

## **IM REIFEN GRAAF´SCHEN FOLLIKEL BEFINDEN SICH MULTIPOTENTE STAMMZELLEN**

Kossowska-Tomaszczuk K.1), Zhang H.1,2), Scherberich A.2), Martin I.2),  
De Geyter Ch.1,2)

- 1) Frauenspital, Universitätsspital Basel
- 2) Department Biomedicine, Universitätsspital Basel

Einleitung: Neben der Eizelle befinden sich im reifen Graaf´schen Follikel luteinisierte Granulosazellen. Letztere werden als endgültig differenziert betrachtet, u.a. da sie im Laborversuch nicht länger als wenige Tagen kultiviert werden können. Im Rahmen dieser Studie gelang zum ersten Mal der Nachweis, dass es in reifen Graaf´schen Follikeln multipotente Stammzellen gibt.

Material und Methoden: Luteinisierte Granulosazellen wurden im Rahmen von Behandlungen mit der in-vitro Fertilisation oder der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion mittels ultraschall-kontrollierter, transvaginaler Follikelpunktion gewonnen. Sie wurden anschliessend mittels Durchflusszytometrie basierend auf dem Vorhandensein eines FSH-Rezeptors von beigemischten Zellen getrennt und in zwei verschiedenen Nährflüssigkeiten, von der eine mit dem Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF) angereichert wurde, kultiviert.

Ergebnisse: Während die Granulosazellen ohne LIF-Zusatz in der Nährflüssigkeit nach circa 10 Tagen apoptotisch wurden, ermöglichte die Zugabe von LIF die Kultur im Medium für bis zu drei Monate. Während dieser Zeit verloren die Granulosazellen nach und nach ihre üblichen Charakteristika, wie den FSH-Rezeptor und das Enzym Aromatase. Stattdessen entwickelten die Zellen typische Merkmale von multipotenten Stammzellen, wie die Marker CD29, CD44, CD90, CD105, CD117 und CD166 an der Zelloberfläche. Die Zellen exprimierten auch OCT-4, ein wichtiges Merkmal multipotenter Stammzellen, jedoch nicht stellar, vasa und nanog, Merkmale von Stammzellen aus der Keimbahn. Ein weiterer Beweis für das Vorhandensein multipotenter Stammzelllinien im Ovarialfollikel wurde durch die Transformation dieser Zellen in Osteoblasten, Chondrozyten und Nervenzellen, sowohl in vitro durch die Übertragung der Zellen in das jeweils geeignete Medium, als auch in vivo durch die Transplantation auf eine immun-inkompetente Maus erbracht.

Schlussfolgerung: Zum ersten Mal gelang der Nachweis dass sich im Follikel reifer Graaf´scher Follikel multipotente Stammzellen befinden. Diese Entdeckung hat das Potential, nicht nur die bisherigen Konzepte zur Rekrutierung neuer Follikel zu beeinflussen, sondern trägt auch zum besseren Verständnis der Pathogenese der ovariellen Endometriose und des Ovarialkarzinoms bei.

## **MATURE OVARIAN FOLLICLES CONTAIN A SUBPOPULATION OF STEM CELLS.**

Kossowska-Tomaszczuk K.1), Zhang H.1,2), Scherberich A.2), Martin I.2),  
De Geyter Ch.1,2)

1) Woman's Hospital, University Hospital of Basel

2) Department BioMedicine, University Hospital of Basel

Introduction: Luteinizing granulosa cells (GCs) reside in mature Graafian follicles and are considered to be terminally differentiated destined to undergo apoptosis within several days. We now demonstrate that a subpopulation of cells collected from Graafian follicles possess all characteristics of multipotent stem cells.

Material and Methods: Luteinizing GCs, collected from infertile women treated with assisted reproduction, were identified and sorted with a fluorescence-activated cell sorter (FACS) based upon the presence of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR). These sorted cells were then cultured in a culture medium either supplemented with the leukemia inhibiting factor (LIF) or not.

Results: Luteinizing GCs cultured in the absence of LIF invariably became apoptotic after approximately 10 days. However, in the presence of LIF luteinizing GCs remained viable for up to three months and obtained many of the characteristics of multipotent stem cells, as given by the expression of various surface markers such as CD29, CD44, CD90, CD105, CD117 and CD166. During prolonged culture in the presence of LIF the sorted cells progressively lost their ability to express both FSHR and aromatase. In contrast, luteinizing GCs continued to express OCT4, a marker of multipotent stem cells, but not *vasa*, *nanog* nor *stellar*, markers of the germ-stem cell line. The multipotency of these cells was then demonstrated by their differentiation into the neuronal, osteoblastic and chondrogenic lineages when incubated in various specific culture media. In addition, we were able to demonstrate that multipotent stem cells developed from luteinizing GCs in the presence of LIF grew into chondrogenic and osseous tissue after transplantation into the back of immuno-incompetent nude mice.

Conclusion: For the first time we were able to demonstrate that mature Graafian follicles contain a subpopulation of multipotent stem cells. This novel finding may have important implications for current concepts on follicular recruitment, the development of ovarian endometriosis and the pathogenesis of ovarian cancer.