

**Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt – Diabetes Zentrum
des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke



Isolierung von adulten humanen Haarfollikel-
Stammzellen und Versuche zur Transdifferenzierung in
endokrine Progenitorzellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Michaela Maria Hummel

aus

München

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Seißler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Wolff
Prof. Dr. Klaus G. Parhofer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2011

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jochen Reißler, dem Leiter des Diabetes-Zentrums der Medizinischen Klinik Innenstadt (Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität), für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Seine engagierte Betreuung und seine konstruktiven Anregungen waren für mich sehr wertvoll und haben zur Erstellung dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus und Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Michael Ehrenfeld für ihre Hilfe, wodurch meine Arbeit entscheidend vorangebracht werden konnte.

Herr Dr. med. Helmut Arbogast hat meine Arbeit durch die Bereitstellung von Pankreasproben sehr unterstützt. Ich danke auch seinen medizinisch-technischen Assistenten für die gute Zusammenarbeit.

Frau Monika Offers, Frau Miriam Nath und Frau Dr. rer. nat. Christine Sattler möchte ich für die gute Einarbeitung, für ihre Hilfsbereitschaft bei gelegentlichen Fragen und Problemen und für ihre freundliche Unterstützung in der Zellkultur und zahlreichen anderen Labortätigkeiten danken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Anteilnahme und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Stammzellen	7
1.2.1	Embryonale Stammzellen	7
1.2.2	Adulte Stammzellen	10
1.2.3	Alternative Quellen für autologe Stammzellen	11
1.2.4	Adulte Stammzellen aus der Haut und aus Hautanhangsgebilden	13
1.2.5	Der Haarfollikel	15
1.2.6	Die Stammzellen des Haarfollikels	19
2	Fragestellung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Reagenzien	24
3.1.2	Kits	26
3.1.3	Antikörper	26
3.1.3.1	FACS-Antikörper	26
3.1.3.2	Antikörper für die Immunhistologie	27
3.1.3.3	Antikörper für Immunfluoreszenz	28
3.1.3.4	Medien und Puffer	28
3.1.4	Geräte	28
3.1.5	Verbrauchsmaterial	29
3.2	Methoden	31
3.2.1	Versuche zur Gewinnung von Haarfollikelstammzellen	31
3.2.1.1	Isolierung von Zellen aus gezupftem Körperhaar	31
3.2.1.2	Isolierung von Zellen aus humanen Kopfhautgewebeproben	32
3.2.2	Zellkultur	33
3.2.2.1	Zellkulturmedien	33
3.2.2.2	Kulturbedingungen	35
3.2.3	Beschichtung der Wellplatten und Zellkulturschalen	35
3.2.3.1	Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin	35
3.2.3.2	Gelatine	36
3.2.3.3	Kollagen	36
3.2.3.4	Fibronectin	36
3.2.4	Analyse der Proliferationsrate der Haarfollikelzellen	36
3.2.5	Colony-Forming-Unit-Assay	36
3.2.6	Analyse der Genexpression mittels RNA-Isolierung	37
3.2.7	cDNA-Synthese (reverse Transkription der mRNA)	38
3.2.8	Herstellung der PCR-Positivkontrollen	39
3.2.8.1	RNA-Präparation aus humanem Pankreasgewebe	39
3.2.8.2	Kultivierung der Zelllinie HACAT	40
3.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
3.2.10	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.2.11	Histologie	43
3.2.11.1	HE-Färbung	43
3.2.11.2	Immunhistologie	43
3.2.11.3	Immunfluoreszenz	44
3.2.12	FACS-Analyse (Durchflußzytometrie)	47
3.2.13	Untersuchung des proendokrinen Differenzierungspotenzials	50
3.2.13.1	Stimulation mit Activin A und Exendin 4	50
3.2.13.2	Caspase Inhibitor VI	52
3.2.13.3	Stimulation mit DBZ	52
3.2.13.4	Forskolin	53
3.2.13.5	LIF	53
3.2.13.6	Monothioglycerol	54
3.2.13.7	Picolinsäure	55

3.2.13.8	Retinsäure.....	56
3.2.14	Differenzierungsansätze.....	57
3.2.14.1	Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in Osteoblasten.....	57
3.2.14.2	Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in Adipozyten	58
3.2.14.3	Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in glatte Muskelzellen	59
3.2.14.4	Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in Neuronen	59
3.2.15	Analyse der Zellkulturüberstände mittels EIA	60
3.3	Statistik	61
4	Ergebnisse.....	62
4.1	Isolation und Expansion der Haarfollikelstammzellen.....	62
4.1.1	Verdau der Haarfollikel mit Enzymen	62
4.1.2	Verdau von Kopfhautgewebe mittels Enzymen.....	64
4.1.3	Proliferationsrate der Haarfollikelzellen	67
4.1.4	Colony Forming Unit Assay	67
4.2	Analyse der basalen Gen- und Proteinexpression.....	68
4.2.1	Typische Marker der Haarfollikelstammzellen.....	68
4.2.2	Marker embryonaler und adulter pluripotenter Stammzellen	69
4.2.3	Expression von Zytokeratinen und Vimentin	71
4.2.4	Endokrine Progenitormarker und endokrine Marker.....	73
4.3	Analyse des Differenzierungspotentials.....	74
4.3.1	Differenzierung in Osteoblasten	74
4.3.2	Differenzierung in Adipozyten.....	74
4.3.3	Differenzierung in Neuronen.....	75
4.3.4	Differenzierung in glatte Muskelzellen.....	75
4.3.5	Differenzierung in endokrine Zellen.....	76
4.3.5.1	Stimulation mit Activin A und Exendin 4	76
4.3.5.2	Stimulation mit DBZ	77
4.3.5.3	Stimulation mit LIF, Monothioglycerol und Picolinsäure	77
4.3.5.4	Stimulation mit Retinsäure	77
4.3.5.5	Stimulation mit Forskolin	78
4.4	Enzyme Immunoassay (EIA) auf Somatostatin.....	79
5	Diskussion.....	81
6	Zusammenfassung	91
7	Literaturverzeichnis	93

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Das aufwendige Verfahren der Inselzellisolation (aus Merani und Shapiro, 2006).....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 2: 5-Jahresverlauf nach Inselzelltransplantation (aus Ryan et al., Diabetes 54, 2005).....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 3: Differenzierung von Embryoid Bodies in endokrine Zellen (aus http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3.asp).....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 4: Darstellung der Multipotenz mesenchymaler Stammzellen (aus http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3.asp).....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 5: Der Haarfollikel (aus Encyclopaedia britannica; www.britannica.com/.../531186/sebaceous-gland).....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 6: Die Differenzierung des Haarschaftes (aus Zouboulis et al., 2008).....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 7: Darstellung der Stammzellnische in der Wulstregion des Haarfollikels (Elaine Fuchs, 2007).....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 8: Zupfen von Haarfollikeln</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 9: Gezupftes Haar nach Dispaseverdau (A), gezupftes Haar nach Trypsinverdau (B), isolierte Zellen mit Zelldetritus direkt nach dem Ausplattieren auf die Zellkulturplatte (C)</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 10: Phänotyp der aus der Haarfollikelregion herausgewachsenen Zellen nach der Subkultivierung in der ersten Passage: neuronentartige Ausläufer (A), Population spindelartiger Zellen (B), fibroblastenartige Zellmorphologie (C)</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 11: Haarfollikel im Zellkulturmedium (A), adhärirter Haarfollikel (B), Zellen adhärirten ausgehend von der Bulgeregion (C).....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 12: Phänotyp der Haarfollikelzellen hBSC 37 am Tag 1 (A) und am Tag 10 (B) nach der Passagierung. Balken = 50µm.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 13: Die Proliferationsrate der Zellen hBSC 37 P11</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 14: Colony Forming Unit Assay: Nachweis der Koloniebildung.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 15: FACS-Ergebnisse der Marker für Haarfollikelstammzellen. Neben dem spezifischen Antikörper (Fläche unter der Kurve ist rot) ist jeweils ein Isotypantikörper (Fläche unter der Kurve ist farblos) dargestellt.</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 16: Analyse embryonaler Marker. Oben: FACS Analyse nach Färbung mit anti-SSEA1 und SSEA4 Antikörpern. Neben dem spezifischen Antikörper (Fläche unter der Kurve ist grau) ist jeweils ein Isotypantikörper (Fläche unter der Kurve ist farblos) dargestellt. Unten: Nachweis von Oct4 mittels PCR. Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 17: PCR-Analyse der Stammzellmarker BCRP1, Sox 1, Sox 2, Sox 17 und Nestin Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 18: Färbung der hBSC 37 Zellen auf Oct 4 mit dem Goat-anti Oct4 Antikörper (A); Negativkontrolle: Färbung mit einem irrelevanten Goat-Antikörper (B). Balken = 100µm</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 19: Färbung der hBSC 37 Zellen mit einem monoklonalen Mouse anti-Nestin Antikörper (A) oder einem Isotypantikörper (B). Balken = 50 µm.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 20: Färbung der Zellen auf CK18 (A), CK19 (B), CK20 (C) und Pan CK (D); Negativkontrolle: Isotypantikörper (E). Balken = 100 µm.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 21: PCR-Analyse von Zytokeratin 7 (CK 7) in den hBSC 37 Zellen Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 22: PCR-Analyse der Vimentinexpression in hBSC 37 Zellen Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 23: PCR-Analyse der (pro)endokrinen Marker in unstimulierten hBSC 37-Zellen Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.....</i>	<i>73</i>

<i>Abbildung 24: Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen hBSC 37 P4 mittels von-Kossa-Färbung.....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 25: Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen hBSC 37 P4 mittels Oil-Red-Färbung: rot gefärbte Fettvakuolen innerhalb des Zytoplasmas (A und B)</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 26: Immunhistologische Färbung der Zellen hBSC 37 nach neuronaler Differenzierung. Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen mittels Färbung mit einem anti-Tubulin βIII (A), Anti-Neurofilament-200 (B), Anti-Synaptophysin-Antikörper (C) oder einem Isotypantikörper (D); Kernfärbung mit DAPI. Balken = 50 μm.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 27: Immunhistologische Färbung der Zelllinie hBSC 37 nach 14 Tagen Inkubation in DMEM4500/F12 mit TGF-β. Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen mittels Anfärbung mit anti-Desmin (A) oder einem Isotypantikörper (B); Kernfärbung mit DAPI. Balken = 50 μm.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 28: PCR-Analyse der Expression (pro)endokriner Marker nach Stimulation der hBSC 37 Zellen mit 10 μM Retinsäure für 5 Tage. Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 29: Expression endokriner Marker nach Stimulation der hBSC37 Zellen mit 10 μM Forskolin für 5 Tage. Bei gleichen Gapdh-Spiegeln wird die Expression von Somatostatin gesteigert. Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 30: Bestimmung der Somatostatinkonzentration im Zellkulturüberstand von hBSC37 Zellen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Die Zellen wurden für 2 oder 5 Tage in Basalmedium (B und C) bzw. in einem X-Vivo-haltigen Medium (D und E) mit 10 μM Forskolin stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen in Basalmedium ohne Forskolin inkubiert (A). *$p < 0,001$ versus unstimulierte Zellen.....</i>	<i>79</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus</i>	1
<i>Tabelle 2: Übersicht der Stammzellen aus der Dermis (modifiziert nach Zouboulis et al., 2008)</i>	15
<i>Tabelle 3: Medium 1</i>	33
<i>Tabelle 4: Medium 2 (nach Zhang et al., 2006)</i>	33
<i>Tabelle 5: Medium 3</i>	33
<i>Tabelle 6: Medium 4 (nach Yu et al., 2006)</i>	34
<i>Tabelle 7: Medium 5</i>	34
<i>Tabelle 8: Medium 6</i>	34
<i>Tabelle 9: Medium 7 (nach Grinnell und Bickenbach, 2007)</i>	35
<i>Tabelle 10: Mastermix der Reversen Transkriptase</i>	38
<i>Tabelle 11: Kulturmedium der Zelllinie HaCaT</i>	40
<i>Tabelle 12: Mastermix der Polymerase-Kettenreaktion</i>	40
<i>Tabelle 13: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen der PCR</i>	42
<i>Tabelle 14: Antikörper für die Immunhistologie bzw. Immunfluoreszenz</i>	46
<i>Tabelle 15: Darstellung von Vorkommen und Funktion verschiedener Oberflächenmoleküle, die in der vorliegenden Studie untersucht worden sind</i>	49
<i>Tabelle 16: Stimulationsmedium mit Activin A und Exendin 4</i>	51
<i>Tabelle 17: Stimulationsmedium mit NAD</i>	51
<i>Tabelle 18: Stimulationsmedium mit Exendin 4</i>	51
<i>Tabelle 19: Stimulationsmedium mit Caspaseinhibitor VI</i>	52
<i>Tabelle 20: Stimulationsmedium mit DBZ</i>	53
<i>Tabelle 21: Stimulationsmedium mit Forskolin</i>	53
<i>Tabelle 22: Stimulationsmedium mit LIF</i>	54
<i>Tabelle 23: Stimulationsmedium mit Monothioglycerol</i>	55
<i>Tabelle 24: Stimulationsmedium mit Picolinsäure</i>	55
<i>Tabelle 25: Stimulationsmedium mit Retinsäure</i>	56
<i>Tabelle 26: Medium der Osteoblastendifferenzierung</i>	58
<i>Tabelle 27: Medium der Adipozytendifferenzierung</i>	59
<i>Tabelle 28: Medium für die Differenzierung in glatte Muskelzellen</i>	59
<i>Tabelle 29: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Neuronen</i>	60

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BCRP 1	Breast cancer resistance protein 1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Bp	Basenpaare
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridin (synthetisches Thymidinanalogon)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CGRP	Calcitonin gene – related peptide
CK	Zytokeratin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBZ	Dibenzazepin
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EIA	Enzyme immunoassay
ESC	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GADA	Glutamat-Decarboxylase-Autoantikörper
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HaCaT	Human adult low calcium temperature keratinocytes
hBSC	Human bulge stem cells
hES-Zellen	Humane embryonale Stammzellen
HFSC	Haarfollikelstammzellen
HLA	Human Leukocyte Antigene
Hlx B9	Homeo box HB9
HNF	Hepatocyte nuclear factor
HSC	Hämatopoetische Stammzellen

IAA	Insulinautoantikörper
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFE	Interfollikuläre Epidermis
IgG	Immunglobulin G
IRS	Innere Wurzelscheide (inner root sheath)
ISL-1	Insulin gene enhancer protein Islet-1
ITS	Insulin – Transferrin – Selenium
Krt1-15	Zytokeratin 15 Promotor
LIF	Leukemia inhibitory factor
LRC	Label retaining cells
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	Mitochondriale Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTG	Monothioglycerol
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NGF	Nerve growth factor
NK-Zellen	„Natural Killer“ – Zellen
Nkx 6.1	NK6 homeobox 1
NSC	Neurale Stammzellen
NT3	Neurotrophin-3
OD	Optische Dichte
ORS	Äußere Wurzelscheide (outer root sheath)
PA	Picolinsäure (Picolinic acid)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PDX1	Pancreatic duodenum homeobox protein 1
POMC	Proopiomelanocortin
PPC	Pancreatic precursor cells
P / S	Penicillin / Streptomycin

PTX	Pankreastransplantation
Rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)
RT	Raumtemperatur
RT – PCR	Realtime-PCR
SKP	Skin – derived precursor cells
SOX	SRY (sex determining region Y)-box
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
SZ	Stammzellen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T / E	Trypsin / EDTA
TA-Zellen	„Transit amplifying“ – Zellen
TGF- β	Transforming growth factor β
U	Units (Einheiten)
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Unter dem Begriff Diabetes mellitus wird eine Gruppe sehr heterogener chronischer Erkrankungen zusammengefasst, die durch eine Störung der Homöostase des Glukosestoffwechsels gekennzeichnet sind. Die Klassifizierung erfolgt anhand der Pathogenese in vier Haupttypen (Tabelle 1). Die Prävalenz des Diabetes mellitus nimmt weltweit in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zu. Weltweit leiden mehr als 285 Millionen Menschen an einem Diabetes mellitus (Centre européen d'étude du Diabète, Europäische Kommission, Diabetes Atlas: www.eatlas.idf.org). Die bei weitem häufigste Form ist der Typ 2 Diabetes, bei dem eine Kombination von Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung vorliegt.

I. Typ 1 Diabetes (Zerstörung der Betazellen, assoziiert mit absolutem Insulinmangel) A. Vermittelt durch einen Autoimmunprozess B. Idiopathisch
II. Typ 2 Diabetes (Insulinresistenz assoziiert mit relativem Insulinmangel und/oder Sekretionsdefekt)
III. Andere spezifische Diabetes-Typen A. Genetische Defekte der Betazellfunktion (z.B. MODY-Diabetes, mitochondrialer Diabetes) B. Genetische Defekte der Insulinwirkung (Leprechaunismus, Rabson-Mendenhall-Syndrom, lipoatrophischer Diabetes) C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas (z.B. Pankreatitis, Hämochromatose) D. Endokrinopathien (z.B. Cushing-Syndrom, Akromegalie, Phäochromozytom) E. Medikamenten-induziert (z.B. Glukokortikoide, Interferon) F. Infektionskrankheiten (kongenitale Röteln, Coxsackie, Zytomegalie) G. Seltene Formen des autoimmun-vermittelten Diabetes (z.B. Stiff-Man-Syndrom, Antiinsulinrezeptor-Syndrom) H. Andere genetische Syndrome mit Assoziation zum Diabetes
IV. Gestationsdiabetes (erstmal während der Schwangerschaft aufgetretene oder diagnostizierte Störung des Glukosestoffwechsels)

Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus

Alle Formen des Diabetes können in einem beliebigen Stadium der Erkrankung eine Insulintherapie notwendig machen. Die Insulinbehandlung als alleiniges Kriterium erlaubt somit keine Klassifikation.

Etwa 10 - 15% der Fälle leiden an einem Typ 1 Diabetes. Der Typ 1 Diabetes entsteht durch eine chronische Autoimmunerkrankung, die gegen die insulinproduzierenden Betazellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas gerichtet ist. Die Mechanismen der Induktion der Autoimmunreaktion werden bis heute nur teilweise verstanden. Beteiligt sind Umweltfaktoren (Nahrungsbestandteile, Virusinfektionen) und eine genetische Prädisposition (v.a. Polymorphismen der HLA Klasse-II-Moleküle DR/DQ) (Seißler, 2008).

Auf der Basis einer chronischen Autoimmunreaktion werden bei diesen Patienten die körpereigenen insulinproduzierenden Betazellen sukzessive von autoreaktiven T-Lymphozyten, NK-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems zerstört. Durch die Detektion von spezifischen Inselzellantikörpern wie z.B. die Autoantikörper gegen Insulin (IAA), gegen die Glutamat-Decarboxylase (GADA), gegen die Tyrosinphosphatase IA-2 (IA2A) und den Zinktransporter ZnT8, die altersabhängig bei 80 - 90% der Patienten bei Diabetesmanifestation positiv sind, kann der autoimmune Prozess Monate bis Jahre vor der klinisch manifesten Erkrankung nachgewiesen werden (Lundgren et al., 2009; Lampasona et al., 2010). Erst wenn mehr als 90 % der Betazellen zerstört sind, kommt es zu den typischen Krankheitssymptomen (Polyurie, Polydipsie, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Ketoseneigung).

Aufgrund des absoluten Insulinmangels wird eine lebenslange Substitution von Insulin notwendig. Ziel der Insulintherapie ist die Nachahmung der physiologischen Insulinsekretion, um eine möglichst normnahe Einstellung der Blutzuckerwerte, sowohl prä-, als auch postprandial zu erreichen, da durch eine adäquate Blutzuckereinstellung Akut- und Spätkomplikationen vermieden werden können (Paterson et al., 2007 [DCCT Research Group]).

Die Therapie des Typ 1 Diabetes wurde in den letzten Jahrzehnten durch Schulungsprogramme, die Entwicklung neuer Therapiealgorithmen und die Einführung von Insulinanaloga oder die Möglichkeit einer Insulinpumpentherapie deutlich verbessert. Trotzdem gelingt es nur bei einem Teil der Patienten, eine normnahe Blutzuckereinstellung zu erreichen (Phillip et al., 2007 [European Society for Paediatric Endocrinology; Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society;

International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes.]). Die chronische Hyperglykämie führt z.B. über die Glykosylierung von Proteinen des Endothels und die Induktion von oxidativem Stress zu typischen mikrovaskulären Erkrankungen (Retinopathie, diabetische Nephropathie und Polyneuropathie) sowie zur Steigerung des Risikos für arteriosklerotische Komplikationen der großen Arterien (Myokardinfarkt, Apoplex, periphere Arterielle Verschlusskrankheit [pAVK]) (Fisher, 2004; Lteif et al., 2003; Aronson, 2008; Albers et al., 2010). Die genannten makrovaskulären Spätfolgen des Diabetes mellitus werden zu den Haupttodesursachen von Diabetikern gezählt (Wilson et al., 2001) und sind in erster Linie für die hohe Morbidität und Mortalität von Diabetikern verantwortlich (Nathan et al., 2005 [DCCT/EDIC Study Research Group]; Holman et al., 2008; UKPDS 1998). Darüber hinaus besteht durch die Therapie das Risiko von schweren Hypoglykämien, was die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken kann.

Trotz aller Fortschritte, die mit der intensivierten Insulintherapie erzielt wurden, erreichen nur 50 % der Typ-1-Diabetiker eine normnahe Blutzuckereinstellung. Es gibt verschiedene Gründe für eine mangelhafte Stoffwechseleinstellung, worunter die mangelnde Mitarbeit des Patienten, eine unzureichende Therapie oder auch ein extrem labiles Stoffwechselverhalten zu subsumieren sind (Jacqueminet et al., 2005). Es gilt daher, andere Wege zur Verbesserung der Stoffwechseleinstellung zu finden, um Akutkomplikationen und schwere Folgeerkrankungen zu verhindern. Durch biologischen Ersatz des zerstörten Inselapparates mit funktionell aktiven Betazellen in Form einer Pankreastransplantation oder isolierter Inselzellen ist es prinzipiell möglich, eine Normalisierung der Glukohomöostase ohne die Gefahr schwerer Hypoglykämien zu erzielen.

Die Pankreastransplantation (PTX) ist aktuell der Goldstandard der endokrinen Ersatztherapie, mit der Ein-Jahres-Funktionsraten von bis zu 90 % und eine 5-Jahres-Insulinfreiheit von ca. 60 % erreicht werden kann (Pfeffer et al., 2003).

Die Indikation zur PTX stellt sich bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die eine Nierentransplantation benötigen, oder bei Patienten mit lebensbedrohlichen Hypoglykämiewahrnehmungsstörungen. Das Spenderorgan wird üblicherweise mit einem Y-förmigen Gefäßtransplantat aus der Arteria iliaca, verbunden mit der Arteria mesenterica superior und der Arteria lienalis des Spenders, an der Arteria iliaca communis des Empfängers anastomosiert. Der venöse Abfluss des Spenderorgans

erfolgt über die Vena iliaca communis des Empfängers. Die exokrine Sekretion drainiert heutzutage in den meisten Fällen in den Darm oder, wenn dies nicht möglich ist, in die Harnblase (White et al., 2009). Dieser Eingriff ist technisch aufwendig und zum Teil mit schweren Komplikationen, wie z.B. eine Transplantatpankreatitis mit all ihren Folgeerkrankungen, behaftet (Labruzzo et al., 2006). Die Gesamtmortalität ist aber nach Pankreastransplantation im Vergleich zu einer nicht-transplantierten Gruppe vermindert, so dass allen dialysepflichtigen Typ 1 Diabetikern diese Option angeboten werden sollte (Sutherland et al., 2004; Gruessner und Sutherland, 2005; White et al., 2009).

Eine Alternative zur Pankreastransplantation mit einem minimal-invasiven Eingriff stellt die Inselzelltransplantation dar. Hierbei werden Langerhans-Inseln von einem Organspender isoliert und unter lokaler Betäubung über einen Katheter in die Pfortader der Leber injiziert, so dass sich die Zellen in der Leber ansiedeln (Shapiro et al., 2000) (Abb. 1).

Problematisch ist bei der Inselzelltransplantation der hohe technische Aufwand der Inselisolierung. Es existieren nur sehr wenige Zentren weltweit, die humane Langerhans-Inseln in der notwendigen Menge und Reinheit isolieren können (Bretzel et al., 2006). Dies erklärt auch, warum z.B. in Deutschland in den letzten 20 Jahren nur bis zu 17 Inselzelltransplantationen pro Jahr durchgeführt worden sind (ITR – International Islet Transplant registry).

Ein zweites Problem der Inselzelltransplantation liegt in der ungenügenden Überlebenszeit der transplantierten Inseln. Nach der Einführung einer kortikosteroidfreien Immunsuppression, dem sogenannten Edmonton-Protokoll (Einsatz von Tacrolimus und Sirolimus, sowie Gabe von Daclizumab), wurde eine Insulinfreiheit von 60 % in den ersten 12 Monaten erreicht (Fiorina et al., 2008). Seitdem im Jahre 1999 das Edmonton-Protokoll eingeführt wurde, ist die Anzahl der jährlichen Transplantationen deutlich angestiegen.

In Nordamerika allein wurden im Zeitraum von 1999 bis 2008 insgesamt 828 Inselzelltransplantationen an 412 Patienten durchgeführt, davon seit 2001 jeweils mehr als 40 Transplantationen pro Jahr (CITR, Collaborative Islet Transplant Registry). Fünf Jahre nach der Inselzelltransplantation werden jedoch 90 % der Patienten wieder insulinpflichtig (Abb. 2B). Interessanterweise kann aber bei etwa 80 % der Patienten weiterhin eine endogene Insulinsekretion (C-Peptid Nachweis) detektiert werden (Abb. 2A) (Ryan et al., 2005).

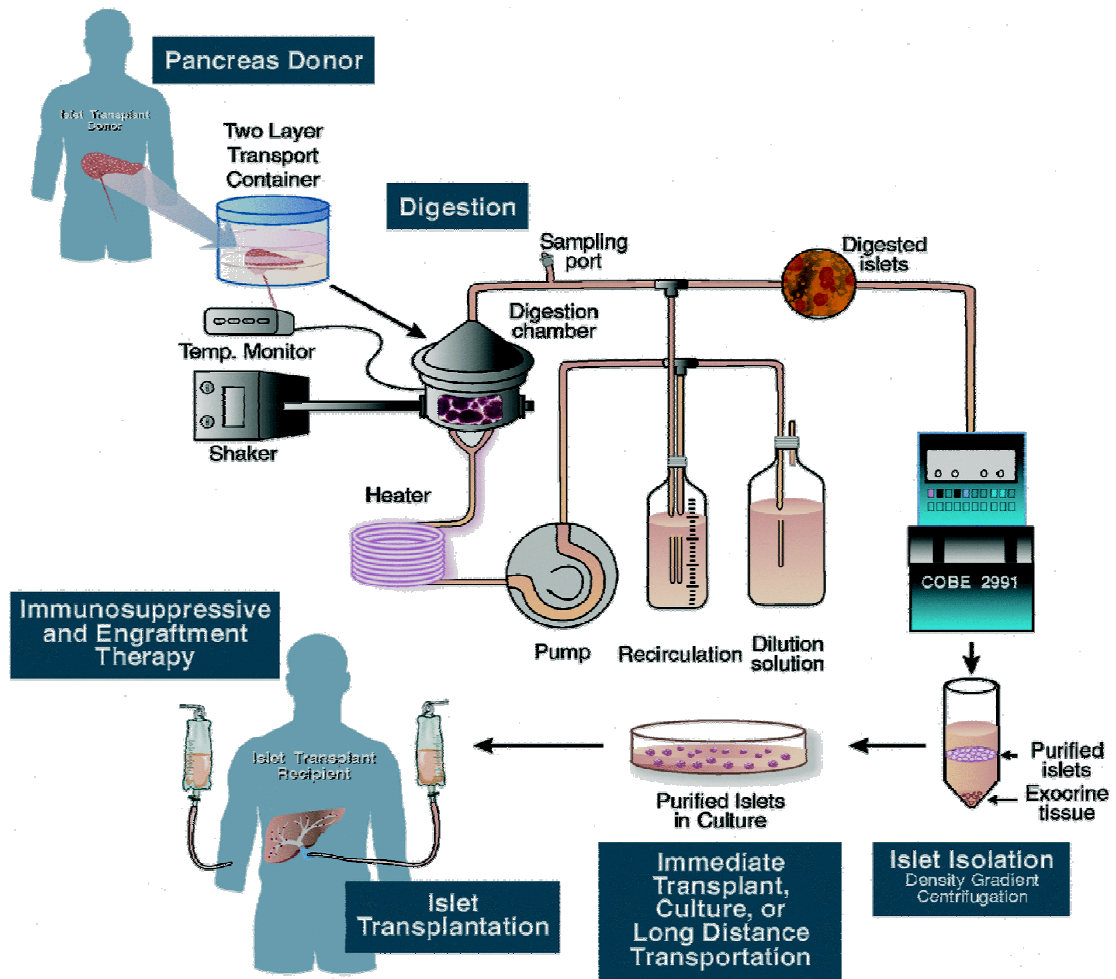


Abbildung 1: Das aufwendige Verfahren der Inselzellisolation (aus Merani und Shapiro, 2006)

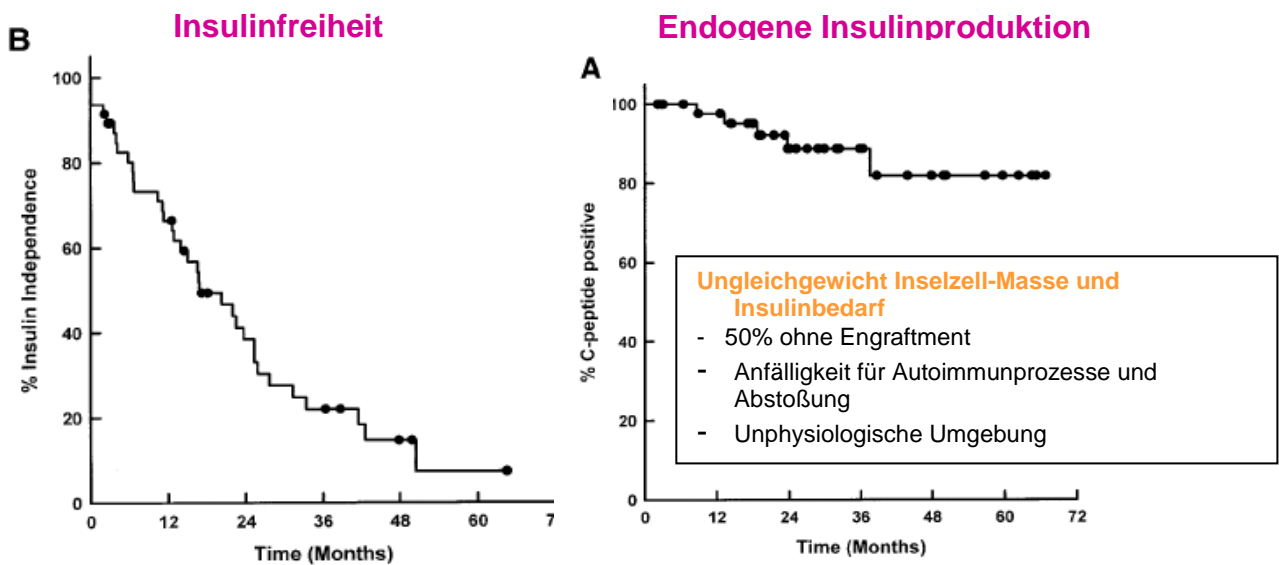


Abbildung 2: 5-Jahresverlauf nach Inselzelltransplantation (aus Ryan et al., Diabetes 54, 2005)

Diese Restfunktion der Inseln kann in vielen Fällen die Blutzuckereinstellung verbessern, die Progression von vaskulären Folgeerkrankungen reduzieren und bei Patienten mit Hypoglykämiewahrnehmungsstörung schwere Hypoglykämien verhindern. Besonders diese Gruppe kann somit sehr stark von einer Inselzelltransplantation profitieren. Der Hauptnachteil der Inselzell- wie auch der Pankreastransplantation ist die Notwendigkeit einer dauerhaften Unterdrückung der Abstoßungsreaktion mittels Immunsuppressiva (Naftanel et al., 2004). Die immunsuppressive Behandlung erhöht mittel- und langfristig das Infektionsrisiko, sowie das Risiko, an Malignomen zu erkranken.

