die gesuchten Genabschnitte wurden mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) amplifiziert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Isolation der RNA aus den kultivierten Zellen wurde das RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Zur Lyse der Zellen wurde 350 µl RLT-Puffer (bis zu 5×10^6 Zellen), der zuvor mit β -Mercaptoethanol versehen wurde (10 µl/ml RLT), auf die Zellen gegeben und auf einem Schüttler gemischt. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule gegeben und zwei Minuten bei höchster Umdrehungszahl (10.000 rpm = 9300 g) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt, durch Pipettieren gemischt, auf die RNeasy-Säule gegeben und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dabei binden die RNA-Moleküle über Wasserstoffbrückenbindungen an die Silikagelmembran und bleiben in der Membran hängen. Nach einmaligen Waschen mit 350 µl RW1 Puffer wurde für den DNase-Verdau 80 µl eines DNase I Mix (pro Ansatz wurde 10 µl DNase I mit 70 µl Puffer RDD vorsichtig vermischt) auf die Säule gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 350 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gespült und jeweils 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Um den restlichen Puffer und die zellulären Bestandteile aus der Säule zu entfernen, wurde diese nochmals zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 30 µl RNase freiem Aqua dest. aus der Säule in einem neuen Eppendorfcup eluiert und auf Eis gestellt.

Um die Konzentration der gewonnenen RNA zu bestimmen, wurde 1 µl des Eluats in einer 1:100-Verdünnung mit RNase-freiem Wasser im Eppendorf-Photometer gemessen. Das Ergebnis ist die Konzentration in µg/ml. Die Absorption wurde bei 260 nm für Nukleinsäuren und bei 280 nm für Proteine gemessen. Der Quotient dieser beiden Werte erlaubt eine Aussage über die Reinheit der gewonnenen RNA.

2.8 cDNA-Synthese und PCR

Die RNA wurde auf Grund ihrer Instabilität mit Hilfe der RT-PCR in cDNA umgeschrieben und anschließend vervielfältigt. Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, bindet mit Hilfe eines Primers an den Poly-A-Schwanz der RNA und synthetisiert einen cDNA-Strang, der mit dem RNA-Strang hybridisiert ist. Der RNA-Anteil wird anschließend durch den RNase-H-Anteil abgebaut. Die Reverse Transkriptase wird durch Erhitzen auf 85 °C denaturiert. Zum entstandenen cDNA-Einzelstrang wird durch eine DNA-Polymerase der komplementäre Strang synthetisiert. Dieser cDNA-Doppelstrang, der durch die prozessierte RNA keine Introns mehr enthält, wird im weiteren Verlauf amplifiziert. Hierfür wurde das iScript-Kit der Firma BioRad verwendet. Es können 100 fg bis 1 µg Gesamt-RNA pro Ansatz eingesetzt werden; üblicherweise wurde hier mit 200 ng gearbeitet, die auf 15 µl mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt wurden. Dazu wurden 4 µl iScript-Mastermix sowie 1 µl der Reversen Transkriptase gegeben.

Zur Herstellung der cDNA durchliefen die Reaktionsgemische folgende Schritte im Cycler:

25 °C: 5 min (Annealing)

42 °C: 30 min (reverse Transkription)

85 °C: 5 min (Denaturierung der RT)

4 °C: Hold

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur Detektion der Expression bestimmter Genabschnitte wurde eine analytische PCR der geernteten Zellen durchgeführt. Hierfür wurde der GoTaq®-Green-Mastermix verwendet, eine gebrauchsfertige Lösung, die die thermostabile Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffer enthält. Der Mastermix enthält außerdem zwei Farbstoffe (blau und grün), welche die direkte Weiterverwendung und Überwachung bei der Gelelektrophorese erlauben. Die spezifischen Primer sind **Tab. 1** zu entnehmen. Es handelt sich um Oligonukletide, die komplementär zum 3'- bzw. zum 5'-Ende des Zielgens sind.

Der cDNA-Strang wurde zunächst bei 95 °C aufgeschmolzen (Denaturierung), wobei die Wasserstoffbrückenbindungen aufbrechen und zwei Einzelstränge vorliegen. Im nächsten Schritt wurden die Reaktionsgemische auf die spezifische Temperatur der jeweiligen Primer abgekühlt. Dies ermöglicht den Primern, sich an den komplementären Strang am 3'-Ende anzulagern (Annealing). Die DNA-Polymerase kann sich anschließend an die Primerkomplexe anlagern und aus den Purinnukleotiden dATP und dGTP sowie aus den Pyrimidinnukleotiden dTTP und dCTP den Zweitstrang synthetisieren (Elongation). Da das Enzym aus einem thermophilen Bakterium stammt, liegt das Arbeitsoptimum bei 72°C. Magnesium wurde als Kofaktor benötigt.

Pro Versuchsansatz wurde folgendes Reaktionsgemisch verwendet:

Taq-Green Mix	10 µl
Primer for.	1 µl
Primer rev.	1 µl
H ₂ O	7 µl
Template	1 µl

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	2 min 95 °C
Denaturierung:	45 sec 95 °C
Annealing:	45 sec 53 °C
Elongation	45 sec 72 °C
Hold	4 °C

Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR-Produkte wurden bei 4 °C gelagert.

2.9 Gelelektrophoretische Auftrennung der cDNA-Amplifikate

Die Gelelektrophorese ist eine relativ einfache Möglichkeit, die PCR-Produkte ihrer Größe nach aufzutrennen und zu identifizieren. Die cDNA-Amplifikate wandern aufgrund ihrer Ladung in dem Gel von Anode zu Kathode, wobei größere Fragmente langsamer wandern als kleine. Es wurden Gelplatten aus Agarose verwendet. Die Agarose

bildet dabei ein relativ großporiges Netz (500 nm bei einprozentigen Gelen), das wie ein molekulares Sieb wirkt und sich gut zur Trennung von DNA eignet. TBE-Puffer wurde mit 1,5 % Agarose in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollkommen aufgelöst hatte. Die Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml Ethidiumbromid) wurde nach dem Abkühlen des Gels auf etwa 40 °C dazugegeben. Anschließend konnte das Gel gegossen werden. In der Gelelektrophoreseapparatur wurde das Gel vollständig mit TBE-Puffer bedeckt. Die Slots wurden mit jeweils 10 µl des DNA-Mix befüllt; in das erste und letzte Slot wurden je 5 µl einer Referenz-DNA (Ladder mit 100 bp) gegeben. Die Spannung betrug 120 mA und wurde solange angelegt, bis die Banden aufgetrennt waren. Zur Darstellung der RNA-Expression wurde das Analysesystem BioDocAnalyse der Firma Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland verwendet. Unter der Dunkelhaube wurden mittels UV-Licht-Anregung die fluoreszierenden Banden auf dem Gel sichtbar gemacht und fotografiert. Im Verhältnis zu den GAPDH-Banden (Kontrollen) liefert die relative Intensität der Banden einen Hinweis auf die Expressionsstärke der jeweiligen Zielproteine in den Zellen.

Tab. 1 Primersequenzen

Marker	Sequenz	Bp	Temperatur
GAPDH for.	5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'	216	60 °C
GAPDH rev.	5'-GGAGGCATTGCTGATGATCT-3'	216	60 °C
Oct4 h+b for.	5'-CTGGGTTGATCCTCGGACCT-3'	335	50 °C
Oct4 h+b II rev.	5'-TGATGTCCTGGGACTCCTC-3'	335	50 °C
Sox2 II for.	5'-ACGTGAGCGCCCTGCAGTAC-3'	340	60 °C
Sox2 II rev.	5'-AAGGGCAGTGTGCCGTTAATG-3'	340	60 °C
c-Myc h+b for.	5'-TACTGCGACGAGGAGGAGAA-3'	330	60 °C
c-Myc h+b II rev.	5'-ACAGTCCTGGATGATGATGT-3'	330	60 °C
Nanog h+b for.	5'-CCATGGATCTGCTTATTCAGG-3'	275	56 °C
Nanog h+b II rev.	5'-CATTCTCTGGTTCTGGAACC-3'	275	56 °C
Klf4 h+b for.	5'-AAGGGAGAAGACACTGCGTC-3'	565	56 °C
Klf4 h+b II rev.	5'-CTGCTGCGGCGGAATGATCA-3'	565	56 °C

2.10 Co-Kultivierung der STRO-1-positiven RPZ mit Oct4-Promotorzellen

Um zu klären ob es zu einer Oct4-Übertragung zwischen den RPZ kommt und ob diese Übertragung in der Empfängerzelle eine funktionelle Konsequenz nach sich zieht wurden die STRO-1-positiven RPZ zusammen mit embryonalen Oct4-Kontroll-

Mausfibroblasten (MEF=Mouse embryonic fibroblast) kultiviert. In den MEF wird die GFP-Expression von einem endogenen Oct4-Promoter kontrolliert und so die Expression von Oct4 mit der Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) gekoppelt. Im Falle einer Übertragung des Oct4-Proteins sollte in den Empfängerzellen eine grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden (Stemgent™ Oct4-GFP MEF, Miltenyi Biotec Inc., Bergisch Gladbach, Germany). Die Oct4-GFP-MEF wurden zunächst entsprechend der Herstellerempfehlung in MEF-Kulturmedium (Stemgent™, San Diego, USA) für 6 Wochen kultiviert um eine bereits bestehende GFP-Expression auszuschließen. Danach wurden die Oct4-GFP-MEF trypsinisiert, in 4-Well-Chamber-Slides der Firma Lumox® überführt und mit NH-Medium über Nacht im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die STRO-1-positiven RPZ in einem Verhältnis von 7:1 (STRO-1-pos. RPZ/Oct4-GFP MEF-Zellen) hinzugefügt. Da nur etwa 10% der STRO-1-positiven RPZ eine eindeutige Oct4-Färbung außerhalb des Nukleus und in den Zell-zu-Zellverbindungen zeigten wurden zusätzliche RPZ hinzugeführt um die Chance eines Oct4-Transfers zu erhöhen. Um eine anderweitige Übertragung von Oct4, zum Beispiel über sezernierte Exosomen oder durch andere Transporter von Membran- bzw. Zytosolbestandteilen weitestgehend ausschließen zu können, wurde eine Kontrollkultur mit den Oct4-GFP-MEF und den Überständen der STRO-1-positiven RPZ-Kultur angelegt. Für den Kontrollversuch wurden die Kulturüberstände der STRO-1-positiven RPZ zwischen 0-48 h und 48-120 h Kulturdauer gesammelt und mit 300 g für 10 min und anschließend 1200 g für 10 min zentrifugiert. Dieses Vorgehen basiert auf einem Protokoll welches zur Gewinnung von Exosomen dient und von verschiedenen Autoren publiziert worden ist (Caby et al. 2005, Koga et al. 2005). Anschließend wurden die Überstände mit neuem NH-Expansionsmedium in einem Verhältnis von 1:1 vermischt. Die initial für 24 h in NH-Expansionsmedium kultivierten Oct-4-GFP-MEF wurden mit PBS-Puffer gewaschen und das vorbereitete Kulturmedium hinzugegeben. Während der Kulturdauer von 120 h wurde die GFP-Expression in den Zellen kontrolliert.

2.11 Auswertung der Ergebnisse

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Software-Programme Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und SigmaPlot der Firma Systat Software Inc., Richmond, CA, USA gesammelt, verarbeitet und ausgewertet. Für die gemessenen Zellzahlen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Die Messungen der Cy5- und DAPI-Fluoreszenzen der STRO-1-positiven RPZ aus dem NH-Medium erfolgten mit Hilfe des Programms SigmaScan Pro 5 (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA). Um die Intensitäten der Fluoreszenzfärbungen exakt messen zu können, wurden die digitalen Aufnahmen vom Zeiss-Format ZVI in das

Tiff-Format konvertiert. Dabei wurden der DAPI-Kanal für die Kernfärbung und der Cy5-Kanal für die Oct4-Anfärbung getrennt konvertiert. Nach dem Kalibrieren wurden die DAPI- und Cy5-Flächen der Tiff-Dateien durch die Überlagerung eines binären Bildes festgelegt und ausgemessen. Dieser Schritt erfolgte für jeden der beiden Kanäle einzeln. Zuvor wurden die Schwellenwerte des zu messenden Bereichs festgelegt; jedem Pixel wurde bei der Messung ein Grauwert zwischen 0 und 255 zugeordnet, wobei Schwarz dem Wert 0 und Weiß dem Wert 255 entsprach. Auf diese Weise wurden die Fläche, die totale Intensität, die durchschnittliche Intensität und der Shape-Faktor, der ein dimensionsloses Maß zur numerischen Beschreibung der Form eines Partikels darstellt, errechnet und anschließend in Bezug zueinander gesetzt.

3 Ergebnisse

Für die Aufrechterhaltung der stammzelltypischen Eigenschaften in mesenchymalen Stammzellen, die Sicherung der Zellpopulation sowie die induzierte Pluripotenz sind Transkriptionsfaktoren (TF) wie **Oct4**, **c-Myc**, **Sox2**, **Nanog** und **Klf4** von besonderer Bedeutung (Rodolfa und Eggan 2006; Park et al. 2007; Takahashi et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Beziehung zwischen der Ausbildung des Oberflächenmarkers STRO-1 und der Expression dieser TF in mesenchymalen Stammzellen des RP darzulegen. Untersucht wurden das Proliferations- und Expressionsverhalten der STRO-1-positiven und -negativen RPZ sowie das Verhalten und die Veränderung der Oct4-Expression und der DNA-Methylierung in den STRO-1-positiven RPZ im zeitlichen Verlauf.

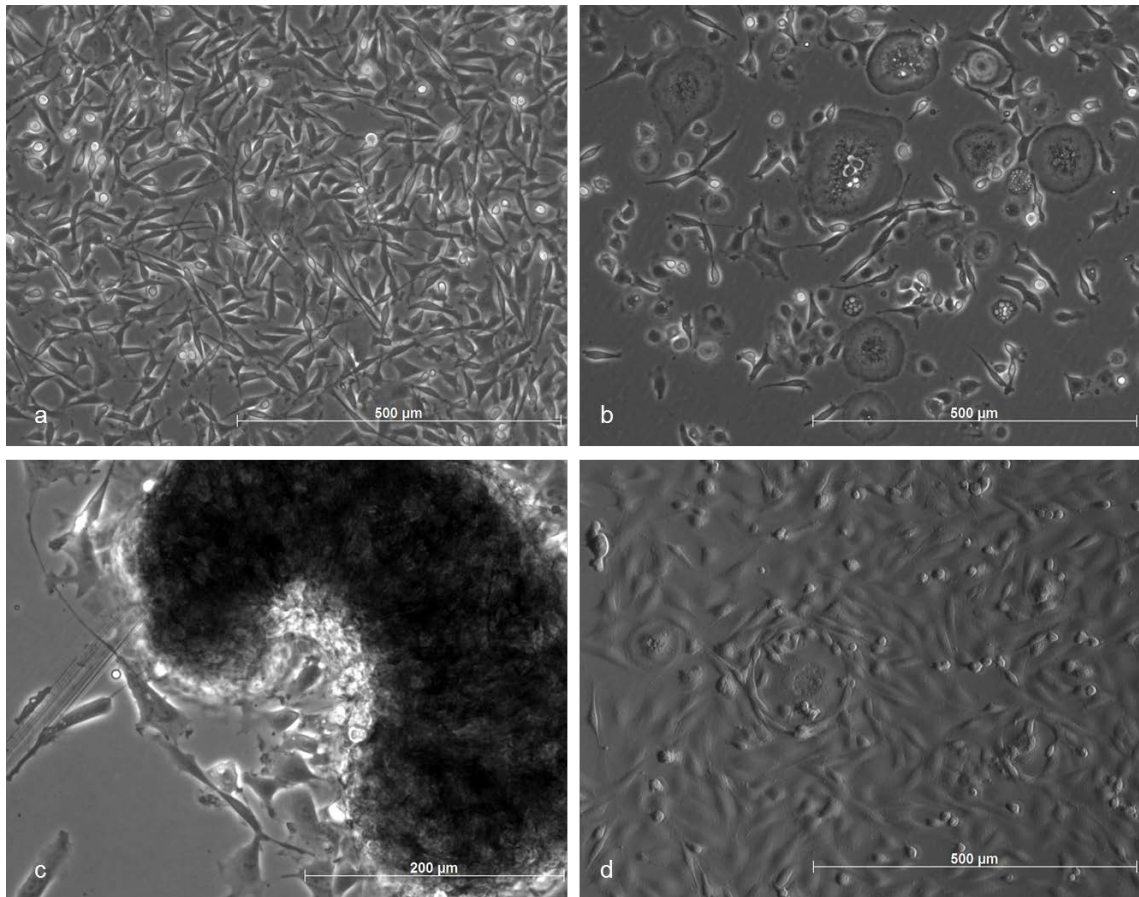


Abb. 1 Mikroskopische Aufnahme der RPZ in NH-Medium **a** und DMEM **b** nach dem zweiten Umsetzen der Gewebestückchen und anschließender viertägiger Kultivierung. Zellzahl, Morphologie und Zelldichte unterscheiden sich bereits deutlich voneinander. Die DMEM-Kultur zeigt darüber hinaus ein deutlich heterogeneres Zellbild. Bild **c** zeigt ein Gewebestück und die auswachsenden Zellen im NH-Expansionsmedium während der Gewebepassage VIII nach zwei Tagen in Kultur. Abbildung **d** zeigt die Zellen der DMEM-Kultur im Varel-Kontrast, der einen dreidimensionalen Eindruck der Zellkultur ermöglicht.

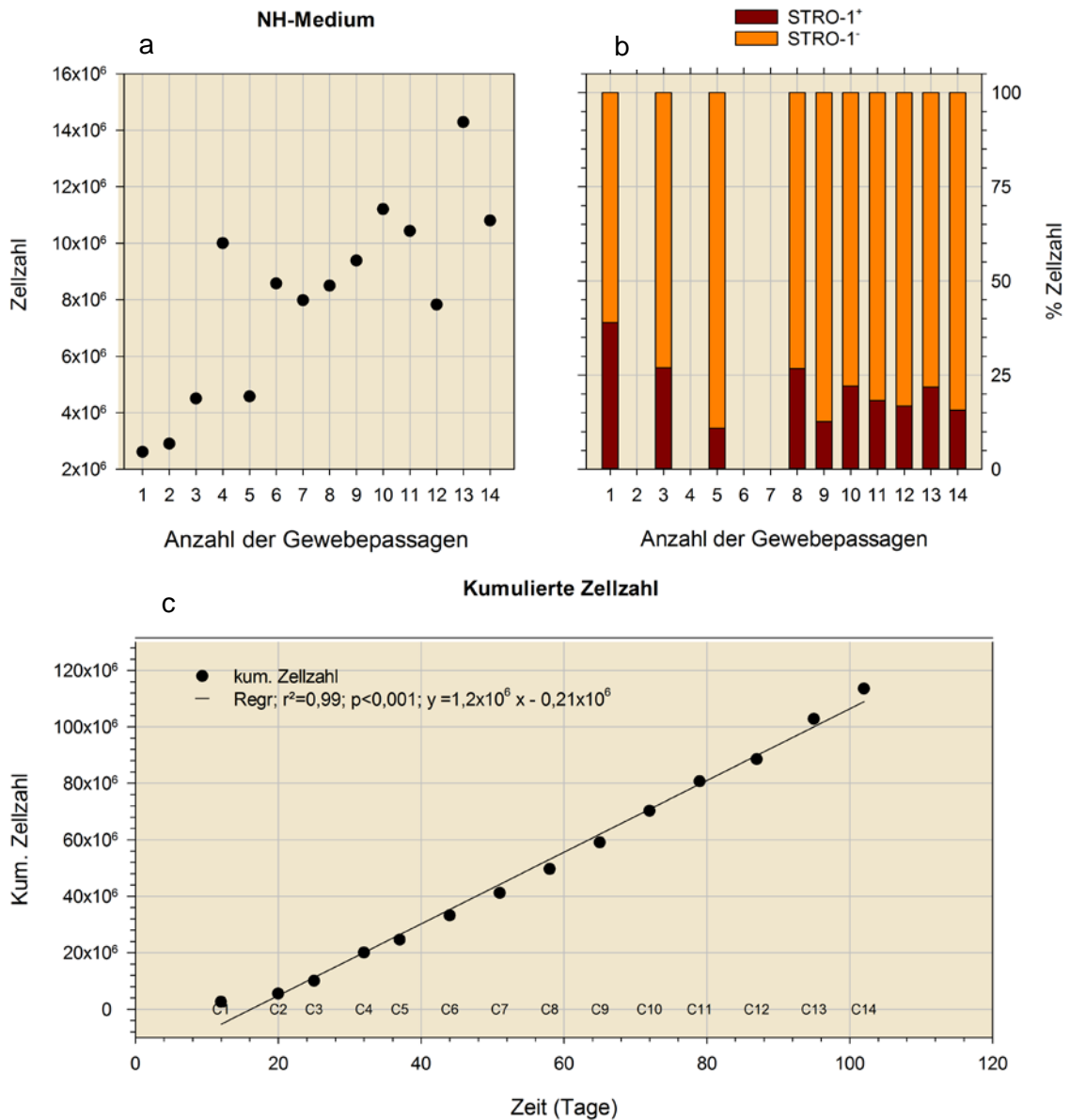


Abb. 2 Proliferation und Anzahl der STRO-1-positiven und STRO-1-negativen Zellen im NH-Medium während der 14 Gewebepassagen. Dargestellt ist **a)** die absolute Zellzahl, **b)** der relative Anteil der STRO-1-positiven Zellen und **c)** die zeitabhängige, kumulative Zellzahl der 14 Passagen sowie deren Regressionsdaten. Die Gewebebröckchen befanden sich zwischen fünf und 12 Tage im Kulturmedium. Bei den Gewebepassagen zwei, vier, sechs und sieben wurde keine STRO-1-Sortierung der Zellen vorgenommen.

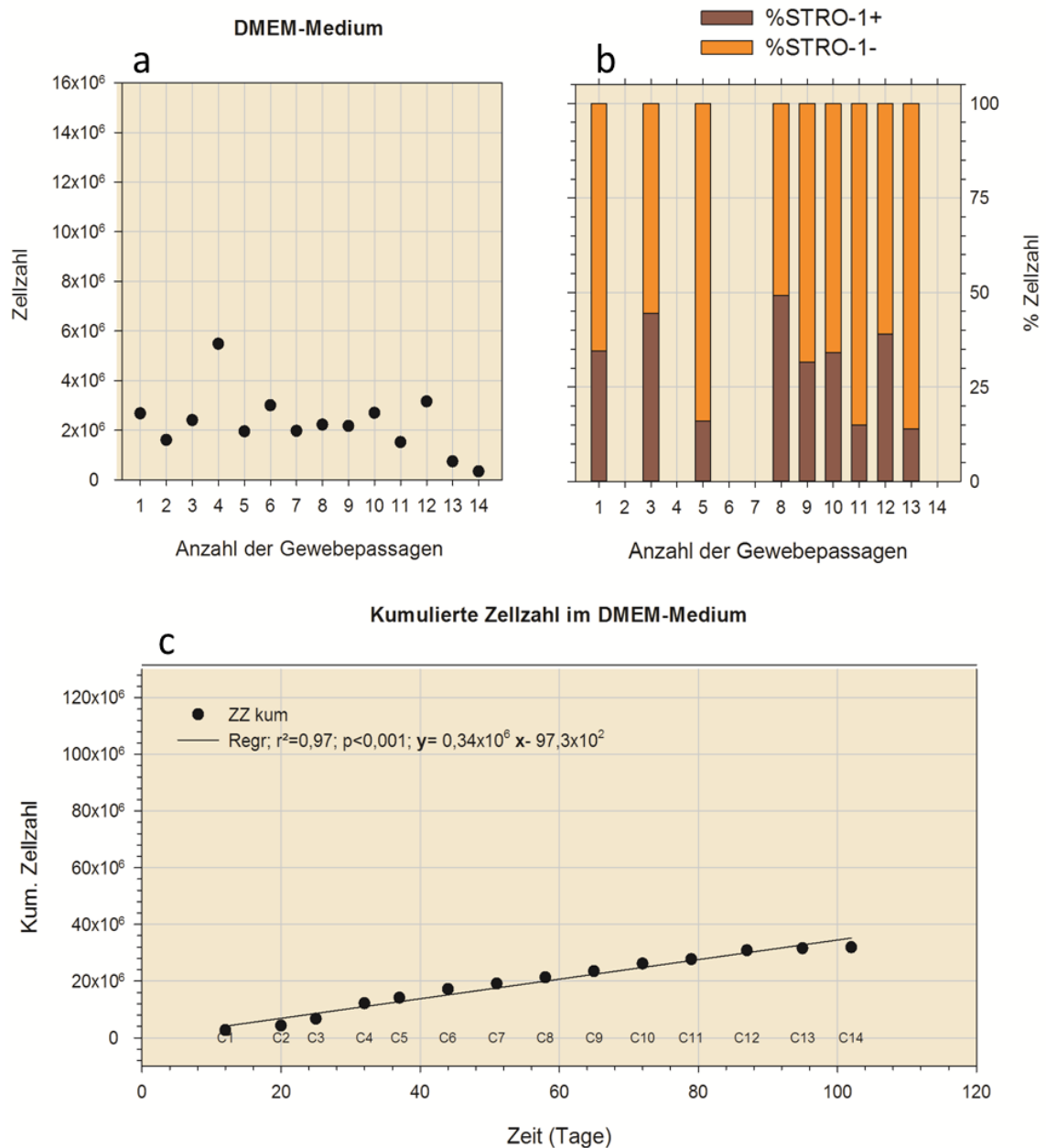


Abb. 3 Proliferation und Anzahl der STRO-1-positiven und STRO-1-negativen Zellen im DMEM während der 14 Gewebepassagen. Dargestellt ist **a)** die absolute Zellzahl, **b)** der relative Anteil der STRO-1-positiven Zellen und **c)** die zeitabhängige, kumulative Zellzahl der 14 Passagen sowie deren Regressionsdaten. Die Gewebepäckchen befanden sich zwischen fünf und 12 Tage im Kulturmedium. Bei den Gewebepassagen zwei, vier, sechs und sieben wurde keine STRO-1-Sortierung der Zellen vorgenommen.

