

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

Untersuchungen zum Transfer von Pluripotenzfaktoren maligner Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen auf tumorfremde somatische Zellen

INAUGRAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Julia Walter

aus Berlin

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese

2. Korreferent: Prof. Dr. med. N. Miosge

3. Promotor: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden.....	5
2.1 Material und Gerätschaften	6
2.2 Zellkulturen und Zelllinien	9
2.2.1 Zelllinien	9
2.2.2 Zellkultur	11
2.3 Zellsortierung	13
2.4 Kokultivierung	16
2.5 Transfektion	17
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	20
2.6.1 RNA-Isolation und cDNA-Herstellung.....	20
2.6.2 Reverse Transkriptase-Polimerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	23
2.6.3 Gelelektrophorese.....	25
2.7 Oct4-Transport von Tumor- auf Nichttumorzellen durch Exosomen	27
2.8 Statistik	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Zellsortierung nach dem Stro-1-Oberflächenmarker.....	28
3.2 Morphologische Aspekte der sortierten Zellen	31
3.3 Kokultivierung von Tumor- und Promotorzellen.....	36
3.4 Übertragung der Pluripotenzfaktoren von Tumor- auf Somazellen	41
3.4.1 Charakterisierung von Tumor- und Somazellen	42
3.4.2 Transfektion und Kokulturrexperiment.....	44
4 Diskussion	50
4.1 Diskussion der Methodik	51
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	55
4.2.1 Zellsortierung nach dem Stro-1-Oberflächenmarker.....	55
4.2.2 Morphologische Aspekte der sortierten Zellen	57
4.2.3 Kokultivierung der Tumorzellen und Promotorzellen	58
4.2.4 Übertragung der Pluripotenzfaktoren von Tumor- auf Somazellen	60
5 Zusammenfassung	62
Anhang	64
Literaturverzeichnis.....	79

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A-Abb.	Abbildung im Anhang
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c-myc	Myelocytomatose-abgeleiteter Name
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNAs	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
Σ	Summe
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FKS	fetales Kälberserum
for	<i>forward</i>
FS	Filtersatz
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
Glc	Glukose
h	Stunde
HEK293T	Human Embryonic Kidney293T

HeLa	Henrietta Lacks (Zervixkarzinom-Zellen)
Hep2	humane Epitheliomzellen Typ 2 (humane Larynxkarzinom-Zellen)
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor vom Typ 2
HGF	humane Gingivafibroblasten
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
IgM	Immunglobulin M
kb	Kilobase
Klf4	Krüppel-like Faktor 4
l	Liter
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
max	maximal
MDB	<i>membrane desalting buffer</i>
Mean	arithmetisches Mittel
MEF	Mäusefibroblasten
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Stichproben
NH-Medium	<i>nonhematopoietic-Medium</i>
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
Oligo (dT)	Oligonukleotide
p	Signifikanzniveau
P/S/G	Penicillin / Streptomycin/ Gentamycin
%	Prozent
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
S.	Seite
s.	siehe
SAOS-Zellen	Osteosarkom-Zellen (<i>sarcoma osteogenic cells</i>)
SD	Standardabweichung
s	Sekunde
Sem	Standardfehler
Sox 2	SRY (<i>sex determining region Y</i>)-box2
Stro-1	<i>stromal cell surface marker</i>
Tab.	Tabelle
A-Tab.	Tabelle im Anhang
TE-Puffer	Tris (<i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan) /EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
rev	<i>reverse</i>
u. a.	unter anderem
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
V	Volt
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm ²	Quadratmikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristische Eigenschaften von Tumorzellen	2
Abbildung 2: Pluripotenzfaktoren und deren Bedeutung für die Redifferenzierung von Zellen.	3
Abbildung 3: Plasmidkarte von pCMV-VSV-G	7
Abbildung 4: Plasmidkarten von pCMV-dR8.91 und pLKO.1.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der MAC [®] -Sortierung.....	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung des FACS-Geräts	15
Abbildung 7: Kammeranordnung der Kokulturen und Kontrollen der Tumorzelllinien	16
Abbildung 8: Exzitations- und Emissionsspektrum von GFP	17
Abbildung 9: Schema des Transfektionsablaufs	18
Abbildung 10: Schema eines PCR-Ablaufes.....	25
Abbildung 11: Mischkultur Hep2- und SAOS-Zellen	29
Abbildung 12: Ergebnisse der Zellsortierung (S1-10) der Tumorzelllinien Hep2 und SAOS	30
Abbildung 13: Kulturen von Hep2 ^{Stro1+} - und SAOS ^{Stro1+} -Zellen	32
Abbildung 14: Mikroskopaufnahmen der Stro-1- sortierten Tumorzelllinien.	33
Abbildung 15: Zellflächen der Stro-1 ⁺ - und Stro-1 ⁻ - Hep2- und SAOS- Zellen im MEF-/NH-Medium	34
Abbildung 16: Größenvergleich der Zellflächen	36
Abbildung 17: Interaktion zwischen Hep2- und Oct4-GFP MEF-Zellen	37
Abbildung 18: Fluoreszenzaufnahmen: Kokulturen von Tumorzellen mit Oct4-GFP MEF-Zellen.....	39
Abbildung 19: Fluoreszenzfläche und -intensität der Oct4-Promotorzellen	40
Abbildung 20: Expression von Pluripotenzfaktoren der Stro-1 ⁺ - und Stro-1 ⁻ -Tumorzelllinien.....	43
Abbildung 21: FACS–Analyse Nr. 1 der HGF-Zellen	45
Abbildung 22: Kokulturen von transfizierten HGF-Zellen mit Hep2- und SAOS-Zellen	45
Abbildung 23: <i>Photomerge</i> von einer GFP-transfizierten HGF-Zelle mit langem <i>Nanotube</i>	46
Abbildung 24: FACS-Analyse Nr.2: nach Kokultivierung	46
Abbildung 25: Expressionsmuster von HGF-Zellen nach Kokultivierung mit Tumorzellen	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Größenstandard (<i>Ladder</i>) und deren Hersteller	6
Tabelle 2: Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	6
Tabelle 3: Zelllinienübersicht.	9
Tabelle 4: Plasmidübersicht.....	18
Tabelle 5: cDNA-Ansatz	22
Tabelle 6: Thermocycler-Programm für cDNA	22
Tabelle 7: <i>Annealing</i> -Temperatur der Transkriptionsfaktoren	24
Tabelle 8: PCR-Ansatz	24
Tabelle 9: Thermocycler-Programm für PCR	24
Tabelle 10: Zellflächen der Stro-1 ⁺ - und Stro-1 ⁻ -Hep2- und SAOS- Zellen im MEF-/ NH-Medium.....	34
Tabelle 11: Sequenzierungsergebnisse der Expressionsbanden der Tumorzelllinien	44
Tabelle 12: Sequenzierungsergebnisse der Expressionsbanden von HGF-Zellen.....	48

1 Einleitung

Krebs ist eine weltweit verbreitete Erkrankung, deren Erforschung in der Wissenschaft einen hohen Stellenwert besitzt. Solide Tumoren epithelialer Herkunft in Brust, Lunge, Dickdarm und Eierstöcken machen 80 % aller Krebserkrankungen weltweit aus (Visvader und Lindeman 2008). Dennoch sterben über 90 % der Patienten erst an den Folgen der späteren Metastasierung in entfernten Geweben (Jemal et al. 2006; Steeg 2006; Weigelt et al. 2005). Trotz der enormen Fortschritte, die bereits in der Tumorforschung stattgefunden haben, sind die Entstehung, die Verbreitung sowie der Metastasierungsvorgang von Krebserkrankungen noch nicht ausreichend geklärt. In der gängigsten Theorie wird als Grund der Tumorentstehung eine Anhäufung von Mutationen innerhalb von Tumorsuppressor- und Proto-onkogenen angenommen. Diese führen letztendlich zum ungehinderten Wachstum und zur Unsterblichkeit der Tumorzellen. Diese Theorie wird auch als Mehrstufenmodell bezeichnet und erfordert mehrere Mutationen, um eine Krebserkrankung zu verursachen (Knudson 1985). Durch pathologische Analysen von Organen konnten Zwischenschritte nachgewiesen werden, die schließlich zur malignen Transformation führten (Foulds 1954). Es wird angenommen, dass sechs essentielle Änderungen in der Zellphysiologie nötig sind, um ein malignes Zellwachstum zu ermöglichen (Abbildung 1). Zu diesen sechs Veränderungen gehören die Aufrechterhaltung der Produktion von Wachstumssignalen, der Verlust der Sensitivität gegenüber wachstumsunterdrückenden Signalen, die Verhinderung der Apoptose, die ungehinderte Zellproliferation, eine andauernde Angiogenese sowie die Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000; 2011). Dabei wird der Tumor nicht als homogene Zellmasse angenommen, sondern besteht aus unterschiedlichen Zellpopulationen, die sich gegenseitig beeinflussen. Diese Subpopulationen werden auch als Nischenpopulationen beschrieben. Es ist bekannt, dass Tumorzellen die vermehrte Ausschüttung von Wachstumssignalen in deren Nachbarzellen stimulieren (Skobe und Fusenig 1998). So wird die Tumorzelle von äußeren Signalen beeinflusst, ist aber auch selbst dazu in der Lage, andere Zellen zu beeinflussen. Die beschriebene Interaktion zwischen Tumorzelle und somatischer Zelle ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

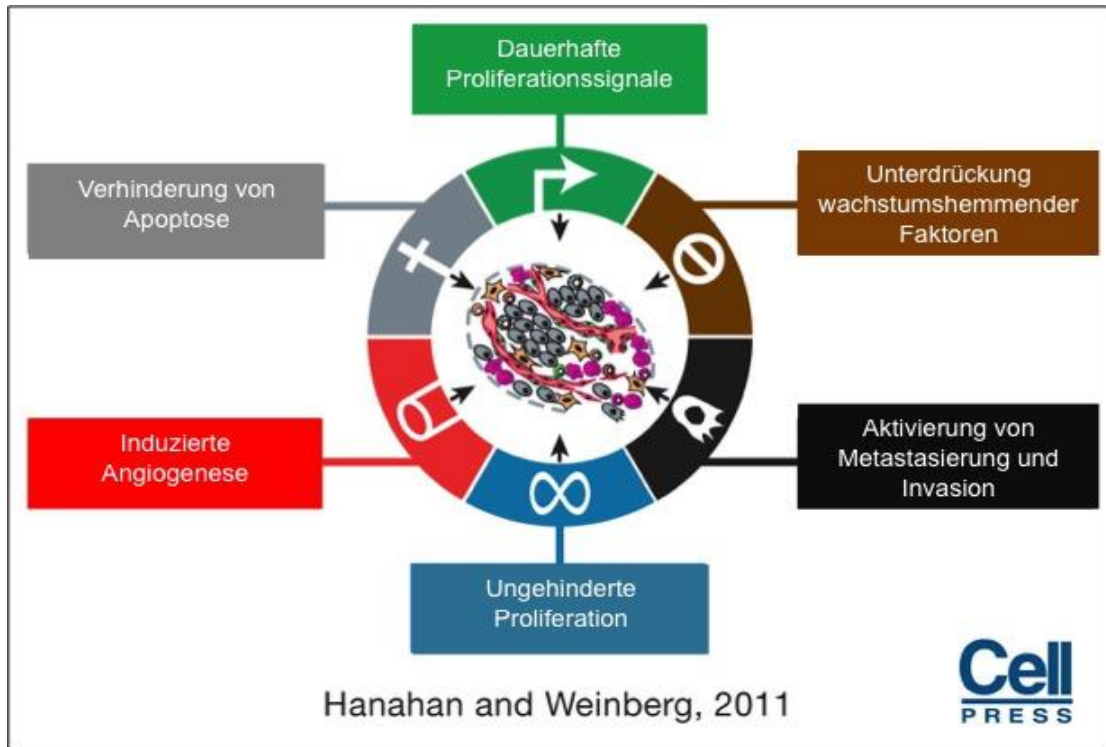


Abbildung 1: Charakteristische Eigenschaften von Tumorzellen nach einer modifizierten Grafik von Hanahan und Weinberg (2011).

Tumorstammzellen werden Eigenschaften zugewiesen, die eine wichtige Rolle in der Initiation, Progression und Metastasierung von Tumoren spielen. Die Theorie der Tumorzellen mit Stammzell-ähnlichen Charakter wurde erstmals vor über 150 Jahren aufgestellt (Cohnheim 1867; 1875; Durante und Nesso 1874) und ist immer noch von großem Interesse. Welchen Einfluss diese Zellart auf die Initiation von Tumoren hat, konnte erstmals am Beispiel der Leukämieerkrankung nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde an murinen Lymphomzellen gezeigt, dass diese nach Injektion in Mäusen Kolonien in der Milz bildeten (Bonnet und Dick 1997; Bruce und Van Der Gaag 1963; CH Park et al. 1971). Später konnte eine Stammzellpopulation auch in soliden Tumoren nachgewiesen werden (Al-Hajj und Clarke 2004; Bao et al. 2006; Bertolini et al. 2009; Bussolati et al. 2008; Eramo et al. 2008; Hemmati et al. 2003; Ibrahim et al. 2012; Jiang et al. 2009; TK Lee et al. 2011; Singh et al. 2003; Singh et al. 2004). Dabei gibt es viele Ähnlichkeiten zwischen Stammzellen und Tumorstammzellen. In den letzten Jahren konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Metastasierung von Tumoren über ähnliche Signalkaskaden abläuft wie die Stammzellmigration.

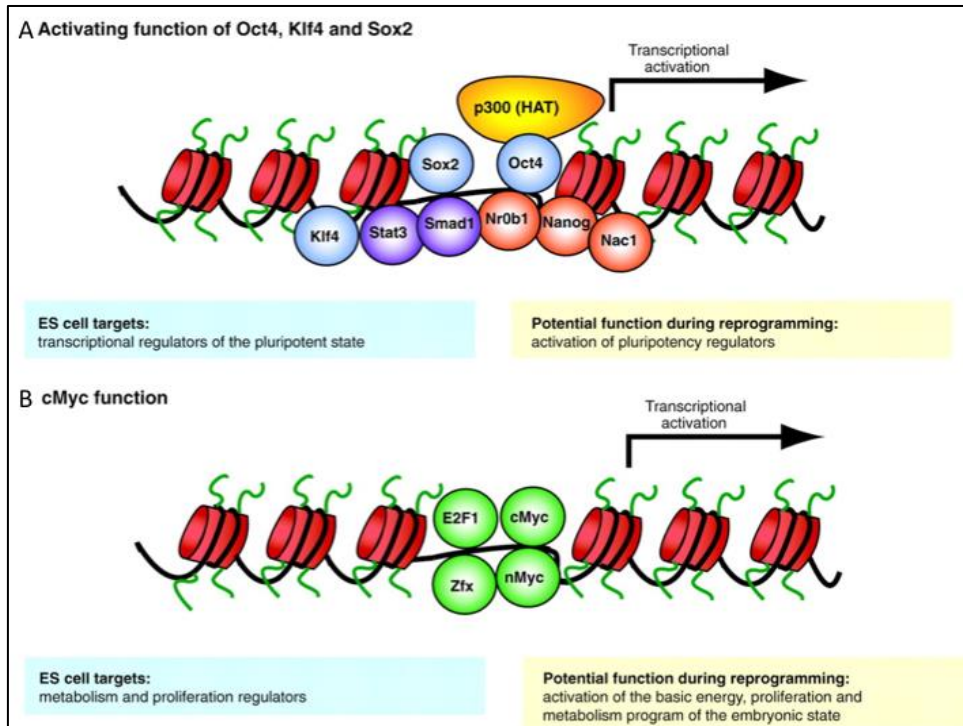


Abbildung 2: Pluripotenzfaktoren und deren Bedeutung für die Redifferenzierung von Zellen (modifizierte Grafik nach Hochedlinger und Plath 2009).

Stammzellen definieren sich als kaum bzw. undifferenzierte Zellen, welche zur Selbsterneuerung sowie zur Ausdifferenzierung in unterschiedliche Gewebetypen befähigt sind. Man unterscheidet toti-, pluri-, multi- und unipotente Stammzellen. Embryonale Stammzellen können in Zellen aller drei Keimblätter sowie in Zellen der Keimbahn differenzieren. Im Gegensatz dazu können adulte Stammzellen nur gewebespezifische Zelltypen bilden. Bei der induzierten pluripotenten Stammzelle handelt es sich um eine meist mit Hilfe eines viralen Vektors reprogrammierte Zelle, die der embryonalen Stammzelle ähnelt. Der normale Differenzierungsablauf verläuft unidirektional von einer undifferenzierten Zelle zur differenzierten Zelle. Mit zunehmender Differenzierung verlieren die Zellen dabei meist ihre Fähigkeit zur Proliferation. Im Jahr 2006 konnte erstmals eine Induktion von Pluripotenz mittels retroviraler Transfektion nachgewiesen werden (Takahashi und Yamanaka 2006). Zellen konnten entgegen ihres Differenzierungsvorganges in pluripotente Zellen „rückverwandelt“ werden. In diesem Zusammenhang wurden Mäusembryo-Zellen und adulte Fibroblastenzellen in induzierte pluripotente Stammzellen umgewandelt. Diese induzierte Pluripotenz konnte mit Hilfe der Faktoren Oct4 (Nichols et al. 1998; Niwa et al. 2000), Sox2 (Avilion et al. 2003),

c-myc (Cartwright et al. 2005) und Klf4 (Y Li et al. 2005) herbeigeführt werden. Die mit diesen vier Transkriptionsfaktoren induzierte Pluripotenz wurde erstmals von Takahashi und Yamanaka (2006) durchgeführt. Sie erhielten daher den Namen „Yamanaka-Faktoren“.

Die Injektion dieser pluripotenten Stammzellen führte in Mäusen zu Teratomen, die Zellen aus allen drei Keimblättern enthielten. Damit wurde der Beweis erbracht, dass eine Reprogrammierung differenzierter Zellen möglich ist. Die Abb. 2 verdeutlicht den Ablauf der Reprogrammierung mittels Pluripotenzfaktoren.

Nachfolgende Arbeiten konnten zeigen, dass auch weniger Faktoren in der Lage sind, Pluripotenz in Zellen zu induzieren (Kim et al. 2008; Kim et al 2009 a; Kim und Sebastiano und et al. 2009 b ; Li et al. 2011; Tsai et al. 2010; Yuan et al. 2011). Rolf et al. (2012) konnten erstmals nachweisen, dass die Erzeugung von Pluripotenz in adulten Stammzellen auch auf natürlichem Wege möglich ist. Sie beschrieben eine Übertragung des Pluripotenzfaktors Oct4 von Stro-1⁺-mesenchymalen Stammzellen aus dem Hirschgeweih-Periost auf differenzierte Zellen ihrer Umgebung. Dabei wird Oct4 über Zell- zu Zellverbindungen, sogenannte *Nanotubes*, auf Nachbarzellen übertragen. Diese Zellverbindungen stellen vermutlich eine Basis der Zellkommunikation sowie der Zellmigration dar und bieten somit den Zellen die Möglichkeit, ihre Umwelt direkt zu beeinflussen (Zani und Edelman 2010). Dieser Mechanismus der direkten Übertragung von Pluripotenzfaktoren könnte auch bei der Tumorexansion und der Metastasenbildung eine wichtige Rolle spielen.

Ziel der Arbeit

Es war daher das Ziel der vorliegenden Dissertation, zu überprüfen, ob Tumorzellen und insbesondere die Stro-1⁺-Tumorzellen Transkriptionsfaktoren auf „gesunde“, differenzierte Zellen übertragen können. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass es sowohl bei Tumoren epithelialen als auch mesenchymalen Ursprungs Stro-1⁺-Zellen gibt, dass diese Zellen die sog. „Yamanaka-Faktoren“ exprimieren und in der Lage sind, diese Transkriptionsfaktoren (Oct4, Nanog, c-myc, Sox2, Klf4) auf Nichttumorzellen zu übertragen.

2 Material und Methoden

Als Tumorzellen wurden in den folgenden Versuchen eine ektodermale Karzinomzelllinie (Hep2-Zellen = humane Epitheliomzellen Typ 2) und eine mesenchymale Sarkomzelllinie (SAOS-Zellen = *sarcoma osteogenic cells*) verwendet. Zunächst sollte der Nachweis erbracht werden, ob die Zelllinien überhaupt in nennenswertem Umfang Stro-1⁺-Stamm- bzw. Vorläuferzellen enthalten.

Anschließend sollten die Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen nach Sortierung morphologisch beschrieben werden. Im folgenden Schritt wurden die Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen beider Tumorzelllinien mit Oct4-GFP-Promotorzellen kokultiviert. Hierbei handelte es sich um embryonale Mäusefibroblasten (MEF), die das *green fluorescent protein* (GFP) als Reportergen exprimieren und anschließend GFP synthetisieren, wenn auf sie Oct4 übertragen wurde. Parallel dazu sollte mit Hilfe der RT-PCR der Nachweis erbracht werden, dass die Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-myc*, *Klf4* und *Nanog* durch die entsprechenden Zellen exprimiert werden und ggf. sollte dann exemplarisch die Sequenzierung der Faktoren erfolgen.

In einer letzten Versuchsreihe wurden schließlich humane Gingivafibroblasten (HGF) mit Hep2- und SAOS-Zellen in Kokultur inkubiert, um in einem weiteren Schritt den Nachweis der Übertagung von Transkriptionsfaktoren zu überprüfen. Dazu wurden die HGF-Zellen mit GFP markiert, um sie nach der Inkubation mit den beiden Tumorzelllinien aus der Kokultur zu separieren.

Vor und nach Kokultur wurden die HGF mit RT-PCR auf die Expression der Pluripotenzfaktoren hin untersucht und zum Teil deren Sequenzierung vorgenommen. Die in den Versuchen verwendeten Geräte und Materialien sind in den A-Tabellen 1 bis 4 aufgeführt. Die *Primer*-Sequenzen für die Bestimmung der untersuchten Transkriptionsfaktoren sind in der Tabelle 2 genannt.

2.1 Material und Gerätschaften

Die Auflistung von Materialien, Chemikalien und Gerätschaften findet sich im Anhang. Der für die PCR verwendete Größenstandard und die *Primer* sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen. Die Plasmidkarten sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt.

Tabelle 1: Größenstandard (*Ladder*) und deren Hersteller

Ladder	Hersteller
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, life technologies, Darmstadt

Tabelle 2: Oligonukleotide (*Primer*) von 5 Transkriptionsfaktoren und *GAPDH*. Aufgeführt sind der Namen des Gens, die *Primer*, die Banden mit der Anzahl der Basenpaare [bp] und zugehörige *Primer*-Sequenzen.

Gen	for/rev Primer	Bande [bp]	Sequenz 5' → 3'
GAPDH	GAPDH for	218	CGA GAT CCC TCC AAA ATC AA
	GAPDH rev		GGA GGC ATT GCT GAT GAT CT
Sox 2	Sox2 II for	340	ACG TGA GCG CCC TGC AGT
	Sox2 II rev		AGG GGC AGT GTG CCG TTA
Oct4	Oct4 h&b for	335	CTG GGT TGA TCC TCG GAC CT
	Oct4 h&b II rev		TGA TGT CCT GGG ACT CCT C
c-myc	Myc h&b for	330	TAC TGC GAC GAG GAG GAG
	Myc H&b II rev		ACA GTC CTG GAT GAT GAT
Nanog	Nanog h&b for	275	CCA TGG ATC TGC TTA TTC
	Nanog h&b II rev		CAT TCT CTG GTT CTG GAA
Klf4	Klf4 h&b for	565	AAG GGA GAA GAC ACT GCG
	Klf4 h&bII rev		CTG CTG CGG CGG AAT GTA

Plasmidkarten

Die für die GFP-Markierung der HGF-Zellen eingesetzten Plasmide sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

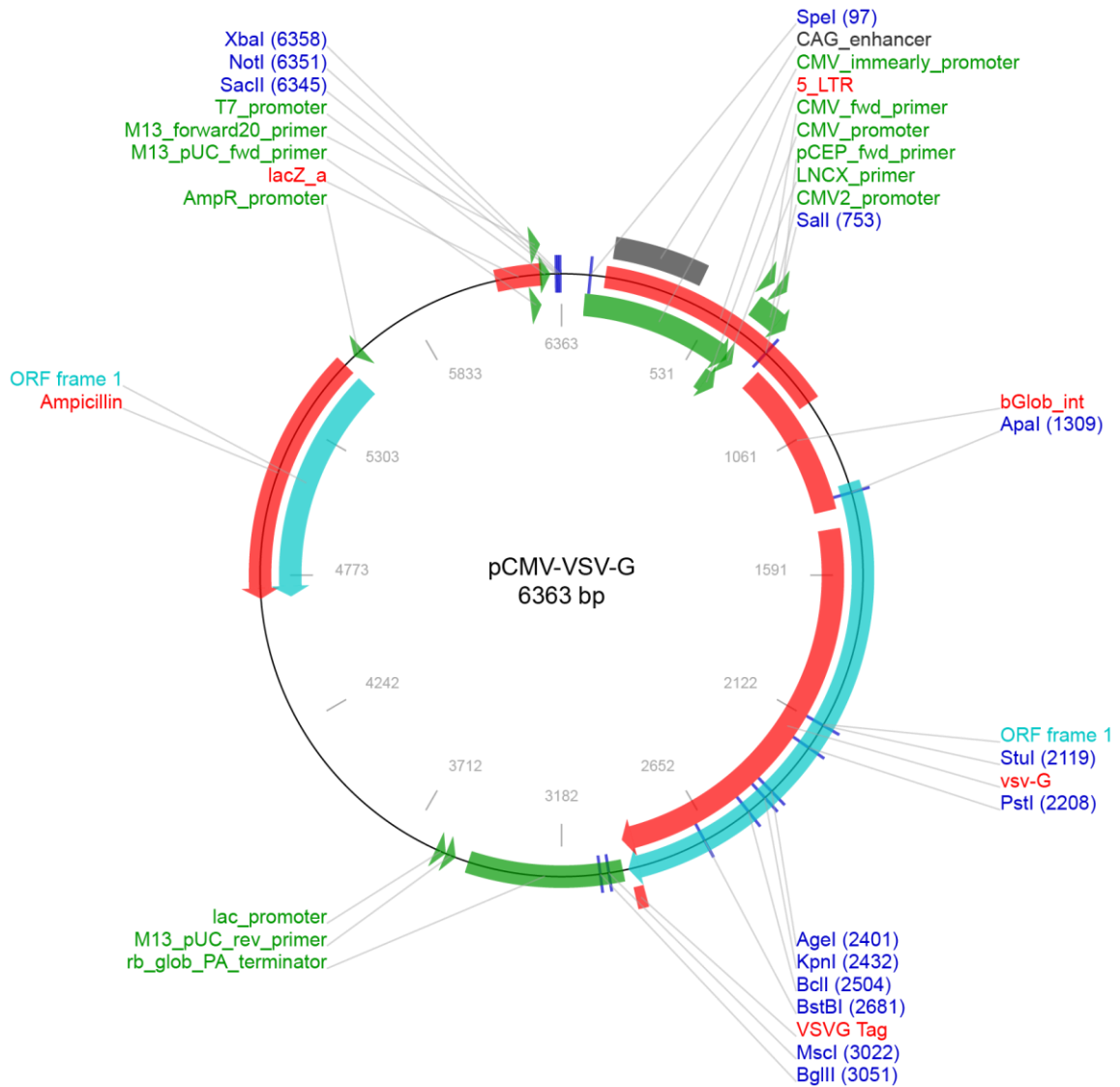


Abbildung 3: Plasmidkarte von pCMV-VSV-G (Geschenk von Weinberg B; Addgene # 8454) (Stewart et al. 2003) .

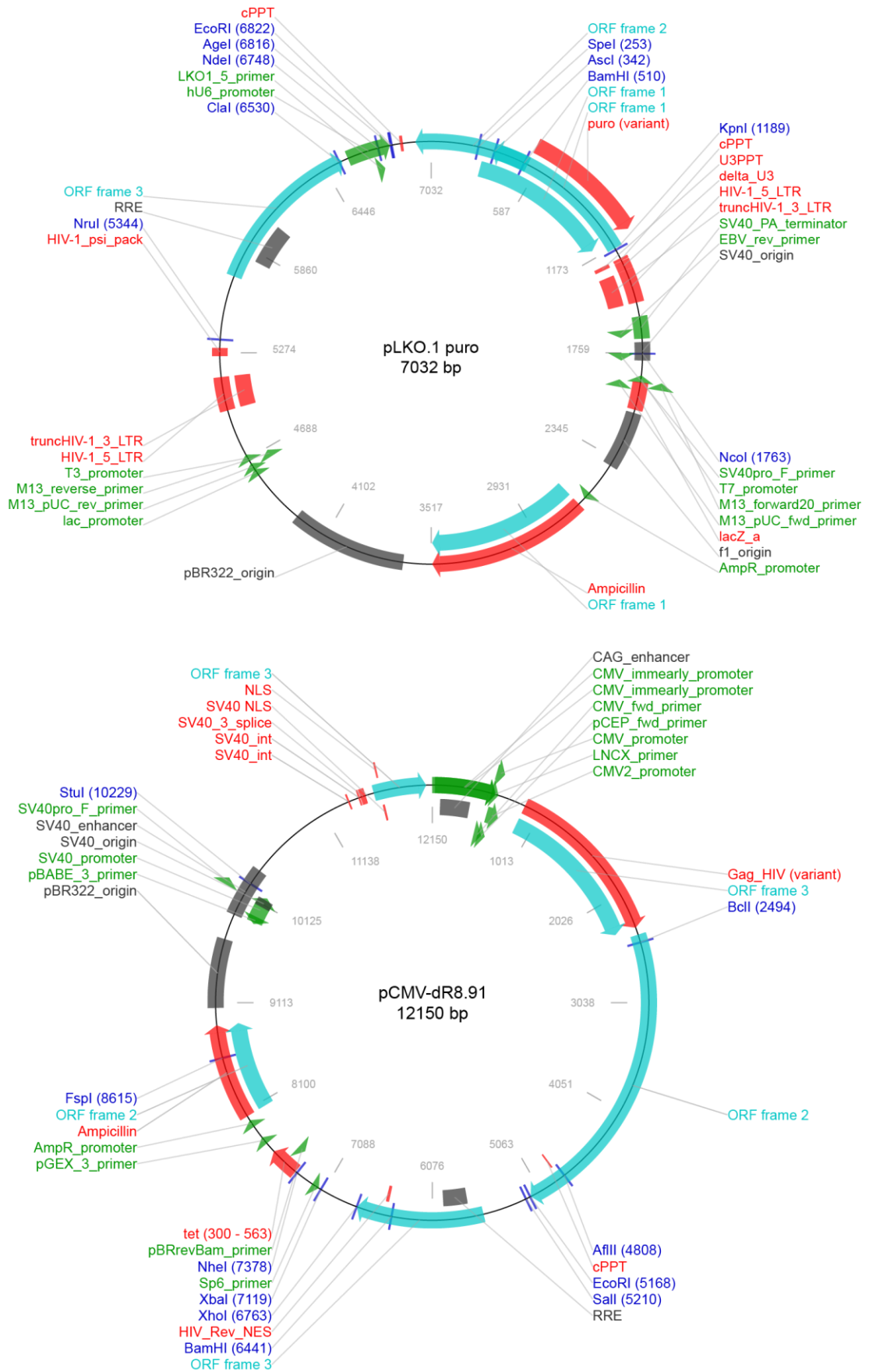


Abbildung 4: Plasmidkarten von pCMV-dR8.91 und pLKO.1 (Geschenk von Weinberg B; Addgene # 8453) (Stewart et al. 2003) .

2.2 Zellkulturen und Zelllinien

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden bei sterilen Bedingungen unter einer Werkbank (Biohazard Cleanair) durchgeführt. Verwendete adhärente Zelllinien sind im Handel erhältlich. Das Kultivieren der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Sanyo Electric Biomedical CO) unter konstanten, kontrollierbaren Bedingungen.

2.2.1 Zelllinien

Die eingesetzten Zelllinien, ihre Herkunft und die verwendeten Kulturmedien sind als Übersicht in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zelllinienübersicht. Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Zelllinien, deren Herkunft und die verwendeten Medien zur Zellaufzucht. Antibiotika waren nicht immer Bestandteil der Kulturmedien.