Eine vollständige Unterdrückung des Autoimmunprozesses ist jedoch meist nicht möglich. Außerdem führen Immunsuppressiva (vor allem die Calcineurin-Inhibitoren wie z.B. Tacrolimus und Ciclosporin) zu einer Schädigung der Nieren und beeinträchtigen die Funktion der Inseln und die Insulinsensitivität (Calcineurin-Inhibitoren, mTOR-Inhibitoren, Steroide). Beobachtet wurde eine Verringerung der Insulinfreisetzung aus den Betazellen, ein Anstieg der Insulinresistenz, eine Erhöhung der Apoptoserate der Betazellen oder eine direkte Toxizität auf die Inselzellen (Hjelmsaeth et al., 2005; Penfornis et al., 2006; Plaumann et al., 2008; Balla und Chobanian, 2009). Auf diese Mechanismen kann teilweise das Transplantatversagen nach Pankreas- oder Inseltransplantation zurückgeführt werden. Aufgrund des Nebenwirkungsprofils der Immunsuppression muss die Indikation für eine Inselzelltransplantation streng gestellt werden. Potentielle Kandidaten sind Typ 1 Diabetiker mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz oder Patienten, die bereits eine Nierentransplantation erhalten haben, sowie Patienten mit einem sehr instabilen Diabetes, mit häufigen schweren Hypoglykämien oder mit einer verminderten Wahrnehmung von Hypoglykämiesymptomen (Bretzel et al., 1999; Ryan et al., 2005). Neben den Einschränkungen durch die Nebenwirkungen einer Transplantation stellt vor allem der Mangel an Organspendern das Haupthindernis für den vermehrten Einsatz einer Pankreas- oder Inselzelltransplantation dar. Dieses Problem kann nur gelöst werden, wenn eine alternative Spenderressource für die Zellersatztherapie gefunden wird.

In der Diabetologie wird deshalb im Rahmen von experimentellen Arbeiten intensiv nach neuen Ansätzen für die Zellersatztherapie des Typ 1 Diabetes geforscht. Eine sehr interessante Zellpopulation sind körpereigene adulte Stammzellen, die aus

verschiedenen Geweben von Patienten isoliert werden können. Da diese Zellen nach der Transplantation primär als körpereigen akzeptiert werden, könnte wahrscheinlich eine deutlich niedrigere Dosis von Immunsuppressiva eingesetzt werden, die nicht die alloreaktive Abstoßungsreaktion, sondern nur das Wiederauftreten der Autoimmunreaktion inhibiert (Seißler, 2008). Im Folgenden wird nun zunächst allgemein auf die Eigenschaften von Stammzellen eingegangen. Der Fokus liegt hierbei auf den adulten Haarfollikelstammzellen, deren Charakteristika und Differenzierungspotenzial in der vorliegenden Studie untersucht worden sind.

1.2 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen eines Organismus, die befähigt sind, sich asymmetrisch in zwei verschiedene Tochterzellen zu teilen. Bei der asymmetrischen Teilung entsteht eine der Mutterzelle entsprechende Zelle (Alonso und Fuchs, 2003; Watt et al., 2006). Dies entspricht einem der drei Kriterien einer Stammzelle: der Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Liang und Bickenbach, 2002). Die Tatsache, dass sich aus einer Stammzelle eine ganze Zellpopulation entwickeln kann, die die Eigenschaften der Mutterzelle besitzt, nennt man Klonalität.

Die zweite Tochterzelle ist eine reife, differenzierte Zelle, die im Organismus bestimmte Aufgaben übernimmt, dafür aber die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren hat (Alonso und Fuchs, 2003; Kaiser, 2004). Die Fähigkeit zur Differenzierung in einen oder mehrere verschiedene Zelltypen, zur Selbsterneuerung und eine hohe Proliferationsfähigkeit sind Kriterien, welche alle Stammzellen verbinden (Liang und Bickenbach, 2002).

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Stammzellen können anhand ihres Differenzierungspotenzials eingeteilt werden: Totipotent sind Stammzellen, aus welchen alle embryonalen und extraembryonalen Zelltypen hervorgehen können (Douglas et al., 2009). Nach den ersten Furchungsteilungen entstehen zwei Zellgruppen: das Trophoektoderm und die innere Zellmasse, aus der sich der Embryo entwickelt. Aus dem Trophoektoderm entstehen

die extraembryonalen Strukturen (z.B. die Plazenta) (Kaiser, 2004; Douglas et al., 2009). Die innere Zellmasse enthält nur pluripotente Zellen, die durch Teilung und Differenzierung alle Zelltypen des Embryos, dagegen keine extraembryonalen Strukturen erzeugen können (Douglas et al., 2009).

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) können sich in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm), sowie in Zellen der Keimbahn ausdifferenzieren (Douglas et al., 2009). Durch die Aktivität des Enzyms Telomerase sind ES-Zellen in der Lage, sich unbegrenzt zu vermehren. Primäre Körperzellen weisen in vitro nach einer gewissen Zeit keine Zellteilung mehr auf (Seneszenz) (Hayflick, 1979; Kuilman et al., 2010).

Da hES-Zellen in vitro gezielt zu verschiedensten Zelltypen ausdifferenziert werden können, sind sie potentiell im Rahmen von Zellersatztherapien einsetzbar. Die bisherigen Ergebnisse zahlreicher Arbeitsgruppen müssen jedoch streng geprüft werden. Daher ist im Gegensatz zu adulten Stammzellen eine mögliche klinische Anwendung noch weit entfernt. So können ES-Zellen beispielsweise nach Transplantation in Versuchstiere Teratome bilden (Aleckovic und Simón, 2008). Ferner ist eine mögliche immunologisch bedingte Abstoßung entsprechender Transplantate durch den Empfänger zu bedenken.

In den letzten fünf Jahren wurden Methoden entwickelt, aus humanen embryonalen Stammzellen insulinproduzierende Zellen zu generieren (D'Amour et al., 2005; Baharvand et al., 2006; Jiang et al., 2007).

Die Verwendung pluripotenter, embryonaler Stammzellen hat den Vorteil, dass damit unlimitiert Ausgangsmaterial zur Verfügung steht. Der Nachteil ist die ethische Problematik. Leider ist die Ausbeute an Insulin-positiven Zellen noch gering, und die Ausreifung zu voll funktionell aktiven Betazellen ist noch nicht gelungen. Weitere umfangreiche Untersuchungen sind notwendig, um die Schritte der Differenzierung zu verstehen und die notwendigen Stimulationsreize aufzuklären. Erst dann kann eine auf Stammzellen basierende Diabetestherapie in klinischen Studien getestet werden (Seißler, 2008).

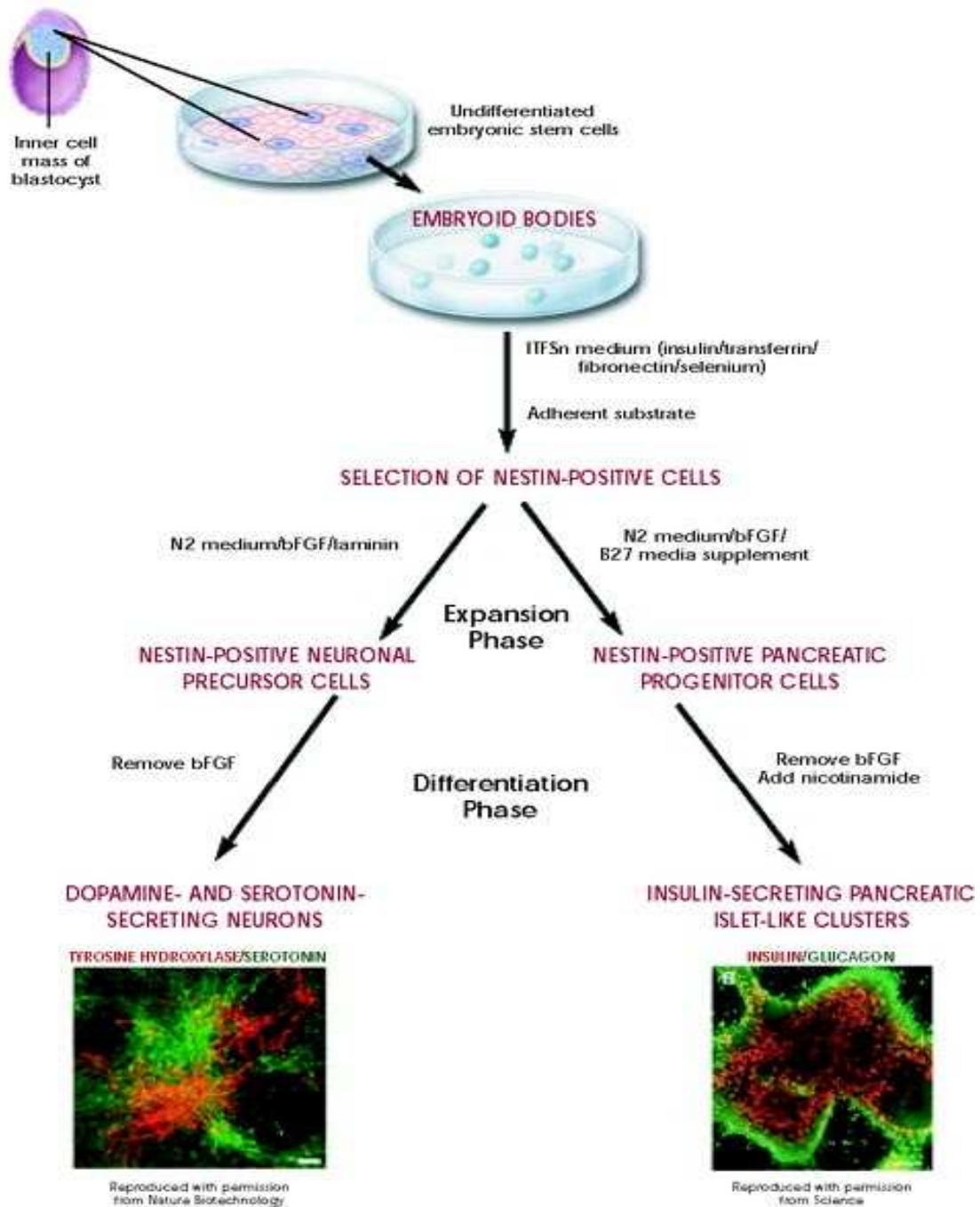


Abbildung 3: Differenzierung von Embryoid Bodies in endokrine Zellen (aus <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3.asp>)

1.2.2 Adulte Stammzellen

Stammzellen aus adulten Geweben werden in multipotente, oligopotente und unipotente Zellen unterteilt. Als multipotente Stammzellen bezeichnet man Zellen, die in viele verschiedene Zelltypen des adulten Organismus differenzieren können. Oligopotente Stammzellen differenzieren nur in zwei oder mehrere Zelltypen. Aus einer unipotenten Stammzelle geht nur eine ausgereifte Zellart hervor (Kaiser, 2004). Adulte Stammzellen existieren in Geweben mit hohem Zellumsatz, wie beispielsweise im Gastrointestinaltrakt, im Myokard, im Nervensystem und in der Epidermis, wo sie absterbende Zellen durch Migration aus ihrer Nische und anschließende Differenzierung in den jeweils benötigten Zelltyp ersetzen (Niemann et al., 2002; Yang, 2006; Kosodo und Huttner, 2009).

Im jeweiligen Gewebe sind die adulten Stammzellen in Nischen zu finden, in denen das vorherrschende Mikromilieu die Selbsterneuerung der Stammzellen fördert und deren Ausdifferenzierung verhindert (Ohlstein et al., 2004). Diese undifferenzierten Zellen können sich symmetrisch oder asymmetrisch teilen. Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische Zellen, die dem Phänotyp der Mutterzelle entsprechen. Bei der asymmetrischen Teilung hingegen entsteht eine der Mutterzelle entsprechende Zelle und eine zweite Zelle, die eine begrenzte Zahl an Zellteilungen durchlaufen kann, um schließlich terminal zu differenzieren. Dies sind sogenannte Transit-Amplifying-Zellen (Watt et al., 2006).

Es besteht nun die Möglichkeit, die Multipotenz einiger adulter Stammzellen für die Zellersatztherapie zu nutzen. Gegenstand intensiver Forschung ist derzeit die Suche nach adulten pankreatischen Progenitor-/Stammzellen.

Es ist bereits gelungen, adulte humane, pankreatische Langerhans-Inseln in der Zellkultur zu expandieren. Die Zellen behielten ihre Fähigkeit, glukoseabhängig Insulin zu sezernieren und exprimierten die Gene aller vier endokrinen in den Langerhans-Inseln vorkommenden Zelltypen (Hanley et al., 2009).

Aus pankreatischen, ductusähnlichen Progenitorzellen generierte die Arbeitsgruppe um Lee eine Zelllinie, die nach der Expansion in der Zellkultur und der Differenzierung in insulinsezernierende Zellen in diabetische Ratten infundiert werden konnte. Der Blutzucker der diabetischen Ratten sank bei gleichzeitig erhöhtem Plasma-Insulinspiegel (Lee et al., 2009).

Eine Therapie mit adulten autologen Stammzellen bietet generell den Vorteil, dass eine allogene Abstoßungsreaktion vermieden werden kann. Eine immunsuppressive

Therapie könnte beim insulinpflichtigen Diabetes Typ 2 ganz vermieden werden, während beim Typ 1 Diabetes nur eine Niedrigdosistherapie aufgrund einer etwaigen Reaktivierung der Autoimmunreaktion notwendig wäre. Die ethische Unbedenklichkeit, die eine Therapie mit adulten autologen Stammzellen bietet, stellt einen weiteren Vorteil dar.

1.2.3 Alternative Quellen für autologe Stammzellen

Adulte Stammzellen wurden in zahlreichen Organen des Körpers, beispielsweise in Knochenmark, Blut, Gehirn, Leber und auch im Nabelschnurblut von Neugeborenen nachgewiesen (Pittenger et al., 1999; Zvaifler et al., 2000; Zuk et al., 2002; Herrera et al., 2006). Darunter finden sich unter anderem mesenchymale Stammzellen (MSC) und hämatopoetische Stammzellen (HSC) aus dem Knochenmark, neuronale Stammzellen (NSC), aber auch pankreatische Progenitorzellen (PPC).

Diese adulten Stammzellen konnten schon erfolgreich in andere Zelltypen differenziert werden, die nicht dem Herkunftsgewebe der Stammzellen entsprechen. Einige Beispiele stellen die Transdifferenzierungen von hämatopoetischen Stammzellen in drei verschiedene Zelltypen des Gehirns (Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten), in Herzmuskelzellen (Kronenwett und Haas, 2006) und Leberzellen (Khurana et al.; 2008) dar.

Darüber hinaus wurde die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Herzmuskelzellen und in Skelettmuskelzellen beschrieben (De Bari et al., 2001; Dezawa et al., 2005; Yoon et al., 2008).

Auch eine Differenzierung in Neuronen ist bekannt (Naghdi et al., 2009). Neuronale Stammzellen besitzen nach Filip (Filip et al., 2004) die Fähigkeit, sich in hämatopoetische Zellen zu differenzieren. Es wurden ferner Stammzellen in der Skelettmuskulatur identifiziert, die Herzmuskulatur ersetzen können und außerdem in neuronale Zelllinien differenzieren können (Arsic et al., 2008).

Bezüglich endodermaler, nicht pankreatischer Gewebe wie der Leber (Yang et al., 2006) und dem Intestinaltrakt (Kojima et al., 2002) wurde von Stammzellen berichtet, die in insulinsezernierende Zellen transdifferenzieren können. Nach Einbringen der differenzierten Zellen in den Organismus eines diabetischen Versuchstieres wurde dessen Insulinplasmaspiegel angehoben und der Blutzucker reguliert.

Der Vorgang der Transdifferenzierung bleibt derzeit in den Fachkreisen umstritten. Terada stellte die Hypothese auf, dass es sich bei den Experimenten mit in vivo-Transdifferenzierung nicht um eine wirkliche Differenzierung handelt, sondern nur um eine Zellfusion der adulten Stammzelle mit einer Zelle des Gewebes, in das die Stammzelle eingebracht wurde (Terada et al., 2002).

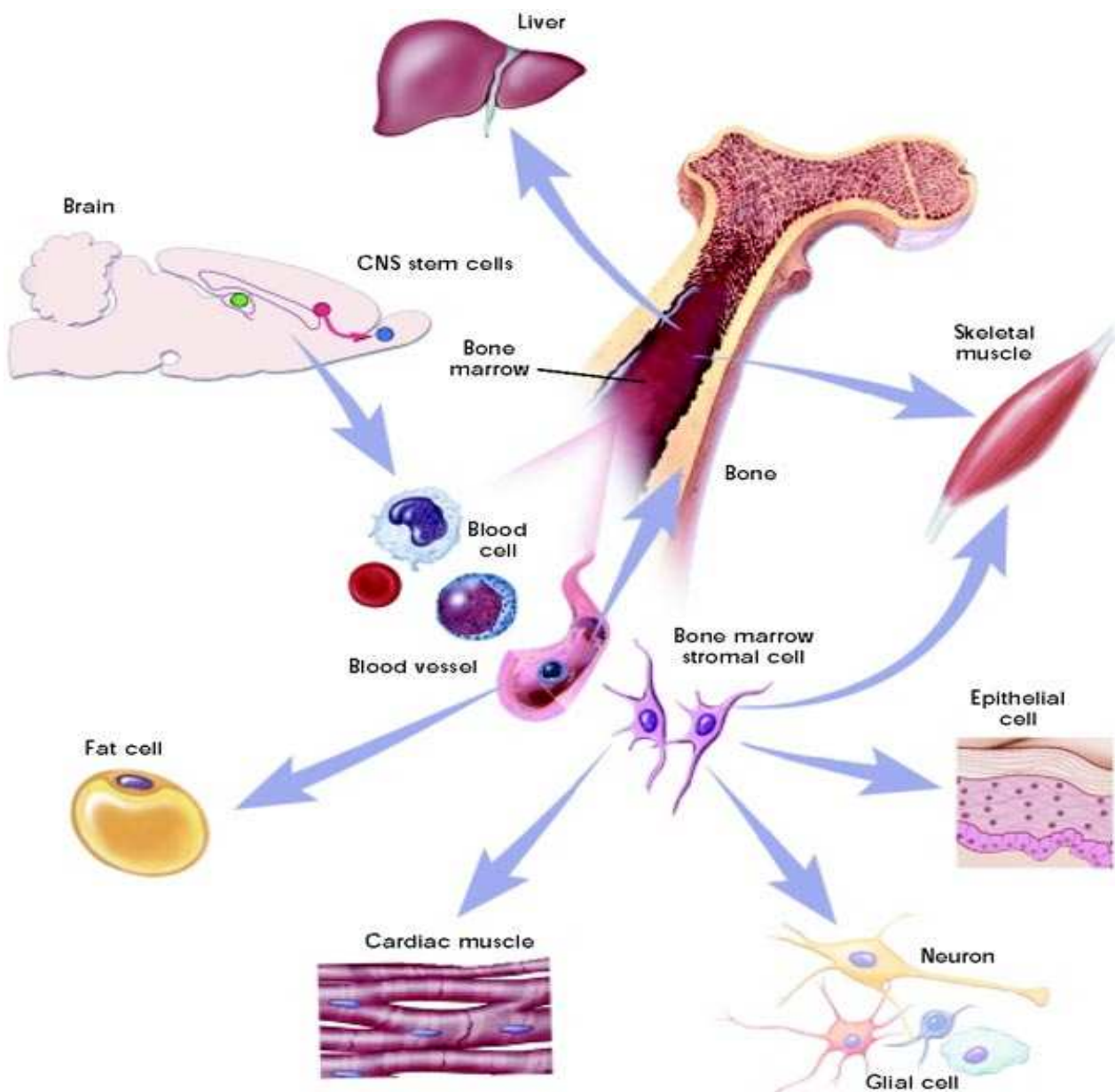


Abbildung 4: Darstellung der Multipotenz mesenchymaler Stammzellen (aus <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3.asp>)

Zusammenfassend zeigen erste Daten, dass es möglich sein könnte, aus adulten Stammzellen betazellähnliche Zellen zu gewinnen. Bei den bisherigen in vitro Studien zur Herstellung von Betazellen konnte allerdings nur eine sehr niedrige, nicht physiologisch regulierte Insulinproduktion nachgewiesen werden. Damit bleibt unklar, ob aus diesen Vorläuferzellen tatsächlich in Zukunft reife Betazellen generiert werden können. Die Suche nach neuen Quellen für autologe Stammzellen bleibt somit ein aktuelles wichtiges Thema.

1.2.4 Adulte Stammzellen aus der Haut und aus Hautanhangsgebilden

Wenn die Epidermis beschädigt wird, kann sie ausgehend von den Stammzellen der Bulgeregion komplett rekonstituiert werden. Denn diese Zellen besitzen das Potenzial, alle epithelialen Schichten der Haut, einschließlich der Epidermis, der Talgdrüsen und aller Zelltypen des Haarfollikels regenerieren zu können (Cotsarelis et al., 1990; Lyle et al., 1998; Oshima et al., 2001; Liu et al., 2003; Trempus et al., 2003; Blanpain et al., 2004; Ito et al., 2004; Tumber et al., 2004; Morris et al., 2004; Amoh et al., 2005; Roh et al., 2005; Hu et al., 2006; Yu et al., 2006; Zhang et al., 2006). Dagegen wurde berichtet, dass sich auf ein Signal hin aus der dermalen Papille die Zellen der interfollikulären Epidermis (IFE) in Haarfollikel und Talgdrüsen differenzieren können (Niemann und Watt, 2002). Stammzellen aus der IFE und aus der Bulgeregion stellen zwei gänzlich verschiedene Zellpopulationen aus der Epidermis dar. Es wurde ferner gezeigt, dass in der Bulgeregion mehrere unterschiedliche Stammzellpopulationen existieren (Blanpain et al., 2004).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass in der Wulstregion der Haarfollikel adulter Dermis epidermale Neuralrinnenstammzellen (Epi-NCSC) residieren. Epi-NCSC sind neuronale Vorläuferzellen, die aufgrund ihrer Multipotenz ein großes neuronales Regenerationspotenzial aufweisen (Sieber-Blum et al., 2004; Martinez-Monedero et al., 2007; Fernandes et al., 2008). El Seady differenzierte diese Zelllinie in bipolare Neuronen, myelinisierte Schwannzellen und Oligodendrozyten (El Seady et al., 2008).

Auch in der Dermis wurden Stammzellen beschrieben, die sogenannten skin-derived precursor cells (SKPs), die in neuronale und mesodermale Progenitorzellen differenzieren (Toma et al., 2005; Fernandes et al., 2004; Medina et al., 2006).

Skin-derived-precursor Cells (SKPs) aus der Dermis können in Neuronen, Gliazellen, glatte Muskelzellen und Adipozyten differenzieren. Es wird angenommen, dass die SKPs ihren Ursprung aus der Neuralrinne nehmen und im Verbund mit Haarfollikeln vorkommen. Ihre genaue Lokalisation in der Dermis wird jedoch kontrovers diskutiert (Amoh et al., 2005; Fernandes et al., 2004). Daneben wies Hunt Stammzellen aus der dermalen Papille des Haarfollikels nach. Es handelt sich dabei um sphärenformende Zellen, die der Neuralrinne entstammen. Diese „Papillasphären“ ähneln den SKPs im Phänotyp und im Differenzierungspotenzial: Sie können in vitro neuronale und gliale Zellen generieren. Die Arbeitsgruppe konnte die dermale Papille als eine Nische für Abkömmlinge der Neuralrinne identifizieren (Hunt et al., 2008).

Es wurde noch eine weitere Zelllinie in der Dermis entdeckt; die sogenannten DEEP-1-Zellen. DEEP-1-Zellen (dermis-derived epithelial progenitor-1) exprimieren die Zytokeratine CK 8, CK 18 und CK 19, jedoch nicht CK 20. Auch Vimentin und Nestin konnten nicht detektiert werden. Der embryonale Stammzellmarker Oct-4 und die Stammzellmarker ABCG2 und CD 133 werden ebenfalls nicht exprimiert (Medina et al., 2006).

Da die DEEP-1-Zelllinie weder CK 1, noch CK 5, CK 6 und CK 14 exprimiert, kann ausgeschlossen werden, dass DEEP-1 aus epidermalen Keratinozyten hervorgehen. Wie Bulge-Stammzellen sind DEEP-1 positiv für s100A6 (Ito und Kizawa, 2001), Integrin β 1 und p63 (epidermale SZ) (Jones und Watt, 1993; Pellegrini et al., 2001). Außerdem erwiesen sich die DEEP-1 Zellen als positiv für E-Cadherin, so dass ihr Expressionsprofil mit dem Profil epithelialer Progenitorzellen kompatibel ist. Sie unterscheiden sich aber von den SKPs und den Merkelzellen in ihrer fehlenden Nestin- und CK 20-Expression (Medina et al., 2006). Letztendlich konnten die DEEP-1 Zellen nicht in Neuronen (D'Ippolito et al., 2004), Hepatozyten (Miyazaki et al., 2002), Osteoblasten oder Adipozyten differenziert werden.

Es existiert daneben die Hypothese, dass eine kleine Population von Stammzellen an der Basis der Talgdrüsen existiert (Ghazizadeh und Taichman, 2001; Watt et al., 2006; Fuchs und Horsley, 2008). Talgdrüsen und Haarfollikel scheinen in enger Verbindung zu stehen: Als Antwort auf eine Gewebsverletzung können Stammzellen aus beiden Nischen alle differenzierten, epithelialen Zelllinien generieren (Niemann

und Watt, 2002; Ito et al., 2005). Nach der Injektion von immortalisierten humanen Sebozyten (SZ95) in Nacktmäuse differenzierten die Progenitorzellen jedoch nur in interfollikuläre Epidermis und bildeten keine Haarfollikel, was zu der Annahme führt, dass Sebozytenstammzellen eher bipotent als multipotent sind (Zouboulis et al., 2008).

Zelllinien	Spezies	Differenzierung in	Expression	Quellen
Multipotente dermale Zellen	Mensch (Dermis)	Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten, Nervenzellen, Hepatozyten	CD13(+), CD29(+), CD34(+), CD45(-), CD49(+), CD105(+), CD106(-), CD133(-), Nestin(-), Stro-1(+), Vimentin(+)	Chen et al., 2007
SKPs (skin-derived progenitor cells)	Maus, Mensch (Dermis)	Adipozyten, glatte Muskulatur, Nervenzellen (Gliazellen, Schwannzellen)	Nestin(+), Fibronectin(+), Vimentin(+)	Toma et al., 2001; Biernaskie et al., 2006
DMC (dermis-derived multipotent stem cells)	Ratte (Dermis)	Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten, Nervenzellen, Hepatozyten	CD31(-), CD34(-), CD44(+), CD45(-), CD59(+), CD90(+), α -SMA(-), CK19(-), Collagen-Type II(-), Desmin(-), ICAM-I(+), VCAM-I(+)	Shi and Cheng, 2004
DEEP-1 (dermis-derived epithelial progenitor-1)	Maus (Dermis)	Nervenzellen, Hepatozyten, Nierenzellen	CK1(-), CK5(-), CK6(-), CK8(+), CK14(-), CK18(+), CK19(+), CK20(-), c-kit(-), E-Cadherin(+), Integrin β 1 (+), Nestin(-), p63(+), S100A6(+), Vimentin(-)	Medina et al., 2006
Epi-NCSC	Nagetier, Mensch (Dermis, Haarfollikel)	bipolare Neuronen, Schwannzellen, Oligodendrozyten	β III Tubulin(+), Krox-20(+), Nestin(+), Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP)(+)	El Seady et al., 2008

Tabelle 2: Übersicht der Stammzellen aus der Dermis (modifiziert nach Zouboulis et al., 2008)

1.2.5 Der Haarfollikel

Ein Haar besteht aus dem aus der Hautoberfläche herausragenden Haarschaft und der Haarwurzel. Im Haarschaft findet sich zentral das Mark (Medulla). Peripher schließt sich die verhornte Wurzelrinde (Kortex) an. Bedeckt wird die Rinde vom Oberhäutchen (Kutikula), das aus flachen gewölbten Hornzellen besteht.

Die Haarwurzel wird von der inneren und äußeren epithelialen, sowie von der bindegewebigen Wurzelscheide (Haarbalg) umgeben. Der unterste Teil der Haarwurzel wird Bulbus genannt. Dort ist die bindegewebige Haarpapille lokalisiert (Welsch, 2003, S.499-502).

Die sich im Bulbus um die Haarpapille herum befindlichen Matrixzellen sind das germinative Epithel, dessen Zellen zu den teilungsaktivsten Geweben des menschlichen Körpers gehören. Daraus differenzieren sich zentral der Haarschaft und seitlich die innere Wurzelscheide (inner root sheet, IRS; Panteleyev et al., 2001).

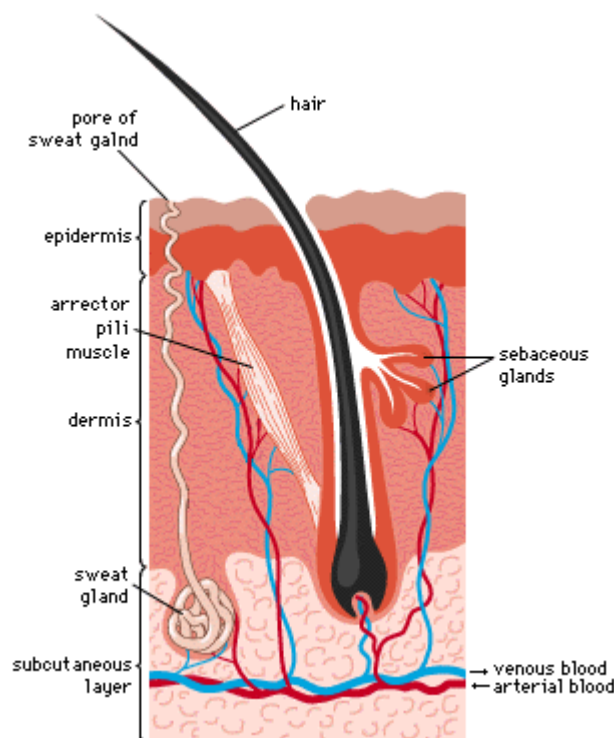


Abbildung 5: Der Haarfollikel (aus Encyclopaedia britannica; www.britannica.com/.../531186/sebaceous-gland)

Über der dermalen Papille befinden sich unter den Matrixzellen eingelagerte Melanozyten, die Pigment an die Trichozyten des Haares abgeben. Nach außen schließt sich die äußere Wurzelscheide (outer root sheet, ORS) an. Man unterscheidet drei Abschnitte: den oberflächlichen Abschnitt oberhalb der Talgdrüsenmündung (Infundibulum), einen mittleren Abschnitt, der sich bis zum Bulbus erstreckt und den tiefsten Abschnitt, der den Bulbus umschließt. Auf der

Höhe des Musculus arrector pili, im mittleren Abschnitt, ist der sogenannte Wulst lokalisiert, wo sich in einer Nische die Stammzellen des Haarfollikels befinden (Tiede et al., 2007).

Jeder Follikel durchläuft asynchron mit den Nachbarfollikeln einen Kreislauf aus drei Phasen: eine Wachstumsphase (Anagen), eine Regressionsphase (Katagen) und eine Ruhephase (Telogen). Im Anagen differenzieren sich die Matrixzellen zu den konzentrischen Schichten des Haarschaftes (Medulla, Kortex, Haar-Kutikula), der inneren Wurzelscheide (IRS-Kutikula, Henle- und Huxley-Schicht) und der äußeren Wurzelscheide. Nachdem der Haarschaft voll ausgebildet ist, beginnt das Katagen. Durch gerichtete und streng kontrollierte Apoptose kommt es zum Abbau der unteren zwei Drittel des Haarfollikels (Commo und Bernard, 1997; Tobin et al., 1998). Das obere Drittel des Follikels bleibt als Zellkonglomerat bestehen, das den alten Haarschaft umgibt. Die Basis dieses Konglomerats ist als Wulstregion bekannt, die ein natürliches Reservoir für Haarfollikelstammzellen darstellt.

Nach der Katagenphase begeben sich die Zellen der Wulstregion in eine Ruhephase (Telogen), in der die dermale Papille in engem Kontakt zur Wulstregion steht (Blainpain und Fuchs, 2006; Alonso und Fuchs, 2006). I

st die Regressionsphase abgeschlossen, geht der Haarfollikel in das Telogen über, das der Ruhephase der Haarfollikelstammzellen entspricht. Erst wenn die Wulstregion mit den enthaltenen Stammzellen erneut aktiviert wird, verlängert sich der Follikel wieder bis in das subkutane Gewebe und der Zyklus beginnt von vorne (Paus und Cotsarelis, 1999).

In die Bildung des Haarfollikels und die Initiation jedes weiteren Zyklus ist eine ganze Serie von Interaktionen zwischen den mesenchymalen Zellen der dermalen Papille und den epidermalen Keratinozyten involviert (Hardy, 1992). Während Stimuli aus Mesenchym und Epidermis am Beginn des Haarzyklus die Haarfollikelstammzellen in Richtung dermale Papille wandern lassen, werden die Stammzellen der Wulstregion bei einer Verletzung der Haut zu einer Aufwärtswanderung veranlasst, wo sie zum Zentrum der Wunde migrieren und an der Reepithelialisierung beteiligt sind (Taylor et al., 2000; Tumber et al., 2004; Morris et al., 2004).