3.1 Zellexpansion von STRO-1-positiven und -negativen RPZ

Die Gewebeproben aus dem Rosenstockperiost wurden zur Anzucht der Primärkultur in kleine Stückchen mit einem Durchmesser von ca. 1mm zerschnitten und in Kulturgefäßen mit den Nährmedien versetzt. Sobald die aus den Gewebestückchen auswachsenden RPZ ein konfluentes Wachstum erreichten, wurden die Gewebestückchen in neue Kulturgefäße umgesetzt und weiter kultiviert. Insgesamt wurden so 14 Gewebepassagen durchgeführt, um die Proliferationspotenz der STRO-1-positiven und -negativen RPZ zu testen. Mit den in den Kulturgefäßen verbliebenen Zellen wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

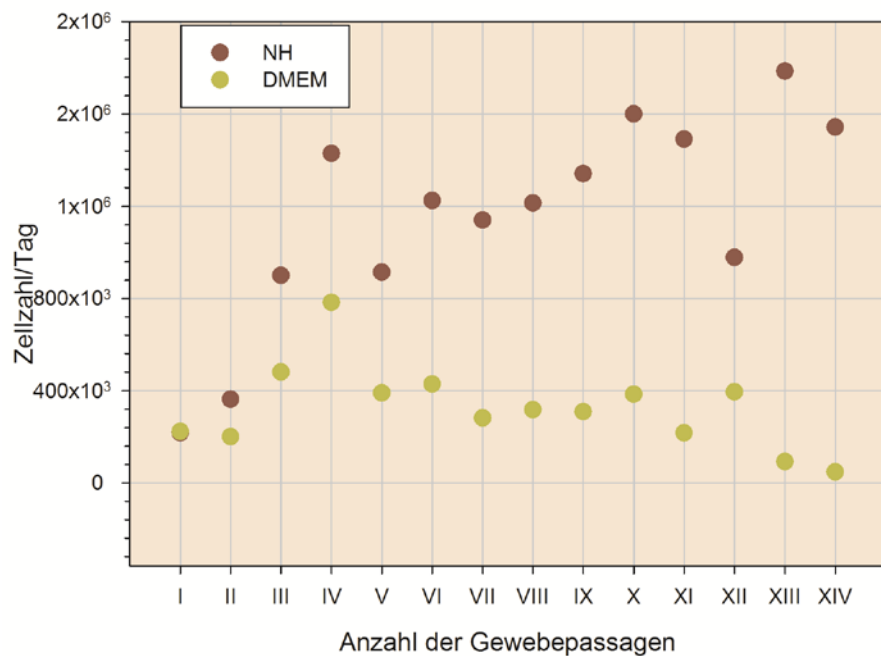


Abb. 4 Dargestellt ist die durchschnittlich ausgewachsene Zellzahl pro Kulturtag im NH- und im DMEM. Zum Zeitpunkt der Gewebepassagen wurden die Gewebepartikel in neue Kulturgefäße umgesetzt und die ausgewachsenen Zellen gezählt. Die Kulturdauer beträgt zwischen fünf und 12 Tage.

Die Zellen beider Kulturansätze zeigten eine fibroblastenähnliche Morphologie, wobei die RPZ im DMEM eine eher kompakte, abgerundete oder dreieckige Zellform besaßen und die Zellen im NH-Medium meist länglicher waren und häufiger ausgeprägte Zellfortsätze hatten. Darüber hinaus wies die DMEM-Kultur ein sehr viel heterogeneres Zellbild auf; die Zellen variierten stark in Größe und Form und präsentierten ein langsames Zellwachstum mit weniger Koloniebildung als im NH-Nährmedium. Im Laufe der Kulturzeit bildeten die plastikadhärenten RPZ beider Kulturen einen für mesenchymale Stammzellen typischen Zellrasen. Die Proliferationsraten der beiden Zellpopu-

lationen unterschieden sich deutlich voneinander. **Abb. 2** und **3** zeigen das Zellwachstum beider Kulturansätze im Vergleich. In den **Abb. 2a** und **3a** sind die jeweils gemessenen Zellzahlen als absolute Zahlen zum Zeitpunkt der Gewebepassagen dargestellt. Die Kultivierungsdauer, die zwischen fünf und 12 Tage betrug, ist kumulativ dargestellt. Zum ersten Messzeitpunkt nach 12 Kulturtagen lagen die Zellzahlen des NH-Nährmediums mit $2,61 \times 10^6$ Zellen und des DMEM-Nährmediums mit $2,67 \times 10^6$ Zellen dicht beieinander. Zu den darauffolgenden Messzeitpunkten generierte das Rosenstock-Periostgewebe im NH-Medium bis zur dreizehnten Gewebepassage (= 95 Kulturtage) steigende Zellzahlen. In der NH-Kultur war die 13. Gewebepassage der Zeitpunkt der maximalen Proliferationsrate mit $1,79 \times 10^6$ Zellen pro Kulturtag und insgesamt $14,28 \times 10^6$ Zellen. Im Vergleich dazu war das Maximum der Zellproliferation im DMEM-Nährmedium bereits zum Zeitpunkt der vierten Gewebepassage erreicht. Hier betrug die gemessene Zellzahl $5,48 \times 10^6$ Zellen und die maximale Proliferationsrate $7,83 \times 10^5$ Zellen pro Kulturtag. Danach fiel die Zahl der auswachsenden Zellen in diesem Medium auf Werte zwischen $1,95$ und $3,15 \times 10^6$ Zellen ab.

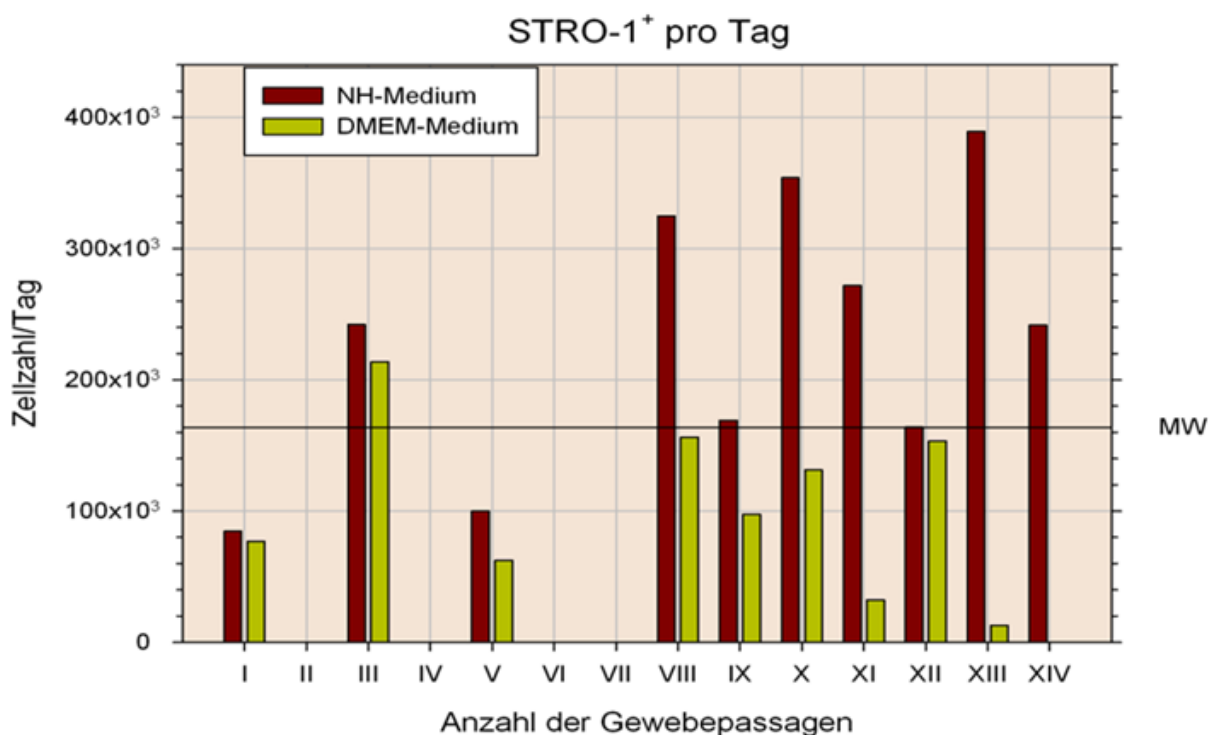


Abb. 5 Dargestellt ist die durchschnittlich ausgewachsene absolute Zellzahl pro Kulturtag von STRO-1-positiven Zellen im NH- und im DMEM-Nährmedium bis zum Zeitpunkt der jeweiligen Gewebepassage.

Die kumulierten absoluten Zellzahlen in Abhängigkeit der Kulturdauer (in Tagen) im NH- und im DMEM-Nährmedium wurden in den **Abb. 2c** und **3c** veranschaulicht. Die jeweiligen Zeitpunkte der Gewebepassage wurden durch die Punkte C1 bis C14 mar-

kiert. Die Regressionsgerade der Zellzahlen aus der NH-Kultur zeigte eine signifikant größere Steigung; die Gesamtzellzahl zum 14. Messzeitpunkt betrug $113,55 \times 10^6$ Zellen, in der DMEM-Kultur waren es hingegen lediglich $31,87 \times 10^6$ Zellen. Die Zellproliferation unterlag einer streng linearen Funktion. Die Zuwachsrate der Zellen ließ sich dabei durch zwei verschiedene Methoden errechnen; entweder aus der Steigung der Regression der kumulierten Zellzahl in **Abb. 2c** und **3c** oder aus dem Mittelwert der pro Tag errechneten Zuwachsraten, die in **Abb. 4** dargestellt werden. **Abb. 4** zeigt den direkten Vergleich der durchschnittlich pro Tag erzielten Zuwachsraten der Zellen bis zum Zeitpunkt der Passage der Gewebeteilchen. Diese unterschiedlich errechneten Werte waren innerhalb des jeweiligen Mediums weitestgehend gleich. Als Steigung der Regression der kumulierten Zellzahl ergab sich für das NH-Medium eine tägliche Zuwachsrate von $1,26 \times 10^6$ Zellen und anhand der Mittelwerte ein Zuwachs von $1,15 \times 10^6$ Zellen. Für das DMEM betrug die Steigung der ersten Ableitung der Regression $0,34 \times 10^6$ bzw. $0,32 \times 10^6$ Zellen als errechneter Mittelwert. Dies entsprach nur etwa einem Viertel der Zuwachsrate der Zellen des NH-Mediums. Das unterschiedliche Proliferationsverhalten der Zellen in den beiden Nährmedien wurde hier besonders deutlich. Obwohl die RPZ beider Kulturen zu Beginn der Kulturzeit ähnliche Zellzahlen aufwiesen, präsentierten die RPZ des NH-Nährmediums ein deutlich höheres Proliferationspotential mit bis zu 20-fach höheren Zellzahlen. **Abb. 5** zeigt die absoluten Zahlen der STRO-1-positiven Zellen beider Nährmedien pro Kulturtag bis zum Zeitpunkt der jeweiligen Gewebepassage. Die gemessenen Zellzahlen des NH-Nährmediums überstiegen die des DMEM-Nährmediums zu jedem Messzeitpunkt. Ab dem achten Messzeitpunkt divergierten die Zellzahlen besonders stark. Simultan zur Gesamtproliferation erreichten die STRO-1-positiven Zellen aus dem NH-Medium zum 13. Messzeitpunkt mit $2,48 \times 10^6$ Zellen ihr Maximum, während die maximale Anzahl von STRO-1-positiven Zellen in der DMEM-Kultur zum dritten Messzeitpunkt mit $1,10 \times 10^6$ Zellen gemessen wurde. **Abb. 2b** und **3b** zeigen, dass der relative Anteil an STRO-1-positiven Zellen im DMEM-Nährmedium bei zehn von 13 Messungen signifikant höher war als im NH-Nährmedium. Trotz der höheren absoluten Zellzahl im NH-Medium betrug der durchschnittliche Anteil der STRO-1-positiven Zellen nur $21,07 \pm 8,27$ %, im DMEM hingegen $30,9 \pm 13,11$ %. Der höchste relative Anteil an STRO-1-positiven Zellen in der DMEM-Kultur fand sich zum Zeitpunkt der achten Gewebepassage mit 49,29 %. Die NH-Kultur brachte hingegen zum Zeitpunkt der ersten Passage mit 38,91 % den größten relativen Anteil STRO-1-positiver Zellen hervor. Die Expansionsversuche zeigten, dass die Proliferationstendenz im NH-Expansionsmedium deutlich höher war als im standardisierten DMEM. Dementsprechend war auch die absolute Zahl an STRO-1-positiv markierten Zellen in diesem Medium höher, wenngleich der relative Anteil der STRO-1-positiven Zellen im DMEM höher war.

3.2 Expression von Transkriptions- und Pluripotenzfaktoren

Die molekularbiologische Aufarbeitung und Untersuchung sollte Aufschluss über die Expression der Transkriptionsfaktoren **Oct4**, **Sox2**, **c-Myc**, **Nanog** und **Klf4** in den RPZ geben. Insbesondere die Unterschiede von STRO-1-positiven- zu STRO-1-negativen Zellen im NH- und DMEM-Nährmedium waren von Interesse. Darüber hinaus sollte die Veränderung der Expression im zeitlichen Verlauf, also in den verschiedenen Gewebepassagen über den Zeitraum von 102 Kulturtagen, dargestellt werden.

Neben der immunzytochemischen Färbung von STRO-1 und Oct4 (**Abb. 6a**) konnte mit dem vorher ermittelten, passenden Oct4-Primer in allen Proben (Cervus dama, Cervus elaphus, humane MSC) ein PCR-Fragment von 335 bp detektiert werden (**Abb. 6b**). Nach einer Sequenzierung der ausgeschnittenen Banden zeigte sich bei den Damwild-Proben eine bis zu 98%ige Ähnlichkeit zu der bovinen Oct4-Sequenz und eine bis zu 78%ige Ähnlichkeit zu der humanen Oct4-Sequenz.

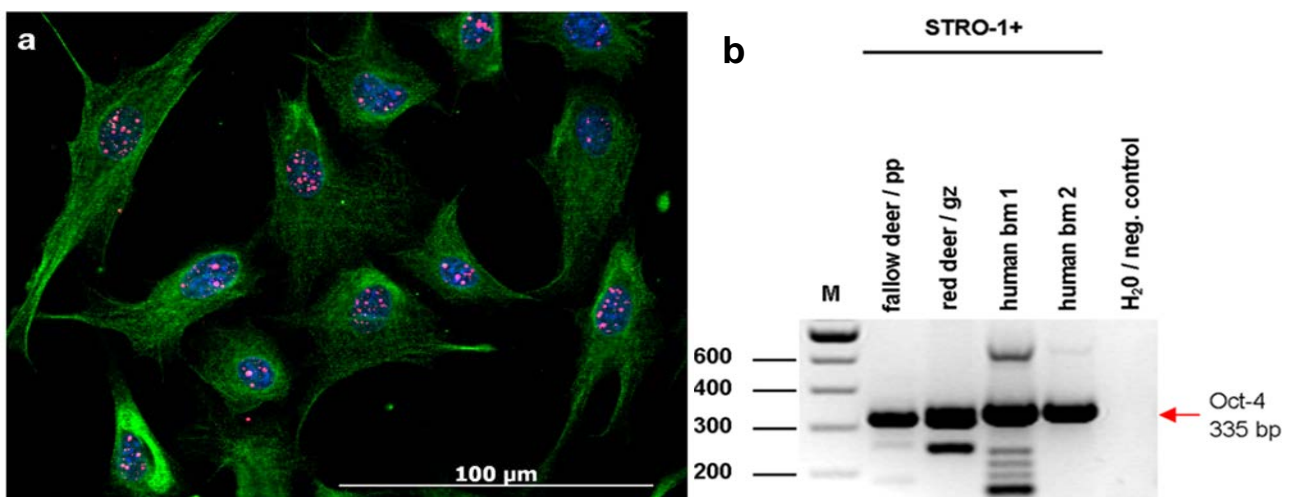


Abb. 6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und RT-PCR-Analyse der Oct4-Expression STRO-1-positiver Zellen der Wachstumszone des Rosenstockperiostes vom Damhirsch. **a)** Die Aufnahme zeigt die Immunfluoreszenzfärbung STRO-1-positiver Zellen (primär Antikörper: anti-human STRO-1 MAB 1038, R&D Systems, 1:50; sekundär Antikörper: FITC Goat anti Mouse IgG/IgM, BD Pharmingen, Germany, 1:100) im Bereich der Zelloberfläche (grüne Pseudokolorierung) und von Oct4 (rote Pseudokolorierung) in den Zellkernen, die mit Hoechst 33342 gegengefärbt wurden. Im Bild **b)** sind die Gelbanden der Oct4-Expression STRO-1-positiver Zellen aus dem Rosenstockperiost vom Damhirsch und im Vergleich dazu auch die Expressionen vergleichbarer Rothirschzellen sowie von STRO-1-positiven humanen Knochenmarkszellen aus Beckenkamm-Biopsien zu sehen. Die PCR dieser Proben ergab Banden, die Oct4 (335 bp) repräsentieren. Aus den gewonnenen Banden wurden Sequenzanalysen durchgeführt, die eine hohe Homologie mit Oct4 bestätigten. Die Primer wurden bei den weiteren Versuchen verwendet (Abb. 6a und b sind bereits veröffentlichte Aufnahmen, doi:10.1371/journal.pone.0032287.g001 und g003)

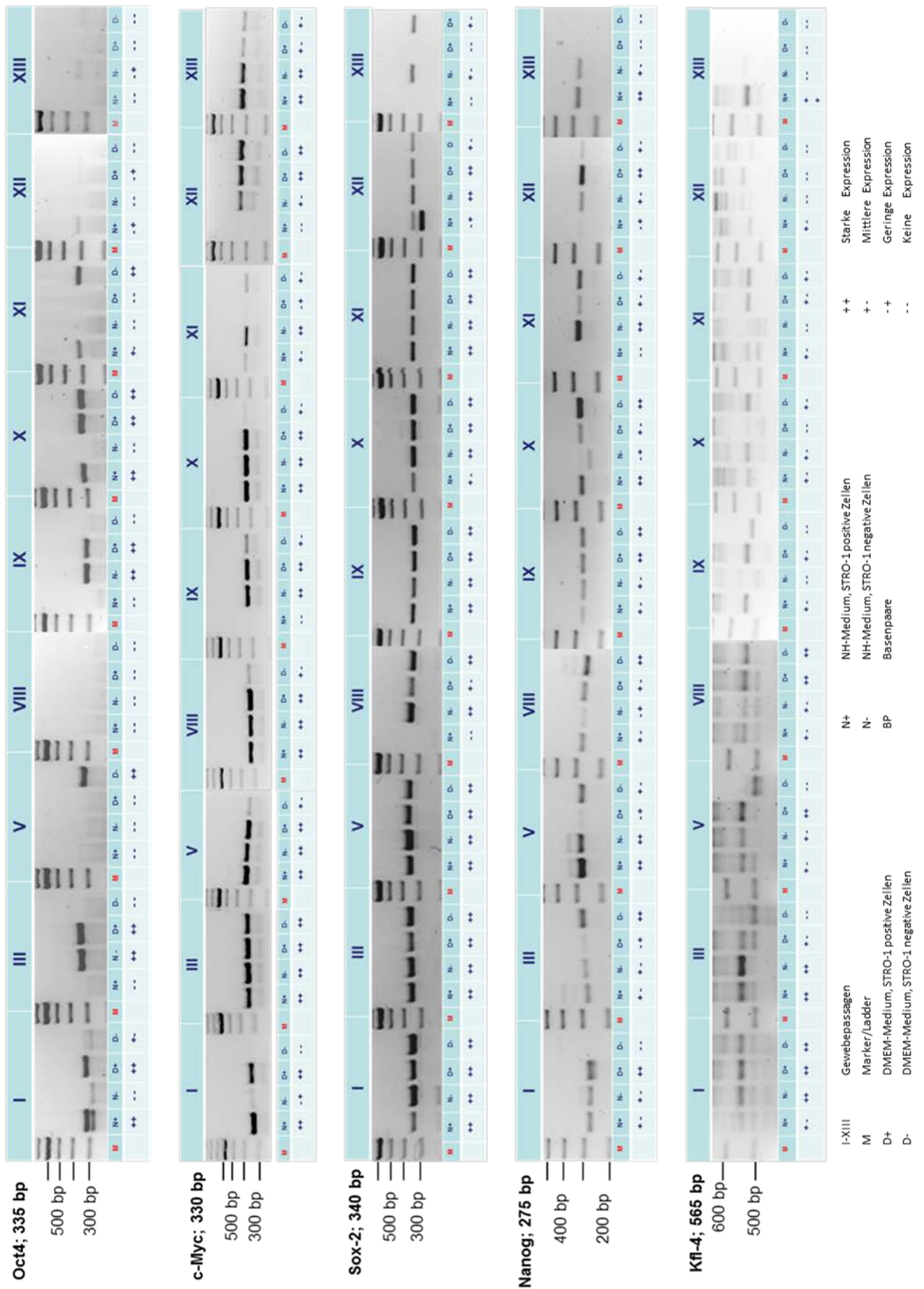


Abb. 7 Dargestellt ist die Expression der fünf Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4 in den STRO-1-positiven und -negativen RPZ der Passagen

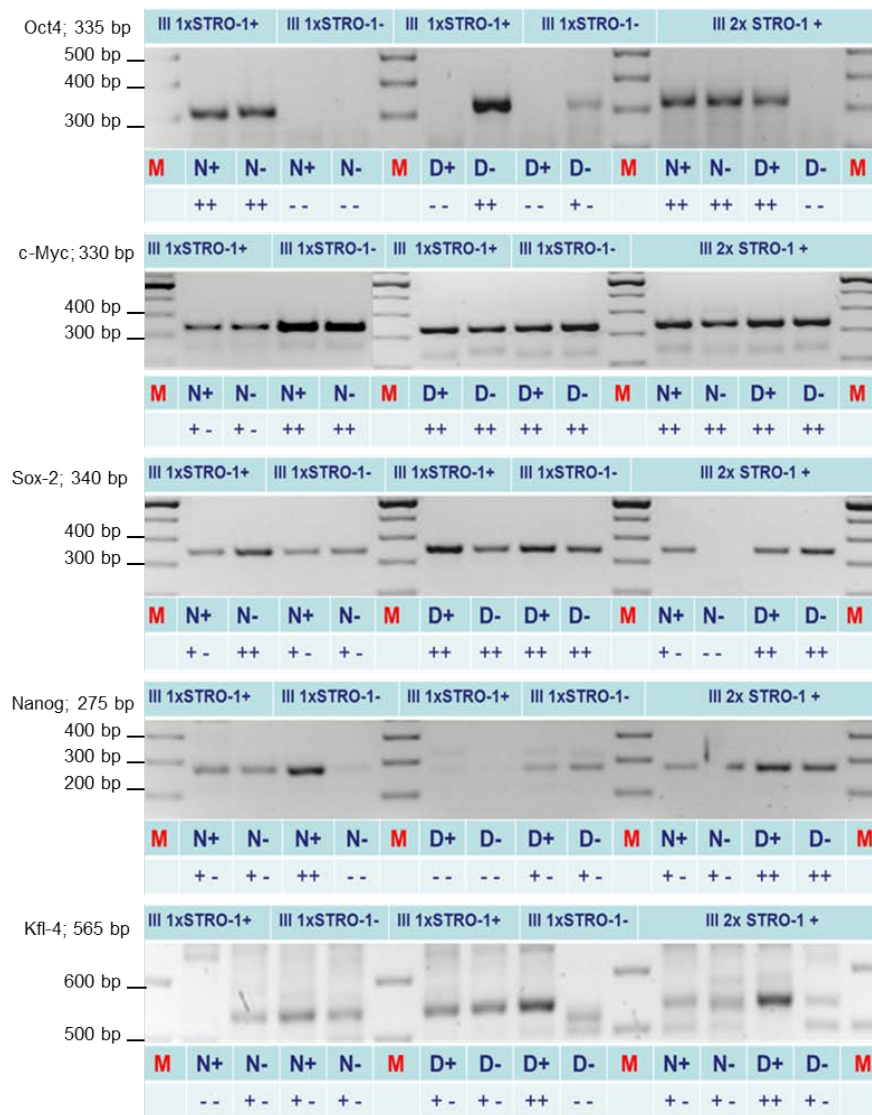
eins bis dreizehn (I-XIII) im Vergleich. Die Primärkulturzellen wurden parallel in NH- und DMEM kultiviert. Die Passagen vier und sechs wurden nach anderen Oberflächenmarkern sortiert und sind daher nicht abgebildet. Die Originalabbildungen mit Negativkontrollen sind im Anhang ab Seite 58 zu finden.