Zelllinie	Herkunft	Medium
SAOS	DSMZ	DMEM, 4,5 % Glc, (1 % P/S/G), 10 % FKS
Hep2	ECACC	DMEM, 4,5 % Glc, (1 % P/S/G), 10 % FKS
HGF	Cell-Lining Berlin	DMEM, 4,5 % Glc, (1 % P/S/G), 10 % FKS
Oct4-GFP MEF	Stemgent®	MEF-Medium: DMEM, 1 % NEAA, 1 % L-Glutamin, 0,1 % β -Mercaptoethanol, 10 % FKS
HEK293T	Cheong et al. 2006	DMEM, 1 % Glc, (1 % P/S/G), 10 % FKS

Die 1973 etablierte **Osteosarkom-Zelllinie (SAOS)** (Fogh und Trempe 1975, Fogh et al. 1977 a; 1977 b) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (DSMZ) bezogen. Die Zellen wurden in 75-cm²-Flaschen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in mit 4,5 g/l Glukose (Glc) angereichertem DMEM-Medium unter Zusatz von fetalem Kälberserum (10 %) sowie den Antibiotika Streptomycin, Penicillin und Gentamycin (je 1 %). Im Brutschrank (Sanyo Electric Biomedical CO) wurden die Zellen während ihres gesamten Wachstums unter konstanten Bedingungen (Temperatur 37 °C; 5 % CO₂ Anteil; Luftfeuchtigkeit 97 %) gezüchtet. Jeden zweiten Tag erfolgte unter strenger mikroskopischer Kontrolle der Mediumwechsel. Die Zellen wuchsen in den Kulturflaschen als *Monolayer* mit einer Verdopplungszeit von ca. zwei Tagen. Es handelt sich um spindelförmige Zellen, die schmale Fortsätze bildeten und im Verbund wachsen. Nach Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Um eine gleichmäßige Verteilung auf

neue Flaschen zu gewährleisten, erfolgte vor jeder Passage eine Überprüfung der Zellzahl mit dem CASY®.

Die **Hep2-Zellen** (European Collection of Cell Cultures, ECACC) sind humane Epitheliumzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms (Moore et al. 1955). Sie wurden aus Tumoren von bestrahlten und mit Kortison behandelten Ratten gewonnen, denen Gewebe eines epithelialen Karzinoms aus dem Larynx eines 56 Jahre alten Mannes injiziert wurde. Diese Zelllinie besitzt Charakteristika von HeLa-Zellen (Henrietta Lacks, Zervixkarzinom-Zellen). Bei den Hep2-Zellen handelt es sich um rundliche bis eckige Zellen mit einer Verdopplungszeit von ca. zwei Tagen. Die Zellen wurden in der Kultur wie die SAOS-Zellen behandelt.

HEK293T-Zellen (Cheong et al. 2006) (Human Embryonic Kidney293T) sind adhärenzte humane embryonale Nierenzellen. Sie sind relativ einfach zu transfizieren und dienen der Lentivirus-Produktion, mit deren Hilfe die GFP-Transfektion der HGF-Zellen vorgenommen wurde. Die Anzucht dieser Zellen erfolgte analog zur Aufzucht der SAOS-Zellen.

Die **Oct4-GFP embryonalen Mausfibroblastenzellen** (Stemgent®) besitzen ein GFP-Reportergen (Brambrink et al. 2008), das auf Exon Nr. 5 im endogenen Oct4 Locus liegt. GFP (*green fluorescent protein*) wurde zuerst in einer Quallenspezies (*Aequorea victoria*) entdeckt und wird mittlerweile zur Untersuchung vieler biologischer sowie medizinischer Fragestellungen angewendet. Die Kultivierung erfolgte mit dem speziell für diese Zellen vorgeschriebenen MEF-Medium. Dabei handelt es sich um DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum, 1 % nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA), 1 % L-Glutamin (200 mM), 0,1 % β -Mercaptoethanol (55 mM). Die Zellen wurden ausgesät. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Passage erfolgte nach Erreichen einer ca. 80 %-igen Konfluenz. Eine mikroskopische Kontrolle der Zellen wurde täglich durchgeführt.

Die **humanen Gingivafibroblasten (HGF-Zellen)** (HGF, Cell-Lining, Berlin) sind mesenchymale Zellen mit vielen verschiedenen Funktionen im Körper, z.B. die Bildung von extrazellulärer Matrix sowie die Wundheilung (Poggi et al. 2003; Tanaka et al. 2003). Sie besitzen eine spindelartige Morphologie. Die Fibroblasten wurden nach dem Protokoll der SAOS-Zellen kultiviert.

2.2.2 Zellkultur

Die betreffenden Zelllinien wurden in den oben genannten Medien inkubiert und ihre Entwicklung alle zwei Tage unter dem Mikroskop (Axiovert 35, Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos) auf Vitalität, Populationsdichte der Zellen sowie auf mögliche Kontaminationen hin überprüft. Der Mediumwechsel erfolgte je nach Proliferationsgeschwindigkeit. Dazu wurden das entsprechende Medium sowie PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*) auf 37 °C erwärmt. Das verbrauchte Medium wurde aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Flasche im Anschluss mit 10 ml PBS-Puffer gespült. Danach wurde der Puffer wieder abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

Das **Passagieren** der Zellen wurde nach Erreichen einer ca. 80 %-igen Konfluenz durchgeführt, weil ein zu dichter Zellbewuchs die Alterung der Zellen fördert. Zusätzlich kann es durch Anreicherung von Stoffwechselprodukten zum Tod der Zellen kommen. Zur Vorbereitung des Passagierens wurden alle verwendeten Substanzen auf 37 °C vorgewärmt. Danach wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt. Im nächsten Schritt erfolgte das Waschen der konfluenten Zellkulturflasche mit 10 ml PBS, welches wiederum abgesaugt wurde. Mit PBS werden Proteinaseinhibitoren entfernt, die sich im Zellüberstand befinden und Trypsin inaktivieren. Im Anschluss wurden die Flaschen mit 2 ml der Endopeptidase Trypsin beschickt. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen von etwa 5 min im Brutschrank (Sanyo Electric Biomedical CO). Das Ablösen der adhärennten Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet und ggf. durch leichtes Abklopfen der Kulturflasche verbessert.

Die **Trypsinreaktion** wurde mit 10 ml DMEM-Medium abgestoppt. Durch mehrmaliges Resuspendieren der Zellen gegen die Kulturflaschenwand konnten Zellaggregate vereinzelt werden. Anschließend wurden die Zellen bei 300 • g zentrifugiert und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Die Subkultivierung erfolgte durch Aliquotierung der Tochterzellen in neue Zellkulturflaschen. Zur Bestimmung der Zellzahl und Berechnung der Aliquoten wurde das CASY®-System verwendet. Je nach Zellart wurde die Zellanzahl der Tochterkultur gewählt und mit frischem Medium in neue Flaschen gesät.

Zur Aufbewahrung und nahezu unbegrenzten Lagerung von Zelllinien wurde eine **Kryokonservierung** durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsinisiert. Die Trypsinreaktion wurde mit DMEM-Medium abgestoppt. Danach wurden die Zellen in ein 50-ml-*Falcontube* überführt und für 5 min bei 1200 rpm (*revolutions per minute*)/ 300 · g herunterzentrifugiert. Zum Einfriervorgang wurden Kryoröhrchen mit 100 µl DMSO (10 %) (Dimethylsulfoxid) vorbereitet. Bei DMSO handelt es sich um ein organisches Lösungsmittel, welches die Kristallbildung in der Zelle und somit deren Zerstörung verhindert. Es darf jedoch nur in geringer Konzentration eingesetzt werden, da sonst die zytotoxische Wirkung überwiegt. Die Zellen wurden pro Röhrchen in 900 µl FKS (fetales Kälberserum) resuspendiert und in die Kryoröhrchen überführt. Zur Verhinderung einer Kristallbildung wurden die Zellen langsam mit einer Temperaturabsenkung von einem Grad Celsius pro Minute eingefroren. Um dies zu gewährleisten, wurden die Zellen in einem *Freezing Container* (NALGENE®) für eine Stunde in den Gefrierschrank (Liebherr Hausgeräte) bei -20 °C gestellt. Der *Freezing Container* enthält Isopropanol, welches ein kontrolliertes Einfrieren ermöglicht. Danach wurden die Zellen in einen Gefrierschrank (Sanyo Electric Biomedical CO) mit einer Temperatur von -80 °C überführt und schließlich in einem dafür vorgesehenen Stickstofftank gelagert.

Die **Revitalisierung** der Zellen erfolgte durch die Entnahme der entsprechenden Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank. Die Röhrchen wurden langsam aufgetaut und in ein *Falcontube* mit dem entsprechenden Medium, welches vorher erwärmt wurde, überführt. Um die Chemikalienrückstände des Einfrierens zu entfernen, wurde die Zellsuspension herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen in vorbereitete Kulturflaschen mit 10 ml Medium ausgesät.

CASY® ist ein Gerät zur automatischen **Zellzahlbestimmung**. Die CASY®-Technologie beruht auf der Partikelmesstechnik nach dem Widerstandsprinzip und der Pulsflächenanalyse. Durch die Pulsflächenanalyse können Zellen gezählt und analysiert werden. Das Gerät setzt eine Probe einem definierten elektrischen Feld aus und arbeitet mit dem Stromausschlussverfahren, welches sich die Isolatorwirkung intakter Zellmembranen zu Nutze macht. Die Integrität der Zellmembran wird dabei zum Vitalitätsparameter erklärt. Die Zellgröße ist proportional zur Impulshöhe. Ist eine Zelle *devital*, so ist deren Zellmembran defekt. Der gemessene Impuls des CASY® ist im Vergleich zur lebenden Zelle geringer. Im

Falle einer toten Zelle wird nur noch das Zellmatrixvolumen erfasst, welches ca. dem Zellkernvolumen entspricht. Da eine Zelle nicht kleiner als ihr Zellkern ist, können *avitale* von *vitalen* Zellen anhand der Impulshöhe unterschieden werden.

Je 100 μl einer Probe wurden auf 10 ml CASY[®]-Puffer gegeben und gut gemischt. Das CASY[®]-System saugt dann eine definierte Menge von 400 μl über eine Messkapillare an und bestimmt die Zellanzahl. Die Probe wird mit einer konstanten Geschwindigkeit durch eine Messkapillare mit definiertem Widerstand injiziert. Die Zellanzahl pro Milliliter wird zusätzlich in Prozent erfasst. Des Weiteren wird der Anteil an Debris und Zellaggregaten durch das CASY[®] ermittelt. Über die Messdaten konnte nachträglich die Gesamtzellzahl der Probe errechnet werden. Diese Ergebnisse wurden zu statistischen Zwecken sowohl bei der RNA-Isolation als auch für die Proliferationsversuche verwendet. Durch die automatische Auszählung konnten reproduzierbare Ergebnisse generiert werden.

2.3 Zellsortierung

Zur Zellsortierung wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Methode (1) war eine Sortierung nach dem Oberflächenmarker STRO-1 mit Hilfe eines Magnetfeldes. Methode (2) bediente sich der unterschiedlichen Emissionsspektren. So konnten GFP-transfizierte von nicht transfizierten Zellen separiert werden. (1) Bei der Sortierung nach dem Antikörper Stro-1 wurde die **MACS[®]** (*magnetic cell separation*, Miltenyi Biotec)-Technologie verwendet. Die Zellsortierung wird dabei magnetisch durchgeführt. Die Stro-1⁺-Zellen wurden mit MACS[®] *MicroBeads* markiert. Daraufhin wurden alle Zellen einem magnetischen Feld ausgesetzt. Durch Spülungen wurden die nicht markierten Zellen von den markierten, magnetischen Zellen separiert. Die positiven Zellen konnten nun durch Entfernung des Magnetfeldes gewonnen werden. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte durch Trypsinierung und Herstellung eines Zellpellets mittels Zentrifugation. In einem Waschschrift folgte die Reinigung des Zellpellets mit einem Milliliter speziellem MACS[®]-Puffer. Nach Resuspension des Pellets wurden die Zellen 10 min bei 200 $\cdot g$ (Erdbeschleunigung) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellzahl wurde mit CASY[®] bestimmt. Danach wurde die Probe je nach Zellzahl in PBS (*phosphate buffered saline*) gelöst (200 μl bei Zellzahlen $< 12 \cdot 10^6$, 500 μl bei Zellzahlen $> 12 \cdot 10^6$). Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 μl (10 μl bei $> 12 \cdot 10^6$) Stro-1 versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubationsende wurde die Probe in 2 ml MACS[®]-Puffer eluiert und für 5 min bei

250 · g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde in 80 µl (200 µl bei $>12 \cdot 10^6$) MACS[®]-Puffer gelöst. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 4 °C mit 20 µl (50 µl bei $>12 \cdot 10^6$) IgM (MACS[®] *MicroBeads*). Die Probe wurde wiederholt mit 2ml MACS[®]-Puffer für 5 min bei 250 · g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Stro-1⁺-Zellen waren nun magnetisch markiert und wurden in 500 ml MACS[®]-Puffer aufgenommen. Die entstandene Zellsuspension wurde in vorbereitete Säulen (LS MACS[®] Separation Columns) überführt und einem Magnetfeld ausgesetzt. Die Säulen wurden erneut mit Puffer gespült und die Stro-1⁻-Zellen in Fraktionen aufgefangen. Nach Entfernung des Magnetfeldes wurden die Säulen unter Druck gespült und die Stro-1⁺-Zellen in einer neuen Fraktion aufgefangen. Die jeweiligen Fraktionen wurden in neue Kulturflaschen überführt und mit Medium versetzt. Nach Erreichen von Konfluenz konnten die erhaltenen Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen für die molekularbiologischen Versuche vorbereitet werden.

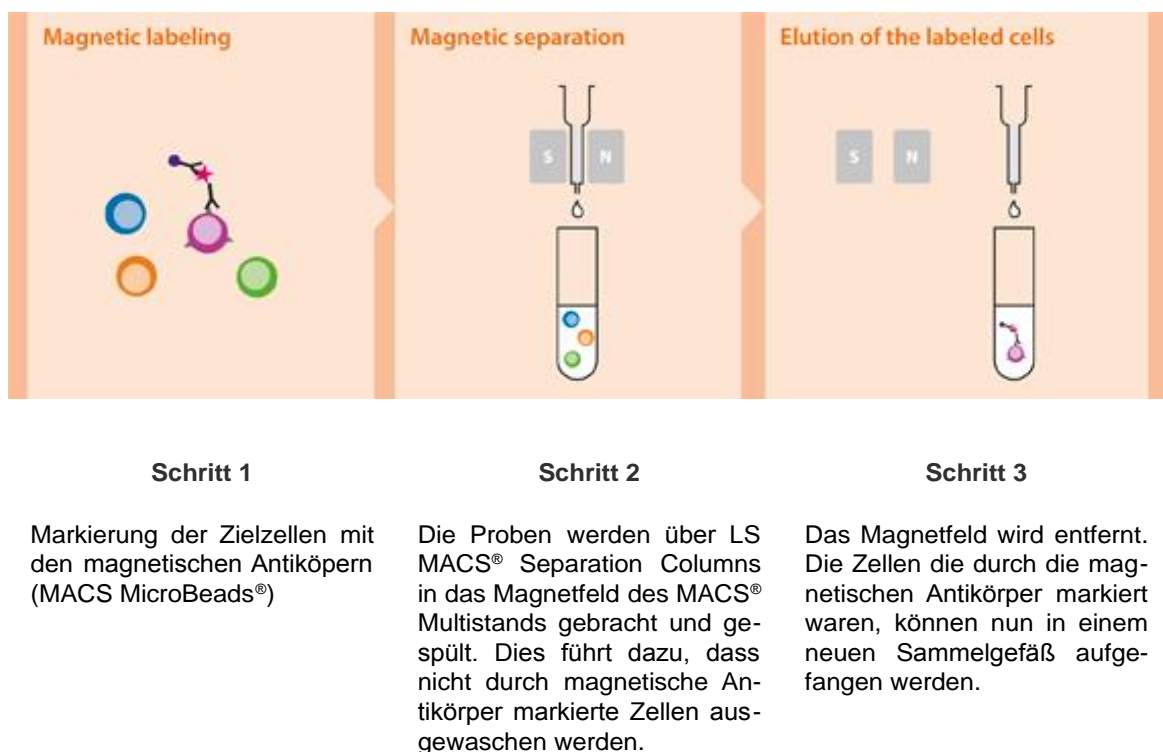


Abbildung 5: Schematische Darstellung der MAC[®]-Sortierung. Die Schritte 1-3 verdeutlichen den Ablauf der Separation mittels Magnetfeld (modifizierte Grafik nach Miltenyi Biotec[®]).

(2) Zur Ermittlung der Anzahl von erfolgreich mit GFP-transfizierten HGF-Zellen wurde die Durchflusszytometrie, die **FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting)**, gewählt (Abbildung 6). Bei der FACS-Analyse wurden die Zellen durch eine dünne Kapillare vereinzelt und mit einem Laserlicht bestrahlt. Die unterschiedliche Emission des Laserlichts wurde gemessen und ausgewertet. Die Sortierung der Zellen erfolgt durch eine gezielte Umpolarisation. Die Zellen durchlaufen dann ein elektrisches Feld und werden je nach Ladung in verschiedene Gefäße sortiert. Nach einer Woche Kokultivierung mit Tumorzellen erfolgte eine zweite Sortierung GFP-positiver HGF-Zellen. Um die Sortierung vorzubereiten, wurden die Zellen in einem Milliliter Medium resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte HGF-Zellen, die in einem Milliliter Medium analysiert wurden.

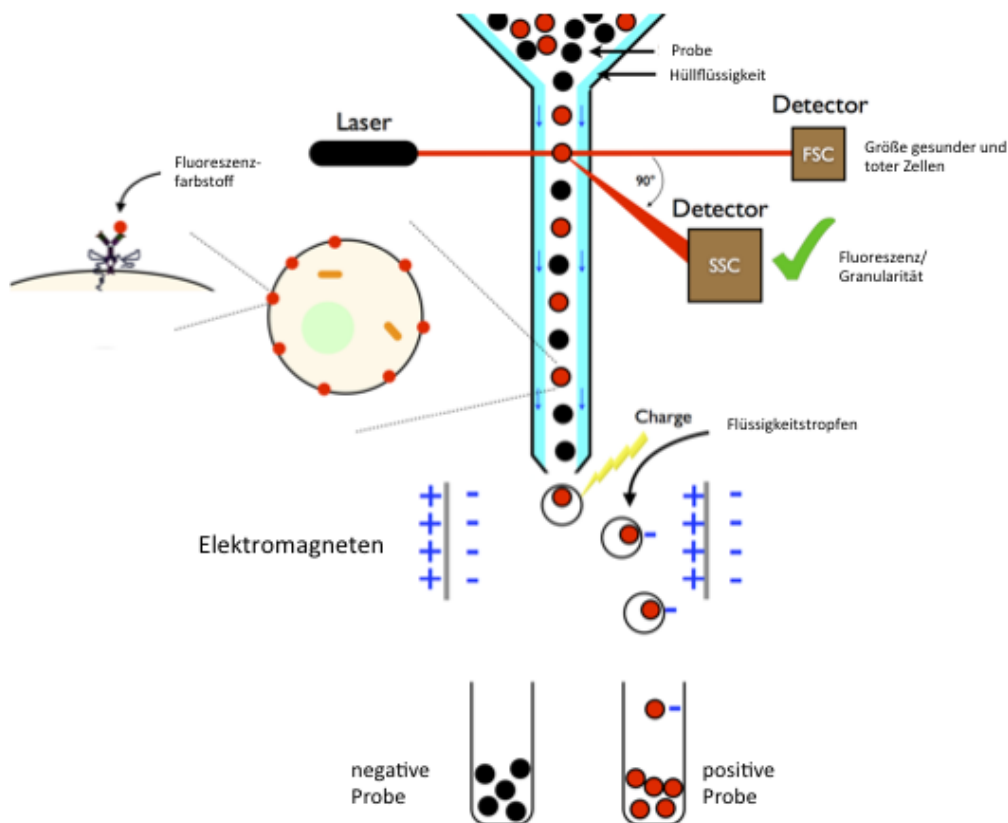


Abbildung 6: Schematische Darstellung des FACS-Geräts mit beispielhaftem Ablauf einer Sortierung (modifizierte Grafik nach Sabban 2011).

2.4 Kokultivierung

Der Versuch wurde mit vier Kammerplatten (Imaging Chamber 2, Zell-kontakt GmbH) durchgeführt. Sowohl NH (*nonhematopoietic*)- als auch MEF-Medium kam in diesem Versuch zur Anwendung. Bei dem NH-Expansions-Medium handelt es sich um ein spezielles Medium zur Kultivierung von Stammzellen. Alle Medien wurden ohne Antibiotikum verwendet. Gerade sterische Antibiotika können zu einer Fluoreszenz unter dem Mikroskop führen und würden so die Ergebnisse der mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen verfälschen. Am Tag 0 wurden je 10 000 Oct4-GFP MEF-Zellen auf zweimal 6-*Wells* gegeben. Nach 24 h (1 Tag) erfolgte die Kokultivierung mit etwa 30 000 SAOS- bzw. Hep2- Zellen pro Kammer. Die Kammeranordnung kann Abbildung 7 entnommen werden.

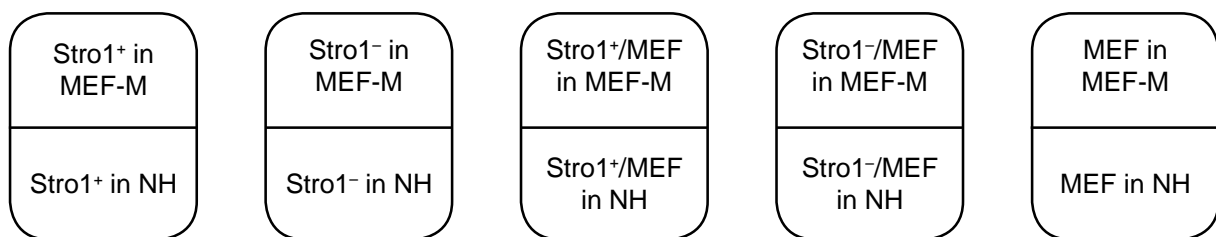


Abbildung 7: Kammeranordnung der Kokulturen und Kontrollen der Tumorzelllinien SAOS und Hep2 mit Oct4-GFP MEF-Zellen (MEF). Sie wurden in zwei Medien kokultiviert, dem MEF-Medium (MEF-M) und dem NH-Medium (NH). Die Tumorzellen wurden vorher in Stro-1⁺ (Stro1⁺)- und Stro-1⁻ (Stro1⁻)-Zellen sortiert.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer hochauflösenden Schwarz-Weiß-Kamera und den entsprechenden Filtersätzen des Mikroskops (Axiovert 200M, Carl Zeiss Vision GmbH) durchgeführt. Die Exzitation erfolgte bei 365 nm (Filtersatz (FS) 01) und 440-450 nm (FS10) und mit einer Emission von 397 nm (FS01) und 515-565 nm (FS10). Dabei handelt es sich um das Exzitationsspektrum des GFPs. Die Wellenlängen und somit die mikroskopischen Filtersätze wurden entsprechend des Exzitations- und Emissionsspektrums des GFPs gewählt (Abbildung 8). Den Grauwertstufen der Schwarz-Weiß-Aufnahmen wurden durch das PC-Programm Pseudokolorierungen zugewiesen. Beginn der Fluoreszenzaufnahmen war 24 h nach Versuchsansatz. Einstellungen wie Belichtung und Kontrast wurden in der Fotoreihe annähernd konstant gehalten. Die Belichtung der Fluoreszenzaufnahmen für den

grünen Kanal betrug 6000 ms. Hingegen betrug die Belichtungszeit für die als Schwarzweiß-Bilder dokumentierten Durchlicht-aufnahmen 800 ms.

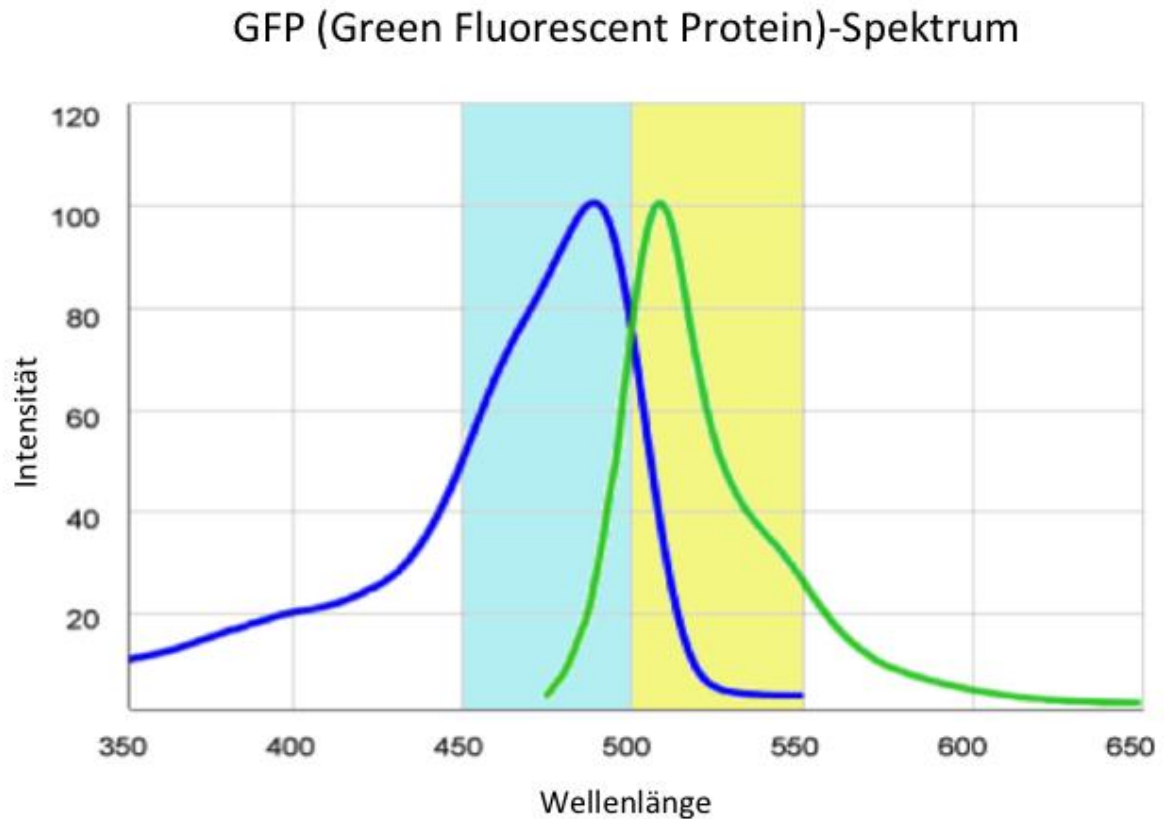


Abbildung 8: Exzitations- und Emissionsspektrum von GFP. Die Grafik zeigt das Anregungsspektrum von GFP mit aufgetragener Intensität gegen die Wellenlänge in nm (modifizierte Grafik nach Cox 2012). Exzitation (blau), Emission (grün). Der Filtersatz des verwendeten Fluoreszenzmikroskops arbeitet mit der Wellenlänge 450-490 nm (Exzitation) und 515-565 nm (Emission). FS10: 450-490nm (Exzitation), 515-565nm (Emission).

2.5 Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-RNA bzw. -DNA in eukaryotische Zellen. In diesem Fall geschieht dies mit Hilfe der Lipofektion. Es wurden lentivirale Vektorpartikel mittels Vesikel in die Zielzellen durch Membrantransfusion eingeschleust. Lentivirale Vektoren werden aus dem Humanen-Immundefizienz-Virus hergestellt. Es sind meist mehrere Plasmide notwendig, um die Expression von verschiedenen Genen in den Empfängerzellen (HEK293T-Zellen) hervorzurufen (Abbildung 9). Diese produzieren dann Viruspartikel, die zur Transfektion der Zielzelle (HGF-Zelle) verwendet werden.

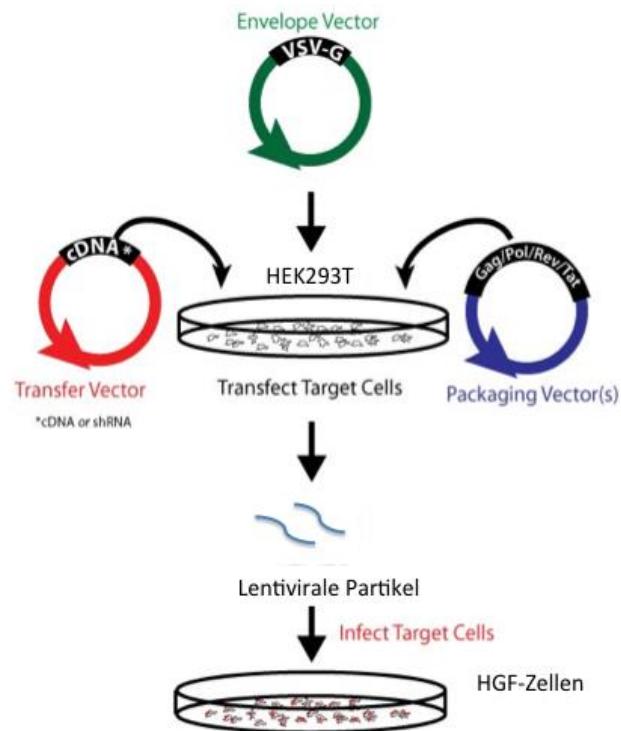


Abbildung 9: Schema des Transfektionsablaufs mit drei Plasmiden. Die HEK293T-Zellen produzieren lentivirale Partikel. Sie werden verwendet, um die HGF-Zellen zu transfizieren (modifizierte Grafik von Addgene nach Dull et al. (1998); Naldini et al. (1996) und Zufferey et al. (1998)).

Um einzelne Zelltypen besser unterscheiden zu können, wurden HGF-Zellen mittels viraler Transfektion GFP in ihr Genom eingebracht. Die Transfektion mit lentiviralen Vektoren wurde unter Berücksichtigung aller Sicherheitsvorschriften im S2-Labor durchgeführt. Zur Gewinnung lentiviraler Partikel wurden die HEK293T-Zellen (ca. $2,0 \cdot 10^5$ Zellen/ml) in 2,5 ml DMEM-Medium (10 % FKS ohne Antibiotika) auf 6-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert. Sobald eine Konfluenz von 50 - 70 % erreicht war, erfolgte die Transfektion mittels folgendem Plasmidmix:

Tabelle 4: Plasmidübersicht

Plasmid	Menge
pCMV-ΔR8.91	500 ng
pMD.G-VSV-G	50 ng
pLKO.1-GFP	500 ng
OPTI-MEM (Invitrogen)	30 μ l

Zur Transfektion wurde FuGene 6 (Roche) verwendet. Die Plasmide werden durch Lipofektion in die HEK293T-Zellen eingebracht.

Der Transfektionsansatz bestand aus 4 µl FuGene 6 und 16 µl OPTI-MEM (Invitrogen), welches zum Gesamtansatz gegeben wurde. Die Zugabe von FuGene 6 zu OPTI-MEM erfolgte tropfenweise. Danach wurde der Ansatz vorsichtig durch Schwenken vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Plasmidmix tropfenweise dem Transfektionsansatz zugeführt und erneut durch leichtes Schwenken gemischt. Nach einer 20 - 30 minütigen Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix tropfenweise auf die HEK293T-Zellen gegeben. Die Zellen wurden 16 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix gegen je 2,5 ml DMEM (10 % FKS, 1 % P/S, 1 % BSA) ausgetauscht und dann für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von BSA (*bovine serum albumin*) erhöhte die Ausbeute an Viruspartikeln im Überstand. Der Überstand mit den darin enthaltenen Viruspartikeln konnte abgenommen werden und wurde durch 2,5 ml frisches Medium ersetzt. Das Gemisch aus Partikeln und Medium wurde 5 min bei 1250 rpm zentrifugiert, um es von überschüssigen HEK293-Zellen zu reinigen. Nach erneuter 24-stündiger Inkubation, wurde der Arbeitsschritt wiederholt. Die Medium-Viruspartikel konnten dann direkt weiterverwendet werden oder wurden zur längeren Aufbewahrung bei - 80 °C eingefroren. Die HEK293T-Zellen wurden verworfen.

Die HGF-Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät. Nach Erreichen einer ca. 70 %-igen Konfluenz wurde der vorbereitete virale Überstand im Verhältnis 1:1 mit Medium vermischt und je 1 ml auf jedes *Well* gegeben. Zusätzlich wurden Polybene in der Endkonzentration von 10 µg/ml auf die *Wells* gegeben, um die Virus-Zielzell-Bindung zu verbessern. Die virale Infektion erfolgte durch *Spin Inoculation* für zwei Stunden bei 2500 rpm (1350 · g). Anschließend wurden die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Diese Prozedur wurde am folgenden Tag wiederholt. Dann wurde das Viruspartikelgemisch abgesaugt und verworfen. Um den Transfektionserfolg zu überprüfen, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) nach GFP sortiert und für Kokultivierungsversuche weiterverwendet.