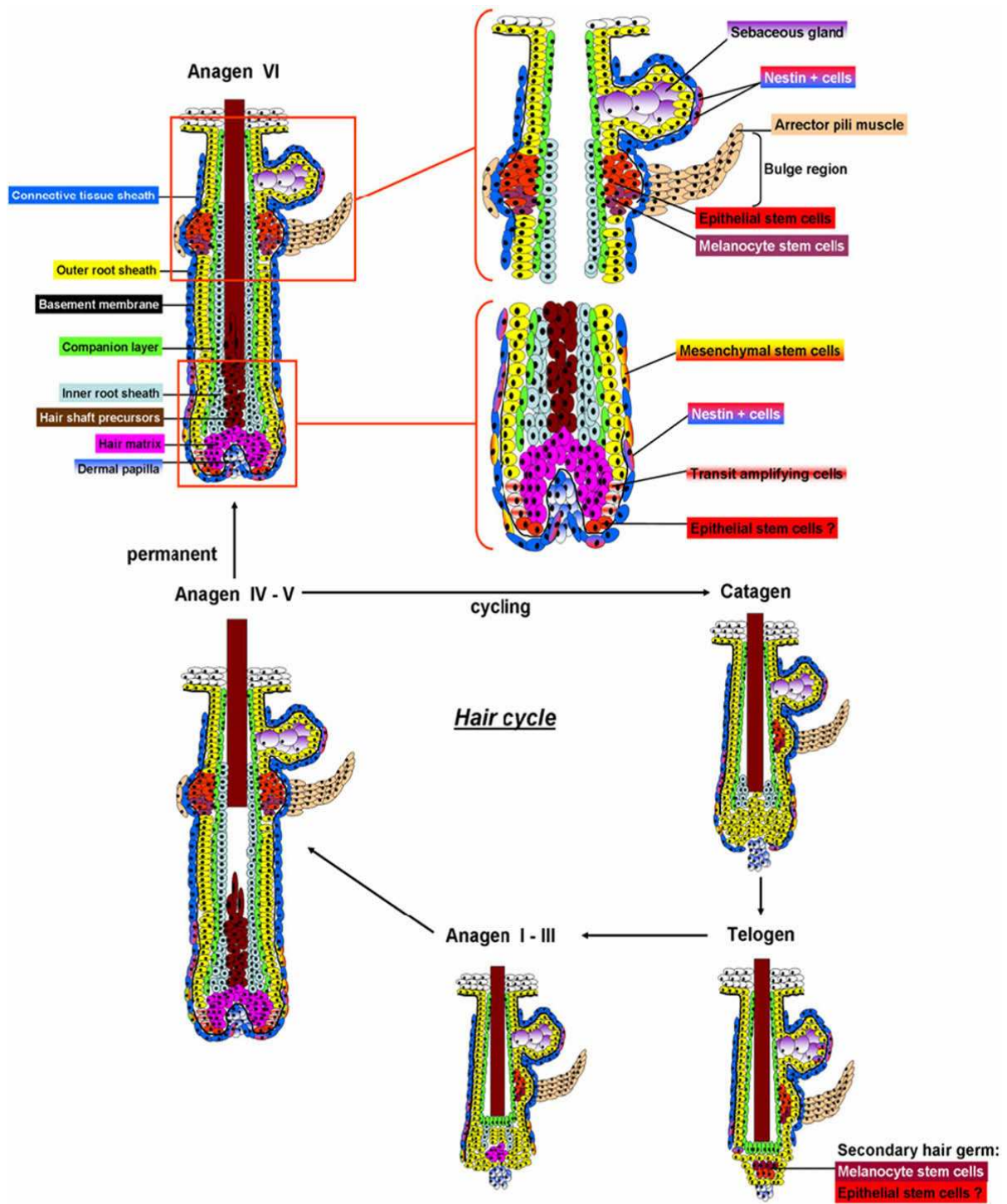


Abbildung 6: Die Differenzierung des Haarschaftes (aus Zouboulis et al., 2008)

1.2.6 Die Stammzellen des Haarfollikels

Schon 1956 haben Montagna und Chase beobachtet, dass nach Röntgenbestrahlung der Haut die Matrixzellen absterben, aber dennoch Haare aus Zellen des ORS gebildet werden können (Montagna und Chase, 1956).

Neuere Studien haben die Evidenz hervorgebracht, dass Stammzellen in der Wulstregion existieren und zur Homöostase der Haarfollikel, der Talgdrüsen sowie der Epidermis nach einer Verletzung beitragen (Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Tumber et al., 2004; Morris et al., 2004).

Zur genauen Lokalisation der Stammzellen im Haarfollikel wurden verschiedene Methoden angewandt. Oshima und seine Arbeitsgruppe untersuchten die Fähigkeit zur Koloniebildung einzelner Abschnitte des Haarfollikels, um nachzuweisen, in welcher Region die Zellen mit dem höchsten proliferativen Potential residieren. Es stellte sich heraus, dass die Wulstregion den größten Anteil an proliferativen Zellen beherbergt (Kobayashi et al., 1993, Oshima et al., 2001).

Bulgestammzellen stellen „Label-retaining cells“ (LRC) der Wulstregion dar, wie durch Versuche mit markierten Nukleotidanaloga wie Bromodeoxyuridin (BrdU) (Cotsarelis et al., 1990; Morris und Potten, 1999; Taylor et al., 2000) oder ³[H]-Thymidin (Cotsarelis et al., 1990, Zhang et al., 2006) festgestellt werden konnte (Panteleyev et al., 2001).

Morris isolierte die Bulgestammzellen nach ihrer K15-GFP-Expression (Morris et al., 2004). Mit Hilfe der Markierungsstudien mit GFP konnte nachgewiesen werden, dass die Bulgestammzellen sich entlang der Basallamina der äußeren Wurzelscheide zur Matrix bewegen. Dort proliferieren sie, um sich schließlich in Zellen des neuen Haares und die innere Wurzelscheide terminal zu differenzieren (Blanpain und Fuchs, 2006).

Um die definierten Eigenschaften der Haarfollikelstammzellen wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre Multipotenz zu beweisen, wurden klonale Analysen durchgeführt. Es stellte sich die Frage, ob Bulgestammzellen multipotent sind, oder ob in ihrer Stammzellnische verschiedene unipotente Vorläuferzellen residieren, aus denen sowohl die Epidermis als auch die epidermalen Anhangsgebilde wie z.B. die Talgdrüse hervorgehen. Aus einzelnen Zellen der Wulstregion wurden Populationen von Klonen erstellt, die sich weiter in genotypisch identische Nachkommen expandieren ließen. Damit war die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in vitro nachgewiesen (Blanpain et al., 2004).

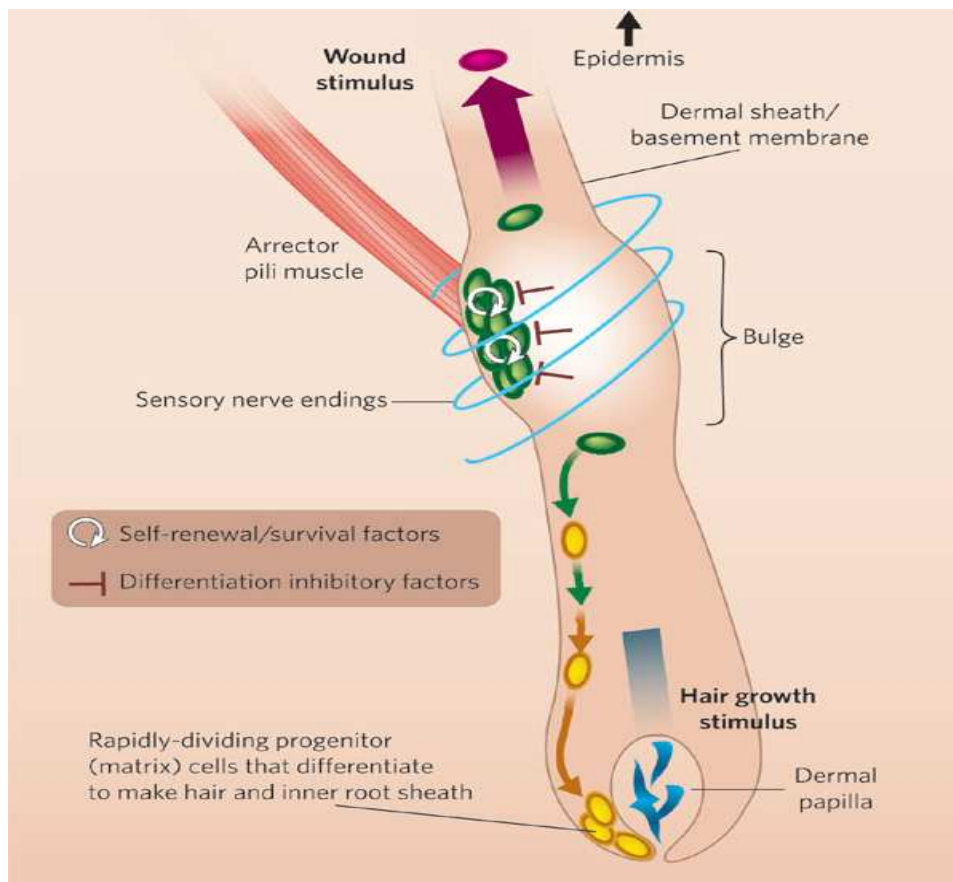


Abbildung 7: Darstellung der Stammzellnische in der Wulstregion des Haarfollikels (Elaine Fuchs, 2007)

Darüber hinaus sind holoklone Nachkömmlinge einer einzigen Wulststammzelle in der Lage, nach Transplantation auf den Rücken einer Nacktmaus, Epidermis, ganze Haarfollikel und Talgdrüsen zu bilden (Claudinot et al., 2005). Dafür wurde die dorsale Haut von Nacktmäusen partiell chirurgisch entfernt und mit GFP-markierten Keratinozyten aus der Kultur einer einzeln isolierten Wulststammzelle beschickt. Mittels Immunfluoreszenzmikroskop konnten später die neu gewachsenen Haarfollikel, die neue Epidermis und die Talgdrüsen eindeutig den transplantierten GFP-markierten Keratinozyten auf dem Rücken der Nacktmaus zugeordnet werden. Die Fähigkeit, neue Haarfollikel zu generieren, persistierte sogar nach mehreren Passagen der Haarfollikelstammzellen (Blanpain et al., 2004).

In einer Pionierstudie gelang es Oshima, einer Wildtypmaus einen lacZ-markierten Haarfollikel einer transgenen Maus auf den Rücken zu transplantieren. Nach 30

Tagen konnten lacZ-markierte Zellen in der Epidermis, den Talgdrüsen und den Haarfollikeln des transplantierten Tieres detektiert werden (Oshima et al., 2001).

Die molekularen Mechanismen, denen die Ausbildung einer Stammzellnische unterliegt, sind weitgehend unbekannt (Spradling et al., 2001; Lin et al., 2002; Fuchs et al., 2004).

Die Arbeitsgruppe um Blanpain entdeckte GFP-positive transplantierte Wulststammzellen an der Basis von Telogenfollikeln. In einigen der durch Transplantation generierten Haarfollikel konnten funktionelle Stammzellen detektiert werden. Dies zeigt, dass transplantierte, multipotente Bulgestammzellen in der Lage sein könnten, am Aufbau einer Stammzellnische mitzuwirken, selbst wenn sie vorher zeitweise aus ihrer Nische entfernt und in Kultur expandiert wurden (Blanpain et al., 2004). Die Expression von c-myc in der Basallamina der Bulgeregion scheint eine Rolle in der Stammzellendifferenzierung zu spielen, da eine Inhibierung der c-myc-Expression im Haarfollikel zu progressivem Haarverlust führt (Waikel et al., 2001; Zanet et al., 2005).

Die Transplantation epidermaler Stammzellen ist eine gut etablierte und erfolgreiche Methode, um die Reepithelialisierung tiefer Brandwunden, chronischer Wunden und Ulzera zu ermöglichen (Williams et al., 2006).

Laut Ito reagieren Stammzellen aus der Bulgeregion auf einen Stimulus aus der verletzten Epidermis mit der Generierung kurzlebiger TA-Zellen, die zwar für die akute Wundheilung verantwortlich sein sollen, nicht aber für die kontinuierliche Homöostase der Epidermis (Ito et al., 2005).

Haarfollikelstammzellen spielen aber nicht nur in der epidermalen Wundheilung eine Rolle. Amoh untersuchte das neuronale Potenzial der Wulststammzellen: Die Arbeitsgruppe implantierte die Nestin-positiven Stammzellen in einen geschädigten Ischiasnerv. Es kam zur Wiederherstellung der Nervenfunktion, da die Wulststammzellen in Schwannsche Zellen differenziert waren und dadurch die Regeneration der Neuronen begünstigt hatten (Amoh et al., 2005).

Daneben differenzierte Mignone Nestin-positive Stammzellen aus der Wulstregion in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, glatte Muskulatur und Adipozyten (Mignone et al., 2007).

Die Multipotenz der Haarfollikelstammzellen erscheint vielversprechend. Von besonderem Interesse ist auch ihr besonderes immunologisches Profil. Es wurde beobachtet, dass im Haarfollikel kein Oberflächenmolekül der Klasse MHC I

exprimiert wird und eine geringe Anzahl an Immunzellen dort residiert (Christoph et al., 2000). Dieses immunologische Privileg könnte einen Vorteil gegenüber anderen adulten Stammzellen in der Zellersatztherapie darstellen.

2 Fragestellung

In vielen Bereichen der Medizin wird intensiv nach neuen, alternativen Quellen für adulte Stammzellen im Hinblick auf regenerative Therapieansätze gesucht. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise, die die Multipotenz der Haarfollikelstammzellen belegen. Nachgewiesen wurden verschiedene Typen von Progenitorzellen in der Bulgeregion, deren Charakteristika und Fähigkeiten bisher nur teilweise untersucht und verstanden werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war:

- 1) im Labor eine Methode zu etablieren, mit der Stammzellen aus humanen Haarfollikeln (human bulge stem cells, hBSC) isoliert und in großer Menge expandiert werden können,
- 2) durch Analyse zellspezifischer Marker die Charakteristika der Stammzellen zu bestimmen,
- 3) die Multipotenz der Haarfollikelstammzellen unter spezifischen Differenzierungsbedingungen zu untersuchen
- 4) die Expression proendokriner Transkriptionsfaktoren nach der Differenzierung zu analysieren.

Mit den Versuchen sollen neue Daten über die Eigenschaften definierter Haarfollikelstammzelltypen gewonnen werden, um die Frage zu klären, ob sich bestimmte Populationen von Haarfollikelstammzellen dafür eignen, reife endokrine Zellen für die Zellersatztherapie zu produzieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Substanz	Hersteller
Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Activin A	R&D Systems (Minneapolis)
Ascorbic acid	Sigma (Taufkirchen)
B27-Supplement	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
BDNF	R&D Systems (Minneapolis)
β -Glycerolphosphat	Sigma (Taufkirchen)
Caspaseinhibitor VI	Merck (Darmstadt)
Choleratoxin	Biomol (Hamburg)
Cutasept F	BODE Chemie (Hamburg)
Dexamethason	Sigma (Taufkirchen)
Dibenzazepin	Merck (Darmstadt)
Dispase	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (Taufkirchen)
DNA Ladder (100bp)	Promega (Mannheim)
rmEGF	R&D Systems (Minneapolis)
Eosin	Sigma (Taufkirchen)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Exendin 4	Sigma (Taufkirchen)
rmbFGF 10	R&D Systems (Minneapolis)
Fibronektin (aus Rattenplasma)	Sigma (Taufkirchen)
FKS: fetales Kälberserum	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Formaldehyd (36,5%)	Sigma (Taufkirchen)
Forskolin	Merck (Darmstadt)
Gelatine 2%	Sigma (Taufkirchen)
Hämatoxylin	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
HCl	Merck (Darmstadt)
H ₂ O ₂	Linaris (Wertheim-Bettingen)
Hydrocortison	Sigma (Taufkirchen)

Indomethacin	Sigma (Taufkirchen)
Insulin	Sigma (Taufkirchen)
Isobutylmethylxanthin	Sigma (Taufkirchen)
Isopropanol	Sigma (Taufkirchen)
ITS (Insulin-Transferrin-Selenium) (100 x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Kaisers Glycerin-Gelatine	Merck (Darmstadt)
Kollagenase	Sigma (Taufkirchen)
Kollagen	BD Biosciences (Heidelberg)
Kristallviolett	Sigma (Taufkirchen)
Laminin	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin 200mM (100 x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
LIF	Chemicon (Temecula)
Loading Dye	Promega (Mannheim)
Matrigel	BD Biosciences (Heidelberg)
MEM (non-essential Amino Acids) (100 x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Taufkirchen)
Monothioglycerol	Sigma (Taufkirchen)
Natriumthiosulfat	Sigma (Taufkirchen)
NGF	R&D Systems (Minneapolis)
Nicotinamid	Sigma (Taufkirchen)
NT3	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
dNTP-Mix (je 5 mM)	Qiagen (Hilden)
Oil Red O	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (20 x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Picolinsäure	Sigma (Taufkirchen)
Poly-L-Arginin	Sigma (Taufkirchen)
Poly-L-Lysin	Sigma (Taufkirchen)
Pyrogallol	Sigma (Taufkirchen)
Retinsäure	Sigma (Taufkirchen)
RNase-Inhibitor (30 U / µl)	Eppendorf (Hamburg)
Saponin	Sigma (Taufkirchen)
Silbernitrat	Sigma (Taufkirchen)
Streptavidin	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
TGF-β	Preprotech (Hamburg)
Trypsin-EDTA (10 x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

Versene (100 x)

Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.2 Kits

Kit	Hersteller
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche (Mannheim)
HotStarTaq Plus	Qiagen (Hilden)
Lightcycler Fast Start DNA Master Plus	Roche (Mannheim)
Vector® Nova Red	Vector (Burlingame, USA)
Omniscript RT Kit	Qiagen (Hilden)
Rneasy Plus Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Vectastain® ABC Kit Universal	Vector (Burlingame)
Vectastain® ABC Kit Goat IgG	Vector (Burlingame)

3.1.3 Antikörper

3.1.3.1 FACS-Antikörper

Primärer AK	Spezies	Isotyp	Farbe	Hersteller
BCRP1	Rat	Rat IgG _{2a}	pur	Biozol (Eching)
CD9	Mouse	Mouse IgG _{1k}	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
CD24 (heat stable AG)	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD29 (β1-Integrin)	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD31 (PECAM-1)	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD34	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD44 (Pgp-1)	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD45	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD49b (Integrin α2)	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD49f	Mouse	Mouse IgG _{2a}	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD56 (NCAM)	Mouse	Mouse IgG _{2a}	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
CD71	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
CD117 (c-kit)	Mouse	Mouse IgG ₁	Biotin	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD133 (Prominin 1)	Mouse	Mouse IgG _{2b}	PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD200	Mouse	Mouse IgG _{1k}	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)

SSEA1	Mouse	Mouse IgM	-	Kamiya Biomedical (Seattle)
SSEA4	Mouse	Mouse Ig3	-	Chemicon (Temecula)
Isotyp	Mouse	Mouse IgG ₁	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp	Mouse	Mouse IgG ₁	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp	Mouse	Mouse IgG _{1k}	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp	Mouse	Mouse IgG _{2a}	FITC	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp	Mouse	Mouse IgG _{2b}	PE	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp	Mouse	Mouse IgG3	-	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp	Mouse	Mouse IgM	-	ImmunoTools (Friesoythe)
Isotyp	Rat	Rat IgG _{2a}	FITC	Serotec (Martinsried)

Sekundärer AK

Streptavidin	Mouse		FITC	BD Pharmingen (Heidelberg)
Mouse	Mouse	IgG	FITC	BD Pharmingen (Heidelberg)
Mouse	Mouse	IgM	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
Rat	rat	IgG	pur	BD Pharmingen (Heidelberg)

3.1.3.2 Antikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Calcitonin	Mouse	1:100	DAKO (Glostrup, Dänemark)
CK18	Mouse	1:50	DAKO (Glostrup)
CK19	Mouse	1:50	DAKO (Glostrup)
CK20	Mouse	1:50	DAKO (Glostrup)
Insulin	Goat	1:50	Santa Cruz (Heidelberg, Germany)
Nestin	Mouse	1:200	Chemicon (Temecula, USA)
Oct4	Goat	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
Oligodendrozytenmyelin	Mouse	1:100	Chemicon (Temecula, USA)
PanCK	Mouse	1:100	Sigma (Taufkirchen, Germany)

3.1.3.3 Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Farbe	Hersteller
β-III-Tubulin	Mouse	1:200	-	Promega (Mannheim)
Desmin	Mouse	1:80	-	Sigma (Taufkirchen)
Neurofilament 200	Mouse	1:100	-	Sigma (Taufkirchen)
Synaptophysin	Mouse	1:500	-	Chemicon (Temecula)
Sekundärer AK				
Anti-mouse IgG	Rabbit	1:20	FITC	DAKO (Glostrup)

3.1.3.4 Medien und Puffer

Substanz	Hersteller
Advanced DMEM/F12 (1:1)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM D6429	Sigma (Taufkirchen)
Knockout DMEM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Knockout serum replacer	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
PBS	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
TAE-Puffer	50 x Stammlösung: 121 g Tris-Base 28,5 ml Eisessig 50ml 0.5M EDTA (pH8.0) (auf 0,5 l Wasser) Gebrauchslösung: 40 ml auf 2 l auffüllen
Vectashield® Hard-Set™ Mounting Medium with DAPI	Vector (Burlingame)
X-Vivo	Cambrex (Karlskoga, Schweden)

3.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn (Karlsruhe)
BD FACS Calibur	BD Biosciences (Heidelberg)

BIOFUGE fresco	Heraeus (Hanau)
BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank Heracell	Heraeus (Hanau)
Brutschrank APT.LINE CB	Binder (Tuttlingen)
Elektrophoresekammer	MWG Biotech (Ebersberg)
Fluoreszenzmikroskop Leica DM 2500	Leica Microsystems CMS GmbH (Wetzlar)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen)
IKAMAG Magnetrührer	IKA (Staufen)
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	NeoLab (Heidelberg)
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt)
Thermocycler: GeneAmp PCR System	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
Victor 3, Model 1420-012, multi-label microplate reader	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)
Vortex-Schüttler	VWR International (Darmstadt)
Wasserbad WNB 7-45	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Culture Slides	BD / Falcon (Heidelberg)
Deckgläser	Menzel (Braunschweig)
Einwegskalpell	PFM (Köln)
FACS-Tubes	BD / Falcon (Heidelberg)
Mikropistill	Wagner & Munz GmbH (München)
Mikrotiterplatten (6/12/24 Well)	Corning (München)
1,5 ml Tubes	Eppendorf (Hamburg)
15 / 50 ml Tubes	Corning (München)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
PCR-Tubes (0.2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen	Corning (München)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Brand (Wertheim)
Serologische Pipetten	BD / Falcon (Heidelberg)
Sterilfilter	Millipore (Schwalbach)

Zellkulturflaschen

Zellschaber (cell scraper)

Corning (München)

Sarstedt (Nümbrecht)

3.2 Methoden

3.2.1 Versuche zur Gewinnung von Haarfollikelstammzellen

3.2.1.1 Isolierung von Zellen aus gezupftem Körperhaar

Mit Hilfe einer unsterilen Pinzette wurden von verschiedenen Probanden Körperhaare gezupft. Es handelte sich dabei um Augenbrauen, Barthaare und die Behaarung der Extremitäten.

Anfangs wurden die Haare mit gut sichtbarem Haarfollikel in 24-Wellplatten auf insgesamt 6 verschiedene Medien gegeben und beobachtet, ob dies zur Zelladhäsion und Zellproliferation ausreicht. In einem zweiten Ansatz wurden die gezupften Körperhaare / Haarfollikel vor der Kultivierung auf verschiedene Weise mit Enzymen verdaut: Die gezupften Haare wurden mit 1 ml 1x Trypsin / EDTA (T/E) (0,25 %) 4 bzw. 8 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mit 1,33 ml Versene für 5 Minuten nochmals bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme in der Lösung mit 5 ml PBS / 10 % FCS inaktiviert. Die Suspension wurde bei 145 g 8 Minuten lang zentrifugiert und das Pellet mit 5 ml PBS gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden je 0,2 ml auf 6 Wells in 6 verschiedene Medien (siehe Tabellen 3 bis 9) gegeben.

Nachdem mit der ersten Methode nur wenige Zellen isoliert werden konnten, wurden die Haarfollikel zweimal je eine halbe Stunde bei 37 °C mit 1 x T/E inkubiert. Zwischen den beiden Inkubationen wurde die Enzymlösung mit PBS / 10% FCS inaktiviert und das Pellet nach Zentrifugation mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und je 0,2 ml auf 5 verschiedene Wells mit 5 verschiedenen Medien verteilt.

Ein weiterer Ansatz war der Verdau der frisch gezupften Haare in Dispase (0,04 g / 10 ml DMEM / F12 3: 1) über Nacht bei 4 °C. Nach achtminütiger Zentrifugation bei 288 g und Absaugen des Überstandes wurden die Haare entweder gar nicht, 4 Minuten oder 8 Minuten mit jeweils 1 ml T/E (0,25 %) und 1,33 ml Versene bei 37°C weiterverdaut. Die Enzymlösung wurde mit 5 ml PBS / 10 % FCS inaktiviert und nach einer weiteren Zentrifugation in 1 ml PBS gewaschen. Das durch eine letzte Zentrifugation gewonnene Pellet konnte abschließend in 1 ml Kulturmedium resuspendiert werden. Als vierte Methode wurden frisch gezupfte Haare unter dem Stereomikroskop in der Follikelregion mit einem Skalpell angeraut, mit dem Ziel,

proliferationsfähige Zellen herunterzuschaben. Die Haare wurden mitsamt dem abgeschabten Gewebe in 2 ml Versene bei 37 °C 8 Minuten inkubiert und daraufhin in 3 ml PBS / 10 % FCS gegeben. Nach zweimaliger Zentrifugation mit einem dazwischen geschalteten Waschgang durch 1 ml PBS wurde das Pellet in 2 ml Kulturmedium ausgesät. Nach dem Haar- bzw. Zelltransfer in sterile 6-Wellplatten oder Zellkulturflaschen wurden die Zellen bei 37°C im Zellkulturschrank kultiviert. Die Medien wurden alle 3 Tage erneuert und auf Kontamination und Zellproliferation geprüft.

3.2.1.2 Isolierung von Zellen aus humanen Kopfhautgewebeprobe

Von Patienten, die sich einer Operation im Bereich des Kopfes unterziehen mussten, wurde nach Aufklärung und erhaltenem Einverständnis eine kleine Probe behaarter Kopfhaut (ca. 3 x 5 mm²) gewonnen und in NaCl 0,9 % überführt. Das Gewebe wurde sofort nach Erhalt aus dem OP in PBS gewaschen. Nach Verdau in steril filtrierter Kollagenase (4 mg / ml HBSS) für 2 Stunden bei 37°C wurde die Verdauung vorsichtig abgesaugt und das Gewebe mit 5 ml PBS / 10 % FCS gewaschen. Es fand ein weiterer Waschgang in DMEM: F12 (3:1) statt. Daraufhin wurden die Haare einzeln mittels einer sterilen Pinzette epiliert und in ein mit PBS gefülltes Falcon überführt. Nach einer Zentrifugation von 8 Minuten bei 288 g wurde das Pellet mit den verbliebenen Haaren in 2 ml Kulturmedium auf ein mit Kollagen beschichtetes Well gegeben (Mignone et al., 2007).

Als zweite Methode wurde der Verdau in Dispase (0,04 g / 10 ml DMEM / F12 (3:1)) über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Das weitere Prozedere erfolgte wie oben geschildert.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Zellkulturmedien

In den folgenden Medien wurden die isolierten Zellen kultiviert:

DMEM 4500 mg/l Glukose	60 %	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30 %	6 ml
FCS	10 %	2 ml
ITS (100 x)	1 %	0,2 ml
EGF	10 ng / ml	2 µl (von 100 ng / µl Lsg.)
Insulin	5 µg / ml	2 µl (von 50 mg / ml Lsg.)
Penicillin/Streptomycin	1 %	0,2 ml

Tabelle 3: Medium 1

DMEM 4500 mg/l Glukose	60 %	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30 %	6 ml
FCS	10 %	2 ml
Hydrocortison	50 µM	10 µl
EGF	10 ng / ml	2 µl (von 100 ng / µl Lsg.)
Insulin	5 µg / ml	2 µl (von 50 mg / ml Lsg.)
Penicillin/Streptomycin	1 %	0,2 ml

Tabelle 4: Medium 2 (nach Zhang et al., 2006)

DMEM 4500 mg/l Glukose	60 %	11,4 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30 %	5,6 ml
FCS	10 %	2 ml
bFGF	20 ng / ml	40 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
B27 (50 x)	5 %	1 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %	0,2 ml

Tabelle 5: Medium 3

DMEM 4500 mg/l Glukose	60 %	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30 %	6 ml
k.o. Serum Replacement	10 %	2 ml
β -Mercaptoethanol	0,1 mmol / l	40 μ l (von 50 mM Lsg.)
EGF	10 ng / ml	2 μ l (von 100 ng / μ l Lsg.)
MEM: Non-ess. AS (100 x)	1 %	0,2 ml
bFGF	4 ng / ml	8 μ l (von 10 μ g / ml Lsg.)
Penicillin/Streptomycin	1 %	0,2 ml

Tabelle 6: Medium 4 (nach Yu et al., 2006)

DMEM 4500 mg/l Glukose	60 %	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30 %	6 ml
FCS	10 %	2 ml
β -Mercaptoethanol	0,1 mmol / l	40 μ l (von 50 mM Lsg.)
EGF	10 ng / ml	2 μ l (von 100 ng / μ l Lsg.)
MEM: Non-Ess. AS (100 x)	1 %	0,2 ml
bFGF	4 ng / ml	8 μ l (von 10 μ g / ml Lsg.)
Penicillin/Streptomycin	1 %	0,2 ml

Tabelle 7: Medium 5

DMEM 4500 mg/l Glukose	60 %	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30 %	6 ml
FCS	10 %	2 ml
EGF	10 ng / ml	2 μ l (von 100 ng / μ l Lsg.)
bFGF	4 ng / ml	8 μ l (von 10 μ g / ml Lsg.)
Penicillin/Streptomycin	1 %	0,2 ml

Tabelle 8: Medium 6

DMEM 4500 mg/l Glukose	60 %	11,4 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30 %	5,6 ml
FCS	15 %	3 ml
MEM: Non-ess. AS (100 x)	1 %	0,2 ml
β-Mercaptoethanol	0,1 mM	40 µl
ESGRO (LIF)	1000 U / ml	20 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
Penicillin/Streptomycin	1 %	0,2 ml

Tabelle 9: Medium 7 (nach Grinnell und Bickenbach, 2007)

3.2.2.2 Kulturbedingungen

Die isolierten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid zuerst in 24-Wellplatten gehalten und bei Zunahme der Zellzahl in 25 cm² Zellkulturflaschen und später in 75 cm² Flaschen umgesetzt. Die Zellen wurden in verschiedenen Medien kultiviert, um die besten Wachstumsbedingungen herauszufinden. Zweimal in der Woche wurden die Medien erneuert und die Zellen nach 2 - 3 Tagen 1:5 gesplittet.

3.2.3 Beschichtung der Wellplatten und Zellkulturschalen

Um die Kultivierung der Stammzellen und die Zelladhäsion zu verbessern, wurden die 6-Wellplatten bzw. Zellkulturflaschen mit verschiedenen Substanzen vorbeschichtet.

3.2.3.1 Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin

Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Arginin wurde in destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 0,1 mg / ml verdünnt. Anschließend wurde der Boden der Kulturplatten mit 400 µl pro 10 cm² benetzt. Die Platten wurden für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten zunächst zwei Waschgänge mit PBS und zuletzt ein Waschgang mit dem jeweiligen Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen auf die beschichteten Wells gegeben.

3.2.3.2 Gelatine

Gelatine (2 %) wurde 1: 2 mit PBS verdünnt und auf die Kulturplatten pipettiert (400 µl pro 10 cm² Kulturplatte). Nach einer Stunde bei 37 °C wurden die Platten mit PBS gewaschen. Nach einem Waschgang mit dem jeweiligen Kulturmedium wurden die Zellen auf die Wells ausgesät.

3.2.3.3 Kollagen

Die Kollagenlösung (3,76 mg / ml) wurde 1: 5 mit sterilem PBS verdünnt. Von der gewonnenen Lösung (752 µg / ml) wurden 400 µl pro 10 cm² Kulturplatte auf die Wells mit dem Cellscrapper verteilt und anschließend zum Trocknen über Nacht unter der Sterilbank belassen. In einem Teil der Experimente wurde eine Verdünnung auf 100 µg / ml getestet (Methode nach Roh et al., 2005).

3.2.3.4 Fibronectin

Die Fibronectinstammlösung (500 µg / ml) wurde mit PBS auf 10 ng / ml verdünnt und in der Konzentration von ca. 4 µg / cm² auf die Wells gegeben. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37 °C erfolgte ein Waschgang mit PBS und mit dem jeweiligen Kulturmedium.

