

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Knochenmark stellt eine leicht zugängliche Quelle für adulte Stammzellen dar, die für einen Einsatz in multiplen zellbasierten Therapien geeignet zu sein scheinen. Einige wenige Studien der letzten Jahre deuteten die Existenz von pluripotenten Stammzellen innerhalb der Knochenmarkstammzellen (KMSZ) an. Als entscheidender Parameter dieser pluripotenten Stammzellen, die als MAP-, MIAMI- und VSEL-Zellen bezeichnet werden, gilt die Expression verschiedener embryonaler und gewebespezifischer Stammzellmarker.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen eines totalen Serumentzuges auf eine Subpopulation von bereits existierenden, kleinzelligen Nestin-positiven KMSZ (sog. A-KMSZ) aus der Ratte *in vitro*. Es konnte demonstriert werden, dass eine dreitägige Phase der Serumdeprivation zu einer Proliferation der A-KMSZ, verbunden mit einer Änderung ihrer Morphologie, Genexpression und ihres Immunphänotypes, führt. Die Tochterzellen, als Serumdeprivation-induzierte Knochenmarkstammzellen (SD-KMSZ) bezeichnet, verfügen über runde bzw. bipolare Somata, wie sie charakteristisch für neurale Stammzellen (NSZ) sind. Das Expressionsmuster der SD-KMSZ, sie sind Nestin-positiv und ko-exprimieren darüber hinaus GFAP (92 %) und S100 $\beta$  (91 %), ähnelt ebenfalls dem neuraler Stammzellen des Hippokampus und der Subventrikulärzone. Des Weiteren konnte in den SD-KMSZ die Expression der Pluripotenzgene Oct4 und SOX2 nachgewiesen werden. Wie qRT-PCR-Untersuchungen zeigten, induzierte die Serumdeprivation, bezogen auf die mRNS-Menge unter Basalbedingungen, einen Expressionsanstieg von Nestin (2,1fach), GFAP (5,7fach), S100 $\beta$  (1,8fach), Oct4 (6,3fach), SOX2 (37,8fach), c-myc (1,6fach) und klf4 (6,5fach). Wie andere Gruppen kürzlich zeigten, führt die Überexpression von Oct4, SOX2, c-myc und klf4 zur Transformation von adulten Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (*iPS cells*). Man kann daher annehmen, dass die A-KMSZ und die von ihnen abstammenden SD-KMSZ, ähnlich wie MAP-, MIAMI- und VSEL-Zellen, Abkömmlinge einer Fraktion pluripotenter Stammzellen innerhalb des Knochenmarks sind und aus diesem Grund die genannten Pluripotenz- und NSZ-Marker aufweisen. Die Genese der SD-KMSZ könnte möglicherweise durch eine epigenetische Reprogrammierung ausgelöst werden, die durch den Serumentzug in Gang gesetzt wird. Der in dieser Arbeit beschriebene Expressionsanstieg einiger für die Pluripotenz von Stammzellen wichtiger Schlüsselgene ist ein wichtiger Beleg für eine solche Reprogrammierung. Möglicherweise stellt diese Reprogrammierung eine Strategie der Zellen dar, trotz der fehlenden Wachstumsfaktoren weiter zu proliferieren, um eventuell unter dem erneuten Einfluss von Faktoren wieder in spezialisierte Zellen auszudifferenzieren. Der komplette Entzug des Serums repräsentiert somit möglicherweise eine einfache, aber effiziente Möglichkeit, um pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark zu selektieren und *in vitro* anzureichern. Dieses Vorgehen könnte für zukünftige Transplantationsstrategien mit KMSZ von großer Bedeutung sein.

Im Kontext eigener Transplantationsstudien im Tiermodell wurde für diese Arbeit *in vitro* die Langzeitstabilität einer Bromdesoxyuridin (BrdU)-Markierung an KMSZ untersucht. Es wurde gezeigt, dass es zur erwartungsgemäßen Fragmentierung des BrdU-Signals in Folge der Chromatidenaufteilung während des Zellzyklusses kommt. Darüber hinaus konnte erstmalig demonstriert werden, dass auch eine Ausschleusung der BrdU-Nukleotide aus dem Kern ins Zytoplasma stattfindet. Im zeitlichen Verlauf der Studie ließ sich in einer Vielzahl von KMSZ BrdU im Zytoplasma nachweisen. Auf welchen Mechanismen dieser Effekt beruht, ist nicht bekannt. Es ist zu vermuten, dass es sich um DNS-Reparaturprozesse handelt, die zur Entfernung der körperfremden Nukleotide führen.