2.6 Molekularbiologische Methoden

In diesem Versuchsaufbau wird eine abgewandelte Form der PCR angewandt, die RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR). Es handelt sich dabei um den Nachweis von RNA, also der Expression von spezifischen Genen. Dazu wird RNA aus Zellen isoliert, die dann in cDNA (*complimentary DNA*) umgeschrieben wird. Im Anschluss erfolgt die Vervielfältigung der cDNA mittels zweier spezifischer *Primer*. Sie beginnt mit der Denaturierung der DNA, so dass zwei Einzelstränge entstehen, an welche die *Primer* binden. Die Verlängerung der DNA-Abschnitte geschieht durch die DNA-Polymerase. In mehreren Zyklen wird so ein spezifisches DNA-Fragment vermehrt. Das Produkt kann anschließend durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Die schematische Darstellung der PCR kann der Abbildung 10 entnommen werden.

2.6.1 RNA-Isolation und cDNA-Herstellung

Zur Bestimmung der Expression eines Gens in Zellen oder Geweben musste die RNA zunächst isoliert werden. Die Isolation erfolgte mit dem (1) RNeasy[®]Mini Kit (Qiagen[®]) und bei sehr geringer Zellanzahl mit dem (2) NucleoSpin[®]RNA XS-Kit (Macherey-Nagel).

(1) Protokoll zur RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy[®]Mini Kits (Qiagen[®]). Vor der RNA-Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, je circa 10^6 Zellen in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und das Zellpellet bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Zelllyse wurde der RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol versetzt. Je nach Zellanzahl wurden $350\text{ }\mu\text{l}$ ($<5\cdot 10^6$) oder $600\text{ }\mu\text{l}$ ($5\cdot 10^6$ - $1\cdot 10^7$) des RLT-Puffermixes auf das Zellpellet gegeben und für eine Minute gemischt. Die Zellsuspension wurde dann auf die QIAshredder-Säulen gegeben und zwei Minuten bei 10 000 rpm (9300·g) zentrifugiert. Das aufgefangene Zelllysate wurde je nach Ausgangszellanzahl mit Ethanol (70 %) (Verhältnis 1:1) suspendiert, auf eine RNeasy[®]Spin-Säule pipettiert und erneut für 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die RNA war in der Säule gebunden und der Überstand konnte verworfen werden. Anschließend wurde RW1-Puffer zu gleichen Teilen auf die Säule gegeben und für 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Um Kontaminationen durch genomische DNA zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ DNase mit $70\text{ }\mu\text{l}$ RDD-Puffer gemixt. Das Gesamtvolumen wurde zum Verdau möglichst im Zentrum auf die Säulen

aufgetragen. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach abgelaufener Inkubationszeit erfolgte ein Waschschriff mit 700 µl RW1-Puffer, der auf die Säulen gegeben wurde. Die Säulen wurden 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Dies diente der Entfernung vorhandener DNase-Reste. Dann wurden die Säulen mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die präparierten Säulen wurden wiederum 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert und dann ein zweites Mal für eine Minute bei voller Drehzahl zentrifugiert. Dies diente der Entfernung von Pufferrückständen. Zum Auffangen des Eluats wurden die Säulen auf 1,5-ml-Eppendorftubes überführt und in zwei Schritten mit je 20 µl RNase *free water* versetzt und eine Minute bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die aufgereinigte RNA-Probe wurde nun in den Eppendorftubes für Folgeversuche verwendet. Nach Bestimmung des RNA-Gehaltes (mit NanoDrop) wurde sie weiter in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt.

(2) Protokoll zur RNA-Isolation mit Hilfe des NucleoSpin[®]RNA XS-Kits (Macherey-Nagel). Dieses Kit ist geeignet, RNA von Zellzahlen zwischen 100 bis $1 \cdot 10^5$ zu isolieren. Es kam bei der RNA-Isolation GFP-transfizierter HGF-Zellen zur Anwendung. Das Homogenisieren und Lysieren der Zellen erfolgte mit 100 µl RA1-Puffer und 2 µl TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin). Danach wurde das Gemisch zweimal für 5 s geschüttelt. Nun erfolgte die Einstellung der Bindungskonditionen durch die Zugabe von 100 µl Ethanol (70 %), der durch Auf- und Abpipettieren mit der Probe vermischt wurde. Anschließend wurde das Lysat auf die NucleoSpin[®]-Säulen gegeben, 30 s bei 11 000 rpm (10230·g) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Säule zu entsalzen, wurden 100 µl MDB (*membrane desalting buffer*) auf die Säule gegeben und erneut 30 s bei 11 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum DNA-Verdau wurden 3 µl DNase mit 25 µl *Reaction Buffer* vermischt und auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem DNA-Verdau folgten drei Waschschriffe. Im ersten Waschschriff wurden 100 µl RA2-Puffer auf die Säule pipettiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben 30 s bei 11 000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurden sie zweimal mit RA3-Puffer gewaschen. Dafür wurden 400 µl RA3-Puffer auf die Säulen gegeben, 30 s bei 11 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden 200 µl RA3-Puffer auf die Proben gegeben und 2 min bei 11 000 rpm zentrifugiert. Zum Auffangen des Eluats wurden die Säulen in 1,5-ml-Eppendorftubes

überführt und in zwei Schritten mit je 20 µl RNase free water versetzt analog zum RNeasy® Mini Kit-Protokoll (Qiagen®) und eine Minute bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die Probe konnte in den Eppendorftubes aufgefangen werden. Nach Bestimmung des RNA-Gehaltes (mit NanoDrop) wurde sie weiter in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt.

Tabelle 5: cDNA-Ansatz

cDNA Ansatz	Volumen [µl]
5x iScript® reaction mix	4
iScript® reverse transcriptase	1
Nuclease-free water	x
RNA template (100 ng - 1 µg RNA)	x
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6: Thermocycler-Programm für cDNA

Thermocycler Programm	Temperatur [°C]
Lid	100
5min	25
30min	42
5min	85
Pause	4

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurde die Methode der reversen Transkription genutzt. Hierbei wurde das iScript® cDNA Synthesis Kit (BIO RAD) verwendet. Zum Beginn der Synthese benötigt die DNA-Polymerase *Primer*. Dabei handelt es sich um oligo(dt) und *random hexamer Primer*. Diese führen zur Anlagerung der reversen Transkriptase. Es erfolgte zunächst die Synthese eines komplementären cDNA-Stranges von der mRNA-Matrize (*messenger-RNA*). Um doppelsträngige DNA zu erhalten, wird die mRNA mittels RNase H verdaut. Das entstandene cDNA-Produkt kann nun weiter für die PCR verwendet werden. Die pipettierten Volumina und der cDNA-Ansatz können den Tabellen 5 und 6 entnommen werden.

2.6.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte, um sie später durch Gelelektrophorese nachzuweisen. Die DNA-Abschnitte werden durch eine Polymerase, die ihre Synthese an speziellen *Primern* beginnt, vervielfältigt.

Gearbeitet wurde mit dem Phusion[®] Mastermix mit HF-Puffer. Dieser enthält eine spezielle Phusion[®] DNA-Polymerase, bei der es sich um ein *Pyrococcus-like*-Enzym handelt, welches mit einer speziellen Domäne zur Reaktionsbeschleunigung ausgestattet ist. Alle Nucleotide befinden sich ebenfalls bereits im Master Mix. Lediglich die *Primer*, das *Template* und Wasser müssen für die PCR-Reaktion hinzugefügt werden. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wird das *housekeeping*-Gen *GAPDH* verwendet. Die Genexpression von *GAPDH* wird bei jeder PCR mitbestimmt. *GAPDH* sollte dann auf dem Agarosegel eine Bande bei 218 bp besitzen. Pipettierschema und Thermocycler-Programm können den Tabellen 7 bis 9 entnommen werden.

Mit der PCR-Reaktion sollten die Proben auf die Expression der Gene *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *c-myc* und *Klf4* untersucht werden. ***Oct4*** (*Octamer binding transcriptionfactor 4*), ebenfalls unter den Synonymen POU5F1 oder MGC22487 bekannt, ist ein Transkriptionsfaktor, der in Stammzellen und Krebszellen zu finden ist (Nichols et al. 1998; Niwa et al. 2000). ***Sox2*** steht als Abkürzung für „sex determining region Y (SRY)- box 2“ (Collignon et al. 1996). Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsfaktor, der in embryonalen und neuronalen Stammzellen nachgewiesen wurde (Komitova und Eriksson 2004). ***Klf4*** (Krüppel-like Faktor 4) ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Identifizierung von Stammzeleigenschaften genutzt wird. Er kann sowohl als Tumorsupressor- als auch als Onkogen fungieren (Ghaleb et al. 2005). ***C-myc*** ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor für ein Protoonkogen bei dem vermutet wird, dass es an der Regulierung der Expression von 15 % aller Gene beteiligt ist (Gearhart et al. 2007). Er beeinflusst die Zellteilung, das Zellwachstum und die Zellapoptose. ***Nanog*** ist ein Transkriptionsfaktor, der für ein Protein mit einer Homeodomäne kodiert. Er wurde *in vitro* sowohl in embryonalen Stammzellen als auch in embryonalen Tumorzellen nachgewiesen (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003)

Tabelle 7: *Annealing*-Temperatur der Transkriptionsfaktoren. Angabe der Gene, *Primer*, *Annealing*-Temperaturen (Ann. Temp.) und Zyklen.

Gen	For Primer	Rev Primer	Ann. Temp.[°C]	Zyklen
GAPDH	GAPDH for	GAPDH rev	50	40
Sox 2	Sox2 II for	Sox II rev	60	40
Oct4	Oct4 h&b for	Oct4 h&b II rev	50	40
c-myc	Myc h&b for	Myc H&b II rev	60	30
Nanog	Nanog h&b for	Nanog h&b II rev	56	40
Klf4	Klf4 h&b for	Klf4 h&bII rev	60	30

Tabelle 8: PCR-Ansatz

PCR Ansatz	Volumen [µl]
2x Phusion[®] Master Mix	10
Primer A for	2,5
Primer B (rev)	2,5
Template	5,0
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 9: Thermocycler-Programm für PCR

Thermocycler-Programm	Temperatur [°C]	Zyklen
2 min	95	
45 s	95	
45 s	50-60 (Ann. Temp.)	30-40
45 s	72	
7 min	72	
Pause	4	

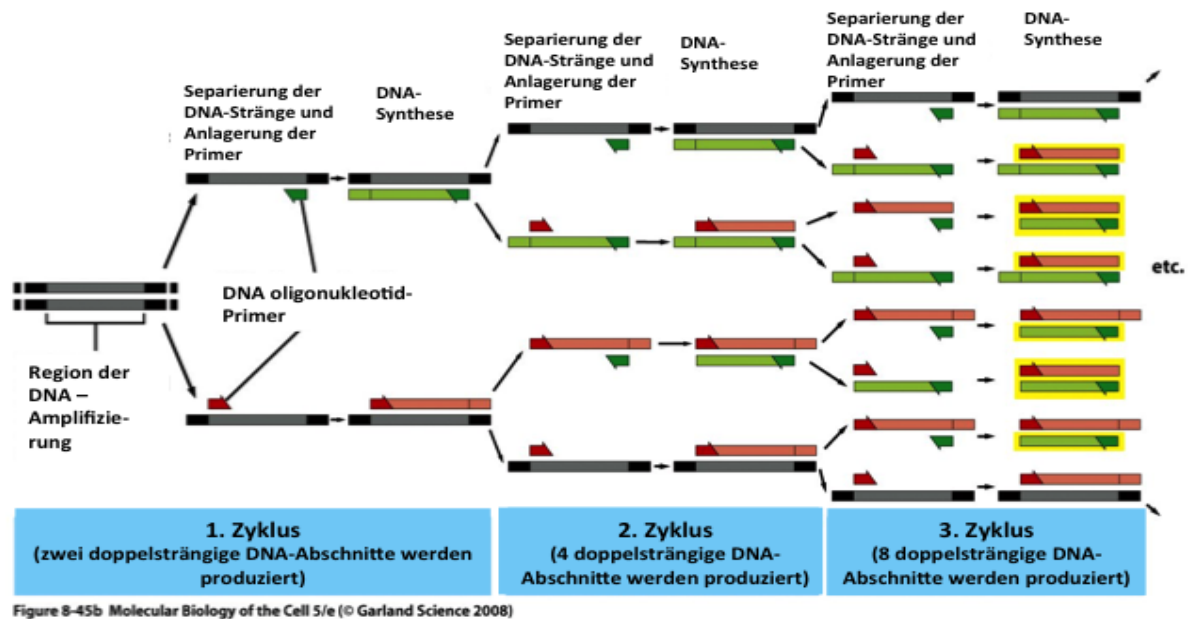


Abbildung 10: Schema eines PCR-Ablaufes. Dargestellt ist die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, die Anlagerung (*Annealing*) der *Primer* und die Verlängerung (*Extending, Elongation*) der DNA-Abschnitte (modifizierte Grafik nach Alberts et al. 2008). Dies wird in mehreren Zyklen wiederholt. Damit entsteht ein Vielfaches eines genau definierten Genabschnitts.

2.6.3 Gelelektrophorese

Die Auftrennung des PCR-Produkts erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Dafür wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel hergestellt, in welchem die Proben bei 85 V für eine Stunde in TE-Puffer (Tris (*Tris*(hydroxymethyl)-aminomethan) /EDTA-Puffer) von der Kathode zur Anode fließen. Die Konzentration des Gels wurde entsprechend der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt. Ein 1,5 %-iges Gel eignet sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 4 - 0,2 kb. Hergestellt wurden 100 – 200 ml Gel. Dazu wurde Agarose abgewogen und in TE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Die Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid oder Roti[®]-GelStain (ROTH) bei einer Geltemperatur von ca. 50 °C führten bei der späteren Auswertung zur Fluoreszenz der Banden unter UV-Licht. Danach wurde das erkaltete Agarosegel in eine Elektrophoresekammer überführt. Da DNA eine negative Grundladung besitzt, bewegt sie sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Poren des Agarosegels ermöglichen eine Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Kleine Nukleinsäure-Moleküle laufen schneller im Gel als große Nukleinsäure-Moleküle. So ergibt sich nach einer bestimmten Zeit eine Auftrennung der Proben nach ihrer Größe. Ein Größenstandard (100 bp *Ladder*) wurde zur ungefähren Bestimmung der Basenpaargröße eingesetzt. Die Proben wurden zum Verfolgen der

Lauffront mit Bromphenolblau gemischt, das auch ohne UV-Licht auf dem Gel sichtbar ist. Die Auswertung des Gels erfolgte mit einem Transilluminator unter UV-Licht mit Hilfe der BioDocAnalyses 2.0. Software. So konnten Bilder zur Dokumentation aller Gele angefertigt werden.

Zur **Gelextraktion** wurde das MiniElute[®] Gel Extraction Kit (50) verwendet. Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und überflüssiges Gel entfernt. Danach wurde ihr Gewicht bestimmt, welches nicht mehr als 400 mg betragen darf. Bei höherem Gewicht mussten die Proben auf mehrere Säulen aufgetragen werden. Mit Hilfe des MiniElute Kits konnten Proben von 70 bp - 4 kb extrahiert werden. Nach dem Wiegen der Proben wurde QG-Puffer im Verhältnis 1:3 also im 3-fachen Volumen zum Gelgewicht hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben unter ständigem Rühren bei 50 °C für 10 min inkubiert bis das Gel vollständig gelöst war. Danach musste der pH-Wert anhand der Farbe der Probenlösung überprüft werden. Besaßen die Proben eine gelbliche Farbe, so betrug ihr pH-Wert ca. 7,5. In diesem Fall konnten die Proben weiter verarbeitet werden. Ansonsten musste der pH-Wert eingestellt werden, bevor die Proben weiter verwendet werden konnten. Im nächsten Schritt wurde Isopropanol im Verhältnis von einem Gel-Volumen (1:1) zu den Proben pipettiert und durch mehrmaliges Hin- und Herschwenken mit den Proben vermischt. Die Proben wurden auf MiniElute Säulen überführt und für eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert, um die DNA an die Säulen zu binden. Der Durchfluss wurde verworfen. Im Anschluss wurden 500 µl QG-Puffer auf die Säulen pipettiert und erneut eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden mit 700 µl PE-Puffer gewaschen, für eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Proben erneut für eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert. Im darauffolgenden Schritt wurden die Säulen auf einem 1,5-ml-Eppendorftube platziert und zur Elution der Proben 10 µl EB-Puffer auf die Säulen gegeben. Die Proben wurden für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert.

Zum Schluss wurden die Proben je nach Herstellerangaben für die Sequenzierung vorbereitet.

2.7 Oct4-Transport von Tumor- auf Nichttumorzellen durch Exosomen

Um auszuschließen, dass die Pluripotenzfaktoren ggf. durch Exosomen übertragen werden, wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt. Exosomen besitzen einen Durchmesser von 40-100 nm und können in Tiegelform oder als runde Vesikel vorliegen. Um eine mögliche Übertragung der Pluripotenzfaktoren durch Exosomen zu überprüfen, wurden die Hep2-, SAOS- und Oct4-GFP MEF-Zellen unter den bereits im oberen Teil der Methodik beschriebenen Bedingungen in Medium ohne Antibiotika kultiviert. Der Mediumüberstand der Tumorzelllinien wurde jeweils nach 48 h und 72 h Kultivierung abpipettiert und bei 300 · g für 10 min und dann nochmals mit 1200 · g für weitere 10 min zentrifugiert, um Zellen und Debris zu entfernen. Der zellfreie Überstand wurde nun über einem 0,2-µm-Filter filtriert, um große Vesikelteile aus der Zellmembran zu entfernen. Dieser Überstand wurde daraufhin im Verhältnis 1:1 mit frischem MEF-Medium gemischt und auf die Oct4-GFP MEF-Zellen gegeben. Im Anschluss erfolgte eine tägliche fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der MEF-Zellen auf Fluoreszenz für 120 h. Die fluoreszenzoptische Aktivierung der MEF-Zellen, bei der für GFP- typischen Wellenlänge, wäre dann ein Beweis der Übertragung von Oct4 durch Exosomen. Beim Ausbleiben der Fluoreszenz kann dieser Übertragungsweg ausgeschlossen werden.

2.8 Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde mit dem Programm SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, USA) vorgenommen. Dabei wurden die gemessenen Werte zunächst in ein Excel-Datenblatt übernommen, das anschließend in SigmaPlot importiert wurde. Mit SigmaPlot wurden dann Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Medianwerte sowie deren Perzentilen berechnet und Grafiken erstellt. Als Signifikanztests wurden entsprechend der t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Lagen Mittelwerte bzw. Medianwerte mehrerer Gruppen vor, so wurde eine Varianzanalyse mit dem entsprechenden ad-hoc-Test vorgenommen (z.B. ANOVA plus Holm-Sidak-Test oder Bonferoni-Test).

3 Ergebnisse

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden vier verschiedene, aufeinander aufbauende Untersuchungen vorgenommen. (1) Als Ergebnisse werden zunächst die Auswertungen der Zellsortierungen nach dem Stro-1-Oberflächenmarker der Hep2- und SOAS-Zellkulturen aufgeführt. (2) Anschließend wurde die Morphologie der Zellen mit Hilfe von mikroskopischen Aufnahmen untersucht. (3.) Danach wurden die beiden Tumorzelllinien nach Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen getrennt mit den Oct4-GFP MEF-Zellen kokultiviert, um die Übertragung der Transkriptionsfaktoren Oct4 von den Tumorzelllinien auf die MEF-Zellen zu überprüfen. Ein möglicher Übertragungsweg des Pluripotenzfaktors Oct4 durch Exosomen wurde anschließend überprüft. (4) In einem zweiten Kokulturversuch wurden dann GFP-transfizierte HGF-Zellen mit den nichtsortierten Zelllinien kokultiviert. Im Anschluss wurden die GFP-markierten HGF-Zellen wieder aussortiert und mit Hilfe der RT-PCR und der Gensequenzierung auf Expression ausgewählter Transkriptionsfaktoren analysiert.

Zellsortierung nach dem Stro-1-Oberflächenmarker

Die Tumorstammzelllinien wurden nach Erreichen von Konfluenz mit dem Stammzellmarker Stro-1 sortiert und für weitere Kokultivierungsversuche verwendet. In den Sortierungen wurden die mit den Stammzellmarkern Stro-1 gekoppelten Zellen als positiv definiert. Die restliche Population, welche nicht an den entsprechenden Marker gebunden hat, wird als negativ bezeichnet. Alle Ergebnisse werden in den A-Tabellen 5 bis 9 im Anhang aufgeführt und in der Abbildung 12 dargestellt.

Der Zellsortierung lagen Kulturen der jeweiligen Tumorzelllinien zugrunde, die in Abbildung 11 dargestellt sind. Die Zellsortierung von Hep2-Zellen mit dem Marker Stro-1 wurde mit ca. $340 \cdot 10^6$ Zellen durchgeführt. Die deskriptive Statistik dazu kann der A-Tabelle 5 entnommen werden.

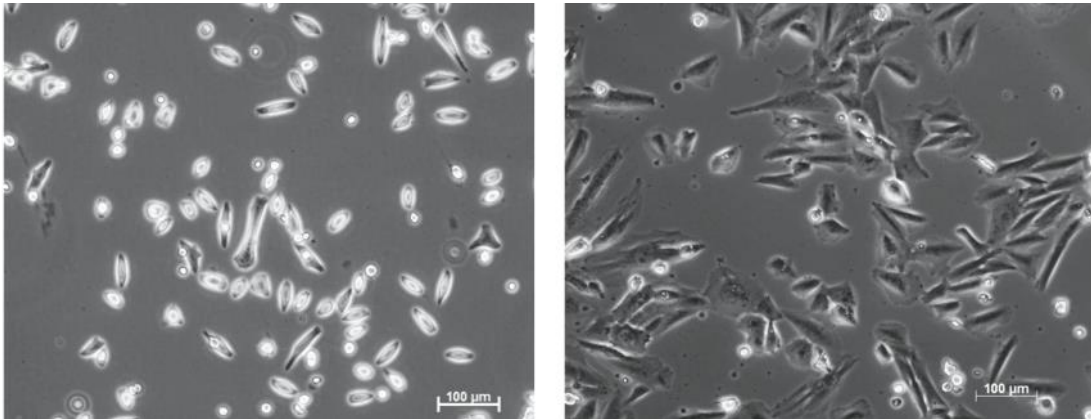


Abbildung 11: Mischkultur Hep2- und SAOS-Zellen. Links: Hep2-Zellen (P4) als unsortierte Kultur nach 24h Inkubation. Rechts: SAOS-Zellen (P3) in Kultur nach 24h Inkubation. Die Belichtungszeit beträgt 800ms. Der Maßstabsbalken befindet sich im rechten unteren Bildrand und entspricht 100 µm.

Für die Hep2-Zellen ergaben sich ca. $4,2 \cdot 10^6$ Stro-1⁺-Zellen und $323,6 \cdot 10^6$ Stro-1⁻-Zellen. Dies entspricht einem Prozentsatz von $1,32 \pm 0,49$ % Stro-1⁺- und $98,68 \pm 0,49$ % Stro-1⁻-Zellen (A-Tabelle 6, Abbildung 12).

Bei der Zellzählung der SAOS-Zellen wurde eine Gesamtzellzahl von ca. $85 \cdot 10^6$ Zellen ermittelt (A-Tabelle 7). Die Gesamtausbeute SAOS^{Stro-1+}-Zellen betrug insgesamt ca. $1,3 \cdot 10^6$ und SAOS^{Stro-1-}-Zellen $81,4 \cdot 10^6$. Dies entspricht einem Prozentsatz von $1,97 \pm 0,95$ % Stro-1⁺- und $98,03 \pm 0,95$ % Stro-1⁻-Zellen (A-Tabelle 8, Abbildung 12). Sortierte Stro-1-Zellen der Passage 4 wurden anschließend separat als positive und negative Population zusätzlich weiter kultiviert. Sowohl die vorher als Stro-1⁺ sortierten Zellen als auch die als Stro-1⁻ sortierten Zellen wurden erneut nach einwöchiger Inkubation sortiert. Beide Zellpopulationen enthielten wiederum sowohl einen Teil Stro-1⁺-Zellen als auch einen Anteil Stro-1⁻-Zellen. Die aus der Passage 4 eingesetzten $860 \cdot 10^3$ positiven Zellen führten bei erneuter Sortierung nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen zu einer Ausbeute von ca. $60 \cdot 10^3$ (7,14 %) Stro-1⁺-Zellen und $800 \cdot 10^3$ (92,89 %) Stro-1⁻-Zellen. Aus der Sortierung von $65 \cdot 10^6$ Stro-1⁻-Zellen der Passage 4 ergab sich nach erneuter Sortierung eine Anzahl von $180 \cdot 10^3$ (1,77 %) Stro-1-positiver und ca. $9,8 \cdot 10^6$ (98,24 %) negativer Zellen. Die Ergebnisse können der A-Tabelle 9 entnommen werden.

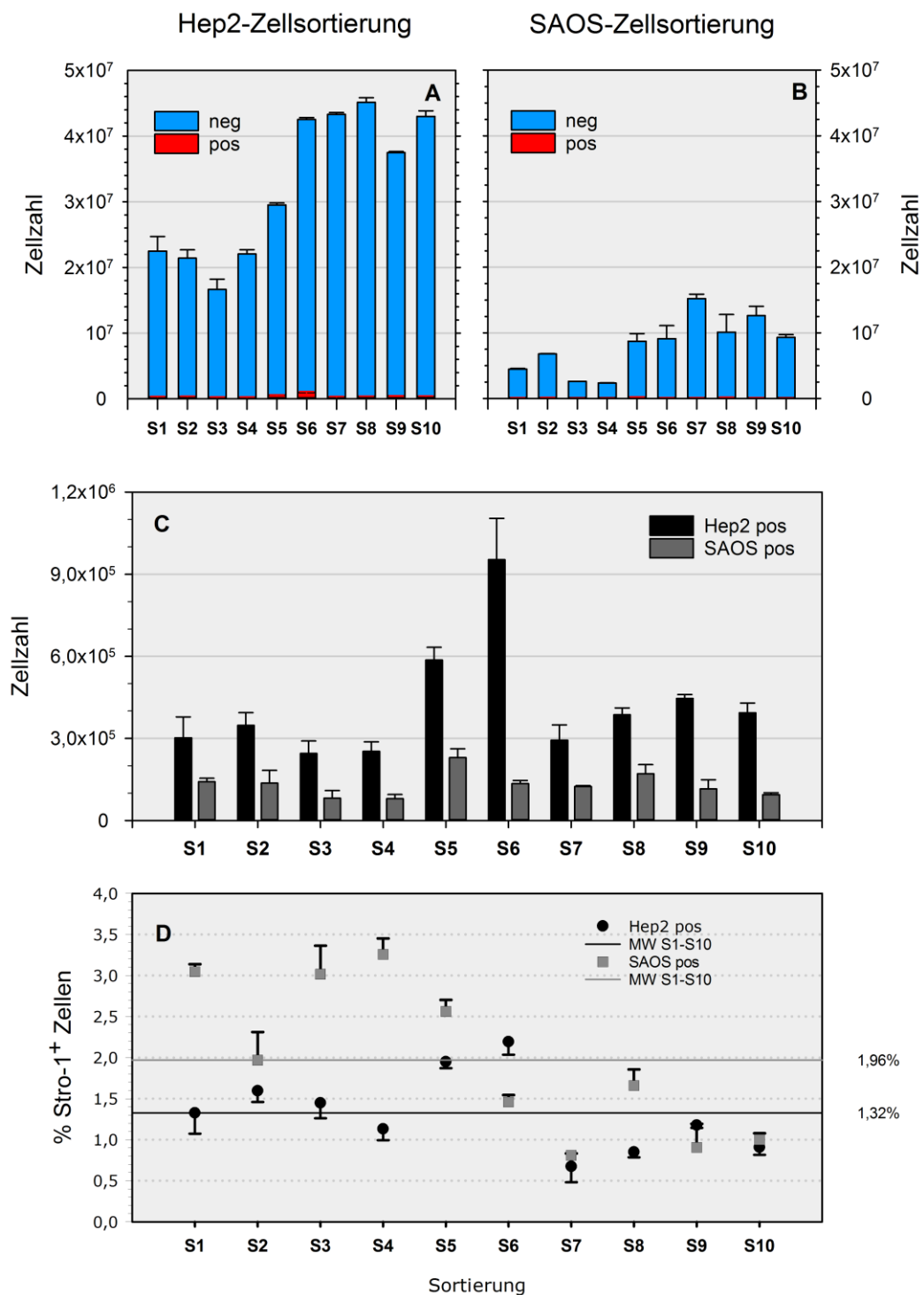


Abbildung 12: Ergebnisse der Zellsortierung (S1-10) der Tumorzelllinien Hep2 und SAOS. Die Zellsortierungen sind nicht mit den Zellpassagen zu verwechseln (siehe Anhang Tab. A-5 bis A-8). In den beiden oberen Grafiken (A und B) sind die Mittelwerte zusammen mit den Standardabweichungen aller Sortierungen (S1-S10) dargestellt. **A)** Zellzahl der Hep2^{Stro-1+} und Hep2^{Stro-1-} der Sortierungen S1-S10 **B)** Zellzahl der SAOS^{Stro-1+} und SAOS^{Stro-1-} Zellen der Sortierungen S1-S10 **C)** Darstellung der Mittelwerte (MW; n=3) und Standardabweichungen (SD) der Zellzahl von Hep2^{Stro-1+} und SAOS^{Stro-1+} Zellen der jeweiligen Sortierungen. **D)** Relative Zellzahl der Hep2^{Stro-1+} und SAOS^{Stro-1+} Zellen der jeweiligen Sortierung in Prozent. Die horizontalen Linien geben den jeweiligen Mittelwert für die Stro-1⁺- Hep2- und SAOS-Zellen aller Sortierungen (S1-S10) an.

Die Sortierung zeigt, dass auch in der standardisierten Zelllinie der SAOS-Zellen Stro-1⁺-Zellen nachgewiesen werden konnten. Allgemein ist festzustellen, dass der Anteil an Stro-1⁺-Zellen in den jeweiligen Tumorzellpopulationen wesentlich geringer war als der Anteil negativ getesteter Zellen. Die Hep2^{Stro-1⁺}-getesteten Zellen ergaben zwar in der Summe eine höhere Anzahl Stro-1⁺-Zellen, weisen aber im Vergleich zu SAOS-Zellen einen geringeren Prozentsatz Stro-1⁺-Zellen auf. Bei allen durchgeführten Sortierungen konnte eine Mischpopulation von sowohl Stro-1⁺- als auch Stro-1⁻-Zellen identifiziert werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Prozentanteil der auf den Oberflächenmarker positiv getesteten Zellen und der Anzahl der Passagen, konnte in diesem Versuchsaufbau nicht festgestellt werden. Eine erneute Sortierung von Stro-1⁺-Zellen nach 7 Tagen Kultivierung ergab einen höheren Anteil Stro-1⁺-Zellen als in der Erstbestimmung, aber auch einen Anteil Stro-1⁻-Zellen. Die in der Erstsartierung als Stro-1⁻- identifizierten Zellen enthielten in der Wiederholungssortierung nach einer Woche Kulturdauer ebenfalls einen Anteil Stro-1⁺-Zellen, der jedoch geringer ausfiel.

Zusammenfassung

In der Hep2-Zellpopulation konnten im Durchschnitt $1,32 \pm 0,49$ % Stro-1⁺ und bei den SAOS-Zellen $1,97 \pm 0,95$ % Stro-1⁺ identifiziert werden. Bei zeitlich versetzten Wiederholungsbestimmungen fiel auf, dass die Expression des Oberflächenepitops Stro-1 innerhalb der Gesamtzellzahl geringer wurde. So z. B. waren 100% positive Zellpopulationen nach 7 Tagen nur noch zu 7, 14 % positiv.

3.1 Morphologische Aspekte der sortierten Zellen

Zur morphologischen Untersuchung wurde das Wachstum der nativen Zellen zunächst unter dem Mikroskop beobachtet und anschließend vor Erreichen der Konfluenz fotografiert. Die Bilder wurden dann mit einem Imageanalysesystem (SigmaScan) vermessen und statistisch ausgewertet. Zur Analyse lagen Stro-1⁺- und Stro-1⁻- Hep2- sowie SAOS-Zellen in Reinkultur vor. Die Zellpopulationen wurden in den zwei Medien NH und MEF kultiviert. Die mikroskopische Beobachtung der Zelllinien wurde täglich durchgeführt. So konnte die Entwicklung der Kulturen der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen dokumentiert werden. Durch die Vermessung und die Auszählung der Zellen konnten Unterschiede in Form und Größe der Zellen ausgewertet werden.