3.2.4 Analyse der Proliferationsrate der Haarfollikelzellen

Zur Untersuchung der Zellproliferationsrate wurden drei Wells mit jeweils $1,3 \times 10^6$ Zellen / Well in Medium 2 angesetzt. Nach 3, 5 und 8 Tagen wurde eine Zellzählung unter dem Lichtmikroskop durchgeführt.

3.2.5 Colony-Forming-Unit-Assay

Der Colony-Forming-Unit (CFU) Assay wurde zur Evaluierung des Selbsterneuerungspotenzials der isolierten Zellen verwendet. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10, 50 und 100 Zellen pro 80 cm² Petrischale im optimierten Medium ausgesät und für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit

Paraformaldehyd (4 %) für 15 Minuten fixiert und mit Kristallviolett für 10 Minuten gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die blau gefärbten Areale ausgezählt. Ab einem Durchmesser von 2 mm wurde eine Färbung als positive Zellkolonie gewertet.

3.2.6 Analyse der Genexpression mittels RNA-Isolierung

Nach erfolgreicher Isolation und Expansion der Haarfollikelzellen wurde die Genexpression bestimmter Markerproteine und Transkriptionsfaktoren auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurde die RNA der Zellen isoliert, sobald diese eine Zellkulturflasche konfluierend bewachsen hatten. Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kits von Roche.

Nach der Entfernung des Mediums aus der Zellkulturflasche wurden die am Flaschenboden angewachsenen Zellen mit 2 - 5 ml Trypsinlösung (0,25 %) für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Dieses Verfahren erlaubt es, sowohl den Zell-Zell-Kontakt zwischen den Zellen, als auch den Zell-Boden-Kontakt zu lösen. Zur Inaktivierung der Trypsinlösung wurden 5 ml PBS / 10 % FCS dazugegeben. Nach einer Zentrifugation von 8 Minuten bei 145 g wurden die Zellen einmal in 5 ml PBS gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert und mit 400 µl Lysis- / Bindingpuffer versetzt. 700 µl der lysierten Zellen wurden anschließend auf die RNA-Säule in einem Collectiontube gegeben und 15 Sekunden bei 8000 g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die danach hinzugegebene DNase-Lösung (100 µl pro Probe) erlaubt es, kontaminierende genomische DNA zu entfernen. Dazu wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Waschen mit 500 µl Waschpuffer I, 500 µl Waschpuffer II und zuletzt mit 200 µl Waschpuffer II und jeweils anschließender Zentrifugation wurden Kontaminationen entfernt. Dabei wurde das Zentrifugat stets verworfen und die RNA- Säule mit der adsorbierten RNA behalten. Zuletzt wurde die RNA mit Hilfe von 50 µl Elutionspuffer von der Säulenmembran abgewaschen.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Eppendorf) ermittelt. Hierfür wurde die RNA im Verhältnis 1: 13 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die OD wurde bei 260 nm und bei 280 nm nach Kalibrierung des Photometers mit RNase-freiem Wasser gemessen.

Das Lambert-Beer-Gesetz ($OD = \text{Konzentration} \times \text{Schichtdicke der Kuvette} \times \text{Extinktionsfaktor}$) erlaubt die Berechnung der RNA-Konzentration nach folgender Formel: $\text{RNA-Konzentration [ng / } \mu\text{l]} = OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$. Das Verhältnis OD_{260} / OD_{280} (Nukleinsäuren / Protein) ermöglicht eine Beurteilung der Reinheit der isolierten DNA. Die Ratio belief sich immer auf über 1,7.

3.2.7 cDNA-Synthese (reverse Transkription der mRNA)

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus mRNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt einen Primer (ein kurzer, komplementärer DNA-Abschnitt) zur Synthese, welcher an die mRNA bindet. Als Primer wurde ein Oligo-dT-Nukleotid (15 Desoxythymidine) eingesetzt, der komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist. Für die cDNA-Synthese aus RNA wurde der Omniscript RT Kit (Qiagen) verwendet.

Mit diesem Protokoll kann eine RNA-Menge im Bereich von 50 ng bis 2 μg umgeschrieben werden. Bei hoher RNA-Konzentration der Probe konnte unter 2 μl RNA eingesetzt werden. War die RNA-Konzentration niedriger, wurde die maximal einsetzbare Menge verwendet. Pro Probe wurden 20 μl Versuchsreagenz angesetzt: 6,33 μl Mastermix und 1 μl Reverse Transkriptase wurden in immer gleicher Menge verwendet (siehe Tab. 10). In Abhängigkeit von der RNA-Konzentration wurden 1 μg RNA zugegeben und das Versuchsreagenz mit RNase-freiem Wasser zu 20 μl ergänzt. Anschließend wurden die einzelnen Proben während einer Stunde bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Heizblock inkubiert. Außerdem wurde pro Probe ein Reaktionsansatz erstellt, in dem die Reverse Transkriptase nicht verwendet wurde. In diesem Ansatz entstand also keine cDNA aus der RNA. Dieses Template diente als Negativkontrolle in den durchgeführten PCRs (Ausschluss kontaminierender genomischer DNA).

10 x RT Puffer	2,0 μl
dNTP-Mix (je 5 mM)	2,0 μl
Oligo(dt)-Primer (10 μM)	2,0 μl
RNase-Inhibitor (30 Units / μl) (Eppendorf)	0,33 μl
Omniscript RT	1,0 μl
RNase-freies Wasser	variabel
Template-RNA	variabel

Tabelle 10: Mastermix der Reversen Transkriptase

3.2.8 Herstellung der PCR-Positivkontrollen

3.2.8.1 RNA-Präparation aus humanem Pankreasgewebe

Für die Etablierung der endokrinen Primer wurde eine Positivkontrolle aus humanem Pankreasgewebe hergestellt. Zur Isolation von RNA aus frischem Pankreasgewebe wurde das RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen) verwendet.

In einem RNase-freien Eppendorfgefäß wurde zuerst RLT-Buffer (Beta-Mercaptoethanol mit dem im Kit enthaltenen RLT plus Puffer 1: 100) auf das mit einer sterilen Schere zerkleinerte Gewebe gegeben. Mit einem RNase-freien Mikropistill wurde das Gewebe im Lysepuffer homogenisiert. Anschließend wurde eine Quiashredder Spin Column mit 600 µl des Homogenisats beschickt und bei maximaler Geschwindigkeit (10400 g) 2 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde die Membran der Quiashredder Spin Column vorsichtig entfernt und das verbleibende Lysat bei 10400 g während 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und auf eine gDNA Eliminator Spin Column gegeben.

Nach Zentrifugation des Reaktionsgefäßes bei 8000 g für 30 Sekunden wurde die Filtermembran entfernt und es wurden 600 µl Ethanol (70 %) zum Durchfluss hinzugefügt. Mit bis zu 700 µl dieser Lösung wurde daraufhin eine RNeasy Spin Column beschickt und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Diesmal wurde der Durchfluss verworfen und auf die Filtermembran wurden 700 µl RW1-Puffer gegeben, was einem Waschschrift entspricht. Nach nochmaliger Zentrifugation bei 8000 g für 15 Sekunden wurde auch dieser Durchfluss verworfen und die Membran der RNeasy Spin Column konnte mit 500 µl RPE-Puffer behandelt werden.

Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Filtermembran ein zweites Mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und diesmal für 2 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Filtermembran vorsichtig aus der alten RNeasy Spin Column entfernt und in ein neues Collection Tube (2 ml) gegeben und 1 Minute auf 10400 g zentrifugiert. Dann wurde die RNeasy Spin Column in ein neues Collection Tube (1,5 ml) überführt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser beschickt. Es folgte eine Zentrifugation bei 8000 g für 1 Minute. Als letzten Schritt wurde die RNeasy Spin Column in ein neues Collection Tube (1,5 ml) gegeben und ein zweites Mal mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Nach der letzten Zentrifugation bei 8000 g für 1 Minute war die RNA gebrauchsfertig.

3.2.8.2 Kultivierung der Zelllinie HACAT

Die HaCaT-Zelllinie (human adult low calcium temperature keratinocytes) ist eine humane, spontan immortalisierte, nicht maligne Keratinozytenzelllinie. Sie stammt aus der gesunden Haut eines männlichen Patienten, bei dem aufgrund eines Melanoms eine Nachoperation („Sicherheitsabstand“) durchgeführt wurde. Aus diesem Präparat wurde nach histologisch gesicherter Benignität die HaCaT-Zelllinie etabliert (Boukamp et al., 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HaCaT-Zelllinie als PCR-Positivkontrolle verwendet. Die Zellen wurden zweimal in der Woche 1: 20 gesplittet und in folgendem Medium kultiviert:

RPMI 1640	90 %	18 ml
FCS	10 %	2 ml
P/S	1 %	0,2 ml

Tabelle 11: Kulturmedium der Zelllinie HaCaT

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die RT-PCR stellt eine in vitro-Methode für die enzymkatalysierte Synthese definierter DNA-Abschnitte dar. In mehreren Amplifizierungsrunden, die aus Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung der spezifischen Primer (Annealing) und Verlängerung der Primer entlang der Matrizen-DNA durch eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (Elongation) bestehen, erfolgt eine Anreicherung spezifischer, definierter DNA-Fragmente (Mullis und Faloona, 1987). Es erfolgt somit ein qualitativer Nachweis amplifizierter Gensequenzen. Für die PCR wurde das Kit von Promega eingesetzt, aus dem folgender Mastermix erstellt wurde:

5x Green Flexi Go Taq Flexi Buffer	5,0 µl
MgCl ₂ (1 / 2 / 3 mM)	1,0 / 2,0 / 3,0 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 µl
5'-Primer (50 pM)	0,25 µl
3'-Primer (50 pM)	0,25 µl
Deionisiertes Wasser	variabel

Tabelle 12: Mastermix der Polymerase-Kettenreaktion

Die verwendete Menge an $MgCl_2$ variierte je nach Primer. Für jede PCR wurde eine Positivkontrolle verwendet, d.h. die cDNA einer Zelllinie bzw. eines Gewebes, die nachweislich positiv für das Genprodukt waren. Pro PCR-Reaktion wurde eine Negativkontrolle eingesetzt. Das Template der Negativkontrolle war ohne Reverse Transkriptase bei der cDNA-Synthese erstellt worden (siehe oben). Die variable Zugabe von deionisiertem Wasser ergab schließlich ein Reaktionsvolumen von 25 μ l zuzüglich der cDNA pro Probe.

Die DNA wurde im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert:

- 1) Aktivierung der DNA-Polymerase für 2 Minuten bei 95 °C
- 2) Denaturierung der DNA für 15 Sekunden bei 95 °C
- 3) Annealing der Primer für 30 Sekunden bei einer Primer-spezifischen Temperatur
- 4) Elongation für 1 Minute bei 72 °C sowie
- 5) Finale Elongation für 5 Minuten bei 72°C.

Die Schritte 2) bis 4) wurden zyklisch wiederholt, wobei die Anzahl der Zyklen primerspezifisch eingestellt wurde (Primersequenzen, Annealingtemperaturen und Zyklenzahl der PCR: siehe Tabelle 13).

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem zweiprozentigen Agarosegel aufgetrennt, das mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt worden war. Je 20 μ l Probe wurde auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentlänge der amplifizierten DNA wurde außerdem ein Molekulargewichtsmarker (100 Bp DNA Ladder, Promega) auf dem Gel mitgeführt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte für große Gele mit 20 Taschen bei 95 Volt (Constant Voltage) für 25 Minuten in einem Gelsystem (MWG Biotech). Die durch Fluoreszenz unter UV-Licht detektierten Banden der amplifizierten DNA wurden mit einem Geldokumentations-System (Intas) photographisch dokumentiert.

Gen	Primersequenz A: Forward (5'→3') B: Reverse (3'→5')	Temp [°C]	MgCl ₂ [mM]	Größe [bp]	Zyklen	Positiv- kontrolle
β-Aktin	A: acccacactgtgccatcta B: gccacaggattccatacca	58		342	28	HACAT
BCRP	A: cagccgtggaactctttgtgtag B: gagtctctggcagaagttttgtcc	62	3	458	35	cDNA29
Beta2	A: cagaaccaggacatgcc B: atcaaaggaaggctggg	58	1	216	35	Pankreas
Chromogranin A	A: cgctccgccgctgctctggctct B: ctggggcctggctccgctctgtg	62	3	453	35	Pankreas
CK7	A: ccagccaccatgtccatccacttc B: ccaggcggcccccatccacctg	58	3	492	35	HACAT
CK20	A: cctacacaagcatctgggcaacac B: cagaaggcggcggaagtagca	58	1	481	35	HACAT
Gapdh	A: tgatgacatcaagaaggtggtag B: tccttgaggccatgtggccat	63	2	250	28	HACAT
Glukagon	A: aggcagaccactcagtga B: aacaatggcgacctctctg	60	2	300	35	Pankreas
Hnf4α	A: atcagaaggcacaacctcaac B: tgtctttgtccaccacgcact	60	2	197	35	Pankreas
HlxB9	A: cctaagatgcccacttcaactccc B: gcccttctgtttctccgctctctg	62	1	276	35	Pankreas
Insulin	A: gaggccatcaagcacatcact B: ggctgctctagtgcagta	58	1	390	35	Pankreas
Isl1	A: cgtgcccgtccaaggtgatca B: cattgggctgctgctctggagtt	60	1	478	35	Pankreas
Ncam	A: gtaaggctggcggcgtcaatgg B: acgatggccccgggtgctcagg	64	1	425	35	Nebennierenrinde
Nestin	A: agagggaattcctggAg B: ctgaggaccaggactctcta	58	1	495	35	HACAT
Nkx6.1	A: accctgccgctatccccgc B: cagaagatggcgctccggcca	58	1	509	35	Pankreas
Oct4	A: cgaccatctgccgctttgag B: ccccctgtccccattccta	60	1	577	35	cDNA29
Pdx1	A: cccatggatgaagtctacc B: gtcctctctttttccac	60	2	200	35	Pankreas
Somatostatin	A: gatgctgctctgccgctcc B: tgccatagccgggtttga	58	2	300	35	Pankreas
Sox1	A: ctactttctccggttgcttcc B: tgccctggtctttgtcctcatcc	60	1	390	35	Kleinhirn
Sox2	A: gccagtggaactttgtcg B: gcagcgtgacttatcctctt	62	2	390	35	Kleinhirn, HACAT
Sox17	A: cagtgaccagagaccagacc B: ccacgactgccagcatctt	60	1	292	35	Großhirn
Vimentin	A: gaacgccagatgctgaaatg B: ccagagggagtgaatccagatta	55	2/3	280	35	Testis, Haut

Tabelle 13: Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen der PCR

3.2.11 Histologie

3.2.11.1 HE-Färbung

Zur Identifizierung der basalen Zellmorphologie wurden die gewonnenen Haarfollikelzellen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dafür wurden 7500 bis 15000 Zellen pro Culture Slide in ihrem normalen Medium ausgesät und bei 37 °C kultiviert. Sobald Zell-Zell-Kontakte unter dem Mikroskop sichtbar waren, konnte mit der Färbung begonnen werden:

Nach der Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Als nächstes erfolgte die Fixation mit Paraformaldehyd (4 %) für 15 Minuten. Vor der Rehydrierung mit Aqua dest. für 5 Minuten wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Hämatoxylin-Lösung Gill III wurde anschließend für 90 Sekunden auf dem Objektträger inkubiert. Nun wurden die Zellen für 2 Sekunden in HCl-Lösung (0,1%) differenziert und danach 3 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Färbung mit Eosin dauerte 4 Minuten. Der Objektträger wurde dann 30 Sekunden lang unter fließendem Leitungswasser gewaschen und zuletzt zweimal für 5 Minuten in Xylol inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

3.2.11.2 Immunhistologie

Zum Nachweis bestimmter Oberflächenproteine auf den isolierten Zellen wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden 7500 bis 15000 Zellen pro Culture Slide in ihrem normalen Medium ausgesät und bei 37 °C kultiviert, bis Zell-Zell-Kontakte unter dem Mikroskop sichtbar waren. Nun konnte mit der Färbung begonnen werden: Der Zellüberstand im Culture Slide wurde entfernt. Die am Boden haftenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd (4%) für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Von diesem Moment an wurde das Culture Slide während jedem weiteren Schritt in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Nach drei Waschgängen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit Hilfe von Saponin (1%) für 10 Minuten permeabilisiert. Es folgten drei weitere Waschgänge mit PBS. Die Färbung der Zellen wurde mit dem Vectastain® ABC Kit durchgeführt. Mittels H₂O₂ (0,3%) und Pferdeserum (0,3%, in PBS) wurde die endogene Peroxidase der

Zellen blockiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Pferdeserum (oder Ziegenserum, je nach Antikörper) (10 %) blockiert. Die Inkubation bei Raumtemperatur dauerte 60 Minuten. Nach einem Waschgang mit PBS konnte der primäre Antikörper (Verdünnung 1:50 bis 1:200 in 10% Pferde- oder Ziegenserum in PBS) auf die Objektträger aufgebracht und für 120 Minuten inkubiert werden. Es folgten drei Waschgänge mit PBS. Nun wurde der sekundäre biotinylierte Antikörper für 60 Minuten auf das Culture Slide gegeben (1 Tropfen Pferde- (oder Ziegen-) Blocking Serum und 1 Tropfen biotinylated Antibody). Nach drei weiteren Waschgängen mit PBS wurde eine Färbung mit Vector® NovaRed-Reagenz durchgeführt: Das Reagenz bestand aus 5 ml Aqua dest. 3 Tropfen Lösung 1, 2 Tropfen Lösung 2, 2 Tropfen Lösung 3 und 2 Tropfen Hydrogen Peroxide Solution. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 bis 15 Minuten. Danach wurde das Culture Slide mit Leitungswasser gewaschen und mit Hämatoxylin für 5 bis 45 Sekunden gegengefärbt. Nach der Differenzierung der Zellfärbung unter Leitungswasser wurde der Objektträger mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

3.2.11.3 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnten bestimmte Oberflächenproteine auf den isolierten Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurden 7500 bis 15000 Zellen pro Culture Slide in ihrem normalen Medium ausgesät und bei 37 °C kultiviert, bis Zell-Zell-Kontakte unter dem Mikroskop sichtbar waren. Nun konnte mit der Färbung begonnen werden: Der Zellüberstand im Culture Slide wurde entfernt. Die am Boden haftenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd (4 %) für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Von diesem Moment an wurde das Culture Slide während jedem weiteren Schritt in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach drei Waschgängen mit PBS wurden die fixierten Zellen mit Hilfe von Saponin (1 %) für 10 Minuten permeabilisiert. Es folgten drei weitere Waschgänge mit PBS. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Normal Horse Serum (3 %) blockiert. Die Inkubation bei Raumtemperatur dauerte 60 Minuten. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurden die Culture Slides mit dem primären Antikörper über Nacht mit Normal Horse Serum (3 %) bei 4°C inkubiert. Vor der Applikation des sekundären Antikörpers waren 3 Waschschrte mit PBS von je 10

Minuten nötig. Anschließend konnte der sekundäre Antikörper in Normal Horse Serum (3 %) auf die Culture Slides aufgebracht und für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert werden. Drei Waschgänge mit PBS von je 5 Minuten wurden abschließend durchgeführt. Nach dem Eindeckeln der Culture Slides mit dem Vectashield® Hard-Set™ Mounting Medium with DAPI wurde das Ergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Antikörper	Vorkommen	Verdünnung	Funktion
β-III-Tubulin	Neuronen (El Seady et al., 2008)	1:200	Mikrotubuli; Bestandteile des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen
CK18	Epidermis (Aberdam et al., 2007), einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen, z.B. GI-Trakt (Terada et al., 2009), DEEP-1 (Medina et al., 2006)	1:50	Intermediärfilament, Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen
CK19	einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen, z.B. GI-Trakt (Terada et al., 2009), DEEP-1 (Medina et al., 2006)	1:50	Intermediärfilament, Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen
CK20	Merkelzellen (Eispert et al., 2009), einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen, z.B. GI-Trakt (Terada et al., 2009)	1:50	Intermediärfilament, Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen
Desmin	Skelett-, Herz- und glatte Muskulatur (Paulin und Li; 2004)	1:80	Typ 3-Intermediärfilament, Element des Zytoskeletts
Nestin	Nervenzellen, adulte SZ (Amoh et al., 2005; Mignone et al., 2007)	1:200	Intermediärfilament, Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen
Neurofilament 200	ausgereifte Neuronen des ZNS und PNS (Hunt et al., 2008)	1:100	Neuronales Intermediärfilament
Oct4	pluripotente embryonale SZ (Boiani und Schöler, 2005; Yu et al., 2006); adulte SZ der Haut (Yu et al., 2006; De Kock et al., 2009; Tai et al., 2005)	1:100	Aus der Familie der POU-Domain-Transkriptionsfaktoren; Vermittlung von Selbsterneuerung und Pluripotenz
PanCK	Einfache verhornende und nicht verhornende Plattenepithelien	1:100	Intermediärfilament, Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen
Synaptophysin	Neuronen	1:500	Präsynaptisches Vesikelprotein; Modulation der synaptischen Aktivität (Hinz et al., 2001)

Tabelle 14: Antikörper für die Immunhistologie bzw. Immunfluoreszenz

3.2.12 FACS-Analyse (Durchflußzytometrie)

FACS steht für "fluorescence activated cell sorting" und beschreibt eine Methode, mittels derer die Zellmorphologie und die Proteinexpression von Zellen untersucht werden kann. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Die Ergebnisse der Streulichtmessungen werden in einem "Dot-Plot"-Diagramm dargestellt, auf dessen X-Achse das FSC und auf der Y-Achse das SSC aufgetragen ist.

Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können zur Markierung der Zellen verwendet werden. Nach der Markierung kann die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen. Durch Einsatz von verschiedenen Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Pro Zelle können mehrere verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden. In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe FITC und PE verwendet.

Die Markierung mit Antikörpern wurde folgendermaßen durchgeführt: Die aus der Zellkulturflasche abgenommenen Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop gezählt. In jedes Röhrchen sollten pro Antikörper zwischen 200.000 und 500.000 Zellen gegeben werden. Somit wurde die Menge an Zellsuspension berechnet, die 300.000 Zellen enthielt und anschließend mit 1 ml Pufferlösung (PBS mit 1% FCS) verdünnt. Für jeden spezifischen Antikörper wurde als Negativkontrolle ein irrelevanter Antikörper (Isotypkontrolle) verwendet. Jedes Röhrchen wurde nun bei 453 g für 5 Minuten zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde danach in einer Antikörperlösung aus dem jeweiligen Antikörper (1 µl) verdünnt mit 50 µl Puffer resuspendiert. Die Endkonzentration des Antikörpers sollte 1:100 betragen. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C während 30 Minuten. Im anschließenden

Waschgang wurde zuerst je 1 ml Puffer pro Ansatz dazugegeben, um dann jedes Röhrchen bei 453 g für 5 Minuten zu zentrifugieren.

Nicht direkt konjugierende Antikörper (wie CD117 Biotin) mussten vor der Fixation mit Streptavidinlösung (1:200) vorbehandelt werden: In Puffer verdünntes Streptavidin-FITC wurde zu den Zellen dazugegeben und 20 Minuten abgedunkelt bei 4 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml Puffer wurde eine Zentrifugation bei 453 g für 5 Minuten durchgeführt. Bei der folgenden Fixierung wurde das Pellet in 250 µl Puffer resuspendiert und mit 250 µl Formalinlösung (4%) versetzt. Dieser Ansatz wurde anschließend während 20 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Waschschrift wurde jedes Röhrchen zuerst bei 453 g für 5 Minuten zentrifugiert, wobei das Pellet mit 1 ml Puffer resuspendiert und ein letztes Mal zentrifugiert wurde. Der verbleibende Überstand wurde in 300 µl Puffer gelöst und abgedunkelt bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt. Die FACS-Analyse erfolgte mit dem FACS Calibur Gerät der Firma Biosciences (Heidelberg). Die erfassten Rohdaten wurden mit der Software WinMDI Version 2.9 ausgewertet.

Cluster of Differentiation	Vorkommen	Funktion
CD 9	peripheres Nervensystem; embryonale Stammzellen	Zelladhäsionsmolekül der Tetraspaninfamilie; Expression in neuronalen Progenitorzellen (Ishibashi et al., 2004); Marker für Pluripotenz embryonaler SZ (Prowse et al., 2009)
CD 24	B-Lymphozyten, differenzierte Neuroblasten	Zelladhäsionsmolekül; involviert in die neuronale Zelldifferenzierung (Pruszek et al., 2009)
CD 29 ($\beta 1$-Integrin)	Haarfollikelstammzellen	Zelladhäsionsmolekül; Interaktion mit der extrazellulären Matrix (Morris et al., 2004; Morasso und Tomic-Canic, 2005)
CD 31 (PECAM-1)	Endothelzellen, neutrophile Granulozyten	Zelladhäsionsmolekül ; reguliert die Migration neutrophiler Granulozyten (Luu et al., 2003)
CD 34	hämatopoetische Stammzellen und endotheliale Gewebe	Zelladhäsionsmolekül (Alakel et al., 2009); fördert die Zellmigration (Maltby et al., 2010)
CD 44 („Bone homing receptor“)	humane hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen	Zelladhäsionsmolekül; leitet humane hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen zum Knochenmark (Sackstein et al., 2008)
CD 45	Hämatopoetische Zellen, außer Erythrozyten und Plasmazellen	Tyrosinphosphatase; Modulation der Signaltransduktion und Zytokinproduktion im Immunsystem (Saunders and Johnson, 2010)
CD 49b ($\alpha 2$-Integrin)	„Natural Killer“-Zellen, T-Zellen	Kollagenrezeptor (Morris et al., 2004; Morasso und Tomic-Canic, 2005)
CD 49f ($\alpha 6$-Integrin)	Haarfollikelstammzellen, Thrombozyten, Monozyten und T-Lymphozyten	Zelladhäsionsmolekül; Interaktion mit der extrazellulären Matrix (Morris et al., 2004; Morasso und Tomic-Canic, 2005)
CD 56 (NCAM)	Neuronen, Glia, Skelettmuskel und Natural Killer-Zellen	Zelladhäsionsmolekül; spielt eine Rolle beim neuronalen Wachstum, bei der synaptischen Plastizität und bei der Gedächtnisbildung
CD 59 (Protectin)	Lymphozyten, Erythrozyten	Regulator des Komplementsystems; Inhibition des „Membrane Attack Complex“ (Huang et al., 2006)
CD 71	differenzierte hämatopoetische Zellen	Transferrinrezeptor (Li et al., 1998; Fathke et al., 2004); spielt eine Rolle im Eisenhaushalt
CD 117 (c-Kit-Rezeptor)	hämatopoetische Stammzellen	Tyrosinkinaserzeptor Typ III; spielt eine Rolle in der Zellproliferation und in der Zelldifferenzierung (Alakel et al., 2009)
CD 133 (Prominin 1)	hämatopoetische Stammzellen, endotheliale Progenitorzellen, neuronale und gliale SZ	Zelladhäsionsmolekül , Mitglied der Pentaspan-Transmembranglykoproteinfamilie (Alakel et al., 2009)
CD 200	Hämatopoetische Zellen	Typ-1-Membranglykoprotein, Stammzellmarker (Ohyama und William, 2007; Amoh et al., 2009) ; reguliert die Aktivität der myeloiden Zellen

Tabelle 15: Darstellung von Vorkommen und Funktion verschiedener Oberflächenmoleküle, die in der vorliegenden Studie untersucht worden sind

3.2.13 Untersuchung des proendokrinen Differenzierungspotenzials

Es wurden zahlreiche Experimente durchgeführt, in denen der Einfluss definierter Faktoren auf die Genexpression und auf die Differenzierung der isolierten Haarstammzellen ausgetestet wurde. Teilweise waren diese in der Literatur zur Unterstützung der Ausreifung endokriner Zellen aus adulten Stammzellpopulationen eingesetzt worden. Nach der Stimulationsphase wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche entnommen; ihre RNA wurde zur anschließenden cDNA-Synthese extrahiert. Die Genexpression der stimulierten Zellen wurde mittels PCR analysiert.

3.2.13.1 Stimulation mit Activin A und Exendin 4

Activin A gehört zur Familie der Transforming Growth Factor- β -Familie. Es bewirkt die Umwandlung von exokrinen AR42J Zellen in insulinexprimierende Zellen (Mashima et al., 1996) und führt zur Regeneration von pankreatischen Betazellen der mit Streptozotocin behandelten Mäuse (Li et al., 2004). Das Analogon Exendin 4 führt zu einer Hochregulation von Pdx1 und infolgedessen zu einer gesteigerten Differenzierung in insulinproduzierende Zellen (Movassat et al., 2002). Für die Stimulation wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium (Tab. 16) für 5 Tage in einer 25 cm² Flasche inkubiert.

Die Arbeitsgruppe um Wu untersuchte die Differenzierungskapazität von Stammzellen aus dem Knochenmark in Inselzellähnliche Zellen (Wu et al., 2007). Dabei wurden die mesenchymalen Stammzellen zuerst für 2 Wochen in HG-DMEM mit 5 % FCS gehalten, um anschließend jeweils 7 Tage in den unten genannten Medien kultiviert zu werden (Tab. 17 und 18).

DMEM 4500 mg/l Glukose	57%	11,4 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	28%	5,6 ml
FCS	15%	3 ml
bFGF10	10 ng / ml	20 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
Nikotinamid	10 mM	0,2 ml (von 1 M Lsg.)
Activin A	10 ng / ml	8 µl (von 25 µg / ml Lsg.)
Exendin 4	90 nM	6 µl (von 300 nM Lsg.)
MTG	0,0006 M	1 µl
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 16: Stimulationsmedium mit Activin A und Exendin 4

Für 7 d		
DMEM 4500 mg/l Glukose	95%	19 ml
FCS	5%	1 ml
Nikotinamid	10 mM	0,2 ml (von 1 M Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 17: Stimulationsmedium mit NAD

Für weitere 7 d		
DMEM 4500 mg/l Glukose	95%	19 ml
FCS	5%	1 ml
Exendin 4	10 nM	20 µl (von 20 µM Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 18: Stimulationsmedium mit Exendin 4

3.2.13.2 Caspase Inhibitor VI

Apoptose, der programmierte Zelltod, spielt eine große Rolle während der Entwicklung, bei der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und bei der Regulation des Immunsystems. Sie wird von einer Klasse von Cysteinproteasen, den Caspasen, koordiniert. Caspase-Inhibitoren könnten eine Therapie verschiedener Krankheiten durch Hemmung der Apoptose ermöglichen.

Shen verwendete den Caspaseinhibitor VI in einem Versuchsansatz, in dem gezeigt werden sollte, dass Retinsäure in embryonalem Pankreasgewebe die Suppression exokriner Differenzierung und die Bildung von endokrinen Zellclustern hervorruft (Shen et al., 2007). Für die Stimulation wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium (Tab. 19) für 5 Tage in einer 25 cm² Flasche inkubiert.

DMEM 4500 mg/l Glukose	60%	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30%	6 ml
FCS	10%	2 ml
bFGF10	10 ng / ml	20 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
Retinsäure	1 µM	2 µl (von 10 mM Lsg.)
Nikotinamid	5 mM	0,1 ml (von 1 M Lsg.)
Activin A	10 ng / ml	8 µl (von 25 µg / ml Lsg.)
Exendin 4	90 nM	6 µl (von 300 nM Lsg.)
Caspase Inhibitor VI	40 µM	40 µl (von 20 mM Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 19: Stimulationsmedium mit Caspaseinhibitor VI

3.2.13.3 Stimulation mit DBZ

DBZ (Dibenzazepin) ist ein γ -Sekretaseinhibitor, der die Notch-Prozessierung moduliert. Es greift also in die Differenzierung von Geweben ein, die vom Notch-Signalweg reguliert werden. Es wurde berichtet, dass DBZ die Genexpression verschiedener Hormone, wie z.B. Somatostatin, Sekretin und Gastrin, in endokrinen Zellen steigert (Milano et al., 2004). Für den Stimulationsansatz wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium in einer 25 cm² Flasche für 7 Tage kultiviert:

DMEM 4500 mg/l Glukose	60%	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30%	6 ml
k.o. Serum replacement	10%	2 ml
Hydrocortison	50 µM	10 µl
EGF	10 ng / ml	2 µl (von 100 ng / µl Lsg.)
DBZ	20 nM	4 µl (von 100 µM Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 20: Stimulationsmedium mit DBZ

3.2.13.4 Forskolin

Forskolin ist ein Labdan-diterpen, das aus der indischen Pflanze *Coleus forskohlii* gewonnen wird. Forskolin wird im Rahmen der Erforschung der Zellphysiologie zur Untersuchung des intrazellulären cAMP-Signalwegs verwendet. Forskolin aktiviert das Enzym Adenylatzyklase und hebt so den cAMP-Spiegel an. cAMP stellt einen wichtigen Botenstoff in der hormonellen Signaltransduktion dar. Es wird berichtet, dass Forskolin die Plasmamembran von Betazellen depolarisiert und die Frequenz Ca²⁺-abhängiger Aktionspotentiale erhöht. Dies führt zu einer signifikanten Steigerung der Insulinsekretion (Ullrich et al., 1996; Li et al., 2004). Für die Stimulation wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium (Tab. 21) für 5 Tage in einer 25 cm² Flasche inkubiert.