Der Referenzmarker, das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), wurde in allen Proben annähernd gleich exprimiert (siehe Seite 57). Die Negativkontrolle mit H₂O zeigte keinerlei Banden. **Abb. 7** zeigt die PCR-Analyse und die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese der Gewebepassagen eins bis 13 (I-XIII). In horizontaler Ausrichtung ergeben sich die Banden der Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4. Die jeweiligen Passagen sind untereinander angeordnet. Die Transkriptionsfaktoren c-Myc und Sox2 wurden in einem Großteil der geernteten Zellpopulationen exprimiert. Dabei wurde das Protoonkogen c-Myc von den Zellen im DMEM, insbesondere von den STRO-1-negativen RPZ, in geringerem Ausmaß exprimiert als von den Zellen in der NH-Kultur. Für Sox2 war hingegen kein Unterschied zwischen den beiden Nährmedien evident. Sowohl in STRO-1-positiven als auch in STRO-1-negativen Zellen beider Medien wurde Sox2 in vergleichbarem Ausmaß exprimiert. Die Banden wurden jedoch mit zunehmender Kulturdauer deutlich schmaler, obgleich die Zellzahlen im NH- und DMEM bis zur 12ten bzw. 13ten Passage anstiegen. Die Bandenbreite korreliert demnach nicht oder nur bedingt mit der Zellzahl, sondern mit der Kulturdauer. Nanog und Klf4 wurden weniger gleichmäßig exprimiert und die Banden waren von geringerer Intensität. Nanog war zwar in 32 von 36 Zellproben nachweisbar, dennoch konnte kein eindeutiges Expressionsmuster dargestellt werden. Die Zellpopulationen, in denen Nanog exprimiert wurde, stammten aus beiden Nährmedien und waren sowohl STRO-1-positiv als auch -negativ. Die Intensitäten der Banden der Zellpopulationen, die aus der gleichen Gewebepassage hervorgingen, waren ebenfalls sehr unterschiedlich; auch hier zeigte sich kein direkter Zusammenhang mit der gemessenen Zellzahl. In Passage 12 war beispielsweise eine ausgeprägte Bande bei den STRO-1-positiven RPZ aus dem DMEM zu erkennen ($9,86 \times 10^5$ Zellen), während bei den STRO-1-positiven Zellen aus dem NH-Medium bei einer Zellzahl von $1,08 \times 10^6$ Zellen nahezu keine Nanog-Expression nachzuweisen war. Die Intensität der Klf4-Banden, die ebenfalls nur schwach ausgeprägt waren, nahm mit zunehmender Kulturdauer weiter ab. Darüber hinaus waren hier mehrere Nebenbanden zu beobachten. Dennoch ließ sich in allen STRO-1-positiven Zellpopulationen, die in NH-Medium kultiviert wurden, Klf4 nachweisen. Vor allem bei den späteren Gewebepassagen (XII, XIII) waren nur noch die STRO-1-positiven Zellen der NH-Kultur Klf4-positiv. Die STRO-1-negativen Zellpopulationen, insbesondere die der DMEM-Kultur, exprimierten nur wenig bis kein Klf4. Der Transkriptionsfaktor Oct4 wurde durch dieses Verfahren in deutlich weniger Populationen nachgewiesen als c-Myc, Sox2, Nanog und

Klf4. 20 von 36 Zellproben zeigten in der Gelelektrophorese keine Oct4-Bande. Die Expression war außerdem unabhängig vom Nährmedium; in den Zellpopulationen beider Medien fand sich Oct4. Darüber hinaus zeigte diese Untersuchung, dass nicht nur STRO-1-positive-, sondern auch STRO-1-negative Zellen im Laufe des Versuches Oct4 exprimieren. Eine größere Rolle schien hingegen die zeitliche Komponente zu spielen; in keiner der Zellpopulationen, die aus der Gewebepassage sieben, 12 und 13 hervorgehen, wurde Oct4 exprimiert. Dennoch war auch hier kein eindeutiges Expressionsmuster erkennbar. Sowohl die Zellen der frühen Passagen als auch die der späteren waren Oct4-positiv bzw. -negativ.

3.3 Expressionsverhalten der mehrfach sortierten RPZ

Für diesen Teil des Versuches wurden die nach STRO-1 sortierten RPZ der Gewebepassage drei erneut kultiviert und zwei weitere Male nach diesem Oberflächenmarker sortiert. Aus den geernteten Zellen ergaben sich für die Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog und Klf4 nach der Amplifikation der cDNA und der elektrophoretischen Auftrennung die in **Abb. 8** dargestellten Banden. Sox2 und c-Myc präsentierten eine gleichmäßige Expression in nahezu allen Zellpopulationen. Im NH-Nährmedium konnte Oct4 in den STRO-1-positiven und -negativen RPZ nachgewiesen werden. Diese waren zuvor bereits einmal STRO-1-positiv sortiert worden. Nach der ersten Sortierung betrug die anschließende Kultivierungsdauer 5 Tage und nach der zweiten Sortierung 7 Tage. In den STRO-1-positiven und -negativen RPZ, die bei der ersten Sortierung STRO-1-negativ waren, ließ sich keine Oct4 Bande darstellen. Im DMEM enthielten hingegen nur diejenigen Zellen Oct4, die bei der zweiten Sortierung STRO-1-negativ waren. Primär waren diese Zellen sowohl STRO-1-positiv als auch -negativ. Von den zuvor zweifach-STRO-1-positiven RPZ ließ sich in den STRO-1-negativen Zellen aus dem DMEM kein Oct4 nachweisen. Nanog wurde in dieser Versuchsreihe ebenfalls von den meisten Zellpopulationen exprimiert, jedoch in unterschiedlichen Intensitäten. Die STRO-1-positiven und -negativen RPZ aus dem DMEM zeigten keine Nanog-Banden, diese Zellen waren bei der ersten Sortierung STRO-1-positiv. Auch Klf4 wurde lediglich von zwei Zellpopulationen nicht exprimiert: den STRO-1-positiven RPZ des NH-Mediums, die bereits einmal STRO-1-positiv waren, und den STRO-1-negativen RPZ des DMEMs, die zuvor STRO-1-negativ waren. Diese Banden waren schwächer ausgeprägt und es existierten auch hier Nebenbanden.



Legende:

III	Gewebepassagen III	N+	NH-Medium, STRO-1 ⁺ Zellen
1xSTRO-1 ⁺	Zellen 1xSTRO-1 ⁺ sortiert	N-	NH-Medium, STRO-1 ⁻ Zellen
1xSTRO-1 ⁻	Zellen 1xSTRO-1 ⁻ sortiert	BP	Basenpaare
2xSTRO-1 ⁺	Zellen 2xSTRO-1 ⁺ sortiert	++	Starke Expression
M	Marker/Ladder	+ -	Mittlere Expression
D+	DMEM, STRO-1 ⁺ Zellen	- +	Geringe Expression
D-	DMEM, STRO-1 ⁻ Zellen	--	Keine Expression

Abb.8 Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4, c-Myc, Sox2, Nanog, und Klf4 in den mehrfach nach dem Oberflächenmarker STRO-1 sortierten Zellpopulationen der III. Gewebepassage. Nach der jeweiligen Sortierung wurden die Zellen erneut ausgesät und bis zu einem konfluentem Zellwachstum kultiviert. Die Originalabbildungen mit Negativkontrollen sind im Anhang ab Seite 58 zu finden.

Zusammenfassend können folgende Aussagen gemacht werden: Ein Großteil der Zellen dieser Versuchsreihe exprimierte alle fünf Transkriptionsfaktoren; insbesondere

jene Zellen, die dreimal nach dem Oberflächenmarker STRO-1 sortiert wurden. Die Zellpopulationen, in denen die Oct4-Bande besonders gut sichtbar wurde, sind alle- samt ein- oder zweimalig STRO-1-positiv sortiert worden. Bei den übrigen Transkriptionsfaktoren war der Unterschied zwischen den STRO-1-positiven und -negativen Zellen weniger deutlich bzw. nicht vorhanden.

3.4 Intensitäten von Cy5 und DAPI in den STRO-1-positiven RPZ

In diesem Versuchsteil wurden die Intensitäten der DAPI gefärbten DNA und des immunfluoreszenzmarkierten Oct4-Proteins anhand fixierter, STRO-1 positiver Zellen gemessen und analysiert. Dies sollte Aufschluss über die Expression des Oct4-Proteins im zeitlichen Verlauf und den Zusammenhang zwischen der Oct4-Expression und dem Methylierungsgrad der DNA geben. Dazu wurden die RPZ aus dem NH-Expansionsmedium nach STRO-1 sortiert und die positiven RPZ 24 h, 48 h, 72 h, 96 h sowie 144 h kultiviert, fixiert und gefärbt. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung wobei DAPI die DNA und der Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 das Oct4-Protein sichtbar machten. **Abb. 9** zeigt die Immunfluoreszenzaufnahmen, die nach den jeweiligen Inkubationszeiten angefertigt wurden. 24 h nach der STRO-1 Sortierung wiesen die Zellen lediglich vereinzelte Spots des angefärbten Oct4 in den Zellkernen auf. Nach 48 h nahm der Oct4-Gehalt in den Zellen signifikant zu. Das Oct4-Protein war dabei nicht nur im Zellkern, sondern bei einigen Zellen auch vermehrt im Zytoplasma lokalisiert. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten darüber hinaus Zellen mit langen tubulären Fortsätzen, die in einigen Fällen Verbindungen zwischen den Zellen bildeten. In diesen Fortsätzen bzw. Zell-zu-Zellverbindungen war ebenfalls das fluoreszierende Oct4-Protein nachzuweisen (**Abb.10**). 72 h nach der STRO-1-Sortierung war der Anteil des fluoreszierenden Oct4 wieder ähnlich gering wie zum ersten Messzeitpunkt. Eine weitere Oct4-Zunahme war nach 96 h zu beobachten. Auch hier war der Transkriptionsfaktor sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma einiger Zellen nachweisbar, allerdings in erheblich geringerem Ausmaß als nach 48 h. Nach 144 h war schließlich nur noch in wenigen Zellen fluoreszenzmarkiertes Oct4. Die Kernfärbung der blau fluoreszierenden DAPI-Färbung zeigte zum ersten Messzeitpunkt nach 24 h auffällig viele hellblaue Spots im Zellkern, deren Intensität mit zunehmender Kultivierungsdauer abnahm.

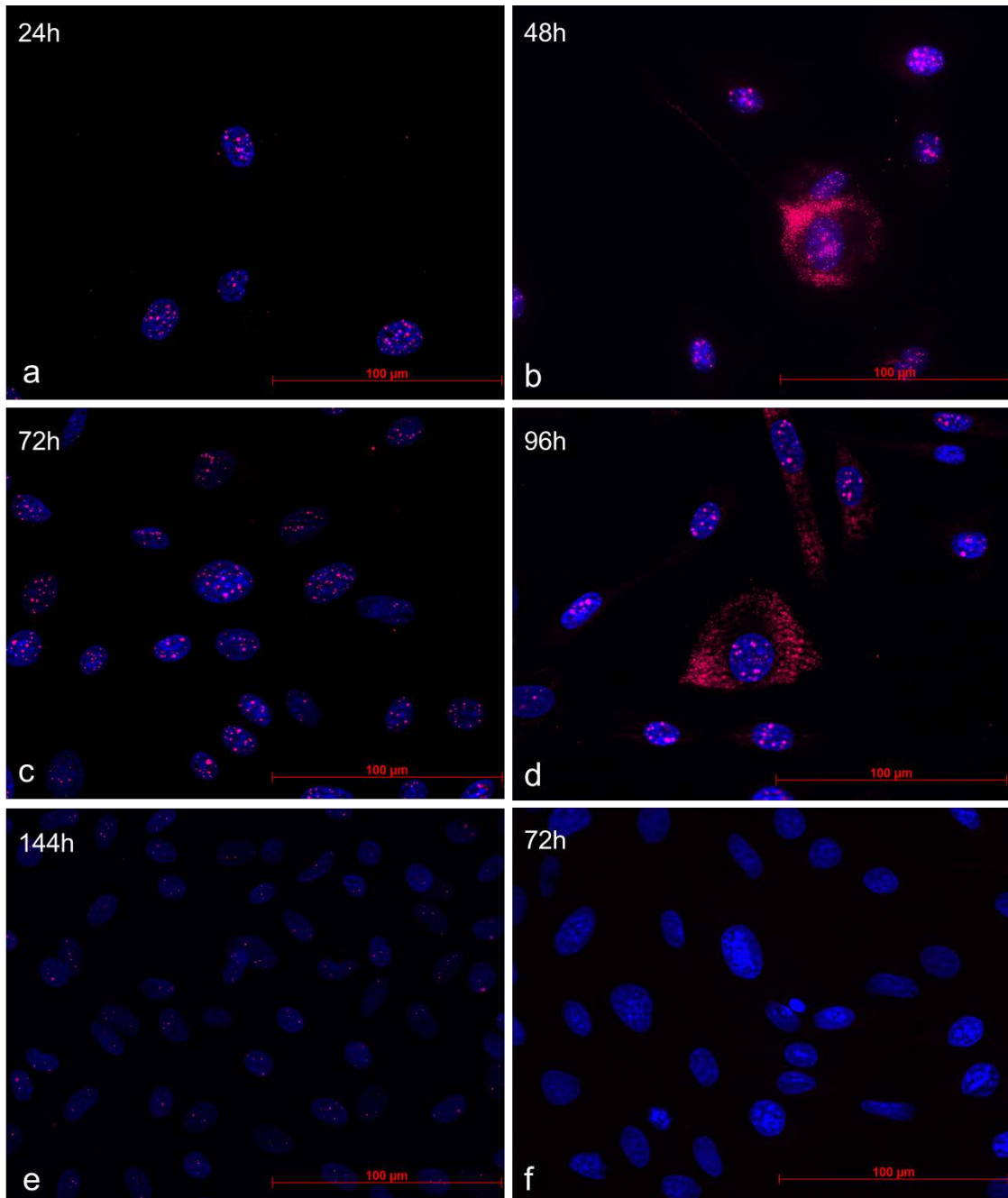


Abb. 9 Fluoreszenzaufnahmen der immunhistochemischen Färbung der Zellkerne und des Oct4-Proteins. Die STRO-1-positiven mesenchymalen Stammzellen des Rosenstockperiosts wurden nach der STRO-1-Sortierung **a)** 24 h, **b)** 48 h, **c)** 72 h, **d)** 96 h sowie **e)** 144 h im NH-Expansionsmedium kultiviert, fixiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI (blau) und Cy5 (rot) gefärbt. Abb. **f)** zeigt die Negativkontrolle nach 72 h. DAPI färbt den Zellkern an, während Cy5 den Transkriptionsfaktor Oct4 sichtbar macht. Während nach 24 h, 72 h und 144 h nur wenige im Zellkern lokalisierte Oct4-Spots zu erkennen sind, kann nach 48 h und 96 h eine beträchtliche Menge des Proteins im Zellkern **und** im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden.

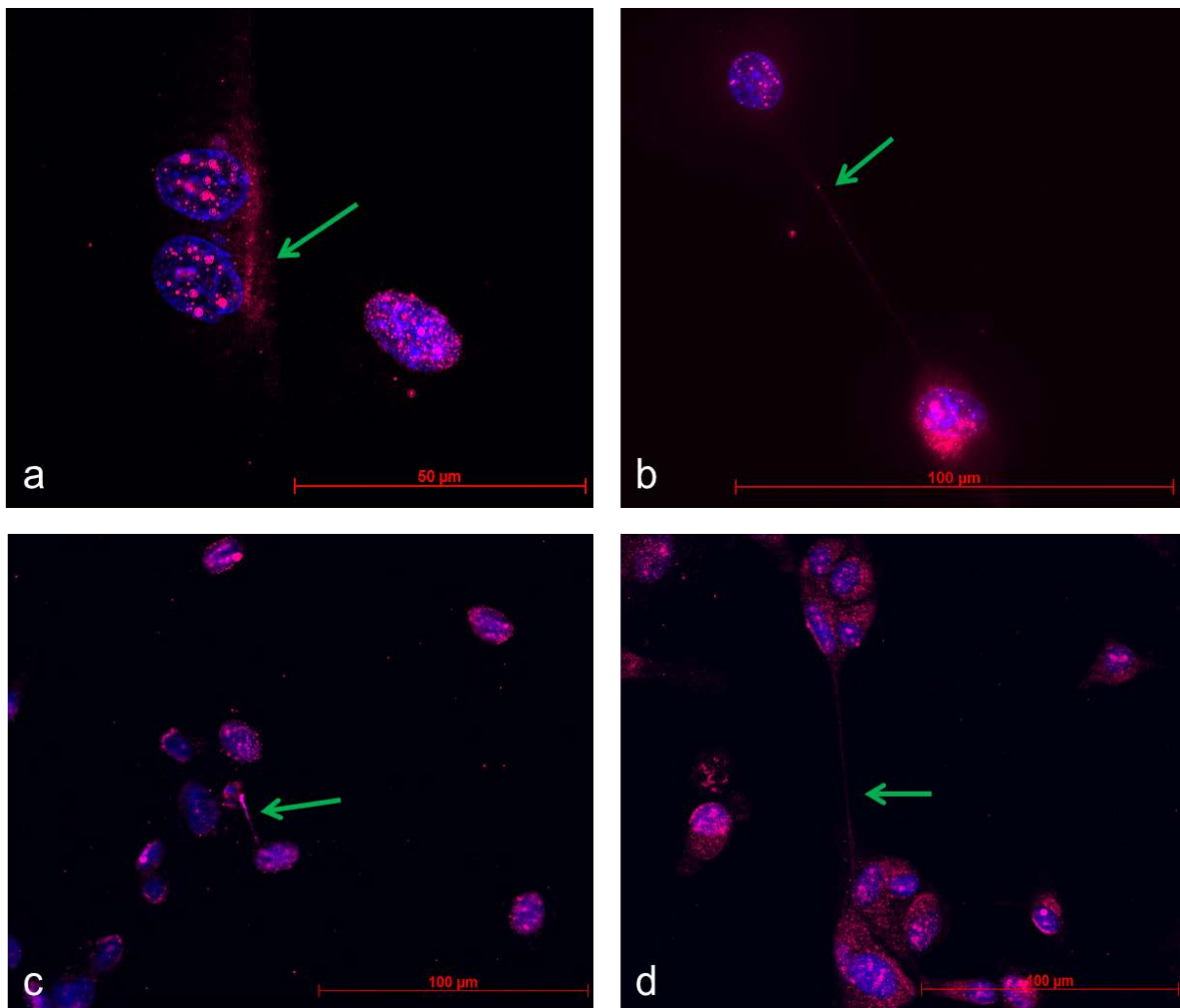


Abb. 10 Die Bilder **a)**, **b)**, **c)** und **d)** zeigen STRO-1-positive RPZ aus dem NH-Expansionsmedium, die nach der Sortierung für 48 h inkubiert wurden. Anschließend wurden sie fixiert und mit DAPI (blau, Zellkern) und Cy5 (rot, Oct4-Protein) angefärbt. Die abgebildeten Zellen weisen einen hohen Gehalt des Oct4-Proteins auf, das sich sowohl auf den Nucleus als auch auf das Zytoplasma verteilt. Darüber hinaus sind Zellfortsätze, die Verbindungen zwischen den RPZ darstellen (grüner Pfeil), zu erkennen, in denen ebenfalls das Oct4-Protein nachzuweisen ist (Negativ-Kontrolle siehe Abb. 9).

Nach 144 h waren diese Spots in den Zellkernen am schwächsten ausgeprägt. Für die weitere Analyse wurden die fluoreszenzmarkierten Strukturen in den STRO-1-positiven RPZ mit Hilfe des Bildanalyse-Programmes Sigma Scan ausgemessen. Grundlage waren 17 mikroskopische Aufnahmen an den fixierten und fluoreszenzmarkierten Zellen. Insgesamt wurden in 276 Zellkernen und im Zytoplasma der Zellen die Intensitäten und Flächen von 19200 Oct4-Spots vermessen, die eine Größe zwischen $0,1 \mu\text{m}^2$ und $16 \mu\text{m}^2$ ($1,3 \pm 2,5 \mu\text{m}^2$) in der zweidimensionalen Ausdehnung aufwiesen. Die stark methylierten DNA-Abschnitte der Zellkerne hoben sich als helle (DAPI)-Spots von der dunkleren blauen DAPI-Färbung ab, die ebenfalls mit Hilfe der Mehrkanalbilder ausgewertet wurden.

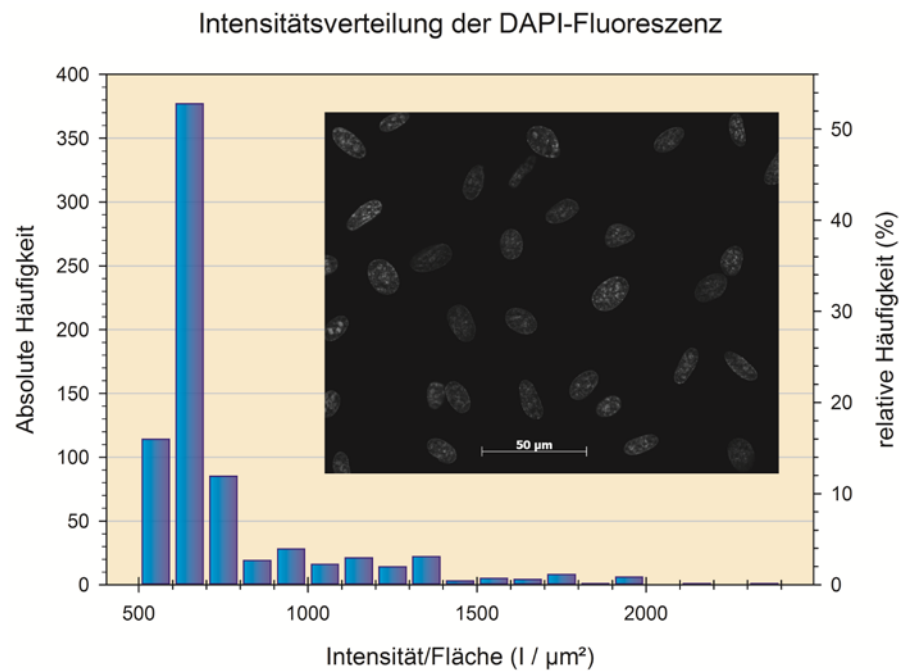


Abb. 11 Intensitätsverteilung von DAPI im Zellkern ($n=276$). Angegeben ist die absolute und relative Häufigkeit (in %) der Intensität pro DAPI-Fläche. Hohe Intensitäten ab Werten von ca. $1200 I/\mu\text{m}^2$ entsprechen methylierten Arealen. Das in die Grafik integrierte Bild zeigt ein 8-bit Schwarz-Weiß-Bild einer DAPI-Färbung der Zellkerne von STRO-1-positiven Zellen nach 96 h in der Zellkultur. Deutlich zu sehen sind die helleren Anteile der DAPI-Färbung, die den methylierten Abschnitten des Kernes entsprechen.