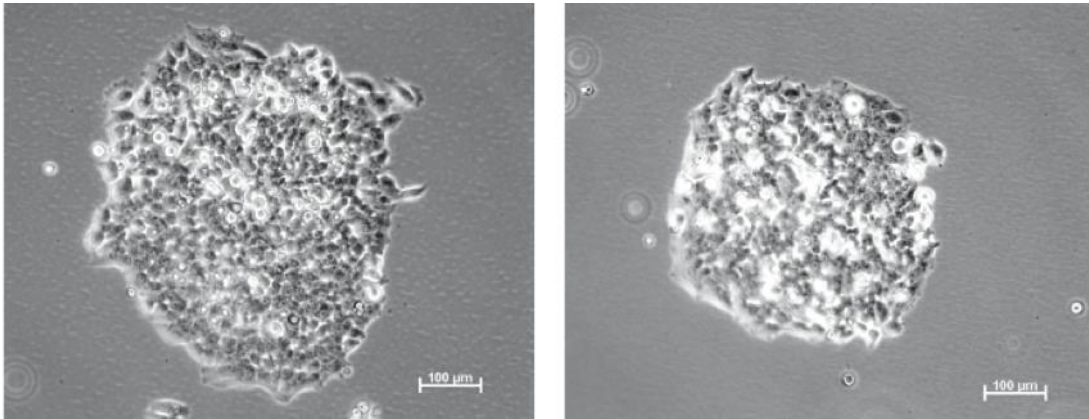


Abbildung 13: Kulturen von Hep2^{Stro1+}- und SAOS^{Stro1+}-Zellen. Sphärische Kulturen von Stro-1⁺-Hep2- rechts und SAOS-Zellen links nach 72h in NH-Medium ohne Antibiotika. Die Belichtungszeit betrug 800 ms. Der Maßstabsbalken befindet sich im unteren rechten Bildrand und entspricht 100 µm.

Bei der mikroskopischen Beobachtung des Kulturwachstums ergaben sich Unterschiede zwischen Hep2- und SAOS-Zellpopulationen. Besonders bei den SAOS^{Stro-1+}-Zellen war ein sphärisches Wachstum der Kultur nach Populationszunahme zu beobachten. Sowohl Hep2^{Stro-1+}- als auch SAOS^{Stro-1+}-Zellen wuchsen vereinzelt ausgesät unter Koloniebildung als dichte Kulturen auf kleinem Raum unter Ausbildung mehrerer übereinander liegender Zellschichten (Abbildung 13). Im Gegensatz dazu wiesen die Stro-1⁻-Kulturen ein völlig anderes Wachstumsmuster auf. Sie neigten eher zum breitflächigen Wachstum mit Ausbildung eines *Monolayers*. Nicht nur die Anordnung der Populationen, sondern auch die Morphologie der einzelnen Zellen unterschied sich voneinander (Abbildung 14 und 15). SAOS Zellen sind langgestreckte Zellen mit kleinen Fortsätzen, die Fibroblasten ähneln. Sie sind geringfügig größer und schlanker als Hep2-Zellen. Hep2-Zellen entwickeln eckige bis runde Zellformen, die kompakter als SAOS-Zellen imponieren. Alle Zellen besaßen einen Zellkern, der überwiegend mittig in der Zelle angeordnet war. Bei der mikroskopischen Beobachtung der Kulturen konnten hinsichtlich der Morphologie keine wesentlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kulturmedien festgestellt werden. Bei der Vermessung der Zellgrößen ergaben sich jedoch für Stro1⁺- und Stro-1⁻-Zellen in Abhängigkeit von beiden Medien signifikante Unterschiede der Zellgrößen.

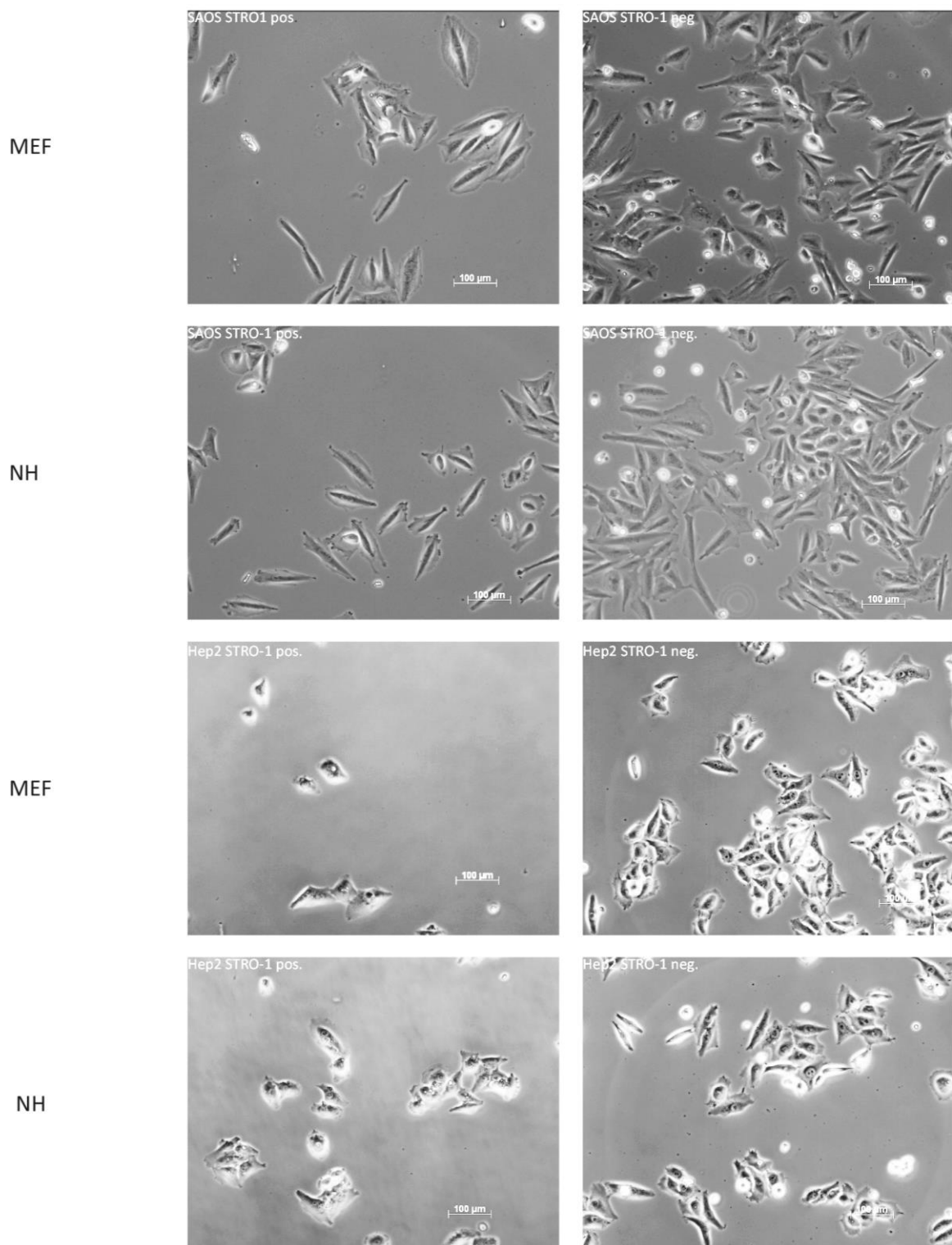


Abbildung 14: Mikroskopaufnahmen der Stro-1- sortierten Tumorzelllinien. Wachstum und Morphologie von Hep2^{Stro-1+}- und Hep2^{Stro-1-}-Zellen sowie SAOS^{Stro-1+}- und SAOS^{Stro-1-}-Zellen in unterschiedlichen Medien. Die Abbildung zeigt Übersichtsaufnahmen der Stro-1⁺- und Stro-1⁻- SAOS- und Hep2-Zellen im NH- und MEF-Medium. Links Stro-1⁺- und rechts Stro-1⁻-Zellen. Die Übersichtsaufnahmen wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug 800 ms. Der Maßstabsbalken befindet sich im unteren rechten Bildrand und entspricht 100 μm .

Zellfläche von SAOS- und Hep2-Zellen

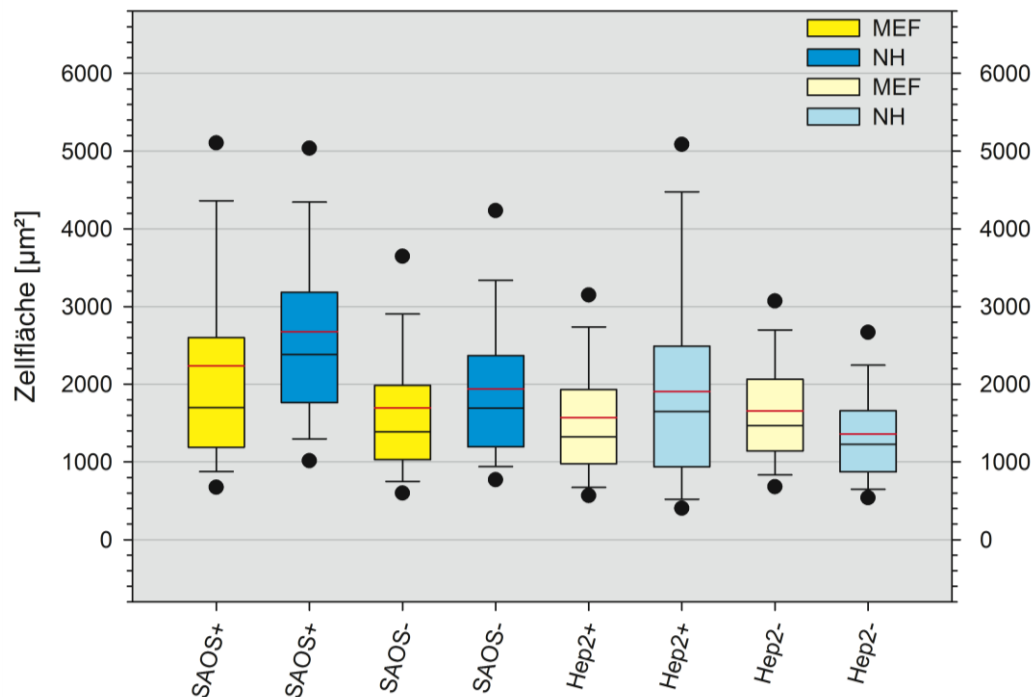


Abbildung 15: Zellflächen der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Hep2- und SAOS-Zellen im MEF-/NH-Medium. In der Grafik sind die Medianwerte, die 5 %-, 25 %-, 75 %- und 95 %- Perzentilen, die Minimum- und Maximumwerte sowie die Mittelwerte als rote Markierung innerhalb der Boxplots dargestellt.

Tabelle 10: Zellflächen der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Hep2- und SAOS-Zellen im MEF-/ NH-Medium. Die Tabelle gibt den Stichprobenumfang, die Median- und Perzentilwerte sowie die Signifikanzen an.

Signifikanztest der Zellflächen der positiven gegen die negativen Zellen*						
Zelllinie	Medium	N	**Median	25 %	75 %	Signifikanz
SAOS pos.	MEF	167	1700	1190	2598	P<0,001
SAOS neg.	MEF	764	1388	1032	1986	
SAOS pos.	NH	485	2382	1762	3188	P<0,001
SAOS neg.	NH	575	1691	1194	2370	
Hep2 pos.	MEF	20	1651	939	2490	P=0,029
Hep2 neg.	MEF	705	1227	872	1660	
Hep2 pos.	NH	161	1325	977	1932	P=0,023
Hep2 neg.	NH	398	1469	1140	2066	
Signifikanztest der Zellflächen des MEF-Mediums gegen das NH-Medium*						
SAOS pos.	MEF	167	1700	1190	2598	P<0,001
SAOS pos.	NH	485	2382	1762	3188	
SAOS neg.	MEF	764	1388	1032	1986	P<0,001
SAOS neg.	NH	575	1691	1194	2370	
Hep2 pos.	MEF	20	1651	939	2490	P=0,257
Hep2 pos.	NH	161	1325	977	1932	
Hep2 neg.	MEF	705	1227	872	1660	P<0,001
Hep2 neg.	NH	398	1469	1140	2066	

*Mann-Whitney U –Test; ** Angaben in µm²

Die statistische Auswertung der Zellen ergab eine signifikant höhere Zellfläche der SAOS^{Stro-1+}-Zellen gegenüber den SAOS^{Stro-1-}-Zellen in beiden Medien (Abbildung 15, Tabelle 10). Dabei bildeten SAOS^{Stro-1+}-Zellen, kultiviert in NH-Medium, die größten Zellflächen (Medianwert: 2382 μm^2) bei maximaler Zellausdehnung und geringster Kompaktheit aus (A-Tabelle 10). Sie erreichten eine maximale Länge von 95,23 μm . Dies bestätigen auch die bereits in der mikroskopischen Auswertung beschriebenen Beobachtungen von langgestreckten großen Zellen. Die statistischen Auswertungen für die Hep2-Zellkultur führten zu keinen einheitlichen Ergebnissen. Der größte Medianwert der Zellfläche von 1651 μm^2 ergab sich bei Hep2^{Stro-1+}-Zellen, welche in MEF-Medium kultiviert wurden. Hep2^{Stro-1-}-Zellen erreichen im NH-Medium die größten Zellflächen. Die Hep2^{Stro-1+}-getesteten Zellen waren auch insgesamt kompakter als die negativ getesteten Zellen (A-Tabelle 10). Die höchste Kompaktheit (20,79) im Vergleich zu den anderen Zellkulturen erreichten Hep2^{Stro-1+}-Zellen im NH-Medium. Hep2-Zellen sind der Analyse zufolge kleinere Zellen, die meist kompakter und von geringerer Länge sind als die SAOS-Zellen.

Zusammenfassung

Die Stro-1⁺-Zellen beider Populationen wachsen in Kolonien, sind größer als die übrigen Zellen und unterscheiden sich in ihrem Wachstumsverhalten eindeutig von den restlichen Zellen der Kultur. Die Größe der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Populationen beider Zelltypen ist stark abhängig vom jeweiligen Kulturmedium. Die Hep2^{Stro-1+}-Zellen sind im MEF-Medium um 35 % größer und im NH-Medium um 10 % kleiner als die Hep2^{Stro-1-}-Zellen. Die SAOS^{Stro-1+}-Zellen sind im MEF-Medium um 23 % und im NH-Medium um 42 % größer als deren Stro-1⁻-Zellen. Im NH-Medium sind die SAOS^{Stro-1+}-Zellen um 40 % und deren negative Zellen um 22 % größer als im MEF-Medium. Die Hep2^{Stro-1+}-Zellen sind hingegen um 20 % kleiner im NH-Medium, während die negativen um 20 % größer als im MEF-Medium sind.

Die Stro-1⁺-Zellen sollen in den Folgeversuchen auf ihre mögliche Interaktion mit tumorfremden Zellen untersucht werden.

3.2 Kokultivierung von Tumor- und Promotorzellen

In einem *Screening*-Test sollte zunächst abgeklärt werden, ob die beiden Tumorzelllinien Oct4 exprimieren und auf andere Zellen übertragen können. Für das Kokultivierungsexperiment wurden die Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen beider Tumorzelllinien mit Oct4-GFP MEF-Zellen kokultiviert. Unter Berücksichtigung von Verdopplungsgeschwindigkeit und Zellgröße wurde eine Kammer mit ca. 30 000 Zellen befüllt. Die Oct4-GFP MEF-Zellen besitzen die Eigenschaft unter Expression von Oct4, GFP (*green fluorescent protein*) zu produzieren und dann zu fluoreszieren. Kommt es also zur Produktion von Oct4 innerhalb der Zelle, wird ebenfalls der Fluoreszenzfarbstoff GFP produziert. Dies wurde in Mikroskopaufnahmen festgehalten. Anhand dieser standardisierten Aufnahmen wurden die Intensität und die Fläche der Fluoreszenz bestimmt. Dazu wurden die Zellen alle 24 h unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und fotografiert. In den Kokulturen war eine starke Ausbildung von Zell-zu-Zell-Kontakten zu beobachten. MEF- und Tumorzellen konnten vor allem durch ihre Größenunterschiede visuell differenziert werden. In der Abbildung 16 sind diese Größenunterschiede noch einmal veranschaulicht; die entsprechenden Messdaten befinden sich im Anhang (A-Tabelle 11).

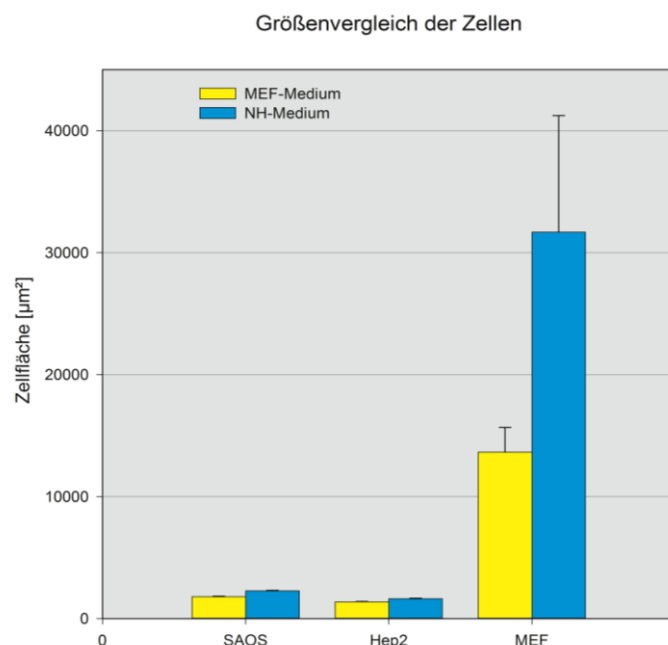


Abbildung 16: Größenvergleich der Zellflächen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellfläche in μm^2 der Zelllinien Hep2, SAOS und Oct4-GFP MEF in MEF- und NH-Medium.

Der Mittelwert der Zellgröße der MEF-Zellen beträgt in MEF-Medium ca. $13,6 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$, in NH-Medium $31,7 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$. Die Zellen zeigen große Schwankungen in ihrer Fläche. Dennoch sind sie wesentlich größer als die SAOS- und Hep2-Zellen. Die mittlere Zellgröße von Hep2-Zellen in MEF-Medium lag bei $1,4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ und in NH-Medium bei $1,6 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$. Die SAOS-Zellen besaßen eine mittlere Zellgröße von $1,8 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ in MEF-Medium und $2,3 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ in NH-Medium. Alle Zellen wiesen eine höhere mittlere Zellgröße in NH-Medium auf.

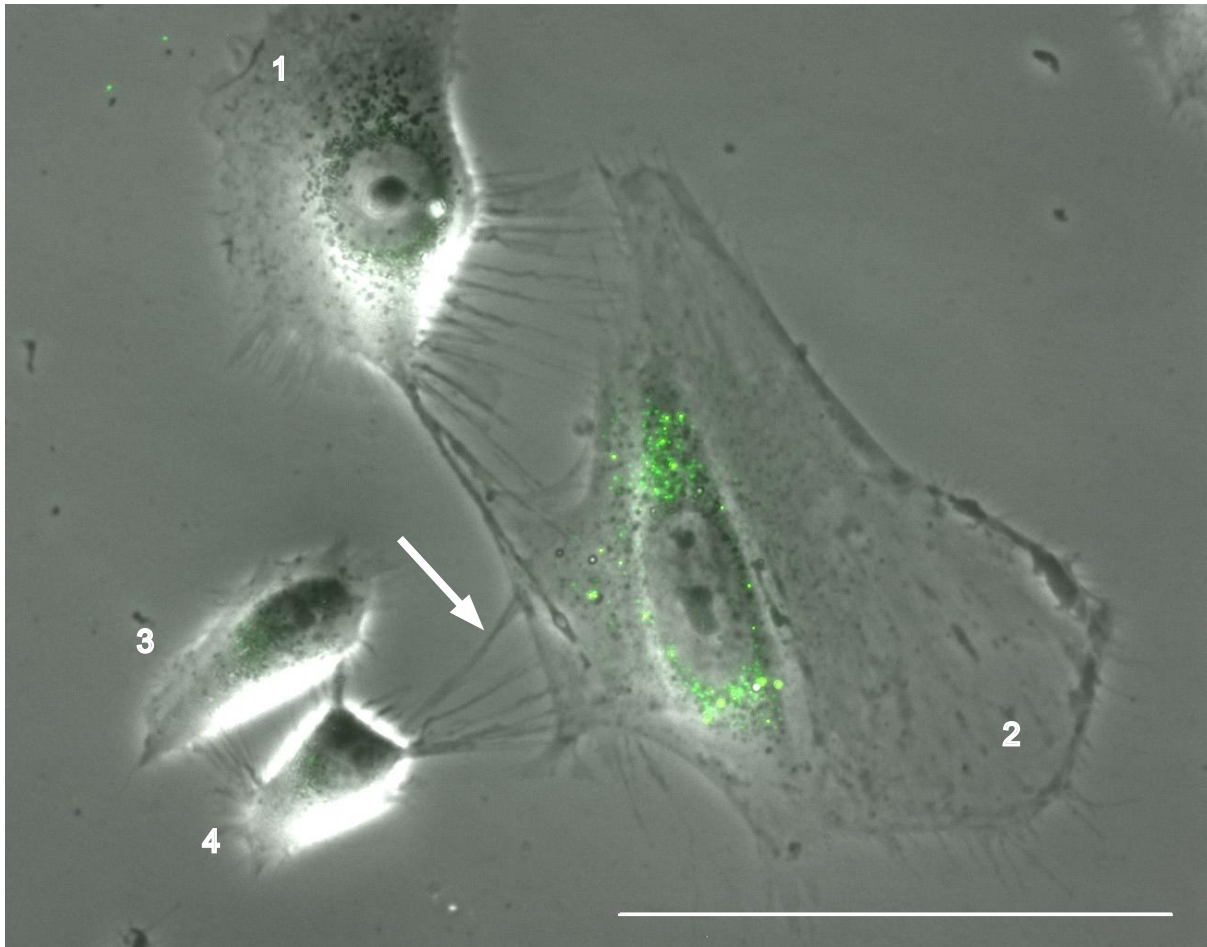


Abbildung 17: Interaktion zwischen Hep2- und Oct4-GFP MEF-Zellen. Zell-zu-Zell-Verbindungen zwischen Hep2^{Stro-1+}-Zellen mit Oct4-GFP MEF-Zellen nach 48 h Inkubation (weißer Pfeil). Zu sehen sind je zwei MEF- (Nr. 1 und 2) und zwei Hep2-Zellen (Nr. 3 und 4), die miteinander interagieren. Mikroskopische Filtersätze waren zur Darstellung von GFP geeignet (s. Material und Methoden). Die Detailaufnahme wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h durchgeführt. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzaufnahme betrug 6000 ms, die der Durchlichtaufnahme 800 ms. Die Farben wurden anhand der Grauwertunterschiede der hochauflösenden Schwarzweißaufnahme vom Computer zugeordnet (Pseudokolorierung). Der Maßstabsbalken befindet sich im unteren rechten Bildrand und entspricht 100 μm .

MEF-Zellen besitzen ein weit ausgebreitetes Zytoplasma. In manchen Zellen sind mehrere Kerne zu finden. In den Kokulturen konnte bereits nach 24 h Inkubation ein

schwaches Leuchten der Oct4-GFP MEF-Zellen wahrgenommen werden, das zeitabhängig zunahm. Der zeitabhängige Flächen- und Intensitätsverlauf der Fluoreszenz ist in Abbildung 19 dargestellt. Diese GFP-Fluoreszenz breitete sich rund um den Kern in Richtung der Peripherie des Zytoplasmas aus. Die leuchtenden Strukturen imponierten meist rundlich, vakuolen- oder granulähnlich (Abbildung 17 und 18). Die Fluoreszenz zeigte sich sehr variabel in den MEF-Zellen. Sie reichte von kleinen Körnchen bis hin zu größeren Flächen. Nach ca. einwöchiger Inkubation der Mischkulturen war der Zellrasen meist so dicht gewachsen, dass eine visuelle Unterscheidung der Zellen unter morphologischen Gesichtspunkten nicht mehr möglich war. Folglich wurde der Versuch dann beendet.

(1) Ergebnisse der GFP-Fluoreszenzfläche und –intensität von MEF-Promotorzellen in Kokultur mit Hep2^{Stro-1+}- und Hep2^{Stro-1-}-Zellen in MEF-Medium. Die graphische und statistische Auswertung der GFP-Fluoreszenzfläche und deren Intensität ist der Abbildung 19 und den A-Tabellen 12 und 13 zu entnehmen. Die Kokultur von Hep2^{Stro-1+}-Zellen mit MEF-Zellen, in MEF-Medium kultiviert, weist dabei einen annähernd linearen Anstieg der GFP-Fluoreszenzfläche mit zunehmender Inkubationszeit auf. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenzfläche der Kokultur mit den negativ getesteten Zellen (Hep2^{Stro-1-}, MEF-Medium) anfangs am größten und fällt dann langsam ab. Sie erreicht jedoch nicht einmal ein Viertel der Fläche der Kokultur der positiv getesteten Zellen. Ein GFP-Intensitätsmaximum innerhalb der Kokultur mit Stro-1⁺-Zellen wird nach den ersten 48 h Inkubation erreicht. Die Mischkultur aus Hep2^{Stro-1-}-Zellen und Oct4-GFP MEF-Zellen erreicht ihr Maximum erst nach einer Inkubationszeit von 92 h.

(2) Ergebnisse der GFP-Fluoreszenzfläche und –intensität von MEF-Zellen in Kokultur mit SAOS^{Stro-1+}- und SAOS^{Stro-1-}-Zellen in MEF-Medium. Die Auswertung der gewonnenen Daten für die Kokultur mit SAOS-Zellen, kultiviert in MEF-Medium, führte zu anderen Resultaten. Mischkulturen aus SAOS Stro-1⁺-getesteten Zellen und MEF-Zellen wiesen eine maximale Fluoreszenzfläche (1260,93 μm^2) nach 48 h Inkubation auf. Diese Fluoreszenzfläche entspricht mehr als dem Sechsfachen, der in diesem Versuch gemessenen Fluoreszenzflächen (SAOS^{Stro-1+}- und SAOS^{Stro-1-}-Zellen mit Oct4-GFP MEF-Zellen in MEF-Medium). Die Kokultur erreicht das Intensitätsmaximum mit SAOS^{Stro-1+}-Zellen nach vier Tagen (1,290 arithmetisches Mittel), die Kokultur mit Stro-1⁻-Zellen bereits nach zwei Tagen (1,372 arithmetisches Mittel).

(3) Ergebnisse der GFP-Fluoreszenzfläche und –intensität von MEF-Promotorzellen in Kokultur mit SAOS^{Stro-1+}- und SAOS^{Stro-1-}-Zellen in NH-Medium. Mischkulturen aus MEF-Zellen mit SAOS^{Stro-1+}-Zellen, kultiviert in NH-Medium, erreichten die größte Fluoreszenzfläche. Es erfolgte ein steiler Anstieg der Fluoreszenzfläche zwischen 48 (289,19 μm^2) und 72 h (933,01 μm^2). Die Kokultur mit den SAOS^{Stro-1-}-Zellen erreichte ein Maximum ihrer Fluoreszenzfläche nach 48 h (747,47 μm^2). Die mittlere Intensität der Fluoreszenz erreichte in der Mischkultur mit SAOS^{Stro-1+}-Zellen ihre Maxima zwischen 48 (1,135 arithmetisches Mittel) und 72 h (1,148 arithmetisches Mittel). Das Intensitätsmaximum der Kokultur aus MEF- und Stro-1⁻-Zellen wird nach 144 h (1,237 arithmetisches Mittel) gemessen. Dieses Intensitätsmaximum ist höher als das der Mischkultur aus positiv getesteten SAOS-Zellen und MEF-Zellen.

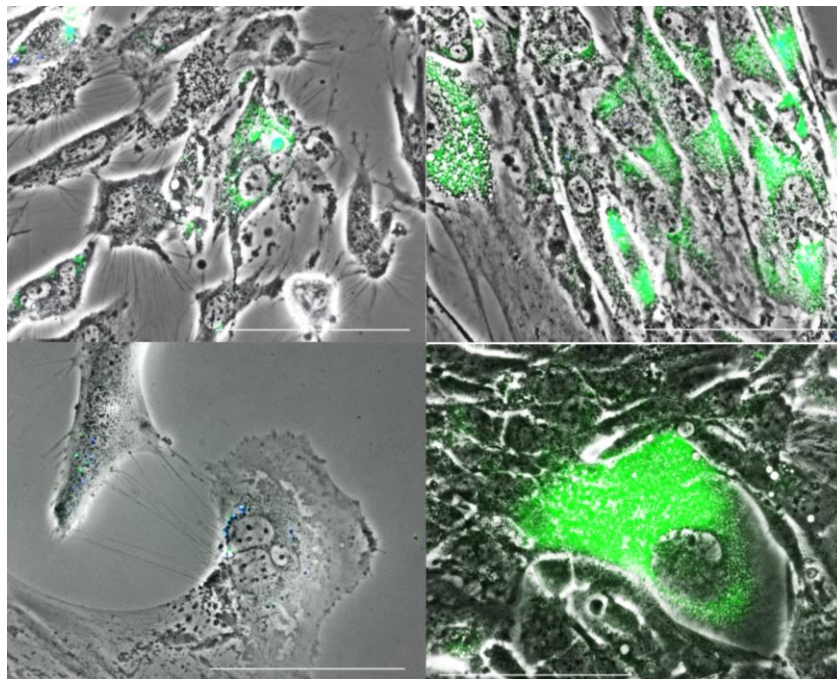


Abbildung 18: Fluoreszenzaufnahmen: Kokulturen von Tumorzellen mit Oct4-GFP MEF-Zellen. Die oberste Reihe zeigt Hep2-Zellen in Kokultur mit MEF-Zellen in MEF-Medium nach 168 h Inkubation. Die untere Reihe zeigt SAOS-Zellen in Kokultur mit MEF-Zellen nach 144 h in NH-Medium (links) und in MEF-Medium (rechts). Die Belichtungszeit der Fluoreszenzaufnahme betrug 6000 ms, die der Durchlichtaufnahme 800 ms. Die Farben wurden anhand der Grauwertunterschiede der hochauflösenden Schwarzweißaufnahme vom Computer zugeordnet (Pseudokolorierung). Der Maßstabsbalken befindet sich im unteren Bildrand und entspricht 100 μm .