X-Vivo	100%	20 ml
Forskolin	10 µM	10 µl (von 20 mM Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 21: Stimulationsmedium mit Forskolin

3.2.13.5 LIF

Der Leukemia inhibitory factor (LIF) ist ein Interleukin der Klasse 6, das Zellwachstum und Zelldifferenzierung beeinflusst. In Kulturen embryonaler Stammzellen wird LIF verwendet, um die Zellen in ihrem undifferenzierten Status zu halten (Mignone et al., 2007). Die Differenzierung adulter, retinaler Progenitorzellen in Gliazellen, Neuronen und Photorezeptoren wird durch die Applikation von LIF in

der Zellkultur verhindert. Stattdessen verbleiben die Zellen in einem proliferativen, aber dennoch undifferenzierten Status (Carter et al., 2009).

LIF übt daneben Einfluss auf die Zelldifferenzierung anderer Zellarten, wie Knochen- und Nervenzellen, als auch auf die Embryogenese und Entzündungsgeschehen aus. Für den Stimulationsansatz wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium (Tab. 22) für 5 Tage in einer 25 cm² Flasche inkubiert.

DMEM 4500 mg/l Glukose	60%	14,25 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30%	4,75 ml
FCS	5%	1 ml
EGF	20 ng / ml	4 µl (von 100 ng / µl Lsg.)
bFGF	20 ng / ml	40 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
ESGRO (LIF)	1000 U / ml	20 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 22: Stimulationsmedium mit LIF

3.2.13.6 Monothioglycerol

Monothioglycerol (MTG) senkt durch die Steigerung der intrazellulären Glutathionkonzentration den oxidativen Stress einer Zelle. Die Glutathionkonzentration schwankt in bestimmten Stadien der embryonalen Entwicklung. Die Arbeitsgruppe um Ku stimulierte embryonale Stammzellen unter anderem mit MTG und differenzierte diese in frühe Progenitorzellen des Pankreas (Ku et al., 2004). Für die Stimulation wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium (Tab. 23) für 5 Tage in einer 25 cm² Flasche inkubiert.

DMEM 4500 mg/l Glukose	60%	11,4 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30%	5,6 ml
FCS	15%	3 ml
bFGF10	10 ng / ml	20 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
Nikotinamid	10 mM	0,2 ml (von 1 M Lsg.)
Activin A	10 ng / ml	8 µl (von 25 µg / ml Lsg.)
Exendin 4	90 nM	6 µl (von 300 nM Lsg.)
Monothioglycerol	0,0006 M	1 µl
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 23: Stimulationsmedium mit Monothioglycerol

3.2.13.7 Picolinsäure

Die Arbeitsgruppen Horvath und Chen fanden heraus, dass Chromiumpicolinat den glykämischen Status insulinresistenter Patienten verbessert, indem es den insulinregulierten Glukosetransport in insulinsensitive 3T3-L1-Adipozyten erhöht (Horvath et al., 2008; Chen et al., 2006).

Auch Abdourahman und Edwards beschreiben eine verbesserte Glukosetoleranz diabetischer Ratten nach Chromiumpicolinat-Supplementierung (Abdourahman und Edwards, 2008). Für den Stimulationsansatz wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium (Tab. 24) für 5 Tage in einer 25 cm² Flasche inkubiert.

DMEM 4500 mg/l Glukose	60%	11,4 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30%	5,6 ml
k.o. Serum replacement	10%	2 ml
Hydrocortison	50 µM	10 µl
EGF	10 ng / ml	2 µl (von 100 ng / µl Lsg.)
Nikotinamid	5 mM	0,2 ml (von 1 M Lsg.)
Picolinsäure	10 mM	1 ml (von 200 mM Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 24: Stimulationsmedium mit Picolinsäure

3.2.13.8 Retinsäure

Vitamin A (Retinsäure) übt einen Einfluss auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung aus. Es ist in der Literatur beschrieben worden, dass Retinsäure die Entstehung von Ngn3-positiven endokrinen Progenitorzellen induziert und ihre weitere Differenzierung in Betazellen stimuliert (Oström et al., 2008).

Für die Stimulation wurden 100.000 Zellen in 5 ml Stimulationsmedium (Tab. 25) für 5 Tage in einer 25 cm² Flasche inkubiert.

DMEM 4500 mg/l Glukose	60%	12 ml
DMEM / F12 (1 : 1)	30%	6 ml
k.o. Serum replacement	10%	2 ml
All-trans-Retinsäure	10 µM	2 µl (von 10 mM Lsg.)
Nikotinamid	5 mM	0,1 ml (von 1 M Lsg.)
Activin A	10 ng / ml	8 µl (von 25 µg / ml Lsg.)
bFGF10	10 ng / ml	20 µl (von 10 µg / ml Lsg.)
P/S	1%	0,2 ml

Tabelle 25: Stimulationsmedium mit Retinsäure

3.2.14 Differenzierungsansätze

3.2.14.1 Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in Osteoblasten

Ein Beweis für die Multipotenz von Zellen ist ihre Fähigkeit zur Differenzierung in einen anderen Zelltyp. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential der isolierten Haarfollikelstammzellen untersucht, in Osteoblasten, Adipozyten, glatte Muskulatur und Neuronen zu differenzieren. Für die Osteoblastendifferenzierung wurden 7.500 bis 15.000 Zellen pro cm² in einer 6-Wellplatte in Medium 2 ausgesät. Die Zellen adhärten an den Wells über Nacht im Inkubator bei 37°C und wurden nach Entfernung des alten Mediums für 14 Tage im Differenzierungsmedium gehalten. Es wurden auch Kontrollzellen ausplattiert, die kein Differenzierungsmedium erhielten und damit als Negativkontrolle für die Osteoblastenfärbung dienen.

Das Medium (Tab. 26) wurde zweimal pro Woche gewechselt. Zum Nachweis der Differenzierung wurde die von-Kossa-Färbung durchgeführt (Popp et al., 2007). Mittels dieser Methode werden Kalziumsalze gefärbt. Hierfür wird Silbernitrat eingesetzt, da das intrazelluläre Kalzium gegen Silberionen ausgetauscht werden kann. Die Silberionen werden durch Inkubation unter UV-Licht zu metallischem Silber reduziert und sind anschließend als braune bis schwarze Pigmentierung erkennbar.

Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums aus den 6-Wellplatten wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend fand die Fixation der Zellen auf der Wellplatte statt: 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mittels Formalin (10 %) in PBS. Danach wurden die Wells dreimal gründlich mit Aqua dest. gewaschen, um Salze zu entfernen. Nun wurde eine 5-prozentige Silber-Nitrat-Lösung zugegeben und 30 Minuten bei RT unter UV-Licht inkubiert. Es erfolgten drei Waschgänge mit Aqua dest. Pyrogallol (1 %) wurde auf die Zellen aufgebracht und 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein Waschgang mit Natriumthiosulfat (5 %). Zum Schluss wurden die Wells noch zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Das Ergebnis der Färbung wurde per Foto dokumentiert.

DMEM 1000 mg / l Glucose	60%	5 ml
FCS	10%	600 µl
P/S	1%	60 µl
Dexamethason	100 µM	9,6 µl
Ascorbic acid	0,3 mM	18 µl
Beta-Glycerolphosphat	10 mM	60 µl

Tabelle 26: Medium der Osteoblastendifferenzierung

3.2.14.2 Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in Adipozyten

Für die Adipozytendifferenzierung wurden 7.500 bis 15.000 Zellen pro cm² in einer 6-Wellplatte in Medium 2 ausgesät. Die Zellen wuchsen über Nacht im Inkubator bei 37 °C auf den Wellplatten an und wurden nach Entfernung des alten Mediums für 14 Tage in ein Differenzierungsmedium gegeben. Es wurden zusätzlich Kontrollzellen ausplattiert, die kein Differenzierungsmedium erhielten und damit als Negativkontrolle für die Adipozytenfärbung dienten.

Das Medium (Tab. 27) wurde zweimal pro Woche gewechselt. Zum Nachweis der Differenzierung wurde die Oil-Red-Färbung durchgeführt (Janderová et al., 2003). Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums aus den 6-Wellplatten wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend fand die Fixation der Zellen auf den Wellplatten statt: 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mittels Formalin (10 %) in PBS. Das Formalin wurde abgesaugt, durch frisches Formalin (10 %) ersetzt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Oil Red Working Solution vorbereitet: 3 Teile Oil Red Stock Solution wurden mit 2 Teilen Aqua dest. gemischt, bei RT 20 Minuten inkubiert und anschließend durch ein 20 µm Sterilfilter filtriert.

Nach dem Absaugen des Formalins wurden die Wells einmal mit Isopropanol (60 %) gewaschen. Das Isopropanol wurde vollständig aus den Wells entfernt; anschließend wurden die Wells luftgetrocknet. Nun wurde die Oil Red Working Solution zugegeben und bei RT für 2 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde die Oil Red Working Solution entfernt und es erfolgten zwei Waschgänge mit Aqua dest. Danach wurde Isopropanol hinzugefügt und genau 30 Sekunden lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden die Wells dreimal mit Aqua dest. gereinigt. Das Ergebnis der Färbung wurde per Foto dokumentiert.

DMEM 4500 mg/l Glukose	86,6%	5,2 ml
FCS	10%	600 µl
P/S	1%	60 µl
Isobutylmethylxanthin (= IBMX)	10 mg / ml	60 µl
Indomethacin	50 mM	24 µl
Dexamethason	64 mM	93 µl
Insulin	10 mg / ml	6 µl

Tabelle 27: Medium der Adipozytendifferenzierung

3.2.14.3 Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in glatte Muskelzellen

Zum Nachweis der Differenzierung in glatte Muskelzellen wurden die Zellen hBSC 37 P9 auf mit Matrigel (0,1%) beschichteten Culture Slides ausgesät und in TGF- β -haltigem Medium nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe Yu für 14 Tage kultiviert (Yu et al., 2006). Als Nachweis für die Differenzierung wurde eine immunhistologische Färbung auf Desmin durchgeführt.

DMEM 4500 mg/l Glucose	60%	6 ml
DMEM F12	30%	4 µl
FCS	10%	1 ml
Non-Essential Amino Acids	1%	100 µl
TGF- β	10 µg / ml	10 µl
P/S	10%	100 µl

Tabelle 28: Medium für die Differenzierung in glatte Muskelzellen

3.2.14.4 Differenzierung der Haarfollikelstammzellen in Neuronen

Für die Differenzierung in Neuronen wurden die Culture Slides zunächst mit Poly-L-Lysin und Laminin doppelbeschichtet. Die Zellen hBSC 37 P9 wurden über Nacht auf Low-Adhärenzplatten inkubiert, so dass sich Zellcluster bilden konnten. Anschließend wurden 5 - 6 Zellcluster pro Well überführt und in Neuronen-Differenzierungsmedium (Hunt et al., 2008) für 14 Tage inkubiert. Als Nachweis für die Differenzierung wurde eine immunhistologische Färbung auf Tubulin β III, Neurofilament 200 und Synaptophysin durchgeführt.

DMEM 4500 mg/l Glucose	60%	6 ml
DMEM F12	30%	4 µl
FCS	1%	100 µl
bFGF	40 µg / ml	10 µl
NGF	10 µg / ml	10 µl
BDNF	10 µg / ml	10 µl
NT3	10 µg / ml	10 µl
Retinsäure	6 µg / ml	10 µl
P/S	10%	100 µl

Tabelle 29: Medienzusammensetzung für die Differenzierung in Neuronen

3.2.15 Analyse der Zellkulturüberstände mittels EIA

Um die Ergebnisse des Stimulationsansatzes mit Forskolin zusätzlich zur PCR-Analyse zu überprüfen, wurde ein Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (EIA) auf Somatostatin durchgeführt (Firma Peninsula Laboratories).

Der EIA bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe des EIA können Proteine und Peptide in einer Probe quantitativ nachgewiesen werden. Man nutzt die Eigenschaft spezifischer Antikörper, die an das nachzuweisende Antigen binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion zeigt das Vorhandensein des Antigens an. Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt und das Reaktionsprodukt wird durch Farbumschlag und Messung der optischen Dichte nachgewiesen. Die Signalstärke ist eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass der EIA für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

Der EIA wurde nach der Anleitung des Kits der Firma Peninsula Laboratories durchgeführt. Dazu wurde der Stimulationsansatz mit Forskolin wiederholt und die Überstände der Zellkulturflaschen nach 2 und 5 Tagen abgenommen. Die Überstände wurden als Proben im EIA verwendet. Als Negativkontrollen wurden reine Zellkulturmedien verwendet.

Der Versuchsansatz erfolgte nach Protokoll 3 des Somatostatin-EIA-Handbuchs. Als erstes wurden in jedes Well der 96-Well-Platte 50 µl des Standards bzw. der Probe und 25 µl Antiserum gegeben. In die Blank-Wells wurde nur Pufferlösung überführt, damit nach erfolgter Messung die Extinktion der Pufferlösung vom Ergebnis der

Proben abgezogen werden konnte. Die Platte wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden jeweils 25 µl des Bt-Tracers pro Well aufgetragen. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die EIA-Platte wurde nun fünfmal mit jeweils 300 µl EIA-Puffer pro Well gewaschen. Nach der Behandlung mit 100 µl Streptavidin-HRP pro Well wurde die EIA-Platte erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wie oben beschrieben, wurde die Platte anschließend fünfmal mit EIA-Puffer gewaschen. Danach wurde auf alle Wells jeweils 100 µl der TMB-Lösung gegeben, woraufhin eine letzte Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur folgte. Die Reaktion wurde durch die Hinzugabe von 100 µl 2N HCl pro Well beendet. Innerhalb von 10 Minuten wurde die Absorption bei 450 nm am Photometer gemessen.

3.3 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit dem ungepaarten t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) von < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 3.0.

4 Ergebnisse

4.1 Isolation und Expansion der Haarfollikelstammzellen

4.1.1 Verdau der Haarfollikel mit Enzymen

Zu Beginn der Arbeit wurde von verschiedenen Probanden Körperbehaarung (Kopfhaar, Augenbrauen, Barthaare, Behaarung der Extremitäten) mittels einer unsterilen Pinzette epiliert.

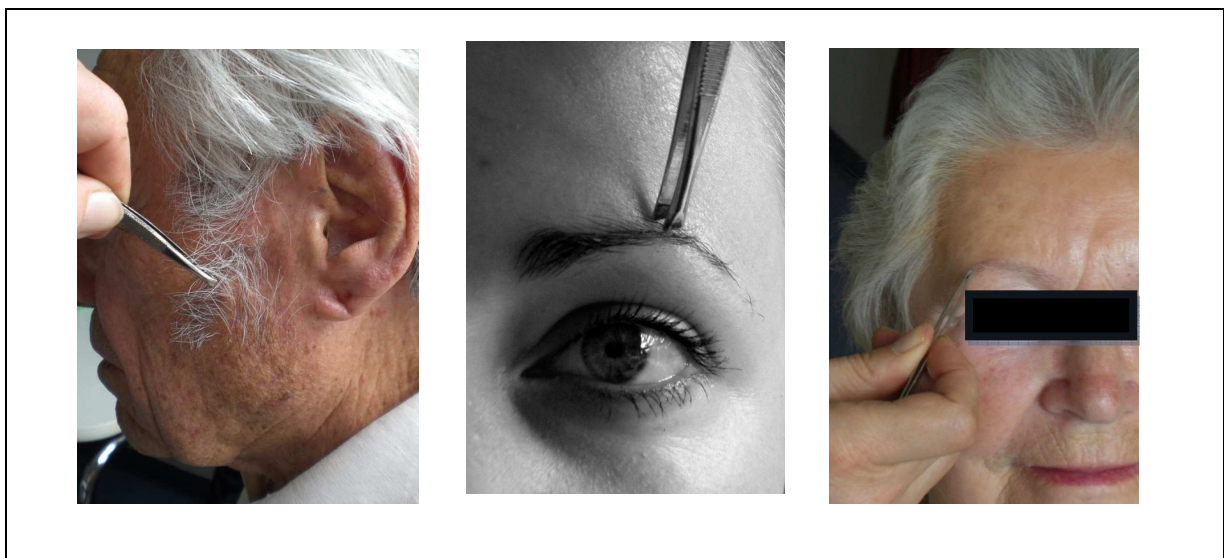


Abbildung 8: Zupfen von Haarfollikeln

Die gezupften Haare wurden mit Hilfe von verschiedenen Enzymlösungen angedaut, um die Haarfollikelstammzellen von den Haarfollikeln abzulösen. Eine getestete Methode war der Verdau durch Trypsin für 2, 4, oder 8 Minuten. Danach wurden die Haare jeweils für die gleiche Zeit mit Versenelösung inkubiert, um die Zellen der Wurzelscheiden vom Haarschaft zu lösen. Für die untersuchten Zeiten konnte kein Unterschied bezüglich der Zellausbeute beobachtet werden. Um die Zellen nicht unnötig zu belasten, wurde im weiteren Verlauf eine Dauer von je 4 Minuten pro Verdau festgelegt.

Zum Vergleich sind auch alternative Isolationsversuche durchgeführt worden. Bei zehn Versuchen sind Haare gezupft und mit Dispase behandelt worden. Ein weiterer Verdau der Haare durch Trypsin fand nicht statt. In der anschließenden

Zentrifugation wurde die relative Zentrifugationsbeschleunigung zwischen 145 g bis 288 g variiert. Die größte Ausbeute an Zellen ergab sich bei 288 g.

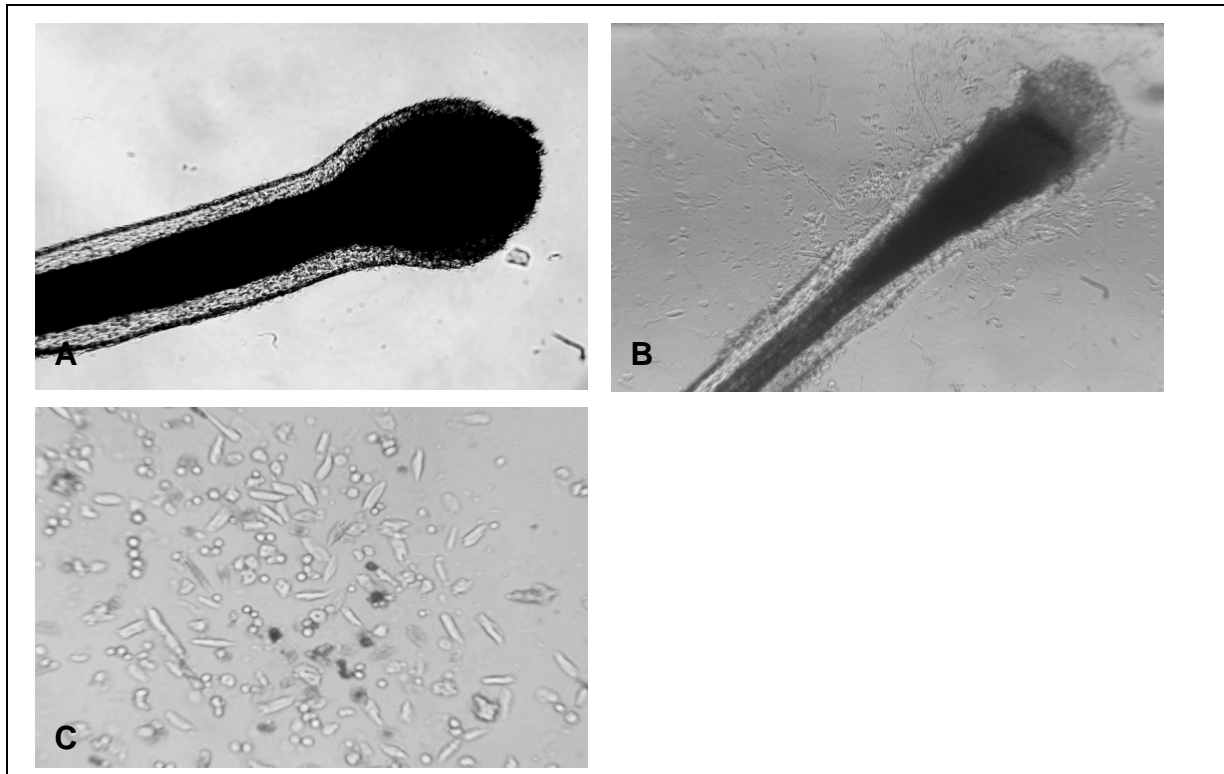


Abbildung 9: Gezupftes Haar nach Dispaseverdau (A), gezupftes Haar nach Trypsinverdau (B), isolierte Zellen mit Zelldetritus direkt nach dem Ausplattieren auf die Zellkulturplatte (C)

Bei fünf weiteren Versuchen sind die Haare gezupft und ohne Verwendung von Enzymen auf 6-Wellplatten gegeben worden. Diese Art der Isolation ergab stets eine geringe Zellausbeute und wurde daher nicht mehr durchgeführt. Bei vier Versuchen erfolgte lediglich ein Verdau durch Trypsin ohne Verwendung von Dispase. Auch diese Art der Isolation führte zu einer geringen Zellausbeute.

In einem alternativen Ansatz wurden frisch gezupfte Haare an der Follikelregion mit einem sterilen Einmalskalpell abgeschabt, so dass die Zellen der Wurzelscheide entfernt werden konnten. Nach einer Behandlung mit Versene bzw. Trypsin wurden die Haare zentrifugiert und anschließend mit dem Zellpellet auf ein mit Kollagen beschichtetes Well gegeben. Nach 35 verschiedenen Versuchen war die Zellisolation gelungen. Die Zellen adhärten jedoch nicht am Boden der Wells und proliferierten auch nach 2 Monaten in den getesteten Medien nicht. Eine Zellproliferation ohne Adhäsion konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

4.1.2 Verdau von Kopfhautgewebe mittels Enzymen

Da der Verdau der aus der Kopfhaut gezupften Haarfollikel ohne Erfolg blieb, wurde der direkte Verdau von Kopfhautgewebeproben getestet. Die Proben stammten von Probanden, die sich einer Operation im Bereich der behaarten Kopfhaut unterziehen mussten. Es handelte sich dabei um sehr kleine Gewebeproben (ca. 3 x 5 mm²), die in Dispase bzw. Kollagenase für 2 bzw. 24 Stunden eingelegt wurden (hBSC 36 bis hBSC 42). Pro Gewebestück wurden ungefähr 5 Haare mittels einer sterilen Pinzette epiliert. Nach einem Waschgang und einer Zentrifugation wurden die Haare mit Zellpellet in Zellkulturmedien überführt und die Adhäsion wie auch die Zellproliferation täglich untersucht. Nach 5 bis 6 Tagen zeigten die im Medium schwimmenden Haarfollikel eine Zellproliferation im Bereich der Bulgeregion.

Nach einem Waschgang und einer Zentrifugation wurden die Haare mit Zellpellet in Zellkulturmedien überführt und die Adhäsion wie auch die Zellproliferation täglich untersucht.

4.1.3 Kulturbedingungen

Innerhalb dieser Arbeit wurden mehrere Kulturmedien getestet, die von anderen Forschergruppen beschrieben worden waren. In einigen Arbeiten wurden für embryonale Stammzellen der Maus Kulturbedingungen für die endokrine Differenzierung beschrieben. Häufig lassen sich jedoch Kulturbedingungen der murinen Zellen nicht auf die Ansprüche humaner adulter Stammzellen übertragen, weshalb einige beschriebene Medien oder auch Zellisolationmethoden angepasst werden mussten.

Die mit Enzymen vorbehandelten Haarfollikel und die isolierten Haarfollikelstammzellen wurden auf 6-Wellplatten ausgesät und in verschiedenen Kulturmedien angezüchtet (Tab. 3 - 9). Danach wurde die Zellproliferation jeden Tag unter dem Stereomikroskop beurteilt. Unter verschiedenen Kulturbedingungen wiesen die Zellen verschiedene Morphologien auf. In den ersten Tagen stellte sich ein polymorphes Zellbild dar (Abb. 10A-C). Es fanden sich Zellen in spindeliger Form. Aber auch Zellen mit multiplen Zellfortsätzen, die an Neuronen erinnerten, konnten beobachtet werden. Zudem variierte die Zellgröße innerhalb der verschiedenen Zellmorphologien.

Neben dem Einsatz verschiedener Kulturmedien wurden alternative Beschichtungen der Zellkulturplatten getestet. Nachdem sich unter der Beschichtung mit Fibronectin, Kollagen, Gelatine, Poly-L-Lysin und Poly-L-Arginin keine erhöhte Zellausbeute und -proliferationsrate und auch keine anderen Zelltypen zeigten, wurde von einer Vorbehandlung der Kulturplatten abgesehen.

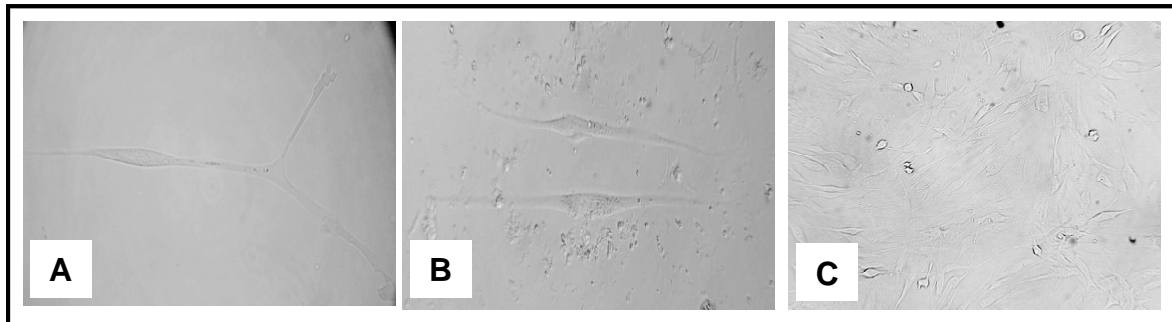


Abbildung 10: Phänotyp der aus der Haarfollikelregion herausgewachsenen Zellen nach der Subkultivierung in der ersten Passage: neuronenartige Ausläufer (A), Population spindelartiger Zellen (B), fibroblastenartige Zellmorphologie (C)

Die höchste Zellproliferation war dabei im Zellkulturmedium 2 nachzuweisen. Deshalb wurde im weiteren Verlauf ausschließlich dieses Medium für die Zellkultur verwendet. Im Medium 2 zeigten die im Medium schwimmenden Haarfollikel eine Zellproliferation im Bereich der Bulgeregion (Abb. 11A, 11B). Nach 4 bis 5 Tagen wiesen die Haarfollikel eine Adhäsion an der unbeschichteten Zellkulturplatte auf, die von den aus der Bulgeregion heraus wachsenden Zellen ausging (Abb. 11C). Um eine Kontamination durch Fibroblastenkulturen zu vermeiden, wurden adhärenzte Zellen mittels einer sterilen Pipette aus der Bulgeregion gepickt und auf andere Zellkulturplatten gegeben. Die so gewonnenen Zellen proliferierten weiterhin und begannen die Böden der 6-Wellplatte vollständig zu bedecken. Nach einer Woche konnten die Zellen von der 6-Wellplatte abgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt werden. Mit dieser Methode wurden die Zellen hBSC 37 bis hBSC 42 isoliert.

Die hBSC 37 wurden in dieser Arbeit am umfassendsten untersucht. Die Zellen zeigten bis Passage 30 (letzte untersuchte Zellpassage) eine konstante Zellmorphologie. Direkt nach der Subklonierung wachsen die Zellen sehr schnell und zeigen eine spindelförmige Morphologie (Abb. 12A). Mit zunehmender Konfluenz ist eine eher eine rundliche Zellform zu beobachten (Abb. 12B).

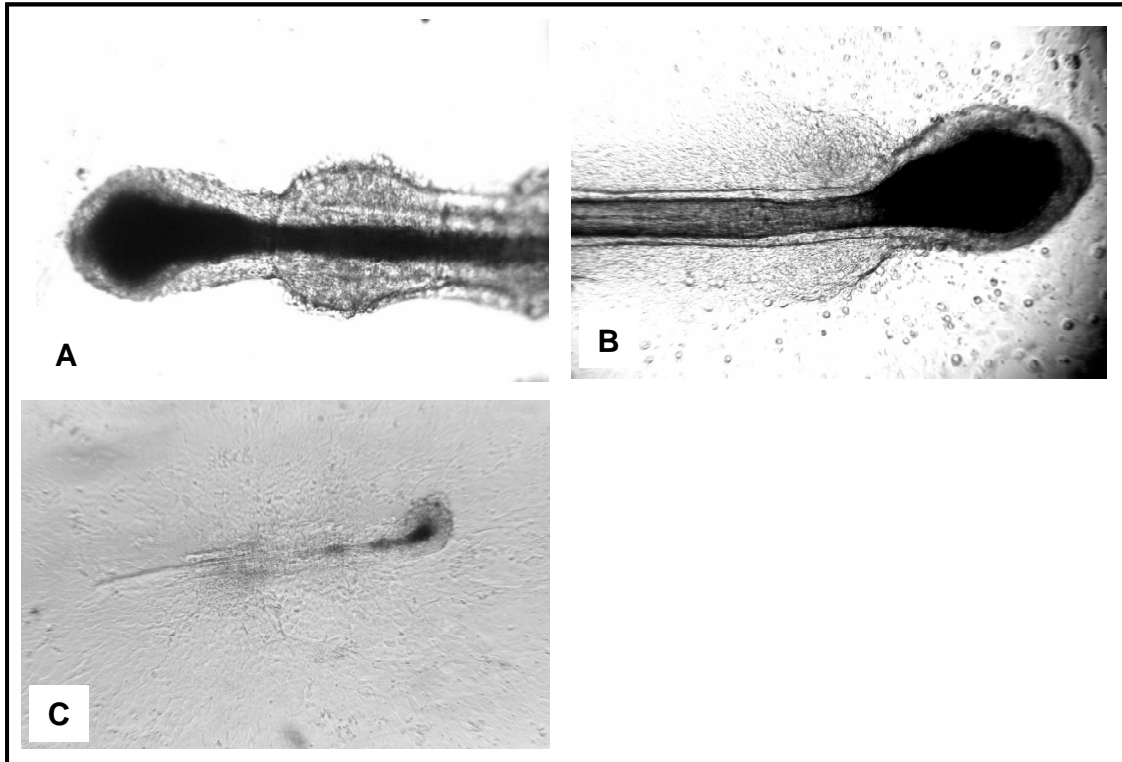


Abbildung 11: Haarfollikel im Zellkulturmedium (A), adhärierter Haarfollikel (B), Zellen adhären ausgehend von der Bulgeregion (C)

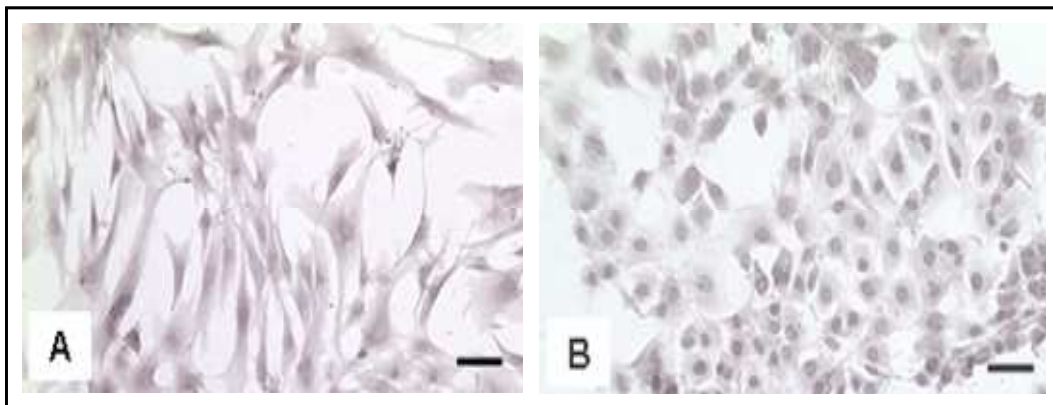


Abbildung 12: Phänotyp der Haarfollikelzellen hBSC 37 am Tag 1 (A) und am Tag 10 (B) nach der Passagierung. Balken = 50µm

4.1.3 Proliferationsrate der Haarfollikelzellen

Die Haarfollikelzellen wurden in drei Wells in Medium 2 gegeben und nach 3, 5 und 8 Tagen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Innerhalb von acht Tagen stieg die Zellzahl um den Faktor 7, d.h. von $1,3 \times 10^6$ Zellen / Well an Tag 0 auf $9,75 \times 10^6$ Zellen / Well an Tag 8.