Die Verteilung der gemessenen DAPI-Intensitäten pro DAPI-Fläche ($I/\mu\text{m}^2$) ist in **Abb. 11** dargestellt. In den 276 Zellkernen steigt die Intensität mit Zunahme der hellen, methylierten Areale der DNA. Der Grafik ist sowohl die absolute als auch die relative Häufigkeit der Intensitäten zu entnehmen. Dabei wird deutlich, dass sich über 80 % der gemessenen Flächen in einem Intensitätsbereich zwischen $500 I/\mu\text{m}^2$ und $800 I/\mu\text{m}^2$ befanden. Etwa 52 % der gemessenen DAPI-Flächen lagen dabei in einem Bereich zwischen $600 I/\mu\text{m}^2$ und $700 I/\mu\text{m}^2$. Die methylierten Spots zeichneten sich durch eine Intensität von ca. $1200 I/\mu\text{m}^2$ oder mehr aus. Der Anteil der gemessenen DAPI-Spots in diesem Bereich war allerdings vergleichsweise gering und betrug nur etwa 13 % der gesamten DAPI-Fläche. Der weitaus größte Anteil der Zellen bzw. der Zellkerne befand sich also in einem Zustand geringer Methylierung. **Abb. 12** zeigt die Intensitätsverteilung der 19.200 gemessenen Oct4-Objekte, ebenfalls in relativen und absoluten Zahlen. Der Intensitätsbereich, in dem sich die Messwerte befanden, betrug zwischen $400 I/\mu\text{m}^2$ und $4200 I/\mu\text{m}^2$. Damit verteilten sich die gemessenen Werte auf einen deutlich breiteren Intensitätsbereich als die DAPI-Intensitäten. Die Grafik veranschaulicht jedoch, dass auch hier über 80 % der Werte unterhalb von $1000 I/\mu\text{m}^2$ und damit in einem ähnlichen Intensitätsbereich wie die DAPI-Intensitäten angesiedelt waren. Im

Gegensatz zur Intensität der Kernfärbungen lagen die Höchstwerte zwischen $3600 \text{ I}/\mu\text{m}^2$ und $4200 \text{ I}/\mu\text{m}^2$; diese machten nur einen vergleichsweise kleinen Teil von weniger als 1 % aus.

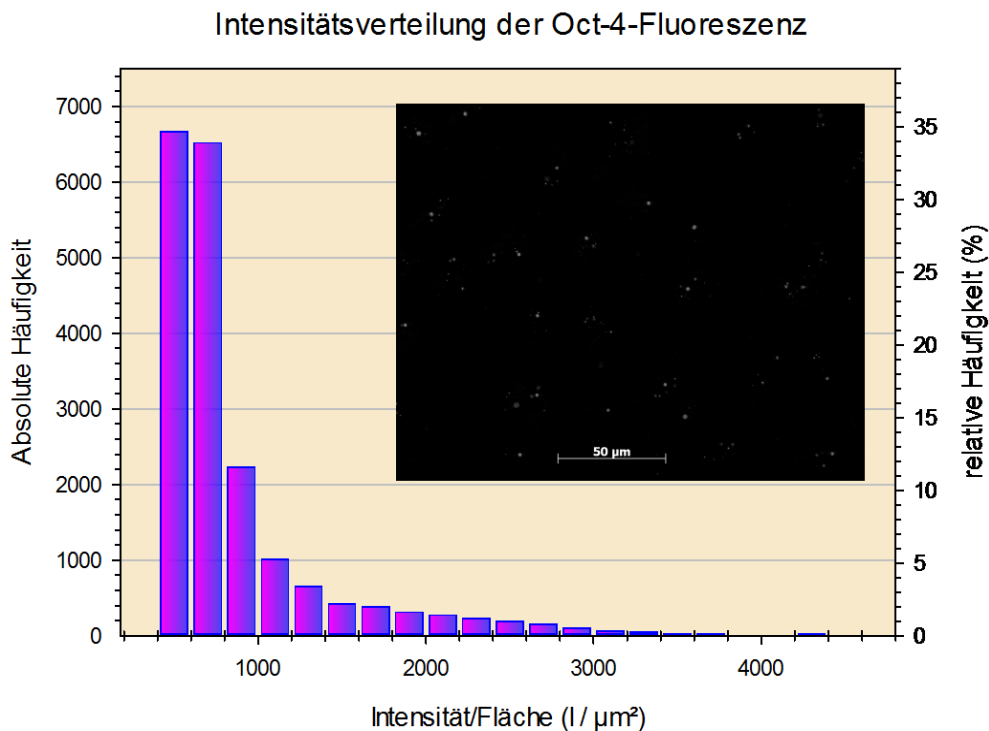


Abb. 12 Intensitätsverteilung der gemessenen fluoreszierenden Oct4-Spots. Angegeben ist die absolute und relative Häufigkeit (in %) der Intensität pro Oct4-Fläche. Insgesamt wurden 276 Zellen mit 19200 Oct4-Spots vermessen, die eine Größe zwischen $0,1 \mu\text{m}^2$ und $16 \mu\text{m}^2$ ($1,3 \pm 2,5 \mu\text{m}^2$) in der zweidimensionalen Ausdehnung aufwiesen. Weiterhin ist ein 8-bit Schwarz-Weiß-Bild einer Cy5-Färbung nach 96 h Inkubation abgebildet. Cy5 färbt das Oct4-Protein in den STRO-1-positiven Zellen in einem roten Fluoreszenzfarbton an.

Abb. 13 zeigt die gemessenen Intensitäten der DAPI- und der Cy5-Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf. Die totale Intensität ($\text{I}/\mu\text{m}^2$) ist durch zwei Größen gekennzeichnet; zum einen durch die Größe der fluoreszenzmarkierten Fläche (μm^2), die durch die Anzahl der fluoreszierenden Pixel repräsentiert wird, und zum anderen durch die Intensität bzw. die Konzentration der Fluoreszenz innerhalb dieser Fläche (I), die durch die Pixelintensität repräsentiert wird. Die totale Intensität steigt, wenn entweder die Pixelintensität oder die Anzahl der fluoreszierenden Pixel zunimmt oder wenn beide zunehmen. Die Summen der gemessenen Intensitäten der DAPI- und Oct4-Fluoreszenz in Bezug auf den Zellkern sind in **Abb. 13a** dargestellt. Die Grafik zeigt die totale Intensität der DAPI- und der Cy5-Fluoreszenz im Zellkern im zeitlichen Verlauf. Die DAPI-Intensität war nach 24 h am größten und nahm dann ab. Zwischen 48 h und 72 h be-

schreibt der Graph eine Plateauphase, um nach 144 h den niedrigsten Wert zu erreichen. Das Oct4-Protein wurde nach 24 h zunächst nur in geringem Maße exprimiert. Nach 48 h und 96 h stieg die Oct4-Fläche im Zellkern signifikant an und nach 48 h waren die Oct4-Spots über die gesamten Zellkernflächen verteilt. In der Grafik zeigt sich dies in der Annäherung der beiden Kurven. Nach 72 h fiel die Oct4-Intensität wieder auf den Ausgangswert ab, um nach 96 h erneut anzusteigen; dieses Mal jedoch lediglich auf Werte zwischen 80 und $90 \times 10^3 \text{ I}/\mu\text{m}^2$ totaler Intensität, was etwa der Hälfte des Wertes nach 24 h entsprach. Darüber hinaus blieb die Oct4-Intensität hier weit unter der DAPI-Intensität. Zum letzten Messzeitpunkt nach 144 h erreichte auch die Oct4-Intensität ihr niedrigstes Niveau. In **Abb. 13b** sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Intensität der DAPI- und Oct4-Fluoreszenz auf der fluoreszierenden Gesamtfläche dargestellt. Der Graf, der die DAPI-Intensitätsfläche darstellt, beschreibt einen ähnlichen Verlauf wie in **Abb. 13a**. Die Oct4-Intensitätsfläche nahm hingegen nach 48 h und 96 h derart zu, dass sie die Zellkernfläche übertraf, da nun auch im Zytoplasma einiger Zellen Oct4 nachweisbar war (vergleiche **Abb. 10**). Nach 72 h nahm die Oct4-Fläche drastisch ab, um auch hier nach 96 h erneut anzusteigen. Zwar konnte nach 96 h ebenfalls angefärbtes Oct4-Protein im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden, dennoch lag die Oct4-Gesamtkonzentration deutlich unter der nach 48 h Kultivierungszeit gemessenen Konzentration. **Abb. 13c** zeigt die mittlere DAPI- und Oct4-Intensität in Abhängigkeit der Kulturdauer, bei der sich die Intensität auf die durchschnittliche Pixelintensität innerhalb der fluoreszenzmarkierten Flächen bezieht. Auch hier wird noch einmal veranschaulicht, dass die DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne mit Mittelwerten von etwa $22,5 \text{ I}$ nach 24 h und 72 h am intensivsten war, während sie nach 48 h und 96 h auf ca. 18 I abfiel. Die niedrigste Intensität wiesen die Zellkerne nach 144 h auf. Der DNA-Methylierungsgrad in den Zellkernen der RPZ war demnach nach 48 h, 96 h und 144 h besonders gering. Die Oct4-Intensität war nach 24 h, 72 h und darüber hinaus auch nach 144 h besonders hoch. Der Höchstwert lag bei ca. 35 I nach 24 h in Kultur. Es wird deutlich, dass die DAPI- und die Oct4-Intensitäten miteinander korreliert sind. Zu den Zeitpunkten geringerer DAPI-Intensität, also nach 48 h und 96 h, war auch die Intensität innerhalb der fluoreszenzmarkierten Oct4-Fläche geringer als zu den übrigen Messzeitpunkten ($r=0,59$; $P=0,013$; $n=17$ Aufnahmen mit 276 Zellkernen; Pearson Korrelation).

Zusammenfassend lassen sich über die Intensität der DAPI- und der Oct4-Färbung folgende Aussagen machen: Die totale DAPI-Intensität pro Zellkern bzw. die DAPI-Fluoreszenzfläche war nach 24 h am größten und nahm zu den darauffolgenden Messzeitpunkten ab. Die mittlere Intensität auf der fluoreszierenden DAPI-Fläche war nach 24 h und 72 h höher als zu den anderen Messzeitpunkten. In den Zellkernen waren wenige kleine Oct4-Spots nachzuweisen, die aber intensiv fluoreszierten.

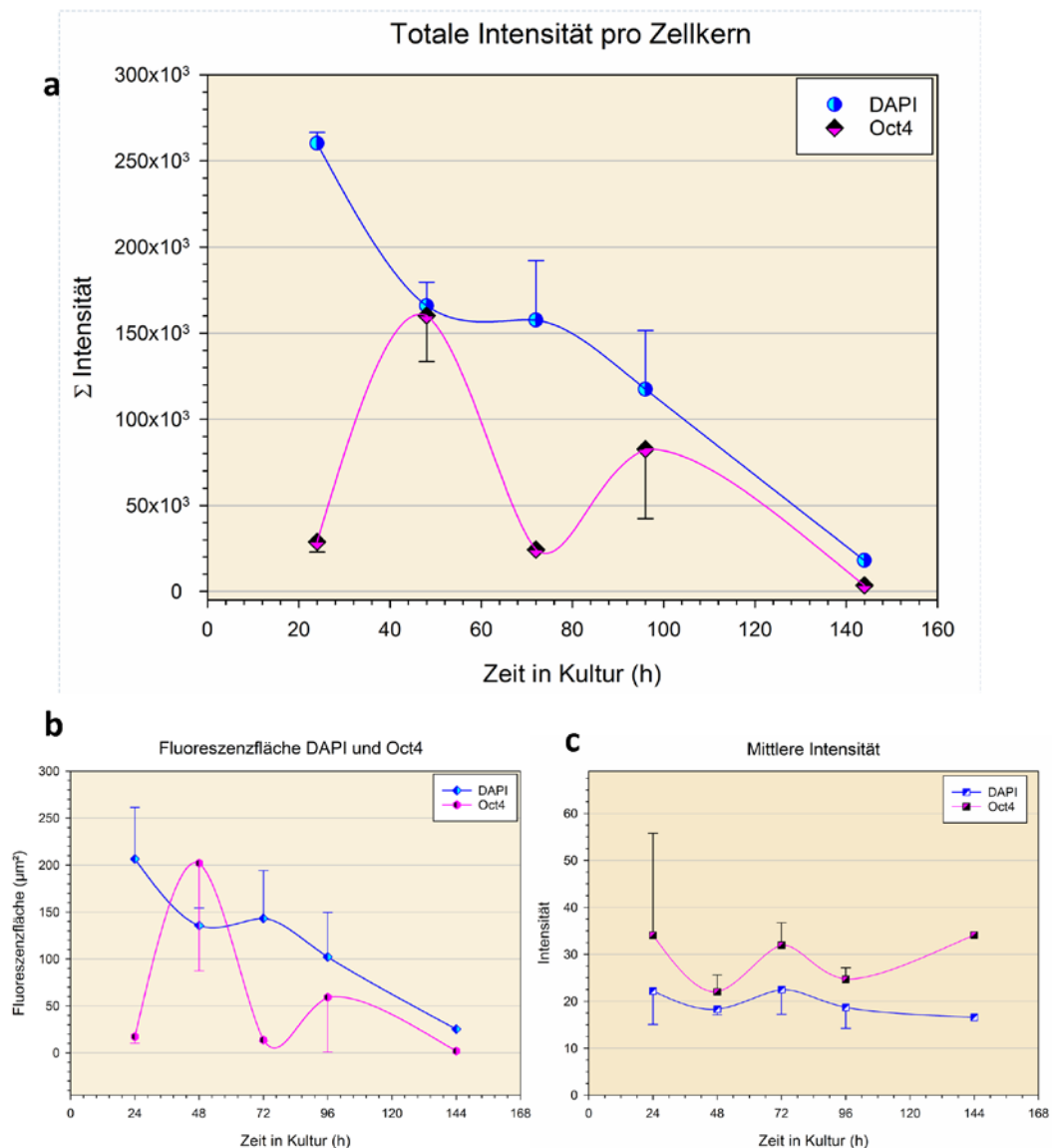


Abb. 13 Mittelwerte und Standardabweichungen der zeitabhängigen Intensitäten der Oct4- und der DAPI-Fluoreszenz in den STRO-1-positiven RPZ zu unterschiedlichen Zeitpunkten. **a)** zeigt die totale Intensität der DAPI- und Oct4-Fluoreszenz auf die Fläche der Zellkerne bezogen ($3 \leq n \leq 54$). Diese berechnet sich aus der fluoreszierenden Gesamtfläche **b)** und der durchschnittlichen Intensität auf dieser Fläche. **c)** Die Fläche der Oct4-Fluoreszenz ist nach 48 h größer als die Zellkernfläche, da zu diesem Zeitpunkt auch das Oct4-Protein im Zytoplasma einiger Zellen vorhanden ist. Die durchschnittlichen Intensitäten der DAPI- und Oct4-Fluoreszenz sind miteinander korreliert ($r=0,59$; $P=0,013$; $n=17$ Aufnahmen mit 276 Zellkernen; Pearson Korrelation).

Dies lässt sich auf eine hohe Oct4-Konzentration in diesen Bereichen zurückführen. Insgesamt lagen aber über 80 % der angefärbten DNA bzw. der gemessenen DAPI-Flächen in einem Intensitätsbereich, bei dem nicht von einer vermehrten Methylierung der DNA auszugehen ist. Nach 48 h und 96 h war die Intensität der DAPI-

Fluoreszenzfläche besonders niedrig. Sie korrelierte mit der mittleren Intensität der Oct4-Fluoreszenz. Die durchschnittliche Intensität der fluoreszenzmarkierten Oct4-Fläche wurde zwar nach 48 h und 96 h kleiner, die fluoreszenzmarkierte Fläche selbst vergrößerte sich jedoch. Bezieht man die Intensität auf den Zellkern bzw. auf die Gesamtfläche, so wird deutlich, dass zu diesen Zeitpunkten besonders viel Oct4 in den Zellkernen und den Zytoplasmen der Zellen vorhanden war. Die Methylierung bzw. die Demethylierung der DNA und die Expression des Transkriptionsfaktors Oct4 stellen dynamische Prozesse dar, die erheblichen zeitabhängigen Schwankungen unterlagen. Innerhalb von 24 h wurde der Oct4-Gehalt in den STRO-1-positiven RPZ mehr als verzehnfacht, während nach 72 h bzw. 144 h so gut wie kein Oct4 mehr nachweisbar war. Die Synthese des Oct4-Proteins befand sich nach 48 h Kultivierungszeit auf ihrem Maximum, gleichzeitig war der Methylierungsgrad der DNA zu diesem Zeitpunkt besonders gering. Darüber hinaus war das Oct4-Protein nach 48 h nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma sowie in den membranösen Zellfortsätzen und Zell-zu-Zellverbindungen lokalisiert, die offensichtlich einen Transportweg für das Oct4 darstellen.

3.5 Übertragung von Oct4 im Co-Kultivierungsversuch

Um die Oct4-Übertragung über die membranösen Zell-zu-Zellverbindungen und deren funktionale Konsequenz in den Empfängerzellen zu verifizieren, kultivierten wir die STRO-1-positiven RPZ zusammen mit transfizierten Oct4-GFP-MEF, bei denen die Transkription von Oct4 über die GFP-Fluoreszenz überwacht werden konnte. Bereits nach 24 h Kultivierungsdauer war eine beginnende GFP-Produktion in den MEF nachzuweisen (**Abb. 14**). Zwischen 24 h und 48 h zeigten sich ein deutlicher Anstieg der intrazellulären GFP-Expression sowie ein Anstieg der Anzahl der GFP-positiven Zellen. Nach 48 h nahm die GFP-Expression langsam ab, konnte aber noch bis zum Versuchsende (144 h) nachgewiesen werden. Obwohl dieser Versuch mit Zellen verschiedener Spezies durchgeführt worden war, stieg die Anzahl der Zell-zu-Zellverbindungen und die Oct4-GFP-MEF integrierten sich gut in den Zellrasen. Die Versuchsergebnisse demonstrieren den Oct4-Transfer auf die Oct4-GFP-MEF sowie das Anschalten der GFP-Produktion in den Empfänger-Zellen. Es erscheint naheliegend, dass die kleinen Mengen des Oct4-Proteins, die über die Zell-zu-Zellverbindungen transportiert werden ausreichend sind, um eine sofortige Reaktion in den Empfängerzellen zu initiieren. Obwohl die hier durchgeführten Versuche eindeutig zeigen, dass Oct4 von den STRO-1-positiven RPZ direkt an andere Zellen weitergegeben werden kann, wurde der Versuch unternommen mögliche alternative Übertragungswege, wie beispielsweise einen interzellulären Transfer von Oct4 über Exosomen, weitestgehend auszuschließen. Im Gegensatz zu der Co-Kultur zeigte sich bei den Kulturen, die mit den Exosomen-

haltigen Überständen der RPZ beimpft wurden, keinerlei GFP-Fluoreszenz in den Oct4-GFP-MEF. Dabei konnte weder mit den zwischen 0-48h noch mit den zwischen 48 und 120 h Kultivierungsdauer gesammelten Überständen eine Fluoreszenz beobachtet werden.

Eine Übertragung von Oct4 durch Exosomen erscheint daher eher unwahrscheinlich. Ob es nach dem Oct4-Transfer über die Zell-zu-Zellverbindungen und dem Anschalten der Oct4-Transkription auch tatsächlich zu einer Reprogrammierung muss jedoch in weiteren Untersuchungen eingehender überprüft werden.

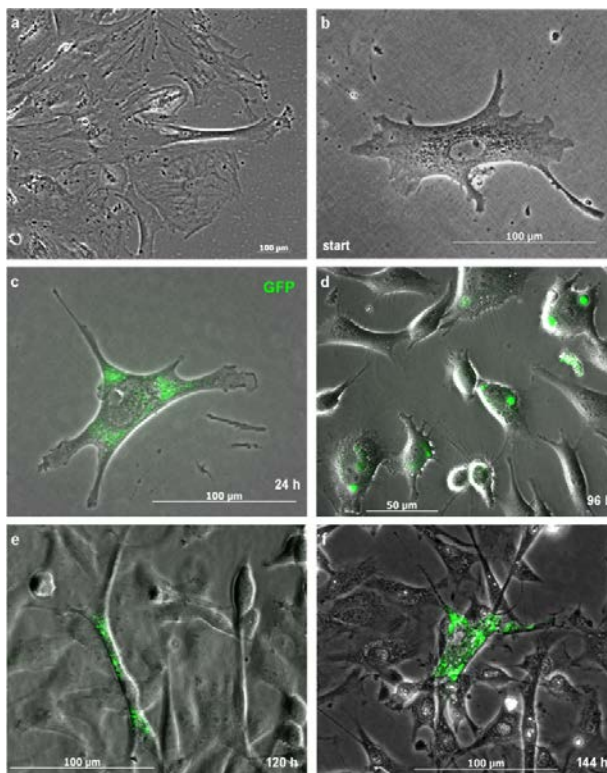


Abb. 14 Co-Kultur von STRO-1-positiven RPZ und Oct4-Promotorzellen **a,b)** Die Bilder zeigen Kontrollen der Oct4-GFP-MEF-Promotorzellen und **b)** eine einzelne MEF-Zelle 24 Stunden nach Aussaat. Die Bilder **c, d, e** und **f** geben die Promotorzellen in der Co-Kultur wieder, die GFP-Expression (grüne Pseudokolorierung) ist im Zytoplasma der Zellen gut zu erkennen **c)** einzelne MEF-Zelle nach 24h, **d)** nach 96h, **e)** nach 120h und **f)** nach 144h. (Bilder **a,b,c,f** Phasenkontrastaufnahme und **d)** und **e)** Varelkontrastaufnahmen; Abb. 14 ist eine bereits veröffentlichte Aufnahme doi:10.1371/journal.pone.0032287.g007)

4 Diskussion

Die jährliche Geweihregeneration der *Cervidae* ist ein einmaliges Phänomen in der Natur. Als einzige Säugetierspezies sind sie in der Lage, als adulte Individuen ein Organ vollständig zu regenerieren. Obwohl das Wachstum der Geweihe seit Mitte des 20. Jahrhunderts Gegenstand wissenschaftlicher Forschungen ist, sind die zellulären und molekularbiologischen Mechanismen immer noch nicht vollständig erforscht und verstanden. Kierdorf et al. postulierten 2003 neben weiteren Autoren, dass das Rosenstockperiost (RP) den Ausgangspunkt dieses Prozesses darstellt (Kierdorf et al. 2003; Li et al. 2005). Dieser Hypothese nach werden im Rahmen des jährlichen Wachstumszyklus Zellen des RP aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung angeregt (Kierdorf et al. 2007; Kierdorf et al. 2003; Li et al. 2005). Später wurde vermutet, dass im RP Stammzellen lokalisiert sind, die sich in sogenannten Stammzellnischen organisieren und als Reservoir für mesenchymale Progenitorzellen fungieren. Erst 2008 gelang es Rolf et al., diese Hypothese zu verifizieren. Mit Hilfe des Oberflächenmarkers „*Stromal Cell Surface Marker-1*“ (STRO-1) konnten Stammzellen im Rosenstockperiost nachgewiesen werden und diese durch die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) isoliert und anschließend kultiviert werden. Die STRO-1-positiven RPZ sind gleichzeitig positiv für die Oberflächenmarker CD271 und CD133 und negativ für den hämatopoetischen Oberflächenmarker CD34 (Rolf et al. 2008).

Entwickelt wurde der murine monoklonale IgM-Antikörper STRO-1 1991 von Simmons und Torok-Storb. Er bindet an eine Untergruppe humaner, nicht-hämatopoetischer und fibroblastenähnlicher Knochenmarkzellen, die auch als *Colony-Forming-Units-Fibroblasten* (CFU-F) bezeichnet werden (Simons und Torok-Storb 1991; Gronthos und Simmons 1995). 2002 zeigten Dennisa et al., dass humane STRO-1-positive Zellen in osteogene, neurogene, adipogene und chondroge Zelllinien differenzieren können und somit multipotente mesenchymale Vorläuferzellen darstellen. Darüber hinaus übernehmen sie im lebenden Organismus weitere wichtige Funktionen wie etwa die Bildung von Hämatopoese-unterstützenden Stromazellen (Dennisa et al. 2002). In ihren Versuchen zeigten Rolf et al. (2008), dass die STRO-1-positiven Zellen des Rosenstockperiosts ebenfalls in der Lage sind, in osteogene, adipogene und chondroge Zelllinien zu differenzieren. Der immunhistologische Nachweis der STRO-1-positiven multipotenten Vorläuferzellen an diversen Lokalisationen des regenerierenden Geweihs ließ darauf schließen, dass diese Zellen sowohl für die Entwicklung der internen Komponenten wie Knochen und Knorpel als auch für die der externen Bestandteile wie Bast und Blutgefäße oder die neuronale Versorgung von Bedeutung sein könnten (Rolf et al. 2008). Die Summe dieser Erkenntnisse untermauerte die Hypothese der auf Stammzellen basierenden Geweihregeneration. Dennoch war weiterhin un-

klar, wie genau die RPZ dieses beispiellos schnelle Wachstum bewerkstelligen können und welche Faktoren dabei eine Schlüsselrolle spielen. Ansatzpunkt und Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mögliche Mechanismen zu untersuchen und näher zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck erfolgte die Anzucht der Primärkultur aus den Gewebeproben des RP, die zu Beginn der jährlichen Regenerationsphase entnommen wurden. Über die optimalen Kultivierungsbedingungen von Hirschgeweihzellen wurde bis dato nur wenig Literatur publiziert. Bei einem Großteil der mit Hirschgeweihzellen forschenden Arbeitsgruppen hat sich basierend auf Erfahrungswerten die Verwendung des Standardmediums DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) zur Anzucht der Primärkultur etabliert (Kužmová et al. 2011; Li 2012; Rolf et al. 2008; Seo et al. 2012). In den hier durchgeführten Versuchen wurden die RP-Gewebestückchen zum Vergleich in zwei parallelen Kulturen angezchtet, die eine in DMEM, die andere in einem Spezialmedium für nicht-hämatopoetische Stammzellen (NH-Medium). Durch den Nachweis der MSZ im Rosenstockperiost erschien es naheliegend, dass diese Zellen, ähnlich wie humane MSZ, von der Kultivierung in einem solchen Spezialmedium profitieren könnten. Trotz der standardmäßigen Verwendung von FKS in Nährmedien zur Kultivierung von Zellen, wird der Gebrauch immer wieder kontrovers diskutiert und muss daher kritisch hinterfragt werden. Pochampally et al. (2004) weisen beispielsweise darauf hin, dass humane MSZ, die mit FKS kultiviert werden, früher differenzieren und die Expression ihrer Oberflächenmarker schneller verändern, als Zellen, die ohne Serum kultiviert werden. Auch die Frage, wie viel FKS die Zellkulturen für ein optimales Wachstum benötigen, muss aufgrund neuerer Versuchsergebnisse überdacht werden. Seo et al. postulieren in ihrer 2012 veröffentlichten Studie, dass die Verwendung von weniger als 5 % FKS im Nährmedium das Zellwachstum negativ beeinträchtigt, während die Verwendung von mehr als 5 %, genau wie das Zuführen der Wachstumsfaktoren IGF-1 und b-FGF, keine signifikante Steigerung der Zellproliferation bei MSZ bewirke.