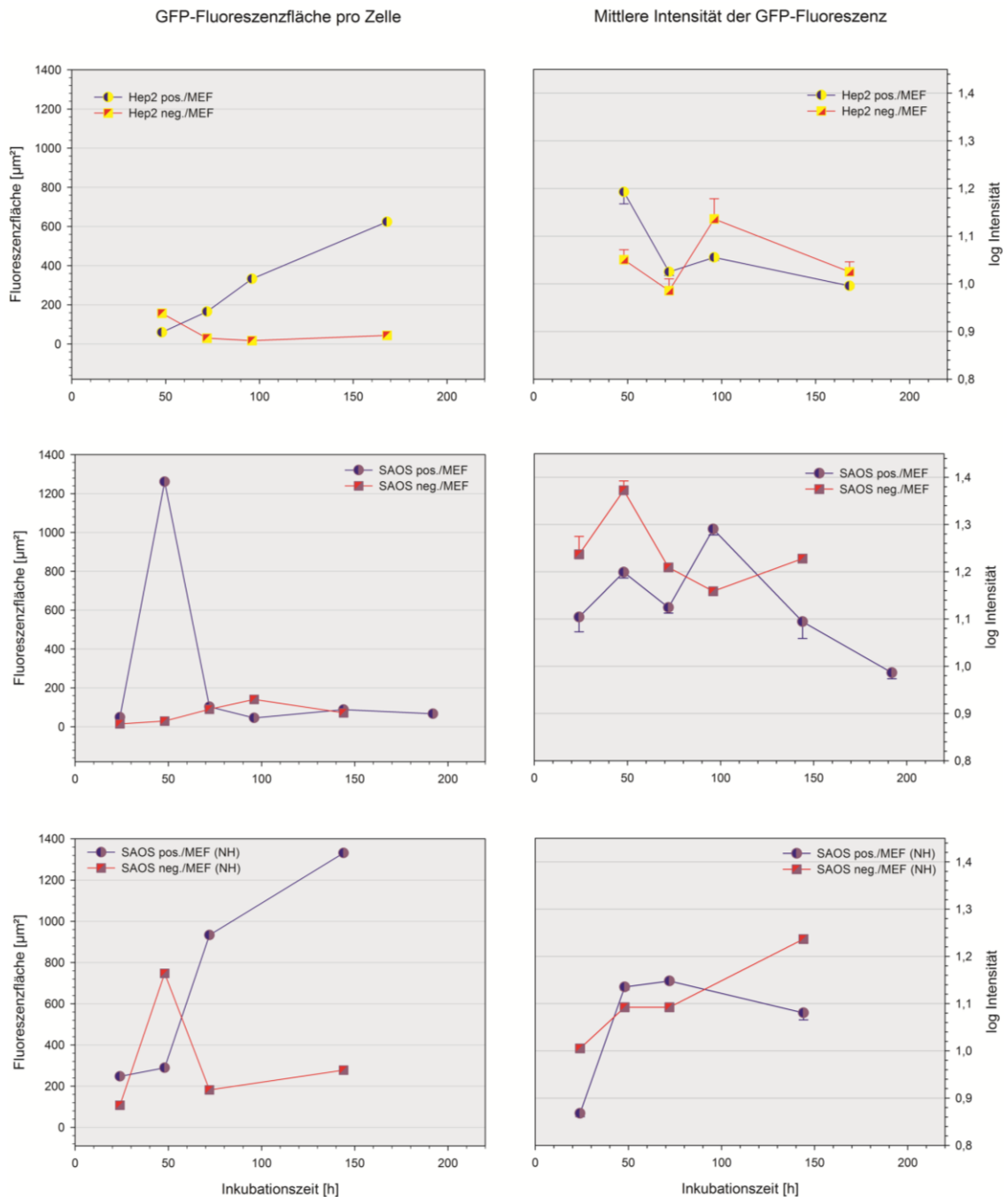


Abbildung 19: Fluoreszenzfläche und -intensität der Oct4-Promotorzellen während der Kokultur mit Hep2- und SAOS-Zellen im MEF- und NH-Medium. In der linken Spalte der Abbildung ist die Inkubationszeit in Abhängigkeit der Fluoreszenzfläche pro Zellen aufgetragen. Rechts ist die Inkubationszeit in Abhängigkeit der GFP-normalisierten Fluoreszenzintensität abgebildet. Ausgewertet wurden Fluoreszenzaufnahmen von Oct4-GFP MEF-Zellen, die mit den nach dem Oberflächenmarker Stro-1 sortierten Tumorzelllinien, SAOS und Hep2 kokultiviert wurden. In der rechten Spalte wurde das Konfidenzintervall für die jeweiligen Werte in der Grafik angegeben. Die Hep2-Zellen wurden in MEF-Medium kultiviert, die SAOS-Zellen in NH- (unterste 2 Grafiken) und MEF-Medium (mittlere 2 Grafiken). Die Messungen wurden anhand der Grauwerte der Originalbilder vorgenommen. Die Messwerte und Statistik sind den A-Tabellen 12 und 13 zu entnehmen.

In einem weiteren Versuch galt es zu überprüfen, ob die beobachtete Übertragung von Oct4 von den Tumorzellen auf die Promotorzellen durch Exosomen verursacht wurde. Dazu wurden 2 getrennte Versuchsanordnungen durchgeführt. Die exosomenpartikelhaltigen Überstände wurden jeweils 48 und 72 h nach Aussaat der SAOS/Hep2-Zellkulturen gewonnen. Die Versuchsansätze wurden täglich für die Dauer von 4 Tagen mikroskopisch überwacht. In keinem der beiden Versuchsansätze konnte eine Fluoreszenz der MEF-Promotorzellen beobachtet werden. Die beiden Versuchsansätze belegen, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Übertragung von Oct4 von Hep2- oder SAOS-Zellen auf die MEF-Promotorzellen durch Exosomen stattfindet.

Zusammenfassung

Sowohl Stro-1⁺- als auch Stro-1⁻-Zellen der Zelllinien SAOS und Hep2 übertragen Oct4 auf die Promotorzellen. Eine Übertragung von Exosomen konnte ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenzmessung ergibt jedoch eine größere Fluoreszenzfläche der Promotorzellen in der Kokultur mit den Stro-1⁺-Zellen. Die zeitabhängige Expression von GFP in den Promotorzellen der SAOS-Kokultur ist abhängig vom Kulturmedium. Eine schnellere Entwicklung von Fläche und Intensität wird im MEF-Medium, ein langanhaltender Verlauf beider Parameter im NH-Medium erreicht.

Es war daher notwendig im nächsten Schritt die Genexpression von *Oct4* in den Tumorzellen nachzuweisen. Ferner sollte geklärt werden, ob sich als weitere Pluripotenzfaktoren *c-myc*, *Sox2*, *Nanog* und *Klf4* nachweisen lassen.

3.3 Übertragung der Pluripotenzfaktoren von Tumor- auf Somazellen

Um den Nachweis der Übertragung von Pluripotenzfaktoren von Tumorzellen auf somatische Zellen zu überprüfen, wurden zunächst beide Zelltypen auf die Expression der Faktoren *Oct4*, *Nanog*, *c-myc*, *Sox2* und *Klf4* überprüft. Als somatische Zellen dienten dabei HGF-Zellen, die mit den Tumorzelllinien für eine Woche kokultiviert wurden. Um die HGF-Zellen nach der Kokultur von den Tumorzellen separieren zu können, wurden diese vor Versuchsbeginn mit GFP transfiziert und markiert.

3.3.1 Charakterisierung von Tumor- und Somazellen

Mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren erfolgte die Untersuchung der Tumorzelllinien auf Pluripotenzfaktoren. Dafür wurde RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und bestimmte Gensequenzen durch **RT-PCR** (*reverse Transcriptase- Polimerase Chain Reaction*) vervielfältigt. Die RT-PCR stellt dabei eine hochspezifische Methode dar, um bestimmte Gensequenzen auf Transkriptebene zu analysieren. Das Haushaltsgen *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), welches in allen Lebewesen vertreten ist, wurde als Positivkontrolle verwendet. Anschließend wurde das PCR-Produkt durch ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die erhaltenen Banden wurden mittels Sequenzierung analysiert. Bei den zu untersuchenden Markergenen handelte es sich um *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-myc* und *Nanog*. Mit Hilfe der PCR und anschließender Gelelektrophorese wurden Expressionsbanden erhalten. Das Zellmaterial, welches von Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen zur RNA-Gewinnung eingesetzt wurde, unterschied sich in der Zellzahl. Die Anzahl Stro-1⁺-Zellen war geringer.

Bei der Abbildung 20 handelt es sich um die RT-PCR-Ergebnisse von Hep2^{Stro-1⁻}-, Hep2^{Stro-1⁻}-, SAOS^{Stro-1⁺}- und SAOS^{Stro-1⁻}-Zellen. Die Pluripotenzfaktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-myc* und *Nanog* konnten in allen Zellproben nachgewiesen werden. Alle untersuchten Pluripotenzfaktoren, mit Ausnahme von *Klf4*, wurden als klare Banden exprimiert. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsintensität feststellbar. Lediglich bei den SAOS^{Stro-1⁺}-Zellen war die Expression der einzelnen Faktoren geringer.

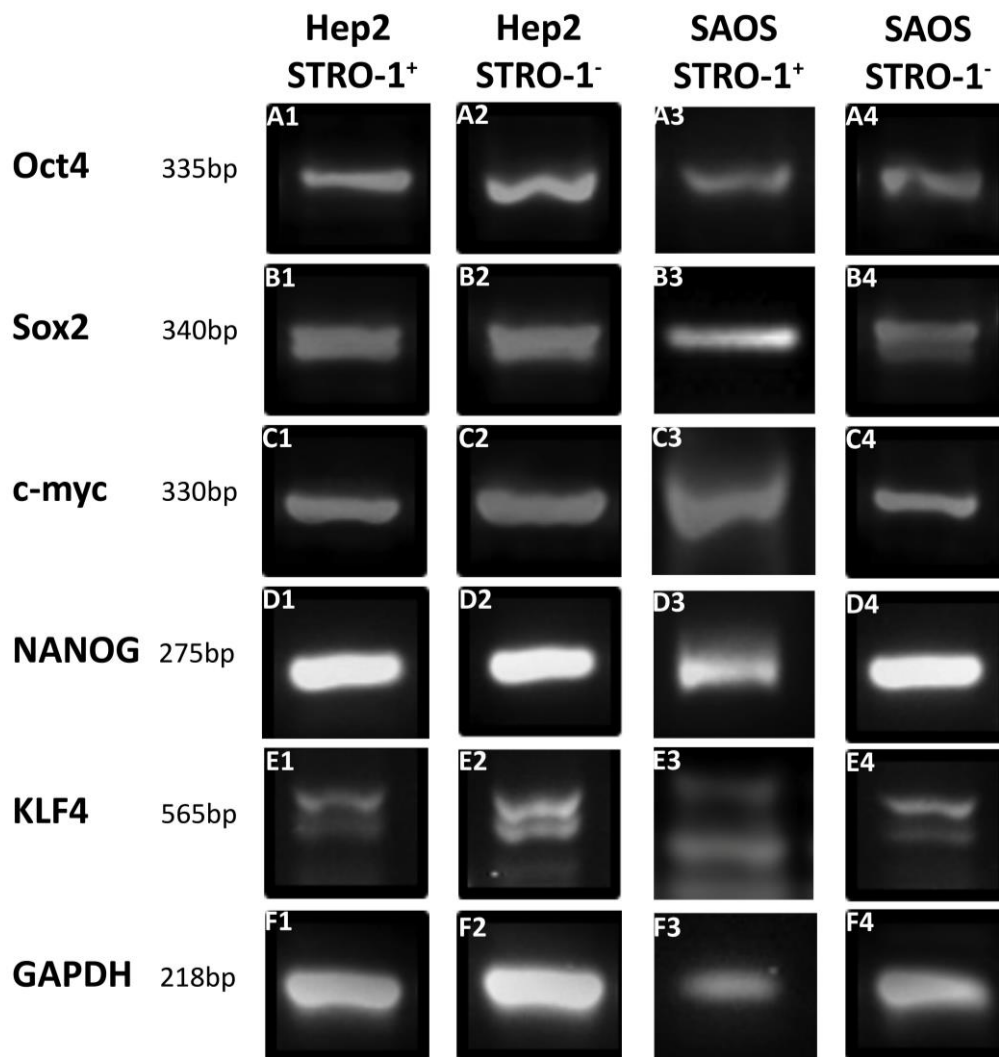


Abbildung 20: Expression von Pluripotenzfaktoren der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Tumorzelllinien. Die Abbildung zeigt das Expressionsmuster von Hep2- und SAOS-Tumorzelllinien, die jeweils nach Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen sortiert worden waren. Die Zellen wurden auf das Expressionsmuster der Faktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-myc*, *Nanog*, *Klf4* untersucht. Zur Kontrolle wurde *GAPDH* verwendet. Nachträglich wurden die Banden B1-2, C1-2, D1-2 und F1-2 von Hep2^{Stro-1+}- und Hep2^{Stro-1-}-Zellen sequenziert. Die Banden C3-4 und D3-4 von den SAOS Zellen wurden ebenfalls sequenziert. Die originalen Gele sind im Anhang dokumentiert (A-Abbildung 1 bis 9).

Eine **Sequenzierung** wurde nicht für alle in der PCR erhaltenen Expressionsbanden durchgeführt, sondern diente einer stichprobenartigen Überprüfung. So konnte eine Expression von *Sox2*, *c-myc* und *Nanog* in Hep2-Zellen bestätigt werden. In den SAOS-Zellen wurde eine Expression von *c-myc* und *Nanog* gezeigt. *GAPDH* wurde zur Kontrolle der *Primer* durch die Sequenzierung der Hep2-Zellen nochmals bestätigt. *Oct4* wurde nicht sequenziert, da dieser Faktor durch das Kokulturerperiment mit den Promotorzellen nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Sequenzierungsergebnisse der Expressionsbanden der Tumorzelllinien Hep2 und SAOS. Die Übereinstimmungen der zu untersuchenden Pluripotenzfaktoren mit den entsprechenden *Primern* (*forward* und *reverse*) wurden in Prozent angegeben. Alle Prozentangaben entsprechen den Übereinstimmungen der jeweiligen Gene mit *Homo sapiens*.

Zellen	Ausgeschnittene Banden	Primer for.	Primer rev.
Hep2	Sox 2	92 %	90 %
Hep2	c-myc	95 %	90 %
Hep2	Nanog	87 %	-
Hep2	GAPDH	98 %	96 %
SAOS	c-myc	95 %	91 %
SAOS	Nanog	90 %	70 %
Prozentübereinstimmung mit <i>Homo sapiens</i>			

3.3.2 Transfektion und Kokulturrexperiment

In einem neuen Versuchsansatz wurden humane Gingivafibroblasten mit GFP transfiziert. Dies diente der Markierung der Zellen. So konnten sie mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) von anderen Zellen, die keine GFP-Markierung trugen, separiert werden. Die erfolgreich mit GFP-transfizierten Zellen wurden daraufhin mit den Tumorzelllinien Hep2 und SAOS kokultiviert. Danach wurden die HGF-Zellen von den Tumorzellen separiert und mittels molekularbiologischer Methoden auf Pluripotenzfaktoren untersucht.

3.3.2.1 Transfektion und Sortierung der HGF-Zellen

Die HGF-Zellen wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben mit GFP transfiziert. Daraufhin erfolgte eine Sortierung der Zellen mit FACS, um die erfolgreich transfizierten HGF-Zellen zu separieren und für den Kokultivierungsversuch mit Tumorzelllinien einzusetzen. Von $7,68 \cdot 10^6$ Zellen wurden $36,989 \cdot 10^3$ Zellen als positiv transfiziert identifiziert (Abbildung 21).

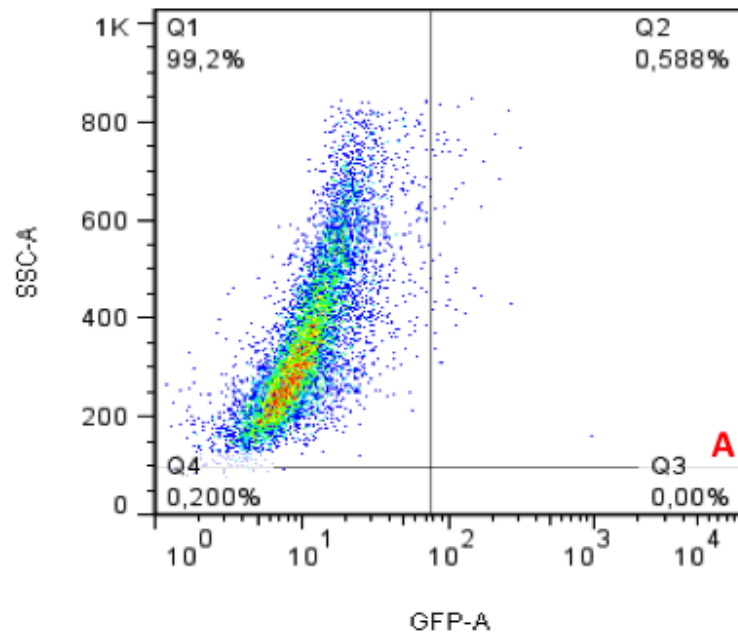


Abbildung 21: FACS-Analyse Nr. 1 der HGF-Zellen. GFP-positiv transfizierte Zellen wurden von nicht transfizierten Zellen separiert.

Die Kokulturen wurden für 7 Tage inkubiert. Zur Kontrolle wurde ebenfalls eine Reinkultur HGF-Zellen angelegt. Die Kontrolle der Kokulturen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Zur Dokumentation wurden mikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 22 und 23).

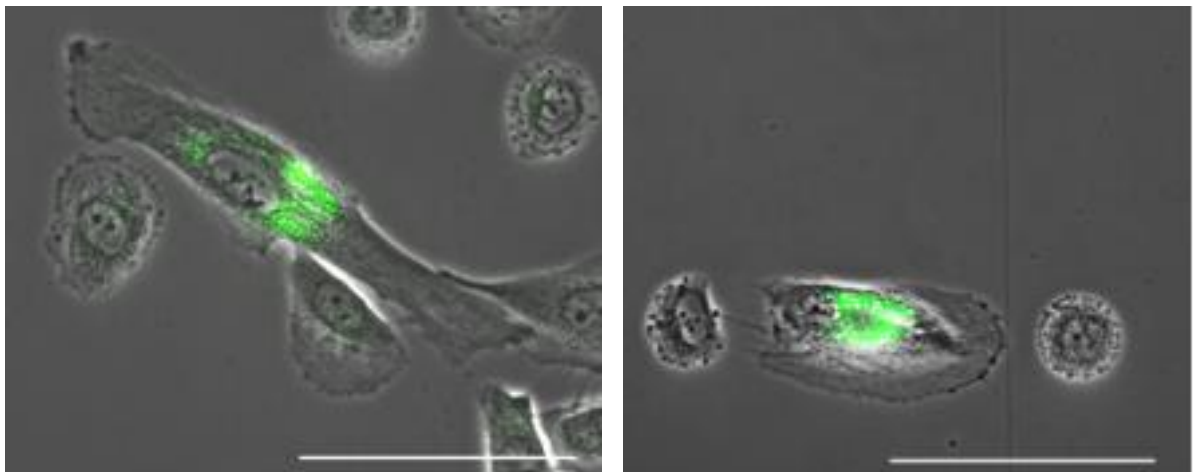


Abbildung 22: Kokulturen von transfizierten HGF-Zellen mit Hep2- und SAOS-Zellen. Die Mikroskopaufnahme links zeigt eine GFP-transfizierte HGF-Zelle zentral in Kokultur mit Hep2-Zellen nach 48 h Kokultivierung. Die rechte Mikroskopaufnahme zeigt eine GFP-transfizierte HGF-Zelle mittig im Bild mit je einer SAOS-Zelle links und rechts. Das Bild wurde 48 h nach Beginn der Kokultivierung aufgenommen. Die Kokultivierung fand in DMEM-Medium statt. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzaufnahme (Pseudokolorierung) betrug 6000 ms, die der Durchlichtaufnahme 800 ms. Der Maßstabsbalken befindet sich im unteren rechten Bildrand und entspricht 100 μm .

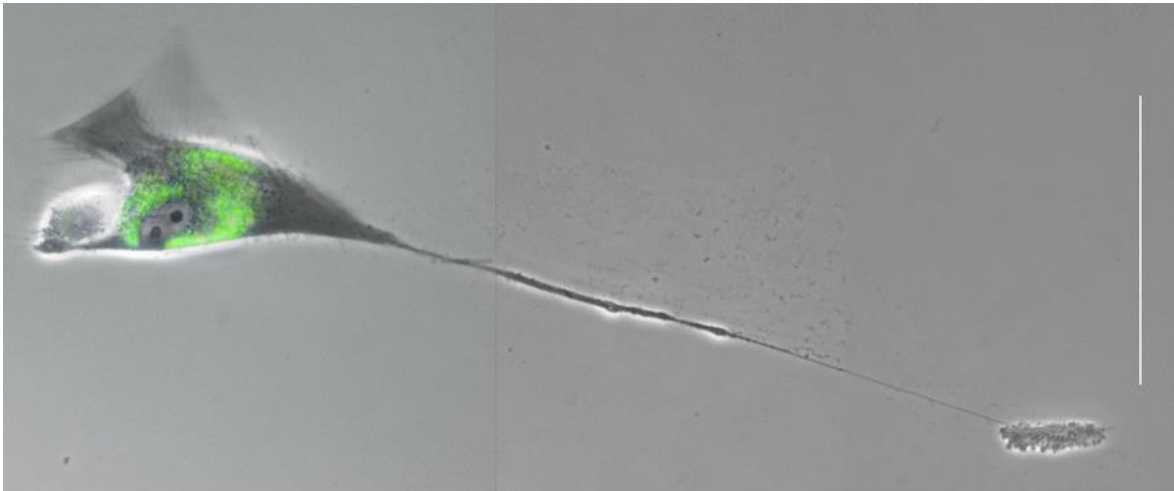


Abbildung 23: Photomerge von einer GFP-transfizierten HGF-Zelle mit langem *Nanotube*. Am HGF-Zellkörper sowie am Ende des *Nanotubes* sitzt eine SAOS-Zelle. Die Kokultivierung fand in DMEM-Medium statt. Die Belichtungszeit der Fluoreszenzaufnahme (Pseudokolorierung) betrug 6000 ms, die der Durchlichtaufnahme 800 ms. Der Maßstabsbalken befindet sich im rechten Bildrand und entspricht 100 μm .

Nach Inkubation wurden die Zellen erneut nach GFP sortiert. Dabei wurden 1555 GFP-positive HGF-Zellen aus der Kokultur von SAOS und HGF-GFP-positiven Zellen sortiert (Abbildung 24 B). Aus der Mischkultur von Hep2- und HGF-GFP-positiven Zellen konnten noch 8016 Zellen mit GFP-Fluoreszenz separiert werden (Abbildung 24 A). Die GFP-positiv sortierten Zellen wurden mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

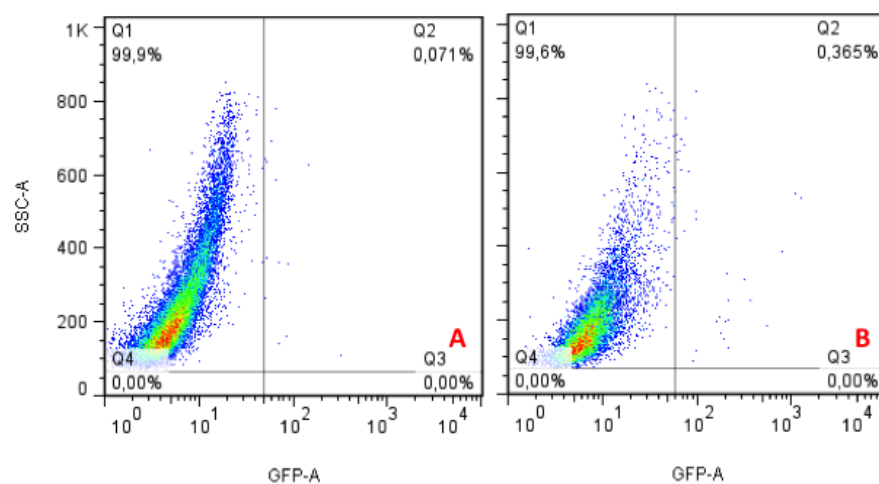


Abbildung 24: FACS-Analyse Nr.2: nach 7 Tagen Kokultivierung. A) zeigt die Sortierung nach GFP der Kokultur Hep2- und HGF-Zellen und. B) die Ergebnisse der Kokultur aus SAOS- und HGF-Zellen. Die GFP-positiven Zellen wurden mit der PCR anschließend auf Pluripotenzfaktoren untersucht.

3.3.2.2 Charakterisierung der HGF-Zellen

Die Abbildung 25 stellt das Expressionsmuster von HGF-Zellen nach **PCR-Analyse** dar. Mit der FACS-Analyse konnte nur eine geringe Zahl GFP-transfizierter HGF-Zellen separiert werden. Auf Grund der geringen Zellzahl wurde zur RNA-Isolation ein RNA mini Kit (NucleoSpin[®]RNA XS, Macherey-Nagel) angewendet. Die Zellen wurden anschließend auf die Pluripotenzfaktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-myc*, *Nanog* und *Klf4* untersucht. Als Kontrolle dienten HGF-Zellen, die nicht mit Tumorzellen kokultiviert wurden. In der Abbildung wird deutlich, dass *Oct4*, *Sox2* und *c-myc* nur bei den HGF-Zellen nachgewiesen werden konnten, die mit SAOS-Zellen kokultiviert wurden. *Nanog* wurde sowohl in HGF-Zellen, die mit SAOS-Zellen als auch mit Hep2-Zellen kokultiviert wurden, durch eine Expressionsbande bestätigt. Auf den Gelen entstanden unscharfe Banden für *Klf4* in beiden Kokulturen. Dabei wurden für die SAOS-HGF-Kokultur zwei Banden ausgebildet. HGF-Zellen, die mit Hep2-Zellen kokultiviert wurden, zeigten eine Expressionsbande für *Klf4*. Es konnte jedoch keine Expression von *Klf4* mittels Sequenzierung nachgewiesen werden. Die HGF-Zellkontrolle, die nicht durch eine Kokultur in Kontakt mit Tumorzellen gekommen war, zeigte auf den Gelen keine Expression der untersuchten Pluripotenzfaktoren. Lediglich das Haushaltsgen *GAPDH*, welches der Überprüfung einer erfolgreichen PCR-Reaktion dient, konnte auf allen Gelen als Bande bestätigt werden.

Um eine Bestätigung der durchgeführten PCR-Analysen im Kokultivierungsversuch der HGF-Zellen zu erhalten, wurden alle erhaltenen Banden sequenziert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Die Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *Sox2* und *c-myc* konnten mittels **Sequenzierung** für die HGF-Zellen, die zuvor mit SAOS-Zellen kokultiviert wurden, bestätigt werden. Lediglich die Sequenzierung mit dem reversen Primer von *Oct4* ergab kein Ergebnis. Die Expression von *Nanog* konnte in beiden Mischkulturen nachgewiesen werden. *Klf4* wurde in keinem der Ansätze der HGF-Zellen bestätigt.

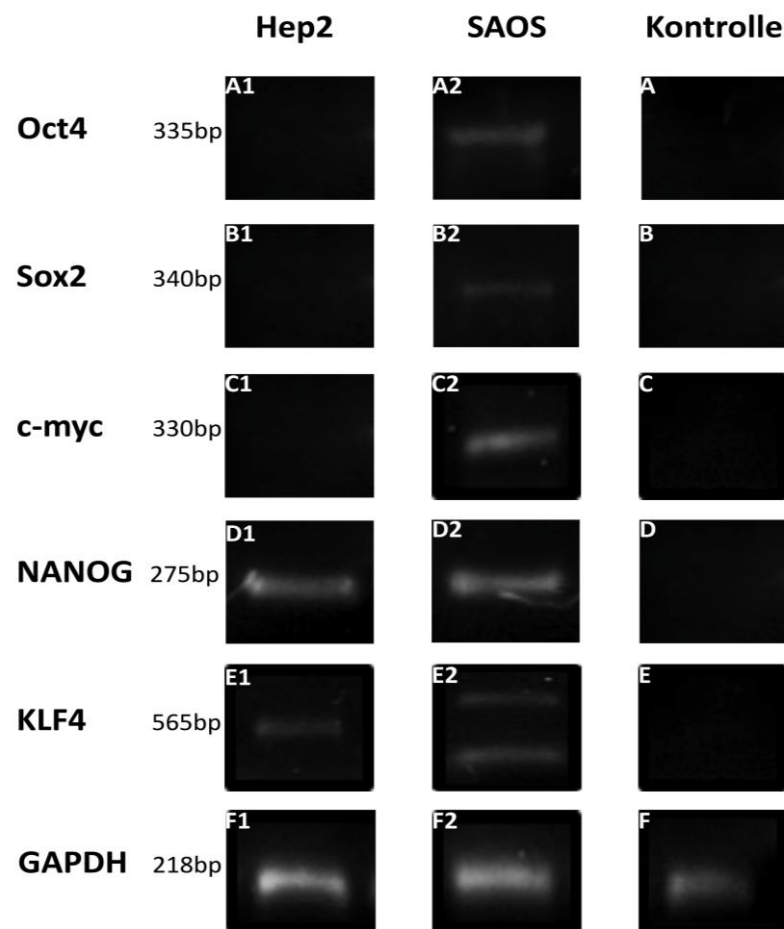


Abbildung 25: Expressionsmuster von HGF-Zellen nach Kokultivierung mit Tumorzellen. Die HGF-Zellen wurden jeweils nach 7 Tagen Kokultivierung mit SAOS- und Hep2-Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden HGF-Zellen verwendet, die nicht mit Tumorzellen kokultiviert wurden. Die Zellen wurden auf das Expressionsmuster der Faktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-myc*, *Nanog* und *Klf4* hin untersucht. Zur Kontrolle wurde *GAPDH* verwendet. Folgende Banden wurden anschließend sequenziert: A2, B2, C2, D2, E2 (SAOS); D1, E1 (Hep2). Die originalen Gele sind im Anhang dokumentiert (A-Abbildung 10 und 11).

Tabelle 12: Sequenzierungsergebnisse der Expressionsbanden von HGF-Zellen nach Kokultivierung mit den Tumorzelllinien SAOS und Hep2. Die Übereinstimmungen der zu untersuchenden Pluripotenzfaktoren mit den entsprechenden *Primern* (*forward* und *reverse*) wurden in Prozent angegeben. Alle Prozentangaben entsprechen den Übereinstimmungen der jeweiligen Gene mit *Homo sapiens*.

Zellen	Ausgeschnittene Banden	Primer for.	Primer rev.
SAOS+HGF	Oct 4	99 %	-
SAOS+HGF	Sox 2	92 %	94 %
SAOS+HGF	c-myc	99 %	99 %
SAOS+HGF	Klf4	-	-
SAOS+HGF	Nanog	90 %	77 %
Hep2+HGF	Klf4	-	-
Hep2+HGF	Nanog	94 %	95 %
Prozentübereinstimmung mit <i>Homo sapiens</i>			

Zusammenfassung

Beide Tumorzelllinien, sowohl Hep2- als auch SAOS-Zellen, exprimieren die Pluripotenzfaktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-myc* und *Nanog*. Eine Expression von *Klf4* konnte in beiden Zelllinien nicht nachgewiesen werden. In Kokultur mit HGF-Zellen übertrugen SAOS-Zellen *Oct4*, *Sox2*, *c-myc* und *Nanog* auf die HGF-Zellen, während den Hep2-Zellen lediglich der Transfer von *Nanog* unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden konnte.

4 Diskussion

Virchow (1859) beschrieb Krebs erstmals als eine Erkrankung der Zelle mit einem zeitabhängigen Entwicklungsprozess. Nach neueren Erkenntnissen erhöhen viele wechselnde Faktoren und Zellinteraktionen die Anpassungsfähigkeit des Tumors und führen zur Ausbildung von Krebsstammzellen (Csermely et al. 2014). Der Einfluss der Tumorstammzelle wurde als erstes in hämatopoetischen Tumoren beschrieben (Bonnet und Dick 1997; Reya et al. 2001) und später auch in soliden Tumoren, insbesondere in Neuroektodermal- und Brusttumoren (Al-Hajj et al. 2003; Gilbertson und Rich 2007). Die Herkunft dieser Stammzellen ist noch nicht vollständig geklärt und kann auch in verschiedenen Tumoren variieren. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von Stro-1⁺-Tumorzellen auf somatische Zellpopulationen untersucht. Dabei wird der Oberflächenmarker Stro-1 zusammen mit Zellpopulationsformationen als Indiz für Stammzeleigenschaften der Tumorzelle betrachtet. Als Arbeitshypothese wird eine Übertragung von Pluripotenzfaktoren auf somatische Zellen angenommen. Grundlage für diese Hypothese bildete die Arbeit von Rolf et al. (2012), in der die Übertragung des Pluripotenzfaktors Oct4 von Stro-1⁺-Zellen des Hirschgeweihperiosts auf andere Zellen nachgewiesen werden konnte. Weitere Hinweise lieferte auch die Arbeit von Niu et al. (2009), die einen Transfer von zytoplasmatischen Proteinen zwischen verschiedenen Zelltypen mittels Membrantransfusion diskutiert. Dieser Transfer wird als wichtiger Aspekt in der Interaktion zwischen Stammzellen und ihren angrenzenden somatischen Zellen angenommen und könnte so auch ein Übertragungsmodell für Tumorzellen, insbesondere für Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften darstellen.

Die Pluripotenzfaktoren sind in der Lage, eine Reprogrammierung in Zellen verschiedenster Spezies hervorzurufen, was zum ersten Mal durch Takahashi und Yamanaka (2006) demonstriert wurde. Danach folgten diverse Arbeiten, die eine Induktion von Pluripotenz durch den Einsatz verschiedener Pluripotenzfaktorkombinationen einleiteten (Kaji et al. 2009; Pan et al. 2010; Park et al. 2008; Tsai et al. 2010; Wernig et al. 2007). Theoretisch besteht daher die Möglichkeit, dass auch Tumorzellen in der Lage sind, exprimierte Pluripotenzfaktoren auf andere somatische Zellen zu übertragen. Diese Hypothese galt es daher zu prüfen. Die Pluripotenzfaktoren könnten so einen Prozess der Reprogrammierung in den

somatischen Zellen einleiten, der wiederum zu einer vermehrten Proliferationsaktivität und zur schnelleren Ausbreitung bzw. Metastasierung des Tumors führen könnte. Eine Ausbreitung von Tumoren in Form einer malignen Transformation angrenzender somatischer Zellen wäre dann eine neue Theorie für die Tumorprogression und Metastasierung.

Es stellte sich daher als Arbeitshypothese der vorliegenden Untersuchung die Fragen, ob Tumorzellen Pluripotenzfaktoren besitzen, diese übertragen und dadurch andere somatische Zellen in ihrer Umgebung beeinflussen können. Dabei gilt es zu prüfen, ob den Tumornischenzellpopulationen, hier im speziellen den Stro-1⁺-Zellen, eine besondere Rolle bei dieser Übertragung zugesprochen werden muss.

4.1 Diskussion der Methodik

1991 wurde zum ersten Mal der Oberflächenmarker Stro-1 von Simmons und Torok-Storb beschrieben. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen IgM-Antikörper, der zu einem geringen Prozentsatz (ca. 10 %) an mononukleäre Knochenmarkzellen bindet. Die Stro-1-Antikörper wurden mittels Hybridomtechnik durch intrasplenale Immunisierung von Mäusen mit CD34⁺-Knochenmarkzellen erzeugt. Die Hybridome wurden nach ihrer Reaktion auf B- und T-Zelllinien selektiert sowie nach der Reaktion auf CD34-exprimierende Zellen. Hybridome, die diese Kriterien erfüllten, wurden anschließend kloniert (Simmons und Torok-Storb 1991). Stro-1 ist mittlerweile einer der bekanntesten Stammzellmarker (Kolf et al. 2007), der vor allem zur Identifikation von mesenchymalen Stammzellen bzw. mesenchymaler Progenitorzellen intraoraler Gewebe verwendet wird. Dieser scheint aber nur in einer Subpopulation mesenchymaler Stammzellen aufzutreten.

Als Erstes galt es herauszufinden, ob innerhalb der Tumorzelllinien Hep2 und SAOS eine Population mit Stammzeleigenschaften zu identifizieren ist. Als Kriterien zur Identifizierung von Stammzeleigenschaften wurden das Vorhandensein einer Stro-1⁺-Zellpopulation und deren Wachstum in sphärischen Kulturen gewählt. Durch MACS[®]-Sortierung konnte dabei eine Population Stro-1⁺-Zellen herausgefiltert werden. Diese unterschied sich auch bei morphologischer Betrachtung von der Stro-1⁻-Population. Die Zellen wurden dabei in Medium mit fetalem Kälberserum kultiviert, dessen Zusammensetzung nicht bekannt ist (Skottman und Hovatta 2006) und möglicherweise eine Beeinflussung des Verhaltens und der Eigenschaften der Stro-

1⁺-Zellen zur Folge hat. Serum, in diesem Fall fetales Kälberserum, ist in der Lage viele regulatorische Faktoren wie die Zellproliferation, die Zelldifferentierung und die Zellmigration positiv zu beeinflussen. Es besteht aus verschiedenen Proteinen, Vitaminen, Zytokinen, Aminosäuren, Hormonen und Lipiden. Die proliferative Eigenschaft kommt durch das Vorhandensein zahlreicher Wachstumsfaktoren zu Stande (Gronthos und Simmons 1995; Kuznetsov et al. 1997; Müller et al. 2006; Ng et al. 2008; Walthall und Ham 1981; QR Wang et al. 1990). Dennoch ist, wie bereits erwähnt, die Zusammensetzung unbekannt, kann in den verschiedenen Chargen variieren und unterliegt keiner Standardisierung. Gerade in der Aufzucht neuronaler Zellen wird deshalb oft auf Serumzusätze verzichtet. Die serumfreie Aufzucht von Zellen ist aber auch mit dem Verlust vieler Nährstoffe verbunden. Zhu et al. (2006) zeigte unter anderem, dass eine serumfreie Aufzucht zum Zelltod mesenchymaler Zellen führen kann. Generell sollte die Verwendung von Serum also kritisch hinterfragt werden.

In dieser Arbeit konnte jedoch keine Beeinflussung der Zellkultur durch die Verwendung von Serum beobachtet werden. Die Stro-1⁺-Zellkulturen wuchsen in sphärischen Populationen. Innerhalb eines *in-vitro* Experiments scheint eine Sortierung mittels MACS[®]-Technologie und anschließender Kultivierung daher geeignet, um eine Stro-1⁺-Population zu identifizieren. Die Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse der Zellkulturen auf das Verhalten der Tumorzelllinien im Milieu eines lebendigen Organismus muss aber noch abschließend überprüft werden.

Um das Vorhandensein ausgewählter Pluripotenzfaktoren zu überprüfen, wurden PCR-Analysen von den Tumorzelllinien und den HGF-Zellen durchgeführt. Die Methode eignete sich, um die zu untersuchenden Pluripotenzfaktoren auf Genomebene nachzuweisen. Zur Funktionsüberprüfung des Analyseverfahrens wurden neben den zu untersuchenden Proben Leerproben angefertigt und die Expression des Stoffwechsellzyms *GAPDH* getestet. Zusätzliche Gensequenzierungen dienten der Bestätigung der Ergebnisse und der Reduzierung von Fehlern. Bei den zu analysierenden Faktoren handelte es sich um *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *c-myc* und *Klf4*. Signifikante Unterschiede zwischen Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Kulturen konnten in den Experimenten nicht nachgewiesen werden. Um eine genauere Analyse von Stro-1-Subpopulationen durchzuführen, wäre eine Realtime-PCR die geeignete Methode

gewesen, da diese zusätzlich zur qualitativen eine quantitative Probenanalyse ermöglicht. Dies könnte auch eine Fragestellung für zukünftige Arbeiten sein.

Die *Primer*-Länge betrug zwischen 18-30 Oligonukleotiden, d.h. lang genug, um spezifisch für den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt zu sein und kurz genug, um bei der *Annealing*-Temperatur adäquat an die *Template*-DNA zu binden. Bei den Expressionsanalysen von *Oct4* mussten beim *Primerdesign* verschiedene Aspekte beachtet werden. *Oct4* ist ein Transkriptionsfaktor der POU Familie (kodiert durch *Pou5f1*), welcher sowohl eine regulatorische Funktion in pluripotenten Zellen und Keimbahnzellen besitzt sowie wesentlich an der Bildung pluripotenter Zellpopulationen in Säugetierembryonen beteiligt ist (Niwa et al. 2000; Pesce und Scholer 2000). Es gibt viele Diskussionen über die Bestimmung der Expression von *Oct4*, da diese oft ermittelt wird, ohne zwischen den einzelnen Transkriptionsvarianten zu unterscheiden (Liedtke et al. 2008). Des Weiteren sind verschiedenste Pseudogene bekannt, von denen sogar mindestens eine Pseudogenvariante (*POU5F1P1*, NM_001159542) in ein Protein umgeschrieben wird und ebenfalls als Transkriptionsfaktor agieren kann, der allerdings schwächer als *Oct4A* ist (Panagopoulos et al. 2008). Es gibt zwei verschiedene Transkriptionsvarianten für *Oct4*. Die in diesen Experimenten verwendeten *Primer* waren für das erste Exon, welches nur in *Oct4A* (NM_002701) vorkommt, spezifisch. Weiterhin konnte die Transkriptionsvariante *Oct4B* (NM_203289) ausgeschlossen werden, welche als irrelevant für die Pluripotenz im Menschen angenommen wird (Lee et al. 2006). Damit wurde eine größtmögliche Sicherheit der Aussagefähigkeit der Ergebnisse gewährleistet.

Die Tumorzelllinien wurden nun in Kokultivierungsexperimenten mit Mäusefibroblasten und humanen Gingivafibroblasten kultiviert. Bei den Mäusefibroblasten handelte es sich um eine spezielle Zelllinie mit einem GFP-Reportergen. Diese Zellen exprimieren GFP sobald sie *Oct4* produzieren. Die durch das GFP hervorgerufene Fluoreszenz konnte dann mit einem Mikroskop detektiert werden. Die Detektierung von Genexpression ist ein jüngst etabliertes Verfahren in der modernen Forschung (Leffel et al. 1997). Die HGF-Zellen wurden durch eine Transfektion mit GFP markiert. Um unerwünschte Fluoreszenz im Medium zu vermeiden, wurde auf den Einsatz von Antibiotika im Medium bei den mikroskopischen Versuchsansätzen verzichtet, da Antibiotika zyklische Molekülstrukturen aufweisen, die ein Hinter-

grundrauschen der Fluoreszenz bewirken und somit die Auswertung störend beeinflussen. Bei den im Medium oft eingesetzten Antibiotika Penicillin, Gentamycin oder Streptomycin handelt es sich um solche zyklischen Verbindungen, die ebenfalls mit einer bestimmten Wellenlänge fluoreszieren können. Dies würde zu einer diffusen Fluoreszenz bei mikroskopischen Aufnahmen führen und so das Ergebnis verfälschen.

Die GFP Markierung der HGF-Zellen erfolgte mit einem lentiviralen Vektor. Mit der FACS-Analyse konnten die erfolgreich transfizierten Zellen identifiziert und später sortiert werden. Durch die geringe Effizienz der Transfektion stand folglich nur ein geringer Teil GFP-positiver Zellen für das Kokultorexperiment zur Verfügung. Die Zweitsortierung nach GFP-positiven Zellen ergab eine noch geringere Ausbeute. Diese geringe Ausbeute machte eine RNA-Isolierung mit anschließender PCR schwierig. Zur Isolierung wurde deshalb ein NucleoSpin[®] RNA XS- Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Nach der Aufreinigung erfolgte die PCR mit anschließender Gelelektrophorese. Die erhaltenen Banden waren schwach, was wahrscheinlich auf die geringe Zellzahl der Probe zurückzuführen ist. Eine Erhöhung des Analysematerials könnte daher eventuell zu einem deutlicheren Ergebnis führen. Da zum Teil keine Banden zu identifizieren waren, könnte ein Wiederholungsexperiment möglicherweise sogar weitere positive Ergebnisse erzielen. Dennoch beweist der Erhalt einzelner Expressionsbanden klar die Übertragung von Pluripotenzfaktoren. Mit dem Aufbau der Kokultivierungsexperimente konnte so eine mögliche Übertragung von Faktoren bestätigt werden. Durch den Nachweis der Expression von Pluripotenzfaktoren mittels molekularbiologischer Methoden in den somatischen Zellen war prinzipiell eine Aussage über ein verändertes Expressionsmuster in den Zielzellen möglich. Es lässt jedoch keine direkte Aussage über veränderte Proliferationseigenschaften oder bezüglich anderer neugewonnener Tumorzelleigenschaften der somatischen Zielzellen zu. Dies wäre ein Ausblick auf zukünftige Folgeversuche.

Ebenfalls gilt es, die möglichen Übertragungswege der Pluripotenzfaktoren zu prüfen. Dabei sind unterschiedliche Wege der Zellkommunikation denkbar. Um diese Kommunikation weiter einzugrenzen, wurde der Übertragungsweg mittels Exosomen näher untersucht. Die Methode der Exosomen-Isolation wurde angewendet, welche auch schon von Caby et al. (2005) und Koga et al. (2005) beschrieben wurde. Die

Erkenntnisse, die in der vorliegenden Arbeit gesammelt und in der Arbeit von Rolf et al. (2012) publiziert wurden zeigten, dass eine Übertragung des Pluripotenzfaktors Oct4 innerhalb der ersten 24 h bis 72 h nach Beginn der Kokultur mit den MEF-Promotorzellen stattfindet. Daher wurden die Tumorzellen für die Exosomen-Isolation 48 h und 72 h inkubiert, bevor der präparierte Mediumüberstand gewonnen und auf die Oct4-GFP MEF-Zellen gegeben wurde. Der Versuch ergab, dass der Pluripotenzfaktor Oct4 sowohl bei SAOS- als auch bei Hep2-Zellen nicht durch Exosomen übertragen wird. Es handelt sich dabei lediglich um ein Ausschlussverfahren, welches andere Transportwege offen lässt. Des Weiteren ist nur der Pluripotenzfaktor Oct4 untersucht worden. Es gilt also noch abzuklären, ob es einen möglichen Exosomentransport der anderen untersuchten Pluripotenzfaktoren gibt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Einteilung der „Diskussion der Ergebnisse“ richtet sich nach der Gliederung der Ergebnisse. So werden nacheinander die Zellsortierung nach Stro-1, die mikroskopische Untersuchung nach Morphologie und die Kokultivierung der Tumorzellen mit MEF-Zellen diskutiert. Danach erfolgt die kritische Diskussion der Übertragung von Pluripotenzfaktoren und der Ergebnisse der molekularbiologischen Methoden zusammen mit der Diskussion des Übertragungsweges von Pluripotenzfaktoren über Exosomen.

4.2.1 Zellsortierung nach dem Stro-1-Oberflächenmarker

Schon in früheren Arbeiten wurde eine höhere Proliferationsrate sowie eine höhere Rate adhärenter Zellen für Stro-1⁺-Zellen dokumentiert (Oyajobi et al. 1999). Gronthos et al. (2003) beschrieb eine Abhängigkeit der Expression des Oberflächenmarkers Stro-1 und der Anzahl der Passagen. Die von der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuche ergaben eine Abnahme der Expression von Stro-1 mit zunehmender Passagenzahl. Das Vorkommen des Oberflächenmarkers konnte bereits in einigen Geweben wie dem Fettgewebe, im Herz, in der Aorta, im Rektum und in den Beinmuskeln bestätigt werden (Lin et al. 2011). Ebenfalls Stro-1⁺ getestet wurden die Tumorzelllinien PC3, DU145, MCF7, und K562 (Ning et al. 2011) und die Osteosarkom-Zelllinie MG 63 (Gibbs et al. 2005). In der Annahme, dass Tumoren aus verschiedenen Subpopulationen bestehen, wurden die Tumorzelllinien in dieser

Arbeit auch auf den Oberflächenmarker Stro-1 getestet. Beide Zelllinien sowohl Hep2- als auch SAOS-Zellen besaßen eine geringe Population Stro-1⁺-Zellen, die sich aber kontinuierlich in allen Populationen der Zellkulturen nachweisen ließ. Die Hep2-Kultur enthielt im Durchschnitt 1,32 % Stro-1⁺-Zellen. Innerhalb der SAOS-Zellkultur wiesen durchschnittlich 1,97 % der getesteten Zellen den Oberflächenmarker Stro-1 auf (Abbildung 12, A-Tabelle 5-9). Im Vergleich zu Hep2-Tumorkulturen besitzen die SAOS-Zellkulturen einen prozentual höheren Anteil Stro-1⁺-getesteter Zellen. Ein möglicher Grund der prozentual höheren Expression des Stro-1-Oberflächenmarkers kann in der mesenchymalen Herkunft der SAOS-Zellen, im Gegensatz zur ektodermalen Herkunft der Hep2-Zellen, liegen. Die Sortierung nach Stro-1 diente der Eingrenzung einer eventuellen Stammzellnische innerhalb der Tumorzellpopulation. Neben dem Oberflächenmarker Stro-1 konnten in SAOS-Zellen (Zelllinie MG 63) bereits andere charakteristische Stammzellmarker wie CD105 und CD44 nachgewiesen werden (Gibbs et al. 2005), welche als Indikatoren mesenchymaler Stammzellen gelten (CD Li et al. 2005; Simmons et al. 1994). In der zuvor zitierten Arbeit wurde eine Subpopulation von zwei bis zehn Prozent SAOS^{Stro-1+}-Zellen ermittelt. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Im experimentellen Teil der Arbeit wurden rund 2 % der getesteten Tumorzellen als Stro-1⁺-Zellen identifiziert. Mit dem Nachweis von Stro-1 wurde das Vorhandensein einer Subpopulation bewiesen. Dennoch scheint die Expression von Stro-1 nicht stabil. So ergab eine Zweitsortierung, der bereits Stro-1⁺-identifizierte SAOS-Zellen zugrunde lagen, nach einwöchiger Inkubation nur eine Ausbeute von 7,14 % Stro-1⁺-Zellen (A-Tabelle 9). Des Weiteren enthielten die Stro-1⁻-SAOS-Zellkulturen nach erneuter Sortierung wiederum einen geringen Prozentsatz (1,77 %) Stro-1⁺-Zellen (A-Tabelle 9). Dies könnte bedeuten, dass die Expression von Stro-1 von unterschiedlichen Faktoren, wie auch schon von Gronthos et al. (2003) erwähnt wurde, abhängig ist. Die Abnahme der Expression von Stro-1 mit zunehmender Passagenzahl konnte jedoch in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Das oben beschriebene Verhalten der Stro-1⁺-Zellen lässt vermuten, dass die Expression von Stro-1 an den Zellzyklus gebunden ist. Sie wäre somit nur zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Zellentwicklung nachweisbar. Konkret lässt sich jedoch sagen, dass die Expression des Oberflächenmarkers Stro-1 einen dynamischen Prozess darstellt, der möglicherweise zeitlich limitiert ist. Es ist bereits gezeigt worden, dass bestimmte Aktivitätsmuster und die Genexpression durch Faktoren wie Selektionsdruck,

Entwicklungsprozesse oder durch den Einfluss der Tumorumgebung verändert werden können. Ein Beispiel dafür ist eine Studie mit Frauen, die Östrogenrezeptor (ER) positive oder *triple* negative (ER⁻, Progesteronrezeptor⁻ und HER2⁻) Tumoren besaßen. Dabei wurden DNA-Sequenzanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung durchgeführt. So konnte festgestellt werden, dass es in der frühen Entwicklungsphase der Tumore vor allem zu größeren Strukturänderungen mit Genamplifikationen und Gendeletionen in den DNA-Abschnitten kommt. Punktmutationen entstehen jedoch langsam mit der Entwicklung des Tumors (Fox und Loeb 2014; Wang et al. 2014).

Unabhängig davon ist die Weitergabe des Oberflächenepitops an Tochterzellgenerationen nicht gesichert. Es wird vermutet, dass die Stammzellpopulation sowohl der symmetrischen als auch der asymmetrischen Teilung unterliegt, in deren Folge dann undifferenzierte neben differenzierteren Zellpopulation auftreten, welche die Hauptmasse des Tumors bilden (Dalerba et al. 2007). In diesem Zuge könnte die Expression des Oberflächenrezeptors ebenfalls verloren gehen. Die Weiterdifferenzierung der Tumorstammzelle könnte auch durch das Verwenden von fetalem Kälberserum im Kulturmedium begünstigt werden, was bereits im Abschnitt des Material- und Methodenteils diskutiert wurde. Da Stro-1 nicht nur in Stammzellen nachweisbar war (Lin et al. 2011), ist er lediglich als Beweis einer Subpopulation anzusehen, die es näher zu untersuchen gilt.

4.2.2 Morphologische Aspekte der sortierten Zellen

Um die Subpopulation Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen präziser zu charakterisieren, wurden mikroskopische Untersuchungen zu morphologischen Aspekten durchgeführt. Allgemein erschienen die Stro-1⁺-Zellen etwas größer und langgestreckter in ihrer Form. Besonders in den Stro-1⁺-SAOS-Zellpopulationen war ein sphärisches Wachstum der Kultur zu beobachten, sogenannte *sarcosphere* Formationen. Die sphärischen Gebilde von Zellen wurden schon in früheren Arbeiten als Indiz für Stammzeleigenschaften in Zellkulturen beschrieben (Chaichana et al. 2006; Gibbs et al. 2005; Hemmati et al. 2003; Wang et al. 2009). Auch für Hep2- und HeLa-Zellen, die viele Gemeinsamkeiten mit den Hep2-Zellen aufweisen, wurde die Ausbildung von Sphäroiden in Kulturen mit Stammzeleigenschaften erwähnt (Wang et al. 2014; Warriar et al. 2014). Das Vorhandensein des Oberflächenmarkers Stro-1 zusammen mit der Ausbildung sphärischer Kulturen sind zwei Indizien für den Beweis einer

Stammzellnischenpopulation in beiden Tumorzelllinien. Im Zusammenhang mit der morphologischen Betrachtung erfolgte auch eine statistische Auswertung der Zellfläche. Diese unterstützt einerseits die mikroskopischen Befunde, andererseits ergab sich aus ihr ein deutlicher Einfluss des Kulturmediums auf die Zellgröße und Zellform. Die Mikroumgebung scheint also eine entscheidende Rolle für die Entstehung sowie für das Wachstum der Tumorzellen zu spielen. Die sortierten SAOS-Zellen wiesen jeweils einen höheren Medianwert der Zellfläche im NH-Medium auf (Abbildung 15). Für die Hep2-Zellen war dies nicht zutreffend. Die Mittelwerte aller Tumorzellflächen waren im NH-Medium am höchsten. Dieser Zusammenhang zwischen den Tumorzellen und ihrer unmittelbaren Umgebung wird auch als „Ökosystem-Tumor“ bezeichnet, welches ebenfalls ein wichtiger Aspekt in der Metastasierung zu sein scheint (Siegmond-Schultze 2014). In Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass Nährstoffkarenz zur Autophagie der Tumorzellen und zur Einleitung einer reversiblen Ruhephase führt, welche eventuell durch Veränderungen der Mikroumwelt aufgehoben werden könnte (Kenific et al. 2010; Lu et al. 2008). So könnte dieser Einfluss beziehungsweise die Interaktion der Tumoren und Metastasen mit ihrer Mikroumgebung auch ein neuer Ansatz in der Tumorprävention und -behandlung sein (Barcellos-Hoff et al. 2013; Ghesquiere et al. 2014; Quail und Joyce 2013).

4.2.3 Kokultivierung der Tumorzellen und Promotorzellen

Durch Kokultivierung der Tumorzellen mit den Stemgent[®] Oct4-GFP MEF-Zellen (Brambrink et al. 2008) konnte ein indirekter Nachweis der Übertragung des Pluripotenzfaktors Oct4 erbracht werden. Die Tumorzellen dienten dabei als Donorzellen des Pluripotenzfaktors Oct4, die MEF-Zellen als Empfänger- bzw. Detektorzellen. In den Kokulturen Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen begannen Oct4- GFP MEF-Zellen nach 24-48 h zu fluoreszieren und zeigten somit die Oct4-Expression und -Synthese innerhalb der MEF-Zellen an. Diese GFP-Fluoreszenz war sehr variabel und konnte über mehrere Tage in den Kokulturen beobachtet werden. Die schnelle Induktion der Oct4-Produktion und die Einleitung der induzierten Pluripotenz in MEF-Zellen konnten bereits durch Li et al. (2011) und Rolf et al. (2012) demonstriert werden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Oct4 zusammen mit einer Kombination aus vier *small molecules* in der Lage ist, eine Induktion von Pluripotenz auszulösen. Auch in anderen Arbeiten konnte bereits

demonstriert werden, dass der Pluripotenzfaktor Oct4 allein ausreichend ist, um eine induzierte Pluripotenz herbeizuführen (Kim et al. 2009 a ; Kim und Sebastiano 2009 b). Weiterhin wird die Funktion von *Oct4* als Hauptregulator-Gen sowie seine Funktion als bestimmender Faktor für die Reprogrammierung von Zellen diskutiert (Li et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Anstieg der GFP-Fluoreszenzfläche und somit der Oct4-Produktion mit zunehmendem Zeitintervall in der Stro-1⁺-Zellpopulation detektiert werden. Einzige Ausnahme bildeten die SAOS Stro-1⁺-sortierten Zellen, kultiviert in MEF-Medium, deren größte Fluoreszenzfläche nach 48 h Inkubation gemessen wurde. Größere Fluoreszenzflächen der MEF-Zellen innerhalb der Kokulturen mit Stro-1⁺-Zellen lassen eine verstärkte Anregung der MEF-Zellen durch die *Donorzellen* vermuten. Daraus kann geschlossen werden, dass die Stro-1⁺-Population eine höhere Anregung der Oct4-Produktion in den Empfängerzellen verursacht als die Stro-1⁻-Subpopulation. Die mittlere Intensität der GFP-Fluoreszenz verhielt sich in den Kokulturen zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten sehr variabel. Es kann daher kein eindeutiger Trend festgelegt werden. Eine Übertragung von Oct4 zwischen Tumor- und Nichttumorzellen konnte in allen Kokulturen bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass die Zell-zu-Zellübertragung von Pluripotenzfaktoren, speziell von Oct4, prinzipiell möglich ist. Ho et al. (2011) beschrieb eine unabhängige Induktion von Pluripotenz innerhalb verschiedener Spezies. Folglich sollte eine Übertragung von Pluripotenzfaktoren zwischen verschiedenen Spezies, aber auch zwischen verschiedenen Zelltypen, keine Barriere darstellen. Sind Tumorzellen nun in der Lage, Pluripotenzfaktoren auf Zellen ihrer Umgebung zu übertragen, wäre dies eine bislang noch nicht beschriebene Art der Interaktion. Somatische Zellen, in diesem Fall Fibroblasten, könnten in ihren Proliferations- und Differenzierungseigenschaften beeinflusst werden und somit zum aggressiveren Wachstum und zur Ausbreitung des Tumors *in vivo* beitragen. Ein Hinweis darauf, dass eine Reprogrammierung durch Pluripotenzübertragung bei SAOS-Zellen möglich ist, lieferte auch der Versuch von Zhang et al. (2013), bei dem die Zellen reprogrammiert und ausdifferenziert wurden. In dieser Arbeit wurde als Ergebnis ein Verlust der malignen Eigenschaften dieser Zellen beschrieben. Wenn eine Übertragung von beeinflussenden Faktoren von Tumorzellen auf somatische Zellen möglich ist, müssten deren Auswirkungen auf Empfängerzellen weiter untersucht werden. Eine interessante Frage wäre dabei, welcher Zelltyp die

interzellulären Verbindungen in Form der *Nanotubes* initialisiert, die Tumor- oder die Nichttumorzelle?

4.2.4 Übertragung der Pluripotenzfaktoren von Tumor- auf Somazellen

Mittels RT-PCR konnten die Pluripotenzfaktoren *Oct4*, *Nanog*, *c-myc* und *Sox2* in beiden Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Lediglich das Vorhandensein von *Klf4* konnte nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse wurden sowohl für die Stro-1⁺-Subpopulation als auch für die Stro-1⁻-Population nachgewiesen. In diesem Fall konnte also kein Unterschied zwischen den für den Oberflächenmarker positiv und den negativ getesteten Tumorzelllinien festgestellt werden. Gegebenenfalls hätte eine quantitative Analyse des PCR-Produkts mehr Aufschluss erbracht und eventuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Subpopulationen herausgestellt. Die Ergebnisse wurden stichprobenartig mittels Sequenzanalyse bestätigt. Sowohl die Expression von *Oct4* als auch von *Nanog* wurde bereits in SAOS- (Gibbs et al. 2005, Wang et al. 2009) und in Hep2-Zellpopulationen (Wu et al. 2014) in früheren Arbeiten bestätigt. Vor kurzem wurden auch *Oct4*, *Sox2* und *Klf4* in Zellen aus frisch resezierten Larynxtumoren nachgewiesen (Suer et al. 2014). CD133⁺-Zellpopulationen exprimierten dabei erhöhte Level dieser Pluripotenzfaktoren und besaßen eine Chemotherapieresistenz gegen herkömmlichen Therapeutika. Das Vorhandensein der Pluripotenzfaktoren innerhalb der Tumorzellen macht deren Weitergabe an andere Zellen und somit die genetische oder epigenetische Veränderung der Empfängerzelle prinzipiell möglich.

Für einen weiteren Nachweis zur Übertragung der Pluripotenzfaktoren von Tumorzellen auf somatische Zellen wurden exemplarisch HGF-Zellen mit GFP transfiziert. Sie wurden zuvor auf alle fünf Pluripotenzfaktoren negativ getestet. Nach einwöchiger Inkubation mit den beiden Tumorzelllinien konnten einige Pluripotenzfaktoren auch in den HGF-Zellen mittels RT-PCR und Sequenzierung detektiert werden. Nach der Kultivierung der HGF- Zellen mit SAOS-Zellen konnte die Expression von *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* und *c-myc* nachgewiesen werden. Die mit Hep2-Zellen kokultivierten HGF-Zellen exprimierten lediglich *Nanog*.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Kokultur der HGF- als auch der Oct4-GFP MEF-Zellen mit den Tumorzelllinien das *Silencing* der hier untersuchten Gene beendet und zu einer Expression der beschriebenen

Transkriptionsfaktoren führt. Da die Aktivierung der entsprechenden Gene durch die Übertragung von Oct4 in Exosomen ausgeschlossen wurde, kann ein aktiver Transport über Zellfortsätze (*Nanotubes*) angenommen werden, wie er bereits durch Rolf et al. (2012) für die Übertragung von Oct4 bei Rosenstock-Periostzellen nachgewiesen wurde. Der horizontale Gentransfer wurde auch von Trejo-Becerril et al. (2014) diskutiert. Schon 1981 wurde die Hypothese aufgestellt, dass Fragmente von DNA-Abschnitten aus Tumorzellen, die nicht der enzymatischen Degradation unterlagen, andere Zellen transfizieren können (Klein 1981). Goldenberg et al. (2013) zeigten, dass auch eine *in-vivo* Zellfusion zwischen humanen Lymphom- und Nagetierstromazellen möglich ist. Diese Hybridzellen führten zu Tumoren, deren Zellen sowohl die humane als auch die tierische DNA enthielten. Des Weiteren konnte in anderen Versuchen zirkulierende Tumor-DNA im Blutstrom von Tieren, die als Tumormodell dienten (Bendich et al. 1965; Garcia-Olmo et al. 1999; Trejo-Becerril et al. 2003), aber auch in Krebspatienten nachgewiesen werden (Gahan 2012; Leon et al. 1977; Trejo-Becerril et al. 2005; Vlassov et al. 2010). Die zirkulierende DNA könnte hypothetisch über eine passive Transfektion in Zellen aufgenommen werden und deren Eigenschaften beeinflussen.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob Tumorzellen insbesondere Stro-1⁺-Tumorzellen Transkriptionsfaktoren auf „gesunde“ differenzierte Zellen übertragen können. Als Arbeitshypothese wurde daher angenommen, dass es sowohl bei Tumoren epithelialen als auch mesenchymalen Ursprungs Stro-1⁺-Zellen gibt und diese in der Lage sind, die Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog, c-myc, Sox2 und Klf4 auf Nichttumorzellen zu übertragen.

Methodik: Als Tumorzellen wurden eine ektodermale (Hep2-Zellen) und eine mesenchymale (SAOS-Zellen) Zelllinie verwandt, die in Kokulturen mit Oct4-GFP-embryonalen Mausfibroblastenzellen (Stemgent[®]) als Promotorzellen für die Oct4-Übertragung und humanen Gingivafibroblasten (HGF-Zellen) inkubiert wurden.

Ergebnis: Die Kulturen der Hep2-Zellen enthielten $1,32 \pm 0,49$ % Stro-1⁺-Zellen. Der Anteil der SAOS^{Stro-1+}-Zellen betrug $1,97 \pm 0,95$ %. Die Größe der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Populationen beider Zelltypen war stark abhängig vom jeweiligen Kulturmedium. Die Hep2^{Stro-1+}-Zellen sind im MEF-Medium um 35 % größer und im NH-Medium um 10 % kleiner als die Hep2^{Stro-1-}-Zellen. Die SAOS^{Stro-1+}-Zellen hingegen sind im MEF-Medium um 23 % und im NH-Medium um 42 % größer als deren Stro-1⁻-Zellen. Im NH-Medium sind die SAOS^{Stro-1+}-Zellen um 40 % und die SAOS^{Stro-1-}-Zellen um 22 % größer als im MEF-Medium. Die Hep2^{Stro-1+}-Zellen sind hingegen im NH-Medium um 20 % kleiner, während die negativen um 20 % größer als im MEF-Medium sind. In beiden Tumorzelllinien ließen sich der Pluripotenzfaktor *Oct4* und die Transkriptionsfaktoren *c-myc*, *Sox2* und *Nanog* sowohl in den Stro-1⁺- als auch Stro-1⁻-Zellen nachweisen. Die Kokulturen der SAOS- und Hep2-Zellen mit den Oct4-Promotorzellen (Oct4-GFP MEF) ergaben, dass sowohl Stro-1⁺-Tumorzellen als auch die Stro-1⁻-Kollektive beider Linien in der Lage waren, Oct4 zu übertragen. Stro-1⁺-Tumorzellen verursachten eine stärkere Oct4-Produktion in den Oct4-GFP MEF-Zellen, was sich anhand größerer Fluoreszenzflächen des GFP vermuten lässt. In den Kokulturen wurde eine sehr hohe Anzahl von Zell-zu-Zellverbindungen (*Nanotubes*) beobachtet. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird daher angenommen, dass der Transfer der Pluripotenzfaktoren über diese Zellverbindungen abläuft, da die Übertragung von Oct4 durch Exosomen ausgeschlossen werden konnte.

In einem weiteren Versuch sollte die Übertragung von *Oct4* und auch von *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *c-myc* auf humane Gingivafibroblasten überprüft werden. Es konnte zunächst nachgewiesen werden, dass humane Gingivafibroblasten die oben genannten Faktoren nicht selbst exprimieren. Nach einer Woche (7d) der Kokultivierung mit den Osteosarkomzellen exprimierten die HGF-Zellen die Pluripotenzfaktoren *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* und *c-myc*, während die Larynxkarzinomzellen lediglich *Nanog* übertrugen. Die durch die Sequenzierung erhaltenen Gensequenzen bestätigten den Nachweis der untersuchten Transkriptionsfaktoren.

Die dieser Untersuchung zugrundeliegende Arbeitshypothese konnte daher in vielen Punkten bestätigt werden.

Ausblick: Als wesentlicher Aspekt dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Stro-1⁺- als auch die Stro-1⁻-Zellen der Hep2- und SAOS-Zelllinie in der Lage waren, Transkriptionsfaktoren auf Nichttumorzellen zu übertragen. Welche Zellpopulation aus dem Kollektiv der Stro-1⁻-Zellen für die Übertragung verantwortlich ist oder ob grundsätzlich alle Zellen in diesem Restkollektiv diese Fähigkeiten besitzen, ist zukünftig zu untersuchen. Inwiefern die Übertragung der Transkriptionsfaktoren auf die „gesunden“ Zellen möglicherweise eine maligne Transformation einleitet, muss in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

Anhang

Tabellen

In den folgenden A-Tabellen 1 bis 4 werden die eingesetzten Gerätschaften und Materialien aufgezählt.

A-Tabelle 1 : Auflistung der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
AirClean600 PCR Workstation	AirCleanSystems, Creedmoor
ApoTome	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Halbergmoos
AxioCam MRm	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Halbergmoos
Axiovert 200M/ HAL 100	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Halbergmoos
Axiovert 35	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Halbergmoos
BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen
CASY® 18ml Röhren	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Dispensette	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
DNA Engine PTC-200	Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FACS-Analyse 5ml Röhren	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Freezing Container	Thermo Scientific Nalgene, NY
Kühlschrank	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen
Mastercycler® Gradient	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Mikrozentrifuge MC 6	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Pipetten, 1-10ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipetten, 10-20ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipetten, 10-500µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipetten, 100-1000µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenboy®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sterilbank	Biohazard Cleanair En 12469, Woerden, Niederlande
Tiefkühlschrank oben	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen
Tiefkühlschrank unten	Sanyo Electric Biomedical CO. Ltd, Japan. Ewald Innovationstechnik GmbH. Vertrieb Sanyo, Bad Nenndorf
Vortexer, MS 2 Minishaker	IKA GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Zellkulturinkubator	Sanyo Electric Biomedical CO. Ltd, Japan. Ewald Innovationstechnik GmbH. Vertrieb Sanyo, Bad Nenndorf
Zellzählgerät (CASY®)	Schärfe System/Innovatis AG, Reutlingen
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge	HERMLE Z400K, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge, klein	Sigma 2K15C, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

A-Tabelle 2 : Auflistung der Software und deren Hersteller.

Software	Hersteller
Adobe InDesign CS6	Adobe System Inc.
Adobe Photoshop CC	Adobe System Inc.
AxioVision 4.8	Zeiss, Oberkochen
BD FACS™	BD Biosciences
BioDocAnalyses 2.0	Biometra
EndNote X7	Thomson Research Soft
Mac Os Version 10.8.5	Apple Macintosh, USA
NanDrop 1000 3.7.1	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Office XP	Microsoft, Redmond, USA
SigmaPlot	Systat Software GmbH
SigmaScan	Systat Software GmbH
Windows 7	Microsoft, Redmond, USA
Windows XP	Microsoft, Redmond, USA

A-Tabelle 3 : Verwendete Fertigsysteme (Kits) und deren Hersteller.

Kit	Hersteller
iScript® cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden
NucleoSpin® RNA XS	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Physion® High-Fidelity Master Mix	BioLabs Inc., New England
Rnase Free DNase-Set	Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden
Rneasy® Mini-Kit (250)	Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden

A-Tabelle 4 : Zellkulturreagenzien/Molekularbiologie, Zellkulturzubehör und deren Hersteller.

Zellkulturreagenzien	Hersteller
Anti-mouse IgM Microbeads	Miltenyi Biotec, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CASY® clean	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CASY® ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cell Scraper 25cm	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Cryo-Rörchen 1ml	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
CryoTubes, 1,8ml	Nunc, Roskilde, Denmark
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) low glucose, GlutaMAX™	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Merck KGaA, Darmstadt
Eppendorf-Röhrchen 1-2ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Falcon Tube 15ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes
Falcon Tube 50ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Filter 0,2 µl	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
6x Gelladepuffer	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Gentamycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Go Taq Green Master Mix	Promega, Promega GmbH, Mannheim
Imaging Chamber 2	Zell-kontakt GmbH

iQ SYBR[®] Green Supermix	Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iScript[®] cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
L-Glutamin 200mM	SIGMA-ALDRICH COMPANY, Steinheim
Low Binding Tubes	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
LS MACS[®] Separation Columns	Miltenyi Biotec, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS[®]-Puffer	Eigene Herstellung (siehe Anhang)
MACS[®], Multistand	Miltenyi Biotec, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MEM NEAA (100X)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
NH Expansion Medium	MACs Miltenyibiotec
NH Expansion Medium	Miltenyi Biotec, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
OPTI-MEM	Invitrogen, life technologies, Darmstadt
Parafilm „M“	PECHINEY PLASTIC PACHAGING, Chicago
Paraformaldehyd	Merck, Merck KGaA, Darmstadt
PBS (without Ca/Mg)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
PCR Soft Tubes, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Penicillin/ Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen 10/20 µl	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen 100 µl	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen 100 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen 1000 µl	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen 200 µl	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Pippette 10ml	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Pippette 25ml	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
2xPhusion[®] Master Mix mit HF Buffer	New England BioLabs GmbH
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Merck KGaA, Darmstadt
Rnase Free Dnase-Set	Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden
RNase-free-water 10ml	Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden
Rneasy Mini-Kit (250)	Qiagen, Qiagen GmbH, Hilden
Roti-GelStain	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Safe-lock Tubes 2,0ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Skalpell	FEATHER SAFETY RAZOR CO., OSAKA
Spitzen 50-1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Spritzen 2ml	BD Discardit II, Mequinenza
β-Mercaptoethanol ≥ 98 %	SIGMA-ALDRICH COMPANY, Steinheim
10x TBE Puffer	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Trypsin (0,025 %)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Vakuum Filter	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
6well-Platten	Greiner, Bio-One GmbH, Solingen
12well-Platten Cellstar	Greiner, Bio-One GmbH, Solingen
24well-Platten, HTS	Corning B.V. Life Science, Netherlands
Zellkulturflasche, 25cm²	Greiner, Bio-One GmbH, Solingen
Zellkulturflasche, 75cm²	Greiner, Bio-One GmbH, Solingen
Zentrifugenröhrchen 15ml (Röhren mit konischem Bogen, Schraubverschluss)	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 50ml (Röhren mit konischem Bogen, Schraubverschluss)	Sarstedt, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht

Tabellen der Sortierungsuntersuchungen Abschnitt 1 Ergebnisse

Hep2 Rohdaten und Sortierung

A-Tabelle 5: Rohdaten der Hep2-Zellkulturen vor der Sortierung. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) aus jeweils 3 Zellzählungen ($n=3$) der entsprechenden Kultur. Mit P sind die jeweiligen Passagen der Zellkulturen benannt, deren gesamte Zellzahl als Summe (Σ) in der letzten Spalte aufgeführt ist.

	Hep2-Zellen		
	MW $\cdot 10^4$	SD $\cdot 10^4$	$\Sigma \cdot 10^4$
Kultur 1 (P17)	4940	57,28	8290
Kultur 2 (P17)	3350	38,35	
Kultur 3 (P10)	6020	1850	25730
Kultur 4 (P10)	5260	97,17	
Kultur 5 (P10)	14450	490	
Summe MW	34020		34020

A-Tabelle 6: Sortierungsergebnis von Hep2-Zellen nach Stro-1. Mittelwerte und Standardabweichungen der Stro-1-Sortierungen von jeweils 3 Messungen der in A-Tabelle 5 aufgeführten Kulturen. Ferner sind die entsprechenden Prozentwerte der Mittelwerte der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Ergebnisse sowie die Summen der entsprechenden Passagen angegeben. In der unteren Zeile sind der mittlere Prozentwert und die Standardabweichung aller Sortierungen, der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen, genannt. Die Zellen aus den Sortierungen S1-S4 entstammen der Passage 17, die Zellen der Sortierungen S5-S10 der Passage10 (A-Tab.5)

	Hep2-Zellen							
	Stro-1 ⁺			Stro-1 ⁻			Stro-1 ⁺	Stro-1 ⁻
	MW $\cdot 10^4$	SD $\cdot 10^5$	$\Sigma \cdot 10^4$	MW $\cdot 10^4$	SD $\cdot 10^4$	$\Sigma \cdot 10^4$	%	%
S1	30,2	7,61	114,58	2249,17	221,97	8259,58	1,32	98,68
S2	34,71	4,69		2141,67	126,1		1,59	98,41
S3	24,45	4,58		1664,17	158,21		1,45	98,55
S4	25,22	3,48		2204,58	65		1,13	98,87
S5	58,67	4,65	305,9	2951,51	29,62	24097,6	1,95	98,05
S6	95,33	15,07		4252,16	29,8		2,19	97,81
S7	29,32	5,6		4329,92	27,26		0,67	99,33
S8	38,65	2,46		4514,72	70,25		0,85	99,15
S9	44,6	1,42		3748,8	15,74		1,18	98,82
S10	39,33	3,57		4300,8	84,38		0,91	99,09
Summe	420,48		420,48	32357,18		32357,18		
Mittlerer Prozentwert \pm SD							1,32 \pm 0,49	98,68 \pm 0,49

SAOS Rohdaten und Sortierung

A-Tabelle 7: Rohdaten der SAOS-Zellkulturen vor der Sortierung. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) aus jeweils 3 Zellzählungen der entsprechenden Kultur. Mit P sind die jeweiligen Passagen der Zellkulturen benannt, deren gesamte Zellzahl als Summe (Σ) in der letzten Spalte aufgeführt ist. Die Kulturen 3 bis 5 der 4. Passage wurden nach erfolgter Sortierung in Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen nach einer Woche Inkubationszeit erneut sortiert. Die Ergebnisse der Wiederholungsbestimmung sind in A-Tabelle 9 aufgeführt.

	SAOS-Zellen		
	MW•10 ⁴	SD•10 ⁴	Σ •10 ⁴
Kultur 1 (P3)	1198,33	25,72	1198,33
Kultur 2 (P6)	712,33	31,63	712,33
Kultur 3 (P4)	2383,33	170,17	6575,83
Kultur 4 (P4)	2570,83	181,56	
Kultur 5 (P4)	1621,67	19,87	
Summe	8486,50		8486,50

A-Tabelle 8: Sortierungsergebnis von SAOS-Zellen nach Stro-1. Mittelwerte und Standardabweichungen der Stro1-Sortierungen von jeweils 3 Messungen der in A-Tabelle 7 aufgeführten Kulturen. Ferner sind die entsprechenden Prozentwerte der Mittelwerte der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Ergebnisse sowie die Summen der entsprechenden Passagen angegeben. In der unteren Zeile sind der mittlere Prozentwert und die Standardabweichung aller Sortierungen der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen genannt. Die Zellen aus den Sortierungen S1-S2 entstammen der Passage 3, die Zellen der Sortierungen S3-S4 der Passage 6 und die Zellen der Sortierungen S5-S10 der Passage 4 (A-Tab.7).

	SAOS-Zellen							
	Stro-1 ⁺			Stro-1 ⁻			Stro-1 ⁺	Stro-1 ⁻
	MW•10 ⁵	SD•10 ⁵	Σ •10 ⁵	MW•10 ⁵	SD•10 ⁵	Σ •10 ⁵	%	%
S1	14,13	1,29	27,78	449,87	8,55	1129,80	3,05	96,95
S2	13,65	4,69		679,93	4,50		1,97	98,03
S3	8,13	2,83	16,08	261,67	0,29	497,53	3,01	96,99
S4	7,94	1,53		235,87	4,17		3,26	96,74
S5	22,92	3,25		872,16	118,06		2,56	97,44
S6	13,48	1,13		910,32	199,15		1,46	98,54
S7	12,43	0,28	86,80	1521,60	66,20	6507,72	0,81	99,19
S8	17,05	3,35		1010,88	269,68		1,66	98,34
S9	11,52	3,33		1261,80	143,74		0,90	99,10
S10	9,40	0,73		930,96	41,58		1,00	99,00
Summe	130,66		130,66	8135,05		8135,05		
Mittlerer Prozentwert ± SD							1,97 ± 0,95	98,03 ± 0,95

SAOS Wiederholungssortierung

A-Tabelle 9: Ergebnis der Wiederholungssortierung von SAOS-Zellen nach Stro-1. Mittelwerte und Standardabweichungen der wiederholten Stro1-Sortierungen von jeweils 3 Messungen der in A-Tabelle 7 aufgeführten Kulturen 3 bis 5(P), denen die Werte der Sortierungen S5 bis S10 in der A-Tabelle 8 zuzuordnen sind. Ferner sind die entsprechenden Prozentwerte der Mittelwerte der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Ergebnisse sowie die Summen der entsprechenden Passagen angegeben. In der letzten rechten Spalte ist der mittlere Prozentwert der beiden Neusortierungen der Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen genannt.

	SAOS-Zellen									
	Stro-1 ⁺			Stro-1 ⁻			Stro-1 ⁺	Stro-1 ⁻	Stro-1 ⁺	Stro-1 ⁻
	MW•10 ⁴	SD•10 ⁴	Σ•10 ⁴	MW•10 ⁴	SD•10 ⁴	Σ•10 ⁴	%	%	MW [%]	MW [%]
S1 Stro-1 pos.	6,17	3,14	6,17	80,20	19,20	80,20	7,14	92,86	7,14	92,86
S2 Stro-1 neg.	13,20	0,68		510,00	20,60		2,53	97,47		
S3 Stro-1 neg.	4,77	2,22	18,00	471,00	16,40	982,00	1	99	1,765	98,235
Summe	24,20		24,20	1060,0		1060,0				

Morphologische Untersuchung in unterschiedlicher Umgebung

A-Tabelle 10: Morphologische Unterschiede von Hep2- und SAOS- Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen in unterschiedlichen Medien. Verglichen werden die Compactness, die max. Länge und die min. Länge. Angegeben sind jeweils der Stichprobenumfang die Median- und Perzentilwerte sowie die Signifikanzen.

Pos. via neg						
Compactness						
Zelllinie	Medium	N	Median	25 %	75 %	
SAOS pos.	MEF	167,00	25,36	21,30	30,59	P=0,005
SAOS neg.	MEF	764,00	23,66	20,36	28,80	
SAOS pos.	NH	485,00	26,32	22,34	31,16	P=0,004
SAOS neg.	NH	575,00	25,12	21,18	29,92	
Hep2 pos.	MEF	21,00	21,87	19,14	24,37	P=0,001
Hep2 neg.	MEF	705,00	26,99	23,68	32,70	
Hep2 pos.	NH	161,00	20,79	18,44	24,65	P=0,001
Hep2 neg.	NH	398,00	24,82	22,18	29,04	
max. Länge						
SAOS pos.	MEF	167,00	79,13	59,82	105,70	P=0,001
SAOS neg.	MEF	764,00	69,19	54,81	85,68	
SAOS pos.	NH	485,00	95,23	75,05	115,54	P=<0,001
SAOS neg.	NH	575,00	76,36	60,94	97,45	
Hep2 pos.	MEF	21,00	76,13	50,00	93,92	P=0,103
Hep2 neg.	MEF	705,00	62,05	51,33	75,87	
Hep2 pos.	NH	161,00	61,01	47,29	76,87	P=<0,001
Hep2 neg.	NH	398,00	67,94	57,07	83,54	

		min. Länge				
SAOS pos.	MEF	167,00	36,27	27,59	46,39	P=0,009
SAOS neg.	MEF	764,00	33,23	26,31	42,26	
SAOS pos.	NH	485,00	42,32	34,59	52,13	P=<0,001
SAOS neg.	NH	575,00	36,02	29,42	45,72	
Hep2 pos.	MEF	21,00	40,36	28,31	51,40	P=0,117
Hep2 neg.	MEF	705,00	33,96	27,05	42,05	
Hep2 pos.	NH	161,00	34,92	29,86	41,73	P=0,052
Hep2 neg.	NH	398,00	37,43	30,79	45,30	

***Mann-Whitney U –Test; ** Angaben in μm^2**

Kokultivierung der Tumorzellen mit Promotorzellen

A-Tabelle 11: Zellflächen von Hep2-, SAOS- und Oct4-GFP MEF-Zellen. Stichprobenumfang, Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen von Hep2-, SAOS- und Oct4-GFP MEF-Zellen in den Medien NH und MEF. Statistische Auswertung mittels One Way Analysis.

Zelllinien	Medium	n	MW	SD	Signifikanz
SAOS	MEF	931	1791,63	43,86	P \leq 0,001
Hep2	MEF	725	1373,91	25,77	
Oct4-GFP	MEF	104	13647,78	2033,61	
MEF					
SAOS	NH	1060	2276,81	42,17	P \leq 0,001
Hep2	NH	559	1632,97	34,61	
Oct4-GFP	NH	42	31685,23	9561,20	
MEF					

One Way Analysis of Variance
Multiple Comparisons versus Control Group (Holm-Sidak method)

Fluoreszenzflächen

A-Tabelle 12: Fluoreszenzflächen von Oct4-GFP MEF-Zellen. GFP-Fluoreszenzfläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten der kokultivierten Oct4-GFP MEF-Zellen, die mit den Hep2- und SAOS- Stro-1⁺- und Stro-1⁻-Zellen in MEF- und NH-Medium inkubiert wurden.

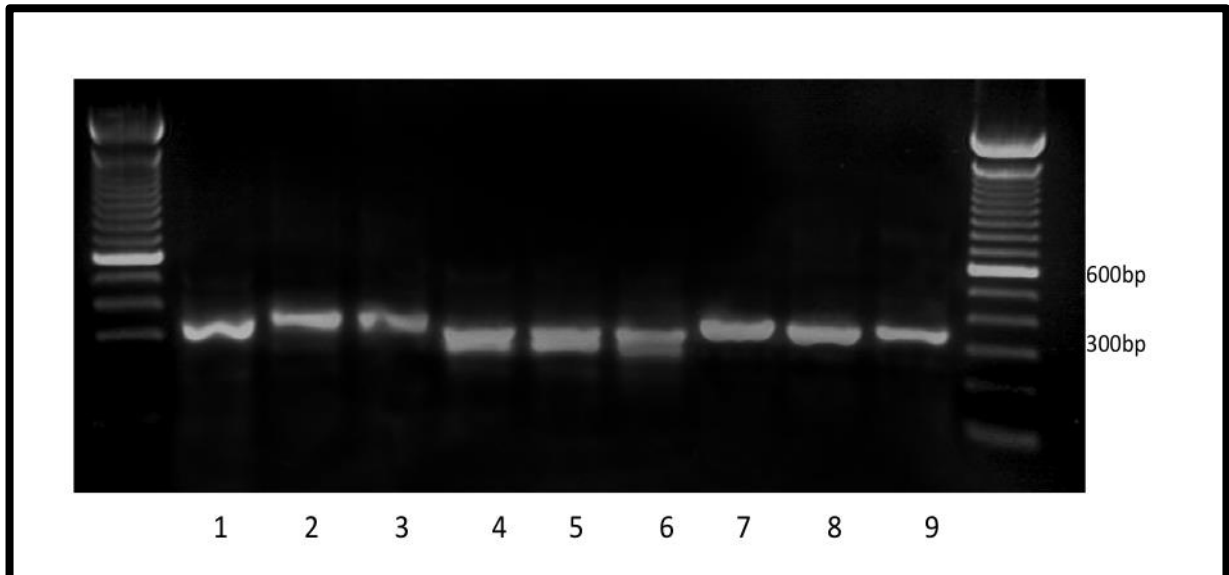
Zeit [h]	Fläche/Zelle [μm^2]	Fläche/Zelle [μm^2]
	Hep2 pos. (MEF)	Hep2 neg. (MEF)
48	59,57	157,00
72	165,25	29,61
96	332,49	17,14
168	623,65	44,14
	SAOS pos. (MEF)	SAOS neg. (MEF)
24	48,88	14,78
48	1260,93	29,33
72	102,77	89,80
96	45,54	141,06
144	88,24	71,62
192	66,68	
	SAOS pos. (NH)	SAOS neg. (NH)
24	247,49	107,27
48	289,19	747,47
72	933,01	181,96
144	1331,33	277,96

A-Tabelle 13 : Mittlere Intensität der Oct4-GFP MEF-Zellen. Normalisierte (Log10 transformierte) Werte der mittleren Intensität der Oct4-GFP MEF-Zellen, welche mit SAOS-und Hep2-Zellen in MEF- und in NH-Medium inkubiert wurden. Die Tumorzelllinien wurden jeweils nach dem Genmarker Stro-1 sortiert. Die statistische Auswertung nach Signifikanz mittels t-Test.

Kokultivierung Oct4-GFP MEF-Zellen mit Hep2 in MEF-Medium						
Zeit [h]	Zelllinie	N	Mean	Std Dev	SEM	
48	Hep2 pos.	156,00	1,19	0,16	0,01	P ≤ 0,001
	Hep2 neg.	127,00	1,05	0,12	0,01	
72	Hep2 pos.	1062,00	1,03	0,13	3,92•10 ⁻³	P ≤ 0,001
	Hep2 neg.	227,00	0,99	0,19	0,01	
96	Hep2 pos.	1056,00	1,06	0,11	3,29•10 ⁻³	P ≤ 0,001
	Hep2 neg.	130,00	1,14	0,25	0,02	
168	Hep2 pos.	2434,00	1,00	0,11	2,13•10 ⁻³	P ≤ 0,001
	Hep2 neg.	260,00	1,03	0,17	0,01	
Kokultivierung Oct4-GFP MEF-Zellen mit SAOS in MEF-Medium						
24	SAOS pos.	190	1,104	0,217	0,0157	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	137	1,237	0,225	0,0192	
48	SAOS pos.	737	1,199	0,173	0,00638	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	446	1,372	0,214	0,0102	
72	SAOS pos.	1120	1,124	0,199	0,00594	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	992	1,209	0,141	0,00449	
96	SAOS pos.	597	1,290	0,156	0,00639	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	1565	1,159	0,127	0,00321	
144	SAOS pos.	318	1,094	0,323	0,0181	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	867	1,228	0,114	0,00386	
Kokultivierung Oct4-GFP MEF-Zellen mit SAOS in NH-Medium						
24	SAOS pos.	2142	0,868	0,169	0,00366	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	1077	1,005	0,129	0,00393	
48	SAOS pos.	2430	1,135	0,155	0,00315	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	5743	1,092	0,0586	0,000774	
72	SAOS pos.	10828	1,148	0,0793	0,000762	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	5743	1,092	0,0586	0,000774	
144	SAOS pos.	692	1,080	0,198	0,00752	P ≤ 0,001
	SAOS neg.	1059	1,237	0,0939	0,00288	
t-Test						

Abbildungen

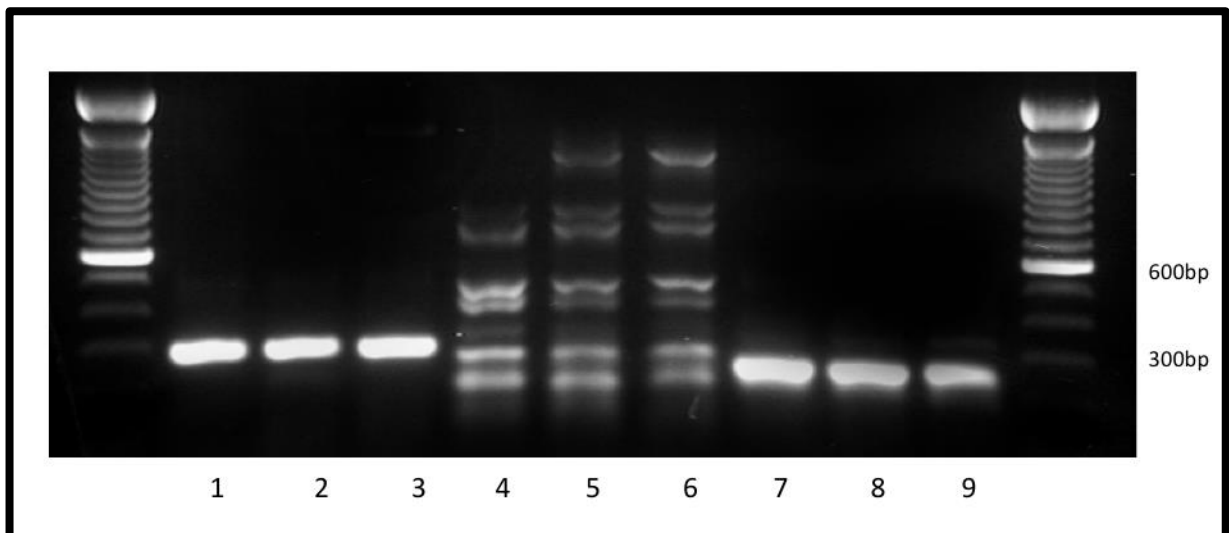
PCR der Tumorzelllinien Hep2 und SAOS



A -Abbildung 1 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Oct4, Sox2 und c-myc.

1:Oct4 Hep2 Stro-1⁻; 2: Oct4 Hep2 Stro-1⁺; 3: Oct4 SAOS Stro-1⁻; 4: Sox2 Hep2 Stro-1⁻; 5: Sox2 Hep2 Stro-1⁺; 6: Sox2 SAOS Stro-1⁻; 7: c-myc Hep2 Stro-1⁻; 8: c-myc Hep2 Stro-1⁺; 9: c-myc SAOS Stro-1⁻

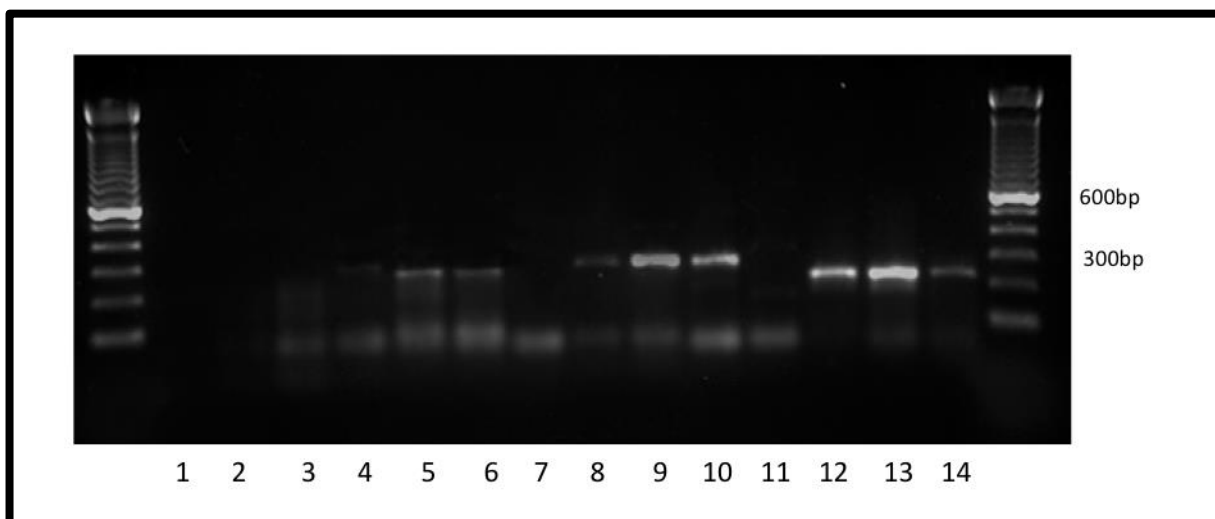
Ladder:100bp



A -Abbildung 2 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Nanog, Klf4 und GAPDH.

1: Nanog Hep2 Stro-1⁻; 2: Nanog Hep2 Stro-1⁺; 3: Nanog SAOS Stro-1⁻; 4: Klf4 Hep2 Stro-1⁻; 5: Klf4 Hep2 Stro-1⁺; 6: Klf4 SAOS Stro-1⁻; 7: GAPDH Hep2 Stro-1⁻; 8: GAPDH Hep2 Stro-1⁺; 9: GAPDH SAOS Stro-1⁻

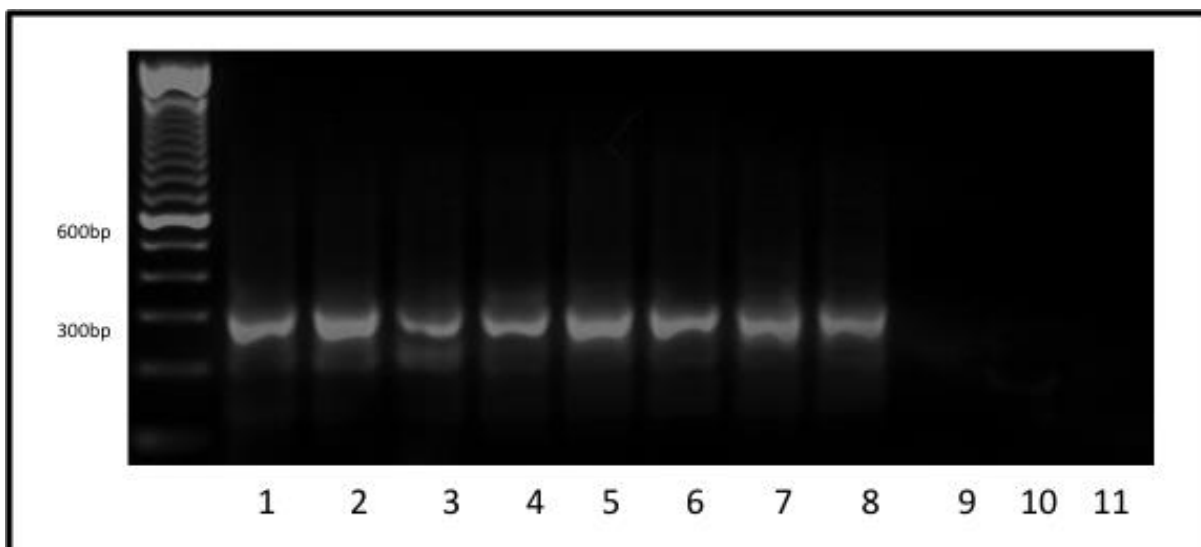
Ladder:100bp



A -Abbildung 3 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Oct4, Sox2, Nanog und GAPDH.

1:Oct4 Hep2 Stro-1⁺; 2: Oct4 Hep2 Stro-1⁻; 3: Oct4 Hep2 Stro-1⁻; 4: Sox2 Hep2 Stro-1⁺; 5: Sox2 Hep2 Stro-1⁻; 6: Sox2 Hep2 Stro-1⁻; 7:blank; 8: Nanog Hep2 Stro-1⁺; 9: Nanog Hep2 Stro-1⁻; 10: Nanog Hep2 Stro-1⁻; 11: blank; 12: GAPDH Hep2 Stro-1⁺; 13: GAPDH Hep2 Stro-1⁻; 14: GAPDH Hep2 Stro-1⁻

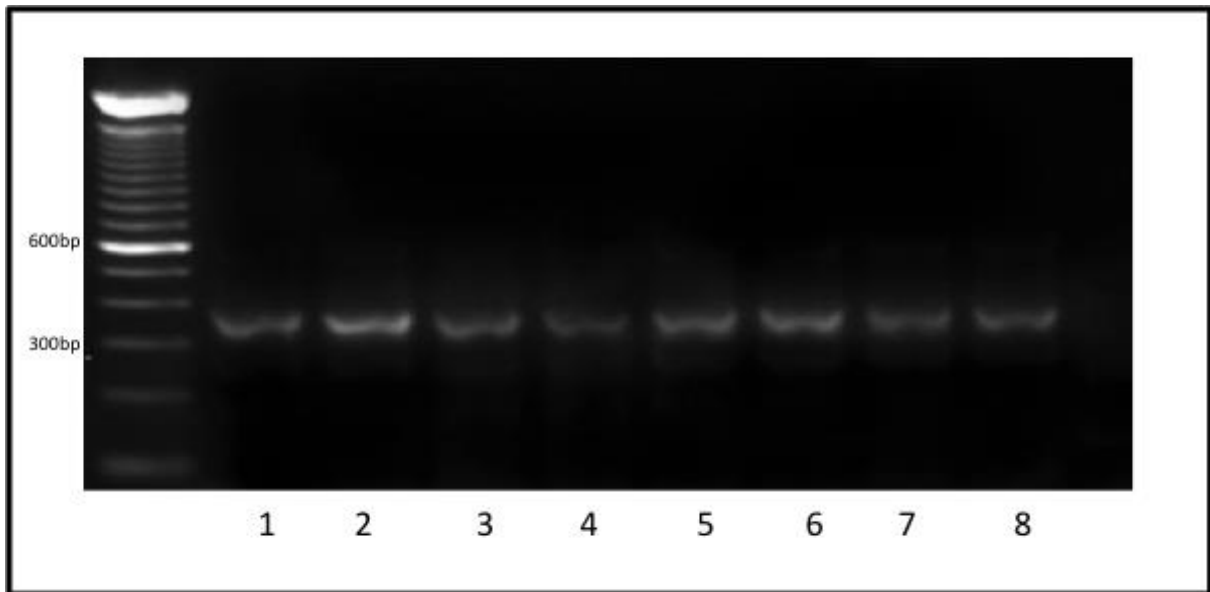
Ladder:100bp



A -Abbildung 4 : Geldokumentation der Expressionsbanden von c-myc.

1: c-myc SAOS Stro-1⁺; 2: c-myc SAOS Stro-1⁺; 3: c-myc SAOS Stro-1⁺; 4: c-myc SAOS Stro-1⁺; 5: c-myc SAOS Stro-1⁻; 6: c-myc SAOS Stro-1⁻; 7: c-myc SAOS Stro-1⁻; 8: c-myc SAOS Stro-1⁻; 9 blank; 10 blank; 11 blank

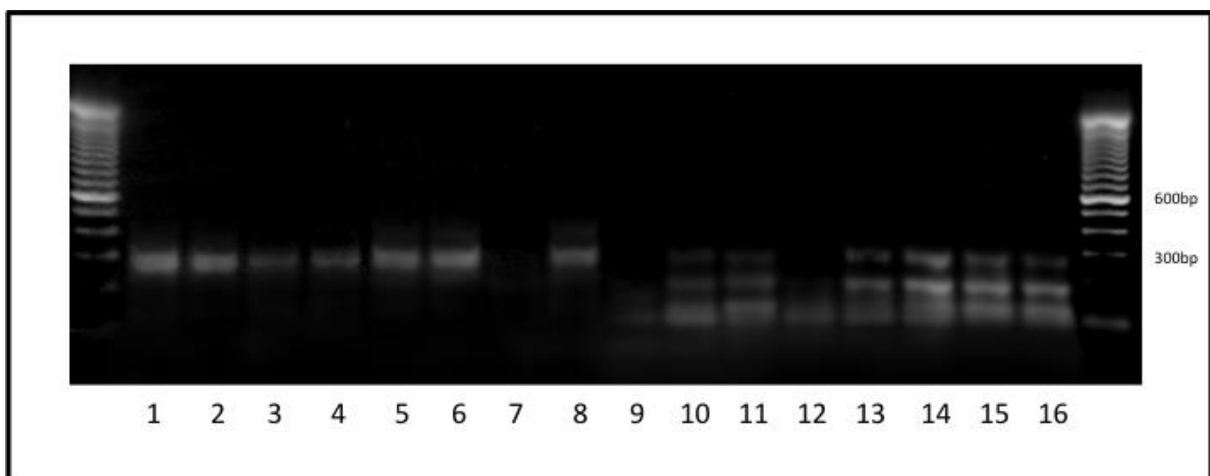
Ladder:100bp



A -Abbildung 5 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Oct4.

1: Oct4 SAOS Stro-1⁺; 2: Oct4 SAOS Stro-1⁺; 3: Oct4 SAOS Stro-1⁺; 4: Oct4 SAOS Stro-1⁺; 5: Oct4 SAOS Stro-1⁻; 6: Oct4 SAOS Stro-1⁻; 7: Oct4 SAOS Stro-1⁻; 8: Oct4 SAOS Stro-1⁻

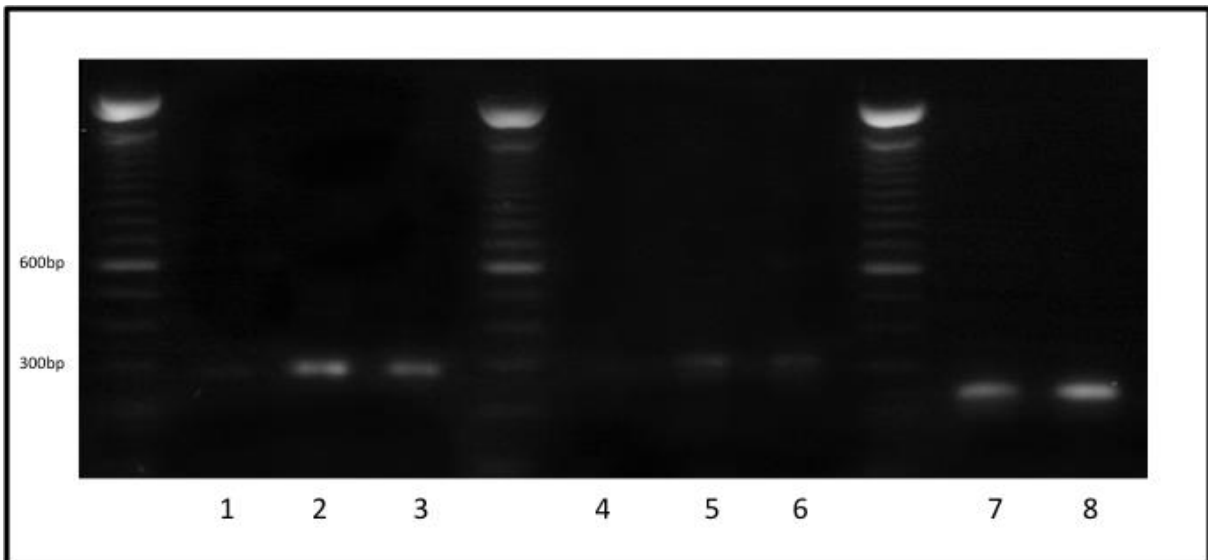
Ladder:100bp



A -Abbildung 6 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Sox2 und Klf4.

1: Sox2 SAOS Stro-1⁺; 2: Sox2 SAOS Stro-1⁺; 3: Sox2 SAOS Stro-1⁺; 4: Sox2 SAOS Stro-1⁺; 5: Sox2 SAOS Stro-1⁻; 6: Sox2 SAOS Stro-1⁻; 7: Sox2 SAOS Stro-1⁻; 8: Sox2 SAOS Stro-1⁻; 9: Klf4 SAOS Stro-1⁺; 10: Klf4 SAOS Stro-1⁺; 11: Klf4 SAOS Stro-1⁺; 12: Klf4 SAOS Stro-1⁻; 13: Klf4 SAOS Stro-1⁻; 14: Klf4 SAOS Stro-1⁻; 15: Klf4 SAOS Stro-1⁻; 16: Klf4 SAOS Stro-1⁻

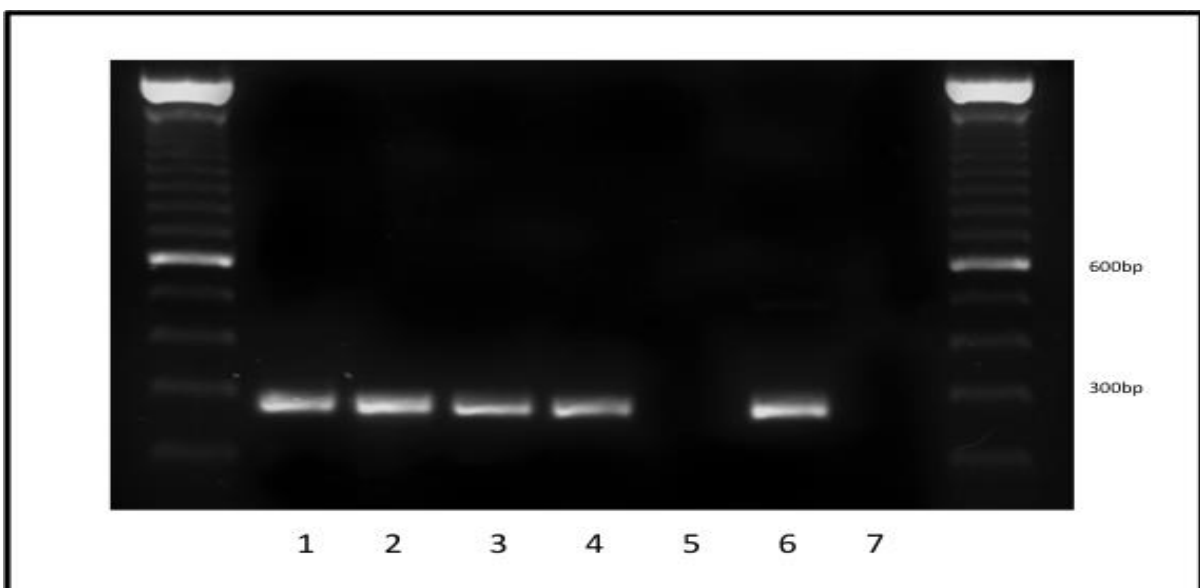
Ladder:100bp



A -Abbildung 7 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Nanog, Sox2 und GAPDH.

1: Nanog Hep2 Stro-1⁺; 2: Nanog Hep2 Stro-1⁻; 3: Nanog Hep2 Stro-1⁻; 4: Sox2 Hep2 Stro-1⁺; 5: Sox2 Hep2 Stro-1⁻; 6: Sox2 Hep2 Stro-1⁻; 7: GAPDH Hep2 Stro-1⁻; 8: GAPDH Hep2 Stro-1⁺

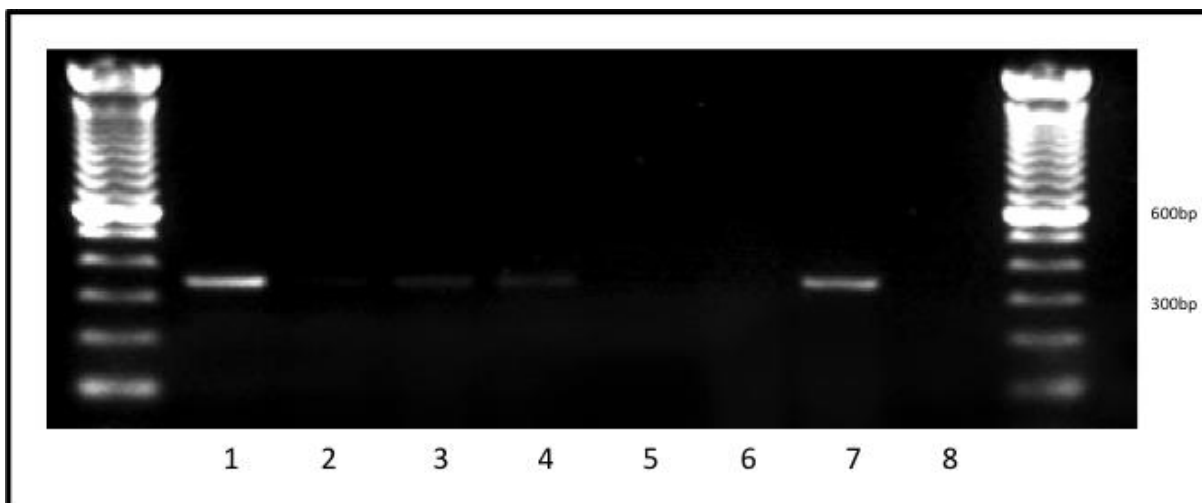
Ladder:100bp



A -Abbildung 8 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Nanog.

1: Nanog SAOS Stro-1⁺; 2: Nanog SAOS Stro-1⁺; 3: Nanog SAOS Stro-1⁺; 4: Nanog SAOS Stro-1⁻; 5: Nanog SAOS Stro-1⁻; 6: Nanog SAOS Stro-1⁻; 7: blank

Ladder:100bp

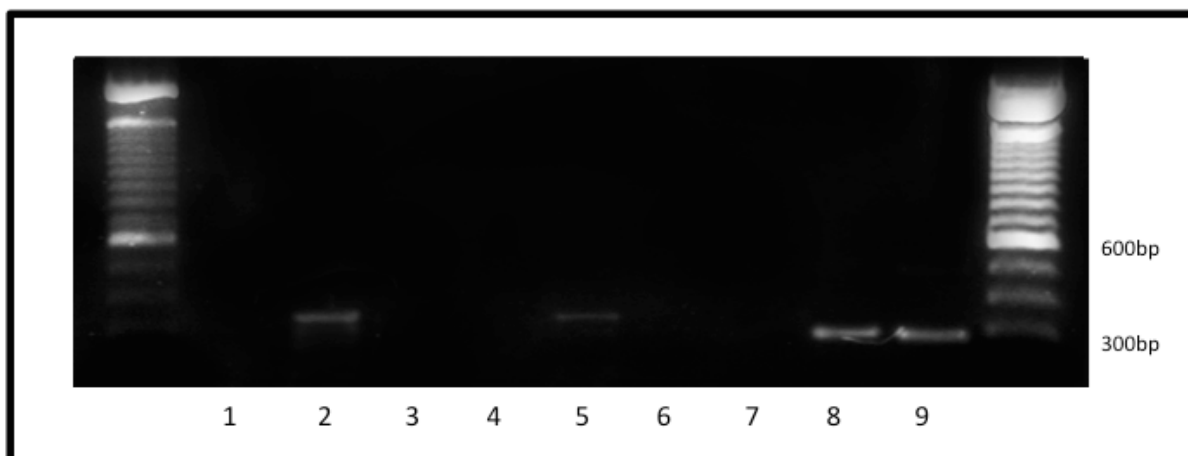


A -Abbildung 9 : Geldokumentation der Expressionsbanden von Sox2 und c-myc.

1:Sox2 SAOS Stro-1⁺; 2: blank; 3: Sox2 SAOS Stro-1⁻; 4: c-myc SAOS Stro-1⁻; 5: c-myc SAOS Stro-1⁺; 6: c-myc SAOS Stro-1⁻; 7: c-myc SAOS Stro-1⁺; 8: blank

Ladder:100bp

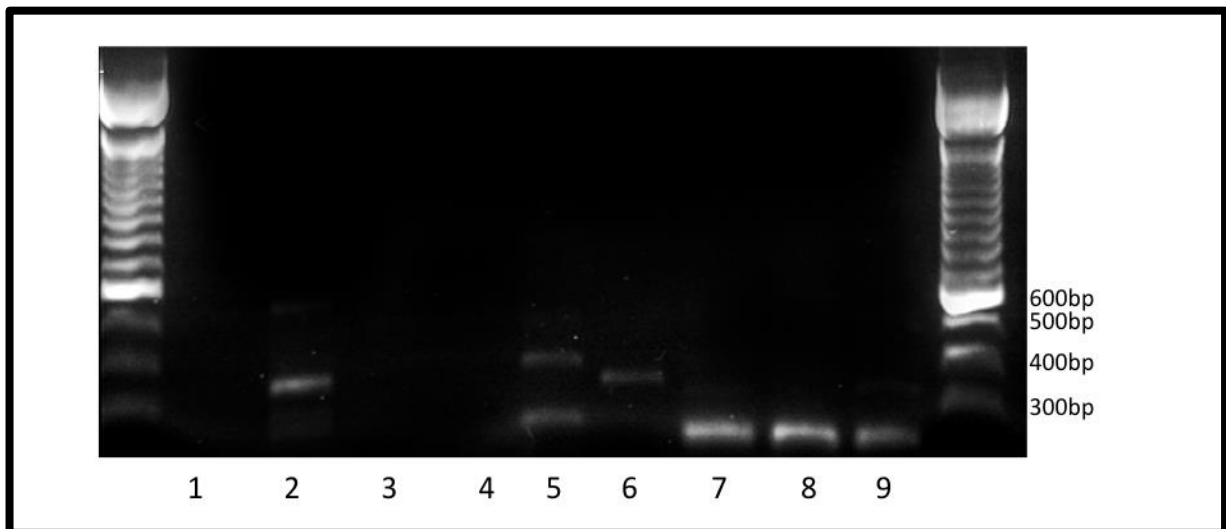
PCR vom Kokulturversuch mit transfizierten HGF-Zellen



A -Abbildung 10 : Geldokumentation der Expressionsbanden transfizierter HGF-Zellen von Oct4, Sox2 und Nanog.

1: Oct4 HGF; 2: Oct4 HGF+SAOS; 3: Oct4 HGF+Hep2; 4: Sox2 HGF; 5: Sox2 HGF+SAOS; 6: Sox2 HGF+Hep2 ; 7: Nanog HGF; 8: Nanog HGF+SAOS ; 9: Nanog HGF+ Hep2

Ladder:100bp



A -Abbildung 11 : Geldokumentation der Expressionsbanden transfizierter HGF-Zellen von c-myc, Klf4 und GAPDH.

1: c-myc HGF; 2: c-myc HGF+SAOS; 3: c-myc HGF+Hep2; 4: Klf4 HGF; 5: Klf4 HGF+SAOS; 6: Klf4 HGF+Hep2 ; 7: GAPDH HGF; 8: GAPDH HGF+SAOS ; 9: GAPDH HGF+ Hep2

Ladder:100bp

Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Walter P, Lewis J, Raff M, Roberts M: *Molekular Biologie of the Cell*. Garland science 5, U S A 2008, 545

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7), 3983-3988

Al-Hajj M, Clarke MF (2004): Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23(43), 7274-7282

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003): Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17(1), 126-140

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006): Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444(7120), 756-760

Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC (2013): The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 13(7), 511-518

Bendich A, Wilczok T, Borenfre.E (1965): Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science* 148(3668), 374-376

Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, et al. (2009): Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(38), 16281-16286

Bonnet D, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7), 730-737

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

Bruce WR, Van Der Gaag H (1963): A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature* 199, 79-80

Bussolati B, Bruno S, Grange C, Ferrando U, Camussi G (2008): Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J* 22(19), 3696-3705

Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C (2005): Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 17(7), 879-887

Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S (2005): LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132(5), 885-896

Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Quintana J, Quinones-Hinojosa A (2006): Neurosphere assays: Growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies. *Stem Cells* 24(12), 2851-2857

- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5), 643-655
- Cheong N, Madesh M, Gonzales LW, Zhao M, Yu K, Ballard PL, Shuman H (2006): Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome. *J Biol Chem* 281(14), 9791-9800
- Cohnheim J (1867): Ueber entzündung und eiterung. *Path Anat Physiol Klein Med* 40, 1-79
- Cohnheim J (1875): Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren. *Virchows Arch* 65, 64
- Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, CohenTannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, LovellBadge R (1996): A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122(2), 509-520
- Cox G: *Optical Imaging Techniques in Cell Biology*. CRC Press, U S A 2012, 169-180
- Csermely P, Hodsagi J, Korcsmaros T, Modos D, Perez-Lopez AR, Szalay K, Veres DV, Lenti K, Wu LY, Zhang XS (2014): Cancer stem cells display extremely large evolvability: alternating plastic and rigid networks as a potential Mechanism: Network models, novel therapeutic target strategies, and the contributions of hypoxia, inflammation and cellular senescence *Semin. Cancer Biol* 30, 42-51
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF (2007): Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58, 267-284
- Durante F, Nesso (1874) fisio-pathologico tra la struttura die nei materni e la genesi de alcuni tumori maligni. *Arch Memor Observ Chir Pract* 11, 217-226
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel R J, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998): A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72(11), 8463-8471
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R (2008): Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15(3), 504-514
- Fogh J, Trempe G (1975): New human tumor cell lines in human tumor cells in vitro. In *Human Tumor Cells in Vitro*. Plenum Press, 115-159
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977 a): Absence of Hela-Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived from Human Tumors. *J Natl Cancer Inst* 58(2), 209-214
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977 b): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59(1), 221-226
- Foulds L (1954): The Experimental Study of Tumor Progression - a Review. *Cancer Res* 14(5), 327-339
- Fox EJ, Loeb LA (2014): Cancer One Cell at a Time. *Nature* 512(7513), 143-144
- Gahan PB (2012): Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer. *Infect Disord Drug Targets* 12(5), 360-370

- Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, Martinez E, Vallejo M (1999): Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histol Histopathol* 14(4), 1159-1164
- Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK (2007): Pluripotency Redux — Advances in Stem-Cell Research. *New Engl J Med* 357(15), 1469-1472
- Ghaleb AM, Nandan MO, Chanchevalap S, Dalton WB, Hisamuddin IM, Yang VW (2005): Kruppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res* 15(2), 92-96
- Ghesquiere B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P (2014): Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* 511(7508), 167-176
- Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, Ghivizzani SC, Ignatova TN, Steindler DA (2005): Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 7(11), 967-976
- Gilbertson RJ, Rich JN (2007): Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 7(10), 733-736
- Goldenberg DM, Gold DV, Loo M, Liu D, Chang CH, Jaffe ES (2013): Horizontal transmission of malignancy: in-vivo fusion of human lymphomas with hamster stroma produces tumors retaining human genes and lymphoid pathology. *PLoS One* 8(2), e55324
- 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
- Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi ST, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003): Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116(9), 1827-1835
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5), 646-674
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003): Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25), 15178-15183
- Ho R, Chronis C, Plath K (2011): Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency. *J Cell Physiol* 226(4) 868-878
- Hochedlinger K, Plath K (2009): Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136(4), 509-523
- Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, Spencer-Dene B, Hossaini S, Abuzinadah M, Li N, Fadhil W, Ilyas M, Bonnet D, et al. (2012): Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem Cells* 30(10), 2076-2087
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu JQ, Smigal C, Thun MJ (2006): Cancer statistics, 2006. *Ca-Cancer J Clin* 56(2), 106-130

- Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, et al. (2009): Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 7(3), 330-338
- Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K (2009): Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458(7239), 771-775
- Kenific CM, Thorburn A, Debnath J (2010): Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol* 22(2), 241-245
- Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Scholer HR (2009 a): Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461(7264), 643-649
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, et al. (2009 b): Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136(3), 411-419
- Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, et al. (2008): Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454(7204), 646-650
- Klein BY (1981): A Suggested Mechanism for Changing Tumor-Cell Phenotype - Transfection of Host-Cells with DNA-Sequences of Dead Tumor-Cells. *Med Hypotheses* 7(5), 645-650
- Knudson AG (1985): Hereditary Cancer, Oncogenes, and Antioncogenes. *Cancer Res* 45(4), 1437-1443
- Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, Yamanaka N, Tasaki A, Nakashima H, Nakamura M, Kuroki S, Tanaka M, et al. (2005): Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes Anticancer. *Res* 25(6A), 3703-3707
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007): Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9(1), 204
- Komitova M, Eriksson PS (2004): Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 369(1), 24-27
- Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG (1997): Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 12(9), 1335-1347
- Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J (2006): The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 281(44), 33554-33565
- Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO (2011): CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell* 9(1), 50-63
- Leffel SM, Mabon SA, Stewart CN, Jr. (1997): Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques* 23(5), 912-918
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977): Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37(3), 646-650

- Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang PH, Mao N (2005): Mesenchymal stem cells derived from human placenta suppress allogeneic umbilical cord blood lymphocyte proliferation. *Cell Res* 15(7), 539-547
- Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ (2005): Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105(2), 635-637
- Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, et al. (2011): Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res* 21(1), 196-204
- Liedtke S, Stephan M, Kogler G (2008): Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biol Chem* 389(7), 845-850
- Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, Lin CS (2011): Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev* 20(10), 1747-1752
- Lu Z, Luo RZ, Lu YL, Zhang XH, Yu QH, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu YH, Mills GB, et al. (2008): The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 118(12), 3917-3929
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003): The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5), 631-642
- Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW (1955): Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 15(9), 598-602
- Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, et al. (2006): Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 8(5), 437-444
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage F H, Verma I M, Trono D (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259), 263-7
- Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmiathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, et al. (2008): PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112(2), 295-307
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95(3), 379-391
- Ning HX, Lin GT, Lue T, Lin CS (2011): Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75kd endothelial antigen. *Biochem Bioph Res Co* 413(2), 353-357
- Niu X, Gupta K, Yang JT, Shambloott MJ, Levchenko A (2009): Physical transfer of membrane and cytoplasmic components as a general mechanism of cell-cell communication. *J Cell Sci* 122(Pt 5), 600-610

- Niwa H, Miyazaki J-i, Smith AG (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24(4), 372-376
- Oyajobi BO, Lomri A, Hott M, Marie PJ (1999): Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody. *J Bone Miner Res* 14(3), 351-361
- Pan C, Lu B, Chen H, Bishop CE (2010): Reprogramming human fibroblasts using HIV-1 TAT recombinant proteins OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC. *Mol Biol Rep* 37(4), 2117-2124
- Panagopoulos I, Moller E, Collin A, Mertens F (2008): The POU5F1P1 pseudogene encodes a putative protein similar to POU5F1 isoform 1. *Oncol Rep* 20(5), 1029-1033
- Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA (1971): Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 46(2), 411-422
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008): Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451(7175), 141-146
- Pesce M, Scholer HR (2000): Oct-4: Control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev* 55(4), 452-457
- Poggi P, Rodriguez y Baena R, Rizzo S, Rota MT (2003): Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 74(5), 623-629
- Quail DF, Joyce JA (2013): Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19(11), 1423-1437
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859), 105-111
- 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(2), e32287
- Siegmund-Schultze N (2014): Auf der Suche nach der Achillesferse der Tumoren. *Dtsch Arztebl* 37 (111), 1512-1516
- Sabban S : Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high- affinity FcεRI receptor. PhD thesis , Sheffield 2011, 97-98
- 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
- Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves S (1994): Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 389, 271-280
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003): Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63(18), 5821-5828
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004): Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015), 396-401

- Skobe M, Fusenig NE (1998): Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *P Nat Acad Sci U S A* 95(3), 1050-1055
- Skottman H, Hovatta O (2006): Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction* 132(5), 691-698
- Steeg PS (2006): Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12(8), 895-904
- Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD (2003): Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 9(4), 493-501
- Suer I, Karatas OF, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Buge O, Cansiz H, Ozen M (2014): Characterization of Stem-Like Cells Directly Isolated From Freshly Resected Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Specimens. *Curr Stem Cell Res Ther* 9, 347-53
- Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4), 663-676
- Tanaka N, Morita T, Nezu A, Tanimura A, Mizoguchi I, Tojyo Y (2003): Thrombin-induced Ca²⁺ mobilization in human gingival fibroblasts is mediated by protease-activated receptor-1 (PAR-1). *Life Sci* 73(3), 301-310
- Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Trevino-Cuevas H, Taja-Chayeb L, Garcia-Lopez P, Segura-Pacheco B, Chavez-Blanco AC, Lizano-Soberon M, Gonzalez-Fierro A, Mariscal I, et al. (2003): Circulating nucleosomes and response to chemotherapy: An in vitro, in vivo and clinical study on cervical cancer patients. *Int J Cancer* 104(6), 663-668
- Trejo-Becerril C, Onate-Onate LF, Taja-Chayeb L, Vanoye-Carlo A, Cetina L, Duenas-Gonzalez A (2005): Serum nucleosomes during neoadjuvant chemotherapy in patients with cervical cancer. Predictive and prognostic significance. *Bmc Cancer* 5, 65
- Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Duenas-Gonzalez A (2014): In vivo rat model to study horizontal tumor progression. *Methods Mol Biol* 1165, 175-185
- Tsai SY, Clavel C, Kim S, Ang YS, Grisanti L, Lee DF, Kelley K, Rendl M (2010): Oct4 and klf4 reprogram dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28(2), 221-228
- Virchow R: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathophysiologische Gewebelehre. Verlag von August Hirschwald, Berlin 1858, 410-430
- Visvader JE, Lindeman GJ (2008): Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8(10), 755-768
- Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY (2010): Circulating Nucleic Acids as a Potential Source for Cancer Biomarkers. *Curr Mol Med* 10(2), 142-165
- Walthall BJ, Ham RG (1981): Multiplication of human diploid fibroblasts in a synthetic medium supplemented with EGF, insulin, and dexamethasone. *Exp Cell Res* 134(2), 303-311
- Wang L, Park P, Lin CY (2009): Characterization of stem cell attributes in human osteosarcoma cell lines. *Cancer Biol Ther* 8(6), 543-552

- Wang L, Guo H, Lin C, Yang L, Wang X (2014): Enrichment and characterization of cancer stemlike cells from a cervical cancer cell line. *Mol Med Rep* 9(6), 2117-2123
- Wang QR, Yan ZJ, Wolf NS (1990): Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the in vitro growth of murine bone marrow CFU-F. *Exp Hematol* 18(4), 341-347
- Wang Y, Waters J, Leung ML, Unruh A, Roh W, Shi X, Chen K, Scheet P, Vattathil S, Liang H, et al. (2014): Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* 512(7513), 155-160
- Warrier S, Bhuvanlakshmi G, Arfuso F, Rajan G, Millward M, Dharmarajan A (2014): Cancer stem-like cells from head and neck cancers are chemosensitized by the Wnt antagonist, sFRP4, by inducing apoptosis, decreasing stemness, drug resistance and epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Gene Ther* 21(9), 381-388
- Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ (2005): Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat Rev Cancer* 5(8), 591-602
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku MC, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007): In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151), 318-U312
- Wu CP, Du HD, Gong HL, Li DW, Tao L, Tian J, Zhou L (2014): Hypoxia promotes stem-like properties of laryngeal cancer cell lines by increasing the CD133+ stem cell fraction. *Int J Oncol* 44(5), 1652-1660
- Yuan X, Wan H, Zhao X, Zhu S, Zhou Q, Ding S (2011): Brief report: combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. *Stem Cells* 29(3), 549-553
- Zani BG, Edelman ER (2010): Cellular bridges: Routes for intercellular communication and cell migration. *Commun Integr Biol* 3(3), 215-220
- Zhang X, Cruz FD, Terry M, Remotti F, Matushansky I (2013): Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming. *Oncogene* 32(18), 2249-2260, 2260 e2241-2221
- Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X (2006): Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(2), 416-425
- Zufferey R, Dull T, Mandel R J, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998): Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72(12), 9873-80

Danksagung

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Wiese möchte ich meinen herzlichen Dank, für die Überlassung des Promotionsthemas, die zielgerichtete Betreuung, die kreativen Ideen verbunden mit der steten Diskussionsbereitschaft aussprechen. Danke auch an Dr. rer. nat. Rolf, der die Arbeit sowohl im Labor als auch in der Theorie ideenreich unterstützt hat. Ich möchte mich auch bei dem gesamten Laborteam der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für die tatkräftige Unterstützung bedanken. Bei Herrn T. Aung bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Transfektion der HGF-Zellen, die freundlicherweise im S2 Labor von Prof. Wulf (der Klinik Hämatologie und medizinische Onkologie; Leiter: Prof. Dr. L. Trümper). Vielen Dank auch an Frau S. Becker für die Unterstützung der Durchführung der FACS-Analyse.

Curriculum vitae

Am 26.03.1985 wurde ich, Julia Walter, in Berlin geboren. Vom September 1991 bis Juni 1997 besuchte ich die Melli-Beese-Grundschule und von September 1997 bis Juni 2005 das Philippe-Cousteau-Gymnasium in Berlin, das ich mit der Hochschulreife abschloss. Von August 2001 bis August 2002 verbrachte ich ein High School Jahr in Idaho/ U.S.A.

Von August 2006 bis Juli 2008 erfolgte eine Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der Lise- Meitner- Schule in Berlin. Im Rahmen dieser Ausbildung nahm ich am Leonardo Austauschprogramm teil und arbeitete 3 Monate als BTA am Ozeanographischen Institut STARESO auf Korsika. Im Anschluss arbeitete ich von Januar bis März 2009 als BTA am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch.

Im April 2009 begann ich mein Zahnmedizin Studium an der Georg-August-Universität in Göttingen und beendete im Juli 2014 erfolgreich das Studium mit dem Staatsexamen. Während des Studiums nutzte ich das 9. Semester für einen Studienaufenthalt, gefördert von der Europäischen Union, an der Universität Segalen Bordeaux II, in Bordeaux. Im dritten und fünften Jahr wurde ich mit dem Deutschlandstipendium ausgezeichnet.

Seit 1. Oktober 2014 arbeite ich als Assistenz Zahnärztin in einer Zahnarztpraxis in Berlin.