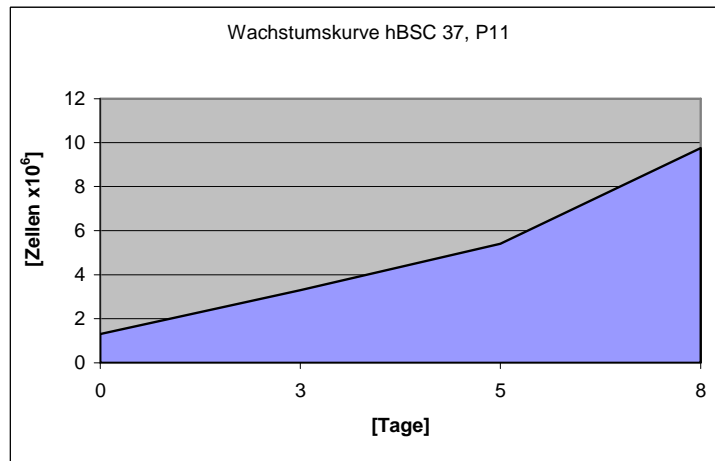


Abbildung 13: Die Proliferationsrate der Zellen hBSC 37 P11

4.1.4 Colony Forming Unit Assay

Um das Potenzial der Zellen, Kolonien aus Einzelzellen zu bilden, zu testen, wurde ein CFU-Assay durchgeführt (Abb. 14). Die CFU-Effektivität ergibt sich aus dem prozentualen Anteil der Zellen, die Kolonien bilden, in Bezug zur ausgesäten Zellzahl. Die Koloniebildungseffektivität der hBSC Zellen lag bei 28% \pm 3% (n = 4 unabhängige Versuche). Damit konnte neben einer hohen Regenerationsrate auch die Koloniebildung als wichtige Stammzell-assoziierte Fähigkeit nachgewiesen werden.

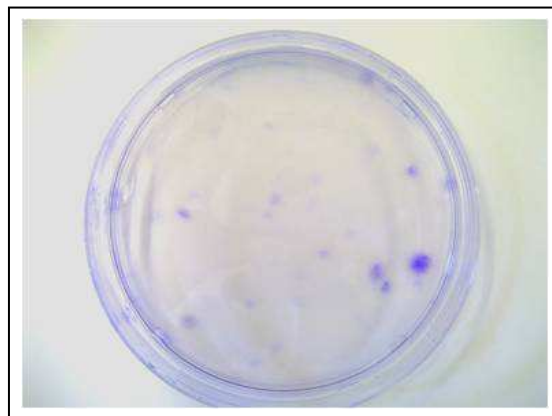


Abbildung 14: Colony Forming Unit Assay: Nachweis der Koloniebildung

4.2 Analyse der basalen Gen- und Proteinexpression

4.2.1 Typische Marker der Haarfollikelstammzellen

Um genau zu definieren, welche Marker von den isolierten Haarfollikelzellen unter basalen Bedingungen exprimiert werden, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Neben dem spezifischen Antikörper (Fläche unter der Kurve ist rot) wurde jeweils ein Isotypantikörper (Fläche unter der Kurve ist farblos) als Negativkontrolle mit untersucht. Wenn nur eine rot unterlegte Kurve zu sehen ist, fallen spezifischer Antikörper und Isotyp zusammen.

Die in der vorliegenden Arbeit isolierten Zelllinien waren negativ für hämatopoetische Stammzellmarker CD34, CD117, CD133 und CD200, von denen einige auch bei Stammzellen des Haarfollikels (CD34, CD200) beschrieben worden waren (Abb. 15). Laut Ohyama sind die Marker CD59 und CD200 in humanen Wulstzellen hochreguliert, während CD24, CD34 und CD71 herunter reguliert sind (Ohyama und William, 2007). CD59 wird als einziger Marker von den vorliegenden Zellen exprimiert. Marker für Leukozyten (CD45), und endotheliale Zellen (CD31) waren ebenfalls nicht nachweisbar.

Es wurde außerdem die Expression einiger Integrine untersucht. Integrine gehören zu einer großen Familie von Rezeptorproteinen, die vor allem an der Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt sind und die u.a. extrazelluläre Signale an das Zytoskelett der Zelle weitergeben. Sie stellen heterodimere Proteine aus zwei nicht-kovalent verbundenen Glykoproteinketten, einer α - und einer β -Untereinheit, dar. Beide Untereinheiten durchspannen die Zytoplasmamembran. Bestimmte Integrine sind in der Literatur als charakteristisch für Haarfollikelstammzellen beschrieben worden.

CD 29 und CD 49f wurden von Morris in murinen Haarfollikelstammzellen nachgewiesen (Morris et al., 2004). Beide Marker waren in den untersuchten Zelllinien negativ bzw. extrem schwach nachweisbar (CD 29). Allerdings konnte CD 49b (Integrin $\alpha 2$) und CD 44 (HCAM) detektiert werden. CD 56 (NCAM) war auf der Zelloberfläche nicht nachweisbar (Abb. 15).

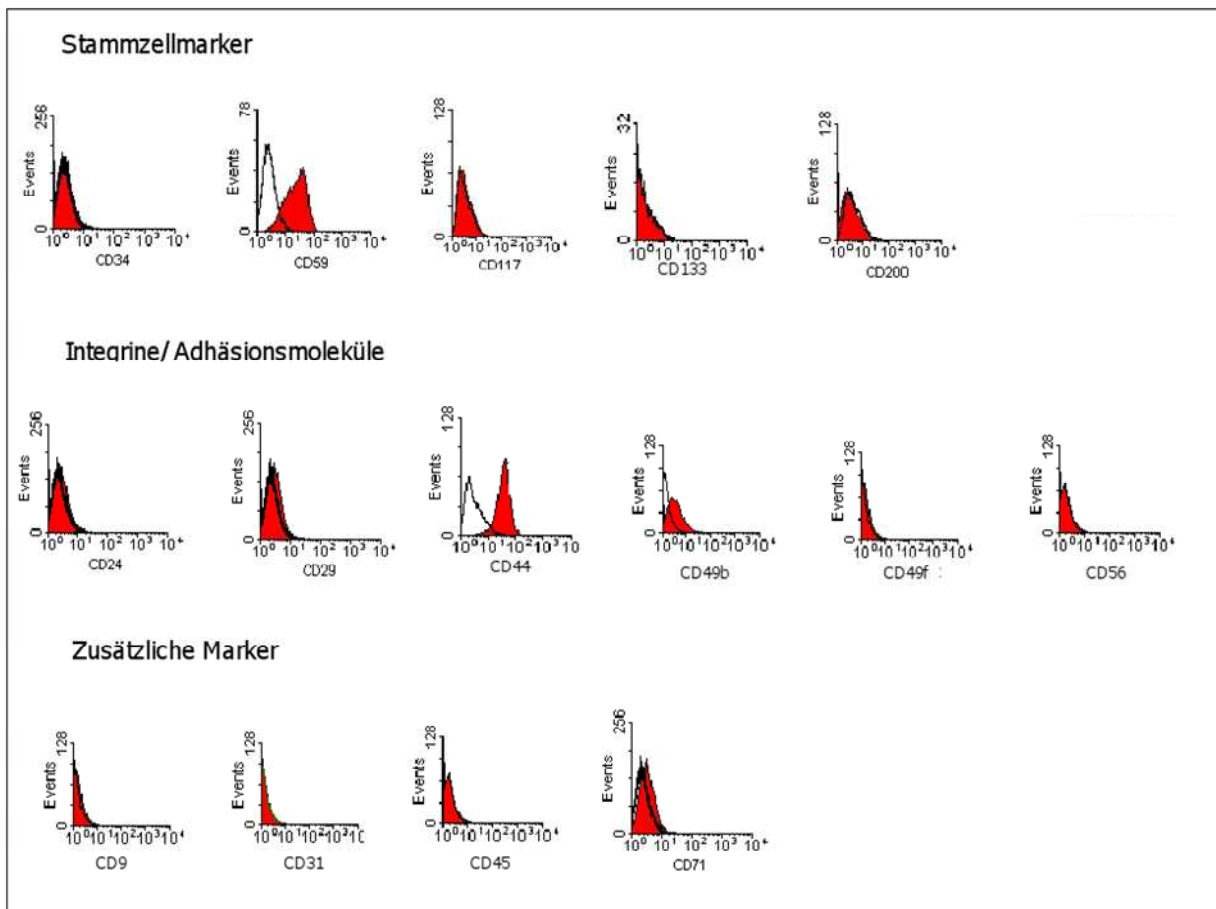


Abbildung 15: FACS-Ergebnisse der Marker für Haarfollikelstammzellen. Neben dem spezifischen Antikörper (Fläche unter der Kurve ist rot) ist jeweils ein Isotypantikörper (Fläche unter der Kurve ist farblos) dargestellt.

4.2.2 Marker embryonaler und adulter pluripotenter Stammzellen

Die hBSC Zellen wurden auf Marker untersucht, die in embryonalen Stammzellen (Oct4, SSEA1, SSEA4), Stammzellen/adulten Progenitorzellen aus dem Pankreas (BCRP1, Sox 2), dem Gehirn (Sox 1, Sox 2, Sox 17, Nestin) und dem Muskelgewebe (BCRP1) exprimiert werden.

In den folgenden Abbildungen ist für jede PCR eine Positivkontrolle zusammen mit der getesteten Zelllinie aufgetragen. Dabei wurde jede Probe mit und ohne Reverse Transkription (-RT) untersucht. Auf diese Art kann eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. In der PCR konnte Oct4, BCRP1, Sox2 und Nestin nachgewiesen werden (Abb. 16 und 17). SSEA1, SSEA4, Sox 1 und Sox 17 waren negativ (Abb. 16 und 17). Zur Bestätigung der Oct4-Expression wurden die

hBSC37 Zellen auf Culture Slides kultiviert und in der Immunhistologie untersucht. In Abb. 18 ist der deutliche immunhistologische Oct4-Nachweis dargestellt. Zusätzlich wurden die Zellen mit Hilfe der Immunhistologie auf Nestin untersucht (Abb. 19). Auch hier konnte die starke Nestinexpression bestätigt werden.

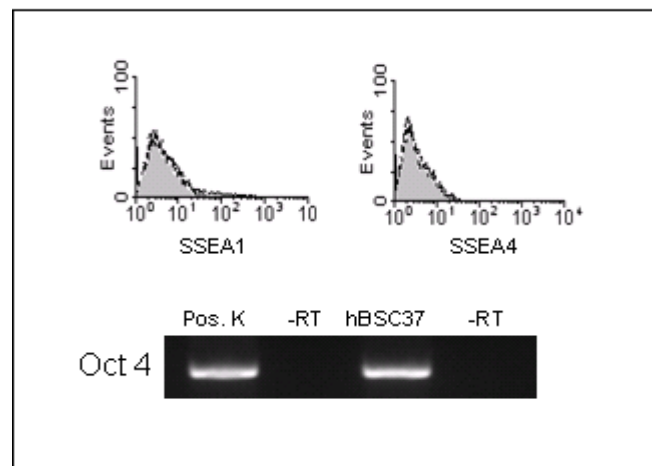


Abbildung 16: Analyse embryonaler Marker. Oben: FACS Analyse nach Färbung mit anti-SSEA1 und SSEA4 Antikörpern. Neben dem spezifischen Antikörper (Fläche unter der Kurve ist grau) ist jeweils ein Isotypantikörper (Fläche unter der Kurve ist farblos) dargestellt. Unten: Nachweis von Oct4 mittels PCR. Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.

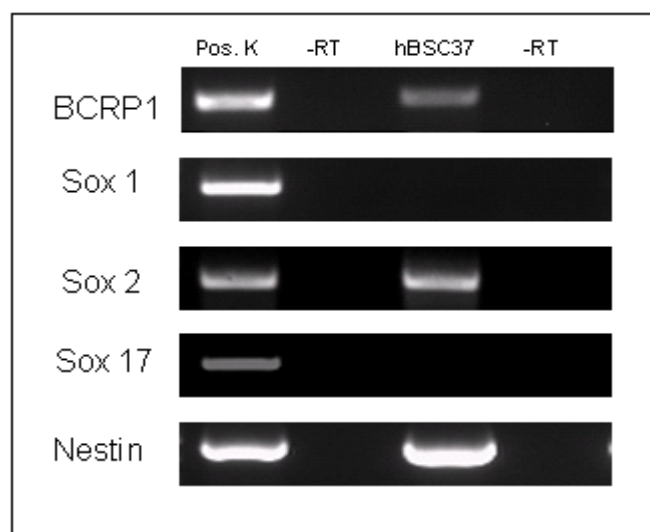


Abbildung 17: PCR-Analyse der Stammzellmarker BCRP1, Sox 1, Sox 2, Sox 17 und Nestin. Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.

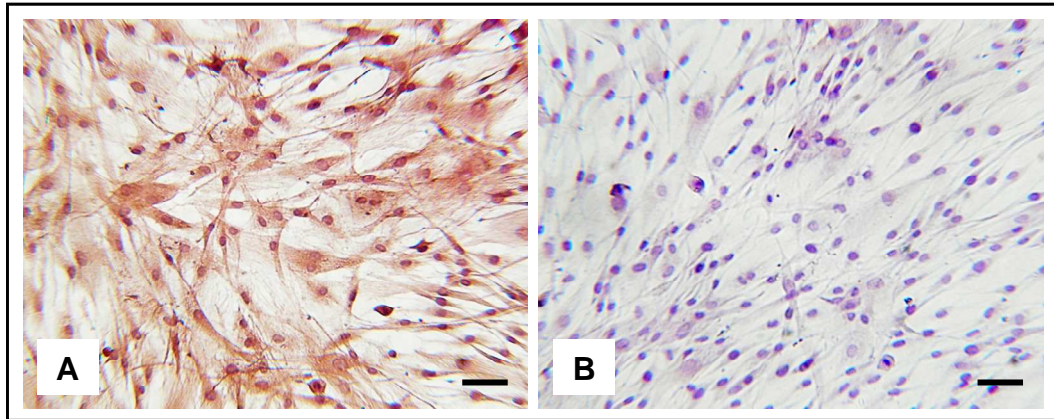


Abbildung 18: Färbung der hBSC 37 Zellen auf Oct 4 mit dem Goat-anti Oct4 Antikörper (A); Negativkontrolle: Färbung mit einem irrelevanten Goat-Antikörper (B). Balken = 100µm

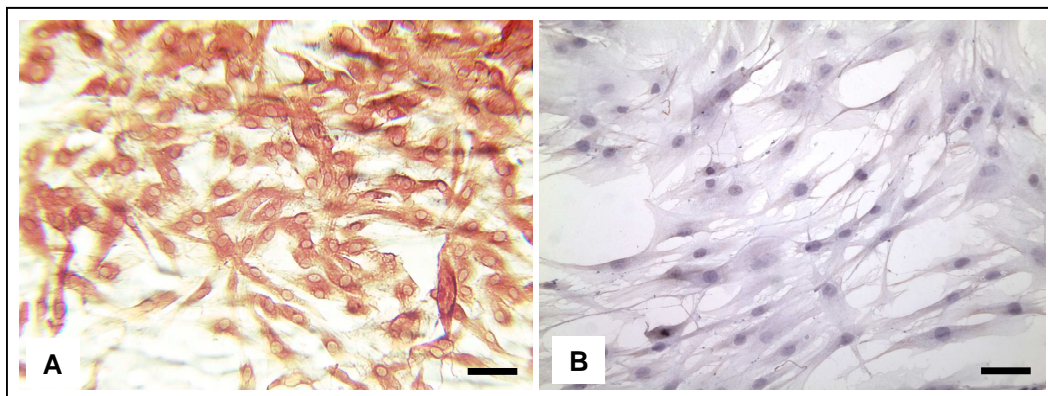


Abbildung 19: Färbung der hBSC 37 Zellen mit einem monoklonalen Mouse anti-Nestin Antikörper (A) oder einem Isotypantikörper (B). Balken = 50 µm

4.2.3 Expression von Zytokeratinen und Vimentin

Zytokeratine sind charakteristische Marker für epitheliale Zellen, wobei das Zytokeratinmuster Rückschlüsse auf den Epitheltyp zulässt. Verschiedene Zytokeratine wurden in unterschiedlichen Stammzellpopulationen des Haarfollikels vorherbeschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb immunhistologische Methoden zum Nachweis von Zytokeratinen eingesetzt und nachfolgend das Zytokeratinexpressionsmuster mit spezifischen monoklonalen Antikörpern zur Zellcharakterisierung untersucht.

Wie Abb. 20 zeigt, waren die hBSC positiv in der Pan-CK-Färbung und exprimierten sowohl CK18 als auch CK20. CK19 war jedoch negativ.

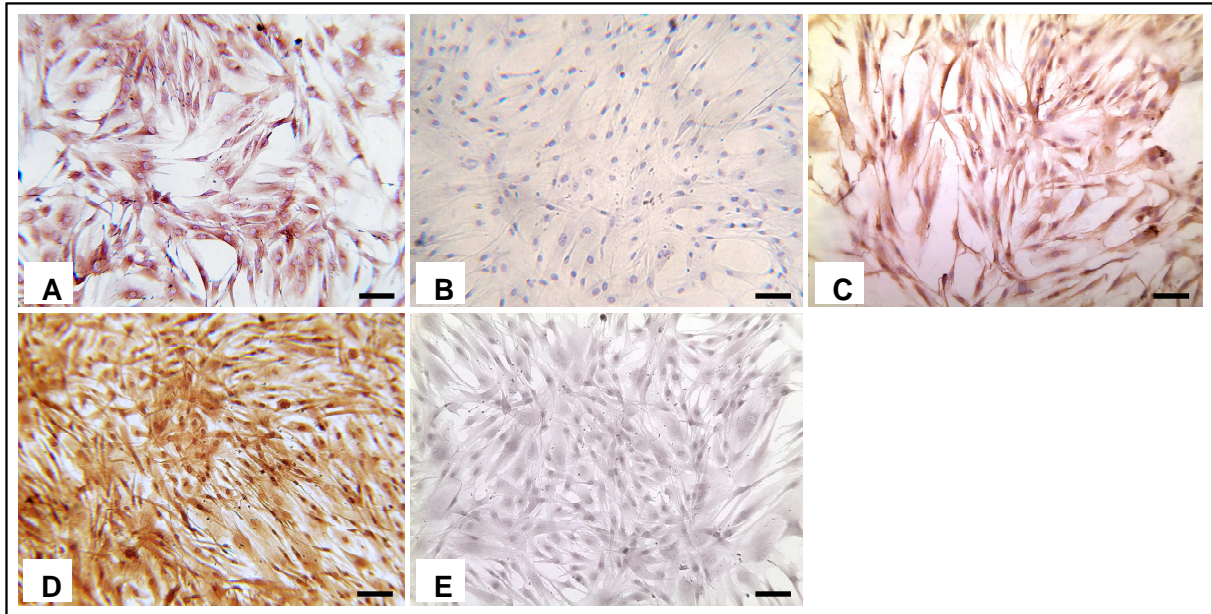
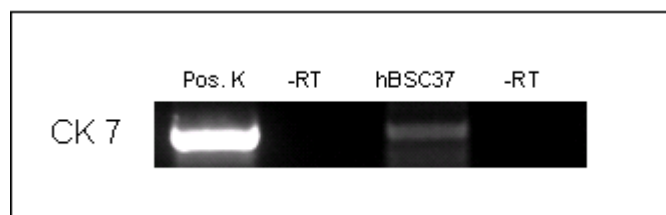


Abbildung 20: Färbung der Zellen auf CK18 (A), CK19 (B), CK20 (C) und Pan CK (D); Negativkontrolle: Isotypantikörper (E). Balken = 100 µm

Neben den in der Immunhistologie untersuchten Zytokeratinen CK18, CK19 und CK20 wurde die Expression von CK7 mittels PCR analysiert. CK7 wird in einfachen Epithelien exprimiert, ist aber auch in geringerem Maße in gastrointestinalen Epithelzellen vorhanden. Im Pankreas wird es in duktalem, nicht aber in azinären Zellen exprimiert (Pujal et al., 2009). In den hBSC37 Zellen wird CK7 nur sehr schwach exprimiert (Abb. 21).



**Abbildung 21: PCR-Analyse von Zytokeratin 7 (CK 7) in den hBSC 37 Zellen
Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.**

Das Bindegewebe der Dermis und auch Anteile des Haarfollikels nehmen ihren Ursprung aus dem Mesoderm. Vimentin wird als Marker mesenchymaler Zellen angesehen (Savagner, 2010). Im Bereich des Haarfollikels wurde eine homogene Vimentinexpression beschrieben (Raposio et al., 2007). Vimentin war in den hBSC Zellen stark exprimiert.

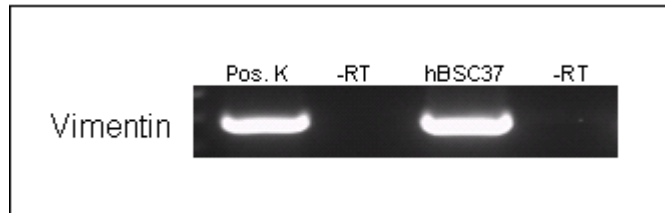


Abbildung 22: PCR-Analyse der Vimentinexpression in hBSC 37 Zellen
 Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.

4.2.4 Endokrine Progenitormarker und endokrine Marker

Unter normalen Expansionsbedingungen ohne Stimulation wurde die Expression der proendokrinen Transkriptionsfaktoren Beta-2, Nkx 6.1, Pdx-1, Isl-1, Hnf-4 α und Hlx B9 in den hBSC 37 Zellen mittels PCR geprüft. Alle genannten Marker, sowie die Hormone Glukagon und Insulin waren negativ. Überraschenderweise wurde eine deutliche Expression von Somatostatin nachgewiesen (Abb. 23).

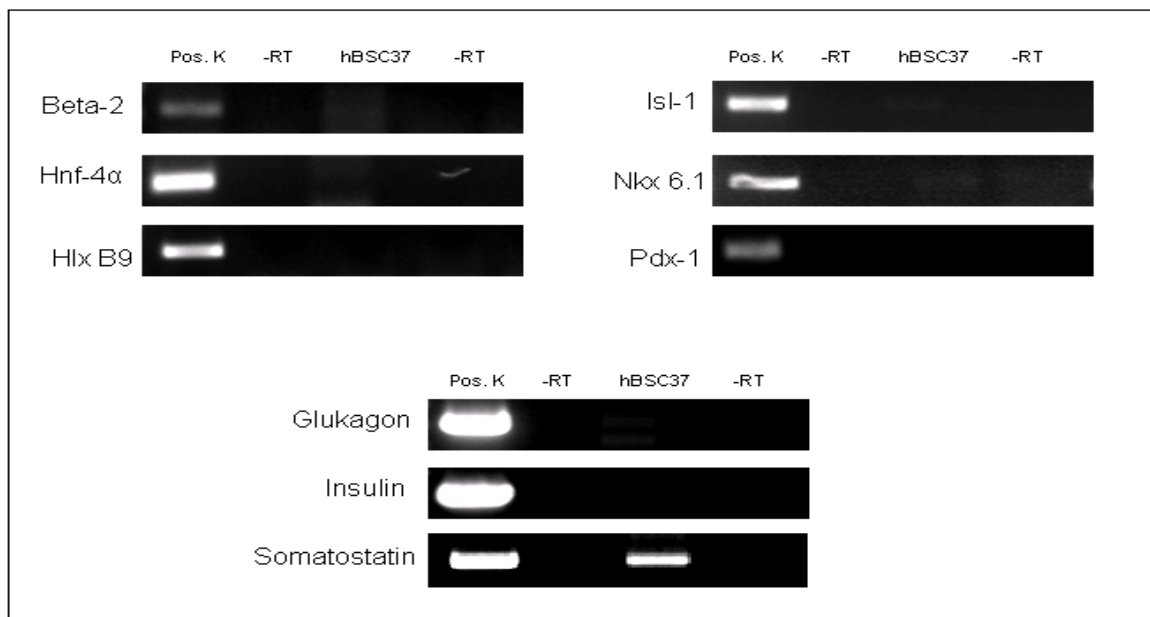


Abbildung 23: PCR-Analyse der (pro)endokrinen Marker in unstimulierten hBSC 37-Zellen
 Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription

4.3 Analyse des Differenzierungspotentials

4.3.1 Differenzierung in Osteoblasten

Im Anschluss an den 14-tägigen Osteoklasten-Differenzierungsansatz wurde die von-Kossa-Färbung durchgeführt. Es zeigte sich keine Kalziumeinlagerung (Schwarzfärbung) in den gefärbten Zellen. Die Transdifferenzierung in Osteoblasten ist damit nicht gelungen (Abb. 24).



Abbildung 24: Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen hBSC 37 P4 mittels von-Kossa-Färbung

4.3.2 Differenzierung in Adipozyten

Nach der 3-wöchigen Kultivierung der Haarfollikelstammzellen im Differenzierungsmedium wurde die Oil-Red-Färbung zur Detektion der transdifferenzierten Fettzellen verwendet. Es konnte nur in wenigen Zellen (< 5%) eine Fettspeicherung (rotgefärbte Vakuolen im Zellinneren) nachgewiesen werden (Abb. 25).

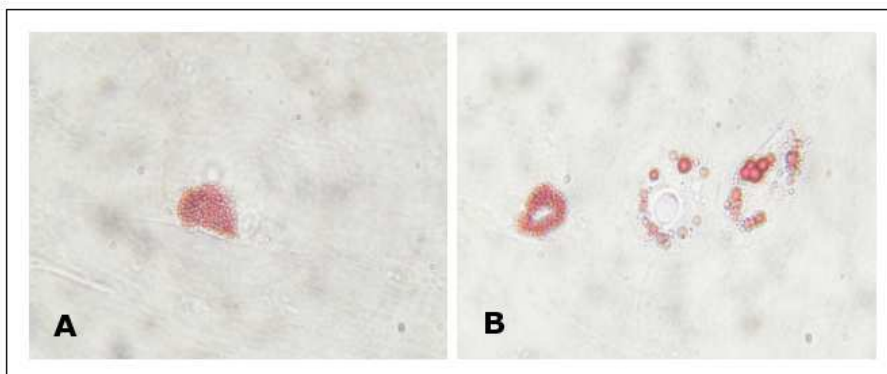


Abbildung 25: Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen hBSC 37 P4 mittels Oil-Red-Färbung: rot gefärbte Fettvakuolen innerhalb des Zytoplasmas (A und B)

4.3.3 Differenzierung in Neuronen

Die neuronale Differenzierungsfähigkeit wurde mit einem für neuronale Progenitorzellen etablierten Protokoll durchgeführt. Nach 14 Tagen erfolgte eine Färbung der Zellen hBSC 37 mit monoklonalen Antikörpern gegen Tubulin- β III und Neurofilament-200, die beide stark positiv waren. Ein Teil der Zellen (ca. 20%) entwickelte während der Differenzierungsphase lange Dendriten-ähnliche Ausläufer. Die Expression von Synaptophysin erwies sich als negativ (Abb. 26).

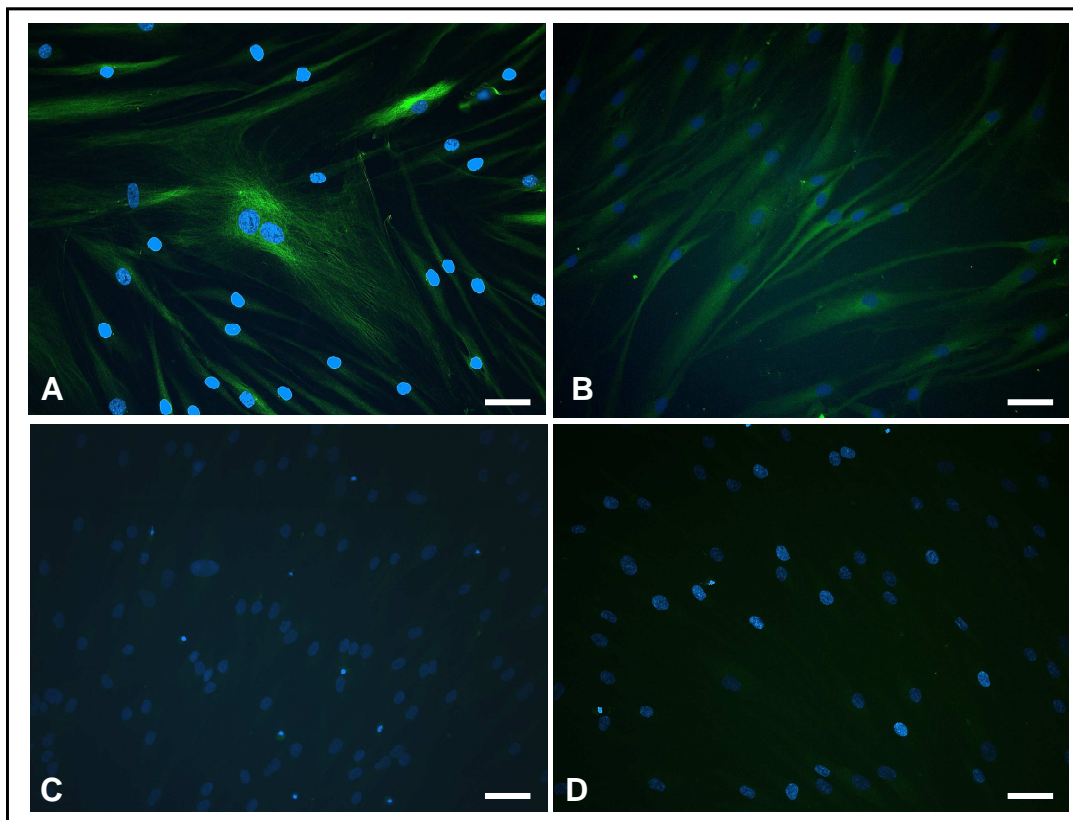


Abbildung 26: Immunhistologische Färbung der Zellen hBSC 37 nach neuronaler Differenzierung. Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen mittels Färbung mit einem anti-Tubulin β III (A), Anti-Neurofilament-200 (B), Anti-Synaptophysin-Antikörper (C) oder einem Isotypantikörper (D); Kernfärbung mit DAPI. Balken = 50 μ m

4.3.4 Differenzierung in glatte Muskelzellen

Nach der Kultivierung der Zellen hBSC 37 im Medium mit TGF- β für 14 Tage konnte eine deutliche Änderung des Phänotyps von einer länglichen Zellstruktur hin zu breiten, fast rechteckig geformten Zellen beobachtet werden. Mittels eines

monoklonalen Antikörpers wurde die Expression von Desmin nachgewiesen, einem Marker für glatte Muskelzellen (Paulin und Li; 2004) (Abb. 27).

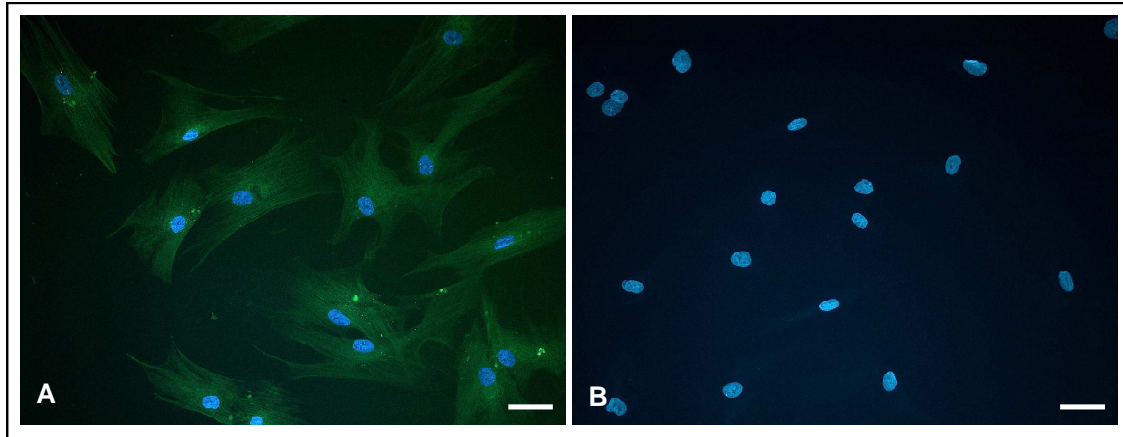


Abbildung 27: Immunhistologische Färbung der Zelllinie hBSC 37 nach 14 Tagen Inkubation in DMEM4500/F12 mit TGF- β . Bestimmung des Differenzierungspotentials der Zellen mittels Anfärbung mit anti-Desmin (A) oder einem Isotypantikörper (B); Kernfärbung mit DAPI. Balken = 50 μ m

4.3.5 Differenzierung in endokrine Zellen

Da die hBSC Zellen einen epithelialen Phänotyp aufwiesen und eine Expression von Somatostatin nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, ob eine weitere Differenzierung in endokrine Zellen, wie z.B. insulinproduzierende Beta-Zellen, möglich ist. Die hBSC Zellen wurden deshalb mit verschiedenen Stimuli inkubiert, denen in der Literatur ein pro-endokriner Effekt zugeschrieben wird. Überprüft wurde jeweils die Expression der Transkriptionsfaktoren Beta-2, Nkx 6.1, Pdx-1, Isl-1, Hnf-4 α und Hlx B9 sowie der Hormone Glukagon, Insulin und Somatostatin.

4.3.5.1 Stimulation mit Activin A und Exendin 4

Es wurden zwei verschiedene Stimulationsansätze mit Activin A und Exendin 4 durchgeführt: jeweils ein Ansatz unter Supplementierung mit Monothioglycerol oder mit Caspase Inhibitor VI. In diesen beiden Ansätzen konnte keine Transdifferenzierung in endokrine Zellen beobachtet werden.