Das Rosenstockperiostgewebe wurde bei konfluentem Zellwachstum in neue Petrischalen überführt. Bei den gewonnenen Zellen handelt es sich somit um primäre Zellen, die am ehesten die In-vivo-Situation in Bezug auf Proliferations- und Expressionsverhalten repräsentieren (Kužmová et al. 2011). Die Separation der STRO-1-positiven und -negativen RPZ der Primärkultur durch magnetische Zellseparation stellt neben der FACS-Analyse ein etabliertes Verfahren zur Zellsortierung dar. Untersuchungen von Psaltis et al. (2010) zeigen, dass die Zellseparation von humanen MSZ aus dem Knochenmark mit Hilfe von Antikörpern, wie z.B. STRO-1, Vorteile gegenüber der konventionellen Methode durch Plastikadhärenz birgt. So sortierte STRO-1-positive Stammzellen zeichnen sich durch eine höhere Klonogenität, eine höhere Proliferati-

onskapazität, ein multilineares Differenzierungspotential und die mRNA-Expression von MSZ-typischen Transkripten in Kultur aus.

Es wurden die Gesamtzellzahlen sowie die Zahl der STRO-1-positiven und -negativen Zellen erhoben und, basierend auf den Mittelwerten der gemessenen Zellzahlen, die absoluten und relativen Anteile von STRO-1-positiven und -negativen Zellen errechnet. Über den gesamten Versuchsverlauf hinweg präsentierten die RPZ ein ausgeprägtes Proliferationspotential mit einer Gesamtzellzahl von $113,54 \times 10^6$ Zellen in der NH-Kultur bzw. $31,87 \times 10^6$ Zellen in der DMEM-Kultur. Es wird allerdings deutlich, dass im NH-Medium erheblich mehr Zellen aus der Primärkultur generiert wurden als im DMEM. Die Zellen des NH-Mediums zeigten eine durchschnittliche tägliche Zuwachsrate von $1,15 \times 10^6$ Zellen, die Zellen der DMEM-Kultur hingegen nur etwa ein Viertel davon mit einem Zuwachs von $0,32 \times 10^6$ Zellen pro Tag. Die statistische Auswertung veranschaulicht, dass es sich in beiden Fällen um eine streng lineare Funktion handelt. Diese wird offensichtlich jedoch nur beibehalten, wenn das Wachstum der Zellen bei Erreichen der Konfluenz sofort unterbrochen wird und die Zellen anschließend wieder in den freien Raum expandieren können.

Der errechnete durchschnittliche Anteil von STRO-1-positiven Zellen lag auf den gesamten Versuch und beide Nährmedien bezogen bei 25,72%. Die Spitzenwerte lagen in der NH-Kultur bei 38,91 % und in der DMEM-Kultur sogar bei 49,29 %. Im Vergleich dazu konnten beispielsweise von Psaltis et al. (2010) im Durchschnitt nur etwa 11,2 % der STRO-1-positiven Zellen aus humanen unfraktionierten, mononukleären Knochenmarkszellen isoliert werden. Der Versuch zeigt, dass die Verwendung des NH-Nährmediums einen positiven Effekt auf die Anzahl der STRO-1-positiven RPZ hat. Zwar war der relative Anteil von STRO-1-positiven Zellen in der NH-Kultur geringer, dennoch wurden dort insgesamt $14,57 \times 10^6$ STRO-1-positive Zellen generiert, während es in der DMEM-Kultur lediglich $5,67 \times 10^6$ STRO-1-positive Zellen waren. Die Verwendung des NH-Mediums führt somit aufgrund der deutlich stärker proliferationsfördernden Wirkung und des verlängerten Wachstumszeitraums letztendlich zu einem höheren Zellertrag. Dies betrifft sowohl die Gesamtzellzahl als auch die absolute Anzahl an STRO-1-positiven Zellen.

Zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung ihres Stammzellstatus wurden alle STRO-1-positiven und -negativen RPZ auf die Expression der Transkriptionsfaktoren **Oct4**, **c-Myc**, **Sox2**, **Nanog** und **Klf4** untersucht. Diese Faktoren steuern bei Mammalia über die Zelldifferenzierung die Embryonalentwicklung und können stammzelltypische Eigenschaften wie Pluripotenz und Selbsterneuerung in embryonalen, aber auch in adulten Organismen erzeugen bzw. aufrechterhalten. Durch die Transduktion der Gene dieser Transkriptionsfaktoren in murine Fibroblasten schafften es Yamanaka

und Takahashi 2006 erstmals, somatische Zellen durch Reprogrammierung in einen pluripotenten Zustand zurückzusetzen (Yamanaka und Takahashi 2006). Oct4, c-Myc, Sox2 und Klf4 werden daher als *Yamanaka-Faktoren* bezeichnet. Es zeigte sich jedoch, dass die reprogrammierten Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren und die Zellpopulationen nicht aufrechterhalten werden konnten. Dies ließ sich erst durch das Mitwirken von Nanog erreichen (Okita et al. 2007). Aufgrund ihrer elementaren Rolle in den Stammzellen verschiedenster Spezies und bei der Reprogrammierung beschränkten wir unsere Untersuchung auf den Nachweis der Expression dieser fünf Faktoren.

Das Protoonkogen **c-Myc** steuert die Kardiogenese und ist essentiell für die Erhaltung der Pluripotenz während der embryonalen Entwicklung. Weiterhin spielt das Protein eine fundamentale Rolle für die Zellproliferation und die Regulation des Energiemetabolismus. Es bindet an metabolische Target-Gene, welche die Glykolyse, die mitochondriale Biogenese und den Aminosäurenkatabolismus beeinflussen (Folmes et al. 2013). Es handelt sich dabei jedoch um einen unspezifischen Enhancer, der die Expression aller aktiven Gene in den Zellen verstärkt, indem er an die ubiquitär vorkommenden CpG-Inseln (**C**ytosin-**p**hosphatidyl-**G**uanin) der Promotoren bindet (Nie et al. 2012). Bindet c-Myc an den Zielpromoter, aktiviert er die Transkription durch die Stimulierung der Elongation. Darüber hinaus rekrutiert c-Myc verschiedene Histon-Acetyltransferase-Komplexe sowie Chromatin-remodellierende-Faktoren und unterstützt den Nukleosomen-Abbau, wodurch die Transkription erleichtert wird (Adachi und Schöler 2012). In ESC verstärkt ein hoher c-Myc-Level den undifferenzierten Status der Zellen, um vor einer zufälligen Differenzierung zu schützen (Nie et al. 2012).

Die genaue Funktion der **Sex-Determining Region Y-Box** (Sox2) ist hingegen zu großen Teilen unbekannt. Man weiß jedoch, dass Sox2 und Oct4 einen Teil ihrer Zielgene in ESC synergistisch aktivieren, beispielsweise das FGF-4-Gen, das wichtig für das Überleben des postimplantierten Embryos ist (Adachi und Schöler 2012; Okumura-Nakanishi 2004; Park und Seo 2012). Park et al. zeigten, dass Sox2 in adulten humanen MSZ eine vollkommen andere Funktion als in ESC hat. In den MSZ reguliert der Transkriptionsfaktor die Dickkopf-1-Expression, einen Inhibitor des WNT-Signalwegs. Auf diese Weise beeinflusst Sox2 die Differenzierung der MSZ in die mesenchymalen Zelllinien. Darüber hinaus kann Sox2 auch die Expression von c-Myc steuern und nimmt auf diese Weise Einfluss auf die Proliferation der Zellen (Park et al. 2012). In den Zellen des Rosenstockperiosts sind sowohl c-Myc als auch Sox2 in nahezu allen Zellpopulationen nachzuweisen und werden auch von den Zellen der späteren Gewebepassagen in gleichbleibendem Umfang exprimiert. Es ist denkbar, dass Sox2 in den mesenchymalen Stammzellen aus dem Rosenstockperiost der Hirschgeweihe eine

ähnliche Funktion wie in den adulten humanen MSZ erfüllt. Um dies zu verifizieren, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Der **Krüppel-like-Factor-4** (Klf4) kann als Aktivator oder Repressor der Transkription fungieren und nimmt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung der embryonalen Stammzellen (ESC) ein. Seine Zielgene überlappen sich mit denen von Oct4, Sox2 und Nanog. Das Protein interagiert über seinen c-Terminus, der drei Tandem-Zink-Finger-Motive enthält, direkt mit Oct4 und Sox2. Auch die Aktivierung von Nanog erfolgt über diese Zink-Finger-Motive. Für die erfolgreiche Reprogrammierung somatischer Zellen erwies sich die Interaktion von Oct4, Sox2, Nanog und Klf4 als essentiell (Wei et al. 2009). Bei unserem Versuch konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der untersuchten Zellpopulationen Klf4 exprimiert. Allerdings sind viele der Banden der Gelelektrophorese nur schwach ausgeprägt und es existieren multiple, unspezifische Nebenbanden. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein; es ist auch in Betracht zu ziehen, dass der verwendete Primer trotz vorangegangener Tests eine nicht optimale Spezifität für die Rosenstock-Periostzellen aufwies.

Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor **Nanog** erhält, zusammen mit Oct4 und Sox2, den pluripotenten Zustand der Zellen der inneren Zellmasse und der embryonalen Stammzellen während der frühen Embryonalentwicklung (Han et al. 2012). Er unterdrückt die Differenzierung und ermöglicht die Selbsterneuerung der Zellpopulationen (Guo et al. 2009). Untersuchungen durch Han et al. (2012) geben Hinweise darauf, dass eine erhöhte Nanog-Expression den altersinduzierten Funktionsverlust in adulten KM-MSZ deutlich verlangsamen kann. Durch Microarray-Analysen wurde gezeigt, dass DNA-Replikation, Nukleotid-Metabolismus, Basenexzisionsreparatur, Basenfehlpaa-rungsreparatur und die Expression der damit verbundenen Gene in adulten BM-MSZ durch Nanog gesteigert werden (Han et al. 2012). Der Alterungsprozess in den adulten Stammzellen wird hierdurch verzögert und die Proliferation durch die Erleichterung der DNA-Reparatur sowie die Stabilisierung des Genoms unterstützt. Dies bietet neue Ansätze für die Zelltherapie, insbesondere bei älteren Patienten. Gleichzeitig zeigt die Studie, dass das Alter des Organismus und die Expression von Nanog und Oct4 invers miteinander korrelieren (Han et al. 2012). Die Nanog-Expression in den RPZ zeigte zwar eine sehr variable Ausprägung im Versuchsverlauf, nichtsdestotrotz exprimierte der größte Teil der Zellpopulationen den Transkriptionsfaktor. In den in DMEM inkubierten Populationen der 13. Gewebepassage ist Nanog, genau wie Oct4 und Klf4, nicht mehr nachzuweisen. Ein Grund dafür könnte die von dieser Passage hervorgebrachte geringe Zellzahl sein. Eine andere Ursache könnte aber auch in der zunehmenden Kulturdauer liegen, durch welche die Nanog-Expression, ähnlich wie bei der Kultivierung humaner MSZ, allmählich abnimmt. Dies ist auch bei Sox2 zu beobachten, allerdings in geringerem Ausmaß.

Der **Octamer binding transcription factor 4** (Oct4), der auch als POU5F1 bezeichnet wird, gilt als der wichtigste Transkriptionsfaktor für die embryonale Entwicklung, die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und die Reprogrammierung somatischer Zellen. Das Oct4-Gen gehört zur POU-Familie, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die mit einer hochkonservierten Homöodomäne ausgestattet ist, die mit der DNA interagieren kann. Sie sind in der Lage, Gene mit dem Oktamer-Motiv ATGCAAAT in der Promotorregion zu erkennen und zu aktivieren (Kellner und Kikyo 2010). Das humane Oct4-Gen befindet sich auf Chromosom 6 und besteht aus fünf Exons. Es enthält zwei DNA-Bindungs-Domänen, die POUH- und die POU5-Domäne, die jeweils unabhängig an eine Hälfte des DNA-Oktamer-Motives binden können. Sie sind durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden, was einen beträchtlichen Spielraum in der Anordnung dieser Domänen zueinander erlaubt (Saxe et al. 2009). Durch alternatives Spleißen werden zwei Oct4-Hauptvarianten generiert: Oct4A und Oct4B. Beide weisen Exon 2 bis 5 auf, in Oct4B fehlt jedoch das Exon 1. Strukturell und funktional unterscheiden sie sich durch die N-terminale transkriptionale Aktivierungsdomäne, welche die zentrale POU-Domäne bildet (Liedtke et al. 2008). Im Vergleich zu Oct4A kann Oct4B die charakteristischen Stammzelleigenschaften in den Zellen nicht aufrechterhalten. Das Oct4-Protein wird etwa bis zur Mitte der Gastrulation in den Zellen synthetisiert. Danach wird das Gen in den Zellen nicht mehr exprimiert, mit Ausnahme der primordialen Keimzellen (Kellner und Kikyo 2010). Die Oct4-Expression ist notwendig zur Ausbildung des Embryoblasten und der Blastozyste (Saxe et al 2009). Der richtige Oct4-Level ist dabei entscheidend, da eine Hoch- oder Herunterregulation von Oct4 divergente Entwicklungsprogramme erzeugt, über welche die Embryogenese gesteuert wird (Niwa et al. 2000). Niwa et al. zeigten, dass schon eine Verdopplung der Konzentration des Oct4-Proteins die Differenzierung in primitives Endoderm und Mesoderm induziert, während ein Abfall von 50 % die Differenzierung in das Trophoektoderm bewirkt (Niwa et al. 2000). Es muss daher einen hochsensitiven Kontrollmechanismus geben, der den Oct4-Gehalt in den embryonalen Stammzellen misst und reguliert. Verschiedene Studien haben die Oct4-Genetik sowie die Wechselwirkungen und Verflechtungen der Transkriptionsfaktoren und deren Signalwege untersucht. Ein wichtiges Ergebnis war die Beobachtung, dass das Oct4-Protein und seine Bindungspartner komplexe autoregulatorische Kreisläufe bilden und die Oct4-, Sox2- und Nanog-Proteine gegenseitig an ihre Promotoren binden. Dieses Autofeedbacksystem wird als ein Zeichen von Widerstandsfähigkeit gesehen, durch das kleinere Störungen des Systems keine übermäßig negativen Effekte auf die Transkription wichtiger Gene haben (Saxe et al. 2009). Auch im Rahmen der induzierten Pluripotenz (iP), bei der somatische Zellen mit Hilfe exogener Expression der Transkriptionsfaktoren in einen multipotenten oder sogar pluripotenten Zustand überführt werden können, spielt Oct4 die entscheidende Rolle. Das

Protein kann, im Gegensatz zu anderen Faktoren, nicht durch niedermolekulare Verbindungen ersetzt werden und ist darüber hinaus allein in der Lage, Zellen zu reprogrammieren (Kim et al. 2009 a; Li et al. 2010). Kim et al. zeigten, dass adulte neuronale Stammzellen allein durch Oct4 in einen pluripotenten Zustand überführt werden können (Kim et al. 2009 a). Oct4 wird daher als regulatorisches Mastergen und Determinante der Reprogrammierung angesehen (Li et al. 2010).

Die genaue Oct4-Sequenz der Cerviden ist bisher nicht bekannt. Das hier gewählte Verfahren stellte jedoch sicher, dass die verwendeten Primer für das Exon 1 spezifisch sind, das nur in Oct4A vorkommt. Dadurch konnte die zweite Transkriptvariante, Oct4B, mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus weist die hohe Homologie zum bovinen Oct4, die durch die Sequenzierung bestätigt wurde, auch darauf hin, dass es sich hierbei nicht um ein Oct4-Pseudogen handelt (Rolf et al. 2012).

In unseren Experimenten zeigten die verschiedenen Zellpopulationen in der Gelelektrophorese unregelmäßige Oct4-Banden ohne ein eindeutiges wiederkehrendes Muster. In den STRO-1-positiven wie -negativen RPZ ließ sich die Expression des Transkriptionsfaktors nachweisen. Dies lässt vermuten, dass es neben den hier untersuchten Variablen, also der Expression des Oberflächenmarkers STRO-1, der Kultivierung in NH- oder DMEM sowie der Versuchsdauer, noch weitere Kriterien gibt, welche die Expression von Oct4 beeinflussen. Außerdem ist zu beachten, dass die Bedingungen, unter denen die Zellen gewonnen und kultiviert wurden, Einfluss auf die Expression haben können. So zeigten Kužmová et al. (2011), dass das Geschlecht, das Passagieren der Zellen und die Konzentration des verwendeten Serums das Proliferations- und Expressionsverhalten der RPZ beeinflussen können. Ein weiteres Problem ist, dass über die Expressionsmuster der mesenchymalen Stammzellen aus dem Rosenstockperiost bisher kaum etwas bekannt war und es daher nur wenige Publikationen gibt, die zum Vergleich herangezogen werden können. Auch der Vergleich mit anderen Spezies muss kritisch gesehen werden, da selbst MSZ aus einem Organismus abhängig von ihrem Ursprungsgewebe völlig unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen können (Adegani et al. 2013). Es lässt sich somit keine konkrete Aussage darüber machen, in welcher Phase des Geweihwachstums welche Transkriptionsfaktoren in welchem Ausmaß exprimiert werden. Unsere Versuche zeigen jedoch, dass alle fünf essentiellen Faktoren in den adulten mesenchymalen Stammzellen des Rosenstockperiosts zumindest temporär nachgewiesen werden können. Einige der Zellpopulationen synthetisieren sogar alle fünf Proteine gleichzeitig. Gegen Versuchsende nimmt die Expression ab. Das Ergebnis unterstützt die Hypothese der auf Stammzellen basierenden Geweihregeneration mit dem Ursprung im Periost der Rosenstöcke und legt den Verdacht nahe, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren einen wichtigen Einfluss auf die Stammzellpopulation in den Nischen und deren Aktivierung hat. Es

ist denkbar, dass diese, wie bei Sox2, isoliert von ihrer Funktion in embryonalen Stammzellen gesehen und untersucht werden müssen.

Die Veränderungen der Expression im Versuchsverlauf sind möglicherweise ein Hinweis darauf, dass sich die stammzelltypischen Eigenschaften mit zunehmender Kulturzeit verändern können. Es ist bekannt, dass MSZ eine begrenzte Ex-vivo-Proliferationsfähigkeit haben. Der Alterungsprozess führt dazu, dass sie ihr multilineares Differenzierungspotential nach 30 bis 40 Verdopplungszyklen in Kultur verlieren. Dieses Phänomen ist auf die Hayflick-Grenze der Zellen bzw. das replikative Altern zurückzuführen. Es beschreibt die begrenzte Anzahl von Zellteilungen bedingt durch die Länge der Telomere (Wagner et al. 2008). Bei Erreichen der kritischen Grenze wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet. Die gealterten MSZ weisen ein reduziertes Proliferations- und Differenzierungspotential, eine Verkürzung der durchschnittlichen Telomer-Länge sowie morphologische Veränderungen auf. Embryonale Stammzellen besitzen hingegen verschiedene Mechanismen, um dies zu verhindern. Unter anderem sind sie in der Lage, das Enzym Telomerase zu synthetisieren, das die Länge der Telomere aufrechterhält und dadurch der Zellalterung entgegenwirkt (Tonti und Mannello 2008). Es ist möglich, dass auch in diesem Versuch das Alter der Primärkultur (102 Kulturstage) maßgeblichen Einfluss auf das Expressionsmuster der Zellpopulationen genommen hat. Dagegen spricht, dass (wie beispielsweise in Gewebepassage zwölf) zwar eine geringere Expression der Transkriptionsfaktoren nachgewiesen wurde, jedoch vergleichsweise hohe Zellzahlen erhoben wurden). Die Proliferationskapazität dieser Zellpopulationen war somit nicht vermindert. Eine andere Erklärung ist die beginnende Differenzierung der Zellen in die verschiedenen mesenchymalen Zelllinien und die damit verbundene Repression der Transkriptionsfaktoren. Die Gelelektrophorese zeigt, dass insbesondere die Expression von Oct4, Nanog und Klf4 abnimmt, während sich die c-Myc- und Sox2-Expression eher wenig verringert. Dies würde sich mit der von Park et al. (2012) beschriebenen Rolle von Sox2 in adulten MSZ bzw. den Einfluss von Sox2 auf c-Myc und die dadurch bedingte Regulierung der Proliferation decken. Die Tatsache, dass die Transkriptionsfaktoren sowohl von STRO-1-positiven als auch von STRO-1-negativen Zellen exprimiert werden, führt zu der möglichen Schlussfolgerung, dass der Oberflächenmarker nicht als alleiniges Stammzellkriterium für die RPZ gelten kann. In der Literatur werden weitere Marker für MSZ beschrieben, die in diesen Versuchen nicht mit einbezogen wurden. Darunter finden sich beispielsweise die Expression von CD105, CD73, CD90, CD271 und CD133, das Fehlen von hämatopoetischen Oberflächenmarker wie CD34, CD45, CD11a, CD19 CD79a, CD14, CD11b und HLA-DR sowie die Fähigkeit, in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Rolf et al. 2008; Shi et al. 2011). Seo et al. untersuchten die Zellen des Rosenstockperiosts auf CD31, CD45, CD62p, CD105, CD133

und HLA-DR; STRO-1 wurde hingegen nicht mit einbezogen. Die FACS-Analyse zeigte, dass diese MSZ positiv für CD105 (79 %) und Oct4 (69 %) waren und somit ebenfalls einen stammzelltypischen Phänotyp präsentierten (Seo et al. 2012). Davon abgesehen stellt die Expression der Oberflächenmarker und der Transkriptionsfaktoren einen dynamischen Prozess dar, bei dem die Anzahl der exprimierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche zeitabhängig variieren kann. Es ist denkbar, dass bei einigen Zellen nur wenige STRO-1-Rezeptoren exprimiert wurden oder einige STRO-1-positive Zellen ungenügend mit den Microbeads versehen und dadurch nicht erkannt wurden, was zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann.

Aufgrund seiner besonderen Rolle als Transkriptionsfaktor und Mastergen wurde im anschließenden Versuch die Expression von Oct4 genauer untersucht. Die STRO-1-positiven RPZ wurden nach der STRO-1-Sortierung 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 144 h inkubiert, fixiert und anschließend mit den Farbstoffen DAPI zur Darstellung des Zellkerns und Cy5 zur Darstellung des Oct4-Proteins, angefärbt. Entscheidend war dabei, dass der Oct4-Primärantikörper ausschließlich die Oct4A-Isoform anfärbt. Neben dem Oct4-Gehalt in den Zellen wurde der Methylierungsgrad der DNA anhand der Intensitätsdifferenzen der hellen Spots innerhalb der DAPI-Fluoreszenzfärbung der Zellkerne bestimmt und die Veränderung der Methylierung in Abhängigkeit der Oct4-Expression dargestellt. Im Gegensatz zu neueren 3D-Analysen ist das hier verwendete zweidimensionale Verfahren mit dem Programm SigmaScan sehr einfach und effizient durchzuführen. Es wurde lange postuliert, dass durch den DAPI-Farbstoff, der bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA bindet, zwar die Strukturen der DNA dargestellt werden, nicht jedoch die methylierten CG-Dinukleotide (mCGD) (Kapusinski 1995). Diese finden sich gehäuft in Promotoren und sind bei verringerter Transkription hypermethyliert. Neuere Publikationen demonstrieren, wie durch die immunhistochemische Färbung dieser mCGD zusammen mit der DAPI-Färbung ein 3D-Bild des Zellkerns erstellt werden kann, welcher Rückschlüsse auf die allgemeine DNA-Methylierung sowie das dekondensierte Heterochromatin erlaubt und die Reorganisation der DNA nach Exposition von Umwelteinflüssen visualisiert (Oh et al. 2013). Eine solche Darstellung war bei dem hier verwendeten Verfahren nicht möglich. Zhang et al. (2008) zeigte, dass es einen Zusammenhang zwischen der DAPI-Intensität und dem Methylierungsgrad der DNA gibt. Sie untersuchten die *male-specific region of Y-chromosome* (MSY) der Papaya, auf der Bereiche zu finden waren, die eine knoten- oder kopfartige Struktur aufweisen und besonders stark durch den Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden. Dieser Effekt kam nicht nur durch die Menge der angefärbten DNA zustande, sondern war mit einer verstärkten DNA-Methylierung assoziiert (Zhang et al. 2008). Auch unsere Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass eine vermehrte Intensität

der DAPI-Fluoreszenz mit einem hohen DNA-Methylierungsgrad assoziiert ist, welcher wiederum als epigenetische Modifikation angesehen werden kann.