Zusammenfassend haben die Markierungsergebnisse gezeigt, dass BrdU nicht geeignet ist, um *in vitro*-markierte KMSZ 4 Wochen nach Transplantation im Empfängerorganismus wiederzufinden. Eine Untersuchung der Differenzierung transplanteder SD-KMSZ *in vivo* erfordert somit den Einsatz anderer Markierungstechniken bzw. die Kombination mit diesen.

## SUMMARY

The bone marrow represents an easily accessible source for adult stem cells suitable for various cell-based therapies. A few studies in recent years suggested the existence of pluripotent stem cells within bone marrow stem cells (BMSC), expressing marker proteins of both embryonic and tissue committed stem cells. These subpopulations were referred to as MAPC, MIAMI and VSEL-cells.

Here, the effects of a complete removal of serum to a subpopulation of preexisting, small nestin-positive BMSC (termed as "A-BMSC") from the rat were investigated *in vitro*. It was demonstrated that a serum deprivation of 3 days results in the proliferation of the A-BMSC and is accompanied by changes in both morphology and gene expression of these cells. The daughter cells of the A-BMSC were termed "serum deprivation-induced BMSC" (SD-BMSC). The SD-BMSC possessed round or bipolar cell bodies, typical for neural stem cells (NSC). Furthermore, the SD-BMSC were nestin-positive and co-expressed both GFAP (92 %) and S100 $\beta$  (91 %). Interestingly, such a co-expression of nestin and GFAP is also detectable in neural stem cells of the hippocampus and the subventricular zone. Moreover, the SD-BMSC expressed the pluripotency genes Oct4 and SOX2. By performing qRT-PCR it was shown, that the serum deprivation induced an up-regulation of the amount of mRNA related to the amount of mRNA under basal culture conditions: nestin (2,1fold), GFAP (5,7fold), S100 $\beta$  (1,8fold), Oct4 (6,3fold), SOX2 (37,8fold), c-myc (1,6fold) und klf4 (6,5fold).

As other groups recently demonstrated that an overexpression of Oct4, SOX2, c-myc and klf4 results in the transformation of adult fibroblast into induced pluripotent stem cells (iPS cells), it can be hypothesized, that A-BMSC and SD-BMSC, like MAPC, MIAMI and VSEL-cells represent derivatives from a single pluripotent stem cell fraction within BMSC, exhibiting characteristics of embryonic and tissue committed stem cells. The generation of SD-BMSC in consequence of the serum deprivation could be the result of an epigenetic reprogramming, which is reflected by the up-regulation of several key genes responsible for the pluripotency of stem cells. Potentially, such a reprogramming represents a strategy of the cell, to survive and proliferate during periods of growth factor depletion and presumably to differentiate again under appropriate conditions. The complete removal of serum might offer a simple way to specifically enrich this fraction of pluripotent embryonic like stem cells in BMSC cultures. This procedure could be of high impact for future transplantation strategies employing BMSC.

In the context of own transplantation studies *in vivo*, the long-term stability of a bromodeoxyuridine (BrdU)-label in BMSC was investigated *in vitro*. It was demonstrated that the BrdU-signal becomes fragmented as expected from the randomly distribution of the chromatides during the cell cycle. Moreover, it was shown for the first time that BrdU is transferred from the nucleus to the cytosol. In the time course of the study the BrdU could be detected by an anti-BrdU specific antibody in the cytosols of numerous BMSC. The molecular mechanism of this unexpected BrdU transfer to the cytosol has still to be investigated, but it is likely that DNA repair mechanisms are mainly involved in this phenomenon.

In summary, the results of the label-study revealed that BrdU is not appropriate to label BMSC *in vitro* with the objective to recover them in a recipient 4 weeks after transplantation. To investigate the fate of transplanted SD-BMSC *in vivo* requires the use of other labeling techniques or combinations thereof, respectively.