4.3.5.2 Stimulation mit DBZ

Als nächstes wurde die Stimulation mit dem χ -Sekretase-Inhibitor DBZ durchgeführt. Dabei wurden die Zellen hBSC 37 P 7 und hBSC 37 P 15 verwendet. Die Stimulation erfolgte während 7 Tagen. Die Zellen wurden nach 3, 5 und 7 Tagen abgenommen und die cDNA isoliert. In den daraus gewonnenen Proben konnte weder die Expression der endokrinen Progenitormarker Beta-2, Nkx 6.1, Pdx-1, Isl-1, Hnf-4 α und Hlx B9, noch der endokrinen Marker Glukagon, Insulin und Somatostatin nachgewiesen werden.

4.3.5.3 Stimulation mit LIF, Monothioglycerol und Picolinsäure

Auch die Verwendung von LIF (1000 U/ml) und Monothioglycerol als Stimulationsagentien bewirkten keine Expression von proendokrinen bzw. endokrinen Markern. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen mit Picolinsäure behandelt. Es konnte nach Versuchsende keine Transdifferenzierung in endokrine Zellen beobachtet werden.

4.3.5.4 Stimulation mit Retinsäure

Die Stimulation mittels Retinsäure wurde in einem weiteren Ansatz erprobt. Durch Stimulation mit 10 μ M Retinsäure für 5 Tage entwickelten die hBSC 37 Zellen eine Expression des proendokrinen Progenitormarkers Nkx 6.1. Hierdurch blieb die Expression von Somatostatin unbeeinflusst. Alle anderen proendokrinen bzw. endokrinen Marker veränderten sich in ihrer Expression nicht.

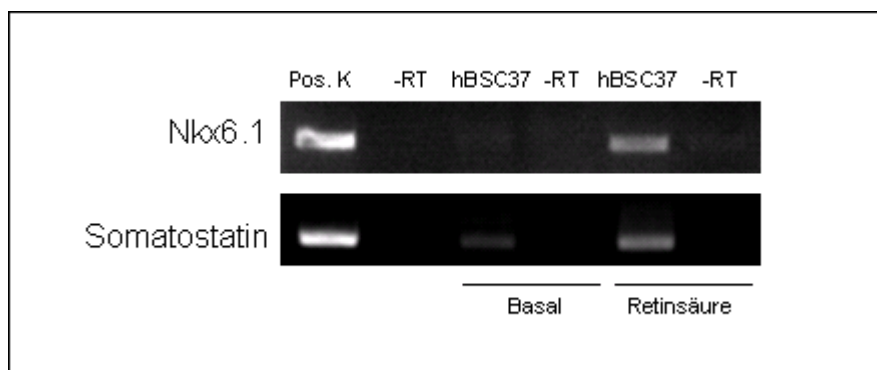


Abbildung 28: PCR-Analyse der Expression (pro)endokriner Marker nach Stimulation der hBSC 37 Zellen mit 10 μ M Retinsäure für 5 Tage. Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription

4.3.5.5 Stimulation mit Forskolin

In einem der abschließenden Versuche wurde Forskolin (10 μ M) dem Kulturmedium für 5 Tage zugesetzt. Die morphologische Veränderung der kultivierten Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Das spindelförmige Zellbild der jungen, unstimulierten Passage wich einer breiteren, quaderförmigen Zellmorphologie nach der Kultivierung mit Forskolin. Auch in der PCR ließen sich Unterschiede zwischen den mit Forskolin stimulierten Zellen und der basalen Zellpopulation feststellen. Die proendokrinen Marker wurden unter der Stimulation mit Forskolin nicht exprimiert. Somatostatin wurde unter Forskolin im Gegensatz zur basalen Zellpopulation vermehrt exprimiert. Auf die Glukagon- und Insulinexpression hatte Forskolin keinen Einfluss.



Abbildung 29: Expression endokriner Marker nach Stimulation der hBSC37 Zellen mit 10 μ M Forskolin für 5 Tage. Bei gleichen Gapdh-Spiegeln wird die Expression von Somatostatin gesteigert. Pos.K = positive Kontrolle; -RT = PCR ohne reverse Transkription.

4.4 Enzyme Immunoassay (EIA) auf Somatostatin

In der PCR-Analyse wurde festgestellt, dass nach Stimulation der Haarfollikelzellen mit Forskolin die Expression von Somatostatin gegenüber der Expression in basalen Zellen erhöht ist. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde ein Somatostatin-EIA durchgeführt. Es wurden die Zellkulturüberstände von hBSC 37 Zellen, die in basalem Medium ohne Forskolin inkubiert wurden, verglichen mit den Überständen der Forskolin-stimulierten Zellen. Innerhalb des 5-tägigen Stimulationsansatzes mit 10 μ M Forskolin wurden nach Tag 2 und nach Tag 5 die Überstände aus den Zellkulturflaschen entnommen. Zur Kontrolle, ob die Zellkulturmedien allein schon Somatostatin enthalten, wurde je eine Mediumprobe im EIA getestet. In den Medien konnte keine Somatostatinkonzentration detektiert werden. Das Basismedium, zu dem Forskolin zugesetzt wurde, bestand aus X-Vivo oder aus Medium 2. Ohne Stimulation war eine sehr geringe Konzentration an Somatostatin im Überstand (0,010 ng / ml).

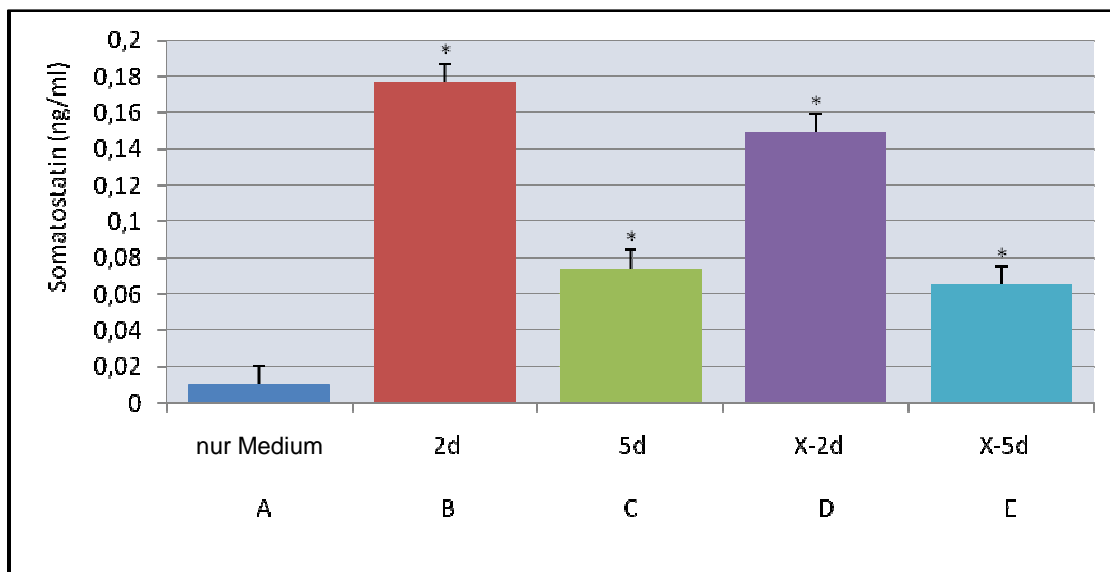


Abbildung 30: Bestimmung der Somatostatinkonzentration im Zellkulturüberstand von hBSC37 Zellen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Die Zellen wurden für 2 oder 5 Tage in Basalmmedium (B und C) bzw. in einem X-Vivo-haltigen Medium (D und E) mit 10 μ M Forskolin stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen in Basalmmedium ohne Forskolin inkubiert (A). * $p < 0,001$ versus unstimulierte Zellen.

Im Überstand (Medium 2 + Forskolin) der stimulierten Zellen waren nach 2 Tagen 0,177 ng / ml Somatostatin nachweisbar, während die Konzentration nach 5 Tagen

mit 0,074 ng / ml wieder gesunken war ($p < 0,001$) (Abb. 31). Die Zellen, die in einem Medium aus X-Vivo mit 10 μ M Forskolin inkubiert worden waren, wiesen nach zwei Tagen ebenfalls eine signifikant hohe Somatostatinkonzentration (0,149 ng / ml) auf ($p < 0,001$), die ebenfalls nach fünf Tagen (0,065 ng / ml) wieder deutlich abfiel. Diese Experimente zeigen, dass die hBSC37 Zellen die Fähigkeit besitzen immunreaktives humanes Somatostatin zu produzieren, das stimulusabhängig sezerniert werden kann.

5 Diskussion

Die Herstellung von ausgereiften Zellen und Geweben aus adulten Stammzellen wird in vielen Fachgebieten der Medizin als vielversprechender Ansatz für die autologe Zellersatztherapie angesehen. Es wird intensiv geforscht, welche Stammzellen in der Zukunft für den Ersatz geschädigter Gewebe im menschlichen Organismus einsetzbar sind. Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Isolation multipotenter Stammzellen aus humanen Haarfollikeln, ihrer Expansion und ihrer Transdifferenzierung. Verschiedene Ansätze zur Generierung von Haarfollikeln, Talgdrüsen und Epidermis ausgehend von Haarfollikelstammzellen wurden schon erarbeitet (Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Tumber et al., 2004; Morris et al., 2004). Auch das neuronale Potential der Haarfollikelstammzellen wurde mit der Differenzierung in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten bewiesen (Amoh et al., 2005; Mignone et al., 2007). Daneben gingen aus Nestin-positiven Stammzellen aus der Wulstregion glatte Muskulatur und Adipozyten hervor (Mignone et al., 2007). Protokolle für die Herstellung von endokrinen Progenitorzellen aus humanen Haarfollikelstammzellen wurden bisher noch nicht erstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Isolierungs- und die Kultivierungsbedingungen für die Expansion von Stammzellen aus dem humanen Haarfollikel im Stammzelllabor der Diabetologie etabliert. Es ist erstmals gelungen, Progenitorzellen zu isolieren und zu expandieren, die neben typischen Stammzellmarkern auch Charakteristika von epithelialen und neuroendokrinen Zellen der Haut aufweisen. Die Produktion und Sekretion von Somatostatin aus Progenitorzellen des Haarfollikels wurde bisher ebenfalls noch nicht beschrieben. Da die hBSCs multipotente Eigenschaften besitzen, stellen sie eine neue vielversprechende Quelle humaner adulter Stammzellen dar.

Isolierung und Charakterisierung der hBSCs

Der Ausgangspunkt der Experimente zur Isolierung und Expansion der Stammzellen waren Arbeiten über die Existenz adulter Stammzellen in der Bulge-Region des Haarfollikels. Ausgetestet wurden mehrere Medien, die für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen, adulten Stammzellen aus dem Knochenmark,

pankreatischen Progenitorzellen und humanen bzw. murinen Haarfollikelstammzellen beschrieben worden waren (Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Tumber et al., 2004; Morris et al., 2004). Diese Basismedien wurden mit verschiedenen Wachstumsfaktoren mit und ohne FCS bzw. Serumersatzstoffen supplementiert. Nach langwierigen Untersuchungen erwies sich nach der Gewinnung der Haarfollikel durch Dispaseverdau die Kultivierung in dem von Zhang und Mitarbeitern beschriebenen Medium (basierend auf DMEM/F12 (3:1) mit 10 % FCS) als besonders erfolgreich (Zhang et al., 2006). Durch die zusätzliche Gabe von Insulin, Hydrocortison und EGF konnte ein besonders zufriedenstellendes Anwachsen der Zellen aus der Bulge-Region beobachtet werden. Dieses modifizierte Medium diente als Basismedium für die Langzeitkultivierung und die Differenzierungsansätze.

Die Zellen (hBSCs), die nach unseren Beobachtungen wahrscheinlich aus der Bulge-Region herauswachsen, konnten von verschiedenen Spendern in unabhängigen Experimenten erfolgreich isoliert werden. Nach der primären Isolierungsphase, in der meist eine gemischte Kultur von Zellen mit unterschiedlichem Phänotyp angezüchtet worden ist, wurde nach etwa der achten Passage ein stabiler Phänotyp beobachtet. Diese Zellen konnten bisher bereits bis zu 30 Passagen lang kultiviert werden.

Im CFU Assay konnte die Fähigkeit, Kolonien aus Einzelzellen zu bilden, nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Proliferationsrate mit einer Verdopplungszeit von weniger als 3 Tagen kann berechnet werden, dass nach der primären Kultivierungsphase ab Passage 8 -10 innerhalb von 35 Tagen etwa 1×10^9 Zellen gewonnen werden können. Diese Zellzahl liegt etwa in der Größenordnung, die für eine Inselzelltransplantation notwendig wäre (Shapiro et al., 2000; Flotte et al., 2001). In Versuch 37 war die Isolation einer stabilen Haarfollikelstammzelllinie erstmalig gelungen. Da der Phänotyp der Zelllinie hBSC 37 charakteristisch für die auch in späteren Versuchen isolierten Stammzellen war und gut expandiert werden konnte, wurde diese Zelllinie ausgewählt, um eine detaillierte Zellcharakterisierung durchzuführen.

Leider wurde bis heute kein Marker identifiziert, mit dem adulte humane Stammzellen klar identifiziert werden können. In den meisten Arbeiten wird deshalb eine Kombination aus Oberflächenmolekülen und zellentwicklungsabhängigen Transkriptionsfaktoren eingesetzt, um Progenitorzellen und Stammzellen zu subklassifizieren. Die hBSC 37 Zellen weisen mehrere typische Merkmale von

adulten Stammzellen auf. Neben den oben erwähnten Fähigkeiten, wie der Selbsterneuerung und der hohen Proliferationsrate, konnten mittels RT-PCR, FACS-Analyse und Immunhistologie Markerprofile detektiert werden, die in mehreren Publikationen über Haarfollikel- und Hautstammzellen, Zellen der Bulge-Region oder adulte Stammzellen aus anderen humanen oder murinen Geweben beschrieben worden sind.

In den hBSC 37 Zellen wurde eine starke Expression von Nestin und Oct4 in der PCR und der Immunhistologie detektiert. Nestin wurde in vielen Publikationen als Marker für multipotente Zellen bei neuronalen Stammzellen und Stammzellen der Neuralleiste (Neural Crest) verwendet, wurde aber auch in mesenchymalen und dermalen Stammzellen aus der Haut beschrieben (Toma et al., 2005; Lorenz et al., 2008; Amoh et al., 2009; Sasahara et al., 2009). Die Nestinexpression ist bei adulten Geweben vor allem den Zonen der Zellregeneration vorbehalten. Mittels Immunhistochemie wurde eine Nestinexpression in der menschlichen Haut vor allem in mesenchymalen Zellen detektiert (Tiede et al., 2009). In immunzytochemischen Ansätzen war Nestin in den epidermalen Neural Crest Stammzellen aus dem Haarfollikel (Epi-NCSCs), den Stammzellen aus der dermalen Papille (SKPs, "skin-derived precursors") und den mesenchymalen Stammzellen aus der Dermis nachweisbar (Sieber-Blum et al., 2004, Toma et al., 2005, Lorenz et al., 2008, Fernades et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass Nestin in mesenchymalen Progenitorzellen nach einer Gewebsverletzung wieder exprimiert werden kann (Lin et al., 1995, Namiki und Tator, 1999, Wiese et al., 2004). Lorenz weist darauf hin, dass auch die Zellisolation einen Proliferationsreiz, ähnlich einer Gewebsverletzung, darstellen kann, was die Nestin-Expression in nicht-mesenchymalen Stammzellen in der Zellkultur erklären könnte (Lorenz et al., 2008).

Oct4 ist ein Mitglied der POU-Domain-Transkriptionsfaktoren, das die Selbstregeneration und Pluripotenz vermittelt. Oct4 wird deshalb als typischer Marker für pluripotente embryonale Stammzellen verwendet (Boiani und Schöler, 2005; Yu et al., 2006). Es war deshalb zunächst überraschend, in den hBSC Zellen eine deutliche Expression von Oct4 nachzuweisen. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass Oct4 und Nanog in vivo in der Haut und hier vor allem im Bereich des Haarfollikels lokalisiert sind (Tai et al., 2005; Yu et al., 2006; De Kock et al., 2009; Riekstina et al., 2009; Li et al., 2010). Es wird vermutet, dass die Oct4-positiven

Zellen der Haut pluripotente Stammzellen sind, aus denen sich Keratinozyten, Drüsenzellen, Melanoblasten und Merkelzellen entwickeln (Yu et al., 2006).

Die Hypothese der Stammzellnatur der hBSCs wird zusätzlich unterstützt durch den positiven Nachweis von Sox2, einem Marker für Stammzellen neuroektodermalen Ursprungs und embryonale Stammzellen (Boiani und Schöler, 2005; Wegner und Stolt, 2005; Medeiros et al., 2009), und den Nachweis des ABC-Transporters BCRP1, einem Marker für Side Population Stammzellen im Knochenmark, Muskel, Testes und Pankreas (Huls et al., 2009).

Interessanterweise exprimieren die hBSCs die oben genannten Marker Oct4 und Sox2, die zu den essentiellen Transkriptionsfaktoren induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) gehören. Takahashi und Yamanaka konnten zeigen, dass durch die Kombination aus den vier Genen c-Myc, Klf-4, Oct-4 und Sox-2 die Reprogrammierung nicht-pluripotenter somatischer Zellen in einen pluripotenten Zustand möglich ist (Takahashi und Yamanaka, 2006; Yoshida und Yamanaka, 2011). Induzierte pluripotente Stammzellen ähneln natürlichen Stammzellen in Morphologie, Wachstumseigenschaften und Stammzellmarkerexpression.

SSEA-1 und SSEA-4, beides stadiumspezifische Marker für embryonale Stammzellen und embryonale Keimzellen, waren wie erwartet nicht detektierbar. Andere Stammzell-assoziierte Marker des hämatopoetischen Systems (CD34, CD117, CD133) (Alakel et al., 2009) und neuraler Stammzellen (CD133) waren auf den hBSCs nicht nachweisbar. CD34 und CD200 waren von einigen Arbeitsgruppen in immunhistologischen Untersuchungen als Marker der Stammzellregion des Haarfollikels beschrieben worden (Ohyama und William, 2007; Amoh et al., 2009; Sasahara et al., 2009). Die fehlende Expression in den hBSCs könnte darauf hindeuten, dass die Zellen einen anderen Ursprung haben oder in der Zellkultur die Expression dieses Markers verlieren. Der Verlust der CD34- und CD200-Expression durch die Kultivierung wurde bei humanen Haarfollikelstammzellen von der Arbeitsgruppe Inoue vorbeschrieben (Inoue et al., 2009).

Für die weitere Charakterisierung der hBSCs wurden Marker getestet, die in vivo im Bereich der dermalen Papille und der Wulstregion des Haarfollikels detektiert worden sind und wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung des Stammzellpools in Nischenregionen der Haut von Bedeutung sind. Unter diesen Markern werden die

Integrine β 1 (CD29), α 6 (CD49f), β 2 (CD49b) und Adhäsionsmoleküle subsummiert, die für die Orientierung der Zellen in der Basalschicht bzw. der Basalmembran der Epidermis und für das Zellhoming wichtig sind (Morris et al., 2004; Morasso und Tomic-Canic, 2005). Einige Arbeitsgruppen haben α 6-Integrin und β 1-Integrin verwendet, um eine Anreicherung von Stammzellen aus der Haut zu erzielen (Morris et al., 2004; Bickenbach und Grinnell, 2004; Morasso und Tomic-Canic, 2005; Roh et al., 2005; Watt et al., 2006; Zhang et al., 2006). Auf der Zelloberfläche der hBSC 37 Zellen war eine schwache Expression des α 6-Integrins (CD49f) detektierbar; (β 1- und α 2-Integrine, sowie der zusätzlich getestete Transferrin-Rezeptor CD71, waren nicht nachweisbar. CD71 wird als Marker proliferativ aktiver Zellen beschrieben (Li et al., 1998; Fathke et al., 2004). Unter den Adhäsionsmolekülen waren CD59 (Protectin) und CD44 (HCAM), jedoch nicht CD24, CD31 (PCAM), CD34, CD45 oder CD56 (NCAM) detektierbar.

Bei der Bewertung und Interpretation der Expressionsmuster muss kritisch darauf hingewiesen werden, dass die hBSC 37 Zellen keine auf Einzelzellebene klonierte Zelllinie darstellt und somit in der Zellkultur eine Mischung mit verschiedenen Zelltypen vorliegen könnte. Der stabile Phänotyp und insbesondere die homogene Färbung in den immunhistologischen Untersuchungen (CK18, CK20, Oct4 und Nestin in nahezu 100% der Zellen) sprechen jedoch stark gegen eine Mischpopulation. In aktuell laufenden Studien werden Einzelzellklone für die klonalen Analysen angezüchtet. Erste Ergebnisse bestätigen den hier für die Ausgangszellen (hBSC 37) beschriebenen Phänotyp.

In der Zusammenschau des Expressionsprofils stellt sich folgende Frage: Welcher humanen Zellpopulation sind die hBSCs zuzuordnen?

Die Zugehörigkeit zum hämatopoetischen Stammzellpool ist bei fehlender Expression von CD34, CD117 und CD133 unwahrscheinlich.

Für die Differenzierung zwischen verschiedenen Stammzellpopulationen der Haut ist das Expressionsmuster an Zytokeratinen (CK) ausschlaggebend, da das Zytokeratinprofil Rückschlüsse auf das Reifungsstadium epithelialer Hautzellen zulässt. Epi-NCSCs aus der Haarpapille und der Wulstregion, SKPs und mesenchymale Stammzellen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen explizit als

Zytokeratin-negativ beschrieben, wohingegen epitheliale bzw. folliculäre Haarfollikelstammzellen, einige in der Bulge-Region lokalisierte Stammzellen (CK15, CK18, CK19, CK20), sowie Basalzellen der Epidermis (CK5, CK14) Zytokeratin-positiv sind (Toma et al., 2001; Bickenbach und Grinnell, 2004; Hu et al., 2006; Lorenz et al., 2008; Aberdam et al., 2008). Merkelzellen der Epidermis exprimieren CK18, CK19 und CK20 (Eispert et al., 2009).

In den hBSC 37 Zellen konnte mittels PCR bzw. mittels Immunhistologie eine starke CK18 und CK20 Expression nachgewiesen werden. Somit kann klar ausgeschlossen werden, dass die hBSCs EPI-NCSCs oder SKPs darstellen. Das Zytokeratinmuster lässt eine epidermale Stammzelle in der Bulge-Region vermuten. Einige Arbeitsgruppen bestätigen die starke Expression von Nestin und Sox2 durch Haarfollikelstammzellen der Wulstregion (Sasahara et al., 2009; Laga et al., 2010). Nestinpositive Zellen in der Wulstregion besitzen laut Yu die Fähigkeit, in Neuronen, glatte Muskeln, Gliazellen und Melanozyten zu transdifferenzieren. Die gleiche Arbeitsgruppe testete ihre isolierten humanen adulten Haarfollikelstammzellen positiv auf Oct-4, einen Transkriptionsfaktor, der in die Selbsterneuerung von Stammzellen involviert ist und als intrinsischer Faktor für die Pluripotenz embryonaler Stammzellen gesehen wird (Yu et al., 2006).

Aus der Literatur ist eine Zellpopulation in der Haut bekannt, die Charakteristika epithelialer und neuroektodermaler Zellen aufweist. Diese Zellen wurden erstmals 1875 von dem Anatomen Friedrich Merkel als große, flache Zellen mit blassem Zellkern beschrieben, die häufig mit Nervenendigungen in der Epidermis in Kontakt stehen. Nachfolgend wurden diese Zellen als Merkelzellen bezeichnet. Es gibt zwei verschiedene Hypothesen über die Abstammung der Merkelzellen. Aufgrund der Expression von Zytokeratinen vermuten einige Arbeitsgruppen eine epidermale Herkunft (Eispert et al., 2009; Van Keymeulen et al., 2009; Morrison et al., 2009). Andere Arbeitsgruppen haben in einem transgenen Wnt1-Promotor-CRE-Mausmodell mit Galaktosidasemarkierung von Neuralleistenzellen nachweisen können, dass alle Merkelzellen von der Neuralleiste abstammen (Szeder et al., 2003). Widera identifizierte Merkelzellkomplexe als Nische der Neuralleistenzellen (Widera et al., 2009). Auch Boulais und Misery sind der Meinung, dass Merkelzellen eher postmitotischen neuronalen Zellen mit epidermaler

Lokalisation entsprechen, als epidermalen Zellen mit neuronalen Charakteristika (Boulais und Misery, 2007).

Merkelzellen sind neuroendokrine Zellen, die zwischen den Basalzellen und im Haarfollikel im Bereich der äußeren Wurzelscheide und der Bulge-Region lokalisiert sind. Sie sind teilweise synaptisch mit Nerven verbunden und durch die Expression von CK18, CK19 und CK20 charakterisiert (Lacour et al., 1991; Fradette et al., 1995, Fradette et al., 2003; Eispert et al., 2009).

Als sogenannte Merkel-Tastscheiben sind die Zellen als Mechanorezeptoren für die Oberflächensensibilität und das Vibrationsempfinden verantwortlich (Boulais und Misery, 2008; Maricich et al., 2009). In neuroendokrinen Granula werden von den Merkelzellen verschiedene Neuropeptide wie z.B. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Somatostatin, Met-Enkephalin gespeichert und sezerniert (Johansson und Nordlind, 1984; Johansson und Vaalasti, 1987; Fantini und Johansson, 1995; Steinhoff et al., 2003; Tachibana und Nawa, 2005; Lucarz und Brand, 2007; Boulais und Misery, 2007; Vockel et al., 2010).

Es wird vermutet, dass die Merkelzellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Differenzierung der Epidermis, der Hautadnexen, sowie der Nerven und Blutgefäße spielen (Boulais und Misery, 2007; Lucarz und Brand, 2007, Van Keymeulen et al., 2009). Merkelzellen können wahrscheinlich parakrine Stimuli auf Haarfollikelstammzellen während der Haarentwicklung ausüben. Sie könnten auch eine funktionelle Rolle in der Proliferation von ekkrinen Schweißdrüsen und Haarfollikeln in der sich entwickelnden Haut spielen. Merkelzellen, die in engem Kontakt zu Nervenfasern stehen, sezernieren möglicherweise endokrine Substanzen in Abhängigkeit von der Regulation durch autonome Nervenfasern (Halata, 1975; Ebara et al., 2002; Boulais und Misery, 2008). Eine enge anatomische Beziehung wurde außerdem zwischen Merkel- und Langerhanszellen in der Bulge-Region humaner Haarfollikel beobachtet (Taira et al., 2002; Halata et al., 2003). Durch die Sekretion von Neuropeptiden kann auch die Funktion von Keratinozyten, Langerhanszellen, Mastzellen, dermalen Endothelzellen und eingewanderten Zellen des Immunsystems direkt beeinflusst werden (Boulais und Misery, 2007). Durch Substanz P, Neurokinin A, POMC-Derivate, CGRP, VIP und Somatostatin kann unter anderem die Zellproliferation, die Zytokinproduktion oder die Aktivität von Zellen des Immunsystems moduliert werden (Payan et al., 1984; Slominski et al., 2001; Steinhoff et al., 2003). Misery bezeichnet Merkelzellen als Schlüsselzellen des

"neuroimmunokutanen Systems" (Misery, 1997; Boulais und Misery, 2008). Insgesamt werden diese Funktionen der Merkelzellen aber noch schlecht verstanden.

Um die Hypothese zu prüfen, dass die hier isolierten hBSCs Merkelzellen oder Vorläuferzellen von Merkelzellen darstellen, wurde ein Panel von neuroendokrinen Markern getestet. Es fand sich eine basale Expression von Somatostatin, die durch Stimulation mit Forskolin deutlich gesteigert werden konnte. Die molekulare Signatur der hBSCs mit positivem Nachweis von Zytokeratinen und neuronalen Transkriptionsfaktoren (Sox2) ist ebenfalls gut mit Merkelzellprogenitorzellen oder Merkelzellen zu vereinbaren (Haeberle et al., 2004; Righi et al., 2006; Laga et al., 2010).

Bisher ist die Langzeitkultur von Merkelzellen über drei bis vier Wochen hinaus nicht gelungen (Kim und Holbrook, 2001; Fradette et al., 2003; Nagase et al., 2009). Nach etwa 2 Wochen geht die Expression von CK20 verloren und die Proliferationsrate nimmt ab (Boulais et al., 2009; Nagase et al., 2009). In der vorliegenden Studie wurde eine Methode entwickelt, humane Zellen aus der Wulstregion des Haares in der Zellkultur in großem Maßstab über mehr als 30 Passagen zu expandieren. Interessanterweise können die Zellen unter Bedingungen kultiviert werden, die für die Expansion von Stammzellen eingesetzt werden. Durch die Verfügbarkeit von Progenitorzellen mit einigen Eigenschaften von Merkelzellen eröffnen sich gegebenenfalls neue Möglichkeiten, Versuche zur Funktion und Regulation dieser bisher nur ansatzweise charakterisierten Zellpopulation durchzuführen. Ob die in der vorliegenden Studie isolierten Zellen tatsächlich Progenitorzellen von Merkelzellen darstellen, muss in weiteren Versuchen, z.B. nach Transplantation in NOD Scid Mäuse, geklärt werden.

hBSC Zellen besitzen multipotente Eigenschaften

Der Vergleich mit den bisher publizierten Daten zeigt, dass die hBSCs einen neuen Subtyp von epidermalen Progenitorzellen darstellen. Neben den Fähigkeiten der Koloniebildung und der Selbstregeneration stellt die Multipotenz ein weiteres wichtiges Kriterium für eine Stammzelle dar.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde deshalb die Ausreifung der hBSCs in mesenchymale Zellen (Adipozyten, Osteoblasten, glatte Muskelzellen), Neuronen

und endokrine Zellen untersucht. Nach der Kultivierung in einem Adipozytendifferenzierungsmedium konnte eine Fettspeicherung, d.h. rotgefärbte Vakuolen im Zellinneren, nur bei einzelnen Zellen (< 5%) nachgewiesen werden. In der von Kossa-Färbung fand sich kein Nachweis einer Mineralisierung von Knochenmatrix. Eine Generierung von Osteoblasten konnte somit nicht erzielt werden. Hingegen entwickelten sich die hBSCs nach der Kultivierung in einem Medium mit TGF- β in glatte Muskelzellen (> 90% Desmin-positive Zellen).

Für die Versuche zur Differenzierung der hBSCs in neuronale Zellen wurde ein Medium verwendet, welches für die Generierung von Neuronen aus Progenitorzellen des Gehirns und der Neuralleiste erfolgreich eingesetzt worden ist (Hunt et al., 2008). Nach 15 - 21 Tagen konnte eine starke Expression von Tubulin- β -III und Neurofilament 200 in über 90% der Zellen detektiert werden. Beide Marker sind spezifisch für ausgereifte Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems und belegen somit die neurogene Differenzierungsfähigkeit der hBSCs.

Das Transdifferenzierungspotential der hBSCs in endokrine Zellen wurde in mehreren Differenzierungsansätzen untersucht, in denen der γ -Sekretase-Inhibitor DBZ, LIF, Picolinsäure, Activin A, Exendin 4, Monothioglycerol und Caspase Inhibitor VI verwendet wurden. Diese Faktoren wurden von einigen Arbeitsgruppen für die Ausreifung von embryonalen und adulten Stammzellen in Insulin-positive Zellen eingesetzt (Mashima et al., 1996; Movassat et al., 2002; Ku et al., 2004; Li et al., 2004; Milano et al., 2004; Shen et al., 2007; Wu et al., 2007). Unter Verwendung der oben genannten Faktoren konnte keine Expression proendokriner bzw. endokriner Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Nach der Differenzierungsphase mit Retinsäure wurden dagegen eine schwache Expression des proendokrinen Progenitormarkers Nkx6.1 und die deutliche Expression von Somatostatin festgestellt. Nach Aktivierung des cAMP-Signaltransduktionsweges durch Forskolin waren die Induktion einer schwachen Nkx6.1-Expression und eine gesteigerte Somatostatinexpression ersichtlich. Die Somatostatinexpression und -sekretion konnte auf Proteinebene durch den Nachweis im Zellkulturüberstand mittels EIA bestätigt werden. Dieser Befund ist besonders hervorzuheben, da es somit in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen ist, humane Progenitorzellen zu isolieren, die das Repertoire für die Produktion und Sekretion von Peptidhormonen besitzen. Der

neuroendokrine Charakter der hBSCs ist insbesondere für die Diabetologie interessant, da hier intensiv nach autologen adulten Stammzellen für die Transdifferenzierung in Insulin-produzierende Betazellen gesucht wird. Die Testung der Expression zusätzlicher Transkriptionsfaktoren, die in Progenitorzellen oder reifen Betazellen exprimiert werden, war allerdings negativ. Auch die endokrinen Marker Glukagon und Insulin konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Versuche zur Induktion einer Differenzierung in ausgereifte Zellen waren konzipiert, um den Beweis zu erbringen, dass die hBSCs multipotente Eigenschaften besitzen. Dies ist durch den Nachweis eines mesodermalen (glatte Muskelzellen), ektodermalen (Neurone) und neuroendokrinen Phänotyps (Somatostatin) gelungen. In nachfolgenden Arbeiten müssen die multipotenten Eigenschaften noch detaillierter untersucht werden. Besonders interessant wären Versuche zur Differenzierung in Insulin-positive Zellen. Da die Transdifferenzierung von adulten Stammzellen jedoch einen höchst komplexen Prozess darstellt, der ein sequentielles Zusammenspiel verschiedenster endogener und exogener Faktoren benötigt, gingen diese Versuche über den Rahmen der hier vorliegenden Arbeit hinaus. Die Untersuchung des Potenzials der hBSCs für zelltherapeutische Ansätze bei neurodegenerativen oder endokrinen Erkrankungen bleibt ebenfalls nachfolgenden Arbeiten vorbehalten.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die prinzipielle Fragestellung zu beantworten, ob Stammzellen aus humanen Haarfollikeln in ausreichender Menge expandiert werden können und inwieweit eine Differenzierung in neuroendokrine Zellen möglich ist. Es sollte eine Methode zur Isolierung und Langzeitkultivierung von Haarfollikelstammzellen etabliert und optimiert werden, um eine neue Quelle autologer adulter Stammzellen für zelltherapeutische Ansätze zu gewinnen.

Durch Verwendung verschiedener Medien und Beschichtungsarten wurde ein Protokoll entwickelt, aus Dispase-verdauten Hautbiopsien Progenitorzellen zu isolieren. Die auf diese Weise expandierten Zellen wurden mit FACS-Analyse, RT-PCR und Immunhistologie charakterisiert. Im letzten Teil der Arbeit wurde durch Zugabe von spezifischen Faktoren die Fähigkeit zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen untersucht.

Nach Austestung verschiedener Zellkulturbedingungen wurde eine neue Population von Zellen aus der Haarfollikelregion isoliert. Diese Zellen, die als hBSCs bezeichnet wurden, waren über mehr als 30 Passagen mit stabilem Phänotyp kultivierbar (Self-Renewal). Zudem waren sie im Colony-Unit-Assay positiv und zeigten die Expression pluripotenter (Oct4) und multipotenter Stammzellmarker (Nestin, BCRP1, Sox2).

Die molekulare Signatur der hBSCs zeigt einige Übereinstimmung mit Merkelzellen, neuroektodermalen Zellen der Haut, die eine Rolle als Mechanorezeptoren und neurosekretorische Zellen der Haut spielen.

Unter Verwendung von etablierten Protokollen wurde die Fähigkeit der Differenzierung in Adipozyten, Osteoblasten, glatte Muskelzellen, Neuronen und endokrine Zellen untersucht. Der Nachweis der Entwicklung von glatten Muskelzellen, Neuronen und in eingeschränktem Maße auch Adipozyten belegt die Multipotenz der hBSCs. Darüber hinaus besitzen die hBSCs die Fähigkeit, stimulusabhängig Somatostatin zu exprimieren und zu sezernieren.

Somit ist es erstmals gelungen, humane adulte Stammzellen/Progenitorzellen mit neuroendokrinen Eigenschaften zu isolieren.

Zusammenfassend ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, eine Methode zu etablieren, mittels derer eine neue Population von humanen multipotenten

Stammzellen aus der Haarfollikelregion in Langzeitkultur expandiert werden konnte. Die Plastizität der hBSCs und insbesondere die Differenzierung in reife endokrine Zellen muss in weiteren Studien untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

Abdourahman A, Edwards JG. 2008. Chromium supplementation improves glucose tolerance in diabetic Goto-Kakizaki rats. *IUBMB Life* 60(8):541-8

Aberdam D. 2008. Epidermal stem cell fate: what can we learn from embryonic stem cells? *Cell Tissue Res.* 331(1):103-7

Alakel N, Jing D, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Ordemann R. 2009. Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Exp Hematol.* 37(4):504-13

Albers JW, Herman WH, Pop-Busui R, Feldman EL, Martin CL, Cleary PA, Waberski BH, Lachin JM; for the DCCT/EDIC Research Group. 2010. Effect Of Prior Intensive Insulin Treatment During The Diabetes Control And Complications Trial (DCCT) On Peripheral Neuropathy In Type 1 Diabetes During The Epidemiology Of Diabetes Interventions, And Complications (EDIC) Study. *Diabetes Care.*

Aleckovic M, Simón C. 2008. Is teratoma formation in stem cell research a characterization tool or a window to developmental biology? *Reprod Biomed Online.* 17(2):270-80

Alonso L, Fuchs E. 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2100 Suppl 1:11830-5

Alonso L, Fuchs E. 2006. The hair cycle. *J Cell Sci.* 1;119(Pt 3):391-3

American Diabetes Association. 2007. American Diabetes Association clinical practice recommendations 2004. *Diabetes Care* 27(Suppl 1):42-85

Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. 2005. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(15):5530-5534

Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. 2005. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(49): 17734-17738

Amoh Y, Kano M, Niiyama S, Hamada Y, Kawahara K, Sato Y, Hoffman RM, Katsuoka K. 2009. Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem.* 1;107(5):1016-20

Aronson D. 2008. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol.* 45:1-16

Arsic N, Mamaeva D, Lamb NJ, Fernandez A. 2008. Muscle-derived stem cells isolated as non-adherent population give rise to cardiac, skeletal muscle and neural lineages. *Exp Cell Res.* 1;314(6):1266-80

- Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK.** 2006. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Dev Growth Differ*; 48: 323–332
- Balla A, Chobanian M.** 2009. New-onset diabetes after transplantation: a review of recent literature. *Curr Opin Organ Transplant*. 14(4):375-9
- Barrandon Y, Green H.** 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:2302–6
- Bickenbach JR, Grinnell KL.** 2004. Epidermal stem cells: interactions in developmental environments. *Differentiation*. 72(8):371-80
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E.** 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118(5):635-648
- Blanpain C, Fuchs E.** 2006. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22:339-73
- Blanpain C, Fuchs E.** 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(3):207-17
- Boiani M, Schöler HR.** 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(11):872-84
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE.** 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 106(3):761-71
- Boulais N, Misery L.** 2007. Merkel cells. *J Am Acad Dermatol*. 57(1):147-65
- Boulais N, Misery L.** 2008. The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*. 18(2):119-27
- Boulais N, Pereira U, Lebonvallet N, Gobin E, Dorange G, Rougier N, Chesne C, Misery L.** 2009. Merkel cells as putative regulatory cells in skin disorders: an in vitro study. *PLoS One*. 4(8):e6528
- Bretzel RG, Brandhorst D, Brandhorst H, Eckhard M, Ernst W, Friemann S, Rau W, Weimar B, Rauber K, Hering BJ, Brendel MD.** 1999. Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management. *J Mol Med*. 77(1):140-3
- Bretzel RG, Eckhard M, Jahr H, Brendel MD.** 2006. Inselzelltransplantation, Stammzelltherapie und regenerative Therapie bei Diabetes mellitus. *Dtsch Med Wochenschr*. 131(16):903-6
- Carter DA, Dick AD, Mayer EJ.** 2009. CD133+ adult human retinal cells remain undifferentiated in Leukaemia Inhibitory Factor (LIF). *BMC Ophthalmol*. 23;9:1

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

Chen G, Liu P, Pattar GR, Tackett L, Bhonagiri P, Strawbridge AB, Elmendorf JS. 2006. Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 20(4):857-70

Christoph T, Müller-Röver S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, Rückert R, Paus R. 2000. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol.* 142(5):862-73

CITR - Collaborative Islet Transplant Registry; <http://www.citregistry.com/>

Claudinot S, Nicolas M, Oshima H, Rochat A, Barrandon Y. 2005. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(41):14677-14682

Commo S, Bernard BA. 1997. Immunohistochemical analysis of tissue remodelling during the anagen-catagen transition of the human hair follicle. *Br J Dermatol.* 137(1):31-8

Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell* 61:1329-1337

D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. 2005. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23:1534–1541

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten F P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44: 1928–1942

DECODE Study Group, the European Diabetes Epidemiology Group. 2001. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med.* 161(3):397-405

De Kock J, Vanhaecke T, Biernaskie J, Rogiers V, Snykers S. 2009. Characterization and hepatic differentiation of skin-derived precursors from adult foreskin by sequential exposure to hepatogenic cytokines and growth factors reflecting liver development. *Toxicol In Vitro.* 23(8):1522-7

Diabetes Control and Complications Trial Research Group. 1993. The effects of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986

Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. 2005. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 8;309(5732):314-7

- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC.** 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117:2971–2981
- Douglas GC, VandeVoort CA, Kumar P, Chang TC, Golos TG.** 2009. Trophoblast stem cells: models for investigating trophoblast differentiation and placental development. *Endocr Rev.* 30(3):228-40
- Dreno B, Mousset S, Stalder JF, Bureau B, Litoux P, Barrière H.** 1985. A study of intermediate filaments (cytokeratin, vimentin, neurofilament) in two cases of Merkel cell tumor. *J Cutan Pathol.* 12(1):37-45
- Ebara S, Kumamoto K, Matsura T, Mazurkiewicz JE, Rice FL.** 2002. Similarities and differences in the innervation of mystacial vibrissal follicle-sinus complexes in the rat and cat: a confocal microscopic study. *J Comp Neurol* 449:103–119
- Eispert AC, Fuchs F, Brandner JM, Houdek P, Wladykowski E, Moll I.** 2009. Evidence for distinct populations of human Merkel cells. *Histochem Cell Biol.*
- El Seady R, Huisman MA, Löwik CW, Frijns JH.** 2008. Uncomplicated differentiation of stem cells into bipolar neurons and myelinating glia. *Biochem Biophys Res Commun.* 14;376(2):358-62
- Fantini F, Johansson O.** 1995. Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation. *Exp Dermatol:* 4: 365–371
- Fathke C, Wilson L, Hutter J et al.** 2004. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells:* 22: 812–822
- Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD.** 2004. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* 6(11):1082-93
- Fernandes KJ, Toma JG, Miller FD.** 2008. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philos. Trans.R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363 185–198
- Filip S, Mokry J, Karbanová J, Vávrová J, English D.** 2004. Local environmental factors determine hematopoietic differentiation of neural stem cells. *Stem Cells Dev.* 13(1):113-20
- Fiorina P, Shapiro AM, Ricordi C, Secchi A.** 2008. The clinical impact of islet transplantation. *Am J Transplant.* 8(10):1990-7
- Fisher M.** 2004. Diabetes and atherogenesis. *Heart* 90: 336–340
- Flotte T, Agarwal A, Wang J, Song S, Fenjves ES, Inverardi L, Chesnut K, Afione S, Loiler S, Wasserfall C, Kapturczak M, Ellis T, Nick H, Atkinson M.**

2001. Efficient ex vivo transduction of pancreatic islet cells with recombinant adeno-associated virus vectors. *Diabetes*. 50(3):515-20

Fradette J, Godbout MJ, Michel M, Germain L. 1995. Localization of Merkel cells at hairless and hairy human skin sites using keratin 18. *Biochem Cell Biol*. 73(9-10):635-9

Fradette J, Larouche D, Fugere C, Guignard R, Beauparlant A, Couture V. 2003. Normal human Merkel cells are present in epidermal cell populations isolated and cultured from glabrous and hairy skin sites. *J Invest Dermatol*. 120:313-7

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. 2004. Socializing with the neighbours: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769-778

Fuchs E. 2007. Scratching the surface of skin development. *Nature*. 22;445(7130):834-42

Fuchs E, Horsley V. 2008. More than one way to skin. *Genes Dev*. 15;22(8):976-85

Ghazizadeh S, Taichman LB. 2001. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*. 15;20(6):1215-22

Grinnell KL, Bickenbach JR. 2007. Skin keratinocytes pre-treated with embryonic stem cell-conditioned medium or BMP4 can be directed to an alternative cell lineage. *Cell Prolif*. 40(5):685-705

Gruessner AC, Sutherland DE. 2005. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant*; 19:433–455

Haeberle H, Fujiwara M, Chuang J, Medina MM, Panditrao MV, Bechstedt S, Howard J, Lumpkin EA. 2004. Molecular profiling reveals synaptic release machinery in Merkel cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:14503–14508

Halata Z. 1975. The mechanoreceptors of the mammalian skin. Ultrastructure and morphological classification. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 50:1–77

Halata Z, Grim M, Bauman KI. 2003. Friedrich Sigmund Merkel and His “Merkel Cell”, Morphology, Development, and Physiology: Review and New Results *Anat Rec Part A* 271A:225–239

Hanley S, Rosenberg L. 2009. Islet-derived progenitors as a source of in vitro islet regeneration. *Methods Mol Biol*. 482:371-85

Hardy MH. 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet* 8(2):55-61

Hayflick L. 1979. The cell biology of aging. *J Invest Dermatol*. 73(1):8-14

Herrera M B, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. 2006. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006; 24: 2840–2850

Hinz B, Becher A, Mitter D, Schulze K, Heinemann U, Draguhn A, Ahnert-Hilger G. 2001. Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur J Cell Biol.* 80(10):615-9

Hjelmsaeth J, Asberg A, Müller F, Hartmann A, Jenssen T. 2005. New-onset posttransplantation diabetes mellitus: insulin resistance or insulinopenia? Impact of immunosuppressive drugs, cytomegalovirus and hepatitis C virus infection. *Curr Diabetes Rev.* 1(1):1-10

Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 2008. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 359(15):1577-89

Horvath EM, Tackett L, McCarthy AM, Raman P, Brozinick JT, Elmendorf JS. 2008. Antidiabetogenic effects of chromium mitigate hyperinsulinemia-induced cellular insulin resistance via correction of plasma membrane cholesterol imbalance. *Mol Endocrinol.* 22(4):937-50

Hu YF, Zhang ZJ, Sieber-Blum M. 2006. An epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) molecular signature. *Stem Cells* 24(12):2692-2702

Huang Y, Qiao F, Abagyan R, Hazard S, Tomlinson S. 2006. Defining the CD59-C9 binding interaction. *J Biol Chem.* 281(37):27398-404

Huls M, Russel FG, Masereeuw R. 2009. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther.* 328(1):3-9

Hunt DP, Morris PN, Sterling J, Anderson JA, Joannides A, Jahoda C, Compston A, Chandran S. 2008. A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells.* 26(1):163-72

Inoue K, Aoi N, Sato T, Yamauchi Y, Suga H, Eto H, Kato H, Araki J, Yoshimura K. 2009. Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells. *Lab Invest.* 89(8):844-56

Ito M, Kizawa K. 2001. Expression of calcium-binding S100 proteins A4 and A6 in regions of the epithelial sac associated with the onset of hair follicle regeneration. *J Invest Dermatol.* 116(6):956-63

Ito M, Kizawa K, Hamada K, Cotsarelis G. 2004. Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differentiation* 72(9-10):548-557

Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, Cotsarelis G. 2005. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.* 11(12):1351-1354

ITR – International Islet Transplant registry; www.med.uni-giessen.de/itr/

Jacqueminet S, Masseboeuf N, Rolland M, Grimaldi A, Sachon C. 2005. Limitations of the so-called "intensified" insulin therapy in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 31(4 Pt 2):4S45-4S50

Janderová L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. 2003. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res.* 11(1):65-74

Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, Majumdar AS. 2007. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:1940–1953

Johansson O, Nordlind K. 1984. Immunohistochemical localization of somatostatin-like immunoreactivity in skin lesions from patients with urticaria pigmentosa. *Virchows Arch* 46: 155–164

Johansson O, Vaalasti A. 1987. Immunohistochemical evidence for the presence of somatostatin-containing sensory nerve fibres in the human skin. *Neurosci Lett* 73: 225–230

Jones PH, Watt FM. 1993. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73(4):713-724

Kaiser S. 2004. Untersuchung humaner Stammzellen aus dem adulten Knochenmark und der fetalen Leber. Dissertation. Freiburg im Breisgau. S.7

Khurana S, Mukhopadhyay A. 2008. In vitro transdifferentiation of adult hematopoietic stem cells: an alternative source of engraftable hepatocytes. *J Hepatol.* 49(6):998-1007

Kim DK, Holbrook KA. 2001. The nerve-dependency of Merkel cell proliferation in cultured human fetal glabrous skin. *Yonsei Med J* 42:311-5

Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. 1993. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(15):7391-7395

Kojima H, Nakamura T, Fujita Y, Kishi A, Fujimiya M, Yamada S, Kudo M, Nishio Y, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Kojima I, Seno M, Wong NC, Kikkawa R, Kashiwagi A. 2002. Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin. *Diabetes* 51(5):1398-408

- Kosodo Y, Huttner WB.** 2009. Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ.* 51(3):251-61
- Kronenwett R, Haas R.** 2006. [Differentiation potential of stem cells from bone marrow] *Med Klin (Munich).* 101 Suppl 1:182-5
- Ku HT, Zhang N, Kubo A, O'Connor R, Mao M, Keller G, Bromberg JS.** 2004. Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro. *Stem Cells.* 22(7):1205-17
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS.** 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24(22):2463-79
- Labruzzo C, El Tayar AR, Hakim NS.** 2006. Graft pancreatitis: literature review. *Int Surg.* 91(2):107-11
- Lacour JP, Dubois D, Pisani A, Ortonne JP.** 1991. Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *Br J Dermatol.* 125(6):535-42
- Laga AC, Lai CY, Zhan Q, Huang SJ, Velazquez EF, Yang Q, Hsu MY, Murphy GF.** 2010. Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology. *Am J Pathol.* 176(2):903-13
- Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, Songini M, Bonicchio S, Giorgino F, Bonifacio E, Bosi E, Buzzetti R; Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group.** 2010. Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes Care.* 33(1):104-8
- Lee J, Wen J, Park JY, Kim SA, Lee EJ, Song SY.** 2009. Reversal of diabetes in rats using GLP-1-expressing adult pancreatic duct-like precursor cells transformed from acinar to ductal cells. *Stem Cells Dev.* 18(7):991-1002
- Li A, Simmons P J, Kaur P.** 1998. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3902–3907
- Li J, Luo R, Kowluru A, Li G.** 2004. Novel regulation by Rac1 of glucose- and forskolin-induced insulin secretion in INS-1 beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(5):E818-27
- Li L, Yi Z, Seno M, Kojima I.** 2004. Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 53(3):608-615
- Li L, Fukunaga-Kalabis M, Yu H, Xu X, Kong J, Lee JT, Herlyn M.** 2010. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J Cell Sci.* 123(Pt 6):853-60

- Liang L, Bickenbach JR.** 2002. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells*. 20(1):21-31
- Lin, H.** 2002. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat. Rev. Genet.* 3, 931-940
- Lin R C, Matesic D F, Marvin M, McKay R D, Brustle O.** 1995. Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis* 2: 79–85
- Liu Y, Lyle S, Yang Z, Cotsarelis G.** 2003. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J Invest Dermatol* 121(5):963-968
- Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, Bader A.** 2008. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*.17(11):925-32
- Lteif AA, Mather KJ, Clark CM.** 2003. Diabetes and heart disease an evidence-driven guide to risk factors management in diabetes. *Cardiol Rev*, 11: 262–274
- Lucarz A, Brand G.** 2007. Current considerations about Merkel cells. *Eur J Cell Biol*. 86(5):243-51
- Lundgren VM, Isomaa B, Lyssenko V, Laurila E, Korhonen P, Groop LC, Tuomi T; Botnia Study Group.** 2010. GAD antibody positivity predicts type 2 diabetes in an adult population. *Diabetes* 59(2):416-22
- Luu NT, Rainger GE, Buckley CD, Nash GB.** 2003. CD31 regulates direction and rate of neutrophil migration over and under endothelial cells. *J Vasc Res*. 40(5):467-79
- Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G.** 1998. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 21):3179-3188
- Maltby S, Wohlfarth C, Gold M, Zbytnuik L, Hughes MR, McNagny KM.** 2010. CD34 is required for infiltration of eosinophils into the colon and pathology associated with DSS-induced ulcerative colitis. *Am J Pathol* 177 (3): 1244–54
- Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA, Zoghbi HY.** 2009. Merkel cells are essential for lighttouch responses. *Science*. 324:1580–1582
- Martinez-Monedero R, Edge AS.** 2007. Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells. *Int. J. Dev. Biol.* 51 655–661
- Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I.** 1996. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest* 97(7):1647-1654

- Medeiros RB, Papenfuss KJ, Hoium B, Coley K, Jadrich J, Goh SK, Elayaperumal A, Herrera JE, Resnik E, Ni HT.** 2009. Novel sequential ChIP and simplified basic ChIP protocols for promoter co-occupancy and target gene identification in human embryonic stem cells. *BMC Biotechnol.* 9(1):59.
- Medina RJ, Kataoka K, Takaishi M, Miyazaki M, Huh NH.** 2006. Isolation of epithelial stem cells from dermis by a three-dimensional culture system. *J Cell Biochem.* 1;98(1):174-84
- Merani S, Shapiro AM.** 2006. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci (Lond).* 110(6):611-25
- Mignone JL, Roig-Lopez JL, Fedtsova N, Schones DE, Manganas LN, Maletic-Savatic M, Keyes WM, Mills AA, Gleiberman A, Zhang MQ, Enikolopov G.** 2007. Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle.* 1;6(17):2161-70
- Milano J, McKay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadiant R, Jacobs RT, Zacco A, Greenberg B, Ciaccio PJ.** 2004. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci.* 82(1):341-58
- Misery L.** 1997. Skin, immunity and the nervous system. *Br J Dermatol.* 137(6):843-50
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH.** 2002. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 298:24–30
- Montagna W, Chase HB.** 1956. Histology and cytochemistry of human skin. X. X-irradiation of the scalp. *Am. J. Anat.* 99:415–45
- Morasso MI, Tomic-Canic M.** 2005. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell.* 97(3):173-83
- Morris RJ, Potten CS.** 1999. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol.* 112(4):470-5
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G.** 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 22(4):411-417
- Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM.** 2009. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev Biol.* 336(1):76-83
- Movassat J, Beattie GM, Lopez AD, Hayek A.** 2002. Exendin 4 up-regulates expression of PDX 1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87(10):4775-4781

- Mullis KB, Faloona F.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Naftanel MA, Harlan DM.** 2004. Pancreatic islet transplantation. *PLoS Med.* 1(3):e58; quiz e75
- Nagase K, Aoki S, Uchihashi K, Misago N, Shimohira-Yamasaki M, Toda S, Narisawa Y.** 2009. An organotypic culture system of Merkel cells using isolated epidermal sheets. *Br J Dermatol.* 161(6):1239-47
- Naghdi M, Tiraihi T, Namin SA, Arabkheradmand J.** 2009. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytotherapy* 11(2):137-52
- Namiki J, Tator C H.** 1999. Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 489–498
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group.** 2005. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 353(25):2643-53
- Niemann C, Watt FM.** 2002. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol.* 12(4):185-92
- Niemann C, Owens DM, Hülsken J, Birchmeier W, Watt FM.** 2002. Expression of DeltaN^{Lef1} in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development.* 129(1):95-109
- Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A.** 2004. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol.* 16(6):693-9
- Ohyama M., William J.** 2007. Advances in the study of stem-cell-enriched hair follicle bulge cells: a review featuring characterization and isolation of human bulge cells., *Dermatology* 214(4):342-51.
- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y.** 2001. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell.* 26;104(2):233-45
- Oström M, Loffler KA, Edfalk S, Selander L, Dahl U, Ricordi C, Jeon J, Correa-Medina M, Diez J, Edlund H.** 2008. Retinoic acid promotes the generation of pancreatic endocrine progenitor cells and their further differentiation into beta-cells. *PLoS One.* 30;3(7):e2841
- Panteleyev AA, Jahoda CA, Christiano AM.** 2001. Hair follicle predetermination. *J Cell Sci.* 114(Pt 19):3419-31
- Paterson AD, Rutledge BN, Cleary PA, Lachin JM, Crow RS; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and**

Complications Research Group. 2007. The effect of intensive diabetes treatment on resting heart rate in type 1 diabetes: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. *Diabetes Care.* 30(8):2107-12

Paulin D, Li Z. 2004. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res.* 301(1):1-7

Paus R, Cotsarelis G. 1999. The Biology of hair follicles. *N Engl J Med* 341:491-498

Payan D G, Hess C A, Goetzl E J. 1984. Inhibition by somatostatin of the proliferation of T lymphocytes and molt-4 lymphoblasts. *Cell Immunol* 84: 433–438

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13;98(6):3156-61

Penforinis A, Kury-Paulin S. 2006. Immunosuppressive drug-induced diabetes. *Diabetes Metab.* 32(5 Pt 2):539-46

Pfeffer F, Nauck MA, Drognitz O, Benz S, von Dobschuetz E, Hopt UT. 2003. Postoperative oral glucose tolerance and stimulated insulin secretion: a predictor of endocrine graft function more than 10 years after pancreas-kidney transplantation. *Transplantation.* 76(10):1427-31

Phillip M, Battelino T, Rodriguez H, Danne T, Kaufman F; European Society for Paediatric Endocrinology; Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society; International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. 2007. Use of insulin pump therapy in the pediatric age-group: consensus statement from the European Society for Paediatric Endocrinology, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, endorsed by the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 30(6):1653-62

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147

Plaumann S, Blume R, Borchers S, Steinfeldt HJ, Knepel W, Oetjen E. 2008. Activation of the dual-leucine-zipper-bearing kinase and induction of beta-cell apoptosis by the immunosuppressive drug cyclosporin A. *Mol Pharmacol.* 73(3):652-9

Popp FC, Slowik P, Eggenhofer E, Renner P, Lang SA, Stoeltzing O, Geissler EK, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. 2007. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells* 25(3):639-645

Prowse AB, Wilson J, Osborne GW, Gray PP, Wolvetang EJ. 2008. Multiplexed staining of live human embryonic stem cells for flow cytometric analysis of pluripotency markers. *Stem Cells Dev.*18(8):1135-40

Pruszek J, Ludwig W, Blak A, Alavian K, Isacson O. 2009. CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells.* 27(12):2928-40

Pujal J, Huch M, José A, Abasolo I, Rodolosse A, Duch A, Sánchez-Palazón L, Smith FJ, McLean WH, Fillat C, Real FX. 2009. Keratin 7 promoter selectively targets transgene expression to normal and neoplastic pancreatic ductal cells in vitro and in vivo. *FASEB J.*23(5):1366-75

Raposio E, Guida C, Baldelli I, Curto M, Fiocca R, Kunkl A, Robello G, Santi PL. 2007. Characterization of multipotent cells from human adult hair follicles. *Toxicol In Vitro.* 21(2):320-3

Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. 2009. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* 5(4):378-86

Righi A, Betts CM, Marchetti C, Marucci G, Montebugnoli L, Prati C, Eusebi LH, Muzzi L, Ragazzini T, Foschini MP. 2006. Merkel cells in the oral mucosa. *Int J Surg Pathol.* 14(3):206-11

Roh C, Tao Q, Photopoulos C, Lyle S. 2005. In vitro differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. *J Invest Dermatol* 125(6):1099-1105

Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. 2005. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 54(7):2060-9

Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgemuth R. 2008. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med.* 14(2):181-7

Sasahara Y, Yoshikawa Y, Morinaga T, Nakano Y, Kanazawa N, Kotani J, Kawamata S, Murakami Y, Takeuchi K, Inoue C, Kitano Y, Hashimoto-Tamaoki T. 2009. Human keratinocytes derived from the bulge region of hair follicles are refractory to differentiation. *Int J Oncol.* 34(5):1191-9

Saunders AE, Johnson P. 2010. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal.* 22(3):339-48

Saurat JH, Didierjean L, Skalli O, Sifegenthaler G, Gabbiani G. 1984. The intermediate filament proteins of rabbit normal epidermal Merkel cells are cytokeratins. *J Invest Dermatol.* 83(6):431-5

Savagner P. 2010. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol.* 21 Suppl 7:vii89-vii92

Seissler J. 2008. [Future therapeutic options and their indications: transplantation and the possibilities of regenerative therapy for diabetes type 1]. *MMW Fortschr Med.* 30;150(44):50-1

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*; 343: 230–238

Shen CN, Marguerie A, Chien CY, Dickson C, Slack JM, Tosh D. 2007. All-trans retinoic acid suppresses exocrine differentiation and branching morphogenesis in the embryonic pancreas. *Differentiation.* 75(1):62-74

Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. 2004. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev. Dyn.* 231 258–269

Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A. 2001. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J* 15: 1678–1693

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature.* 1;414(6859):98-104

Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel J, Scmelz M, Luger T. 2003. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol* 139: 1479–1488

Sutherland DE, Gruessner R, Kandswamy R, Humar A, Hering B, Gruessner A. 2004. Beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus: an integrated approach. *Transplant Proc.* 36(6):1697-9.

Szeder V, Grim M, Halata Z, Sieber-Blum M. 2003. Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev. Biol.* 253:258–263

Tachibana T, Nawa T. 2005. Immunohistochemical reactions of receptors to met-enkephalin, VIP, substance P, and CGRP located on Merkel cells in the rat sinus hair follicle. *Arch Histol Cytol.* 68(5):383-91

Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. 2005. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 26(2):495-502

Taira K, Narisawa Y, Nakafusa J, Misago N, Tanaka T. 2002. Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles. *J Dermatol Sci.* 30(3):195-204

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102(4):451-461

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 4;416(6880):542-5

Terada T. 2009. Intraductal tubular carcinoma, intestinal type, of the pancreas. *Pathol Int*. 59(1):53-8

Tiede S, Kloepper JE, Whiting DA, Paus R. 2007. The 'follicular trochanter': an epithelial compartment of the human hair follicle bulge region in need of further characterization. *Br J Dermatol*. 157(5):1013-6

Tiede S, Kloepper JE, Ernst N, Poeggeler B, Kruse C, Paus R. 2009. Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J Invest Dermatol*. 129(11):2711-20

Tobin DJ, Hagen E, Botchkarev VA, Paus R. 1998. Do hair bulb melanocytes undergo apoptosis during hair follicle regression (catagen)? *J Invest Dermatol*. 111(6):941-7

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3: 778–784

Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. 2005. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 23(6):727-37

Trempeus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW. 2003. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* 120(4):501-511

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303(5656):359-363

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 352(9131):854-65

Ullrich S, Abel KB, Lehr S, Greger R. 1996. Effects of glucose, forskolin and tolbutamide on membrane potential and insulin secretion in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflugers Arch*. 432(4):630-6

Van Keymeulen A, Mascré G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, Szpalski C, Achouri Y, Bloch W, Hassan BA, Blanpain C. 2009. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol*. 5;187(1):91-100

Vockel M, Breitenbach U, Kreienkamp HJ, Brandner JM. 2010. Somatostatin regulates tight junction function and composition in human keratinocytes. *Exp Dermatol*. (10):888-94

Wagers AJ, Weissman IL. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*.5;116(5):639-48

- Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ, Roop DR.** 2001. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet.* 28(2):165-8
- Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V.** 2006. Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev.* 16(5):518-24
- Wegner M, Stolt CC.** 2005. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* 28(11):583-8
- Welsch, Ulrich.** 2003. *Lehrbuch Histologie.* 1.Auflage. Urban & Fischer, München-Jena
- White SA, Shaw JA, Sutherland DE.** 2009. Pancreas transplantation. *Lancet.* 2009 23;373(9677):1808-17
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G.** 2004. Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61: 2510–2522
- Widera D, Zander C, Heidbreder M, Kasperek Y, Noll T, Seitz O, Saldamli B, Sudhoff H, Sader R, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B.** 2009. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells.* 27(8):1899-910
- Williams DF.** 2006. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. *Trends Biotechnol.* 24(1):4-8
- Wilson PW.** 2001. Diabetes mellitus and coronary heart disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30: 857–881
- Wu XH, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Zhu J, Jiang JJ, Cui D, Zhang M, Xu Y, Liu C.** 2007. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol.* 28;13(24):3342-9
- Yang LJ.** 2006. Liver stem cell-derived beta-cell surrogates for treatment of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 5(6):409-13
- Yoon J, Choi SC, Park CY, Choi JH, Kim YI, Shim WJ, Lim DS.** 2008. Bone marrow-derived side population cells are capable of functional cardiomyogenic differentiation. *Mol Cells.* 30;25(2):216-23
- Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X.** 2006. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol.* 168(6):1879-88
- Zanet J, Pibre S, Jacquet C, Ramirez A, de Alborán IM, Gandarillas A.** 2005. Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. *J Cell Sci.* 15;118(Pt 8):1693-704
- Zhang Y, Xiang M, Wang Y, Yan J, Zeng Y, Yu J, Yang T.** 2006. Bulge cells of human hair follicles: segregation, cultivation and properties. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 15;47(1):50-6

Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C. 2008. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol.* 43(11):986-97

Zuk P A, Zhu M, Ashjian P. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279–4295

Zvaifler N J, Marinova-Mutafchieva L, Adams G. 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2: 477–488

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

München, den 01.09.2011

Michaela Maria Hummel