Epigenetische Modifikationen sind teilweise hereditäre, teilweise ontogenetisch entstandene chemische Veränderungen am Grundgerüst der DNA, die dazu führen, dass nur die für die jeweilige Zelle spezifischen Proteine synthetisiert werden, während andere Gene ausgeschaltet sind. Die Entwicklung eines jeden Individuums wird durch diese Modifikationen gesteuert. Die DNA-Methylierung ist eine besonders häufig vorkommende epigenetische Modifikation, bei der eine Methylgruppe mit Hilfe einer DNA-Methyltransferase auf eine Nukleinbase, meist Cytosin, übertragen wird (Jeltsch 2002). Die Cytosine kommen unter anderem in Form von CpG-Dinukleotiden, den sogenannten CpG-Inseln, in den Promotoren nahezu aller Housekeeping-Gene und in ca. der Hälfte der zellspezifischen Gene vor (Guo et al. 2009). In undifferenzierten Zellen sind die CpG-Inseln in den Promotoren der Gene, die mit Pluripotenz in Verbindung gebracht werden, hypomethyliert, wodurch die Transkription ermöglicht wird. Werden sie während der Embryonalentwicklung oder in Kultur durch DNA-Methyltransferasen wie DnMt1, DnMt3A und DnMt3B methyliert, werden sie abgeschaltet. Das kontrollierte Abschalten dieser Gene bewirkt die Differenzierung der Zellen und das Fortschreiten der Embryonalentwicklung in vivo bzw. die Differenzierung der Zellen in vitro. Ist die Funktion der Methyltransferasen gestört, bewirkt dies die Unterbrechung der Differenzierung (Medvedev et al. 2012). Auch für den Reprogrammierungsprozess ist die globale epigenetische Veränderung der DNA und der Histone unerlässlich. Erst durch die Verschiebung der epigenetischen Landschaft der somatischen Zellen hin zu einer stammzellspezifischen epigenetischen Modifikation wird die Transkription der Stammzelltypischen Gene möglich (Gao et al. 2013).

Die methylierten Areale der DNA werden bei der DAPI-Färbung als helle, im Zellkern verteilte Spots dargestellt. Die Intensität dieser DAPI-Spots in den STRO-1-positiven RPZ zeigt im Versuchsverlauf zyklische Schwankungen. Nach 48 h und nach 96 h ist die durchschnittliche DAPI-Intensität deutlich schwächer ausgeprägt als nach 24 h und 72 h (**Abb. 13c**). Insgesamt liegen über 79 % der gemessenen DAPI-Spots zwischen 500 und 800 I/μm², einem Bereich geringerer Methylierung (**Abb. 11**). Von einer vermehrten Methylierung der Basen im Sinne einer DNA-Modifikation ist ab einer DAPI-Intensität von ca. 1200 I/μm² oder mehr auszugehen. In diesem Bereich liegen nur etwa 7,5 % der DAPI-Spots. Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass es zu einer periodischen DNA-Demethylierung und in Folge dessen zu einer gesteigerten Transkription kommt. Die gemessenen Oct4-Intensitäten unterstützen diese Hypothese. Die Bilder, auf deren Grundlage die Messungen angefertigt worden sind, zeigen, dass das angefärbte Oct4-Protein zu den jeweiligen Messzeitpunkten in ganz unterschiedlichem Ausmaß in den Zellen nachweisbar ist (**Abb. 9**) Nach 24 h ist Oct4

in akkumuliertem Zustand in seinem Wirkungsort, den Nuklei der Zellen, lokalisiert. Die fluoreszierenden Oct4-Spots weisen hohe Intensitäten auf, d.h. die Konzentration ist an diesen Punkten auf der DNA besonders hoch (**Abb. 13b, 13c**). 24 h später hat sich zwar die durchschnittliche Oct4-Intensität, die in diesem Zusammenhang ein Maß für die Oct4-Konzentration innerhalb der gemessenen Oct4-Fläche ist, verringert (**Abb. 13c**), die fluoreszierende Fläche und die totale Intensität haben sich jedoch signifikant vergrößert (**Abb. 13a, 13b**). Die Fläche des angefärbten Oct4-Proteins übertrifft die DAPI-Fläche. 42-49 % der STRO-1-positiven Zellen weisen zu diesem Zeitpunkt nukleäres und zytoplasmatisches Oct4 auf, nach 96 h sind es etwa 11 %. Zu den übrigen Zeitpunkten wurde kein zytoplasmatisches Oct4 detektiert. Im Zuge der oben beschriebenen vermehrten DNA-Demethylierung kommt es offensichtlich zu einer Anhäufung des Proteins im Zytoplasma, was unserer Ansicht nach auf eine vermehrte Oct4-Proteinproduktion in den Zellen schließen lässt. Lee et al. (2006) postulierten neben weiteren Autoren, dass sich die Isoformen von Oct4 anhand der Lokalisationen in den Zellen klar differenzieren lassen. Während das als Transkriptionsfaktor wirksame Oct4A im Zellkern lokalisiert sei, finde sich Oct4B in den zytoplasmatischen Kompartimenten der Zelle. Außerdem sei zu beachten, dass es neben den beiden Hauptisoformen eine beträchtliche Anzahl an Pseudogenen gebe, die falsch-positive Ergebnisse erzeugen können (Lee et al. 2006; Liedtke et al. 2008). Oka et al. (2013) zeigten hingegen, dass es sich bei dem aktiven Oct4A um ein Protein handelt, das zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her pendelt. Es wird durch das Transportprotein Importin α vom Zytoplasma in den Nucleus importiert, während der Export primär über passive Diffusion bewerkstelligt wird. Um als Transkriptionsfaktor, der den undifferenzierten Status der embryonalen Stammzellen aufrechterhält, wirksam zu werden, muss Oct4 nur vorübergehend im Nucleus lokalisiert sein. Im Gegensatz dazu muss es bei der Induktion der zellulären Reprogrammierung eine bestimmte Zeit im Zellkern verbleiben, um essentielle, transkriptionsunabhängige Reaktionen wie das Chromatin-Remodeling oder bestimmte epigenetische Veränderungen zu induzieren. Das Oct4-Protein erfüllt demnach unterschiedliche Funktionen bei der Selbsterneuerung in embryonalen Stammzellen und bei der Reprogrammierung in somatischen Zellen und kann – anders als bisher angenommen – durchaus auch im Zytoplasma der Zellen vorkommen (Oka et al. 2013). Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen nach 48 h und 96 h zeigen eine weitere Besonderheit: Ein Teil der Zellen bildet tubuläre Fortsätze aus, von denen wiederum einige wie Zell-zu-Zellverbindungen imponieren. In diesen Zell-zu-Zellverbindungen ließ sich nach 48 h und 96 h ebenfalls eindeutig angefärbtes Oct4-Protein nachweisen.

Das Zellen (insbesondere jene, die sich in Kultur befinden) derartige Fortsätze ausbilden können, ist hinlänglich bekannt. Rustom et al. beschrieben 2004 als Erste die sogenannten „**Tunneling Nanotubes**“ (TNT). Es handelt sich dabei um lange, dünne, Aktin-haltige Brücken, die Zellen in Kultur miteinander verbinden können und seitdem in einer Vielzahl von kultivierten Zelltypen aber auch in vivo gefunden wurden (Rustom et al. 2004). In Immunzellen, neuronalen Zellen und Primärkulturzellen sind sie am besten untersucht. Sie bieten neben den bekannten Kommunikationswegen via Gap Junctions und Exosomen die Möglichkeit zur direkten Kommunikation, was essentiell für das Überleben multizellulärer Organismen ist, da ohne einen solchen Austausch von Informationen Prozesse wie das Remodeling von Geweben und Organen, das Wachstum, die Zellteilung oder das Reagieren des Organismus auf einen Stimulus nicht stattfinden könnten. Die TNT fungieren als Leitung für zytosol- und membrangebundene Moleküle oder Zellorganellen (Marzo et al. 2012). Abhängig vom zellulären System können sie den interzellulären Transfer von z. B. Kalziumionen, Membrankomponenten oder kleinen Organellen des endosomalen und lysosomalen Systems bis hin zu größeren Organellen wie Mitochondrien bewerkstelligen oder zur Verbreitung von Pathogenen beitragen. Auch die Zellmigration kann über die TNT initiiert werden. Derzeit sind zwei unterschiedliche Arten von TNT bekannt: dünne, die nur F-Actin enthalten, und dickere, die im Durchmesser größer sind und neben F-Actin auch Microtubuli enthalten. Die Zellen, welche die TNT ausbilden, nehmen auf diese Weise direkten Einfluss auf die Zellen ihrer Umgebung (Zani und Edelman 2010). Plotnikov et al. zeigten in ihrer Studie von 2010, dass die Tubuluszellen von Ratten unter Co-Kultivierung mit humanen KM-MSZ einen unidirektionalen Transfer auf die MSZ ausüben, in denen anschließend die Differenzierung initiiert wird (Plotnikov et al. 2010). Marzo et al. zeigten, dass die Zellen auf verschiedene endogene oder exogene Stimuli mit der Ausbildung von spezifischen, der Situation angepassten TNT reagieren, die entweder uni- oder bidirektionale Transporte erlauben. So bilden beispielsweise Zellen, die durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid einem Stressor ausgesetzt waren, unidirektionale TNT aus und übertragen ihre Organellen auf andere Zellen (Marzo et al. 2012). In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass unsere TNT sowohl Actin- als auch Tubulinfilamente enthielten (Rolf et al. 2012). In diesen Untersuchungen konnte außerdem der Transport von markiertem Oct4-Protein in den TNT bewiesen werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass die STRO-1-positiven RPZ über solche Zell-zu-Zellverbindungen – möglicherweise in einem festgelegten Zyklus – das Oct4-Protein auf andere Zellen übertragen. Gleichzeitig gab uns dies eine Erklärung für das hohe Oct4-Aufkommen im Zytoplasma der Zellen zu diesen Zeitpunkten. Der nachfolgende Co-Kultivierungsversuch mit den Oct4-GFP-MEF sollte zeigen, dass es tatsächlich zu einer Übertragung des Oct4-Proteins zwischen zwei Zellen kommt. In

Anbetracht der Ergebnisse erscheint es naheliegend, dass die Übertragung von Oct4 über die TNT auf die Empfängerzelle die Oct4-Transkription induziert. Eine Übertragung über andere Transportwege erscheint eher unwahrscheinlich, da zum einen der Exosomentransport ausgeschlossen werden konnte und zum anderen der Transport des Proteins in den TNT's in unseren Versuchen nachgewiesen wurde (Rolf et al., 2012). Erstaunlich ist die kurze Latenzzeit von Beginn der Co-Kultivierung und dem Nachweis beginnender Oct4-Expression. Die in dieser Arbeit beschriebene geringe Latenzzeit von 24 Stunden mit einem Expressionsmaximum des Oct4-Promotors in den Mausfibroblasten bereits nach 48 Stunden steht in einem gewissen Widerspruch zu den Ergebnissen von Wernig et al. (2007) und Brambrink et al. (2008). In beiden Arbeiten wurde die Reprogrammierung der Mausfibroblasten mit Hilfe lentiviraler Vektoren vorgenommen. Die Detektion einer Oct4-Promotor-induzierten grünen Fluoreszenz konnte dabei erstmals nach 6 Tagen (Wernig et al., 2007) und bei Brambrink et al. (2008) nach 16 Tagen ab Reprogrammierungsbeginn festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten lassen sich jedoch nicht direkt mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichen, da im Gegensatz zu unseren Versuchen dort eine Reprogrammierung durch lentivirale Vektoren stattfand, die selbst auch sicher mit einer gewissen Vorlaufzeit verbunden sein wird. In der Arbeit von Brambrink et al. wurde die Flowzytometrie zum Nachweis der grünen Fluoreszenz verwandt, die gegenüber der direkten Fluoreszenzmikroskopie bei der Beobachtung der Kulturen eine erheblich geringere Empfindlichkeit aufweist. Auf diese geringere Sensitivität verweisen auch die Autoren in ihrer Arbeit.

Weiterhin ist bemerkenswert, dass das Oct4-Protein über die Grenzen verschiedener Spezies hinaus einen funktionalen Wirkungseffekt erzielt, welches die Hypothese eines evolutionär konservierten Pluripotenznetzwerks unterstützt. Die Reprogrammierung somatischer Zellen ist derzeit einer der meist beachteten Bereiche der regenerativen Medizin und der Stammzellforschung. Es existieren drei etablierte Verfahren: die Zellfusion, der Zellkerntransfer und die induzierte Pluripotenz durch definierte Faktoren (Sumer et al. 2010; Yamanaka und Blau 2010). Bei der Zellfusion, die chemisch oder durch elektrische Impulse initiiert werden kann, werden beispielsweise humane Fibroblasten mit humanen embryonalen Stammzellen, aber auch mit Zellen anderer Spezies fusioniert. Daraus entstehen Hybridzellen mit einer stabilen, tetraploiden DNA oder mehrkernige Zellen, sogenannte Heterokaryons, die nicht mehr proliferationsfähig sind. Beide haben jedoch die charakteristischen Eigenschaften embryonaler Stammzellen und bieten ein gutes Forschungsmodell, da es sich hierbei um eine technisch relativ einfache Methode handelt (Cowan 2005; Yamanaka und Blau 2010). Im Gegensatz dazu ist der Zellkerntransfer ein sehr aufwendiges Verfahren, bei dem die beteiligten Zellen einem hohen Maß an Stress ausgesetzt sind, und das darüber hinaus bisher nur

manuell durchgeführt werden kann. Einer Oozyte werden in einer Zellphase, in der die Kernhülle abgebaut ist, die kondensierten Chromosomen samt Spindelapparat entnommen. Die reprogrammierenden Faktoren, die normalerweise im Zellkern lokalisiert sind, verteilen sich zu diesem Zeitpunkt im Zytoplasma der Zelle. Der Zellkern einer somatischen Zelle wird in die Oozyte eingebracht, was dazu führt, dass die vorhandenen Pluripotenzfaktoren die charakteristischen Gene der embryonalen Stammzellen reaktivieren. So ist eine sehr schnelle Reprogrammierung möglich, die jedoch aufwendig und wenig effizient ist (Cowan 2005; Yamanaka und Blau 2010). Die Reprogrammierung durch das Einbringen retroviraler Transgene in adulte somatische Zellen, die sogenannte induzierte Pluripotenz, stellt das dritte Verfahren dar. Die Transduktion von Oct4, c-Myc, Sox2, Klf4 und Nanog bewirkt dabei das Zurückdifferenzieren der Zelle in einen pluripotenten Zustand. Diese Zellen sind anschließend in der Lage, in die Linien aller drei Keimblätter zu differenzieren (Ieda 2013; Kim et al. 2009, Yamanaka und Takahashi 2006). Dieses Verfahren ist für die Zellen verträglicher, mit deutlich weniger technischem Aufwand verbunden und auch aus ethischen Aspekten vorzuziehen. Darüber hinaus bietet es in Bezug auf das Tissue-Engineering und die Zelltherapie patientenadaptierte Behandlungsmöglichkeiten. Gemein ist diesen drei Verfahren die Demethylierung der Promotoren jener Gene, welche die Transkriptionsfaktoren kodieren. Ihre Aktivierung führt schlussendlich zur Transkription der stammzellspezifischen Gene, die den Phänotyp der Zelle verändern. Außerdem zeigen sich in den Zellen eine Verlängerung der Telomere und eine erhöhte Telomeraseaktivität, die zur Zellverjüngung beiträgt (Yamanaka und Blau 2010).

Die Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden und der derzeitige Stand der Wissenschaft führen zu der Schlussfolgerung, dass es in den durchgeführten Versuchen zu einer endogen induzierten Reprogrammierung gekommen sein könnte, die durch die Übertragung von Oct4 und möglicherweise weiteren Transkriptionsfaktoren von einer Spender- auf eine Empfängerzelle initiiert wurde. In der bisherigen Literatur werden solche Mechanismen nicht beschrieben. Es ist aber fraglich, warum ein Verfahren, das erfolgreich artifiziell durchgeführt werden kann, nicht auch im lebenden Organismus von Bedeutung sein soll, zumal die Voraussetzungen dafür gegeben sind. Die beschriebenen Zell-zu-Zellverbindungen, der Nachweis des Oct4-Proteins in diesen Verbindungen sowie die von Rolf et al. bereits veröffentlichten Erkenntnisse in Bezug auf den Oct4-Transport und die Oct4-Produktion in den Cerviden-Stammzellen unterstützen diese Hypothese. Es wäre eine Erklärung für das enorme Wachstum der Hirschgeweihe in den Regenerationsphasen. Nach unserer Hypothese werden im Rahmen des jährlichen Regenerationszyklus die MSZ in den Stammzellnischen des Rosenstockperiosts aktiviert. Diese beginnen nicht nur zu proliferieren, sondern übertragen auch einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren auf benachbarte, differenzierte

Zellen der Nische. Diese verändern ihre Expressionsmuster durch die Demethylierung bestimmter Promotoren und werden zu multipotenten Progenitorzellen, die die Geweihregeneration unterstützen. Durch diese Rekrutierung somatischer Zellen kann zusätzlich zur „normalen“ Proliferation der MSZ eine Beschleunigung des Geweihwachstums erzielt werden.

Es bleibt aber die Frage zu klären, ob die Oct4-Übertragung tatsächlich eine Reprogrammierung nach sich zieht und ob im Falle einer endogen induzierten Reprogrammierung noch weitere Faktoren dazu benötigt werden. Um dies endgültig zu beantworten, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

5 Zusammenfassung

Das jährliche Geweihwachstum der Cervidae ist das einzige existierende Beispiel einer vollständigen Organregeneration bei adulten Säugetieren. Dies und die strukturelle Ähnlichkeit zu menschlichen Knochenstrukturen machen das Geweih der Hirsche zu einem idealen osteologischen Forschungsmodell, das wichtige neue Erkenntnisse im Bereich der regenerativen Medizin erbringen kann. Die Regeneration des Geweihknochens wurde lange Zeit ausschließlich auf die Dedifferenzierung periostaler Zellen des Rosenstockperiosts (RP) zurückgeführt. Jüngste Untersuchungen zeigten jedoch, dass im Rosenstockperiost STRO-1-positive mesenchymale Stammzellen lokalisiert sind, die für die Geweihregeneration mitverantwortlich gemacht werden können. Ziel dieser Arbeit war es daher, das Proliferations- und Expressionsverhalten dieser STRO-1-positiven und auch der STRO-1-negativen Zellfraktion des RP näher zu charakterisieren und zu vergleichen. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die Transkriptionsfaktoren **c-Myc**, **Sox2**, **Nanog**, **Klf4** und insbesondere das „Masterregulator-Gen“ **Oct4** in diesen Zellen exprimiert werden.

Methodik: Das RP-Gewebe wurde zu Beginn der jährlichen Regenerationsphase von einem vierjährigen Damhirsch entnommen. Die Anzucht der Primärkultur erfolgte in Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium (DMEM) und in NH Medium, einem proliferationsfördernden Spezialmedium für nicht-hämatopoetische Stammzellen, um potentielle Einflüsse des Nährmediums auf die Zellproliferation abzuklären. Die Gewebestückchen wurden jeweils bei konfluentem Zellwachstum insgesamt 14-mal hintereinander in neue Kulturschalen umgesetzt, die gewonnenen Zellen gezählt und mit Hilfe des STRO-1-Oberflächenmarkers sortiert. Durch RT-PCR und nachfolgende Gelelektrophorese wurde die jeweilige Expression der oben genannten Transkriptionsfaktoren dargestellt. Anschließend sollte immunhistochemisch der optische Nachweis des Oct4-Proteins im Zellkern der fixierten Zellen erbracht werden. Dazu wurden die Zellkerne mit DAPI und eventuell nachweisbares Oct4-Protein mit Cy5 markiert, licht- und fluo-reszenzoptisch mit Mehrkanalaufnahmen erfasst und mit einem Imageanalysesystem ausgewertet. Anschließend wurde versucht, anhand der hellen Spots in der DAPI-Fluoreszenz im Zellkern das Ausmaß der DNA-Methylierung zu erfassen und diese mit dem Auftreten des Oct-4-Proteins in einen zeitlichen Bezug zu setzen. Dafür wurden die Intensitäten und die Flächen beider Fluorochrome zu vermessen und in Abhängigkeit von der Kulturdauer (nach 24h, 48h, 72h, 96h und 144h) in einem Koordinatensystem aufgetragen. Ziel dieses Untersuchungsteils war es somit, den von uns als Arbeitshypothese postulierten Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad der DNA und der Aktivierung des Oct4-Masterrelator-Gens zu verifizieren. Um die Fähig-

keit von STRO-1-positiven Zellen zur Übertragung von Oct4 auf benachbarte andere Zellen zu überprüfen, wurde eine Co-Kultur mit embryonale Mausfibrozyten angelegt, bei denen die Expression von Oct4 mit der GFP-Expression gekoppelt war, so dass sie bei der Übertragung des Oct4-Proteins grün fluoreszierten.

Ergebnisse: Im NH-Medium fand sich eine 3,5-mal höhere Gesamtzellzahl als im DMEM. Der relative Anteil der STRO-1 positiven Zellen war jedoch in der NH Kultur geringer als im DMEM (NH-Medium: $21,07 \pm 8,27\%$; DMEM: $30,9 \pm 13,11\%$). Das zeitabhängige Auswachsen der Zellen aus den Gewebestückchen, ergibt sich aus der kumulierten Zellzahl der 14 Gewebepassagen und folgt in beiden Kulturmedien einer streng linearen Beziehung (NH-Medium: $r^2=0,99$, $p<0,001$; DMEM: $r^2=0,97$, $p<0,001$). Das NH Medium führte mit einer täglichen Wachstumsrate von $1,2 \times 10^6$ Zellen gegenüber dem DMEM mit $0,34 \times 10^6$ Zellen zu einem höheren Zellertrag und einer daraus resultierenden deutlich höheren absoluten Anzahl an STRO-1-positiven mesenchymalen Stammzellen. Sowohl die STRO-1 positiven- als auch die STRO-1-negativen Zellpopulationen exprimierten die sogenannten Yamanaka-Faktoren c-Myc, Sox2, Nanog, Klf4 und Oct4. Die Expressionen erwiesen sich als medien- und zeitabhängig. C-Myc wurde im DMEM, insbesondere von den STRO-1-negativen RP-Zellen, in geringerem Ausmaß exprimiert als von den Zellen im NH Medium. Die Expressionen nahmen insgesamt mit zunehmender Kulturdauer ab. Durch die immunhistochemische Färbung wurde in einem Teil der fixierten Zellen das Oct4-Protein sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma und in Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen. Bei der Auswertung der Fluoreszenzintensitäten von DAPI und Cy5 wurden die totale und die mittlere Intensität berücksichtigt. Die mittlere Intensität kann als Ausdruck der durchschnittlichen Konzentration pro Pixel betrachtet werden, während die totale Intensität als Maß der Gesamtkonzentration angesehen werden kann, da sie die Fluoreszenzfläche mit einschließt. Nach 24 h waren die mittlere und totale DAPI-Fluoreszenz aufgrund vieler besonders hell fluoreszierenden Spots in den Zellkernen am intensivsten. Im Gegensatz dazu war die Cy5-Fluoreszenz sehr gering. Die mittlere und totale Cy5-Fluoreszenz des Oct4-Proteins zeigten in einem Intervall von 48 Stunden gegensinniges Verhalten, indem die totale Intensität hoch und die mittlere Intensität niedrig waren. Wurden DNA-Methylierung und Oct4-Protein im Zellkern verglichen, fielen im 48-stündigen Zeitintervall gleichsinnige Veränderungen auf. Oct4 zeigt nach 48 h und 96 h Kulturdauer jeweils Spitzenwerte mit abnehmender Tendenz. Die DAPI-Intensität nimmt ebenfalls ab. Im Zeitraum zwischen 24 h und 48 h sowie zwischen 72 h und 96 h kam es zur Demethylierung der DNA und gleichzeitig zu einer vermehrten Anreicherung des Oct4-Proteins im Nucleus und im Zytoplasma der untersuchten Zellen. Im nachfolgenden Kokulturrexperiment konnte eine Übertragung von Oct4 der STRO-1-

positiven Zellen auf die Oct4-Promotorzellen nachgewiesen werden. Das Maximum der GFP-Fluoreszenz der Promotorzellen zeigt sich bereits nach 48 h und stimmt mit dem Ausmaß des immunhistochemischen Nachweises des Oct4-Proteins in den STRO-1-positiven Zellen überein.

Schlussfolgerungen: Die relative und absolute Anzahl von STRO-1-positiven Stammzellen in der Kultur hängt stark vom Kulturmedium ab. Sowohl STRO-1-positive als auch STRO-1-negative Zellen des Rosenstockperiosts exprimieren alle Yamanaka-Faktoren, allerdings zeitabhängig in unterschiedlichem Ausmaß. Die beschriebenen Beobachtungen unterstützen ferner die Hypothese, dass der Methylierungsgrad der DNA mit der Menge an Oct4-Protein im Zellkern zeitabhängig korreliert ist. Da zu den Zeitpunkten der vermehrten Oct4-Expression (48 h und 96 h) das Oct4-Protein eindeutig im Zytoplasma und in den Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass es zu einem direkten Zell-zu-Zell-Transport und damit zu einer Übertragung von Oct4 auf die Zielzellen kommt. In den Empfängerzellen kommt es nach der Übertragung wiederum zu einer vermehrten Oct4-Expression.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen zu der Schlussfolgerung, dass Transkriptionsfaktoren wie Oct4 während der Geweihregeneration von den STRO-1-positiven mesenchymalen Stammzellen auf benachbarte, differenzierte Zellen übertragen werden können, wodurch es zur induzierten Pluripotenz und endogenen Dedifferenzierung der Empfängerzellen kommen könnte. Die auf diese Weise rekrutierten Zellen wären dann anschließend wieder in der Lage, stark zu proliferieren, in verschiedene mesenchymale Zelltypen zu differenzieren und sich am Regenerationsprozess zu beteiligen sowie diesen erheblich zu beschleunigen. Zur endgültigen Abklärung dieser Schlussfolgerungen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, die das Verhalten der Empfängerzellen nach der Oct4-Übertragung klären.

6 Anhang

Tab. 2 und 3: Zellzahlen, prozentualer Anteil der STRO-1-positiven und -negativen Zellen sowie die kumulierten Zellzahlen aus den Gewebepassagen C1 bis C14 der aus dem Periost gewonnenen Zellen im NH-Medium. Ferner angegeben sind die Gesamtmittelwerte, Mediane und Standardabweichungen (SD).

Tab. 2

NH-Medium

G-passage	Zellzahl	% positive	% negative	kum. Tage	kum. Zellzahl
C1	2610000	38,91	61,09	12,00	2610000,00
C2	2900000	-----	-----	20,00	5510000,00
C3	4500000	26,90	73,10	25,00	10010000,00
C4	10000000	-----	-----	32,00	20010000,00
C5	4570000	10,93	89,07	37,00	24580000,00
C6	8570000	-----	-----	44,00	33150000,00
C7	7980000	-----	-----	51,00	41130000,00
C8	8494000	26,76	73,24	58,00	49624000,00
C9	9385000	12,62	87,38	65,00	59009000,00
C10	11200000	22,12	77,88	72,00	70209000,00
C11	10434000	18,24	81,76	79,00	80643000,00
C12	7821000	16,77	83,23	87,00	88464000,00
C13	14283333	21,79	78,21	95,00	102747333,33
C14	10800000	15,67	84,33	102,00	113547333,33
Mittelwert	8110523,81	21,07	78,92		
SD	3384469,26	8,27	8,27		

Tab. 3

DMEM

G-passage	Zellzahl	% positive	% negative	kum. Tage	kum. Zellzahl
C1	2670000,0000	34,5794	65,4206	12,0000	2670000,0000
C2	1600000,0000			20,0000	4270000,0000
C3	2400000,0000	44,5344	55,4656	25,0000	6670000,0000
C4	5480000,0000			32,0000	12150000,0000
C5	1950000,0000	16,0358	83,9642	37,0000	14100000,0000
C6	3000000,0000			44,0000	17100000,0000
C7	1970000,0000			51,0000	19070000,0000
C8	2219000,0000	49,2914	50,7086	58,0000	21290000,0000
C9	2161000,0000	31,6447	68,3553	65,0000	23450000,0000
C10	2692000,0000	34,1460	65,8540	72,0000	26140000,0000
C11	1514800,0000	14,9502	85,0498	79,0000	27650000,0000
C12	3152333,3333	38,9282	61,0718	87,0000	30800000,0000
C13	733233,3333	13,9922	86,0078	95,0000	31530000,0000
C14	332033,3333			102,0000	31860000,0000
Mittelwert	2276742,8571	30,90	69,10		
SD	1218868,8077	13,11	13,11		

Tab. 4 Deskriptive Daten der Zellzahlen im NH- und DMEM

G-passage	Kulturdauer (d)	Zellzahl NH-Medium	Zellzahl/Tag NH-Medium	Zellzahl NH-Medium	Zellzahl/Tag NH-Medium
C1	12,00	2610000,00	217500,00	2670000,00	222500,00
C2	8,00	2900000,00	362500,00	1600000,00	200000,00
C3	5,00	4500000,00	900000,00	2400000,00	480000,00
C4	7,00	10000000,00	1428571,43	5480000,00	782857,14
C5	5,00	4570000,00	914000,00	1950000,00	390000,00
C6	7,00	8570000,00	1224285,71	3000000,00	428571,43
C7	7,00	7980000,00	1140000,00	1970000,00	281428,57
C8	7,00	8494000,00	1213428,57	2219000,00	317000,00
C9	7,00	9385000,00	1340714,29	2161000,00	308714,29
C10	7,00	11200000,00	1600000,00	2692000,00	384571,43
C11	7,00	10434000,00	1490571,43	1514800,00	216400,00
C12	8,00	7821000,00	977625,00	3152333,33	394041,67
C13	8,00	14283333,33	1785416,67	733233,33	91654,17
C14	7,00	10800000,00	1542857,14	332033,33	47433,33
Summe		113547333,33		31874400,00	
Mittelwert			1152676,45		324655,14
SD			450445,66		181568,06

Tab. 5 Intensitäten und Flächen der gemessenen DAPI und Oct4-Fluoreszenzen auf die Gesamtfläche bezogen. 238 Zellen.

Zellzahl	Kulturzeit	Zellkernfläche	DAPI-Intensität	Oct4-Fläche	Oct4-Intensität
4	24	844	1299051	82,6389	242474
2	24	498	565063	76	101497
8	48	1163	1364251	2420	3460314
12	48	1231	1117768	513	891219
9	48	1163	1364251	3583	4824565
9	48	1382	1542556	3861	4395685
4	48	621	1034951	1686	2497141
11	48	1782	2553014	1740	2812472
11	48	1663	1990241	1047	2059282
14	72	2185	2486810	242	421366
24	72	3321	3431297	534	971843
13	96	2711	3030613	201	381719
16	96	2085	2399522	647	1105400
12	96	1897	2595198	2029	2839012
22	96	968	858510	243	349654
16	96	1784	1721624	868	1027983
54	144	1830	1290072	123	230591

Tab. 6 Übersichtsdarstellung der Intensitäten und Flächen der gemessenen DAPI und Oct4-Fluoreszenz der Immunfluoreszenzaufnahmen pro Zelle.

Zellkernfläche	DAPI-Intensität	DAPI-Fläche	Oct4-Fläche	Oct4-Intensität	Oct4-Intensität / Zellkernfläche
198	305659	1540	19	57053	287
249	282532	1136	38	50749	204
155	181900	1173	323	461375	2976
101	91246	908	42	72753	724
137	160500	1173	422	567596	4149
154	171395	1116	429	488409	3181
148	246417	1668	401	594557	4024
166	237490	1433	162	261625	1579
154	184282	1196	97	190674	1238
162	184208	1138	18	31212	193
140	144476	1033	22	40920	293
209	233124	1118	15	29363	141
130	149970	1151	40	69088	530
165	225669	1368	176	246871	1496
45	39931	887	11	16263	361
115	111073	965	56	66321	576
34	23890	705	2	4270	126

Tab. 7. Auflistung und Nummerierung der PCR-Proben der STRO-1-positiven und -negativen RPZ

Nr.	Passage	Datum	Medium	1.Sortierung	2.Sortierung	3.Sortierung
1	I	08.06.2012	NH	STRO-1 +	keine	keine
2	I	08.06.2012	NH	STRO-1 -	keine	keine
3	I	08.06.2012	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
4	I	08.06.2012	DMEM	STRO-1 -	keine	keine
5	IIIa	16.06.2012	NH	STRO-1 +	keine	keine
6	IIIa	16.06.2012	NH	STRO-1 -	keine	keine
7	IIIa	16.06.2012	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
8	IIIa	16.06.2012	DMEM	STRO-1 -	keine	keine
9	IIIb	21.06.2010	NH	STRO-1 +	STRO-1 +	keine
10	IIIb	21.06.2010	NH	STRO-1 +	STRO-1 -	keine
11	IIIb	21.06.2010	NH	STRO-1 -	STRO-1 +	keine
12	IIIb	21.06.2010	NH	STRO-1 -	STRO-1 -	keine
13	IIIc	28.06.2010	DMEM	STRO-1 +	STRO-1 +	keine
14	IIIc	28.06.2010	DMEM	STRO-1 +	STRO-1 -	keine
15	IIIc	28.06.2010	DMEM	STRO-1 -	STRO-1 +	keine
16	IIIc	28.06.2010	DMEM	STRO-1 -	STRO-1 -	keine
17	IIId	?	NH	STRO-1 +	STRO-1 +	STRO-1 +
18	IIId	?	NH	STRO-1 +	STRO-1 +	STRO-1 -
19	IIId	?	DMEM	STRO-1 +	STRO-1 +	STRO-1 +
20	IIId	?	DMEM	STRO-1 +	STRO-1 +	STRO-1 -
21	V	28.06.2010	NH	STRO-1 +	keine	keine
22	V	28.06.2010	NH	STRO-1 -	keine	keine
23	V	28.06.2010	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
24	V	28.06.2010	DMEM	STRO-1 -	keine	keine
25	VIII	19.07.2010	NH	STRO-1 +	keine	keine
26	VIII	19.07.2010	NH	STRO-1 -	keine	keine
27	VIII	19.07.2010	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
28	VIII	19.07.2010	DMEM	STRO-1 -	keine	keine
29	IX	26.07.2010	NH	STRO-1 +	keine	keine
30	IX	26.07.2010	NH	STRO-1 -	keine	keine
31	IX	26.07.2010	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
32	IX	26.07.2010	DMEM	STRO-1 -	keine	keine
33	X	02.08.2010	NH	STRO-1 +	keine	keine
34	X	02.08.2010	NH	STRO-1 -	keine	keine
35	X	02.08.2010	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
36	X	02.08.2010	DMEM	STRO-1 -	keine	keine
37	XI	09.08.2010	NH	STRO-1 +	keine	keine
38	XI	09.08.2010	NH	STRO-1 -	keine	keine
39	XI	09.08.2010	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
40	XI	09.08.2010	DMEM	STRO-1 -	keine	keine

41	XII	17.08.2010	NH	STRO-1 +	keine	keine
42	XII	17.08.2010	NH	STRO-1 -	keine	keine
43	XII	17.08.2010	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
44	XII	17.08.2010	DMEM	STRO-1 -	keine	keine
45	XIII	24.08.2010	NH	STRO-1 +	keine	keine
46	XIII	24.08.2010	NH	STRO-1 -	keine	keine
47	XIII	24.08.2010	DMEM	STRO-1 +	keine	keine
48	XIII	24.08.2010	DMEM	STRO-1 -	keine	Keine
49	H2O					

Abb.15 Nachweis der GAPDH-Expression (216 bp) durch RT-PCR und Gelelektrophorese in den STRO-1-positiven und -negativen RPZ (Nummerierung siehe Tab. 7) (H= H_2O ; L= Ladder)

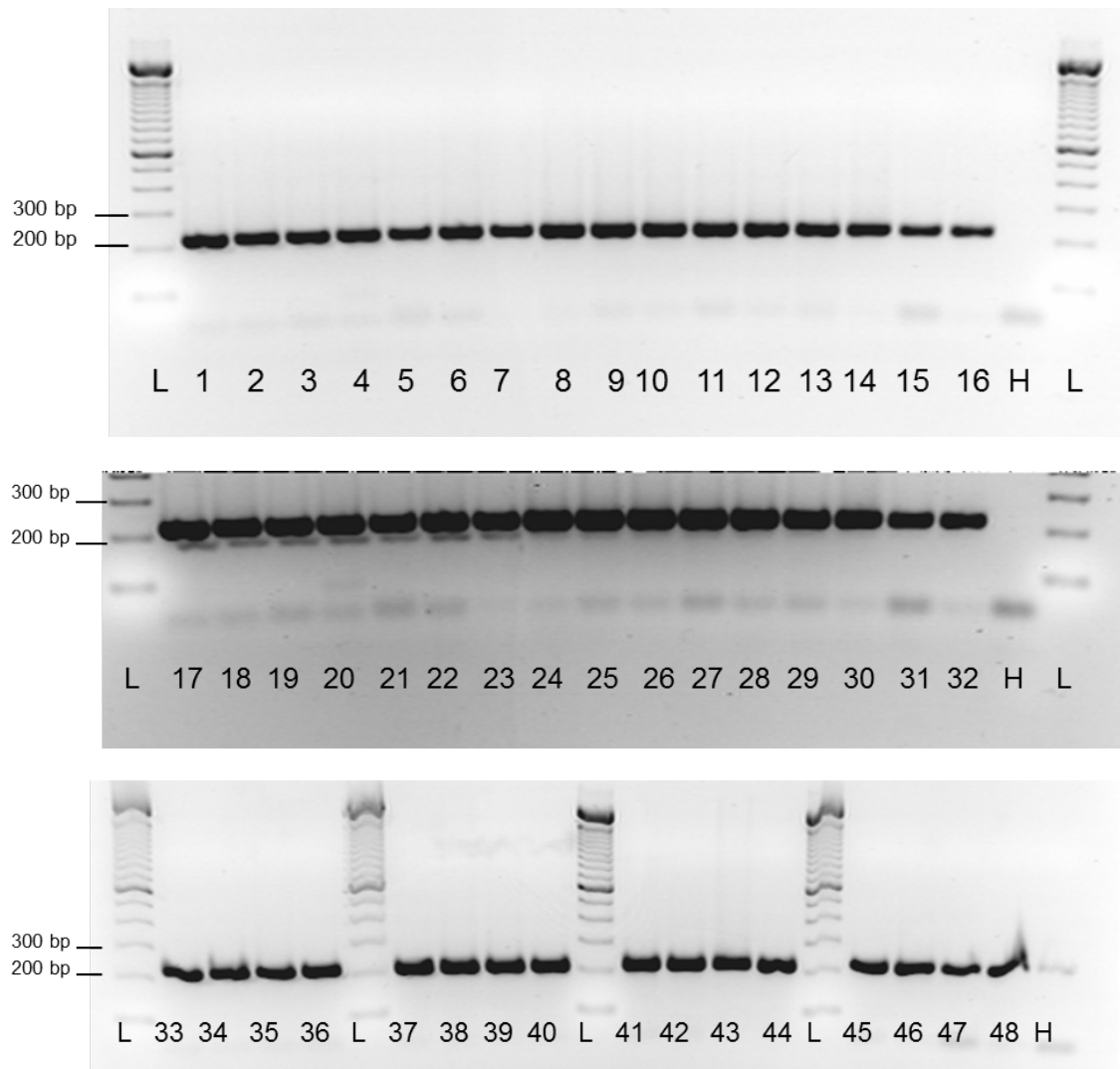


Abb. 16 Nachweis der *c-Myc*-Expression (330 bp) durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ (Nummerierung siehe Tab. 7).

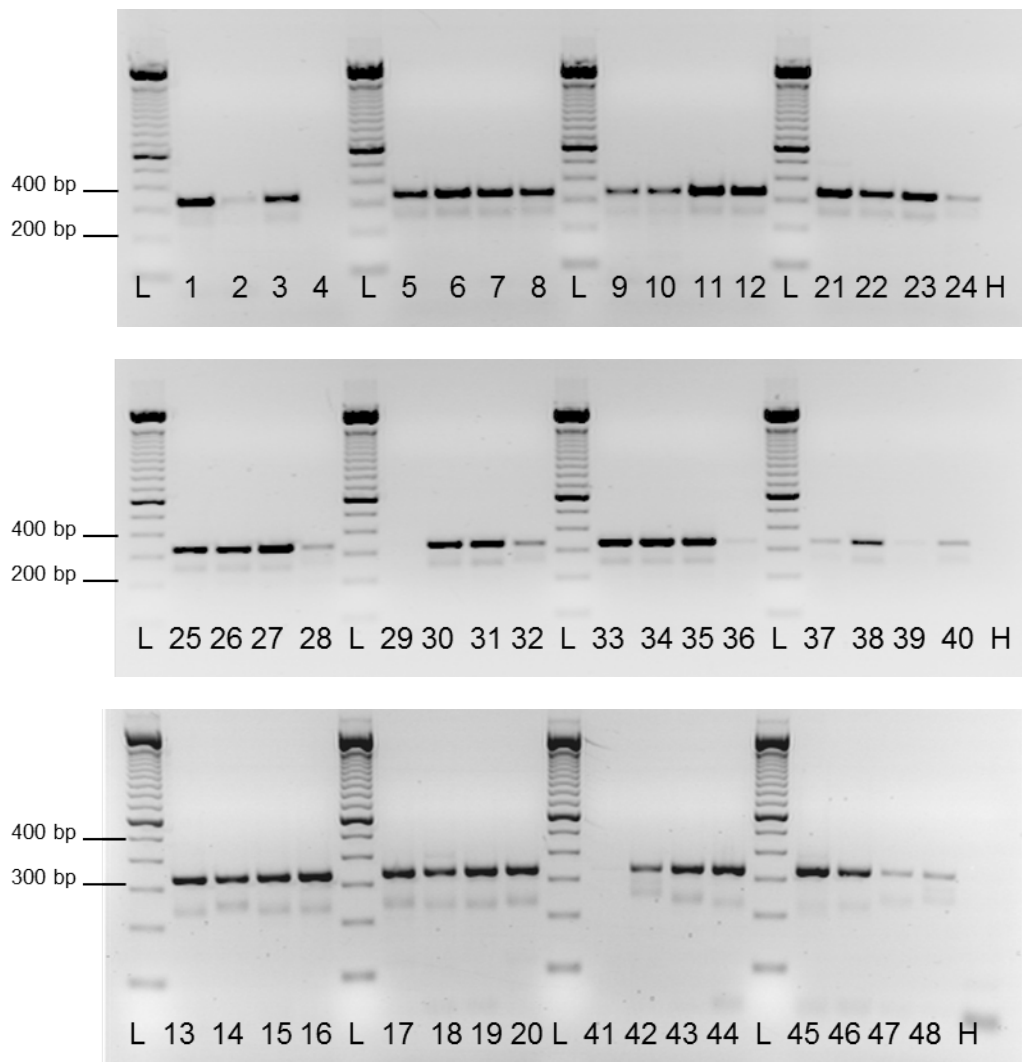


Abb. 17 Nachweis der Sox2-Expression (340 bp) durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ (Nummerierung siehe Tab. 7).

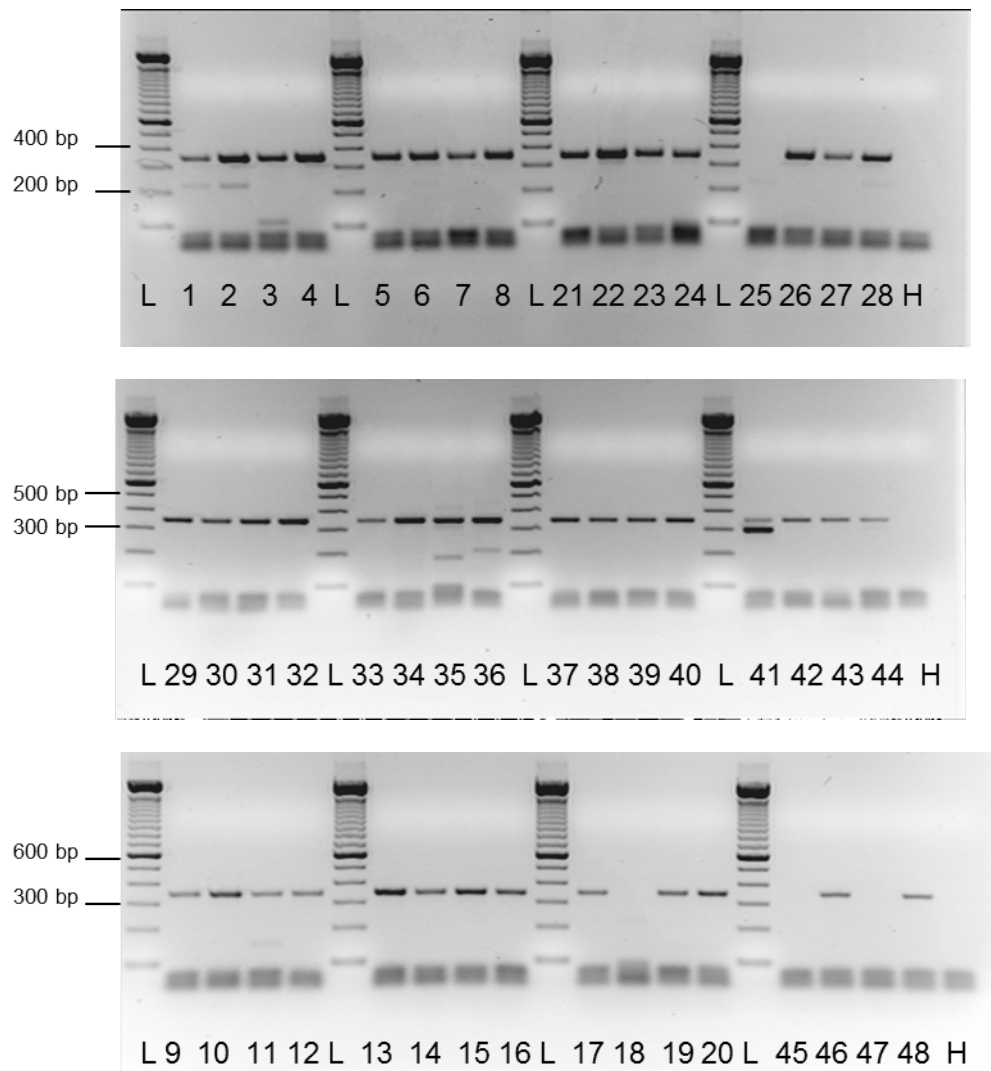


Abb. 18 Nachweis der Nanog-Expression (275 bp) durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ (Nummerierung siehe Tab. 7).

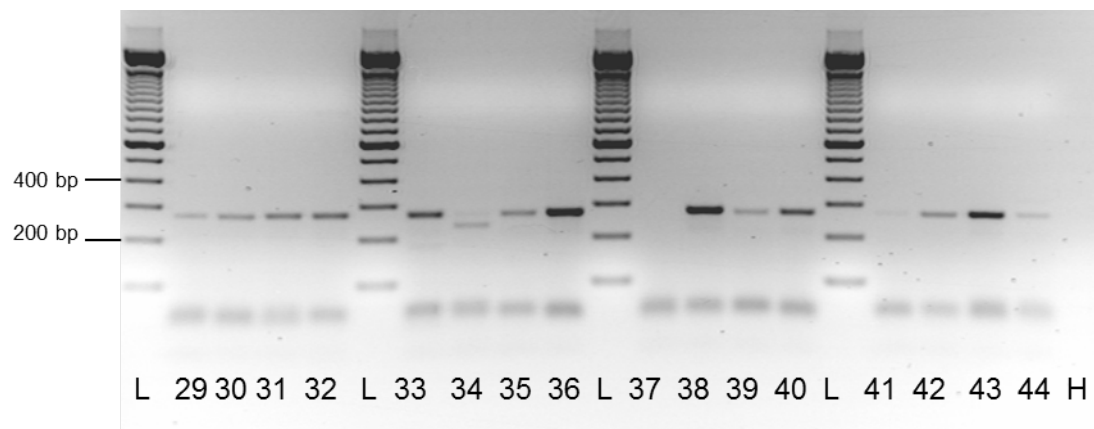
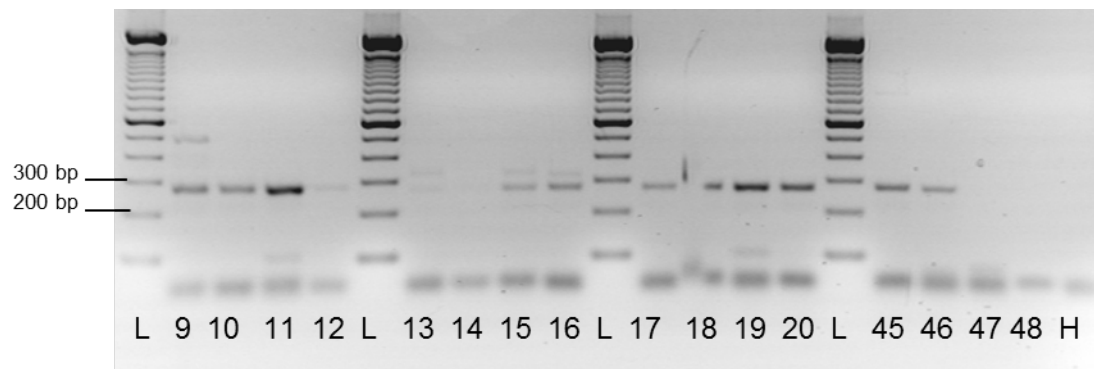
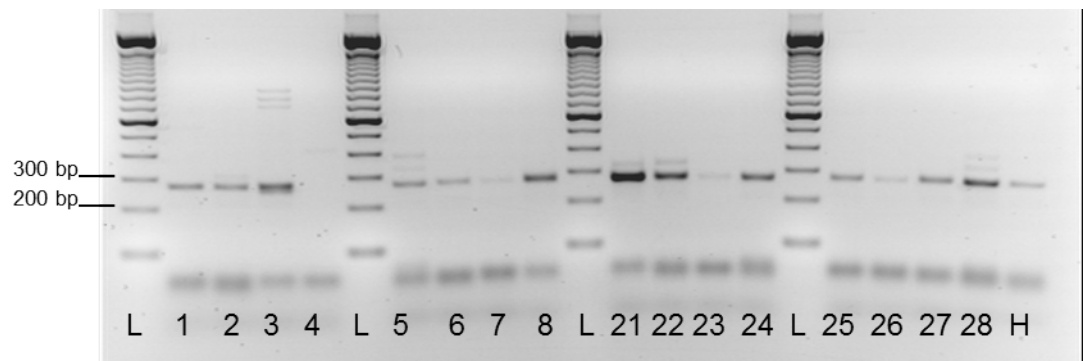


Abb. 19 Nachweis der Oct4-Expression (335 bp) durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und negativen RPZ (Nummerierung siehe Tab. 7).

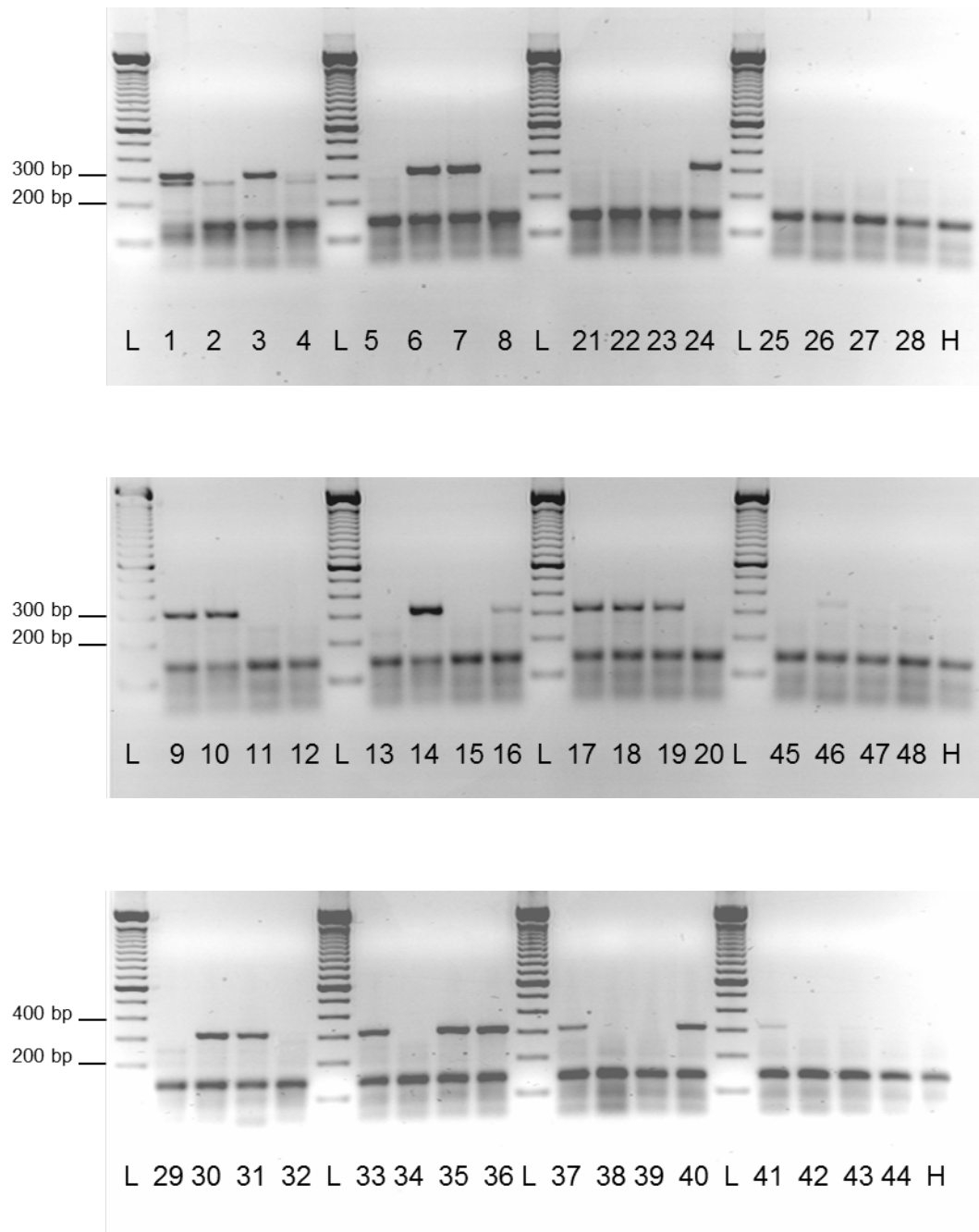
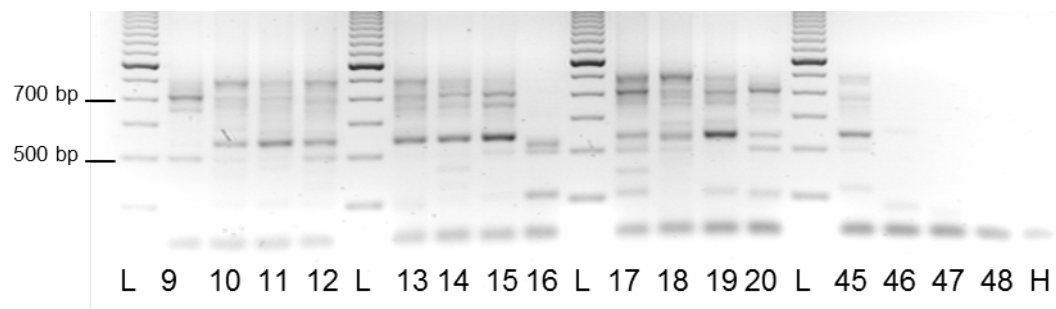
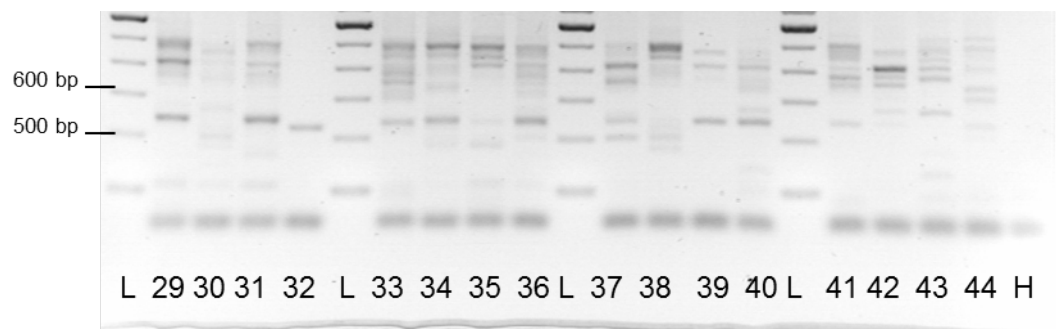
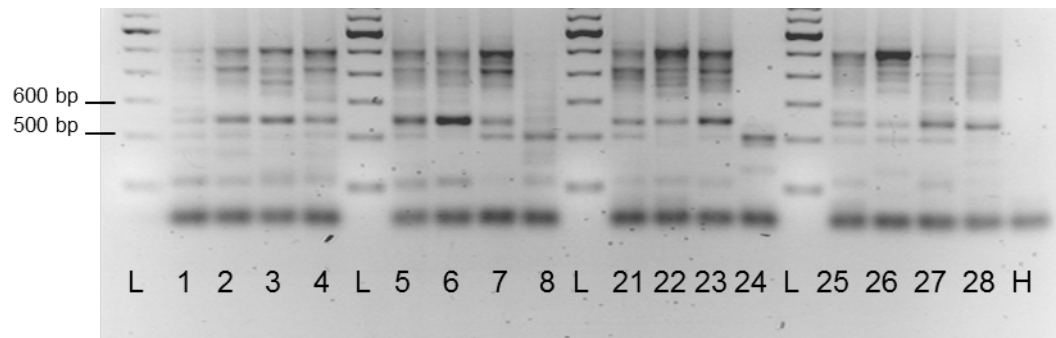


Abb. 20 Nachweis der *Kfl-4*-Expression (565 bp) durch RT-PCR und Gelelektrophorese der STRO-1-positiven und -negativen RPZ (Nummerierung siehe Tab. 7).



Tab.8 Medien und Zusätze

Medien und Zusätze	Hersteller	Bestellnummer.
Monoklonaler Anti-humaner STRO-1 Antikörper	R&D Systems www.RnDSystems.com	Mab 1038
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe	21885-025
NH-Expansion Medium	MACS Miltenyi Biotec www.miltenyibiotec.com	130-091-680
fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin	S0115
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin www.biochrom.de	A 2712
D-PBS, flüssig ohne Mg ⁺ ohne Ca ²⁺	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com	14190-094
Trypsin-EDTA , 0,05% Trypsin	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com	25300-054
RNeasy Protect Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden www.qiagen.com	74126
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden www.qiagen.com	79254
iScript cDNA Synthesis Kit 100	Bio-Rad Laboratories GmbH, München www.bio-rad.com	170-8891
Go Taq Green Master Mix	Promega GmbH Mannheim www.promega.com	
Nuclease Free Water	Promega GmbH Mannheim www.promega.com	P1193
100bp DNA Ladder	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com	15628-050
UltraPure 10mg/ml Ethidiumbromid	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com	15585011
Amphotericin		
DAPI-Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidin-2-phenylindol) Hoechst 33342		
Fluoreszin Isothiocynat (FITC)-konjugierter anti- mouse IgM Antikörper Donkey Anti-Rabbit IgG NL557 Affinit Purified PAb, Donkey IgG	BD Bioscience Pharmingen Heidelberg www.bdeurope.de R&D Systems Minneapolis http://www.rndsystems.com	NL 004

NorthernLights 557 Fluorochrome-labeled Antibody, X Absorbed		
Rat Anti Mouse IgM Microbeads	MACS Miltenyi Biotecs www.miltenyibiotec.com	130-047-301
CD 133 Mircobead Kit	MACS Miltenyi Biotecs www.miltenyibiotec.com	130-050801
CD 271 (LNGFR) Biotin	MACS Miltenyi Biotecs www.miltenyibiotec.com	130-091-883
CD 271 (LNFR) FITC	MACS Miltenyi Biotecs www.miltenyibiotec.com	130-091-917
Swine Serum Antibody Diluent With Background Redoucing Components	DakoCytomation X0901 DakoCytomation	
Fluorserve™ Reagent	Calbiochem (EMD Millipore) www.calbiochem	345787
mouse embryonic fibroblasts, MEF	Stemgent™ Oct4-GFP MEF, Miltenyi Biotec Inc., Bergisch Gladbach, Germany	
MEF-Kulturmedium	Stemgent™, San Diego, USA	
anti-human Oct-3/4	H-34:sc-9081, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc.	

Tab. 9 Labormaterialien

Material	Hersteller	Bestellnummer.
Petrischalen	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht	831801
75cm ² Kulturflschen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht www.sarstedt.com	
Sterile Ecups	Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de	
Reagenzröhrchen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht www.sarstedt.com	
Brutschrank	Sanyo Biomedical, Ewald Innovationstechnik GmbH www.sanyo-boimedical.de	
Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz www.sigmazentrifugen.de	
Casy-Cell-Counter Modell TT	Schärfe System GmbH Reutlingen	
Wasserbad	Memmert GmbH&Co.KG Schwabach www.memmert.de	
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena www.zeiss.de	
Kryoröhrchen	Nunc A/S. Roskilde, Dänemark www.nuncbrand.de	
NALGENE Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Europe Ltd, Neerijse, Belgien www.nalgenunc.com	5100-0001
Stickstofftank	Air Liquide-Devison Matériel Cryogénique, Frankreich www.dmc.airliquide.com	
Kühlschrank		
RNeasy Protect Mini Kit	QUIAGEN GmbH, Hilden www.quiagen.com	74126
QIAshredder 250	QUIAGEN GmbH, Hilden www.quiagen.com	79656
Zentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de	
Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de	
PCR Tubes		
Master Cycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de	
Präzisionspipetten 10-1000µl Research	Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de	
Elite 300 Plus Elektrophore- sekammer	Harnischmacher Labortechnik, www.harnischmacher.de	Kassel
4-Well-Chamber-Slides	Lumox® Sarstedt AG & Co. www.sarstedt.com	

7 Literaturverzeichnis

- Adachi K, Schöler HR (2012):** Directing reprogramming to pluripotency by transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 22, 416–422
- Adegani FJ, Langroudi L, Arefian E, Shafiee A, Dinarvand P, Soleimani M (2013):** A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Mol Biol Rep* 40, 3693–3703
- Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R (2008):** Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*; 2(2):151-159
- Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C (2005):** Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 17: 879–887.
- Cowan C (2005):** Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science* 309, 1369–1373
- Dennisa JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. (2002):** The STRO-1+ Marrow Cell Population Is Multipotential. *Cells Tissues Organs*, 170(2-3) 73-82
- Folmes CDL, Martinez-Fernandez A, Faustino RS, Yamada S, Perez-Terzic C, Nelson TJ, Terzic A (2013):** Nuclear Reprogramming with c-Myc Potentiates Glycolytic Capacity of Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *J Cardiovasc Trans Res* 6, 10–21
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. (2004):** Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell* 19, 116(6) 769-78
- Gao Y, Chen J, Li K, Wu T, Huang B, Liu W, Kou X, Zhang Y, Huang H, Jiang Y et al. (2013):** Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC Induction Reveals an Important Role of DNA Methylation and Hydroxymethylation in Reprogramming. *Cell Stem Cell* 12, 453–469
- Gronthos S, Simmons PJ (1995):** The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*, 85(4) 929-940
- Guo J, Li Z, Feng Y (2009):** Expression and activation of the reprogramming transcription factors. *Biochem Bioph Res Co* 390, 1081–1086
- Han J, Mistriotis P, Lei P, Wang D, Liu S, Andreadis ST (2012):** Nanog Reverses the Effects of Organismal Aging on Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Myogenic Differentiation Potential. *Stem Cells*, 30(12) 2746-59
- Ieda M (2013):** Direct Reprogramming into Desired Cell Types by Defined Factors. *Keio J Med*, 62(3), 74-82.
- Jeltsch A (2002):** Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases. *ChemBiochem*, 3(4) 274-93
- Jones DL, Wagers AJ (2008):** No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 11-21.
- Kapuscinski J (1995):** DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech Histochem*, (5), 220-33
- Kellner S, Kikyo N (2010):** Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol*, 25 (3) 405-412.
- Kierdorf U, Kierdorf H (2012):** Antler regrowth as a form of epimorphic regeneration in vertebrates – a comparative view. *Front Biosci*, 4, 1606-24

- Kierdorf U, Kierdorf H (2011):** Deer Antlers - A Model of Mammalian Appendage Regeneration: An Extensive Review. *Gerontology*, 57, 53–65
- Kierdorf U, Li C, Price JS (2009):** Improbable appendages: Deer antler renewal as a unique case of mammalian regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 20(5), 535-42
- Kierdorf U, Kierdorf H, Szuwart T (2007):** Deer antler regeneration: Cells, concepts, and controversies. *J Morphol*, 268, 726–738
- Kierdorf U, Stoffels E, Stoffels D, Kierdorf H, Szuwart T, Clemen G. (2003):** Histological studies of bone formation during pedicle restoration and early antler regeneration in roe deer and fallow deer. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 273 (2), 741-51
- Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Schöler HR (2009a):** Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *ture*, 461(7264): 649–653. doi: 10.1038/nature08436
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR (2009b):** Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells. *Cell*, 136 (3), 411-419
- Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, Yamanaka N, et al. (2005):** Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* 25: 3703–3707.
- Kužmová E, Bartoš L, Kotrba R, Bubenik GA, (2011):** Effect of Different Factors on Proliferation of Antler Cells, Cultured In Vitro. *PLoS One*, 6 (3), e18053. doi: 10.1371/journal.pone.0018053
- Lee J, Kim HK, Rho J, Han Y, Kim J (2006):** The Human OCT4 Isoforms Differ in Their Ability to Confer Self-renewal. *J Biol Chem*, 281(44): 281, 33554–33565
- Li C (2012):** Deer antler regeneration: A stem cell-based epimorphic process. *Defects Res C Embryo Today*, 96(1):51-62
- Li C, Suttie JM (2001):** Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? *Anat Embryol*, 204(5): 375-388
- Li C, Suttie JM, Clark DE (2005):** Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat Rec*, 282, 163–174
- Li C, Mackintosh CG, Martin SK, Clark DE (2007):** Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum deletion. *Cell Tissue Res*, 328 (1), 65-75
- Li C Harper A, Puddick J, Wang W, McMahon C. (2012):** Proteomes and Signalling Pathways of Antler Stem Cells. *PLoS One*, 7(1):e30026. doi: 10.1371/journal.pone.0030026
- Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X et al. (2010):** Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res* 2010 21, 196–204
- Liedtke S, Stephan M, Kögler G (2008):** Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biol Chem* 389, 845–850
- Marzo L, Gousset K, Zurzolo C (2012):** Multifaceted Roles of Tunneling Nanotubes in Intercellular Communication. *Front Physiol*, 3, 72.
- Medvedev SP, Pokushalov EA, Zakian SM (2012):** Epigenetics of Pluripotent Cells. *Acta Naturae*, 4(4), 28-46
- Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, Wang R, Green DR, Tessarollo L, Casellas R et al. (2012):** c-Myc Is a Universal Amplifier of Expressed Genes in Lymphocytes and Embryonic Stem Cells. *Cell* 151, 68–79

- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000):** Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat genet*, 24(4), 372-376.
- Oh JH, Gertych A, Tajbakhsh J (2013):** Nuclear DNA Methylation and Chromatin Condensation Phenotypes Are Distinct Between Normally Proliferating/Aging, Rapidly Growing/Immortal, and Senescent Cells. *Oncotarget*, 4(3), 474-93
- Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K, Yoneda Y (2013):** Differential Role for Transcription Factor Oct4 Nucleocytoplasmic Dynamics in Somatic Cell Reprogramming and Self-renewal of Embryonic Stem Cells. *J Biol Chem*, 288, 15085–15097
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007):** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317
- Okumura-Nakanishi S (2004):** Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *J Biol Chem*, 280, 5307–5317
- Park I, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2007):** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141–146
- Park SB, Seo KW, So AY, Seo MS, Yu KR, Kang SK, Kang KS (2012):** SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ*, 19(3), 534–545
- Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Galkina SI, Sukhikh GT, Zorov DB (2010):** Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp Cell Res*, 316, 2447–2455
- Pochampally RR (2004):** Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSZs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT4 and other embryonic genes. *Blood* 103, 1647–1652
- Price JS, Allen S, Faucheux C, Althnaian T, Mount JG (2005):** Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *J Anat*, 207(5), 603-18
- Psaltis PJ, Paton S, See F, Arthur A, Martin S, Itescu S, Worthley SG, Gronthos S, Zannettino AC (2010):** Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *J Cell Physiol*; 223(2), 530-540
- Richard J, Goss RP (1985):** Induction of deer antlers by transplanted periosteum I. Graft size and shape. *J Exp Zool*, 235(3), 359-373
- Rodolfa KT, Eggan K (2006):** A Transcriptional Logic for Nuclear Reprogramming. *Cell* 126, 652–655
- Rolf HJ, Fischer K (1996):** Serum testosterone, 5-alpha-dihydrotestosterone and different sex characteristics in male fallow deer (*Cervus dama*): a long-term experiment with accelerated photoperiods. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 115(3), 207-221
- Rolf HJ, Kierdorf U, Kierdorf H, Schulz J, Seymour N, Schliephake H, Napp J, Niebert S, Wölfel H, Wiese KG (2008):** Localization and Characterization of STRO-1+ Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. *PLoS One*. 3(4) e2064. doi: 10.1371/journal.pone.0002064
- Rolf HJ, Niebert S, Niebert M, Gaus L, Schliephake H, Wiese KG (2012):** Intercellular Transport of Oct4 in Mammalian Cells: A Basic Principle to Expand a Stem Cell Niche? *PLoS ONE* 7, e32287. doi: 10.1371/journal.pone.0032287
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH (2004):** Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science*, 303 (5660), 1007–1010

- Saxe JP, Tomilin A, Schöler HR, Plath K, Huang J. (2009):** Post-translational regulation of Oct4 transcriptional activity. *PLoS One*, 4(2):e4467. doi: 10.1371/journal.pone.0004467
- Seo MS, Park SB, Choi SW, Kim JJ, Kim HS, Kang KS (2012):** Isolation and characterization of antler derived multipotent stem cells. *Cell Transplant*; 23 (7), 831-843
- Shi M, Liu Z, Wang FS (2011):** Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 164, 1–8
- Simmons PJ, Torok-Storb B (1991):** Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*; 78(1), 55-62.
- Sumer H, Nicholls C, Liu J, Tat PA, Liu J, Verma PJ (2010):** Comparison of reprogramming ability of mouse ES and iPS cells measured by somatic cell fusion. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1723–1728
- Tae S, Lee S, Park J, Im G (2006):** Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater*, 1 (2), 63-71.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007):** Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861-72
- Tonti GA, Mannello F (2008):** From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol* 52, 1023–1032
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V et al. (2008):** Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS One.*, 3(5):e2213. doi: 10.1371/journal.pone.0002213
- Wei Z, Yang Y, Zhang P, Andrianakos R, Hasegawa K, Lyu J, Chen X, Bai G, Liu C, Pera M, Lu W (2009):** Klf4 Directly Interacts with Oct4 and Sox2 to Promote Reprogramming. *Stem Cells*, 27(12), 2969-78
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007):** In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448 318-24
- Yamanaka S, Blau HM (2010):** Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712
- Yamanaka S, Takahashi K (2006):** Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676
- Yi T, Song (2012):** Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 35, 213–221
- Zani BG and Edelman ER (2010):** Cellular bridges: Routes for intercellular communication and cell migration. *Commun Integr Biol* 3, 215–220
- Zhang W, Wang X, Yu Q, Ming R, Jiang J (2008):** DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya. *Genome Res* 18, 1938–1943

Lebenslauf

Ich, Lena Gaus, wurde am 19.12.1985 in Burgwedel, Niedersachsen als zweites Kind meiner Eltern Hella Maria Gaus, geb. Püschel und Cord Otto Gaus geboren. Mit meinen Eltern und meinen Brüdern Moritz und Hinnerk Gaus wuchs ich in Adelheidsdorf im Landkreis Celle auf. Dort besuchte ich von 1992 bis 1996 die Grundschule Adelheidsdorf. 2005 erlangte ich am Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium in Celle die allgemeine Hochschulreife.

Im April 2006 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, an der ich im April 2008 die ärztliche Vorprüfung absolvierte. Ab Oktober 2008 studierte ich an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Das Praktische Jahr absolvierte ich am St. Bernward Krankenhaus in Hildesheim in den Bereichen Innere Medizin, Unfall-, Viszeral-, und Gefäßchirurgie sowie Gynäkologie und Geburtshilfe.

Den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 28.11.2013 an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Im Oktober 2013 begann ich meine Ausbildung zur Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe im Diakonissen-Krankenhaus in Flensburg.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K.G. Wiese für die freundliche Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die kreativen Diskussionen bedanken.

Daneben gilt mein besonderer Dank auch Herrn Dr. H.J. Rolf, der diese Arbeit mit in die Wege leitete, mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und ebenfalls entscheidend zum guten Gelingen beigetragen hat.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen der MKG, insbesondere Sabine Niebert und Jutta Schultz, für die tatkräftige Unterstützung, die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor.