

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum)

**Osteoblasten-induzierte frühe Osteogenese  
in humanen mesenchymalen Stammzellen  
durch Aktivierung des Wnt-Signalweges**

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

vorgelegt von  
**Matthias Ilmer**  
aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

- |   |  |
|---|--|
| 1. Berichterstatter:                                | Prof. Dr. Marianne Jochum                        |
| 2. Berichterstatter:                                | Prof. Dr. Magdalena Götz                         |
| Mitberichtersteller:                                | Prof. Dr. Peter Müller                           |
|   | Priv. Doz. Dr. Andreas Jung                      |
| Mitbetreuung durch den<br>promovierten Mitarbeiter: | Dr. rer. nat. Peter Neth                         |
| Dekan:  | Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,<br>FACR, FRCR |
| Tag der mündlichen Prüfung:                         | 25.06.2009                                       |

Darin besteht das Wesen der Wissenschaft.  
Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte.  
Dann sieht man nach, ob es der Fall ist  
und im allgemeinen ist es nicht der Fall.

**Sir Bertrand Russell**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>A Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>B Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>B 1 Stammzellen.....</b>	<b>3</b>
B 1.1 Allgemeine Eigenschaften .....	3
B 1.2 Embryonale Stammzellen .....	4
B 1.3 Adulte Stammzellen im postnatalen Organismus .....	5
B 1.4 Stammzellnische .....	7
<b>B 2 Osteogenese.....</b>	<b>9</b>
B 2.1 Knochen, Osteoblasten und Osteoklasten .....	9
B 2.2 Remodeling im osteogenen Modell.....	11
<b>B 3 Der Wnt-Signaltransduktionsweg .....</b>	<b>12</b>
B 3.1 Allgemeine Funktion .....	12
B 3.2 Wnt-Signaltransduktion in Stammzellen und Tumorzellen .....	14
B 3.3 Wnt-Signaltransduktion und Osteogenese .....	15
<b>C Aufgabenstellung.....</b>	<b>16</b>
<b>D Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>D 1 Materialien .....</b>	<b>18</b>
D 1.1 Geräte .....	18
D 1.2 Substanzen .....	20
D 1.2.1 Antikörper .....	20
D 1.2.2 Stock- und Pufferlösungen .....	20
D 1.2.3 Materialien für die Proteinbiochemie und Molekularbiologie .....	21
D 1.2.4 Chemikalien .....	21
D 1.2.5 Substanzen für die Molekularbiologie .....	22
D 1.2.6 Substanzen für die Proteinbiochemie .....	22
D 1.3 Fertigsysteme.....	22

D 1.4	Zellkultur .....	24
D 1.4.1	Humane mesenchymale Stammzellen .....	24
D 1.4.2	Humane Osteoblasten .....	24
D 1.4.3	Substanzen der Zellkultur .....	25
D 1.4.4	Materialien der Zellkultur .....	26
D 1.5	<i>short interfering</i> RNA-Sequenzen .....	26
D 1.6	Software zur Transkriptomanalyse .....	27
D 1.6.1	Image Scanner Software .....	27
D 1.6.2	ArrayVision .....	27
<b>D 2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>D 2.1</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>28</b>
D 2.1.1	Kultivierung, Expansion und Einfrieren von hMSC und hOB .....	28
D 2.1.2	Zellkulturmedien .....	29
D 2.1.3	Zellzahlbestimmung .....	30
<b>D 2.2</b>	<b>Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen .....</b>	<b>30</b>
D 2.2.1	Chemische Differenzierungsinduktion .....	30
D 2.2.1.1	Osteogenese .....	31
D 2.2.1.2	Adipogenese .....	31
D 2.2.1.3	Chondrogenese .....	32
D 2.2.2	Alternative Differenzierungsinduktion .....	33
D 2.2.2.1	Osteoblasten-konditioniertes Medium .....	33
D 2.2.2.2	Indirekte Kokultur .....	33
D 2.2.3	Histochemische Färbungen .....	34
D 2.2.3.1	Alizarin-Rot-Färbung .....	34
D 2.2.3.2	Oil-Red-O-Färbung .....	35
D 2.2.3.3	Toluidinblau-Färbung .....	35
D 2.2.3.4	Van Kossa-Färbung .....	36
<b>D 2.3</b>	<b>Wnt-Signaltransduktion und osteogene Differenzierung .....</b>	<b>37</b>
D 2.3.1	Induktion des Wnt-Signaltransduktionsweges .....	37
D 2.3.2	Transfektion von hMSC mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin und LRP5 .....	37
D 2.3.3	$\beta$ -Cateninbestimmung mittels Western Blot .....	38

<b>D 2.4 Nachweis spezifischer Genexpression mittels qRT-PCR und</b>	
<b>Microarray</b> .....	<b>40</b>
D 2.4.1 Quantitative RT-PCR .....	40
D 2.4.1.1 RNA-Isolierung.....	40
D 2.4.1.2 cDNA-Synthese .....	41
D 2.4.1.3 qRT-PCR mittels LightCycler .....	41
D 2.4.2 Osteogenese-Microarray .....	43
D 2.4.2.1 Versuchsdurchführung .....	43
D 2.4.2.2 Bioinformatische Versuchsauswertung.....	47
<b>D 2.5 Statistik</b> .....	<b>48</b>
<b>E Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
<b>E 1 Chemische Differenzierungsinduktion der hMSC in den</b>	
<b>Basalmedien DMEM und MSCBGM</b> .....	<b>49</b>
E 1.1 Osteogene Differenzierung .....	49
E 1.2 Adipogene Differenzierung .....	51
E 1.3 Chondrogene Differenzierung .....	53
E 1.4 Histochemische Färbung differenzierter hMSC.....	54
E 1.4.1 Van Kossa-Färbung osteogen differenzierter hMSC .....	54
E 1.4.2 Oil-Red-O-Färbung adipogen differenzierter hMSC .....	55
D 1.4.3 Toluidinblau-Färbung chondrogen differenzierter hMSC .....	56
<b>E 2 Alternative osteogene Differenzierung von hMSC</b> .....	<b>57</b>
E 2.1 Kultivierung von hMSC in konditioniertem Osteoblasten-Wachstumsmedium....	57
E 2.2 Indirekte Kokultur von hMSC und hOB .....	63
E 2.3 Microarray-Analyse von osteogen differenzierten hMSC im Vergleich zu hOB ...	67
E 2.4 Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit (Alizarin-Rot-Färbung) von hOB.....	69
<b>E 3 Der Wnt-Signaltransduktionsweg im Rahmen der osteogenen</b>	
<b>Differenzierung</b> .....	<b>71</b>
E 3.1 Einfluss der alternativen osteogenen Differenzierung auf den $\beta$ -Catenin-Level .	71
E 3.2 Einfluss von Wnt3a auf die Expression von Alkalischer Phosphatase.....	72
E 3.3 Inhibition der Wnt-Signalwegfaktoren $\beta$ -Catenin und LRP5 mittels RNAi .....	73

<b>F</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
<b>F 1</b>	<b>Einfluss der Basalmedien DMEM bzw. MSCBGM auf das chemisch induzierte Differenzierungsverhalten von hMSC.....</b>	<b>79</b>
F 1.1	Osteogene Differenzierung .....	79
F 1.2	Adipogene Differenzierung .....	81
F 1.3	Chondrogene Differenzierung .....	81
F 1.4	Resumé der vergleichenden Analyse von DMEM und MSCBGM .....	83
<b>F 2</b>	<b>Alternative Differenzierung von hMSC: Einfluss von Osteoblasten auf die Osteogenese .....</b>	<b>84</b>
F 2.1	Osteogenese-Induktion durch konditioniertes Medium (kOGM).....	84
F 2.2	Einfluss von hOB auf hMSC in der indirekten Kokultur.....	88
F 2.3	Microarray-Daten zu verschiedenen Zell- und Kultivierungsarten.....	89
F 2.4	Mineralisierungsfähigkeit von Osteoblasten .....	90
<b>F 3</b>	<b>Osteogenese und Wnt-Signaltransduktionsweg.....</b>	<b>91</b>
F 3.1	Zytosolisches $\beta$ -Catenin .....	91
F 3.2	Osteogene Marker nach Inhibition des Wnt-Weges .....	91
<b>F 4</b>	<b>Zusammenfassende Beurteilung der alternativen Differenzierung</b>	<b>96</b>
<b>G</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>97</b>
<b>H</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
	<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>107</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>110</b>

# Abkürzungsverzeichnis

## Allgemein verwendete Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase (früher osteogener Marker)
Bmi-1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (mouse)</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BMU	<i>Basic multicellular unit</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSP-2	<i>Bone Sialoprotein 2</i>
CD	Chemisches Differenzierungsverfahren
CD29	<i>cluster of differentiation 29</i>
Cbfa1	<i>Core binding factor <math>\alpha</math> 1</i> (entspricht Runx2)
CTSK	Cathepsin K
DCN	Decorin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoribonucleic Acid (=DNS)
ESC	Embryonale Stammzelle
FBS	Fötale bovines Serum (Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR ( $\alpha/\beta$ )	Glukokortikoidrezeptor ( $\alpha/\beta$ )
GTPase	Guanosintriphosphatase
HBM	<i>high bone mass</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
hOB	Humane Osteoblasten
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IZM	Innere Zellmasse
kOGM	Konditioniertes OGM
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LR	Leptin-Rezeptor
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MSC	Mesenchymale Stammzelle (s.a. hMSC)
MSCBGM	<i>Mesenchymal stem cell basal growth medium</i> (Lonza)
NF-AT	nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten
NSAID	<i>non-steroidal antiinflammatory drugs</i>
OCN	Osteocalcin
OD	optische Dichte
OGM	Osteoblastenwachstumsmedium ( <i>growth medium</i> )
OPPG	<i>osteoporosis pseudoglioma syndrome</i>
p21 = CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A</i> (Chromosom 6 Genlocus p21.2)

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator activated receptor - <math>\gamma</math></i>
qRT-PCR	Quantitative reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Runx2	<i>Mammalian runt domain protein 2</i> (entspricht Cbfa1)
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial derived factor</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

### **Abkürzungen für Komponenten des Wnt-Signalweges**

APC	Adenomatosis Polyposis Coli
CK1	Casein Kinase
DKK	Dickkopf
Dsh	<i>dishevelled</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
GSK3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase
LiCl	Lithiumchlorid
LRP	<i>Low-density lipoprotein-receptor related protein</i>
PCP	Planarer Zellpolaritätsweg (Wnt-Signalweg)
sFRP	<i>secreted Frizzled Receptor Protein</i>
Tcf/Lef	<i>T-Cell factor/lymphoid enhancer binding factor</i>
Wnt	<i>Wingless</i>

### **Abkürzungen für Komponenten des Microarray**

CALCR	Calcitonin Rezeptor
COL	Collagen
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
DMP	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
IBSP	<i>Integrin-binding sialoprotein</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
ITGA	Integrin, alpha
ITGAM	Integrin, alpha M
MMP	Matrix metalloproteinase
NFKB	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
SERPINH	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade H</i> (Heat shock protein 47)
SMAD	<i>SMAD family member</i>
TUFT	Tuftelin
TWIST	Twist homolog
VDR	Vitamin D Rezeptor

## A Zusammenfassung

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) werden im Knochenmark gebildet und besitzen klassische Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierungsfähigkeit, wobei letztere teilweise auch keimblattübergreifend erfolgen kann. Die Rekrutierung dieser Zellen erfolgt nach gängiger Lehrmeinung aus der sog. Stammzellnische. Dabei ist jedoch noch weitgehend unklar, welche Zellarten *in vivo* bei diesem Prozess und der nachfolgenden Differenzierung involviert sind und welchen Signaltransduktionswegen eine tragende Rolle zugesprochen werden kann.

Ein wesentliches Ziel dieser Doktorarbeit war es daher zunächst, *in vitro* die Auswirkung verschiedener Kulturmedien auf das Differenzierungsverhalten von hMSC zu evaluieren. So wurde unter Einsatz von artifiziellen, chemischen Differenzierungsverfahren (CD) die Differenzierung in die adipogene, chondrogene und osteoblastäre Linie über einen Zeitraum von 28 Tagen in zwei unterschiedlichen Basalmedien (MSCBGM; DMEM) untersucht. Dabei zeigten sich nur geringe Unterschiede im Expressionsverhalten der entsprechenden Markergene (Alkalische Phosphatase (AP) für die frühe Osteogenese, PPAR- $\gamma$  für die Adipogenese und Aggrecan für die Chondrogenese), was darauf hinweist, dass die verwendeten Basalmedien nur einen geringen Einfluss auf die Differenzierbarkeit von hMSC ausüben.

In einem mehr der *in vivo*-Situation angepassten Versuchsaufbau wurden anschließend zur detaillierten Untersuchung der osteogenen Differenzierung hMSC über 4, 7 und 14 Tage in durch humane Osteoblasten (hOB) konditioniertem Medium (kOGM) bzw. in indirekter Kokultur mit hOB kultiviert. Expressionsanalysen detektierten einen Anstieg charakteristischer osteogener Marker (AP, Bone Sialoprotein 2 (BSP-2), Leptin-Rezeptor (LR), Cathepsin K (CTSK) sowie Decorin (DCN)) zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

Schließlich wurden mittels der Microarray-Technologie hMSC, hOB, auf herkömmlichem chemischem Wege osteogen differenzierte hMSC (CD) sowie mit kOGM kultivierte hMSC auf ein breites Spektrum an osteogenen Markern untersucht. Die Auswertung ergab, dass mit kOGM kultivierte hMSC und hOB die größte transkriptionelle Ähnlichkeit aufwiesen.

Aufgrund der Tatsache, dass der Wnt-Weg entscheidend an Differenzierung, Proliferation und Apoptose in den verschiedensten Zellarten beteiligt ist, sollte in einem weiteren Teilprojekt untersucht werden, ob bzw. inwiefern dieser Signalweg auch bei der Differenzierung von hMSC durch hOB-konditioniertes Medium involviert ist.

Hierzu wurden unter Verwendung der siRNA-Technologie zum einen  $\beta$ -Catenin und zum anderen LRP5, die zwei wesentliche Mediatoren im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg darstellen, herabreguliert. In der anschließenden Differenzierung durch chemische Zusätze (CD) bzw. durch den Einsatz von kOGM zeigte sich, dass die mit kOGM kultivierten hMSC ein deutlich anderes Expressionsprofil bezüglich der evaluierten osteogenen Marker im Vergleich zu CD bzw. Kontrollzellen aufwiesen, was auf grundlegende Unterschiede hinsichtlich der Differenzierungsmechanismen in CD- bzw. kOGM-behandelten hMSC hinweist.

Des Weiteren wurden zur Analyse des  $\beta$ -Catenin-Status semiquantitative Western Blot-Experimente mit hMSC-Lysaten durchgeführt, die mittels der verschiedenen Differenzierungsansätze vorbehandelt worden waren. Dabei ließ sich eine Erhöhung von  $\beta$ -Catenin (Tag 3) feststellen, nachdem hMSC in kOGM kultiviert worden waren.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit erstmals nachgewiesen werden, dass verschiedene Kulturmedien und in noch größerem Maße die Anwesenheit von differenzierten Zellen das Differenzierungsverhalten von humanen mesenchymalen Stammzellen nachhaltig beeinflussen, wobei u.a. dem Wnt-Signalweg eine tragende Rolle zuzusprechen ist.

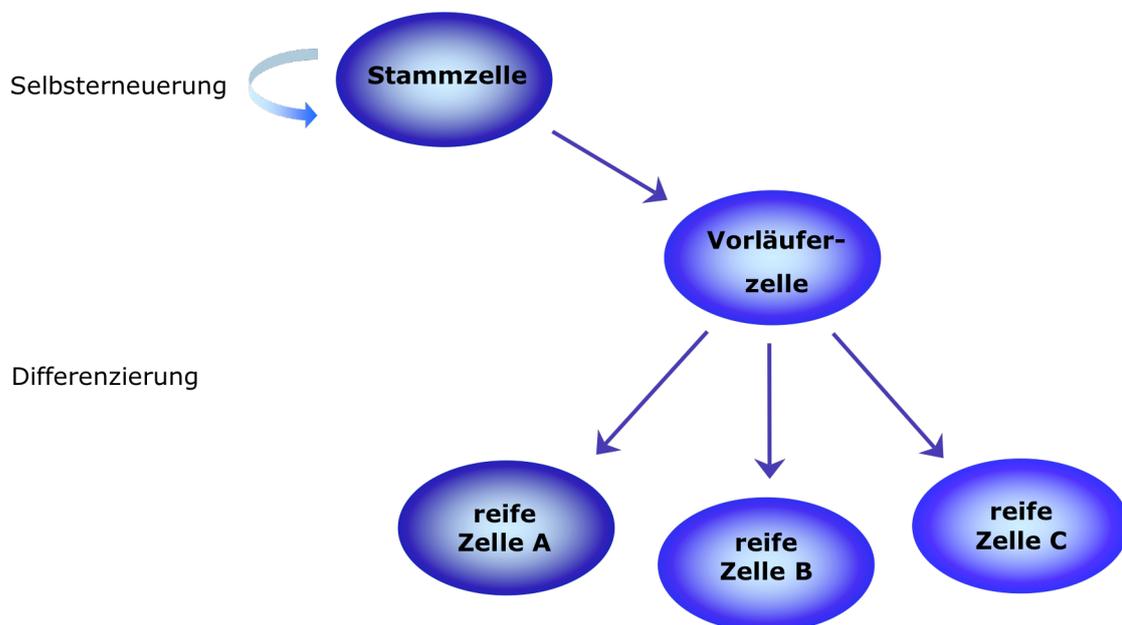
Im Hinblick auf die zukünftige therapeutische Nutzung adulter Stammzellen ist es unumgänglich, die der Differenzierung zugrunde liegenden Regulationsmechanismen besser zu verstehen, um diese Zellpopulation zur Geweberegeneration entsprechend in der Klinik anwenden zu können. Der hier evaluierte Ansatz könnte durchaus dazu beitragen, *in vitro*-Differenzierungen in Zukunft ohne die Verwendung von artifiziellen Zusätzen zu ermöglichen und damit eine natürlichere Zellreifung und erfolgreicherer Einsatz der für die Organregeneration zu retransplantierenden Gewebe zu gewährleisten.

## B Einleitung

### B 1 Stammzellen

#### B 1.1 Allgemeine Eigenschaften

Stammzellen zeichnen sich durch zwei zentrale Eigenschaften aus, durch die sie sich von anderen Zelltypen abgrenzen. Dazu gehören zum einen die Anlage zur symmetrischen Zellteilung („Selbsterneuerung“) und zum anderen die Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung („Differenzierung“) (Abb. B 1). „Selbsterneuerung“ bezeichnet dabei das Vermögen dieser Zellen, sich unter Erhalt des Stammzellcharakters zu teilen. Bei der asymmetrischen Zellteilung entstehen hingegen zwei Zellen mit unterschiedlichem Phänotyp, von denen eine die Eigenschaften der Mutterzelle beibehält, während die zweite Tochterzelle in eine Vorläuferzelle (Progenitorzelle) differenziert, wodurch eine Entwicklung in Richtung eines bestimmten Zelltyps festgelegt wird (Knoblich et al., 2001).



**Abb. B 1: Stammzeleigenschaften.** Dargestellt ist im oberen Teil die Selbsterneuerung, im unteren Teil die Differenzierung über Progenitor-/Vorläuferzellen in ausdifferenzierte, reife Zellen unterschiedlicher Art (A, B, C).

Obwohl diese beiden Eigenschaften grundlegend sind und Stammzellen damit hinreichend charakterisiert werden können, kann man ihnen weitere Attribute zuordnen. So kommen Stammzellen extrem selten vor. Man findet z. B. im Knochenmark nur eine Stammzelle unter 10.000 – 100.000 Zellen (Boggs et al., 1982).

Wenngleich Stammzellen beim Erwachsenen hauptsächlich im Knochenmark auftreten, sind sie gleichwohl auch in vielen anderen Geweben zu finden. Dort können sie in einem Zustand „relativer Ruhe“ (*relative Quiescence*) verharren, bis sie aktiviert werden (Cheng et al., 2000).

Des Weiteren ist für hämatopoetische Stammzellen gezeigt worden, dass aus einer einzelnen Stammzelle ein komplettes Zellsystem mit den unterschiedlichen Differenzierungsstufen rekonstituiert werden kann. Prominentes Beispiel dafür ist die Entwicklung sämtlicher blutbildender Zellen aus einer einzigen hämatopoetischen Stammzelle (Osawa et al., 1996), was insbesondere bei Knochenmarktransplantationen oder der isolierten Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen vontragender Rolle ist (Ogawa et al., 1993; Arai et al., 2003; Copelan et al., 2006).

### **B 1.2      Embryonale Stammzellen**

Embryonale Stammzellen unterscheiden sich von adulten Stammzellen (siehe B 1.3) vornehmlich durch ihr höheres Differenzierungspotential (Potenz).

Nach der Fusion von Spermium und Eizelle entsteht die Zygote. Diese beginnt sich zu teilen, woraus sich nach ca. 4 Tagen die Blastozyste entwickelt (Biswas et al., 2007). Bis zum 8-Zell-Stadium (Morula) besitzt der Zellverband Totipotenz, d.h. aus jeder Zelle kann ein neues Individuum entstehen. Die Blastozyste besteht aus der inneren Zellmasse (IZM) und dem extraembryonalen Gewebe. Zellen der IZM können *in vitro* kultiviert werden. Man bezeichnet diese als pluripotente embryonale Stammzellen (ESC). Pluripotenz bedeutet, dass diese Zellen Ursprung für alle Zellen der meso-, ekto- und endodermalen Keimblätter sowie der Keimzellen sein können. Während der Entwicklung wird das Differenzierungspotential der Zellen zunehmend eingeschränkt. Es entstehen sog. gewebe-spezifische multipotente Stammzellen (Eckfeldt et al., 2005).

Die erste humane embryonale Stammzelllinie konnte 1998 von Thomson et al. etabliert werden. Da ESC leicht spontan zu differenzieren beginnen, werden sie *in vitro* auf einer sog. „feeder layer“, also einer Zellschicht, die die Versorgung übernimmt, gezüchtet. Sie besteht meist aus bestrahlten (bis vor kurzem oft tierischen) Fibroblasten. Damit bleibt der undifferenzierte Status der ESC erhalten. Derzeit werden in diesem Zusammenhang

auch die Regulationsmechanismen intensiv untersucht, die humane ESC in ihrem undifferenzierten Zustand fixieren können. Dazu gehören neben den Signalwegen von bFGF und TGF- $\beta$ /Activin/Nodal auch die Transkriptionsfaktoren Oct 3/4, Nanog (benannt nach „Tir na n’Og“, dem keltischen Land der ewig Jungen) und Sox-2, die im undifferenzierten Zustand stark exprimiert sind und während der Differenzierung herabreguliert werden (Avery et al., 2006; Bilodeau et al., 2006). Bei der Induktion der Differenzierung nimmt man an, dass der BMP (*bone morphogenic protein*)-Weg und möglicherweise auch der Wnt-Weg entscheidenden Einfluss ausüben (Nostro et al., 2008).

Durch ihre pluripotenten Eigenschaften offerieren embryonale Stammzellen ein hohes Potential an therapeutischen Einsatzmöglichkeiten, beispielsweise in der regenerativen Medizin oder in der zellbasierten Gentherapie (Mountford et al., 2008). So setzt man große Hoffnungen darauf, durch therapeutisches Klonen Gewebe zu züchten, welches dann dem Empfänger ohne weitere Immunsuppression transplantiert werden kann (Chidgey et al., 2008). Vor allem als Ersatz von Insulin-produzierenden B-Zellen des Pankreas bei Diabetes mellitus Typ I oder von untergegangenen Nervenzellen könnten ESC von großem Nutzen sein. Abgesehen von ethischen Bedenken birgt die Verwendung von ESC aber auch große Gefahren. Da die genauen Regulationsmechanismen im Rahmen von Proliferations- und Differenzierungsprozessen der ESC bis heute nicht vollständig verstanden sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Nebenwirkungen der Therapie, beispielsweise eine Entartung der Zellen in sog. Teratome, auftreten (Prokhorova et al., 2008).

### **B 1.3      Adulte Stammzellen im postnatalen Organismus**

Dass auch im adulten Körper Stammzellen existieren, ist schon seit langer Zeit bekannt. Prinzipiell unterscheidet man adulte Stammzellen nach ihrem Vorkommen im Organismus. Dazu gehören gewebsständige Stammzellen, die außerhalb des Knochenmarks in Nischen bestimmter Organsysteme anzutreffen sind (z. B. aus der Haut) und Stammzellen der Spermio- bzw. Oogenese (Oktem et al., 2008), sowie vor allem Stammzellen aus dem Knochenmark der hämatopoetischen (CD34<sup>+</sup>) (Ratajczak et al., 2008) und der mesenchymalen Reihe (CD34<sup>-</sup>) (Tare et al., 2008).

Zu den gewebespezifischen Stammzellen zählen die intestinalen epithelialen Stammzellen. Diese sind in den Krypten der Dick- und Dünndarmschleimhaut ansässig. Sie wandern innerhalb von 5 – 7 Tagen an die Spitze der Villi und differenzieren dabei. Aus einer solchen Zelle können Enterozyten, schleimproduzierende Goblet-Zellen, Peptidhormon

sezernierende enteroendokrine Zellen, M-Zellen und Paneth-Zellen entstehen (Marshman et al., 2002).

Erst seit kürzerem ist bekannt, dass Stammzellen in bestimmten gewebespezifischen Stammzellnischen (siehe B 3) auftreten. Wichtige Vertreter dieser Art findet man zwischen Hornhaut und Lederhaut des Auges (Limbus), bei Haarfollikeln im sog. „bulge“ und in der Haut (Lavker et al., 2000 und Alonso et al., 2003). Überraschenderweise konnten auch in verschiedenen Hirnregionen (Gyrus dentatus, Hippocampus, olfaktorische Rinde) neuronale Vorläuferzellen identifiziert werden (Taupin et al., 2002).

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind die am besten charakterisierten Stammzellen. Zur Kontrolle der symmetrischen Erneuerung tragen verschiedene Signalwege bei. Darunter befinden sich z. B. der Notch1-Signalweg mit den Liganden Delta und Jagged, Hoxb4 (Homeobox Gene Family) und der Wnt-Signalweg (Eckfeldt et al., 2005). Die Erhaltung des undifferenzierten Zustandes regulieren der transkriptionelle Repressor Bmi1 und der Zellzyklusinhibitor p21. Bei der Differenzierung werden, je nach Linie, verschiedene Gene induziert. Aus HSC können sich sowohl lymphoide Zelltypen (B-/T-Zellen, NK-Zellen) als auch Zellen der myeloischen Reihe (Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten) entwickeln.

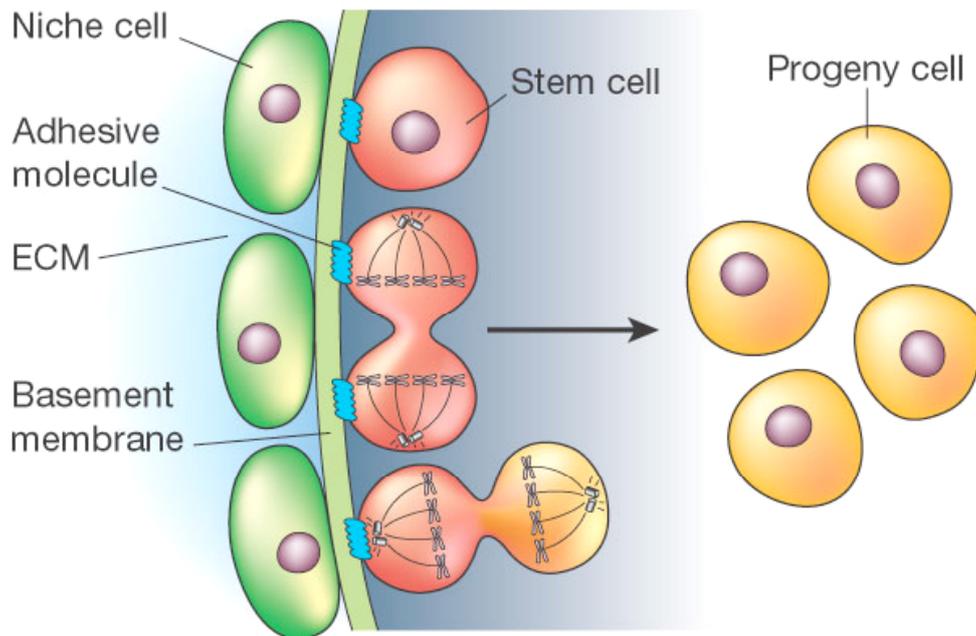
HSC sind bislang die einzigen Stammzellen, die seit Jahren routinemäßig als zellbasiertes Therapeutikum zum Einsatz kommen. Beispielsweise können prognostisch ungünstige myelodysplastische Syndrome mit einer Knochenmarktransplantation therapiert werden (Warlick et al., 2008). Zuvor müssen allerdings sämtliche krankhaft veränderte Zellen und auch nahezu alle blutbildenden Zellen durch Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung beseitigt werden (Myeloablation). Nach der Transplantation neuer hämatopoetischer Stammzellen regeneriert sich die Hämatopoese bzw. das Blutsystem innerhalb von 10 – 14 Tagen. Man unterscheidet dabei autologe, also vom Patienten zuvor isolierte Stammzellen, von allogener Transplantation, die eine Fremdspende unter Beachtung der HLA-Antigene beinhaltet (Copelan et al., 2006).

Für die hier vorliegende Arbeit sind mesenchymale Stammzellen (MSC), die ebenfalls im Knochenmark gebildet werden, von besonderem Interesse. Einst von Friedenstein et al. (1976) als adhärierende, fibroblastenähnliche Zellen aus dem Knochenmark beschrieben, konnte nach und nach gezeigt werden, dass diese innerhalb des mesodermalen Keimblattes in Knochen-, Knorpel- und Fettzellen differenzieren können (Friedenstein et al., 1987). Jüngere Veröffentlichungen weisen immer stärker darauf hin, dass außerdem keimblattübergreifende Trans-Differenzierungen in Hepatozyten (Ong et al., 2006), neuronale Vorläuferzellen (Deng et al., 2006) und Kardiomyozyten (Yoon et al., 2005) möglich scheinen.

Deshalb werden große Erwartungen in den therapeutischen Einsatz von hMSC gesetzt. Nicht nur ihre Vielseitigkeit, sondern auch die relativ unkomplizierte Isolierung ist von großem Vorteil. Um eine sichere Nutzung gewährleisten zu können, müssen jedoch zunächst die molekularen Mechanismen insbesondere der Differenzierungsfähigkeit verstanden werden. Aus klinischer Sicht ist in diesem Kontext vor allem die Beteiligung an der Knochen- und Knorpelregeneration von vorrangiger Bedeutung.

## B 1.4 Stammzellnische

Embryonale Stammzellen können *ex vivo* quasi unendlich lange kultiviert werden, ohne dass sich ihre Differenzierungskapazität ändert. Werden dieselben Zellen *in vivo* in ein Mausmodell injiziert, so entwickeln sich sog. Teratome (Fuchs et al., 2004). Daraus folgt, dass es gewisse Mikroumgebungen geben muss, in denen Stammzellen in ihrem undifferenzierten Stadium erhalten werden können. Diese Räume nennt man Stammzellnischen (Abb. B 2).



**Abb. B 2: Modell der Stammzellnische.** Dargestellt in grün sind die sog. Nischenzellen (sie entsprechen in der Promotionsarbeit den Osteoblasten), sowie Stammzellen in rot. Orange gekennzeichnet sind Vorläuferzellen. Stammzellen haften in oder an der Nische. Wiedergegeben sind drei mögliche Funktionen: Proliferationsstillstand („*relative quiescence*“) im oberen Teil, symmetrische Teilung in der Mitte (es entstehen zwei Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften; diese verbleiben in der Nische) und asymmetrische Teilung im unteren und rechten Abschnitt der Abbildung (eine Tochterzelle verbleibt als Stammzelle in der Nische, die andere differenziert und wandert als Progenitorzelle aus der Nische aus). (modifiziert nach Spradling *et al.*, 2001)

Stammzellnischen zeichnen sich durch drei wesentliche Grundcharakteristika aus. Zum einen können sie ohne ansässige Stammzellen existieren, zum anderen können sie auch die Stammzellaktivität exogener Zellen unterstützen. Darüber hinaus können diese exogenen Zellen vorübergehend die Nische füllen und auch deren Funktionen übernehmen (Spradling et al., 2001).

Die Anzahl der Stammzellen innerhalb einer Nische wird strikt überwacht und geregelt. Dabei besteht ein Zell-Zell-Kontakt zwischen heterogenen Zellarten. Dies führt zur Erhaltung des Stammzellstatus und der relativen Ruhe (*relative quiescence*), einem Zustand, in dem zeitweise keine Proliferation auftritt. Faktoren, die von der Nische produziert werden, enthalten sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Signale, die die Zellzahl und Funktion der Stammzellen genau regulieren (Adams et al., 2006). Dabei spielen nicht nur die Nischenzellen eine Rolle, sondern vielmehr üben Stammzellen und Nischenzellen gegenseitig Einfluss aufeinander aus.

Eine Aktivierung der Stammzellen innerhalb der Nische kann auf zwei Arten erfolgen. Durch langsame Zellteilung füllt sich die Nische nach und nach, wodurch einige Zellen aus der Nische gedrängt werden. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass ein exogener Reiz die Nische stimuliert, z. B. nach einer Verletzung oder im Rahmen des Knochenremodelings (s. Abschnitt B 2.2). Das Verhalten der Zellen wird zwar durch ihr endogenes Programm vorgegeben, aber gleichzeitig durch exogene Faktoren und durch die Nische maßgeblich beeinflusst (Fuchs et al., 2004).

Sehr gut charakterisiert sind bereits Nischen für endodermale Zellen (Dünndarmkrypten) und epitheliale Stammzellen der Haut. Bei hämatopoetischen Stammzellen scheinen sowohl Osteoblasten als auch der Wnt-Signalweg in der Aufrechterhaltung der Stammzellnische durch Selbsterneuerung wichtige Rollen innezuhaben (Calvi et al., 2003; Rattis et al., 2004). Diese speziellen Osteoblasten zeichnen sich durch eine sog. spindelförmige Morphologie aus und exprimieren N-Cadherin. Sie sind auf dem Endosteum zu finden und erhalten die Stammzeleigenschaften der HSC (Zhang et al., 2003). Im Gegensatz dazu können sich HSC in der vaskulären Nische differenzieren. Die Rekrutierung erfolgt offenbar als Antwort auf eine Verletzung oder ähnliche Stimuli (Wilson et al., 2006).

## **B 2        Osteogenese**

### **B 2.1      Knochen, Osteoblasten und Osteoklasten**

Knochen besteht zu 65 % aus anorganischen Bestandteilen und zu 35 % aus organischer Matrix. Zum organischen Teil des Knochens zählt man die knochenformenden Zellen wie Osteoprogenitoren, Osteoblasten und Osteozyten, welche das Osteoid (unmineralisierter Knochen) mineralisieren. Hauptbestandteil der mineralisierten Anteile ist Kalziumhydroxylapatit ( $10\text{Ca}:6(\text{PO}_4):(\text{OH})_2$ ), das dem Knochen seine Stabilität verleiht (Robbins and Cotran, „Pathologic Basis of Disease“, 7<sup>th</sup> Edition, 2005).

Von besonderem Interesse ist der organische Anteil des Knochens. Zum einen, weil er aus verschiedenen Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstufen von Zellen der osteogenen Reihe besteht, die sich gegenseitig beeinflussen. Zum anderen, weil er Nischenzellen für verschiedene Bereiche enthält.

Aus multipotenten MSC bilden sich im Rahmen der osteogenen Differenzierung Osteoprogenitoren. Durch verschiedene Stimuli, beispielsweise durch Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie, werden sie zur weiteren Differenzierung angeregt. Stains & Civitelli (2005) konnten zeigen, dass bei der Differenzierung interzelluläre Informationskanäle (*gap junctions*) eine bedeutende Rolle spielen. Steigt die Anzahl von Connexin 43 und 45 (hauptsächliche Bestandteile der *gap junctions* in Osteoblasten), geht das mit einer gesteigerten Differenzierung einher.

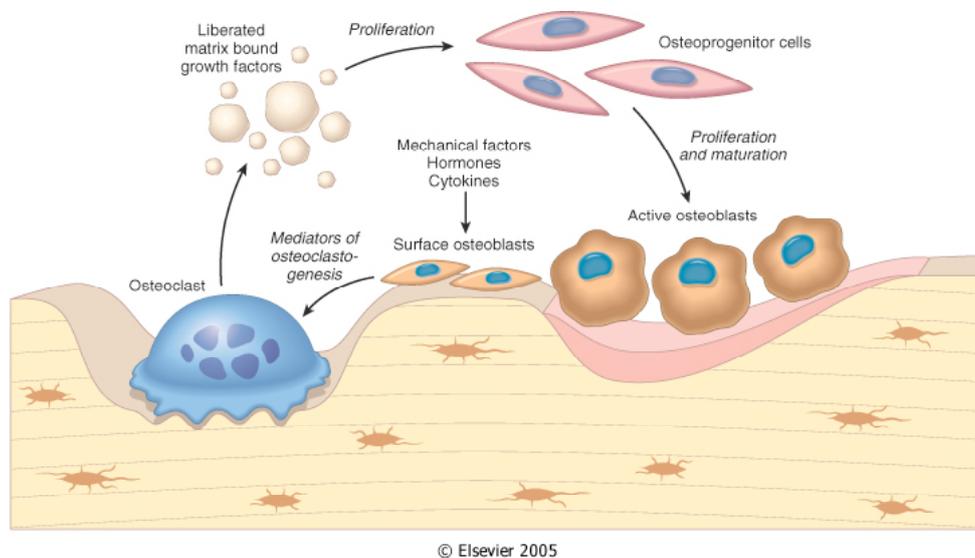
Osteoblasten sind für Wachstum, Wundregeneration und Umbauvorgänge von zentraler Bedeutung. Sie sind auf sämtlichen knöchernen Oberflächen lokalisiert und zuständig für die Prozessierung von Proteinen für die Bildung osteogener Matrix. Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren sie verschiedene Rezeptoren (z. B. für Parathormon (PTH), Vitamin D, Östrogen) und haben eine durchschnittliche Lebensdauer von etwa drei Monaten. Danach sterben sie entweder durch programmierten Zelltod (Apoptose) oder differenzieren zu Osteozyten (Christakos et al., 2003; Manolagas et al., 1995).

Osteozyten kommen schließlich 10-fach häufiger im Knochen vor als Osteoblasten. Sie entstehen, wenn Osteoblasten sich in der sie umgebenden osteogenen Matrix einmauern. Durch *Canaliculi* und *gap junctions* stehen sie dabei untereinander in Verbindung.

Osteoklasten stammen im Gegensatz zu den bisher aufgezählten Zellarten von hämatopoetischen Vorläuferzellen ab und werden den Makrophagen zugeordnet. Die Aufgabe der Osteoklasten besteht in der Resorption von Knochen. Für die Differenzierung und Reifung

sind verschiedene Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) notwendig (Manolagas et al., 1995). Reife Osteoklasten fusionieren zu Synzytien und besitzen dadurch ca. 6 – 12 Nuklei. Ihr Lebensalter ist auf ca. zwei Wochen beschränkt (Boyle et al., 2003).

Wie Abb. B 3 zeigt, besteht ein komplexes Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Zellarten. Dabei werden Faktoren ausgeschüttet, die Wachstum und Differenzierung steuern. Osteoblasten und Stammzellen des Knochenmarks regulieren z. T. das Verhalten von Osteoklasten über die oben genannten Hormone und Wachstumsfaktoren. Wichtig ist, dass für einen intakten Knochenmetabolismus diese parakrinen Mechanismen aufrecht erhalten bleiben (Robbins and Cotran, „Pathologic Basis of Disease“, 7<sup>th</sup> Edition, 2005).

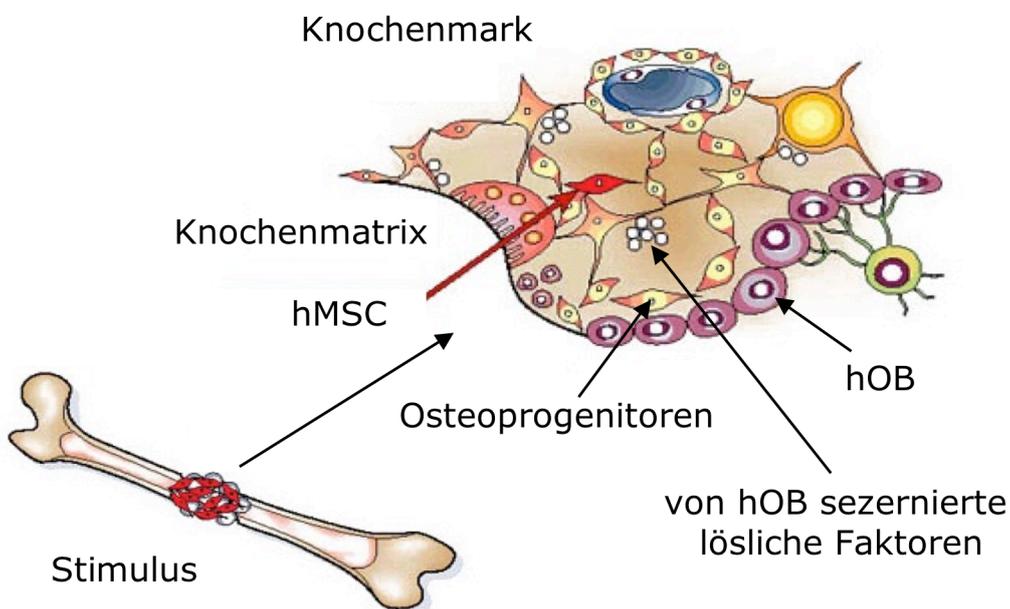


**Abb. B 3: Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten im Knochenauf- und -abbau.** Osteoprogenitoren, Osteoblasten sowie Osteoklasten bilden die BMU (*basic multicellular unit*), die für den Knochenumbau und -aufbau zuständig ist. Durch verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren regulieren sich die Zellen gegenseitig. (Abbildung aus Robbins and Cotran „Pathologic Basis of Disease“, Kapitel 26, 7<sup>th</sup> edition, 2005)

## B 2.2 Remodeling im osteogenen Modell

Als kleinste knochenbildende Einheit gilt die *basic multicellular unit* (BMU), die aus Osteoblasten (OB), ihren Vorläufern sowie Osteoklasten besteht. Sie ist wichtig für die Bildung des Knochens während der Wachstumsphase. Aber auch im Erwachsenen werden 10 % der Gesamtknochenmasse pro Jahr ausgetauscht. Dieser Prozess wird *remodeling* genannt. Bei osteoporotischen Prozessen wird dagegen vermehrt resorbiert und weniger aufgebaut (Jilka et al., 2003).

Ähnliche Vorgänge wie beim Wachstum spielen auch im Wundheilungsprozess des Knochens eine wichtige Rolle. Zerstörte Bestandteile werden abgebaut und es müssen vermehrt Vorläuferzellen rekrutiert werden, um die zerstörten Gewebeteile wiederherzustellen. Dies geschieht ebenfalls über sezernierte Faktoren (Hadjjargyron et al., 2002). Da vor allem aufgebaut werden muss, liegt die Vermutung nahe, dass diese Faktoren von gesunden hOB ausgeschüttet werden (Abb. B 4).



**Abb. B 4: Exogene Stimulierung von hMSC aus dem Knochenmark.** Proliferation und Differenzierung werden nicht nur durch endogene Programme der mesenchymalen Stammzelle (hMSC) und innerhalb der *basic multicellular unit* (BMU), die Osteoprogenitoren, humane Osteoblasten (hOB) und Osteoklasten enthält, reguliert, sondern auch durch exogene Stimuli, beispielsweise durch einen Wunddefekt im Knochen, haben erheblichen Einfluss auf das Verhalten der Stammzellen. (modifizierte graphische Darstellung aus Bianco et al., 2001)

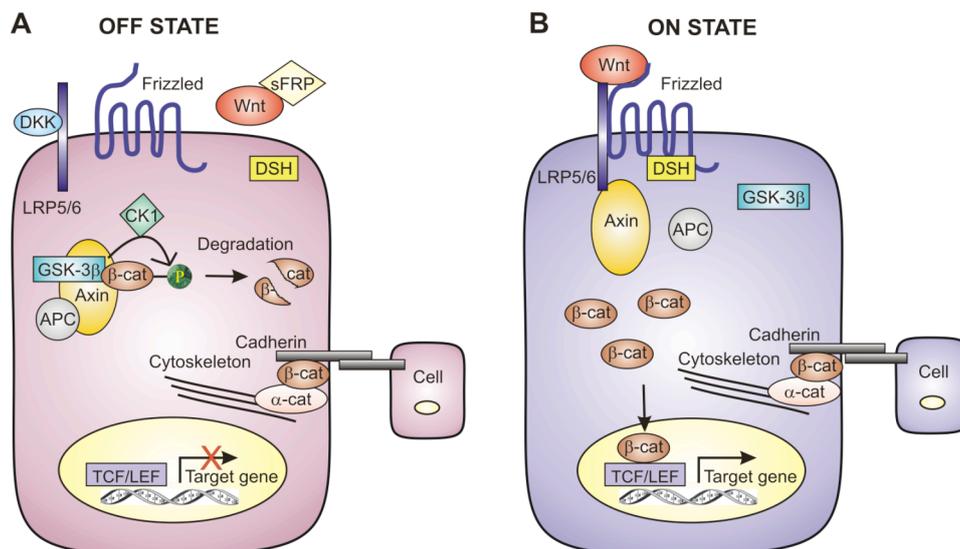
## B 3 Der Wnt-Signaltransduktionsweg

### B 3.1 Allgemeine Funktion

1987 entdeckten Rijsewijk et al., dass das Gen *Wingless* in *Drosophila melanogaster*, das für Segmentpolarität zuständig ist, und das murine Proto-Onkogen *Int-1* homolog zueinander sind. Daraus folgend wurde ein gemeinsamer Name kreiert: Wnt. Das menschliche Genom besitzt 19 unterschiedliche Wnt-Gene (Miller et al., 2002).

In der Literatur sind bis zu vier verschiedene Übertragungswege beschrieben, die durch Wnt-Liganden initiiert werden können. In der vorliegenden Promotionsarbeit ist vor allem der kanonische Wnt-Signalweg von vornehmlichem Interesse. Zum kanonischen Wnt-Signalweg gehören an der Zelloberfläche ein Mitglied der Frizzled-Rezeptorfamilie, das sieben Transmembrandomänen besitzt, sowie Rezeptoren aus der LDL-Familie, nämlich LRP5 oder LRP6 (*low density lipoprotein receptor-related protein*). Im kanonischen Wnt-Signalweg spielt intrazelluläres  $\beta$ -Catenin eine entscheidende Vermittlerrolle (Kato et al., 2007).

In Abb. B 5 sind der Ruhezustand (*off state*) sowie die Aktivierung (*on state*) des Wnt-Weges exemplarisch dargestellt.



**Abb. B 5: Der kanonische Wnt-Signalweg.**

**A)**  $\beta$ -Catenin ist an Cadherin gebunden und sorgt so für Adhärenz an andere Zellen. Wenn kein Wnt gebunden hat, wird freies  $\beta$ -Catenin in einen Degradationskomplex aus Axin, APC und GSK-3 $\beta$  integriert, phosphoryliert und im Proteasom abgebaut.

**B)** Nach Bindung von Wnt-Liganden an die Rezeptoren Frizzled und LRP5/6 zerfällt der Abbaukomplex,  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytosol und kann in den Zellkern translozieren, wodurch es zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen kommt (aus Neth et al., 2007).

Unterbleibt die Aktivierung des Signalweges, wird  $\beta$ -Catenin in einem sog. Degradationskomplex zum Abbau markiert. Dieser besteht aus den Tumorsuppressor-Molekülen Axin und *Adenomatosis Polyposis Coli* (APC), die neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin binden. Beide Faktoren stellen Tumorsuppressoren dar, da APC  $\beta$ -Catenin negativ reguliert und Axin die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) verstärkt. GSK-3 $\beta$  und Casein Kinase 1 (CK1) aus diesem sog. Abbaukomplex phosphorylieren anschließend Serin- (Ser 33, Ser 37 und Ser 45) und Threoninreste (Thr 41) am Aminoterminus von  $\beta$ -Catenin (Behrens et al., 2004). Nach der Phosphorylierung wird das so markierte  $\beta$ -Catenin  $\beta$ -TrCP-vermittelt ubiquitiniliert (Ubiquitin-E3-Ligase) und im Proteasom abgebaut.

Bindet dagegen ein Wnt-Ligand an LRP5/6 sowie einen Frizzled-Rezeptor, so verhindert die Inhibition von GSK-3 $\beta$  durch *Dishevelled* (Dsh) den Abbau von  $\beta$ -Catenin. Dieses akkumuliert intrazellulär und wandert in den Zellkern. Dort aktiviert es DNA-bindende Proteine der Tcf/Lef Familie (*T-cell factor/lymphoid enhancer binding factor*). Durch die Assoziation mit  $\beta$ -Catenin bildet sich dabei ein ternärer Komplex, der dann transient als Transkriptionsfaktor agieren kann (Reya & Clevers 2005). Dadurch werden vermehrt sog. Wnt-Zielgene exprimiert. Die bekanntesten darunter sind Cyclin D1 und c-Myc, welche die Zellproliferation steigern, und *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der die Angiogenese positiv beeinflusst (eine ständig aktualisierte Übersicht der Wnt-Zielgene ist auf folgender Wnt-Homepage zu finden: [www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html](http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html)).

### **B 3.2 Wnt-Signaltransduktion in Stammzellen und Tumorzellen**

Der Wnt-Weg spielt sowohl in Stammzellen als auch in Tumorzellen eine tragende Rolle (Reya & Clevers, 2005). In eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch rekombinantes Wnt3a bzw. LiCl die Invasions- und Migrationskapazität in hMSC erheblich steigert. Der umgekehrte Ansatz, nämlich die Ausschaltung der Wnt-Signalkaskade, konnte dieses Verhalten signifikant inhibieren (Neth et al., 2006).

In hämatopoetischen Stammzellen trägt die Aktivierung des kanonischen Wnt-Weges zur symmetrischen Zellteilung bei (Reya et al., 2003). Ähnliches gilt für Leukämien. So steuert der Wnt-Weg auch die Proliferation von Zellen der chronischen und akuten myeloiden Leukämie (Mikesch et al., 2007) sowie wahrscheinlich auch die der lymphoiden Leukämien. Eine Beteiligung dieses Weges wird ebenfalls bei der Migration bzw. Invasion maligner Zellen des multiplen Myeloms diskutiert (Qiang et al., 2005). Selbst eine Mitwirkung an der Regulation der symmetrischen Zellteilung von neuronalen Stammzellen und auch von Medulloblastomzellen scheint gesichert (Eberhart et al., 2007). Auch embryonale Stammzellen werden in ähnlicher Weise durch den Wnt-Weg kontrolliert (Nusse et al., 2008).

In Kolon-Karzinomen kommt es oftmals zur Inaktivierung von APC. Dies wurde zunächst bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und später auch bei sporadisch auftretenden Karzinomen entdeckt. Die Inaktivierung führt dabei zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und damit einhergehend zu einer Wachstumsverstärkung von Kolonkarzinomzellen unter Erhaltung ihres Vorläuferzellstatus (Fodde et al., 2002).

Prostatakarzinome metastasieren vorwiegend in Knochen und bilden dabei meist osteoblastäre Läsionen. Hall et al. beschrieben 2006, dass vor allem Wnt-Moleküle in dieser tumorinduzierten osteoblastären Aktiviert impliziert sind.

### B 3.3 Wnt-Signaltransduktion und Osteogenese

Verschiedene Autoren beschreiben seit einiger Zeit, dass es eine enge Verflechtung zwischen dem Wnt-Signaltransduktionsweg und der Osteogenese gibt, wobei bereits bei der Embryonalentwicklung ein direkter Zusammenhang nachgewiesen worden ist (Piters et al., 2008). Zu den Wnt-abhängigen Vorgängen zählen neben der Organogenese und der ZNS-Organisation auch die Entwicklung der Extremitäten. Darüber hinaus tragen einige Wnt-Liganden zur Reifung des vertebroskelettalen Systems bei. Auch die Chondrogenese und Gelenksformation wird durch den Wnt-Signalweg gesteuert (Johnson et al., 2004).

*In vitro*-Versuche zeigten, dass verschiedene Wnts die Insulinfreisetzung stimulieren (Schinner et al., 2007). Dies beeinflusst maßgeblich den Knochenmetabolismus, da Insulin mitogen auf Osteoblasten wirkt (Akune et al., 2002). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass bei Allelverlusten der Wnt-Korezeptoren LRP5 oder LRP6 die trabekuläre Knochendichte abnimmt. Mutationen in LRP5 führen allerdings zu verschiedenen Phänotypen. *Gain-of-function*-Mutationen gehen mit dem „*high bone mass*“-Phänotyp (HBM) einher (Balemans et al., 2007; Bodine et al., 2006), während *loss-of-function*-Mutationen *Osteoporosis-Pseudoglioma* (OPPG) verursachen (Ai et al., 2005). OPPG ist charakterisiert durch eine geringe Dichte an eingelagertem Knochenmineral sowie einer erhöhten Knochenbrüchigkeit. Interessanterweise fördert Dexamethason die Bildung von Dickkopf Homolog 1 (Dkk-1), einem Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalweges. Dies deutet darauf hin, dass durch diesen Mechanismus die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose entstehen kann (Cooper et al., 1999; Ferrari et al., 2005).

Der kanonische Wnt-Signalweg fördert die Selbsterneuerung von Stammzellen. Neben der Stimulation der Präosteoblastenreplikation und Induktion der Osteoblastogenese wird die Apoptose in Osteoblasten bzw. Osteozyten inhibiert. Dadurch erhöht sich die Knochendichte und Umstrukturierungsprozesse werden gefördert. Gleichzeitig kommt es zur Unterdrückung der Adipogenese. Während der Embryonalentwicklung ist  $\beta$ -Catenin in Osteoblasten bzw. differenzierenden osteoblastären Zellen erhöht. Das lässt den Rückschluss zu, dass vor allem hier der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert ist (Krishnan et al., 2006).

Zusammenfassend betrachtet haben diese Studien gezeigt, dass in verschiedenen Zellarten der Wnt-Signalweg entscheidende Rollen sowohl in der Embryogenese und Organentwicklung als auch in Stammzellnischen bzw. während Differenzierungsvorgängen von Stammzellen einnimmt.

## C Aufgabenstellung

Die der Rekrutierung der hMSC aus der Stammzellnische und der damit verbundenen Differenzierung z.B. in die osteogene Richtung verbundenen Mechanismen sind trotz intensiver Stammzellforschung bisher noch weitgehend unklar.

Basierend auf dem oben beschriebenen Wissensstand sollte daher eine weitere Funktionsaufklärung zumindest mittels *in vitro*-Untersuchungen erfolgen, wobei sich für die Promotionsarbeit nachfolgende Fragestellungen ergaben:

- Zeigen unterschiedliche Kulturmedien einen Einfluss auf Differenzierungsvorgänge in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)?
- Kann durch sezernierte Faktoren aus humanen Osteoblasten (hOB) eine osteogene Differenzierung in hMSC erreicht werden?
- Spielt der Wnt-Signaltransduktionsweg eine Rolle bei der osteogenen Differenzierung von hMSC?

Im Einzelnen sollte untersucht werden:

1. **Einfluss der Kulturmedien DMEM und MSCBGM auf das Differenzierungsverhalten von hMSC:** Mittels standardisierter chemischer Differenzierungsverfahren (CD) sollten hMSC in die osteogene, adipogene sowie chondrogene Richtung differenziert werden. Dabei sollten unterschiedliche Basismedien evaluiert und etablierte osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierungsmarker mittels qRT-PCR untersucht werden.
2. **Einfluss von hOB-konditioniertem Medium sowie einer indirekten Kokultivierung von hMSC mit hOB auf die osteogene Differenzierung von hMSC:** Im zweiten Teil sollte eine Analyse von zwei alternativen osteogenen Differenzierungsverfahren durchgeführt werden. Dabei sollte Osteoblasten-konditioniertes Medium mit einem indirekten Kokultivierungsverfahren verglichen werden. Durch den indirekten Kokulturansatz von hMSC und Osteoblasten sollte dabei ein Nischen-ähnliches Kompartiment generiert werden. Die Veränderungen im hMSC-Transkriptionsprofil sollten zunächst mit Hilfe der qRT-PCR und darauffolgend mit der Microarray-Technologie untersucht werden.

- 3. Einfluss des Wnt-Signaltransduktionsweges auf die osteogene Differenzierung von hMSC:** Um den Einfluss des Wnt-Signalweges während des osteogenen Differenzierungsprozesses im Detail zu analysieren, sollten zentrale Komponenten dieses Signaltransduktionsweges wie  $\beta$ -Catenin und LRP5 mittels der RNA-Interferenztechnologie ausgeschaltet werden. Durch anschließende Anwendung der verschiedenen Differenzierungsverfahren und Analyse der Expressionsänderung mittels qRT-PCR sollten Wnt-regulierte osteogene Marker identifiziert werden.

## D Material und Methoden

### D 1 Materialien

#### D 1.1 Geräte

Abzugtisch HERA Safe	Heraeus, Hanau
Airflow, Typ 2-454-FBND	Köttermann, Ütze-Hänigsen
Autoklav 3850	Eppendorf, Hamburg
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO <sub>2</sub> -Inkubator Galaxy S	RS Biotech, Irvine, England
Digital Still Kamera, MPEG Movie EX	Sony, Köln
Eismaschine AF-10	Scotsman, Frimont, Italien
Geldokumentationssystem, Image Master VDS	Pharmacia Biotech, USA
Gelelektrophorese-Apparatur, Modell B <sub>1</sub>	PeqLab, Erlangen
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Products, USA
Image Scanner	Pharmacia, Freiburg
Inverses Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus, Mikro-Optik, München
Inverses Fluoreszenzmikroskop IX70	Olympus, Mikro-Optik, München
Kühlschrank (4 °C)	Siemens, München
Kühlzentrifuge, Typ 5415R	Eppendorf, Hamburg
LightCycler II	Roche, Mannheim
Magnetrührer Ika-Combimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
Megafuge, Typ 1. OR	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrowellengerät R-6270	Sharp, Osaka, Japan
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
PCR-Multicycler PT-200	Biozym, Oldendorf
pH-Meter: Typ 526 mit pH Elektrode	WTW, Weilheim
Pipetus-akku	Gilson, USA
Proteintransfereinheiten:	
Mini Protean Electrophoresis Cell	BioRad, München
Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
Routinemikroskop, Axiovert Typ S100	Zeiss, Jena
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank, HeraSafe	Heraeus Instruments, Mannheim

Spannungsquelle, Consort E132	PeqLab, Erlangen
Sterilwerkbank	Biohit Antares, USA
Stickstofftank Locator 4	Sigma, Taufkirchen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermozykler, PCR-Sprint	Hybaid, Ashford, England
Tiefkühlgefrierschrank:	
Liebherr Premium Frost (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Colora UF 85-300S (-80 °C)	Colora, Lorch
Transiluminator DR-88M	Clare Chemical Research, Dolores, USA
UV-Leuchtschirm, Typ TFX-35.M	Vilber Lourmat, Frankreich
Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
Varipipetten, Gilson, Pipetman	Abimed, Langenfeld
Vortex-Genie, Typ G560E	Scientific Industries, New York, USA
Waagen:	
Analysenwaage, A 120 S	Satorius, Göttingen
Technische Waage, MA AF200	Satorius, Göttingen
Wärmeschränke:	
B30	Memmert, Schwabach
BE30	Memmert, Schwabach
Wasserbäder:	
Exatherm U3electronic	Julabo, Seelbach
WB-14	Memmert, Schwabach
Wasserdeionisierungseinheit Membrapure	MembraPURE, Bodenheim
Zentrifugen:	
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Typ CT 4.22	Jouan, Unterhaching
Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, München

## D 1.2 Substanzen

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe „z.A.“ von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Für molekularbiologische Ansätze wurde RNase-freies Wasser der Firma Qiagen (Hilden) sowie „Aqua ad injectabilia“ der Firma Braun (Melsungen) verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Aqua dest. sowie Reinstwasser aus dem Reinstwassersystem der Wasseraufbereitung GmbH (Barsbüttel) hergestellt.

### D 1.2.1 Antikörper

Actin (goat polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology, USA
β-Catenin (goat polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Donkey anti-goat HRP	Santa Cruz Biotechnology, USA
Wnt-3a (goat polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology, USA

### D 1.2.2 Stock- und Pufferlösungen

DYT-Medium	12,8 g Bacto Tryptone 8 g Bacto Yeast Extract 4 g NaCl auf 800 ml mit Aqua dest. vervollständigt
SDS Stock-Lösung	20 % (w/v) SDS
1x Auftragspuffer Laemmli	150 mM Tris 0,3 % Glycerol 5 % SDS 10 ml ddH <sub>2</sub> O
20x SSC Stocklösung:	175,3 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat-Dihydrat 900 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,0
20x SDS Stocklösung	200 g Natriumdodecylsulfat 1l ddH <sub>2</sub> O
Waschlösung I (Microarray):	2 x SSC, 1% SDS (10 ml 20x SSC, 5 ml 20% SDS, 85 ml ddH <sub>2</sub> O)
Waschlösung II (Microarray):	0,1x SSC, 0,5% SDS (0,5 ml 20xSSC, 2,5 ml 20%SDS, 97 ml ddH <sub>2</sub> O)
Proteinlysispuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 M NaCl 5 mM EDTA 1% Triton-X (pH 6.0)

TAE-Puffer (50x)	40 mM Tris-Base (pH 8,3) 2 mM EDTA 20 mM Natriumacetat pH-Einstellung mit Eisessig
TBS-Tween/Triton	20 mM Tris-Cl (pH 7,5) 500 mM NaCl 0,05 % Tween 20 0,2 % Triton X 100
TBS-Puffer	10 mM Tris-Cl (pH 7,5) 150 mM NaCl

### D 1.2.3 Materialien für die Proteinbiochemie und Molekularbiologie

Chemilumineszenzdetektionsfilme (Lumi-Film)	Roche, Mannheim
Gelladepuffer, Typ 10x Blue Juice™	Invitrogen, USA
Filmkassette, Typ Hyperkassette	Amersham Biotech, Freiburg
HyBond Nylonmembran (positiv geladen)	Roche, Mannheim
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Mikrowellengefäße (25 x 12 cm)	Karstadt, München
Nukleasefreie Pinzetten	Roth, Karlsruhe
Sephadex G-25 Gelfiltrationssäulen	Amersham Biotech, Freiburg
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg

### D 1.2.4 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Alizarin-Red-S	Sigma, Deisenhofen
DNA-Auftragspuffer, 10 x	Invitrogen, USA
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Maygrünwaldlösung	Merck, Darmstadt
Methanol, 100 %	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Sigma, Deisenhofen
Natronlauge, 10 M	Apotheke Klinikum Innenstadt
Oil Red O	Merck, Darmstadt
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Pyrogallollösung	Apotheke Klinikum Innenstadt

Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 2 M	Apotheke Klinikum Innenstadt
Trisma-Base	Sigma, Deisenhofen
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

### **D 1.2.5 Substanzen für die Molekularbiologie**

Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	R&D Systems, Wiesbaden
DNA-Längenstandard, Nr. VIII	Roche, Mannheim
DNA-Längenstandard, Kb DNA Leiter	Stratagene, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Humane cytokinspezifische Primer	R&D Systems, Wiesbaden
Kontroll-cDNA (50 ng/μl)	R&D Systems, Wiesbaden
Reverse Transkriptase Puffer	R&D Systems, Wiesbaden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, USA
Reverse Transkriptase	R&D Systems, Wiesbaden
RNase Inhibitor	Ambion, USA
SeaKem LE Agarose	FMC BioProducts, USA
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	R&D Systems, Wiesbaden
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden

### **D 1.2.6 Substanzen für die Proteinbiochemie**

Blockierungslösung für Western Blots	Roche, Mannheim
ECL Plus Western Blotting Detektionsreagenz	Amersham Biosciences, Freiburg
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, USA
Sodiumdodecylsulfat	Sigma, Deisenhofen

### **D 1.3 Fertigsysteme**

cDNA Markierungs- und Hybridisierungs-kit	R&D Systems, Wiesbaden
CyQuant Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes, USA
DNase Set	Qiagen, Hilden
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim

iScript™ cDNA Synthese Kit	BioRad, USA
LC-Primer Set	Search-LC, Heidelberg
LC-SybrGreen Kit	Roche, Mannheim
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Oligo GEArray Osteogenesis	Superarray, USA
ProLong Antifade Kit	Molecular Probes, USA
RNeasy, QiaShredder, RNase free DNase	Qiagen, Hilden
VenorGeM, PCR Mycoplasmen-Diagnostik Kit	Minerva Biolabs, Berlin

## **D 1.4 Zellkultur**

### **D 1.4.1 Humane mesenchymale Stammzellen**

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der Firma Lonza, New Jersey, USA (früher Cambrex) bezogen. Diese werden aus Knochenmark des posterioren Beckenkamms durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert, wobei ihre Abtrennung von hämatopoetischen Zellen durch selektive Adhärenz an Plastik erfolgt. Die Firma garantiert einen negativen Befund auf HIV, Hepatitis-B und -C, Mycoplasmen, Bakterien und Pilzen sowie die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen in drei mesodermale Richtungen. Dabei wird die adipogene Differenzierung durch Lipidvakuolenbildung, die chondrogene Differenzierung durch Bildung von Kollagen II sowie die osteogene Differenzierung durch Mineralisierung (Calciumdeposition) nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen einer 19-jährigen Spenderin (Kaukasierin) herangezogen. Die Spenderin war laut Firmenangabe normalgewichtig und zeigte keine Anzeichen für Herzerkrankungen, Diabetes, Krebs, Epilepsie, andere Organerkrankungen bzw. für virale oder bakterielle Infektionen.

Während der Experimente erfolgte in regelmäßigen Abschnitten die Überprüfung aller Zellkulturen auf eine etwaige Mycoplasmen-Kontamination mit Hilfe eines Mycoplasmen-PCR-Kits der Firma Minerva.

### **D 1.4.2 Humane Osteoblasten**

Die Firma PromoCell (Heidelberg) war Zulieferer für humane Osteoblasten. Diese stammen von Patienten, die auf Grund einer Arthrose eine Endoprothese erhielten, ansonsten aber gesund waren. Aus den Knochen, die in der Operation entfernt wurden (für die vorliegende Arbeit aus dem Knie einer 73-jährigen Spenderin), wurde die Spongiosa in kleine Stücke zerteilt und in Kulturschalen mit Osteoblastenwachstumsmedium kultiviert. Nach ca. 2 Wochen begannen die Osteoblasten auszuwachsen und einen Monolayer auf der Kulturschale zu bilden (Auswuchstechnik).

Die Charakterisierung durch die Firma erfolgt über den Nachweis der Osteocalcinexpression mittels Immunhistochemie sowie durch Beurteilung der Morphologie.

### D 1.4.3 Substanzen der Zellkultur

Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
β-Glycerolphosphat	Sigma, Deisenhofen
Bovines Insulin	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Doxyzyclin	BD Biosciences, USA
Doxyzyclin-freies FBS	BD Biosciences, USA
Einbettmedium auf Kunstharzbasis	DPX Mountant, FLUKA
Einbettmedium für Kryoschnitte	Leica instruments GmbH, Nussloch
Fötale Kälberserum	Gibco, USA
Geneticin (G 418)	Gibco, USA
Hygromycin B	BD Biosciences, USA
Indomethacin	Sigma, Deisenhofen
Insulin/Transferrin/Linolsäure	Sigma, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Lonza, USA
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, USA
L-Prolin	Sigma, Deisenhofen
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Lonza, USA
MSC-Basalmedium	Lonza, USA
MSC-Growth Supplement (MCGS)	Lonza, USA
Natriumpyruvat	Sigma, Deisenhofen
Osteoblast Growth Medium (OGM)	PromoCell, Heidelberg
OGM-Growth Supplement	PromoCell, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Lonza, USA
Phosphat Buffered Saline Solution (PBS)	Gibco, USA
Serumalbumin, bovines (Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Serum-freies Medium, DMEM	Gibco, Invitrogen, USA
siRNA-Puffer	Qiagen, Hilden
Trypsin/EDTA-Lösung	Lonza, USA, Gibco, PromoCell
Wnt-3a (murin)	R&D Systems, Wiesbaden

### D 1.4.4 Materialien der Zellkultur

0,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml Falconröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
50 ml Falconröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser, 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
Deckgläser für Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Kryokonservierungs-Röhrchen	Nalgene, USA
Pasteurpipetten	VWR International, Darmstadt
Petrischalen (Ø 92 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Polystyren Röhrchen, 5 ml	BD Falcon, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Spritze (steril, 20 ml)	BD Discardit II
Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore/Nalgene, USA
Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup> bzw. 25 cm <sup>2</sup>	Nunc, USA
Zellkulturplatten, 6- und 12-Kavitäten	Nunc, USA

### D 1.5 *short interfering RNA*-Sequenzen

Alle verwendeten *short interfering*-RNA (siRNA)-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen, Hilden bezogen. Im Falle der nicht zum Stammrepertoire der Firma gehörenden Sequenzen erfolgte das Sequenzdesign der siRNA-Oligonukleotide mittels eines von der Firma Qiagen auf ihrer Internetseite zur Verfügung gestellten Spezialsoftware:

<http://sirna.qiagen.com/jsp/SearchByAccessionNumber.jsp>

#### Negativkontroll-siRNA

DNA-Zielsequenz: 5´-AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT-3´  
 Sense: 5´-r(UUC UCC GAA CGU GUC ACG U)d(TT)-3´  
 Antisense: 5´-r(ACG UGA CAC GUU CGG AGA A)d(TT)-3´  
 Modifikation: keine

Eine Suche mit Hilfe des BLAST-Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ergab keine Überlappung mit Sequenzen aus dem humanen Genom.

### β-Catenin-siRNA

DNA-Zielsequenz: 5´-AAT GGT TGC CTT GCT CAA CAA-3´

Sense: 5´-r(UGG UUG CCU UGC UCA ACA A)d(TT)-3´

Antisense: 5´-r(UUG UUG AGC AAG GCA ACC A)d(TT)-3´

Modifikation: sense und antisense: 5´-Phosphatgruppe

Die Zielsequenz entspricht dem Sequenzbereich von 842 - 860 der mRNA von *Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein)*, beta 1,88 kDa (NM\_001904).

### LRP5-siRNA

DNA-Zielsequenz: 5´-AAC CAA CGA CCT CAC CAT TGA-3´

Sense: 5´-r(CCA ACG ACC UCA CCA UUG A)d(TT)-3´

Antisense: 5´-r(UCA AUG GUG AGG UCG UUG G)d(TT)-3´

Modifikation: sense und antisense: 5´-Phosphatgruppe

Die Zielsequenz entspricht dem Sequenzbereich von 2.465 – 2.483 der mRNA von *Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein 5* (NM\_002335).

## **D 1.6 Software zur Transkriptomanalyse**

### **D 1.6.1 Image Scanner Software**

Das Einscannen der Arrays erfolgte mit Hilfe des *Image Scanners* der Firma Amersham Biotech, Freiburg sowie der Software „Image Master Labscan 3.0“ derselben Firma.

### **D 1.6.2 ArrayVision**

Von der Firma Imagingresearch wurde für die Analyse der cDNA-Microarrays die statistische Validierungssoftware „ArrayVision“ (Version 6.0) verwendet (St. Catharines, Ontario, Canada).

## **D 2 Methoden**

Sofern keine Referenzen explizit zitiert wurden, ist das Hintergrundwissen zu einzelnen Schritten der angewandten Methoden bzw. Substanzen, die darin Verwendung fanden, aus den Bedienungsanleitungen der jeweiligen Firmen bezogen.

Die molekularbiologischen Methoden wurden in der Regel nach Sambrook et al. („Molecular Cloning“, 2001) durchgeführt.

### **D 2.1 Zellkultur**

#### **D 2.1.1 Kultivierung, Expansion und Einfrieren von hMSC und hOB**

Sowohl humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) als auch humane Osteoblasten (hOB) wurden für alle Versuche zunächst in Zellkulturschalen und -flaschen gezüchtet, um eine ausreichende Zellzahl zu garantieren. Das Alter wurde in Form von Passagen dokumentiert. Von den Firmen Lonza bzw. PromoCell wurden je ca. 1.000.000 (hMSC) bzw. 650.000 (hOB) Zellen in 1 ml Kryokonservierungsmedium in der 1. Passage geliefert. hMSC waren aus dem Knochenmark durch selektive Adhärenz isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf folgende Oberflächenmoleküle charakterisiert worden: positiv für CD29, CD44, CD105 sowie CD166; negativ für CD14, CD34 und CD45 (Marker hämatopoetischer Stammzellen).

Zur Aussaat der hMSC bzw. hOB wurde der Inhalt der Kryogefäße zwei Minuten in 37 °C warmen Wasser an- und schließlich bei Raumtemperatur gänzlich aufgetaut. Dieses Volumen wurde dann in 3 ml (auf 37 °C) vorgewärmtem Wachstumsmedium resuspendiert und auf drei T75-Kulturflaschen gleichermaßen verteilt. Hierbei wurde jede Kulturflasche auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit dem jeweiligen Kulturmedium aufgefüllt. Nach erstmaliger Aussaat wurde das Alter der Zellen per definitionem auf Passage 2 festgelegt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden humane mesenchymale Stammzellen der Passage 4 und 5 sowie Osteoblasten der Passage 3 und 4 verwendet.

Nach der ersten Aussaat der kryokonservierten Zellen auf 3 T75-Kulturflaschen erreichten sie eine Bodenbedeckung von ca. 30 %. Die Zellen wurden weitergezüchtet, bis sie einen Konfluenzgrad von 80 % erreicht hatten. Dabei war, vor allem bei den Osteoblasten, darauf zu achten, dass diese Zelldichte nicht überschritten wurde, da ansonsten Differenzierungsvorgänge induziert wurden. Der gewünschte Zustand wurde nach 1,5 –

3 Wochen erreicht, wobei bei den Osteoblasten anzumerken ist, dass sie deutlich langsamer proliferierten. Durch Zell-Zell-Kontakte stellte sich eine ausgeprägte Kontaktinhibition ein. Von der Firma PromoCell wurde eine Zellverdoppelungszeit von 160 Stunden für humane Osteoblasten angegeben und für mehr als 5 Passagen garantiert.

Das Einfrieren der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von zwei Tagen. Zunächst wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA abgelöst und gezählt (siehe D 2.1.3). Es wurden jeweils 500.000 Zellen auf ein Kryogefäß in je 1 ml Einfriermedium verteilt. Das Einfriermedium bestand zu 85 % aus dem entsprechenden Kulturmedium, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 5 % bovinem Serumalbumin (BSA). Die Einfriereröhrchen wurden für zwei Stunden bei  $-20\text{ °C}$ , anschließend über Nacht bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Tags darauf konnten sie im flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ °C}$ ) eingefroren werden.

### **D 2.1.2 Zellkulturmedien**

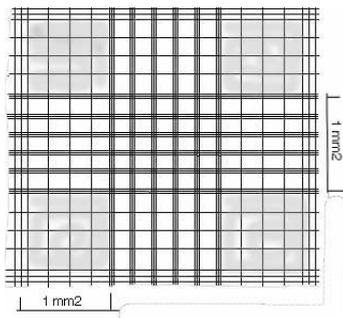
Für die Herstellung des Stammzellwachstumsmediums (MSCBGM) wurden 440 ml Kulturmedium der Firma Lonza mit 50 ml fötalem Kälberserum (FBS), 10 ml L-Glutamin (200 mM) sowie 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (*MSCGM Single Quot*, Lonza, USA) vervollständigt.

450 ml Osteoblastenwachstumsmedium der Firma PromoCell wurden mit 50 ml Zusatz, der ebenfalls fötales Kälberserum sowie 50  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycin und 50  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B enthielt, versetzt.

Während der Kultur wurde zweimal wöchentlich das Medium gewechselt. Dabei wurde zunächst das alte Wachstumsmedium unter sterilen Bedingungen abgenommen und danach durch dasselbe Volumen neuen Mediums ersetzt, das vorher auf  $37\text{ °C}$  vorgewärmt worden war. Um gleichbleibende, annähernd physiologische Bedingungen garantieren zu können, wurden die Kulturflaschen in einem Brutschrank aufbewahrt. Dieser hielt die Temperatur konstant bei  $37\text{ °C}$  und die Luftfeuchtigkeit bei 90 % bei einer  $\text{CO}_2$ -Sättigung von 5 %. Das  $\text{CO}_2$  ist als Anhydrit der Kohlensäure dazu nötig, den pH-Wert auf 7,4 im Hydrogenkarbonatpuffer des Kulturmediums aufrechtzuerhalten.

### D 2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die sogenannte Neubauerzählkammer verwendet. Dafür wurde ein geringer Teil der homogenen Zellsuspension mit einer Glaspipette auf die Zählkammer aufgebracht und die vier Quadrate (in Abb. D 1 grau unterlegt) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Um die tatsächliche Zellzahl zu ermitteln, wurde der Mittelwert der vier Quadrate errechnet, indem die Gesamtzellzahl durch vier geteilt wurde. Daraufhin wurde das Ergebnis mit 10.000 multipliziert, was der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension entspricht. Die Zellen wurden sowohl vor der Aussaat als auch vor dem Einfrieren gezählt. Für einen Konfluenzgrad von 30 % wurden 5.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.



**Abb. D 1: Neubauer-Zählkammer.**  
(aus <http://www.mta-labor.info>)

## D 2.2 Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

### D 2.2.1 Chemische Differenzierungsinduktion

Anhand etablierter chemischer Methoden sollte die Differenzierungsfähigkeit der hMSC in verschiedenen Differenzierungsmedien getestet werden. Zum einen wurde dafür das MSCBGM von Lonza, zum anderen DMEM (high glucose, supplementiert mit PenStrep und FBS) verwendet. Beide dienen als Basismedien und sollten hinsichtlich des Einflusses auf die Zellen verglichen werden.  $6,3 \times 10^6$  hMSC wurden auf insgesamt zehn 12-Kavitäten-Kulturschalen mit einer Oberfläche von 3,5 cm<sup>2</sup> pro Kavität ausgesät. Nachdem diese eine vollständige Bodenbedeckung erreicht hatten, wurde die Differenzierung eingeleitet. Zu diesem Zweck waren außerdem chemische Zusätze notwendig, die im Folgenden erläutert werden.

### D 2.2.1.1 Osteogenese

Je 15 Kavitäten mit hMSC wurden in diesem Versuch mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert, wobei sowohl MSCBGM als auch DMEM als Basismedium Verwendung fanden. Diese Medien wurden jeweils mit den osteogenen Zusätzen supplementiert, die in Art und Endkonzentration in Tabelle D 1 aufgelistet sind. Pro Kavität wurde jeweils 1 ml Medium hinzugegeben und dies nach bereits beschriebener Weise zweimal wöchentlich gewechselt. Waren nach Differenzierung qRT-PCR Analysen vorgesehen, erfolgte die Abnahme der Zellen in 350 µl RLT-Puffer nach vorherigem einmaligen Waschen in PBS (siehe D 2.2.1).

**Tab. D 1: Osteogene Zusätze und deren Endkonzentration im Medium.**

Zusatz	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	100 nM
β-Glycerolphosphat	10 mM
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	50 µM

### D 2.2.1.2 Adipogenese

Nach Erreichen der vollständigen Konfluenz bestand die adipogene Differenzierung zum einen aus einer fünftägigen Stimulierung mit Induktionsmedium und zum anderen in einer zwei-tägigen Konservierung des Differenzierungsstatus in Erhaltungsmedium. Insgesamt wurde der Zyklus bis zu dreimal durchlaufen.

Wie unter D 2.1.4.1 wurden hier die Basalmedien (DMEM und MSCBGM) direkt vor der Verwendung mit Zusätzen supplementiert. Im Unterschied zur osteogenen Differenzierung waren hier zwei verschiedene Medien notwendig (Tabelle D 2 und D 3).

**Tab. D 2: Adipogenes Induktionsmedium**

Zusatz	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	1 µM
Indomethacin	0,2 mM
Insulin	0,01 mg/ml
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	0,5 mM

**Tab. D 3: Adipogenes Erhaltungsmedium**

Zusatz	Endkonzentration im Medium
Insulin	100 µg/ml

Sämtliche untersuchten Zeitpunkte wurden hier und auch bei der osteogenen Differenzierung im Triplikate durchgeführt. Für eine RNA-Isolierung wurden diese in RLT-Lysepuffer abgelöst. Um einen Vergleich mit der korrespondierenden Referenz zu gewährleisten, wurde gleichzeitig dieselbe Anzahl an Kavitäten als Kontrollproben behandelt. Dazu wurden die hMSC ohne Differenzierungszusätze entweder in MSCBGM oder in DMEM kultiviert.

Zur Verifizierung der Differenzierung für histochemische Färbungen wurden Zellen in 6-Kavitäten-Kulturschalen mit 2 ml Kultivierungsmedium auf gleiche Weise behandelt. Dies erfolgte sowohl in osteogenem als auch adipogenem Medium mit den jeweiligen Kontrollproben.

### D 2.2.1.3 Chondrogenese

Für die chondrogene Differenzierung mussten zunächst Zellsedimente hergestellt werden. Dafür wurden 500.000 hMSC zentrifugiert (5 Minuten bei 600 x g) und die Sedimente danach in 15 ml Kulturröhrchen mit 2 ml Medium über 28 Tage kultiviert. Das Medium wurde hierbei alle zwei Tage gewechselt. In die Kulturröhrchen wurde nach dem Mediumwechsel 1 µl TGF-β3 (20 µg/ml) gegeben, was einer Endkonzentration von 0,01 µg/ml entsprach. Insgesamt wurden acht solcher Sedimentkügelchen hergestellt. Vier davon wurden entweder in DMEM oder in MSCBGM mit den entsprechenden Zusätzen differenziert (Tabelle D 4) und die gleiche Anzahl wurde ohne Zusätze (Kontrolle) kultiviert.

**Tab. D 4: Chondrogenes Differenzierungsmedium**

Zusatz	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	100 nM
ITS (Insulin, Selenit, Transferrin)	6,25 ng/ml
Natriumpyruvat	1 mM
Linolsäure	5,33 µg/ml
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	0,17 mM
BSA	1,25 mg/ml
L-Prolin	0,35 mM

Die Hälfte der jeweiligen Proben war für qRT-PCR Analysen vorgesehen, die restlichen wurden für die Herstellung von Gefrierschnitten verwendet. Alle Proben, die in RLT-Puffer lysiert worden waren, konnten zur Aufbewahrung bei -80 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für die RNA-Isolation (siehe D 2.2) verwendet werden.

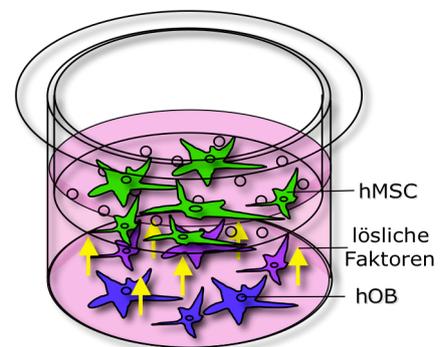
## D 2.2.2 Alternative Differenzierungsinduktion

### D 2.2.2.1 Osteoblasten-konditioniertes Medium

Für die Herstellung von konditioniertem Medium wurden humane Osteoblasten der 3. und 4. Passage der Firma PromoCell zunächst in Osteoblastenwachstumsmedium kultiviert. Die Konditionierung erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen, nachdem die Zellen etwa 80 % Bodenbedeckung erreicht hatten. Nach der Abnahme wurde das Medium mittels eines Filters (0,2 µm Porengröße) steril filtriert und anschließend für die Kultivierung von Stammzellen verwendet. Die Filtration garantiert zum einen die Sterilität des abgenommenen Mediums und trennt zum anderen Zellfragmente ab.

### D 2.2.2.2 Indirekte Kokultur

**Hintergrund:** Mittels der indirekten Kokultur, sollte nun ein kontinuierlicher wechselseitiger Informationsaustausch zwischen Osteoblasten und humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Transwellsystem der Firma Corning (NY, USA) verwendet, das aus zwei unterschiedlichen Kompartimenten besteht. Diese Bereiche werden durch eine Polycarbonatmembran (Fläche 4,67 cm<sup>2</sup>) voneinander getrennt (siehe Abb. D 2). Die Poren der mikroporösen, permeablen Membran haben einen Durchmesser von 0,4 µm, was eine Diffusion löslicher Stoffe gestattet (gelbe Pfeile), die Wanderung der Zellen von oben nach unten, oder auch umgekehrt, dagegen verhindert. Der Abstand der Membran von der Basis der Kulturschale beträgt 1 mm. In den Versuchen fanden Einsätze für 6-Kavitätenkulturschalen Verwendung.



**Abb. D 2: Darstellung des Transwellsystems.** hMSC und hOB stehen durch indirekte Kokultur miteinander in Kontakt.

**Durchführung:** Für die Versuche der indirekten Kokultur wurden die beiden Zellspezies immer am selben Tag ausgesät, d.h. hMSC auf die mikroporöse, permeable Membran und humane Osteoblasten in das untere Kompartiment der Kulturschale. Dabei war darauf zu achten, dass Stammzellen, wie für Differenzierungsversuche üblich, eine annähernd vollständige Bodenbedeckung erreichten (ca. 65.000 Zellen/Insert). Aufgrund der Hypothese, dass die zu erwartenden Effekte von der Zellzahl der produzierenden Zellen abhängig sind, wurden Osteoblasten in verschiedenen Konfluenzen ausgesät. Zum Zeitpunkt der Aussaat wurde dabei eine 40 %ige oder 80 %ige Konfluenz erreicht (entspricht

64.000 bzw. 128.000 Osteoblasten pro Kavität). In der Kontrollgruppe blieb der untere Bereich unbesiedelt. Nach der Ernte wurden die Zellen für die quantitative RT-PCR-Analytik aufbereitet (siehe D 2.2). Zur Gewährleistung einer ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen wurden insgesamt 4 ml Medium eingesetzt, wobei zunächst 2,5 ml in den unteren Bereich und anschließend die restlichen 1,5 ml in den oberen Bereich gegeben wurden.

## **D 2.2.3 Histochemische Färbungen**

### **D 2.2.3.1 Alizarin-Rot-Färbung**

Mit Hilfe der Alizarin-Rot-Färbung sollte die osteogene Differenzierung nachgewiesen werden. Zellen, die sich entweder in einem fortgeschrittenen Stadium der osteogenen Differenzierung befinden, oder auch terminal differenzierte Osteoblasten (Osteozyten) stellen extrazelluläre Matrixproteine (unter anderem Decorin, Kollagen und Osteocalcin) her, in die sich schließlich Calciumphosphat einlagert. Dies wird für den Nachweis der osteogenen Differenzierung herangezogen, da mit Alizarin-Rot eben diese Einlagerungen sichtbar gemacht werden können.

Als Grundlage wurde zunächst eine Stocklösung (40 mM mit pH 4,1) hergestellt. Dafür wurden 0,411 g Alizarin-Rot-S ( $M = 342,3 \text{ g/mol}$ ) der Firma Sigma in einem Gesamtvolumen von 30 ml destilliertem Wasser unter Erhitzen auf 50 °C und ständigem Rühren gelöst. Mittels eines pH-Meters wurde der pH-Wert unter Zugabe von NaOH bzw. HCl auf 4,1 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

Für die Durchführung wurde ein etabliertes Protokoll verwendet (DiGirolamo et al., 1999). Diesem folgend wurde das Medium abgenommen und dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Damit die Zellen sich während und nach der Färbung nicht ablösen konnten, wurden sie mittels ca. 2 ml eiskaltem (-20 °C) 70 %igen EtOH für 1 Stunde fixiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschriff mit 1 ml H<sub>2</sub>O. Daraufhin wurden die Zellen 10 Minuten mit 2 ml der Alizarin-Rot-Stocklösung auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Abnahme dieser Lösung wurde erneut dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Sobald beim letzten Waschschriff kein Farbabgang mehr sichtbar war, wurden die Zellen mit PBS bedeckt und bei +4 °C aufbewahrt.

### **D 2.2.3.2 Oil-Red-O-Färbung**

Die Oil-Red-O-Färbung dient zur Darstellung aller Lipide, da die Löslichkeit dieses Farbstoffes in Lipiden höher ist als im Lösungsmittel. Zur Durchführung wurde zunächst eine 0,3 %ige Stocklösung hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 150 mg Oil-Red-O eingewogen und mit 50 ml Isopropanol unter Rühren vermischt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur etwa einen Monat verwendbar. Aus dieser Stocklösung ließ sich nun eine Arbeitslösung herstellen, indem zu 12 ml Stocklösung 8 ml H<sub>2</sub>O gegeben wurden. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Lösung filtriert. Diese nun 0,2 %ige Lösung war nur mehr 3 Stunden haltbar.

Nach Abnahme des Kulturmediums und kurzer Trocknung an der Luft wurden die Zellen 2 Minuten mit Formalin bei -20 °C fixiert. Das Formalin wurde abgenommen und die Zellen wurden anschließend mit 50 %igem EtOH gewaschen. Nach diesem Waschschrift erfolgte die Färbung der Zellen mit der 0,2%igen Oil-Red-O-Arbeitslösung für etwa 20 Minuten bei RT. Abschließend wurden zwei Waschschriffe durchgeführt, der erste wiederum mit 50 %igem EtOH, der zweite mit Aqua dest., wobei die Zellen ca. 1 Minute lang geschwenkt wurden. Um die Färbung betrachten zu können, wurden die Zellen mit Aqua dest. bedeckt und bei +4 °C aufbewahrt.

### **D 2.2.3.3 Toluidinblau-Färbung**

Die Toluidinblau-Färbung wird besonders für Gewebe verwendet, die Knorpelgrundsubstanz, Schleimdrüsen, Becherzellen oder Mastzellgranula enthalten. In dieser Arbeit diente diese Färbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung. Die Färbesubstanz enthält Thiazinfarbstoffe, wodurch ein metachromatischer Färbefeffekt erreicht wird. Dieser Effekt lässt auf negative Valenzen und ihre besonders dichte Lagerung (< 0,4 nm) schließen. Damit können z. B. Mukopolysaccharide (vor allem sulfatierte) wie Glykosaminoglykane nachgewiesen werden.

Für die Untersuchung wurden die chondrogenen Sedimente sowie ihre Kontrollen verarbeitet (siehe D 2.1.4.3). Um sie durchführen zu können, mussten die Zellsedimente zunächst zu 12 µm dünnen Gefrierschnitten verarbeitet werden. Zu diesem Zweck wurden die Proben am Vortag in eine Lösung aus PBS, Tween 20 und 5 % Saccharose bei 4 °C eingelegt. Am Folgetag wurde auf den Stempel der Gefrierschnittvorrichtung, die zuvor auf -21 °C abgekühlt worden war, eine geringe Menge des Einbettmediums für Kryoschnitte (Jung) gegeben. Gleichzeitig wurde die Probe mit einer Pipette vorsichtig aus der

Lösung genommen und nach kurzem Anfrieren auf die Mitte des Einbettmediums gegeben. Nachdem die Probe vollständig gefroren und die Schnittebene richtig eingestellt worden war, wurde die Probe in 12 µm dünne Schichten geschnitten. Die Schnittschichten wurden anschließend auf einen Objektträger gelegt, auf dem sie bei -20 °C aufbewahrt werden konnten.

Die eigentliche Färbung erfolgte auf den Objektträgern. Zunächst wurden diese für 3 Minuten in 1 %iger Toluidinblaulösung eingelegt. Danach wurde bis zu 120 Minuten mit Leitungswasser gewaschen, bis sich keine Farbschlieren mehr ablösten. Alle 10-20 Minuten wurde dabei das Wasser gewechselt. Nach der Trocknung mit Filterpapier wurden die Schnitte mit neutralem Einbettmedium auf Kunstharzbasis (DPX) und einem Deckglas fixiert.

#### **D 2.2.3.4 Van Kossa-Färbung**

Das Prinzip des histochemischen Nachweises von Calcium in Karbonaten oder Phosphaten mittels der Van Kossa-Färbung besteht darin, dass Calciumionen gegen Silberionen ausgetauscht werden und diese anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Hier kann z. B. Licht als Reduktionsmittel dienen.

Vor der Durchführung wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation in Methanol und eine 20-minütige Inkubation in H<sub>2</sub>O. Daraufhin wurden die Zellen für 5 Minuten in Silbernitrat in Dunkelheit angefärbt. Nach zweimaligem Waschen für je 3 Minuten in H<sub>2</sub>O wurden die Zellen für 5 Minuten in 1 %iger Pyrogallollösung inkubiert. Es folgte ein einmaliger Waschschrift für 3 Minuten in Aqua dest. und die Fixierung in NaOH für 4 Minuten. Wiederum wurden die Proben zweimal für 3 Minuten in Leitungswasser gewaschen, anschließend erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Maygrünwaldlösung für 10 Minuten. Nach einem letzten Waschschrift für 3 Minuten mit Aqua dest. wurden die Zellen in Aqua dest. bei +4 °C aufbewahrt.

## **D 2.3 Wnt-Signaltransduktion und osteogene Differenzierung**

### **D 2.3.1 Induktion des Wnt-Signaltransduktionsweges**

In diesen Versuchen wurde Wnt3a als bekannter Aktivator des kanonischen Wnt-Signalweges verwendet. Hierfür wurden hMSC ausgesät und, sobald diese eine vollständige Konfluenz ausgebildet hatten, über einen Zeitraum von 7 Tagen mit einer Konzentration von 150 ng/ml rmWnt-3a behandelt. Diese Konzentration war zuvor in der Promotionsarbeit von Dr. Marisa Karow in unserer Arbeitsgruppe etabliert worden. Die Zellen wurden dann an Tag 1, 3 und 7 geerntet und wie unter D 2.2 beschrieben, Total-RNA für qRT-PCR-Analysen isoliert.

### **D 2.3.2 Transfektion von hMSC mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin und LRP5**

**Prinzip:** 2006 wurde für die Entdeckung der RNA-Interferenz der Nobelpreis für Medizin & Physiologie an die beiden US-Amerikaner Andrew Z. Fire (Stanford-Universität) und Craig C. Mello (University of Massachusetts Medical School, Worcester) verliehen. Unter natürlichen Bedingungen spielt die RNA-Interferenz beim Abwehrmechanismus gegen Virusinfektionen, der Regulierung von Erbfaktoren und bei der Kontrolle von mobilen DNA-Elementen in Zellen eine zentrale Rolle. Im Labor dagegen kann dieser Mechanismus dazu verwendet werden, um mittels *small interfering ribonucleic acids (siRNA)* gezielt Gentranskription auszuschalten oder zumindest über einen gewissen Zeitraum herabzuregulieren. Zur Transfektion der siRNAs wurde in der vorliegenden Arbeit die Lipofektion verwendet. Das Prinzip dieser Technik basiert auf der Wechselwirkung der anionischen Nukleinsäuren und des kationischen amphiphilen Transfektionsreagenzes. Durch eine Komplexbildung werden Mizellen generiert, die endozytotisch von der Zelle aufgenommen werden können. Somit können künstlich synthetisierte siRNA-Sequenzen von 21 bp in die Zelle eingebracht werden. Die Transfektion solcher siRNAs induziert eine hochspezifische zelluläre Antwort, nämlich die RNA-Interferenz (RNAi), bei der die gezielte Degradation eines spezifischen mRNA-Transkriptes ausgelöst wird. Dies bewirkt eine massive Abnahme des Genproduktes, was auch als Knockdown bezeichnet wird.

**Durchführung:** Die hMSC wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Kavitäten-Kulturschalen bis zu einer 30 %igen Konfluenz ausgesät. Am Tag darauf erfolgten zunächst die Mediumabnahme und ein einmaliges Waschen mit PBS. Danach wurden die Zellen mit 1,5 ml Stammzellwachstumsmedium versorgt. Zuvor war bereits der Transfektionsansatz vorbereitet worden. Insgesamt mussten hierzu drei verschiedene Lösungen in speziellen

Transfektionsröhrchen aus Polystyrol vorbereitet werden. Pro Kavität bestand der Ansatz aus 250 µl DMEM (ohne Zusätze) und 2,5 µl siRNA (entweder gegen  $\beta$ -Catenin, gegen LRP5 oder ohne gegen ein spezifisches Zielgen gerichtet). In einem separaten Transfektionsröhrchen wurden für die pro Kavität zu transfizierende hMSC jeweils 250 µl DMEM mit 5 µl Lipofectamine 2000 vermischt. Danach wurden je 250 µl des Lipofectamine 2000 Ansatzes zu den siRNA-Ansätzen pipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die 500 µl des Transfektionsansatzes vorsichtig in die Kavitäten, die zuvor mit 1,5 ml Kultivierungsmedium versorgt worden waren, tropfenweise zugegeben und für 6 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für einen Tag 2 ml Stammzellwachstumsmedium pro Kavität zugegeben (Hoelters et al., 2005; Karow, 2008).

Um die Differenzierungsfähigkeit der Zellen nach dem Knockdown überprüfen zu können, war es notwendig, die Zellen von 6-Kavitäten-Kulturplatten auf 12-Kavitäten-Kulturplatten umzusiedeln. Dadurch wurde ein höherer Konfluenzgrad (ca. 90 %) erreicht. Fortan wurden die Zellen entweder mit konditioniertem Osteoblastenmedium (siehe D 2.4.1), mit osteogenem Differenzierungsmedium (siehe D 2.2.1.1; im Weiteren zur besseren Unterscheidung auch chemisches Differenzierungsmedium CD genannt) oder zu Kontrollzwecken mit Osteoblastenwachstumsmedium für sieben Tage behandelt.

### **D 2.3.3 $\beta$ -Cateninbestimmung mittels Western Blot**

**Hintergrund:** Bei dieser Methode werden denaturierte Proteine in einem Polyacrylamidgel durch angelegte elektrische Spannung (Elektrophorese) voneinander getrennt. Dabei spielt die Masse der Proteine die entscheidende Rolle. Nach der Separation werden sie auf eine Membran (meist Nitrocellulose) transferiert, was das eigentliche *blotting* darstellt. Die Bindung der Proteine an die Membran wird durch hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoff-Brücken-Bindungen vermittelt. Auf dieser Membran können einzelne Proteine anschließend durch spezifische Bindung mit Antikörpern nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um unterschiedliche  $\beta$ -Cateninspiegel in der Zelle nachzuweisen.

**Durchführung:** Zunächst wurden die Zellen über einen Zeitraum von 1, 3 und 7 Tagen mit konditioniertem Medium, Osteoblastenwachstumsmedium bzw. Stammzellwachstumsmedium kultiviert. An den jeweiligen Tagen wurden die Zellen, wie unter D 2.1 beschrieben, abgenommen, in PBS resuspendiert und zu Aliquots á 20.000 Zellen in Eppendorfgefäße aufgeteilt. Nach einem Zentrifugationsschritt und Abnahme des Überstandes wurden die Zellsedimente in Proteinlysispuffer (D 1.2.3) gelöst. Zu den Proben wurden

5 µl Lämmli-Auftragspuffer gegeben und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden anschließend auf 8 %ige SDS-Gele aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben dienten 7 µl SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard als Molekulargewichtsmarker. Die Gele wurden in die Western Blot-Apparatur eingespannt und für 15 Minuten bei 80 V, danach erfolgte die Elektrophorese für ca. 1 Stunde bei 140 V. Sobald die blaue Lauffront das untere Ende erreicht hatte, wurden die Elektrophorese gestoppt, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran aufgelegt. Danach wurde diese Anordnung zwischen je zwei Filterpapiere und Schwämme in die Blottingapparatur eingespannt. Zuvor waren Filterpapiere, Schwämme und Membran in Blotting-Puffer für ca. 15 Minuten eingelegt worden. Jede Membran wurde für genau 1,5 h bei 70 mA geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen und anschließend 1 h in Blockierlösung (TBS + 3 % BSA) bei Raumtemperatur geblockt. Vor der Zugabe der Primärantikörper  $\beta$ -Catenin und  $\beta$ -Actin über Nacht musste die Membran noch zweimal für 10 Minuten in TBS-Tween/Triton-Puffer und einmal für 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen werden. Die Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:750 ( $\beta$ -Catenin) und 1:400 ( $\beta$ -Actin) zur Blockierlösung gegeben. Die Übernachtinkubation erfolgte bei +4 °C. Danach wurde ein zweimaliges Waschen in TBS-Tween/Triton-Puffer und ein einmaliges Waschen in TBS-Puffer durchgeführt. Der Zweitantikörper *donkey anti-goat* HRP wurde in einer Verdünnung von 1 : 15.000 zur Blockierlösung gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter konstanter Bewegung inkubiert. Abschließend fanden vier weitere Waschschriffe in TBS-Tween/Triton-Puffer statt.

Zur Detektion wurden 2 ml ECL-Plus tropfenweise auf die Membran gegeben, für 1 Minuten manuell geschüttelt und nach Lufttrocknung in Klarsichtfolie verpackt. Anschließend wurde ein spezieller Chemilumineszenzfilm aufgelegt und dieser in der Dunkelkammer belichtet. Für optimale Resultate wurde die Expositionszeit zwischen 30 Sekunden und 45 Minuten variiert.

## **D 2.4 Nachweis spezifischer Genexpression mittels qRT-PCR und Microarray**

### **D 2.4.1 Quantitative RT-PCR**

#### **D 2.4.1.1 RNA-Isolierung**

Zur vollständigen Lyse der Zellen fand der RLT-Lysis-Puffer Verwendung. Dieser besteht aus RLT-Puffer sowie  $\beta$ -Mercaptoethanol (Verhältnis 100:1). Die Total-RNA-Isolation konnte entweder direkt im Anschluss an die Lyse oder auch nach Auftauen der Zellen, die lysiert bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden, durchgeführt werden. Zur Isolation wurde der RNeasy Mini Kit (Firma Qiagen) verwendet. Nach Zugabe des Lysats auf eine mitgelieferte Qia-Shredder-Säule wurde diese 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Darauf folgte die Zugabe von 1 Vol (=350  $\mu\text{l}$ ) 70 %igem EtOH sowie eine gründliche Vermischung der beiden Volumina. Das Gesamtvolumen (700  $\mu\text{l}$  Lösung) wurde danach auf eine Zentrifugationssäule, die in einem 2 ml Reaktionsgefäß steckte, überführt und für 15 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das abzentrifugierte Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer auf die Zentrifugationssäule gegeben, diese 15 Sekunden zentrifugiert (Waschschrift 1) und das Eluat wiederum verworfen. Der folgende Schritt war notwendig, um etwaige DNA-Kontaminationen durch eine DNase-Behandlung zu entfernen. Die DNase-Lösung bestand je Probe aus 10  $\mu\text{l}$  DNase I Stocklösung und 70  $\mu\text{l}$  RDD-Puffer. Nach der Zugabe dieses DNase-Inkubationsmixes (80  $\mu\text{l}$ ) wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zunächst 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer auf die Zentrifugationssäule gegeben und nach einer Zentrifugation von 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit (Waschschrift 2) wurde das Eluat mitsamt dem Sammelgefäß verworfen. Nachdem die Säule auf ein neues Sammelgefäß transferiert worden war, wurden 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer zugegeben und 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und der Schritt wiederholt. Danach wurde die Säule mit Sammelgefäß 1 Minuten lang trocken zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Zentrifugationssäule auf ein neues Sammelgefäß aufgesetzt. Für die Elution der RNA von der Säule wurden 50  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser auf die Zentrifugationssäule gegeben. Nach einminütiger Inkubation erfolgte hierzu ein Zentrifugationsschritt (2 Minuten, maximale Geschwindigkeit).

Direkt im Anschluss wurde die optische Dichte (OD) der Lösung im Spektralphotometer vermessen und durch den Vergleich verschiedener Absorptionsspektren unterschiedlicher Wellenlänge auf Sauberkeit und Menge des Lysates geschlossen. Das Photometer der Firma Eppendorf misst Absorptionen bei 230 nm (Phenol), 260 nm (Nukleinsäuren),

280 nm (Protein) sowie 320 nm (Trübung). Idealerweise sollte die OD 260 (OD = optische Dichte) zwischen 0,1 und 1,0 liegen, was bei diesen Proben erfüllt wurde. Bei einem Quotienten von  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  zwischen 1,8 und 2,2 kann von einer proteinfreien RNA-Lösung ausgegangen werden.  $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$  größer 2 bedeutet, dass die Probe frei von Phenolen ist.

### **D 2.4.1.2 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurde der iScript cDNA Synthesis Kit von BioRad verwendet. Dieser besteht aus einem Puffer, nukleasefreiem Wasser und iScript reverser Transkriptase. Letzteres ist ein vom *moloney murine leukemia virus* (MMLV) abgeleitetes Enzym (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die cDNA von einer einzelsträngigen RNA synthetisiert), das mit einem RNase Inhibitor vermischt ist. Diese reverse Transkriptase ist ein RNase H<sup>+</sup>-Enzym, was eine größere Sensitivität beinhaltet als RNase H<sup>-</sup>-Enzyme. Deshalb reichen schon geringere Mengen RNA zur cDNA-Synthese aus. Der Reaktionsmix enthält außerdem ein Gemisch aus oligo (dT)-Nukleotiden und *random* Hexamere, um die cDNA-Synthese zu initiieren.

In dieser Arbeit wurden RNA-Mengen von 300 – 500 ng eingesetzt. Wurde dabei ein Volumen von 12 µl überschritten, so mussten die Proben eingedampft werden, d. h. durch das Verdampfen von H<sub>2</sub>O bei 50 °C unter Vakuum auf das gewünschte Volumen verringert werden. Zum Volumen der RNA-Lösung wurden außerdem 4 µl 5x iScript Reaktionsmix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase gegeben. Um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erreichen, wurde mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt.

### **D 2.4.1.3 qRT-PCR mittels LightCycler**

**Prinzip:** Die quantitative RT-PCR wurde mit Hilfe des LightCyclers (Roche) durchgeführt. Dabei wird die bei den einzelnen PCR-Zyklen entstandene Produktmenge mit Hilfe des Einbaus eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt, wodurch die Kopienzahl der ursprünglich eingesetzten Matrize quantifiziert werden kann. Es handelt sich bei diesem fluoreszierenden Farbstoff um das sogenannte SybrGreen I. SybrGreen I ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff mit der Summenformel  $C_{32}H_{37}N_4S^+$ . Dies begünstigt eine spezifische Primerbindung während des *Annealing*-Schrittes in jedem PCR-Zyklus. SybrGreen I interkaliert in doppelsträngige DNA-Moleküle unter der Absorption von blauem Licht (Wellenlänge  $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$ ) und der Emission von grünem Fluoreszenzlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ ) (Zipper et al., 2004). Mit zunehmender Zyklenzahl und damit steigenden Mengen an spezifischem doppelsträngigem Produkt nimmt demnach auch die Fluo-

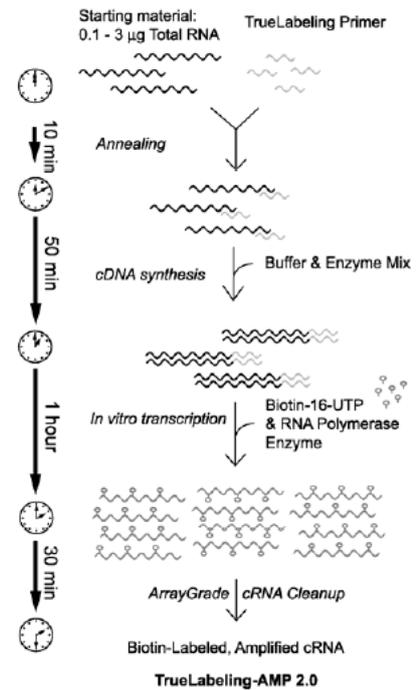
reszenz zu, die im LightCycler-System detektiert werden kann. Über die Verdünnungsreihe eines Standards mit genau definierter Kopienzahl wird eine Eichkurve erstellt, anhand derer bestimmt werden kann, wie viele Kopien der Matrize ursprünglich in der Probe vorlagen. Da SybrGreen I nicht nur in spezifische Produkte, sondern auch in Primerdimere und doppelsträngige Nebenprodukte interkaliert, erfolgte im Anschluss an die quantitative RT-PCR ein Nachweis der Spezifität der generierten Produkte über die Schmelzkurvenanalyse. Die PCR-Bedingungen im LightCycler richteten sich nach den Angaben des für die RT-PCR benötigten Primerset-Herstellers Search-LC ([www.search-LC.de](http://www.search-LC.de)).

Da unterschiedliche Mengen an cDNA eingesetzt wurden und um Ergebnisse einzelner Proben besser vergleichen zu können, wurde zu jeder Probe das sogenannte *Housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Dieses diente als interner Standard, da angenommen wird, dass seine Expression weitgehend unabhängig von externen Faktoren ist. Somit wurde ein Quotient aus der Kopienzahl des untersuchten Gens zu der jeweiligen Kopienzahl des *Housekeeping*-Gens gebildet und in Relation gesetzt.

**Durchführung:** Unabhängig von der Menge der für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA wurde jeweils 1 µl der cDNA-Lösung mit Aqua dest. auf 5 µl aufgefüllt. Dieses Volumen wurde in die dafür vorgesehenen LightCycler-Glas-Kapillaren pipettiert und mit 5 µl eines PCR-Ansatzes ergänzt, was zu einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Kapillare führte. Abschließend wurde jede Kapillare mit einem Plastikstopfen verschlossen. Die PCR-Stocklösung setzte sich aus 3 µl Aqua dest., 1 µl Primer Set und jeweils 1 µl *Light-Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I* der Firma Roche zusammen, das neben SybrGreen I die DNA-Polymerase, PCR-Puffer und dNTPs enthielt. MgCl<sub>2</sub> lag in allen Ansätzen in einer Endkonzentration von 1 mM vor. Anschließend wurden die Kapillaren vier Minuten bei 660 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Lösung mit einem Gesamtvolumen von 20 µl in die Spitze der Kapillaren zu transferieren. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Kapillaren in das dafür vorgesehene Karussell gebracht und in die LightCycler-Apparatur gestellt. Die PCR-Bedingungen blieben bei allen Experimenten unverändert. In jedem LightCycler-Lauf mussten Kontrollen mitgeführt werden, wobei humane cDNA als Positiv- und Aqua. dest. als Negativkontrolle diente.

## D 2.4.2 Osteogenese-Microarray

**Hintergrund:** Mit Hilfe der Microarray-Technik ist es möglich in einem Experiment die Expression vieler Gene zu messen und zu analysieren. In unserem Fall wurden sog. *human osteogenesis OligoGEArray® Microarrays* der Firma SuperArray Biosciences (Frederick, MD, USA) verwendet. Diese *Oligo GEArrays* bestehen aus einer Nylonmembran, auf die 60-mer Oligonukleotidproben mit einer Spezialtechnik so aufgebracht sind, dass diese nicht miteinander in Berührung kommen. Die hier angewandten *Microarrays* enthalten, inklusive der *Housekeeping*-Gene und Negativkontrollen 128 Proben. Die Zielgene umfassen Gene für den Knochenmineralmetabolismus, Ossifikation, Zellwachstum sowie Differenzierung, Moleküle der extrazellulären Matrix, Zelladhäsion, Transkriptionsfaktoren und -regulatoren. Jede Probe ist viermal aufgespottet, woraus ein Expressionsmittelwert abgeleitet werden kann. Diese sind in acht Spalten und 16 Reihen angeordnet.



**Abb. D 4: Darstellung der cRNA-Synthese** (Auszug aus dem Originalprotokoll des Herstellers Superarray).

**Experimentelles Prinzip:** Zunächst wurde aus den Zellen Total-RNA isoliert, wobei derselbe Ansatz verwendet wurde wie unter D 2.4.1 beschrieben. Die Total-RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert. Nach diesem Schritt wurde ausgehend von der cDNA unter Zugabe von RNA-Polymerase Biotin-16-UTP-markierte RNA hergestellt. Nach einem Waschschrift konnte die so markierte *antisense RNA* (aRNA) oder *complementary RNA* (cRNA) weiterverwendet werden (s. Abb. D 4). Für cDNA-Synthese, RNA-Amplifikation und RNA-Markierung wurde der *TrueLabeling-AMP™ Linear RNA Amplification Kit* verwendet.

### D 2.4.2.1 Versuchsdurchführung

#### a) RNA-Denaturierung

In ein PCR-Sammelgefäß wurden 3,0 µg Gesamt-RNA und 1,0 µl G1 Puffer pipettiert und auf ein Gesamtvolumen von insgesamt 10 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Nach 2-3-maligem Auf- und Abpipettieren wurden die Proben kurz zentrifugiert und 10 Minuten

bei 70 °C inkubiert. Um eine Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA zu vermeiden, wurden die Proben sofort danach auf Eis gestellt.

### b) cDNA-Synthese

Für den nächsten Schritt wurden je Probe die in Tabelle D 5 angegebenen Substanzen und Puffer zusammengestellt.

**Tab. D 5: Ansatz zur cDNA-Synthese.**

<b>cDNA Synthesis Master Mix</b>	<b>Pro Arrayprobe (in µl)</b>
RNase-freies H <sub>2</sub> O	4
5x cDNA Synthesis Buffer (G3)	4
RNase Inhibitor (RI)	1
cDNA Synthesis Enzyme Mix (G2)	1
Gesamtvolumen	10

Dieser Reaktionsansatz wurde ebenfalls gemischt, kurz anzentrifugiert und auf Eis gelagert. Zu den 10 µl *cDNA Master Synthesis Mix* wurden 10 µl Reaktionsansatz aus a) hinzugefügt, wiederum 2-3-mal auf- und abpipettiert, anzentrifugiert und 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Danach konnten die Proben entweder bei -20 °C gelagert oder direkt zu Schritt c) übergegangen werden.

### c) cRNA Synthese

Die Reaktionsgefäße wurden zunächst 5 Minuten lang auf 37 °C erwärmt. Für die Durchführung dieses Schrittes war es wiederum nötig, zunächst einen Gesamtreaktionsansatz herzustellen (s. Tab. D 6).

**Tab. D 6: Ansatz für den Amplifikationsansatz.**

<b>Amplification Master Mix</b>	<b>Pro Array (in µl)</b>
2,5x RNA Amplification Buffer (G4)	16
Biotin-16-UTP	2
Amplification Enzyme Mix (G5)	2
Gesamtvolumen	20

Wie bereits beschrieben, wurde dieser Mix gemischt und anzentrifugiert. In jedes PCR-Sammelgefäß wurden dann 20 µl hinzugegeben, was zu einem Gesamtvolumen von 40 µl führte. Dieses wurde mindestens 4 Stunden bei 37 °C erwärmt.

#### **d) cRNA Reinigung**

Um die cRNA aufzureinigen zu können, wurden nun 60 µl RNase-freies Wasser zu jeder Probe pipettiert, dieses Volumen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 350 µl *lysis & binding buffer* (G6), abermaligem Mischen und Anzentrifugieren wurden sofort 350 µl 100 %iges EtOH beigemischt und der gesamte Ansatz auf eine Zentrifugationssäule übertragen. Nachdem diese auf ein Sammelgefäß aufgesetzt worden war, wurde sie ~30 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und 600 µl *working solution* (G17) hinzugefügt. Danach wurde wiederum ~30 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und 200 µl des Puffers G17 zugegeben. Diesmal erfolgte die Zentrifugation für ~3 Minuten bei 11.000 g. Der Durchfluss wurde mitsamt Sammelgefäß entsorgt und die Säule auf ein Elutionsgefäß übersetzt. Nun wurden 50 µl RNase-freies Wasser auf das Zentrum der Säule pipettiert, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und ~1 Minute bei 8.000 g zentrifugiert. Die aufgereinigte cRNA wurde bei -20 °C aufbewahrt (aus Stabilitätsgründen maximal für 4 Tage).

#### **e) Qualitätskontrolle**

Zur Überprüfung der Qualität wurde 1 µl jeder cRNA-Probe in 49 µl TE-Puffer (pH 8.0) verdünnt. Von den Verdünnungen wurden dann in einem Photometer (Fa. Eppendorf) die optischen Dichten (OD) bei 230, 260 sowie 280 nm vermessen. Die Konzentration der Probe wurde folgendermaßen ermittelt:  $A_{260} \times 40$  (Absorptionskoeffizient von RNA)  $\times 50$  (Verdünnungsfaktor). Die Reinheit der Proben war dann gewährleistet, wenn die Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  jeweils 2.0 oder größer waren.

#### **f) Überprüfung der cRNA Markierungseffizienz**

In einem weiteren Test wurde die Markierungseffizienz der cRNA überprüft, d. h. es wurde getestet, bis zu welchem Verdünnungsgrad eine Detektion möglich war. Zunächst wurde 1 µl der biotinylierten cRNA zu 19 µl 1 x Agarosegel Ladepuffer (1:20 Verdünnung) gegeben. Gleichzeitig wurde eine Verdünnungsreihe vorbereitet, indem jeweils 15 µl des 1 x Agarosegel Ladepuffers in ein Sammelgefäß gegeben wurden. Von der ursprünglichen 1:20-Verdünnung wurden 5 µl zu 15 µl im ersten Reaktionsgefäß pipettiert, nach mehrmaligem Mischen 5 µl in das nächste Reaktionsgefäß usw. Insgesamt wurde der Schritt viermal vollzogen. Damit erhielt man eine Verdünnungsreihe von 1:80, 1:320, 1:1280 und 1:5120. Von diesen vier Verdünnungen wurde jeweils 1 µl auf eine positiv geladene HyBond Nylonmembran aufgetragen, ca. 20 Minuten luftgetrocknet und mittels der Chemilumineszenzdetektion (Beschreibung siehe C 2.4.3 i) nachgewiesen. War eine Probe bei einer Verdünnung von 1:1280 oder sogar bei 1:5120 sichtbar, konnte davon ausgegangen werden, dass der Microarray ebenfalls gute Signale lieferte.

### **g) Prä-Hybridisierung**

Zunächst wurde die Membran mit 5 ml deionisiertem H<sub>2</sub>O im mitgeliefertem Hybridisierungsröhrchen angefeuchtet und anschließend für > 5 Minuten invertiert stehen gelassen. Gleichzeitig wurde die GEHyb-Hybridisierungslösung im Wasserbad auf 60 °C erwärmt und während dieses Vorgangs einige Male zur gleichmäßigen Erwärmung gedreht. Nach Entfernen des Wassers aus dem Hybridisierungsröhrchen wurden 2 ml der erwärmten Hybridisierungslösung hinzugegeben, kurz gemischt und für 1-2 Stunden unter kontinuierlichem Schütteln im Hybridisierungssofen bei 60 °C inkubiert.

### **h) Hybridisierung**

750 µl erwärmte Hybridisierungslösung wurden mit 6 µg der Biotin-markierten cRNA vermischt. Nach Entfernung der Prä-Hybridisierungslösung wurde dieser Reaktionsansatz hinzugegeben und wiederum bei 60 °C unter kontinuierlichem Rotieren über Nacht im Hybridisierungssofen inkubiert.

Für die nun folgenden Waschschriffe mussten zuvor die Waschlösungen 1 (2 x SSC, 1 % SDS; Herstellung: 10 ml 20 x SSC, 5 ml 20 % SDS, 85 ml ddH<sub>2</sub>O) und 2 (0,1 x SSC, 0,5 % SDS; Herstellung: 0,5 ml 20 x SSC, 2,5 ml 20 % SDS, 97 ml ddH<sub>2</sub>O) auf 60 °C erwärmt werden. Die Waschschriffe erfolgten wiederum für jeweils 15 Minuten im Hybridisierungssofen, zunächst mit 5 ml Waschlösung 1 und anschließend mit 5 ml Waschlösung 2. Währenddessen musste sorgsam darauf geachtet werden, dass die Membran im Hybridisierungsröhrchen verblieb, um ein Austrocknen zu vermeiden. Der Hybridisierungsreaktionsansatz konnte bei -20 °C für einen weiteren Microarray aufbewahrt werden.

### **i) Chemilumineszenz-Nachweis**

Gleichzeitig zum letzten Waschschriff erfolgte die Erwärmung der *GEAblocking Solution Q* auf 37 °C im Wasserbad. Nachdem die Waschlösung 2 verworfen worden war, wurden 2 ml der vorgewärmten *GEAblocking Solution Q* zugegeben und 40 Minuten lang schüttelnd inkubiert. Zur selben Zeit wurde der 5 x Buffer F auf 1 x mit Aqua dest. verdünnt. Pro Array waren dabei 16 ml zum Waschen und weitere 2 ml zur Verdünnung der Phosphatase-konjugierten Streptavidin-Lösung (AP-SA) notwendig. AP-SA wurde dabei in einer Verdünnung von 1 : 8.000 verdünnt. Nach Verwerfen der Blockierlösung Q wurden 2 ml der AP-SA Buffer F Lösung zugegeben und 10 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgten vier Waschschriffe mit je 4 ml 1x Buffer F für 5 Minuten. Danach wurde noch zweimal mit 3 ml Buffer G gewaschen und zum Schluss erfolgte die Zugabe von 1,0 ml des Chemilumineszenzsubstrats CDP-Star für 5 Minuten.

Nachdem die Membran vollständig an der Luft getrocknet war, wurde sie in Frischhaltefolie verpackt und mittels Auflegen eines speziellen Chemilumineszenzfilms in der Dunkelkammer belichtet. Um optimale Belichtungsergebnisse zu erzielen, wurde die Expositionszeit zwischen 2 und 30 Minuten variiert.

### **D 2.4.2.2 Bioinformatische Versuchsauswertung**

**Prinzip:** Die Microarrays werden eingescannt und mit Hilfe der Scanner-Software „Image Master Labscan“ der Firma Amersham Biosciences bearbeitet. Die Scanner-Einstellungen betragen 1.200 dpi für die Auflösung und die Sicherung der Arrays erfolgt als *8-bit* Bilddatei. Die primäre Auswertung der Microarray-Rohdaten wird mit Hilfe des Analyseprogramms ArrayVision Version 6.0 der Firma Imaging Research, USA durchgeführt. Das Programm arbeitet mit allgemeingültigen *Tif*-Formaten (Bilddateien), die in separate Kanäle (*Channels*) eingeladen werden. Innerhalb von ArrayVision kann für die Auswertung ein Analyseprotokoll erstellt werden, dessen Festlegung im *Protocol Editor* geschieht. Mittels des *Protocol Managers* können die für den jeweiligen Versuch abgespeicherten Protokolle ausgewählt und verwendet werden. In einem abschließenden Schritt berechnet ArrayVision die sich aus den zuvor festgelegten Parametern ergebenden Daten.

**Durchführung:** Die eingelesenen und im *Tif*-Format abgespeicherten Bilder der einzelnen Arrays wurden in das Softwareprogramm eingeladen, wobei alle Bilder nach dem gleichen Prinzip bearbeitet wurden. Neben Informationen über die Struktur der Arrays (Anordnung in Reihen und Spalten) und räumlichen Parametern (Abstände der Spots) beinhaltete das Analyseprotokoll aufgeführte Maßeinheiten (Intensität jedes einzelnen Spots, Hintergrund- und Referenzwerte) sowie das Format, in welches die Daten exportiert werden sollten. Um mit Hilfe des Programms eine korrekte Bewertung der Intensität jedes einzelnen Spots zu erlangen, musste eine Schablone für die Anordnung der Messpunkte angepasst werden. Diese Schablone bestand aus einer kreisförmigen Umrahmung jedes Messpunktes, wobei die einzelnen Dimensionen im Analyseprotokoll festgelegt wurden. Um eine korrekte Quantifizierung für jeden Spot zu erreichen, musste die Schablone exakt auf jedem Spot positioniert sein. Nach Festlegung aller benötigten Parameter berechnete ArrayVision die erforderlichen Daten und führte diese in einer Datentabelle in Excel (Microsoft Office) auf.

## D 2.5 Statistik

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Versuche im Triplikate durchgeführt. Vorteil dieser Vorgehensweise ist es, dass aus den Resultaten ein Mittelwert mitsamt einer Standardabweichung bestimmt werden kann. Zur Auswertung wurde ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) verwendet. In den Abbildungen wurden Mittelwert und Standardabweichungen graphisch aufgetragen. Aus diesen Werten ließ sich mittels des T-Tests ermitteln, ob die Abweichungen der Proben von den Kontrollzellen signifikant \* ( $p < 0,05$ ) oder hochsignifikant \*\* ( $p < 0,01$ ) waren.

Um endogene stoffwechselbedingte Schwankungen des jeweiligen Zielgens auszuschließen, wurden zusätzlich sog. *Housekeeping*-Gene (GAPDH,  $\beta$ -Actin) gemessen und ein Quotient aus Zielgen und *Housekeeping*-Gen gebildet.

## **E Ergebnisse**

### **E 1 Chemische Differenzierungsinduktion der hMSC in den Basalmedien DMEM und MSCBGM**

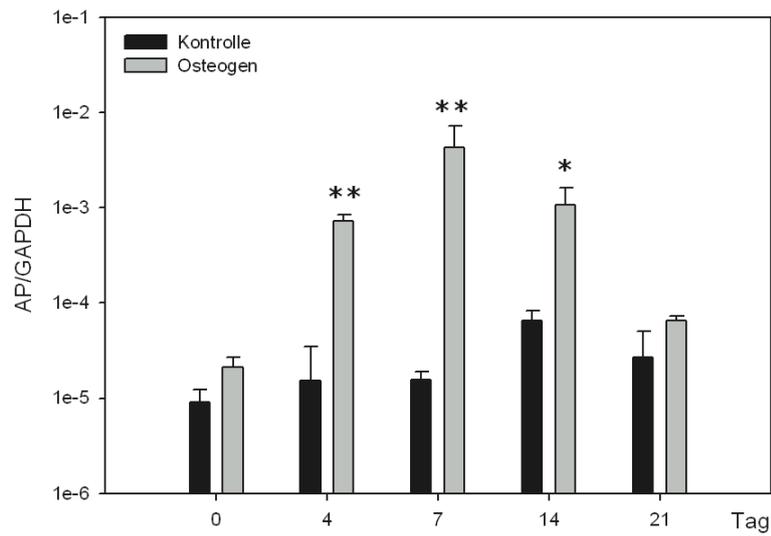
Um den Einfluss von Kulturmedien auf die chemische Differenzierungsinduktion zu evaluieren, wurden die Basalmedien DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) und MSCBGM (mesenchymales Stammzellmedium) eingesetzt und die mRNA-Expression spezifischer Marker für die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung von hMSC untersucht sowie entsprechende histochemische Färbungen der differenzierten Zellen durchgeführt.

#### **E 1.1 Osteogene Differenzierung**

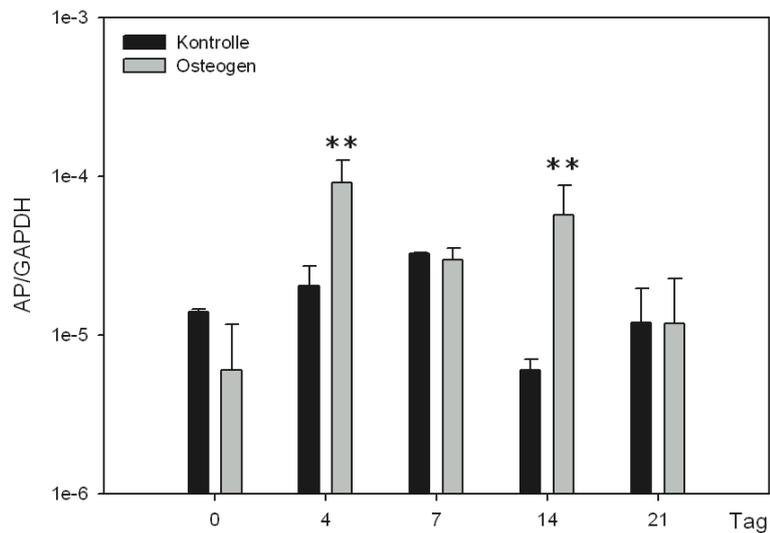
Wie bereits unter D 2.1.4 beschrieben, wurden hMSC in 12-Kavitäten-Kulturschalen ausgesät und über 4, 7, 14 und 21 Tage osteogen differenziert. Von diesen Proben wurde nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels der LightCycler-Technologie die Expression der Alkalischen Phosphatase (AP) und des *Housekeeping*-Gens GAPDH bestimmt. Dabei wurden die AP-Werte in Relation zu den jeweiligen GAPDH-Werten gesetzt.

Aufgrund der großen Expressionsunterschiede zwischen Kontrollansatz und osteogener Differenzierung in DMEM-Medium wurde für die y-Achse zur besseren Übersicht die logarithmische Darstellung gewählt (Abb. E 1). Ausgehend von Tag 0, an dem alle Zellen in etwa gleichviel mRNA für AP produzierten, wiesen die osteogen differenzierten Zellen ab Tag 4 bis zu Tag 14 eine vielfach höhere Expression auf. Am Tag 7 erreichte dieser Unterschied sein Maximum mit einer 280-fachen Induktionsrate. Ab Tag 14 verringerte sich dieser Unterschied wieder, bis die AP-Expression der differenzierten Proben am Tag 21 beinahe wieder ihr Ausgangsniveau erreicht hatte.

Grundsätzlich konnte bei der Verwendung von MSCBGM als Basalmedium ein ähnlicher induktiver Verlauf der AP beobachtet werden (Abb. E 2). Allerdings waren die Unterschiede zwischen osteogen differenzierten hMSC und Kontrollzellen weniger stark ausgeprägt (maximal 9,54-facher Anstieg am Tag 14). Zudem war ein signifikanter Einbruch des frühen osteogenen Markers AP am Tag 7 unter das Niveau der nicht differenzierten Zellen zu beobachten.



**Abb. E 1: Osteogene Differenzierung in DMEM-Medium.** Auf der x-Achse aufgetragen sind die Abnahmezeitpunkte in Tagen, die y-Achse stellt das Verhältnis von Zielgen zum *Housekeeping*-Gen GAPDH (Ratio) dar. Am Tag 4, 7 und 14 produzieren die differenzierten Zellen signifikant mehr Alkalische Phosphatase (AP) im Vergleich zu den Kontrollzellen.



**Abb. E 2: Osteogene Differenzierung in MSCBGM-Medium.** Auf der x-Achse aufgetragen sind die Abnahmezeitpunkte in Tagen, die y-Achse stellt das Verhältnis von Zielgen zum *Housekeeping*-Gen GAPDH (Ratio) dar. Am Tag 4 und 14 produzieren die differenzierten Zellen signifikant mehr mRNA für Alkalische Phosphatase (AP) als die Kontrollzellen.

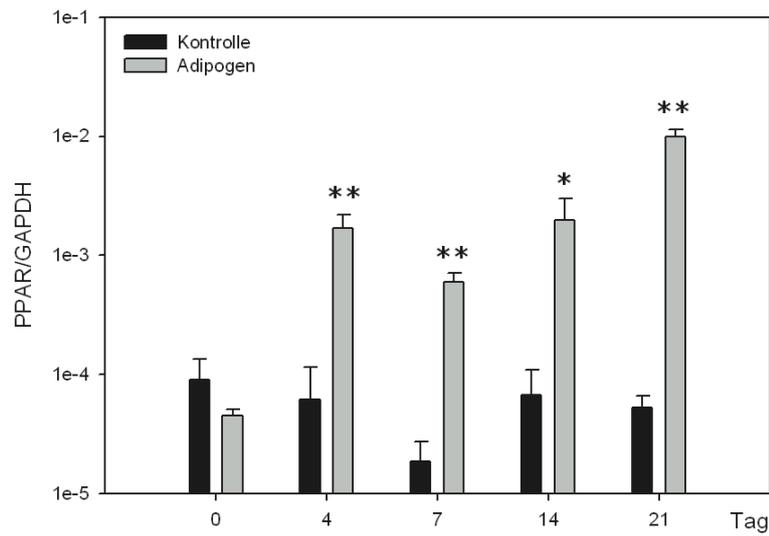
Im Rahmen der Standardabweichung produzierten hMSC, die in DMEM-Medium bzw. MSCBGM-Medium kultiviert worden waren, gleich hohe mRNA-Level von AP am Tag 0.

## E 1.2 Adipogene Differenzierung

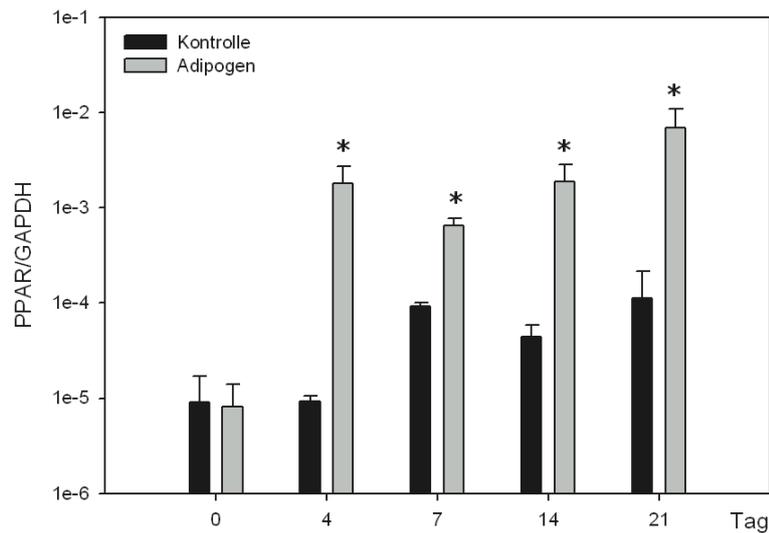
In diesem Versuch wurden hMSC, wie unter E 1.1 beschrieben, in einer 12-Kavitätenkulturschale ausgesät und ebenfalls bis zu 21 Tagen differenziert. Als Kontrollzellen dienten dieselben hMSC, die bei der osteogenen Differenzierung als Referenz herangezogen worden waren. Als Basismedium wurde wiederum DMEM bzw. MSCBGM verwendet. An den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und für quantitative RT-PCR Analysen aufbereitet. Um eine beginnende adipogene Differenzierung der Zellen nachweisen zu können, wurde der adipogene Transkriptionsfaktor PPAR- $\gamma$  gemessen. Damit die Werte untereinander vergleichbar waren, wurden die PPAR- $\gamma$ -Daten auf die Werte des *House-keeping*-Gens GAPDH standardisiert.

Ab Tag 4 zeigte sich im DMEM-Ansatz eine deutlich erhöhte Expression von PPAR- $\gamma$  in adipogen differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten hMSC. Dieser Unterschied nahm im Differenzierungsverlauf noch weiter zu. Ein Maximum der PPAR- $\gamma$ -Expression war am Tag 21 zu beobachten. Hier war PPAR- $\gamma$  190-fach stärker exprimiert als in undifferenzierten hMSC (Abb. E 3).

Grundsätzlich zeigte die PPAR- $\gamma$  Expression in MSCBGM als Basalmedium einen ähnlichen Verlauf. Sie nahm in adipogen differenzierten Zellen stetig zu und stieg von Tag 0 bis Tag 4 um das ca. 200-fache an. Zwischen Tag 4 und Tag 21 nahm sie noch um den Faktor 3,8 zu. Somit bestand der maximale Unterschied im Vergleich zu undifferenzierten Zellen bereits an Tag 4. Ein weiterer Unterschied wies der Expressionsverlauf von PPAR- $\gamma$  in den Kontrollzellen auf. Diese präsentierten an Tag 7 einen ungewöhnlich hohen Wert. An den übrigen Zeitpunkten (Tag 4, 14 und 21) zeigte sich jeweils eine deutlich geringere Induktion von PPAR- $\gamma$  (Abb. E 4).



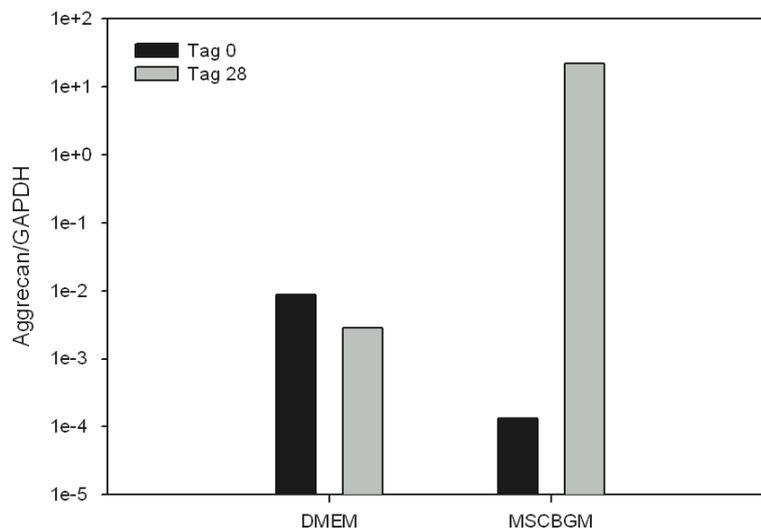
**Abb. E 3: Adipogene Differenzierung in DMEM-Medium.** Die Differenzierung wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt. Die Expression von PPAR- $\gamma$  wurde auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert. Kontrollen sind in schwarz, differenzierte Zellen in hellgrau dargestellt. Ab Tag 4 besteht eine signifikante Erhöhung des Markers bei adipogen differenzierten Zellen.



**Abb. E 4: Adipogene Differenzierung in MSCBGM-Medium.** Die Differenzierung wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt. Kontrollen sind in schwarz, differenzierte Zellen in hellgrau dargestellt. An Tag 4, 7, 14 und 21 zeigte sich, dass adipogen differenzierte Zellen signifikant höhere Expressionen von PPAR- $\gamma$  (normiert auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH) aufweisen als die jeweiligen Kontrollzellen.

### E 1.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung der hMSC wurde wie unter D 2.1.4 beschrieben in Kulturröhrchen durchgeführt. Zur Beurteilung des Differenzierungsstatus wurde das Expressionsniveau von Aggrecan bestimmt. Aggrecan ist ein Proteoglykan, das vor allem in Knorpel zu finden ist und aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat besteht. Es bildet einen Komplex mit Hyaluronsäure und Kollagen-Typ-II-Fasern. Die Bestimmung erfolgte mittels qRT-PCR im LightCycler. Zur Standardisierung wurde das *Housekeeping*-Gen GAPDH bestimmt. Auffällig waren die hohe Expression von Aggrecan in DMEM an Tag 0 sowie ein leichter Abfall am Tag 28 (Abb. E 5). Bei der Verwendung von MSCBGM als Basalmedium war eine deutlich niedrigere Expression von Aggrecan an Tag 0 zu beobachten. Demgegenüber stand eine enorme Zunahme der Aggrecan-Expression an Tag 28 (Abb. E 5). Berechnet man den Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 28, so lässt sich ein  $1,64 \times 10^5$ -faches Ansteigen der Aggrecanexpression feststellen.



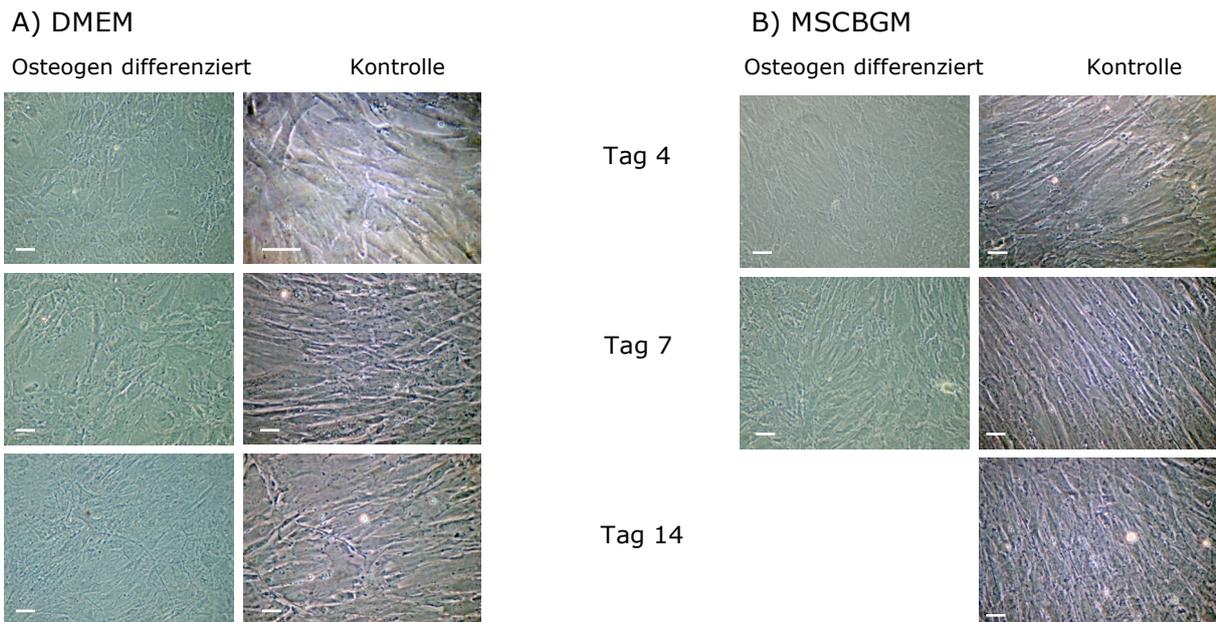
**Abb. E 5: Chondrogene Differenzierung in MSCBGM und DMEM-Medium.** Die Darstellung zeigt einen starken Anstieg des Markers Aggrecan von Tag 0 auf Tag 28 in Zellen mit MSCBGM als Basalmedium. Dagegen ist die Expression von Aggrecan in DMEM an Tag 0 zunächst höher, fällt aber am Tag 28 wieder leicht ab. Die Aggrecan-Werte sind auf die Werte des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

## E 1.4 Histochemische Färbung differenzierter hMSC

### E 1.4.1 Van Kossa-Färbung osteogen differenzierter hMSC

An den jeweils untersuchten Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung erfolgte die sofortige van Kossa-Färbung. In den Abb. E 6A + B (linke Spalte) sind die Tage 4 – 14 während der osteogenen Differenzierung abgebildet. Deutlich erkennbar war zum einen, dass die Zellen mit der Dauer der Differenzierung ihre Morphologie veränderten. Dies kam durch das merklich kantigere und schroffere Erscheinungsbild zum Ausdruck, was auch auf vermehrte Kalziumeinlagerungen schließen ließ. Zwischen Tag 14 und 21 verloren die osteogen differenzierten hMSC zunehmend ihre Adhäsionsfähigkeit und organisierten sich zu osteogenen Zellhaufen. Ein Unterschied bezüglich der Basalmedien DMEM bzw. MSCBGM war nicht ersichtlich.

Im Vergleich dazu war bei den jeweils undifferenzierten hMSC, die in DMEM bzw. MSCBGM kultiviert wurden, nur eine Zunahme der Zellzahl im Sinne einer Proliferation zu erkennen. Die hMSC behielten ihr spindelförmiges, langgestrecktes Aussehen (Abb. E 6A + B, rechte Spalte).



**Abb. E 6: Differenzierungs- und Proliferationsstatus von humanen mesenchymalen Stammzellen.** Gezeigt sind die Zeitpunkte Tag 4, Tag 7 sowie Tag 14. Balken = 50 µm.

**A) DMEM:** hMSC wurden entweder mit chemischen Zusätzen osteogen differenziert (links) oder in reinem Basalmedium (DMEM) über denselben Zeitraum kultiviert (rechts). Der Nachweis der Differenzierung erfolgte durch van Kossa-Färbung.

**B) MSCBGM:** Analog zu A) erfolgte hier die Differenzierung bzw. Kultivierung der hMSC in MSCBGM als Basismedium. An Tag 14 konnte keine osteogen differenzierte Probe ausgewertet werden, da diese bakteriell verseucht war.

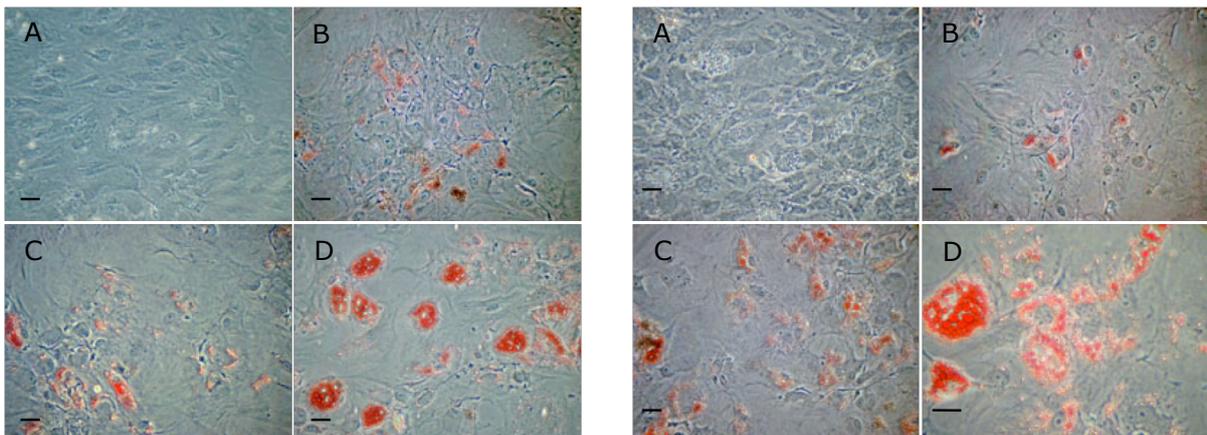
### E 1.4.2 Oil-Red-O-Färbung adipogen differenzierter hMSC

Mit der Oil-Red-O-Färbung lässt sich die adipogene Differenzierung durch die spezifische Anfärbung intrazellulärer Fettvakuolen nachweisen. Die Abb. E 7A und B zeigen die Zeitpunkte Tag 4 (A), 7 (B), 14 (C) sowie 21 (D). Dabei ist zu erkennen, dass zunächst an Tag 4 keine Anfärbung der Fettvakuolen möglich war.

Ab Tag 7 erschienen die ersten rot gefärbten Fettvakuolen, die zunächst schwach (Tag 7), später sehr deutlich und kräftig (Tag 21) ausgeprägt waren. Mit fortschreitender Differenzierung nahmen die Vakuolen in den einzelnen Zellen nicht nur an Größe zu, sondern immer mehr Zellen bildeten auch Fettvakuolen aus. Dies führte zu einem homogenen Verteilungsmuster der rot angefärbten Fettvakuolen. Am Tag 21 waren etwa 70 % der hMSC soweit differenziert, dass sie mit zahlreichen roten Fettvakuolen gefüllt waren. Diese hier beschriebenen Effekte liessen sich sowohl bei Verwendung von DMEM (Abb. E 7A) als auch von MSCBGM (Abb. E 7B) als Basismedium beobachten.

A) DMEM

B) MSCBGM



**Abb. E 7: Oil-Red-O-Färbung adipogen differenzierter hMSC.**

**A) DMEM:** DMEM diente als Basismedium. Die Aufnahmen erfolgten in 20-facher Vergrößerung am Tag 4 (A), Tag 7 (B), Tag 14 (C) und Tag 21 (D). Balken = 50  $\mu\text{m}$ .

**B) MSCBGM:** MSCBGM diente als Basismedium. Die Aufnahmen erfolgten in 20-facher Vergrößerung am Tag 4 (A), Tag 7 (B) und Tag 14 (C) sowie in 40-facher Vergrößerung am Tag 21 (D). Balken = 50  $\mu\text{m}$ .

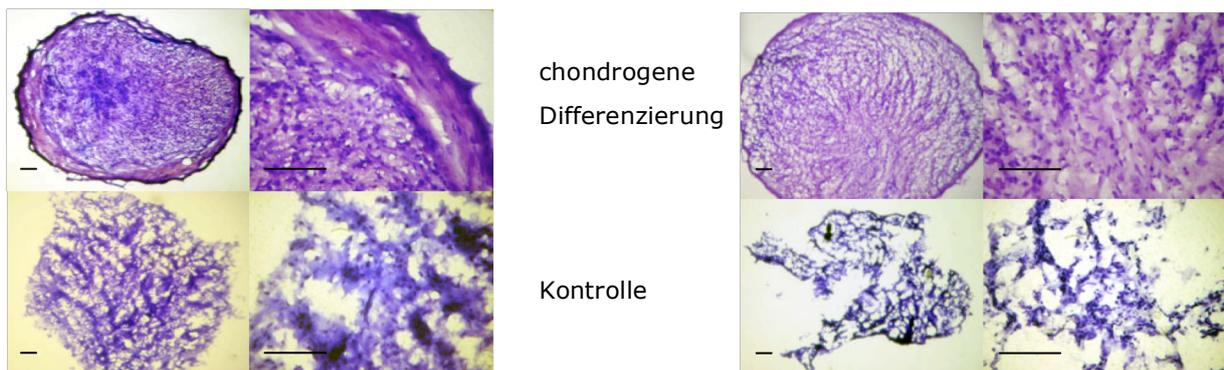
### D 1.4.3 Toluidinblau-Färbung chondrogen differenzierter hMSC

Nach der Durchführung der chondrogenen Differenzierung, wurden die Zellsedimente mittels der Gefriertechnik zu Schnitten verarbeitet und anschließend mit Toluidinblau angefärbt. Als Kontrolle dienten hier Zellsedimente, die über denselben Zeitraum im jeweiligen identischen Kulturmedium jedoch ohne Zusätze kultiviert worden waren. Die Schnittbilder chondrogen differenzierter hMSC lassen eine blau-violette Färbung mit dunkelblau leuchtenden Zellkernen erkennen. Die Zellsedimente umschließend hatte sich eine Membran aus faserartigen Strukturen gebildet (besonders deutlich in Abb. 8A rechts oben). Auf den Kontrollbildern war eine ähnliche Struktur nicht ersichtlich. Hier zeigten die Zellen ein deutlich aufgelockerteres Erscheinungsbild und waren nicht zu einer festen Struktur assoziiert.

Wurden die Differenzierungsversuche mit DMEM als Basismedium durchgeführt (Abb. E 8A), so entstand eine wesentlich breitere äußere Membran sowie ein dichter gepacktes Zellsediment im Inneren, das einen hyalinen Eindruck hinterlässt. Wurde hingegen MSCBGM als Kultivierungsmedium verwendet (Abb. E 8B), so entstanden eher größere und luftigere Schnittbilder, was sich auch in den Kontrollen zeigte.

A) DMEM

B) MSCBGM



**Abb. E 8: Toluidinblau-Färbung chondrogen differenzierter hMSC.** Die obere Reihe zeigt chondrogen differenzierte Zellen, mit einer Ausschnittsvergrößerung auf der rechten Seite. Unten ist die ebenfalls gefärbte Kontrolle zu sehen. Balken = 100  $\mu\text{m}$ .

**A) DMEM:** obere Reihe nach 28-tägiger Kultivierung in chondrogenem Differenzierungsmedium; in der unteren Reihe Kultivierung im Basismedium DMEM über denselben Zeitraum als Kontrolle.

**B) MSCBGM:** Analog zu A) in der oberen Reihe chondrogen differenzierte hMSC, in der unteren Reihe die Kontrolle. Zur Kultivierung wurde das Basismedium MSCBGM verwendet.

## **E 2            Alternative osteogene Differenzierung von hMSC**

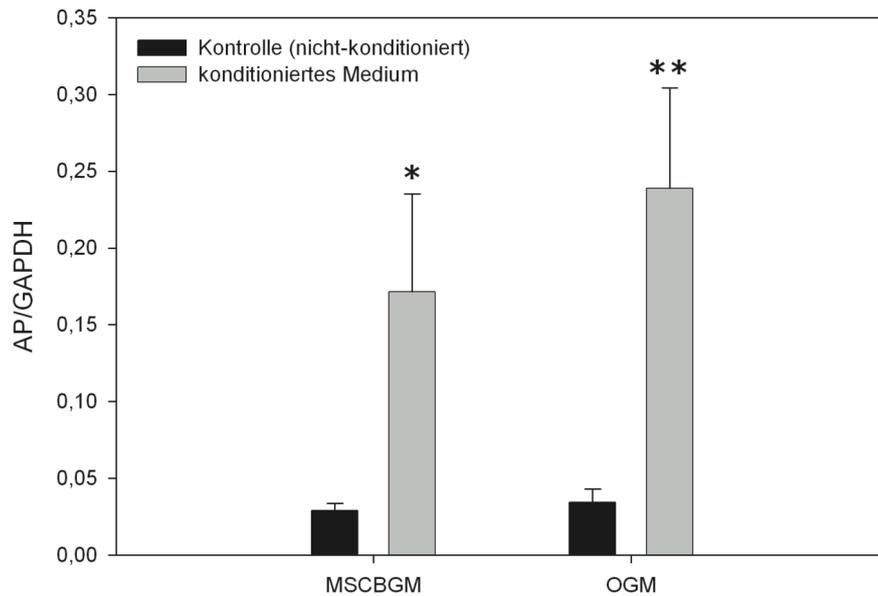
Als alternative osteogene Differenzierung sollten hier Ansätze dienen, die auf den Einsatz von supplementierten, chemischen Zusätzen zum Medium verzichteten. So wurde zum einen durch Osteoblasten konditioniertes Medium verwendet.

Zum anderen sollte untersucht werden, ob die indirekte Kokultur von hOB und hMSC, ebenfalls ohne chemische Zusätze, einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Stammzellen hatte.

### **E 2.1            Kultivierung von hMSC in konditioniertem Osteoblasten-Wachstumsmedium (kOGM)**

In einem Vorversuch wurde zunächst geprüft, ob eine 14-tägige Kultivierung von hMSC mit mesenchymalem Stammzellmedium (MSCBGM) bzw. Osteoblasten-Wachstumsmedium (OGM) nicht-konditioniert bzw. konditioniert durch humane Osteoblasten (hOB) einen Einfluss auf das mRNA-Expressionsmuster von Alkalischer Phosphatase (AP) zeigt. Wie in Abb. E 9 zu sehen ist, stieg die Expression von AP nach Kultivierung der hMSC in beiden Medien signifikant an, nachdem die Medien durch Osteoblasten konditioniert worden waren.

Vergleicht man die unterschiedlichen Basalmedien untereinander, so ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Aus diesem Grunde wurden für alle folgenden Versuche, die mit konditioniertem Medium oder in indirekter Kokultur durchgeführt wurden, OGM verwendet. Ausschlaggebendes Kriterium dafür war, dass sich humane Osteoblasten besser in OGM kultivieren ließen.

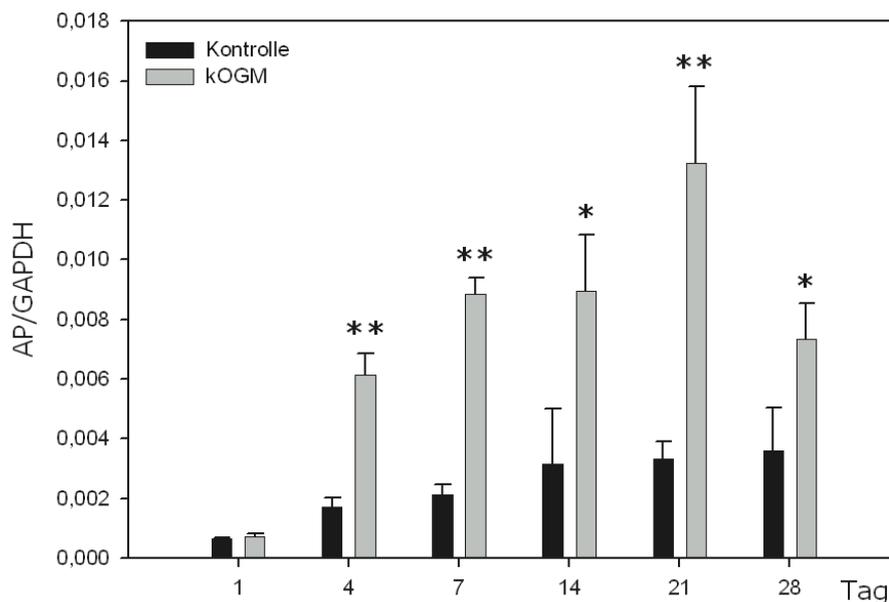


**Abb. E 9: Vergleich der mRNA-Expression von Alkalischer Phosphatase (AP) nach Kultivierung von hMSC in MSCBGM bzw. OGM mit und ohne Osteoblasten-Konditionierung.** Gemessen wurden die Expressionslevel von Alkalischer Phosphatase (AP) nach Normierung auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. Es zeigte sich jeweils eine signifikante Induktion von AP, nachdem die Zellen in hOB-konditioniertem MSCBGM- bzw. OGM-Medium kultiviert worden waren. Kontrollen in schwarz, konditioniertes Medium in grau.

Für die weitere Durchführung der Versuche mit konditioniertem Osteoblastenwachstumsmedium (kOGM) wurde eine laborinterne standardisierte Vorgehensweise festgelegt. Diese beinhaltete, dass das Medium fünf Tage durch hOB konditioniert wurde, die bis dahin eine ca. 70 %ige Konfluenz erreicht hatten. Das so konditionierte Medium wurde zweimal pro Woche während der Stammzellendifferenzierung gewechselt.

Um den Differenzierungsverlauf auf molekularer Ebene zu verfolgen, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten das Expressionsniveau verschiedener osteogener Marker mittels qRT-PCR gemessen. Darunter befanden sich frühe osteogene Marker wie Alkalische Phosphatase (AP), Bone Sialoprotein 2 (BSP-2) und Leptin-Rezeptor (LR), die späteren Marker Decorin (DCN) und Osteocalcin (OCN), der osteogene Transkriptionsfaktor (Runx2/Cbfa-1) und die Cysteinprotease Cathepsin K (CTSK).

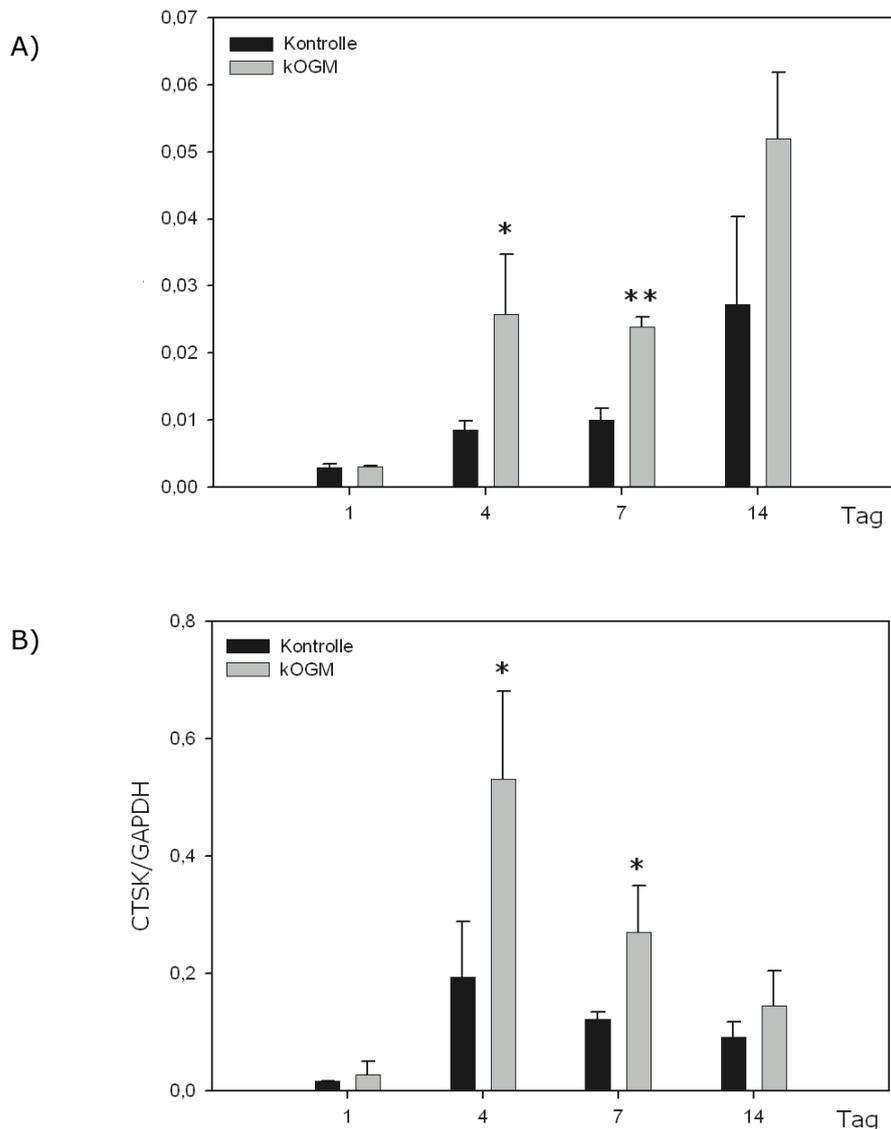
Im Rahmen dieses standardisierten Verfahrens konnte das Ergebnis des Vorversuches bezüglich der AP bestätigt werden. Zu jedem Zeitpunkt beginnend mit Tag 4 war AP im Vergleich zur Kontrolle deutlich induziert mit einer maximalen Induktion auf das 4,3-fache am Tag 7 (Abb. E 10). Die Expression der AP zeigte eine Steigerung bis Tag 21, während sie am Tag 28 wieder leicht abfiel. Vergleichend hierzu wies die AP-Expression in nicht-konditioniertem Medium eine deutlich geringere Zunahme bis zum Tag 28 auf. Zusammenfassend betrachtet war die AP-Expression von hMSC, die in kOGM kultiviert wurden ab Tag 4 immer signifikant höher im Vergleich zu hMSC, die im Kontrollmedium (OGM) gehalten wurden.



**Abb. E 10: Expressionsverlauf von AP nach Kultivierung von hMSC in konditioniertem (kOGM) bzw. nicht-konditioniertem Osteoblasten-Wachstumsmedium.** Eine signifikant höhere Expression von AP-mRNA zeigte sich bei Verwendung von kOGM (grau) im Vergleich zur Kontrolle (nicht-konditioniertes OGM; schwarz) von Tag 4 bis Tag 28. Die Expressionslevel von AP wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Analog zur AP wurden die Expressionsniveaus von Leptin-Rezeptor (LR) und Cathepsin K (CTSK) in mit kOGM- bzw. nicht-konditioniertem OGM kultivierten hMSC bestimmt. Der Leptin-Rezeptor zeigte dabei einen insgesamt ansteigenden Expressionsverlauf, wobei am Tag 4 und 7 eine signifikante Induktion um den Faktor 3,1 bzw. 2,4 durch die Kultivierung der hMSC beobachtet wurde (Abb. E 11A).

Cathepsin K dagegen wies in kOGM kultivierten hMSC einen sprunghaften Anstieg zwischen Tag 1 und Tag 4 um das 18,9-fache auf (Abb. E 11B). Anschließend halbierte sich die Expression von Tag 4 auf Tag 7 und eine zweite Halbierung zeigte sich im Zeitintervall von Tag 7 – 14. Trotz dieses Abflachens war die Expression von CTSK in den Kontrollen am Tag 4 sowie Tag 7 immer noch um das 2,7- bzw. 2,2-fache signifikant niedriger als in den Zellen, die mit kOGM kultiviert wurden.



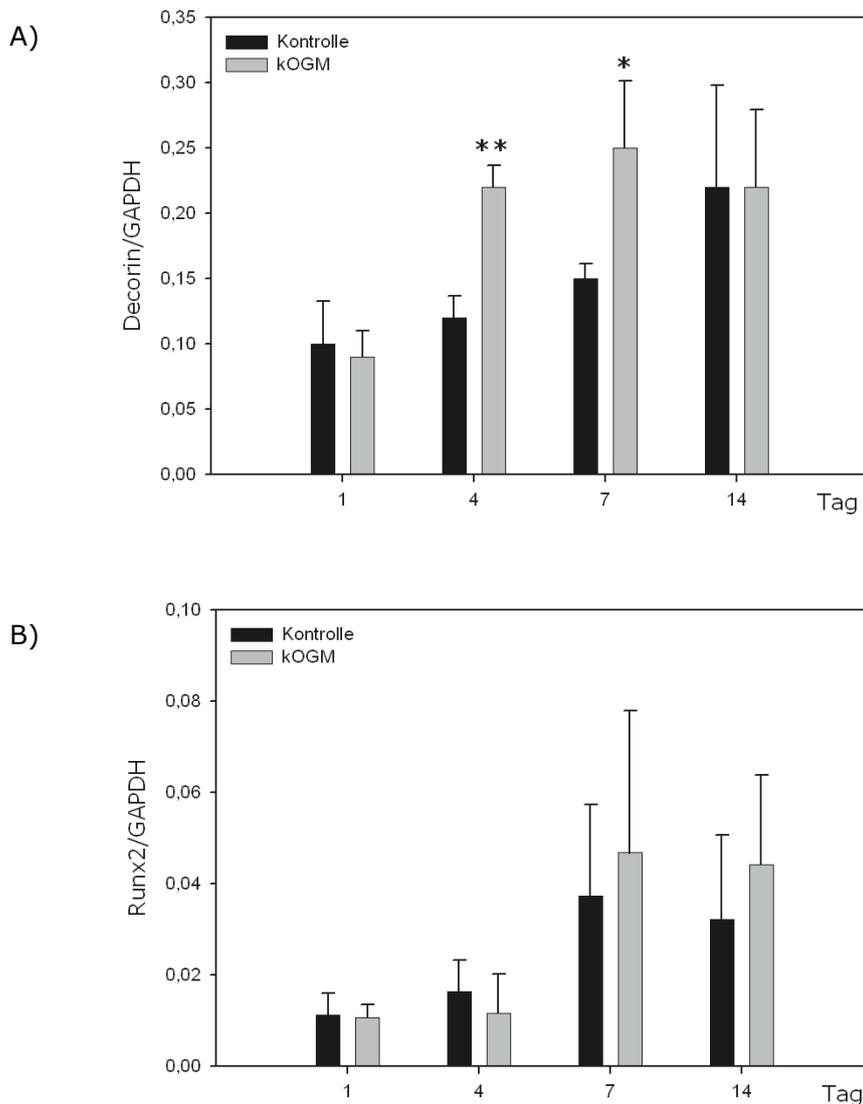
**Abb. E 11: mRNA-Expression von Leptin-Rezeptor bzw. Cathepsin K nach Kultivierung von hMSC in konditioniertem (kOGM) bzw. nicht-konditioniertem Osteoblasten-Wachstumsmedium.**

**A) Leptin-Rezeptor:** Der LR zeigte eine signifikant erhöhte Expression am Tag 4 und 7 nach Kultivierung in kOGM (grau) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz).

**B) Cathepsin K:** Bei CTSK war die Expression am Tag 4 und 7 nach Kultivierung in kOGM (grau) signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (schwarz) und nahm während der späten Phase der osteogenen Differenzierung wieder ab.

Die Expressionslevel von LR und CTSK wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

In Abb. E 12 ist ein genereller Anstieg der Marker über die Zeit, sowohl bei Decorin (DCN) als auch bei Runx2, zu beobachten. Während bei DCN (Abb. E 12A) der durch kOGM induzierte Expressionsanstieg eher kontinuierlich erfolgte und die Kontrollen an Tag 4 und 7 ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau aufwiesen (1,8-/1,7-fach), zeigte Runx2 (Abb. E 12B) einen sprunghaften Anstieg von Tag 4 auf 7 um den Faktor 3. Allerdings blieb im Rahmen der Standardabweichung die Expression von Runx2 in den Kontroll- und kOGM-Proben auf gleichem Niveau.



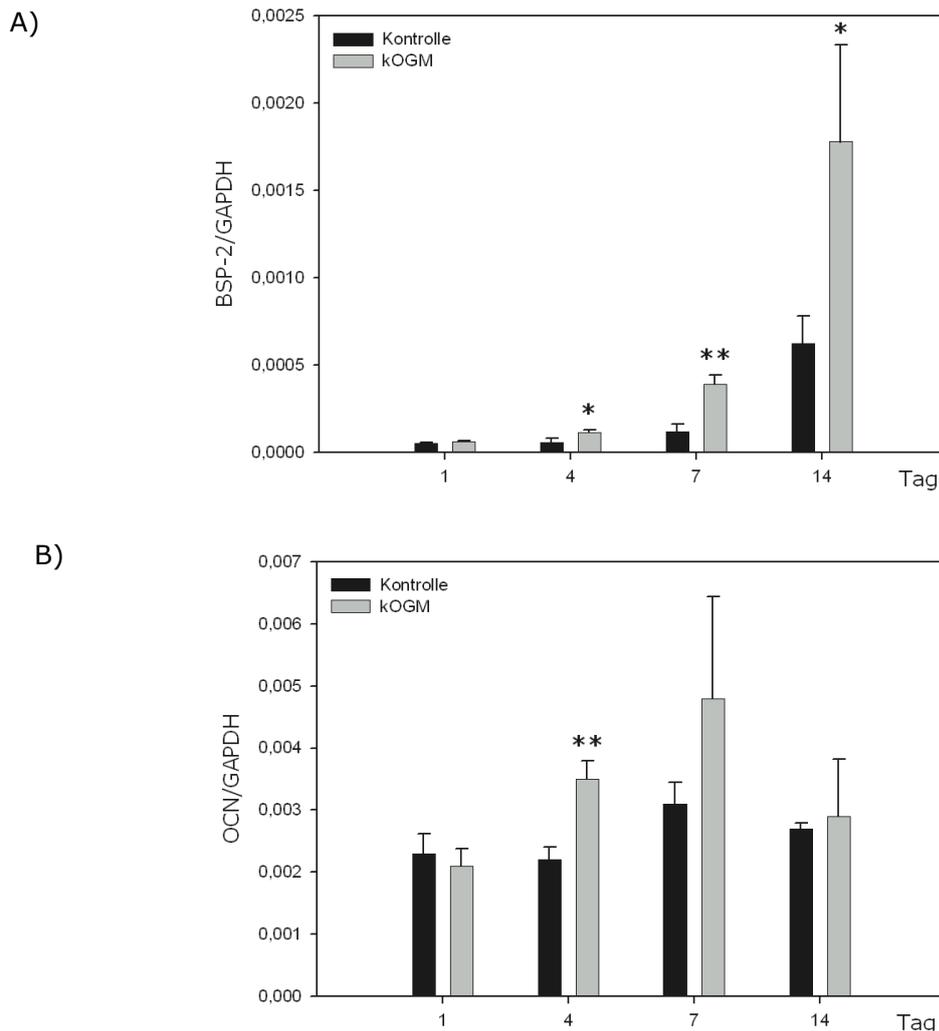
**Abb. E 12: mRNA-Expression von Decorin (DCN) und Runx2 nach Kultivierung von hMSC in konditioniertem (kOGM) bzw. nicht-konditioniertem Osteoblasten-Wachstumsmedium.**

**A) Decorin:** Am Tag 4 und 7 war eine signifikant erhöhte Expression von DCN in mit kOGM kultivierten hMSC (grau) zu beobachten, während sich am Tag 1 und 14 keine Abweichung von den Kontrollen (schwarz) ergaben.

**B) Runx2:** Bei der Runx2-Expression waren zwischen Kontrollzellen (schwarz) und mit kOGM kultivierten Zellen (grau) keine wesentlichen Unterschiede zu detektieren.

Die Expressionslevel von DCN und Runx2 wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Analog der Ergebnisse anderer früher osteogener Marker wie AP stiegen die Expressionen von Bone Sialoprotein 2 (BSP-2) bis Tag 14 deutlich an (Abb. E 13A). Ab Tag 4 war die Kopienzahl von BSP-2 bei hMSC, die mit konditioniertem OGM behandelt worden waren, signifikant höher im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Dabei ergaben sich Induktionswerte von 1,9-fach (Tag 4) bis 3,2-fach (Tag 14). Anders gestaltete sich der Verlauf des späten osteogenen Marker Osteocalcin (OCN). Über den Zeitraum von 14 Tagen pendelten die Induktionsraten, wobei nur am Tag 4 ein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen war (Abb. E 13B).



**Abb. E 13: mRNA-Expression von Bone Sialoprotein 2 (BSP-2) und Osteocalcin (OCN) nach Kultivierung von hMSC in konditioniertem (kOGM) bzw. nicht-konditioniertem Osteoblasten-Wachstumsmedium (Kontrolle).**

**A) BSP-2:** Von Tag 4 bis 14 war eine signifikant erhöhte Expression von BSP-2 in mit kOGM kultivierten hMSC (grau) zu beobachten. Sowohl die Expressionen der Kontrollen (schwarz) als auch der stimulierten hMSC (grau) stiegen über den Zeitraum hin an.

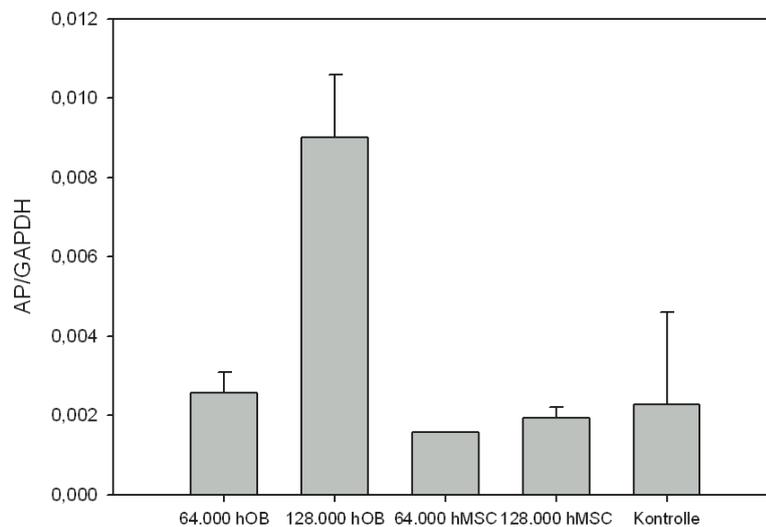
**B) OCN:** Im Rahmen der Standardabweichung variierte das Expressionsniveau von OCN mit Ausnahme von Tag 4, an dem sich bei stimulierten hMSC eine signifikante Expressionssteigerung ergab, nicht.

Die Expressionslevel von DCN und Runx2 wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

## E 2.2 Indirekte Kokultur von hMSC und hOB

In einem Vorversuch im Transwellsystem wurden hMSC über einen Zeitraum von einer Woche mit hOB kokultiviert. Für die Kokultur der hMSC wurden zum einen hOB in unterschiedlicher Anzahl in das untere Kompartiment eingesetzt (64.000 und 128.000 pro Kavität). Zum anderen wurden hMSC statt der hOB in derselben Anzahl eingesetzt, so dass hMSC mit hMSC kokultiviert wurden. Als Negativkontrolle diente ein Transwellsystem, in dem nur das obere Kompartiment mit hMSC besiedelt worden war.

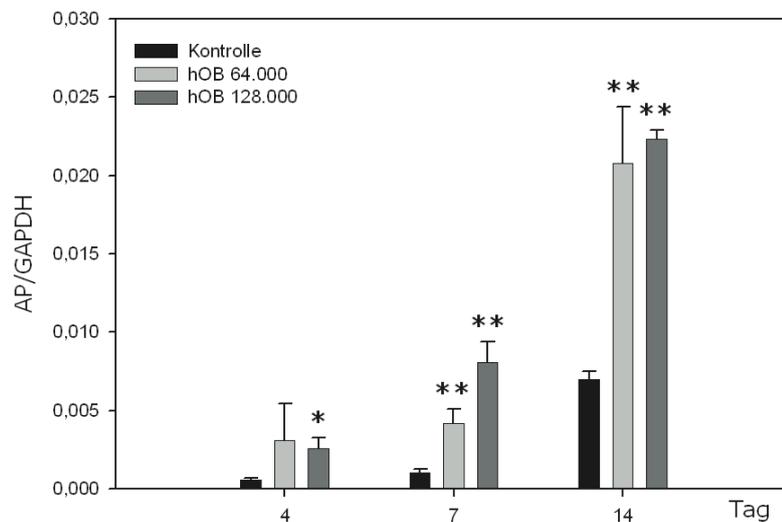
Abb. E 14 zeigt, dass es nur durch die Kokultur mit einer hohen Zahl (128.000) an Osteoblasten zu einem signifikanten Anstieg der mRNA von Alkalischer Phosphatase (AP) kam. Eine Kokultivierung mit hMSC im unteren Kompartiment hatte keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten von AP. Deshalb wurden alle standardisierten weiteren Versuche in Kokultur mit hOB durchgeführt, wobei OGM als Kulturmedium verwendet wurde.



**Abb. E 14: mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase (AP) in der indirekten Kokultur.** Alle Versuche wurden im Duplett durchgeführt, wobei die dargestellten Werte Mittelwerte repräsentieren. Eine starke Induktion der AP zeigte sich bei der Kokultur von hMSC mit 128.000 hOB im unteren Kompartiment. Als Kulturmedium wurde OGM verwendet. Die Kontrolle wurde ohne Zellen im unteren Kompartiment gehalten.

Die AP-Werte wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Zur Analyse des Einflusses von hOB auf hMSC mittels indirekter Kokultur im zeitlichen Verlauf wurden unterschiedliche Zahlen von Osteoblasten in den unteren Teil des Transwellsystems ausgesät (64.000 und 128.000). Entsprechend ergaben sich Konfluenzen von 40% bzw. 80%. Die Quantifizierung der AP-Expression in hMSC (128.000) im oberen Kompartiment ergab, dass dieser Marker von Tag 4 bis 14 um den Faktor 14 zunahm (Abb. E 15). Gleichzeitig war erkennbar, dass die Werte der AP-Expression in den indirekt kokultivierten hMSC deutlich über denen in den Kontrollen (ohne hOB im unteren Kompartiment) lagen. Am Tag 7 konnten Zunahmen vom 3,9-fachen bis zum 7-fachen gemessen werden. Für die Induktion der AP zeigte sich eine partielle Korrelation mit der Anzahl der eingesetzten hOB, wobei eine höhere hOB-Zahl weitgehend mit einer höheren AP-Expression in den hMSC einherging. Am Tag 7 ließ sich eine signifikant erhöhte Zunahme der AP-Expression mit der doppelten Anzahl an hOB erreichen. Am Tag 14 zeigten die mit hOB kokultivierten hMSC eine noch stärkere Induktion der AP-Expression, die jedoch unabhängig von der hOB-Zahl war.

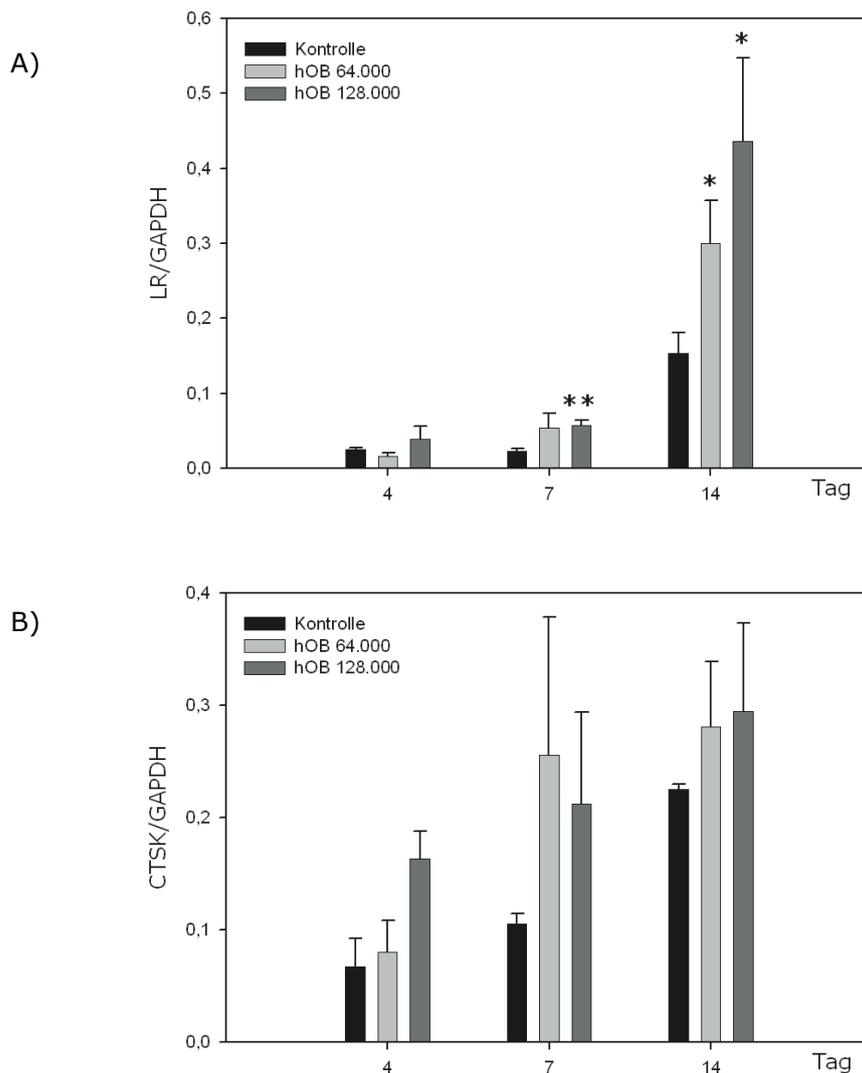


**Abb. E 15: mRNA-Expressionsverlauf der Alkalischen Phosphatase (AP) in der indirekten Kokultur.** Die AP-Expressionswerte wurden jeweils auf entsprechende GAPDH-Werte standardisiert. Als Kulturmedium wurde OGM verwendet (Grau: Kokultur mit 64.000 hOB; hellgrau: Kokultur mit 128.000 hOB; bei den Kontrollen befanden sich keinerlei hOBs im unteren Kompartiment).

Der frühe osteogene Marker Leptin-Rezeptor (Abb. E 16A) zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie die Alkalische Phosphatase. Über die Zeit stieg dessen Expressionsniveau um das etwa 8-fache der Ausgangswerte von Tag 4 an. Am Tag 14 waren signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollprobe und den mit 64.000 bzw. 128.000 hOB kokultivierten Proben erkennbar. Dabei ergaben sich Leptin-Rezeptor-Induktionsraten zwischen von 1,95- bzw. 2,8-fach (Tag 14). Es ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der hOB-Zahl ermitteln, wenngleich eine höhere hOB-Zahl tenden-

ziell mit einer stärkeren Expression des Leptin-Rezeptors in den kokultivierten hMSC einherging.

Die mRNA-Level von Cathepsin K (CTSK) in hMSC, die mit hOB kokultiviert worden waren, zeigten eine relativ kontinuierliche Zunahme über die gemessene Zeit in allen Proben (Abb. E 16B). Am Tag 4 war die CTSK-Expression bei doppelter hOB-Anzahl deutlich erhöht, während am Tag 7 beide indirekt kokultivierten Proben eine vergleichbare CTSK-Induktion aufwiesen. Der Tag 14 präsentierte im Rahmen der Standardabweichung gleich hohe Expressionen.



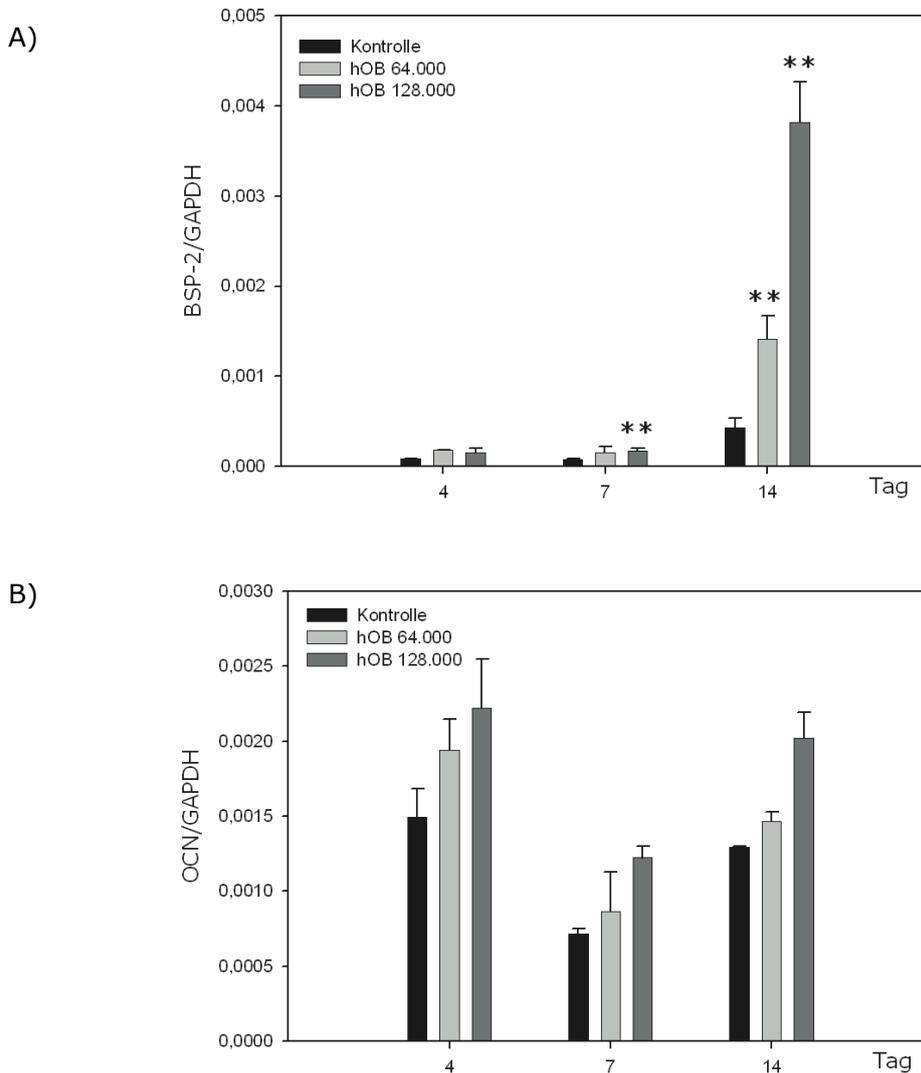
**Abb. E 16: mRNA-Expressionsverlauf von Leptin-Rezeptor und Cathepsin K in der indirekten Kokultur.**

**A) Leptin-Rezeptor (LR).** Zwischen Tag 4 und 14 konnte eine 8-fache Induktion der Expression beobachtet werden. Signifikante Unterschiede waren zudem an den Tagen 7 (2,4-fach im Vergleich zur Kontrolle) und 14 (1,95- bzw. 2,8-fach im Vergleich zur Kontrolle) zu verzeichnen.

**B) Cathepsin K (CTSK).** Tendenziell zeigten alle mit hOB kokultivierten hMSC im Vergleich zu den Kontrollen (nicht-signifikant) erhöhte CTSK-Level.

Die Expressionslevel von LR und CTSK wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Die Expressionswerte des frühen osteogenen Markers Bone Sialoprotein 2 (BSP-2) stiegen über den Zeitraum von 14 Tagen hin deutlich an. Dabei war ersichtlich, dass höhere hOB-Zahlen in der Kokultur auch mit höheren Induktionsraten einhergingen (2,4-fach an Tag 7 bzw. 8,9-fach an Tag 14). Gleichfalls ließ sich beobachten, dass die BSP-2-Expression über die Zeit hin zunahm (Abb. E 17A). Im Vergleich dazu waren die Expressionsraten bei Osteocalcin (OCN) über den Zeitraum von 14 Tagen innerhalb der jeweiligen Standardabweichung unverändert (Abb. E 17B).



**Abb. E 17: mRNA-Expression von Bone Sialoprotein 2 (BSP-2) und Osteocalcin (OCN) nach indirekter Kokultur.**

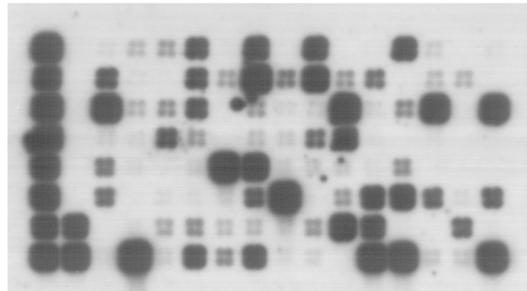
**A) BSP-2:** Bei zunächst gleichem Expressionsniveau an Tag 4, zeigte sich eine signifikante Expressionsinduktion an Tag 7 bei 64.000 hOB. An Tag 14 war eine signifikante BSP-2 Induktion sowohl bei indirekter Kokultur mit 64.000 als auch 128.000 hOB zu beobachten.

**B) OCN:** Innerhalb der Standardabweichung ließen sich keine Unterschiede in den Expressionsniveaus von OCN feststellen.

Die Expressionslevel von BSP-2 und OCN wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

## E 2.3 Microarray-Analyse von osteogen differenzierten hMSC im Vergleich zu hOB

Um einen detaillierteren Einblick in die osteogene Differenzierung von hMSC zu bekommen, die durch lösliche Faktoren von hOB induziert worden war, wurde ein sog. osteogener Microarray durchgeführt. Die dafür nötigen Proben wurden durch 14-tägige Kultur von 90 % konfluenten hMSC generiert, die in drei verschiedenen Medien (MSCBGM, kOGM und CD) kultiviert worden waren. Zum Vergleich mit ausdifferenzierten Zellen wurden hOB eingesetzt, die ebenfalls über 2 Wochen in OGM kultiviert wurden.



Exemplarisch dargestellt ist in Abb. E 18 ein belichteter Microarray.

**Abb. E 18: Microarray mit 128 Genen.** Davon bestehen die hier links abgebildeten Spalten aus *Housekeeping*-Genen und Negativkontrollen.

Alle erhaltenen Genexpressionswerte wurden in Relation zu den jeweils entsprechenden Expressionswerten des als Referenz dienenden Microarray (hMSC in MSCBGM-Medium kultiviert) gesetzt. So entstand für jedes Gen ein relativer Expressionsquotient, wodurch eine vergleichende Analyse der verschiedenen Microarrays ermöglicht wurde. In der unten angeführten Tabelle (Tab. E 1) sind ausgewählte Quotienten von verschiedenen Genen dargestellt. Voraussetzung für die Aufnahme in die Tabelle war, dass der Quotient größer 2 oder kleiner 0,5 war.

Vergleicht man die verschieden differenzierten Zellen mit den ausdifferenzierten hOB, so fällt auf, dass die alternative Differenzierung mit kOGM am wenigsten Gene hochreguliert. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass viele Übereinstimmungen zwischen hOB und mit kOGM-behandelten hMSC bestehen. So werden vier Gene induziert (ALPL, CALCR, CTSK und SMAD9) sowie 15 herabreguliert. Im Gegensatz dazu bestehen zwischen chemisch differenzierten hMSC und hOB deutlich weniger Gemeinsamkeiten (eine Induktion: ITGAM; vier Herabregulationen: COL15A1, COL5A1, FGFR2 und IGF1). Zum Vergleich bestehen gerade einmal drei Übereinstimmungen (COL15A1, COL5A1 und IGF1) zwischen chemisch differenzierten hMSC und mit kOGM-behandelten hMSC.

Genname	hMSC+ CD	hOB	hMSC+ kOGM	Genname	hMSC+ CD	hOB	hMSC+ kOGM
AP	0,81	6,36	2,19	IBSP	54,19	0,34	0,23
BMP1		0,33	0,09	IGF1	0,28	0,06	0,06
BMP6	10,73			IGF2	2,07	2,06	0,52
CALCR		7,58	3,90	ITGA2		0,08	0,33
COL15A1	0,08	0,00	0,08	ITGAM	2,18	9,81	
COL16A1		0,09	0,08	MMP10		1,95	
COL18A1		3,56	0,33	MMP13		0,42	
COL1A1		0,39	0,09	NFKB1		0,34	
COL3A1		0,02	0,25	SERPINH1			0,38
COL5A1	0,42	0,00	0,07	SMAD1	0,57	0,46	0,56
COMP		0,05	0,23	SMAD2		0,31	
CTSK		1,81	1,71	SMAD7		0,18	0,30
DMP1	1,94	0,20	0,31	SMAD9		18,98	3,05
FGF2		0,18	0,30	TUFT1	0,52	0,09	0,13
FGF3		4,35		TWIST1	4,35	0,47	0,29
FGFR2	0,13	0,00		VDR	1,57		0,37

**Tab. E 1: Relativer Expressionsquotient (Ratio) von Genen in der Microarray-Analyse.** In rot markiert sind Ratios, die größer als 2 sind, in grün Ratios, die kleiner als 0,5 sind. Orange hinterlegt sind die Werte von CTSK, da dieses Gen zwar die Kriterien nicht erfüllt, aber ein wichtiger Marker bei vorhergehenden Experimenten war. Die relativen Expressionsquotienten wurden ermittelt, indem die Expressionswerte der Proben (CD; hOB; kOGM) in Bezug zu jeweils entsprechenden Expressionswerten von hMSC gesetzt wurden, die in MSCBGM kultiviert worden waren.

## **E 2.4 Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit (Alizarin-Rot-Färbung) von hOB**

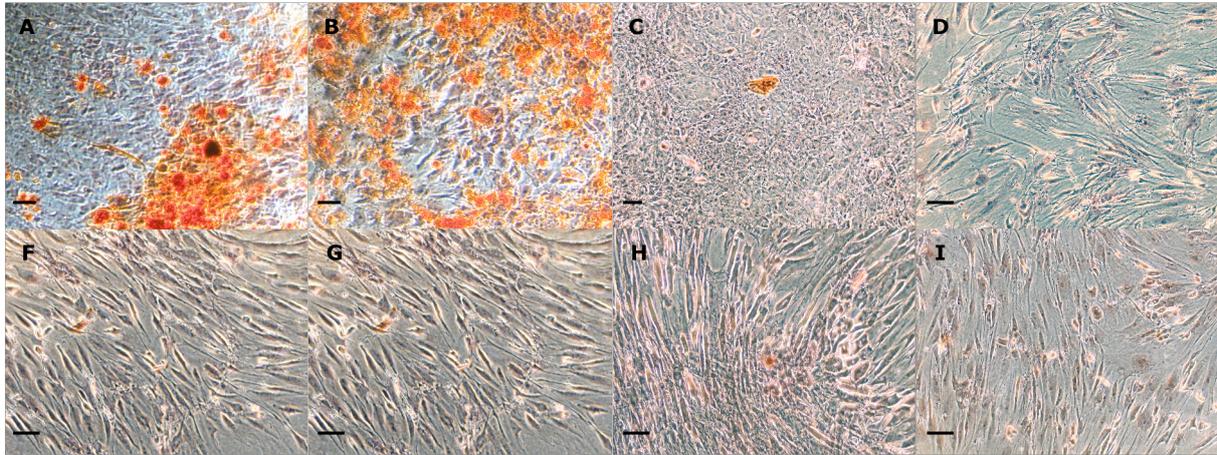
Durch die Färbung sollte ermittelt werden, inwieweit Osteoblasten *per se* zur Mineralisierung der ECM imstande sind bzw. welche Zusätze vonnöten sind, um Kalziumphosphat-einlagerung detektieren zu können. Mit dem Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit lässt sich der Differenzierungsgrad der Osteoblasten beurteilen, da diese erst in einem späteren Differenzierungsstadium dazu im Stande sind. Dies ist insofern wichtig für diese Arbeit, als angenommen werden muss, dass kOGM-differenzierte hMSC maximal denselben Differenzierungsstatus erreichen können.

In einem entsprechenden Versuchsansatz wurden daher zunächst hOB im Duplett in eine 12-Kavitätenschale ausgesät. Dabei wurde jede Kavität mit ca. 30.000 hOB beimpft, was einer 50 %igen Bodenbedeckung entsprach. Nach 10 Tagen hatten sich die Zellen zu einem Konfluenzgrad von 80 – 90% ausgebreitet. Nun erfolgte die Zugabe von Differenzierungs- bzw. Kontrollmedium. Um die Auswirkungen der einzelnen Differenzierungszusätze auf das Färbeverhalten zu ermitteln, wurden die Kavitäten mit allen in Betracht kommenden Kombinationen von L-Ascorbinsäure-2-phosphat (Asc), Dexamethason (Dex) sowie  $\beta$ -Glycerolphosphat (Gly) über zwei Wochen kultiviert. Das Kulturmedium wurde dabei zweimal pro Woche gewechselt. Am Tag 14 wurden die Zellen, wie unter D 2.2.3.1 beschrieben, mit Hilfe der Alizarinfärbung angefärbt.

Erstaunlicherweise konnte in diesem Versuch festgestellt werden, dass es nicht zur Mineralisierung kommt, wenn hOB in reinem OGM kultiviert werden (Abb. E 19). Entscheidend war die Kombination der Differenzierungszusätze. So erwies sich die Kombination aller drei Zusätze (AscDexGly) als stärkster Reiz zur Kalziumphosphat-einlagerung. Dabei bildeten die Zellen über die gesamte Kavität großflächige, runde Ansammlungen rot gefärbter Auflagerungen (Abb. E 19A). Es wurde der Eindruck erweckt, dass die Auflagerungen sich nach oben (aus der Kavität heraus) hin kegelförmig verdünnten.

Unter Verwendung von DexGly kommt es ebenfalls zu rötlich gefärbten Auflagerungen. Diese erschienen eher vereinzelt und kleinflächiger, aber besser verteilt und nicht so konzentriert wie in Abb. E 19A. In der Gesamtheit bildeten die Zellen aber in etwa die gleiche Menge an Kalziumphosphat aus, welches sich anfärben ließ (Abb. E 19B).

Alle anderen Kombinationen wiesen keine Färbung auf (s. Abb. E 19C-H). Dies lässt darauf schließen, dass hOB die Kombination von Dexamethason und  $\beta$ -Glycerolphosphat unbedingt benötigen, um die umgebende Matrix mineralisieren zu können.



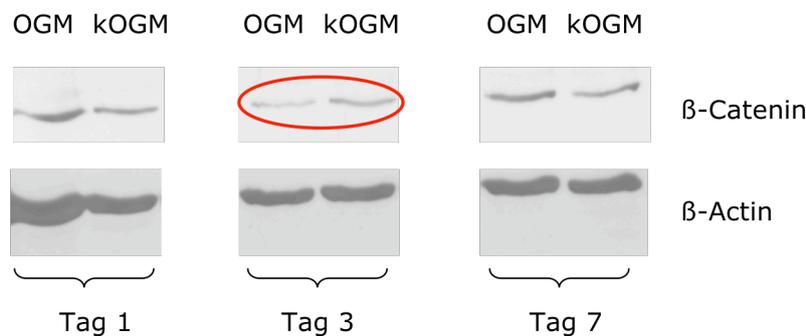
**Abb. E 19: Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit (Alizarin-Rot-Färbung) von hOB nach Behandlung mit verschiedenen Differenzierungszusätzen.** Die Zellen wurden mit folgenden Zusätzen beimpft: A) AscDexGly, B) DexGly, C) AscDex, D) AscGly, E) Dex, F) Gly, G) Asc; H) Kontrolle ohne Zusätze. Es ist zu erkennen, dass sich hOB nur unter Zusatz von DexGly bzw. AscDexGly anfärben ließen. In C – H konnten nur sehr vereinzelt Rot-Färbungen nachgewiesen werden.  $\mu$ -Balken entspricht 50  $\mu$ m.

### E 3 Der Wnt-Signaltransduktionsweg im Rahmen der osteogenen Differenzierung

Hier sollte untersucht werden, inwieweit der Wnt-Signaltransduktionsweg im Rahmen der alternativen Differenzierung von hMSC eine Rolle spielt. Dazu war es notwendig,  $\beta$ -Catenin als zentralen Mediator sowie dessen Veränderungen während der Differenzierung zu evaluieren. Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob Alkalische Phosphatase als mögliches Wnt-Targetgen in Frage kommt und bei Manipulationen des Wnt-Weges Modifikationen erfährt. Als letzte Fragestellung war zu ermitteln, ob die Inhibition von wichtigen Wnt-Faktoren ( $\beta$ -Catenin bzw. LRP5) Auswirkungen auf das Expressionsverhalten osteogener Marker hat.

#### E 3.1 Einfluss der alternativen osteogenen Differenzierung auf den $\beta$ -Catenin-Level

Mit diesem Versuchsansatz sollten zunächst Änderungen des intrazellulären freien  $\beta$ -Catenins als maßgeblichem Mediatorprotein im Wnt-Signalweg während der alternativen osteogenen Differenzierung untersucht werden. hMSC waren hierfür in OGM und kOGM über 1, 3 und 7 Tage kultiviert worden. Anschließend wurden die Zellen nach der Ernte in Aliquots à 20.000 aufgeteilt, lysiert und mittels Western Blot analysiert. Nach der densitometrischen Auswertung der Western Blots wurden die  $\beta$ -Catenin-Werte in Relation zu den  $\beta$ -Actin-Werten (interner Standard) gesetzt. Dabei ergab sich an Tag 3 eine zweifache Induktion (Abb. E 20 und Tab. E 2).



**Abb. E 20: Nachweis von  $\beta$ -Catenin und  $\beta$ -Actin in hMSC mittels Western Blot.** Die Zellen wurden zuvor über 1, 3 und 7 Tage in verschiedenen Medien kultiviert (OGM, kOGM, MSCBGM). Mit rot markiert ist der signifikante Unterschied an Tag 3. Hier ist  $\beta$ -Catenin in kOGM-hMSC 2-fach gegenüber Kontrollzellen in OGM erhöht.

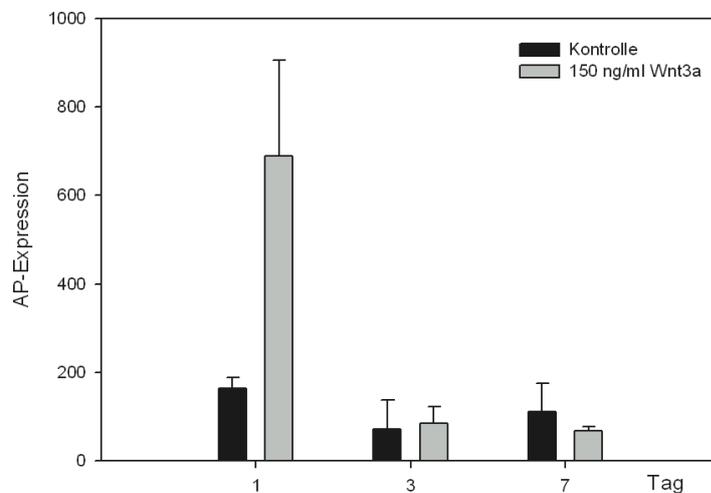
**Tab. E 2: Densitometrische Western Blot-Auswertung der Bildung von  $\beta$ -Catenin in hMSC.** Die Zellen wurden 1, 3 und 7 Tage im Osteoblasten-Wachstumsmedium (OGM) bzw. im konditionierten Medium (kOGM) zur osteogenen Differenzierung kultiviert.

Tag	Medium	Dichtewerte $\beta$ -Catenin	Dichtewerte $\beta$ -Actin	Verhältnis $\beta$ -Cat/ $\beta$ -Act	Induktion kOGM/OGM
1	OGM	63407	358810	0,1767	
	kOGM	35585	174879	0,2035	1,15
3	OGM	13077	151462	0,0863	
	kOGM	26324	155966	0,1688	1,95
7	OGM	52865	175739	0,3008	
	kOGM	35913	163742	0,2193	0,73

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Wnt-Signaltransduktionsweg tatsächlich eine Rolle bei der osteogenen Differenzierung von hMSC spielt.

### E 3.2 Einfluss von Wnt3a auf die Expression von Alkalischer Phosphatase

Basierend auf der Hypothese, dass bei der frühen osteogenen Differenzierung der Wnt-Signalweg mitbeteiligt ist und Alkalische Phosphatase (AP) ein putatives Wnt-Zielgen darstellt, wurden hMSC mit 150 ng/ml Wnt3a stimuliert und die Expression von AP bestimmt (Abb. E 21).



**Abb. E 21: mRNA-Expression von Alkalischer Phosphatase nach Stimulation von hMSC mit Wnt3a.** Am Tag 1 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Alkalischen Phosphatase nach Zugabe von 150 ng/ml Wnt-3a. Die AP-Level wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

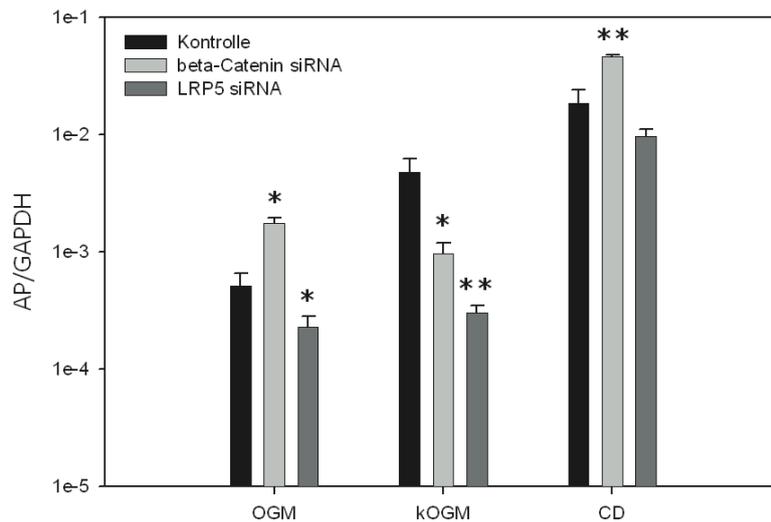
Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich lediglich am Tag 1 eine Induktion der AP um den Faktor 4,2. An den Tagen 3 und 7 änderte sich das Expressionsniveau hingegen nicht. Somit konnte AP zumindest als kurzfristiges Wnt-Zielgen in hMSC bestätigt werden.

### **E 3.3 Inhibition der Wnt-Signalwegsfaktoren $\beta$ -Catenin und LRP5 mittels RNAi**

Um die Beteiligung des Wnt-Signalweges bei der osteogenen Differenzierung detaillierter zu evaluieren, wurden nun mittels der RNA-Interferenz-Technologie zwei zentrale Komponenten dieser Signaltransduktionskaskade, nämlich  $\beta$ -Catenin und LRP5, herabreguliert. Nach Transfektion der hMSC mit den entsprechenden siRNAs und anschließender Kultivierung über 7 Tage mit verschiedenen Wachstums- bzw. Differenzierungsmedien (OGM, kOGM, CD) wurde zunächst die mRNA-Expression von AP sowohl in den nicht-transfizierten Kontrollzellen als auch in den *down*-regulierten, transfizierten Zellen bestimmt.

Wie in Abb. E 22 dargestellt, war die AP-Expression in den Kontrollen unter Kultivierung im Osteoblasten-Wachstumsmedium (OGM) am niedrigsten. Unter Kultivierung im konditionierten Osteoblasten-Wachstumsmedium (kOGM) stieg sie, wie bereits beschrieben, um den Faktor 9,4 an und unter der Kultivierung im chemischen Differenzierungsmedium (CD) sogar um den Faktor 36.

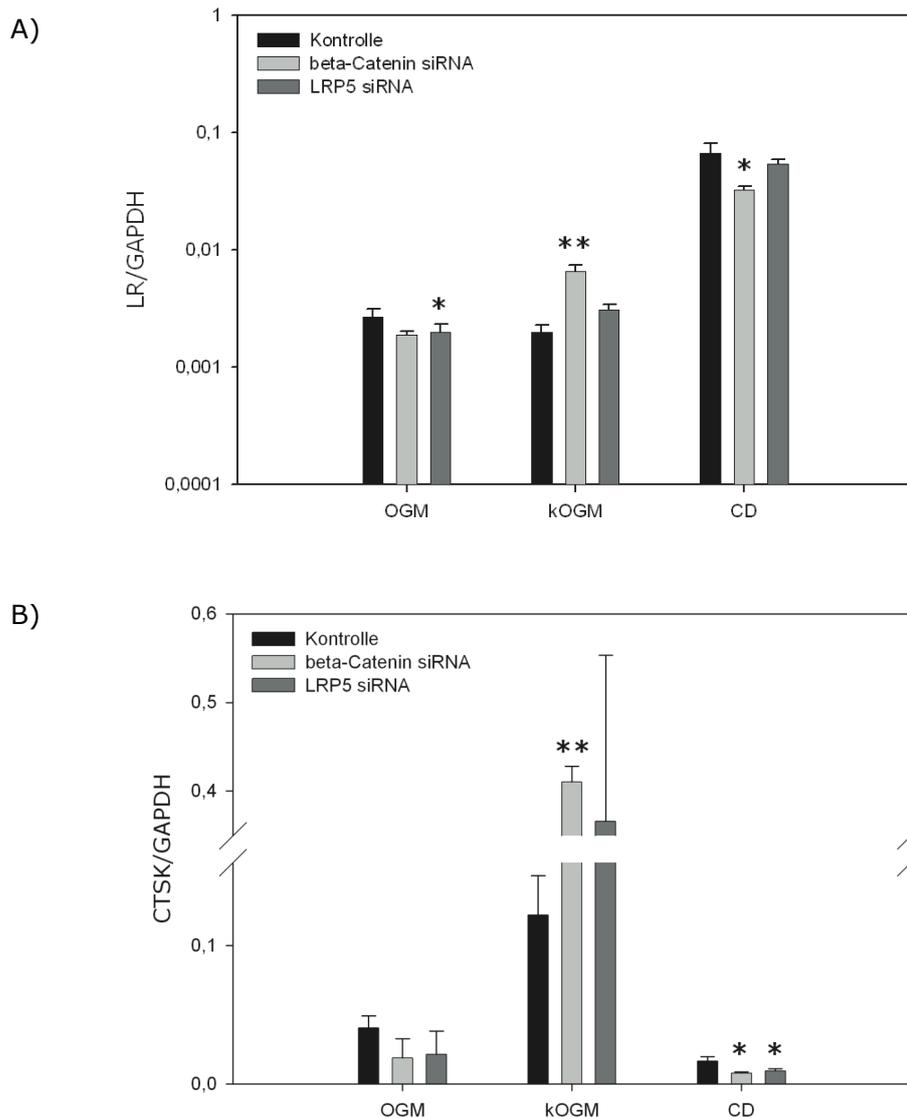
Vergleicht man nun die AP-Expressionswerte innerhalb eines Mediums miteinander, so wird folgendes deutlich. Ausgehend vom AP-Kontrollwert (transfiziert mit nc-siRNA) nahm dieser unter Kultivierung in OGM um den Faktor 3,4 in mit  $\beta$ -Catenin-siRNA transfizierten Zellen zu, während die Probe durch den Knockdown von LRP5 auf das 0,45-fache abnahm. Wurden die hMSC in kOGM kultiviert, so zeigte sich sowohl nach Knockdown von  $\beta$ -Catenin als auch von LRP5 eine Abnahme der AP-Expression und zwar bei mit  $\beta$ -Catenin-siRNA transfizierten hMSC um den Faktor 5, bei RNAi gegen LRP5 um den Faktor 16. Wurde CD als Kultivierungsmedium verwendet, so stieg die Expression beim *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin auf das 2,5-fache des Kontrollwertes an und sank nach LRP5-*Knockdown* auf die Hälfte des Kontrollwertes ab (Abb. E 22).



**Abb. E 22: mRNA-Expressionen von Alkalischer Phosphatase (AP) nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 in hMSC.** hMSC wurden 7 Tage mit OGM (Osteoblastenwachstumsmedium) als Kontrolle, kOGM (konditioniertes OGM) und CD (chemisches Differenzierungsmedium) kultiviert. Die höchsten Expressionsraten von AP wurden mit CD erhalten. Die Herabregulation von  $\beta$ -Catenin mittels siRNA führte nur in kOGM zu einer verminderten AP-Expression. In OGM und CD war hingegen eine Induktion von AP zu beobachten. Der Knockdown von LRP5 ging dagegen in allen drei Medien mit einer Abnahme der AP-Expression einher. Die AP-Level wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Analog zu Abb. E 22 wurden von denselben cDNA-Proben weitere Marker bestimmt. Bei Betrachtung von Abb. E 23A fällt auf, dass ähnlich wie bei der Alkalischen Phosphatase auch beim Leptin-Rezeptor (LR) die höchsten Expressionslevel unter Kultivierung mit CD zu verzeichnen waren. Signifikant erniedrigt war die LR-Expression bei CD, nachdem die Zellen vorher mit  $\beta$ -Catenin-siRNA transfiziert worden waren, während die LRP5-siRNA-Transfektion kaum einen Einfluss zeigte. Bei Verwendung von OGM als Kultivierungsmedium ließen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede detektieren. Erstaunlicherweise wies die Kontrollprobe bei Kultivierung der hMSC in kOGM die niedrigste Expression auf. Nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin war, im Gegensatz zur Alkalischen Phosphatase (Abb. E 22), ein hochsignifikanter Anstieg des Leptin-Rezeptors zu verzeichnen. Auch nach Transfektion von LRP5-siRNA zeigte sich ein signifikanter, wenn auch geringerer Anstieg im Expressionsprofil von LR (Abb. E 23A).

Die mRNA-Expression von Cathepsin K (Abb. E 23B) zeigte keine signifikanten Unterschiede, wenn die Zellen in OGM kultiviert worden waren. Bei Verwendung von kOGM war der Kontrollwert am niedrigsten, während der Knockdown von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 zu einer Zunahme der CTSK-Expression führte. Unter CD-Kultivierung ergaben sich die niedrigsten CTSK-Expressionen. Hier bewirkte allerdings die Herabregulation von LRP5 und  $\beta$ -Catenin dennoch einen signifikanten Abfall der CTSK-Expression im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. E 23: mRNA-Expression von Leptin-Rezeptor und Cathepsin K nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin und LRP5.**

**A) Leptin-Rezeptor (LR):** Deutlich erkennbar sind hohe Expressionen von LR bei Kultivierung mit CD, wobei diese signifikant erniedrigt waren nach  $\beta$ -Catenin-siRNA-Transfektion. Unter Verwendung von OGM ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, bei Kultivierung in kOGM erhöhten sich die Expressionen signifikant (LRP5 siRNA bzw.  $\beta$ -Catenin siRNA).

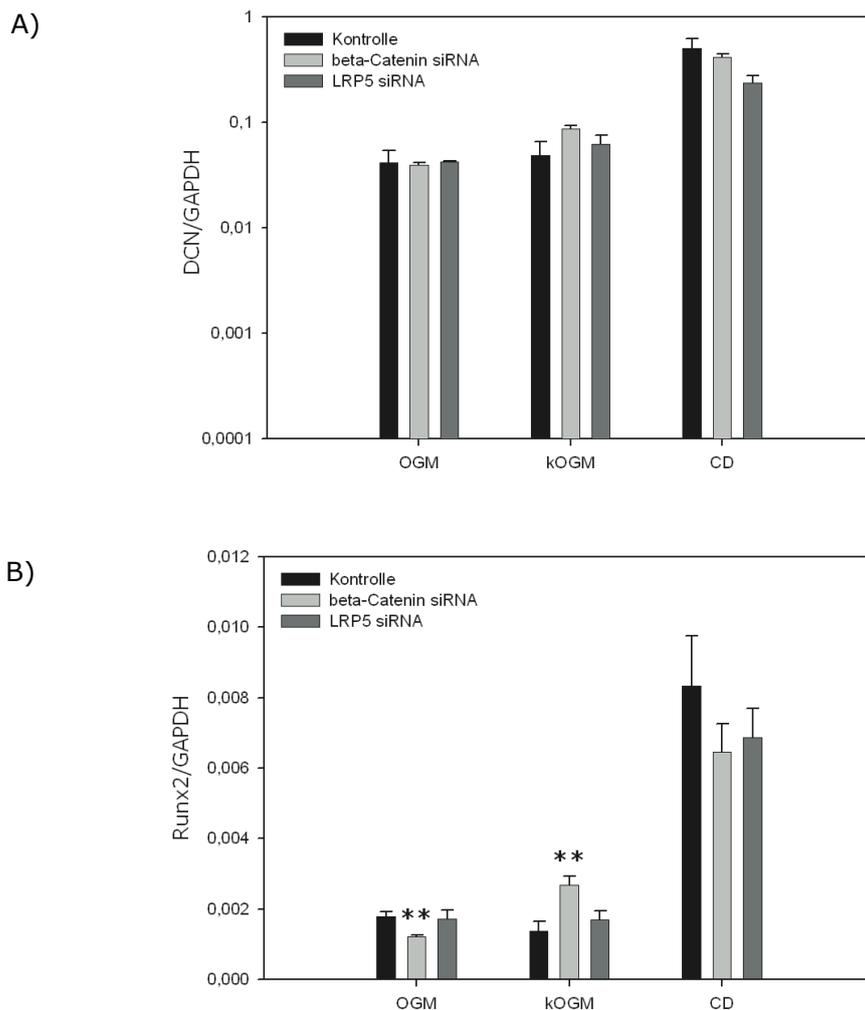
**B) Cathepsin K (CTSK):** Es bestanden keine Unterschiede bei Kultivierung in OGM; bei Verwendung von kOGM kam es zur Erhöhung der Expressionslevel nach siRNA-Transfektion (signifikant bei  $\beta$ -Catenin-siRNA). Im Gegensatz dazu bestanden niedrige mRNA-Expressionen unter CD, wobei diese noch signifikant erniedrigt waren, wenn die Zellen vorher mit siRNA behandelt worden waren.

Die Expressionslevel von LR und CTSK wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Der Marker Decorin (Abb. E 24A) offenbarte keine signifikanten Differenzen bei allen Kultivierungsansätzen im OGM. Wurde CD als Kultivierungsmedium eingesetzt, so zeigte sich ein Abfall von mit LRP5-siRNA behandelten hMSC gegenüber den Kontrollzellen um den Faktor 2,12 (signifikant). Unter kOGM-Kultivierung präsentierte sich eine signifikante Decorin-Erhöhung nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin. Insgesamt bewegten sich die Expres-

sionslevel von Decorin in kOGM und OGM auf demselben Level, durch CD erhöhte sich das allgemeine Niveau nahezu um eine Zehnerpotenz (Abb. E 24A).

Bei Betrachtung von Runx2 (Abb. E 24B) fiel auf, dass unter OGM-Kultivierung der *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin zu einer deutlichen Erniedrigung dieses Faktors in hMSC führte. kOGM-behandelte Zellen zeigten hingegen eine signifikante Induktion von Runx2, nachdem  $\beta$ -Catenin durch RNAi herabreguliert worden war. Bei Verwendung von CD ließen sich keine eindeutigen Unterschiede in den diversen Ansätzen ermitteln. Allerdings war auffällig, dass hier das Gesamtexpressionsniveau gegenüber dem unter Kultivierung der hMSC in kOGM bzw. OGM wesentlich erhöht war.



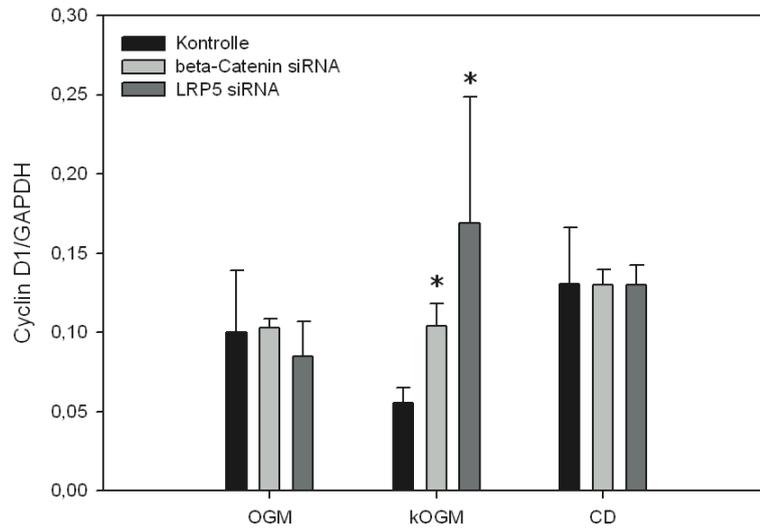
**Abb. E 24: mRNA-Expression von Decorin und Runx2 nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin und LRP5.**

**A) Decorin (DCN).** Innerhalb desselben Mediums konnte die Verwendung von siRNA keine signifikanten Unterschiede hervorbringen. Allerdings war auffällig, dass unter Verwendung von CD das Expressionsniveau signifikant über denjenigen von kOGM bzw. OGM lag.

**B) Runx2.** Die Runx2-Expression war nach Verwendung von  $\beta$ -Catenin-siRNA in OGM-kultivierten hMSC signifikant erniedrigt; eine signifikante Erhöhung ergab sich bei Kultivierung in kOGM und nach  $\beta$ -Catenin-siRNA-Transfektion. Ebenfalls zeigte sich ein deutlich höheres Expressionsprofil unter CD, wobei sich keine signifikanten Unterschiede nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 herauskristallisierten.

Die Expressionslevel von DCN und Runx2 wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

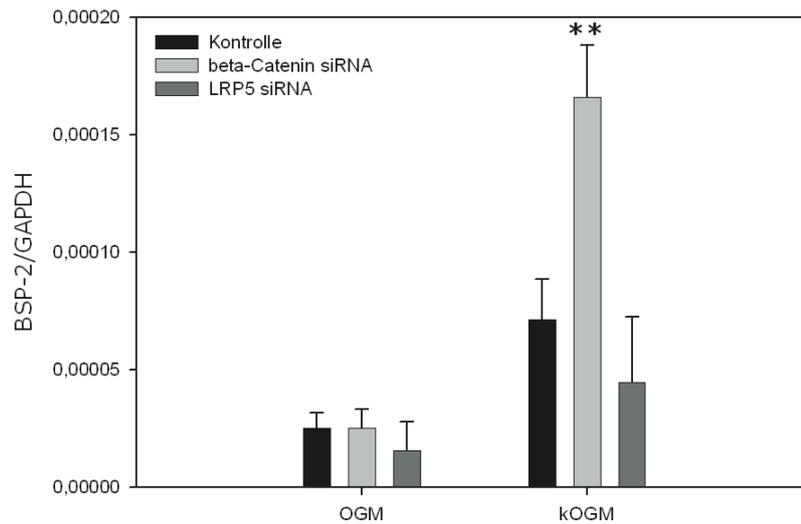
Mit Cyclin D1 wurde ein anerkanntes Zielgen des Wnt-Signalweges gemessen (Tetsu et al., 1999). Es zeigten sich keine Expressionsunterschiede bei der Kultivierung in OGM und CD, wobei sogar das Expressionsniveau des Gens identisch war (Abb. E 25). Im Gegensatz dazu ergab sich nach  $\beta$ -Catenin-*Knockdown* in Zellen, die mit kOGM kultiviert wurden, eine signifikante Erhöhung von Cyclin D1 gegenüber den Kontrollzellen. Auch nach Behandlung mit LRP5-siRNA war eine signifikante Zunahme von Cyclin D1-mRNA zu verzeichnen (Abb. E 25).



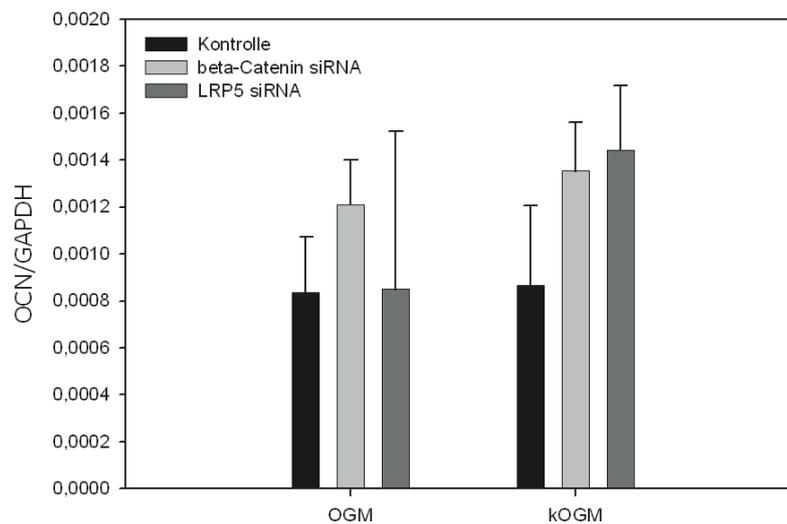
**Abb. E 25: mRNA-Expression von Cyclin D1 nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5.** Sowohl bei Verwendung von OGM als auch von CD konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Dagegen ergab sich eine signifikante Induktion nach *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 und Kultivierung in kOGM. Die Cyclin D1-Level wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

Wie in den Versuchen mit konditioniertem Medium und nach Kokultur zeigte sich insgesamt ein erhöhtes Expressionsniveau von BSP-2 der hMSC nach Stimulation in kOGM im Vergleich zu Zellen, die in OGM kultiviert wurden. Auffallend war, dass der *Knock-Down* von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 in OGM kultivierten hMSC keinen Einfluss hatte. Hingegen stellte sich eine signifikante Induktion des osteogenen Markers dar, nachdem  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 mittels RNAi herabreguliert worden war (Abb. E 26).

Im Vergleich dazu zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expressionen des späten osteogenen Markers Osteocalcin (Abb. E 27).



**Abb. E 26: BSP-2 in hMSC nach siRNA gegen  $\beta$ -Catenin und LRP5 und Kultivierung in OGM bzw. kOGM.** In den hMSC, die zur Referenz in OGM kultiviert wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Eine deutlich höhere Expression war nach Stimulation mit kOGM zu beobachten. Dabei zeigt sich eine signifikante Zunahme nach Verwendung von siRNA gegen  $\beta$ -Catenin. Die BSP-2-Level wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.



**Abb. E 27: OCN in hMSC nach siRNA gegen  $\beta$ -Catenin und LRP5 und Kultivierung in OGM bzw. kOGM.** In den hMSC, die zur Referenz in OGM kultiviert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, ebensowenig nach Stimulation mit kOGM. Die OCN-Level wurden auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert.

## **F            Diskussion**

### **F 1           Einfluss der Basalmedien DMEM bzw. MSCBGM auf das chemisch induzierte Differenzierungsverhalten von hMSC**

Bereits Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden die Vorläuferzellen mesenchymaler Gewebe isoliert und charakterisiert (Friedenstein et al., 1976). In den 90er Jahren stand dazu vor allem die Differenzierungskapazität von mesenchymaler Stammzellen (MSC) verschiedener Spezies im Vordergrund des Interesses. Dabei zeigte sich, dass humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) in der Lage sind, primär Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe und möglicherweise weitere stromale Zelltypen auszubilden (Pittenger et al., 1999). Mittlerweile stehen auch keimblattübergreifend neuronale, myokardiale und hepatozytäre Zelltypen zur Diskussion (Jiang et al., 2002). In diesem Kontext war es für uns von besonderem Interesse das Differenzierungsverhalten von hMSC unter *in vitro*-Bedingungen detaillierter aufzuklären und hierbei zunächst vor allem den Einfluss der gängigen Basalmedien DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) und MSCBGM (*Mesenchymal Stem Cell Basal Growth Medium*) zu evaluieren.

#### **F 1.1           Osteogene Differenzierung**

Herkömmliche Protokolle für eine osteogene Differenzierung *in vitro* sehen vor das Kultivierungsmedium mit chemischen Zusätzen zu supplementieren. Jaiswal et al. (1997) stellten in diesem Zusammenhang fest, dass Dexamethason für die *in vitro*-Differenzierung ein unabdingbarer Zusatz ist. Es steigert sowohl die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) als auch die Proliferationsfähigkeit von hMSC. In diesen Experimenten wurden allerdings niedrigere Konfluenzraten als in der hier vorliegenden Promotionsarbeit verwendet. Ascorbinsäurephosphat ist als Kofaktor für die Hydroxylierung von Prolin- und Lysinresten im Kollagen und für die Synthese weiterer nicht-kollagenöser ECM-Proteine notwendig.

Mit DMEM als Basalmedium zeigten osteogen stimulierte hMSC eine deutliche Induktion der Alkalischen Phosphatase von Tag 4 bis Tag 14, wobei das Maximum der mRNA-Expression von AP an Tag 7 erreicht wurde. Mit MSCBGM als Basalmedium war ein ähnlicher AP-Expressionsverlauf zu erkennen. Während aber an Tag 4 osteogen differenzierte Zellen signifikant höhere AP-Expressionen zeigten, nahm diese an Tag 7 wieder ab und zwar unter das Expressionsniveau der Kontrollzellen. An Tag 14 dagegen waren die AP-Expression wiederum signifikant induziert. Im direkten Vergleich fiel auf, dass in DMEM

insgesamt höhere AP-Werte als in MSCBGM erzielt wurden. Bei der Auswertung der van Kossa-Färbungen trat hingegen kein wesentlicher Unterschied auf. Bereits am Tag 4 der Differenzierung zeigte sich, dass Zellen in beiden Basalmedien ihre Morphologie veränderten. Die zunehmend schroffe, kantige Zellbegrenzung stellt die beginnende osteogene Differenzierung dar. Etwa zur selben Zeit begann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung anhand der van Kossa-Färbungen sichtbar zu werden. Zwischen Tag 14 und 21, wenn der frühe osteogene Marker AP bereits wieder abgefallen war, lösten sich die bis dahin adhärennten Zellen ab und formten Zellsedimente, die sich in der van Kossa-Färbung dunkelgrau bis schwarz darstellten.

Unsere Daten bestätigen die Ergebnisse von Jaiswal et al. (1997), die beschrieben, dass die verwendeten osteogenen Zusätze eine rasche Differenzierung der hMSC ermöglichen. Dies wurde dadurch deutlich, dass der frühe osteogene Marker Alkalische Phosphatase schnell anstieg und später wieder abnahm. Gleichzeitig mit diesem Absinken begann die Mineralisierung der extrazellulären Matrix (ECM), wobei späte Marker (wie z. B. Osteocalcin) induziert wurden. Transformieren sich Osteoblasten zu Osteozyten, so bilden sie zunächst zwei- bis mehrlagige Zellschichten, um sich dann von der Kulturfläche abzulösen (Jaiswal et al., 1997). Bei unseren Versuchen konnten wir diese Phänomene, wie oben bereits erwähnt, mit beiden Kulturmedien reproduzieren. Medienabhängige Unterschiede bestanden allerdings im Proliferationsvermögen. Dieses war in MSCBGM erhöht, was möglicherweise auf spezielle Wachstumsfaktorenzusätze in diesem Medium zurückgeführt werden kann.

Einen weiteren Diskussionspunkt stellt auch der Gebrauch von Dexamethason als Induktionsmittel der Osteogenese dar, insbesondere vor dem Hintergrund der zukünftigen therapeutischen Nutzung dieser Zellen. Einerseits induziert Dexamethason osteogene Differenzierungsschritte *in vitro*, andererseits löst es aber *in vivo* Osteoporose aus (Manelli et al., 2000), so z. B. bei Patienten mit Cushing-Syndrom (Beauregard et al., 2002) oder unter Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden (Sambrook & Lame 2001). *In vivo*-Versuche an Mäusen (Weinstein et al., 1998) zeigten, dass Langzeittherapie mit Glukokortikoiden vermehrt mit Apoptose in Osteoblasten sowie Osteozyten einhergeht.

Ein weiterer Hinweis auf die gegensätzliche bzw. vielfältige Wirkungsweise ist, dass Dexamethason auch in adipogenen und chondrogenen Differenzierungsmedien enthalten ist. Man muss daher von dosisabhängigen und wahrscheinlich auch zeitabhängigen Effekten ausgehen (Hung et al., 2008; Richardson et al., 2003).

## **F 1.2 Adipogene Differenzierung**

Im Zusammenspiel mit Hormonen wie z. B. Insulin ist der *Peroxisome Proliferator-activated Receptor* (PPAR- $\gamma$ ) als Transkriptionsfaktor für die Adipogenese notwendig (Spiegelman et al., 1997). Werden präadipozytäre Zellen mit Indomethacin, einem nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikament (NSAID), behandelt, so stellt sich die terminale Differenzierung der Zellen ein, indem es an PPAR- $\gamma$  bindet und dieses weiter aktiviert (Lehmann et al., 1997).

Zur exogenen Adipogenese-Stimulation von hMSC wurden deshalb in unseren Versuchen Indomethacin und Insulin eingesetzt. Die Überprüfung des Differenzierungsgrades erfolgte durch Messung der mRNA-Expression von PPAR- $\gamma$ . Insulin aktiviert dabei eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die zur adipozytären Reifung führen (Klemm et al., 2001). Zunächst ergab die qRT-PCR-Analyse, dass die mit DMEM differenzierten hMSC eine signifikant höhere Expression von PPAR- $\gamma$  aufwiesen, wobei diese Zellen am Tag 21 ein Expressionsmaximum von PPAR- $\gamma$  zeigten. Erfolgte die Kultivierung und Differenzierung in MSCBGM, so waren die absoluten PPAR- $\gamma$ -Expressionswerte in etwa vergleichbar mit denen von DMEM. Diese waren nach Zugabe der adipogenen Zusätze signifikant erhöht, nur am Tag 7 zeigte die Kontrolle eine ähnlich hohe PPAR- $\gamma$  Expression wie die differenzierte Probe.

Beim Nachweis von intrazellulären Fettvakuolen durch Oil-Red-O-Färbung zeigten sich erste Rotfärbungen am Tag 7, die bis Tag 21 deutlich zunahmten. Trotz fehlender absoluter Quantifizierungsmöglichkeit konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Medien festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass bei beiden Medien aus morphologischer Sicht adipogene Differenzierungsstufen zur selben Zeit durchlaufen wurden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich auf transkriptioneller Ebene mit DMEM eine schnellere adipogene Differenzierung zeigte. Dieses Ergebnis gepaart mit der Beobachtung, dass hMSC in MSCBGM schneller wachsen, lässt darauf schließen, dass hMSC in DMEM besser differenzieren, wohingegen in MSCBGM das Proliferationsvermögen stärker ausgeprägt ist.

## **F 1.3 Chondrogene Differenzierung**

Kenntnisse über die chondrogene Differenzierung sind grundlegend für das Verständnis der osteochondralen Differenzierung von Zellen in langen Röhrenknochen. Wie bereits erwähnt, findet auch hier Dexamethason Verwendung als eines der Agenzien, die zur Induktion der Differenzierung *in vitro* notwendig sind. In neueren Publikationen wurde

gezeigt, dass vor allem das Zusammenspiel von TGF- $\beta$  und Dexamethason für die chondrogene Differenzierung wichtig ist. So induziert TGF- $\beta$  die Genexpression von Aggrecan, *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) und Kollagen Typ II (Mehlhorn et al., 2006), was durch Dexamethason verstärkt wird. Damit einhergehend steigert TGF- $\beta$  die Expression der aktivierenden Splicevariante des Glukokortikoidrezeptors GR $\alpha$  und trägt zudem zur schwächeren Expression der inhibitorischen Splicevariante GR $\beta$  bei (Derfoul et al., 2006). Glukokortikoidrezeptoren werden vor allem auf Chondrozyten exprimiert, die an der endochondralen Knochenbildung beteiligt sind. Neben diesen induktiven Eigenschaften von Dexamethason ist auch bekannt, dass TGF- $\beta$  und Dexamethason negativ miteinander interagieren könnten (Derfoul et al., 2006).

Bei der Messung von Aggrecan im Rahmen der chondrogenen Differenzierung waren unsere Ergebnisse bezüglich der beiden Basalmedien deutlich verschieden. So stieg der chondrogene Marker bei der Verwendung von MSCBGM ausgehend von niedrigen Basiswerten sehr stark an. Bei DMEM war die Expression der Negativkontrolle schon sehr hoch und änderte sich im Verlauf bis Tag 28 nicht.

Betrachtet man jedoch die Toluidinblau-Färbungen, so fällt auf, dass die Kontrollzellen wesentlich langsamer wuchsen, während hingegen die chondrogen differenzierten Zellsedimente rasch an Volumen zunahmen. Zusätzlich zeigten die Kontrollsedimente ein weniger organisiertes Ordnungsmuster, wobei das Innere der Zellsedimente weniger dicht angeordnet war. Die chondrogenen Zellschichten dagegen zeigten eine knorpelige Struktur im Inneren sowie einen festsitzenden Faserring als Abgrenzung nach außen, wobei die Differenzierung in DMEM weiter fortgeschritten erscheint. Das Innere der Zellsedimentschichten zeigte eine kompaktere Anordnung und auch die faserartige Struktur des umspannenden Ringes besitzt mehr Schichten.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine 28-tägige Kultur in chondrogenem Differenzierungsmilieu ausreicht, um eine Differenzierung der Stammzellen in Knorpelzellen mit einer sie umgebenden Matrix zu erzielen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass wohl DMEM leichte Differenzierungsvorsprünge gegenüber MSCBGM bietet. Ausschlaggebend für diese Annahme sind die besseren Ergebnisse der histochemischen Untersuchung mit Toluidinblau. Geht man von den mRNA-Expressionswerten (Aggrecan) aus, genießt MSCBGM einen leichten Vorteil, wobei festzuhalten ist, dass auf Grund des Vorliegens von einzelnen Werten (die Versuche wurden nicht im Triplet durchgeföhrt) die Interpretation erschwert ist.

## **F 1.4      Resumé der vergleichenden Analyse von DMEM und MSCBGM**

Bereits Jaiswal et al. (1997) wiesen darauf hin, dass unterschiedliche Kulturmedien (DMEM und  $\alpha$ -MEM) die Differenzierung unterschiedlich beeinflussen. In einer aktuellen Studie von Shahdadfar et al. (2006) wurde gezeigt, dass die Kultivierung in Medium, das zum einen mit fötalem Kälberserum (FBS) und zum anderen mit autologem Serum supplementiert wurde, mit unterschiedlichen Wachstums- bzw. Differenzierungsgeschwindigkeiten einhergeht.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen in eine ähnliche Richtung. DMEM wurde mit hitzeinaktiviertem FBS sowie Penicillin/Streptomycin versetzt, während dem MSCBGM ein vorgefertigter Mix aus selektionierten Serumchargen, L-Glutamin und einem Antibiotikum (entweder Penicillin/Streptomycin oder Gentamycin) des Herstellers (Fa. Lonza, USA) zugefügt wurde. Dabei zeigte sich, dass Zellen in MSCBGM schneller wuchsen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass dieses Medium nicht näher vom Hersteller spezifizierte Wachstumsfaktoren enthielt.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen zudem darauf hin, dass in DMEM die Differenzierung in alle drei Richtungen (osteogen, adipogen, chondrogen) schneller vonstatten geht. Dies spiegeln auch die Ergebnisse mittels qRT-PCR wider. Ebenso ergaben die immunhistochemischen Färbungen, dass unter Verwendung von DMEM die Differenzierungen vollständiger ablaufen.

## **F 2            Alternative Differenzierung von hMSC: Einfluss von Osteoblasten auf die Osteogenese**

Trotz des Anstiegs osteogener Marker und des Vorliegens osteogener Morphologien in hMSC nach Behandlung der Stammzellen mittels chemischer Differenzierungsverfahren bleibt es fragwürdig, ob diese Vorgänge *in vivo* tatsächlich in derartiger Weise ablaufen. Beispielsweise ist – wie bereits erwähnt – bekannt, dass Glukokortikoide wie z. B. Dexamethason, angewendet über einen längeren Behandlungszeitraum, Osteoporose auslösen können, was indirekt durch eine verminderte intestinale  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption, einen modifizierten Vitamin D Metabolismus sowie Parathormonplasmaspiegel und damit einhergehender Hyperkalzurie begünstigt wird (Manelli et al., 2000). Dabei wird die Knochenresorption direkt durch Glukokortikoide gefördert bei gleichzeitig verminderter Knochenneubildung (Mitchell et al., 1990). Des Weiteren können Steroide die Bildung von Runx2, Osteocalcin, Kollagen Typ I und IGF-I vermindern, die entweder im Rahmen der Osteogenese gebildet oder benötigt werden (Pereira et al., 2001).

Um dieses artifizielle System des chemischen Differenzierungsmediums zu vermeiden, wurde untersucht, ob bzw. inwiefern von primären Osteoblasten sezernierte Faktoren in der Lage sind, die osteogene Differenzierung von hMSC zu induzieren.

### **F 2.1            Osteogenese-Induktion durch konditioniertes Medium (kOGM)**

Dass mesenchymale Stammzellen zur *in vivo*-Differenzierung innerhalb der mesoderma- len Linie fähig sind, wurde bereits beschrieben (Prockop et al., 1997, Pittenger et al., 1999). In ähnlicher Weise kann durch die Zugabe exogener chemischer Zusätze *in vitro* eine osteogene Differenzierung induziert werden, wobei jedoch ein wesentlicher Nachteil darin besteht, dass wichtige Faktoren des natürlichen Umfelds (Nische) weitgehend unberücksichtigt bleiben.

Der hier vorliegenden Arbeit liegt daher die Hypothese zugrunde, dass der Differenzierungszustand der Stammzellen von Zellen aus der jeweiligen Nische mitbestimmt wird, indem diese Hormone, Enzyme oder Wachstumsfaktoren ausschütten. Da Osteoblasten in unmittelbarer Nähe des Knochenmarks vorkommen (Meads et al., 2008) und es darüber hinaus bekannt ist, dass diese Zellen auch eine wichtige Rolle in der Regulation der hämatopoetischen Stammzellnische (siehe B 1.4) spielen (Calvi et al., 2003), wurde der Einfluss von humanen Osteoblasten (hOB) auf hMSC näher untersucht.

Zunächst wurde konditioniertes Medium mit Hilfe von primären humanen Osteoblasten erzeugt und dieses anschließend zur Kultur von hMSC verwendet.

Im Vorversuch wurden hMSC sowohl in MSCBGM als auch in Osteoblastenwachstumsmedium (OGM) (jeweils konditioniert und nicht-konditioniert) kultiviert. Bei der anschließenden Messung von AP mittels qRT-PCR zeigte sich, dass zum einen deren Expression durch Kultivierung mit konditioniertem Medium anstieg und dass hMSC in beiden nicht-konditionierten Medien dasselbe Expressionsniveau von AP erreichten. Dadurch war klar, dass OGM per se keinen Einfluss auf den Differenzierungsstatus von hMSC nimmt. Da Osteoblasten allerdings besser in OGM zu kultivieren waren, wurden alle weiteren Versuche mit OGM und konditioniertem OGM (kOGM) durchgeführt.

Der erste Versuch unter standardisierten Bedingungen ergab, dass der osteogene Marker AP durch Kultivierung in kOGM an den Tagen 4, 7, 14, 21 und 28 signifikant über die entsprechenden Kontrollwerte angestiegen war, wobei eine kontinuierlichere Zunahme bis Tag 21 gefolgt von einem deutlichen Abfall der AP-Expression zu beobachten war. Im Vergleich dazu zeigte die AP-Expression bei der chemisch induzierten Differenzierung in DMEM (CD) einen Spitzenwert am Tag 7 auf und fiel danach bereits ab. Nimmt man CD als Referenzmedium für die osteogene Differenzierung, so lassen sich aus diesen Ergebnissen folgende Aussagen ableiten: Die in kOGM kultivierten hMSC weisen stets eine höhere Expression der AP im Vergleich zu den Kontrollen auf. Das Maximum der AP-Expression wird ca. 14 Tage später erreicht, was darauf hindeutet, dass mittels kOGM die osteogene Differenzierung langsamer erfolgt als mit CD. Durch die Konditionierung mit Osteoblasten gelangt offensichtlich Information in Form von Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren ins Medium, die für eine unterschiedliche Induktion der AP verantwortlich waren. Zur genaueren Analyse wurden deshalb weitere Marker bestimmt.

Das Hormon Leptin ist für die Regulation des Hungergefühls und des Energiemetabolismus im Körper verantwortlich. Es wird normalerweise von Fettgewebezellen produziert und ausgeschüttet. Thomas et al. (1999) konnten zeigen, dass Leptin die osteogene Differenzierung von Zellen aus dem Knochenmark stimuliert und gleichzeitig die Reifung von Adipozyten unterbindet. Später wurde entdeckt, dass primäre Osteoblasten-Kulturen mehr Leptin-Rezeptor-mRNA produzieren als entsprechende Kontrollzellen, in diesem Fall Osteosarkomzellen und kommerziell erhältliche Osteoblasten (Reseland et al., 2001). Deshalb wurde in unserem Ansatz auch der Leptin-Rezeptor (LR) als weiterer Marker der frühen Osteogenese gemessen. Bei hMSC, die mit kOGM kultiviert worden waren, stellte sich heraus, dass die Expression des LR am Tag 4 und Tag 7 signifikant erhöht war, während am Tag 14 zwar eine weitere Induktion von LR in kOGM zu detektieren war, aber gleichzeitig auch die entsprechenden Kontrollen eine höhere LR-Expression zeigten. Lep-

tin-Rezeptor-mRNA wird also durch lösliche Faktoren, die von hOB sezerniert wurden, stimuliert und daraufhin höher exprimiert als in Kontrollzellen. Dieser Effekt war vor allem in der Frühphase deutlich erkennbar und nivellierte sich wieder über die Zeit (ca. nach 14 Tagen).

Cathepsin K (CTSK) gehört zur Gruppe der sogenannten kollagenolytischen Proteinasen (Garnero et al., 1998). Diese werden von Osteoklasten produziert und zur Degradation von extrazellulärer, osteogener Matrix ausgeschüttet, die hauptsächlich aus Kollagen I besteht. Darüber hinaus kann CTSK auch von Osteoblasten gebildet und sezerniert werden, um beispielsweise unzureichend prozessiertes Kollagen I zu recyceln (Mandelin et al., 2006). Basierend auf der Theorie, dass Stammzellen nach der Rekrutierung aus dem Knochenmark an den Ort des Defektes wandern und geschädigte Strukturen abbauen müssen, um an ihren Bestimmungsort gelangen zu können, liegt es auf der Hand, dass Stammzellen proteolytische Enzyme produzieren müssen. Deshalb wurde CTSK als weiterer Marker der frühen Osteogenese gemessen. Die Expression von CTSK stieg zunächst am Tag 4 auf ein Vielfaches des Ausgangswertes von Tag 1 an, nahm von Tag 4 auf Tag 7 ab und fiel am Tag 14 fast auf das Ursprungsniveau zurück. Dabei waren die Werte unter Kultivierung der hMSC mit kOGM sowohl am Tag 4 als auch am Tag 7 signifikant erhöht, während am Tag 14 nur noch eine leichte Zunahme der Expression im Vergleich zu der in den Kontrollzellen zu detektieren war.

Decorin ist ein kleines Chondroitin-Dermatansulfat Proteoglykan, das aus einem Kernprotein und einer einzelnen Glukosaminoglykankette aufgebaut ist. Als ein typischer Bestandteil von Bindegewebe wurde es ursprünglich aus Knochen- und Knorpelgewebe isoliert (Rosenberg et al., 1985). Neben seiner stabilisierenden und vernetzenden Wirkung scheint es auch eine Rolle in der Differenzierung zu spielen, wobei es TGF- $\beta$  bindet (Yamaguchi et al., 1990). Beim Nachweis der Decorin-mRNA zeigte sich ebenfalls an den Tagen 4 und 7 eine signifikante Erhöhung in denen mit kOGM behandelten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die differenzierenden hMSC bereits vermehrt Komponenten der extrazellulären Matrix produzieren. Auch die Induktion von Decorin stützt die Hypothese, dass Faktoren, die von Osteoblasten ins Medium ausgeschüttet werden, die frühe Osteogenese von hMSC triggern können.

Von Sierra et al. wurde 2003 zum ersten Mal beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor Runx2/Cbfa1 (*mammalian runt domain protein 2/core binding factor  $\alpha$  1*) mit anderen Kofaktoren den späten osteogenen Marker Osteocalcin reguliert. Zur weiteren Analyse des Differenzierungsstatus der mit kOGM kultivierten Zellen, wurde deshalb auch das mRNA-Expressionsprofil dieses Transkriptionsfaktors analysiert. Interessanterweise ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mit kOGM behandelten Zellen und

Kontrollzellen feststellen. Das deutet darauf hin, dass die löslichen Faktoren im kOGM zwar die frühe Osteogenese induzieren können, aber keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Runx2 haben. Da das hier verwendete Methodenspektrum sich auf den Nachweis von mRNA beschränkte, konnte weder ausgeschlossen noch nachgewiesen werden, ob Runx2 im Rahmen posttranslationaler Proteinmodifikationen verändert wurde, die zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führen können.

Bone Sialoprotein 2 (BSP-2) ist ein Protein, das vor allem in der umgebenden extrazellulären Matrix von jungen Osteoblasten zu finden ist. Funktionell hat es großen Anteil an der mineralischen Kristallbildung in der ECM. Diese Eigenschaften prädestinieren BSP-2 als verlässlichen Marker der frühen osteogenen Differenzierung (Ganss et al., 1999). Osteocalcin dagegen (OCN) findet vor allem Verwendung als Marker der späteren osteogenen Differenzierung. Dieses nicht-kollagenöse Protein kann Calcium binden und wird im Allgemeinen von Osteoblasten sezerniert, die sich in einer späteren Phase der Osteogenese befinden (Takayama et al., 2008). Betrachtet man diese beiden typischen osteogenen Marker, so unterstreichen die Expressionsergebnisse nach Stimulation mit kOGM die These, dass frühe osteogene Differenzierungsstufen in hMSC erreicht werden. BSP-2, als früher Marker, steigt über die Zeit an und ist nach kOGM-Kultivierung der Stammzellen in diesen immer signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu zeigen sich beim späten osteogenen Marker Osteocalcin weder über den Zeitverlauf noch durch verschiedene Kultivierungsmedien Expressionsunterschiede.

Fasst man alle Ergebnisse der Analyse osteogener Marker zusammen, so kann man folgern, dass kOGM alle untersuchten Faktoren mit Ausnahme von Runx2 und Osteocalcin induziert. Dies unterstreicht zum einen, dass konditioniertes Osteoblastenwachstumsmedium einen starken Stimulus für humane mesenchymale Stammzellen darstellt, den osteogenen Differenzierungsweg einzuschlagen. Auf der anderen Seite lässt sich dadurch belegen, dass stimulierte hMSC auch nach längerer Kultur noch nicht in die späte Phase der osteogenen Differenzierung eingetreten sind, da der späte Marker OCN nicht induziert wird. Dies wurde zudem dadurch bekräftigt, dass der osteogene Transkriptionsfaktor Runx2 nicht verstärkt synthetisiert wurde. Runx2 ist zwar in verschiedenen Phasen der Osteogenese aktiv, aber hauptsächlich in der späteren Phase der osteogenen Differenzierung kommt ihm eine zentrale Bedeutung zu (Karsenty et al., 2000; Sierra et al., 2003).

## F 2.2 Einfluss von hOB auf hMSC in der indirekten Kokultur

Die der hMSC-Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen zugrunde liegenden Mechanismen waren und sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. So zeigten zum Beispiel Ball et al. (2004), dass hMSC durch indirekte Kokultur mit endothelialen Zellen vermehrt organisierte Filamente ausbilden. Interessanterweise differenzieren Fibroblasten in Richtung Myofibroblasten, wenn sie mit hMSC direkt kokultiviert wurden. Durch indirekte Kokultur von murinen Myofibroblasten und MSC differenzieren MSC in Richtung Kardiomyozyten, die partiell auch Spontankontraktionen zeigten (Xie et al., 2006; Li et al., 2007).

Basierend auf diesen und eigenen Vorergebnissen sollte das Konzept auf humane mesenchymale Stammzellen und primäre humane Osteoblasten angewendet werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Differenzierungsverhalten von hMSC in der indirekten Kokultur mit primären Osteoblasten (hOB) untersucht. Unter physiologischen Bedingungen unterliegen Stammzellen möglicherweise nicht immer dem direkten Einfluss mit terminal differenzierten Zellen, so dass der Interaktion durch Austausch von löslichen Faktoren eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Vor diesem Hintergrund wurden indirekte Kokultivierungsexperimente mit Hilfe eines Transwellsystems durchgeführt. Im Vorversuch wurde zunächst über zwei Wochen getestet, ob Kokultivierungen von hMSC mit hOB in unterschiedlicher Zellzahl Auswirkungen auf das Expressionsverhalten von AP hat. Dabei stellte sich heraus, dass ein Zellzahlverhältnis von 2:1 (hOB:hMSC) mit einer signifikanten Expressionssteigerung der AP in hMSC einherging. Daraus resultierten standardisierte Kokulturversuche über 4, 7 und 14 Tage, die einerseits mit derselben Anzahl an hOB und hMSC, und andererseits mit der doppelten Anzahl von hOB sowie mit hMSC ohne hOB (Kontrolle) durchgeführt wurden. Der frühe osteogene Marker AP war signifikant ab Tag 4 erhöht, wenn hMSC indirekt mit hOB kokultiviert wurden und zeigte ab Tag 7 sogar einen hochsignifikanten Anstieg. Interessant war dabei die Beobachtung, dass die Kokultivierung mit der doppelten hOB-Zahl mit einer höheren Induktion der AP-Expression einherging. Ein ähnliches Expressionsprofil war beim Nachweis von LR zu beobachten. Insbesondere die Expressionswerte von BSP-2 zeigten sowohl ein zeitabhängiges, aber noch viel mehr ein von der hOB-Anzahl abhängiges Induktionsverhalten, bei dem die doppelte Anzahl an hOB beinahe die doppelte Induktion an Tag 14 hervorrief. Hingegen war beim späten osteogenen Marker OCN keine Expressionsänderung nachzuweisen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass - ähnlich der Resultate, die mittels der Kultivierung in kOGM erreicht wurden - auch mit der indirekten Kokultur eine Induktion der frühen Osteogenese erzielt werden kann. Zudem war auffällig, dass die Induktionsrate der Markergene von der hOB-Zellzahl abhängig war, d.h. je größer die Osteoblastenzahl in der Kokultur war, desto höhere Induktionsraten konnten beobachtet werden. Darüberhinaus zeigten die Stammzellen in der Kokultur bereits früher als bei Kultivierung in kOGM ein osteogenes Differenzierungsverhalten. Diese Beobachtung ist insofern plausibel, als durch die indirekte Kokultur ein kontinuierlicher Austausch an löslichen Faktoren ermöglicht wird, wohingegen bei Experimenten mit konditioniertem Medium die gelösten Stoffe möglicherweise vor dem nächsten Mediumwechsel zum Teil oder eventuell sogar vollständig aufgebraucht waren.

### **F 2.3      Microarray-Daten zu verschiedenen Zell- und Kultivierungsarten**

Mittels eines speziellen Osteogenese-Microarrays sollte das Transkriptionsprofil von hMSC und hOB sowie von mittels CD bzw. kOGM differenzierten hMSC vergleichend untersucht werden. Die Validität der Microarray-Ergebnisse wurde anhand der Marker AP und CTSK überprüft. Beide Gene zeigten sowohl im Microarray als auch in der qRT-PCR eine Induktion nach Stimulation von hMSC mit kOGM. Zudem wiesen auch hOB eine verstärkte Expression dieser Marker auf.

Auffällig ist, dass während der durch kOGM induzierten Differenzierung die meisten der Gene im Vergleich zu unbehandelten hMSC herabreguliert werden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass Stammzellen im Vergleich zu ausdifferenzierten Zellen eine Vielzahl von Genprodukten benötigen, um auf zahlreiche Stimuli reagieren zu können (Terskikh et al., 2003).

Wurden hMSC in CD kultiviert, so wurden im Vergleich zu unbehandelten hMSC beinahe ebenso viel Gene herauf- wie herabreguliert. Insgesamt gab es weniger Genveränderungen zu detektieren als bei mit kOGM kultivierten hMSC bzw. OGM. Das lässt die These zu, dass die chemischen Faktoren zwar einzelne osteogene Marker induzieren bzw. verändern, aber der Grundcharakter der so behandelten hMSC eher dem der Stammzellen entspricht.

Im Hinblick auf osteogen relevante Faktoren findet man wesentlich mehr Übereinstimmungen zwischen hOB und mit kOGM behandelten hMSC als zwischen hOB und mit CD kultivierten hMSC. Die höhere Konkordanz zwischen hOB und mit kOGM differenzierten hMSC weist darauf hin, dass sie auch hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades eine grö-

Bere Ähnlichkeit zeigen. Bei den hochregulierten Genen handelt es sich um die frühen osteogenen Marker AP und CTSK, den Calcitonin-Rezeptor als Zielprotein von Calcitonin, welcher die Knochenresorption *in vitro* sowie *in vivo* hemmen kann (Dacquin et al., 2004) und SMAD9, ein Transkriptionsfaktor der TGF- $\beta$ /BMP-Signalkaskaden (Ross et al., 2008). Dagegen sind die meisten Gene für die Bildung von ECM-Proteinen wie z. B. Kollagene nicht induziert. Dies weist erneut darauf hin, dass sich die mit kOGM kultivierten hMSC nach der Zeit von zwei Wochen noch in der Frühphase der osteogenen Differenzierung befinden.

## **F 2.4 Mineralisierungsfähigkeit von Osteoblasten**

Osteoblasten durchlaufen in ihrer Entwicklung von mesenchymalen Vorläuferzellen bis zum terminal differenzierten Osteozyten verschiedene Stadien. Westendorf et al. (2004) beschreiben hierfür fünf Phasen: pluripotente Stammzelle, Osteoprogenitor, Präosteoblast, reifer Osteoblast und Osteozyt. Zunächst steht die Proliferation und Expansion im Vordergrund, später die Produktion einer kollagenhaltigen, extrazellulären Matrix und die frühe Differenzierung der Zellen und erst in der letzten Phase die terminale Differenzierung sowie die Mineralisierung der ECM (Harada & Rodan, 2003).

Um einen Hinweis auf den Entwicklungsstand der von uns eingesetzten hOB gewinnen zu können, wurden die hOB über den Zeitraum von 14 Tagen mit verschiedenen Differenzierungszusätzen behandelt und anschließend zum Nachweis von Kalziumphosphat mittels Alizarin-Rot angefärbt. Überraschenderweise konnten wir nur eine positive Färbung beobachten, wenn mindestens die beiden Zusätze Dexamethason und  $\beta$ -Glycerolphosphat im Medium vorhanden waren. Das ist womöglich darauf zurückzuführen, dass es sich bei diesen Zellen um osteogene Vorläuferzellen bzw. Osteoblasten aus einer früheren Differenzierungsphase handelt, die noch nicht ECM mineralisieren können.

## **F 3 Osteogenese und Wnt-Signaltransduktionsweg**

### **F 3.1 Zytoplasmatisches $\beta$ -Catenin**

Die semiquantitative Analyse von  $\beta$ -Catenin mittels Western Blot ergab am Tag 3 eine zweifache Induktion von  $\beta$ -Catenin nach Kultivierung mit kOGM im Vergleich zum Kontrollmedium.  $\beta$ -Catenin ist der intrazelluläre Überträger der Information von Wnt und wird nach Aktivierung des kanonischen Weges vermindert abgebaut, wodurch es zu seiner Akkumulation mit nachfolgendem Transfer in den Zellkern kommt (Neth et al., 2007). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass durch kOGM entweder zusätzliches  $\beta$ -Catenin von der Zelle synthetisiert wird oder eine Verminderung des Degradationsprozesses in Frage kommt. Träte der zweite Fall ein, so wäre dies ein weiterer wichtiger Hinweis darauf, dass humane Osteoblasten einen oder mehrere Wnt-Liganden sezernieren, die den kanonischen Wnt-Weg aktivieren können.

### **F 3.2 Osteogene Marker nach Inhibition des Wnt-Weges**

Über einen möglichen Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Osteogenese verschiedener Stammzellen gibt es unterschiedliche und sich teilweise widersprechende Aussagen. So zeigten De Boer et al. (2004), dass Wnt3a bzw. die alternative Aktivierung durch LiCl die Dexamethason-induzierte Osteogenese inhibieren kann. Allerdings wird gleichzeitig ein dosisabhängiger Effekt beschrieben. In niedriger Dosis induziert Wnt3a die Proliferation, wohingegen in hohen Dosen die adipogene Differenzierung blockiert und Alkalische Phosphatase vermehrt exprimiert wird.

Lithium wird zur Langzeitbehandlung von manisch-depressiven Patienten verwendet (Shaw et al., 2004). In einer 2005 erschienenen Studie zeigte sich, dass diese Patienten ein geringeres Risiko für Knochenbrüche im Vergleich zur Kontrollgruppe haben. Teilweise konnte ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden, den die Autoren auf die inhibierenden Eigenschaften von LiCl hinsichtlich der Knochenresorption zurückführten (Vestergaard et al., 2005).

Andererseits entdeckten Gong et al. (2001), dass *loss-of-function*-Mutationen im Korezeptor LRP5 mit dem Krankheitsbild des *Osteoporosis Pseudoglioma Syndrom* (OPPG), einer schweren Osteoporose mit fortschreitender Erblindung, einhergehen. Kurz darauf beschrieben verschiedene Gruppen, dass bestimmte *gain-of-function*-Mutationen im N-Terminus des Korezeptors LRP5 eine Zunahme der Knochenmasse bewirkten (Boyden et al., 2002; Ferrari et al., 2005; Balemans et al., 2007). Darüber hinaus spielt der kanonische Wnt-Signalweg bei der Selbstreplikation von Stammzellen bei der vermehrten

Rekrutierung junger Präosteoblasten sowie bei der Repression der Apoptoserate in Osteoblasten und Osteozyten eine tragende Rolle (Krishnan et al., 2006).

Interessanterweise schildern Westendorf et al. (2004), dass der Wnt-Signalweg Glycosaminoglykane (z.B. Heparinsulfat und Chondroitinsulfat) in der Extrazellulärmatrix benötigt. Diese tragen dazu bei, einen Wnt-Gradienten aufzubauen. Wie bereits erwähnt, ist die osteogene ECM zur Speicherung von Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- $\beta$  fähig, was prinzipiell auch für Wnt-Liganden zutreffen könnte. Trotzdem ist bis heute unbekannt, welche Zellart Wnt-Liganden in der physiologischen Nische der knochenformenden Umgebung herstellt.

Um einen näheren Einblick bezüglich des Wnt-Weges im Rahmen des osteogenen Differenzierungsprozesses zu erlangen, wurden in einem RNA-Interferenz-basierten Ansatz die beiden Differenzierungsansätze (kOGM und CD) verglichen. Durch Ausschaltung des Signalwegs mittels siRNA gegen  $\beta$ -Catenin sowie LRP5 sollte eine *loss-of-function*-Situation nachgeahmt werden. Zunächst zeigte sich, dass durch die Verwendung von kOGM die Expression der AP in den Kontrollzellen im Vergleich zu OGM-behandelten Zellen deutlich anstieg. Nach vorheriger Transfektion der Zellen mit siRNAs gegen  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 war eine verminderte AP-Expression zu verzeichnen. Im Vergleich dazu präsentierte sich ein völlig anderes Muster bei Verwendung von OGM und CD. Beide Medien bewirkten eine erhöhte AP-Expression bei  $\beta$ -Catenin-*Knockdown*, aber eine herabgesetzte Expression nach LRP5-*Knockdown*.

Aus diesen ersten Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Inhibition des Wnt-Signalweges durch RNAi gegen  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 mit einer deutlich verminderten AP-Expression einhergeht. Deshalb stellten sich zwei wesentliche Fragen, nämlich:

1. Ist der Wnt-Signalweg entscheidend für die frühe Osteogenese in hMSC und wird der Ligand durch Osteoblasten produziert und ausgeschüttet?
2. Wenn der Wnt-Signalweg eine frühe Osteogenese induziert und somit ein Ausschalten des Weges die Differenzierung inhibiert, warum werden dabei nicht alle Differenzierungsmarker auf gleiche Art und Weise beeinflusst?

Die letztere Frage lässt sich folgendermaßen beantworten. Es ist bekannt, dass der kanonische Wnt-Signalweg nicht der einzige ist, der durch Wnt-Liganden aktiviert werden kann (z. B. Westendorf et al., 2004). Unter den nicht-kanonischen Signalwegen gibt es den sogenannten Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg, der über die intrazelluläre Aktivierung heterotrimerer G-Proteine zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht, zyklisches GMP erniedrigt und die Proteinkinase C und damit NF-AT (nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten) aktiviert. Ein dritter möglicher Signalweg ist der planare Zellpolaritätsweg (PCP), bei dem Rho/Rac-

GTPasen und die Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert werden. Letzterer spielt vor allem in der Embryogenese eine wichtige Rolle. Neuere Veröffentlichungen beschreiben zudem, dass der PCP genauso wie der kanonische Weg über Dishevelled (Dsh) vermittelt wird (Veeman et al., 2003), wobei beim PCP-Weg das Actin-Skelett modifiziert wird. Durch einen weiteren nicht-kanonischen Weg wird über die Proteinkinase C die Muskelmyogenese beeinflusst. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Weg wird der Proteinkinase A zugeteilt (Johnson et al., 2006). In den genannten Fällen wirkt  $\beta$ -Catenin nicht als zentraler Transkriptionsmediator.

Vorstellbar ist nun, dass bestimmte osteogene Marker nicht nur über einen einzigen Signalweg gesteuert werden, sondern über mehrere. Da nicht vollständig geklärt ist, wie der Wnt-Weg über LRP5 und den Frizzled-Korezeptoren reguliert wird, ist es durchaus denkbar, dass ein Ausfall von LRP5, als extrazellulär wirksamer Korezeptor des kanonischen Wnt-Signalweges, zu größeren Unterschieden führt als die selektive Hemmung von  $\beta$ -Catenin durch RNAi, dessen Funktion weiter *downstream* in der Kaskade zum Tragen kommt. D.h. es wäre durchaus möglich, dass nach der Übertragung des Signals von extra- nach intrazellulär über den ternären Komplex mit LRP5 und einen Frz-Molekül zwar die Aktivierung von Zielgenen durch  $\beta$ -Catenin nicht erfolgen kann, aber ein anderer der bereits beschriebenen Wnt-Signalwege weiter seine Funktion ausüben kann. Darüber hinaus gibt es viele Hinweise darauf, dass außer dem Wnt-Signalweg weitere Signaltransduktionswege an der Osteogenese beteiligt sind. Dazu zählt u.a. der BMP-Signalweg (Rawadi et al., 2003). Der Einfluss dieser Signalkaskade könnte deutlich an Einfluss gewinnen, da zudem bekannt ist, dass es eine enge Verbindung zwischen dem BMP- und Wnt-Signaling gibt (Nakashima et al., 2005).

Als zweiter Marker wurde der Leptin-Rezeptor (LR) gemessen. Auch hier ergaben sich große Unterschiede. Zum einen zeigte sich, dass die Verwendung von CD mit einer ca. 10-fach höheren Expression einhergeht. hMSC, die in OGM bzw. kOGM kultiviert wurden, wiesen ein ähnliches Expressionsniveau von LR auf. kOGM zeigte allerdings überraschenderweise eine Induktion von LR nach Knockdown von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5, wobei hier das Ausschalten von  $\beta$ -Catenin den stärksten Effekt nach sich zog. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Expression des Leptin-Rezeptors durch den kanonischen Wnt-Signalweg normalerweise gehemmt wird, da unter nicht-stimulierenden Bedingungen (OGM) keine signifikanten Unterschiede nach Knockdown von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 zu detektieren waren.

Sowohl RNAi gegen  $\beta$ -Catenin als auch gegen LRP5 führten zu erhöhten Cathepsin K (CTSK)-Werten im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch hier zeigte sich, dass unter OGM-Bedingungen CTSK inhibiert wird, da nach Ausschaltung des Wnt-Signalweges bzw. Sti-

mulation durch kOGM die Expression von CTSK wieder anstieg. Ursprünglich war CTSK, eine kollagenolytische Cysteinprotease zum Abbau von Kollagen I in der organischen Knochenmatrix, für ihr Vorkommen in Osteoklasten bekannt. In der jüngeren Literatur wird aber darauf hingewiesen, dass beim Knochenumbau auch andere Zellen wie z.B. Osteoblasten die Produktion von Cathepsin K übernehmen und damit zum Abbau der Matrix beitragen können (Mandelin et al., 2005). Ein weiterer Unterschied zwischen den mit kOGM differenzierten Zellen und denjenigen, die mit CD differenziert wurden, besteht darin, dass sich erstere in der frühen Differenzierungsphase befinden. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass der Wnt-Signalweg v.a. in der frühen osteogenen Differenzierungsphase aktiv ist, während er in der späten Phase reprimiert wird (De Boer et al., 2004).

Die mRNA-Daten von Decorin zeigten im Rahmen der Standardabweichung keinen Unterschied zwischen den diversen Ansätzen mit OGM und kOGM. Vermutlich hat weder die Behandlung mit konditioniertem Medium noch die Ausschaltung des Wnt-Signalweges einen Einfluss auf die Expression. Durch die Verwendung von CD ließ sich hier aber eine ca. 10-fache Induktion im Vergleich zu den Gegebenheiten bei Verwendung von OGM bzw. kOGM erreichen. Die Ausschaltung von LRP5 zog eine signifikante Erniedrigung des Decorin-Wertes nach sich. Mutmaßlich induziert eine der chemischen Substanzen, die bei der Generierung von CD verwendet wurden, die Produktion von Decorin-mRNA. Möglicherweise ist dabei auch LRP5 beteiligt, indem es einem positiven Effekt auf diese Wirkung ausübt.

Mit dem Transkriptionsfaktor Runx2 wurde ein Faktor bestimmt, der während der Differenzierung vom Stadium der Osteoprogenitoren/Präosteoblasten über das reife Osteoblastenstadium bis hin zum Osteozytenstadium aktiv ist (Komori et al., 2003; Huang et al., 2007). Auffällig war, dass die Runx2-Expression ein gegenläufiges Muster beim Vergleich von kOGM und OGM zeigte. Bei Verwendung von OGM war Runx2 nach *β-Catenin-Knockdown* erniedrigt, während es bei kOGM erhöht war. Nach der Kultivierung in CD war die Runx2-Expression in allen drei Proben im Vergleich zu den anderen Medien erhöht, wobei kein signifikanter Unterschied untereinander festgestellt werden konnte. Das deutet darauf hin, dass bei Kultivierung von Stammzellen in OGM ohne zusätzlichen Stimulus bereits eine – zumindest partielle – Aktivierung des Wnt-Signalweges vorliegt, da nach *β-Catenin-Knockdown* die Runx2-mRNA-Expression deutlich abfällt. Der LRP5-*Knockdown* dagegen scheint keine Auswirkungen zu haben. Andererseits wird Runx2 hochreguliert, wenn ein Stimulus vorliegt (kOGM) und der Wnt-Signalweg durch *β-Catenin-siRNA* ausgeschaltet wird. Widersprüchlicherweise liegt dagegen bei LRP5-Ausschaltung keine Veränderung vor, so dass die Frage offen bleibt, ob tatsächlich der Wnt-Signalweg entscheidend ist oder aber nur *β-Catenin* eine Schlüsselrolle spielt. Für

Runx2 wurde beschrieben, dass es zum einen durch BMP und TGF $\beta$  zur Aktivierung kommt. Andererseits zeigten Gaur et al. (2005), dass kanonische Wnt-Liganden Runx2 positiv über Tcf1 beeinflussen, was zum Beginn der osteogenen Differenzierung führt. Denkbar ist auch, dass für die Aktivierung von Runx2 entweder LRP6 ausschlaggebend ist oder  $\beta$ -Catenin das verknüpfende Molekül zwischen Wnt- und anderen Signalwegen, wie z. B. einer BMP-Signalkaskade, darstellt (Mbalaviele et al., 2005).

Positive Auswirkungen von kOGM auf das Expressionsprofil von BSP-2 waren zuvor schon gezeigt worden. In dieser Versuchsreihe hingegen zeigte sich, dass der frühe osteogene Marker durch  $\beta$ -Catenin beeinflussbar ist. So stieg der Marker signifikant an, nachdem der intrazelluläre Transmitter des kanonischen Wnt-Signalweges herabreguliert worden war. Das weist darauf hin, dass gerade an der Schnittstelle verschiedenster Signale auch eine Regulation dieses Proteins erfolgt. Es scheint, dass gewisse Signale des konditionierten Osteoblastenwachstumsmediums BSP-2 erhöhen, was zusätzlich durch die Hemmung des Wnt-Signalweges gefördert wird. Wie zuvor schon gezeigt, konnte auch in dieser Versuchsreihe keine Veränderung weder nach Stimulation mit kOGM noch nach Verwendung von siRNA beim späten osteogenen Marker Osteocalcin gezeigt werden. Zum einen bestätigt das unsere Hypothese, dass sich die so differenzierten hMSC in einem frühen Stadium der Osteogenese befinden. Zum anderen scheint der Wnt-Signalweg in der Expression von OCN nicht nachhaltig beteiligt zu sein.

Als letztes Gen wurde in diesem Versuchsansatz das Zellzyklus regulierende Cyclin D1 gemessen. Cyclin D1 ist ein klassisches Wnt-Zielgen, was durch Aktivierung des Signalweges vermehrt gebildet wird (Tetsu et al., 1999; Shtutman et al., 1999; Neth et al., 2006). Daraus lässt sich folgern, dass, falls ein oder mehrere aktivierende Wnt-Liganden im kOGM vorhanden wären, zum einen die Cyclin D1-Expression bei Verwendung von kOGM in den Zellen ansteigen und zum anderen durch die Ausschaltung des Signalwegs ein Abfallen der Expression deutlich werden sollte. Doch gerade der gegenteilige Effekt wurde beobachtet. So zeigte sich bei den Kontrollproben der in kOGM kultivierten hMSC die niedrigsten Expressionswerte von Cyclin D1, während sowohl OGM- als auch CD-Proben höhere Expressionswerte aufwiesen. Gleichzeitig ist erkennbar, dass der *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 bei in OGM und CD kultivierten hMSC keinen Unterschied in der Cyclin D1-Expression hervorrufen. Im Gegensatz dazu induziert der *Knockdown* von  $\beta$ -Catenin bzw. LRP5 die Cyclin D1-Expression in kOGM-behandelten Zellen. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass verschiedene Faktoren von Osteoblasten sezerniert werden, die teilweise durch Wnt geblockt werden. Wird diese Barriere ausgeschaltet, so erhöht sich dementsprechend der Einfluss der anderen Faktoren und der Marker kann ansteigen.

## **F 4 Zusammenfassende Beurteilung der alternativen Differenzierung**

Zusammenfassend betrachtet, zeigte sich, dass von Osteoblasten ausgeschüttete Faktoren das transkriptionelle Profil von hMSC nachhaltig beeinflussen. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der indirekten Kokultur von murinen embryonalen Stammzellen mit fetalen Osteoblasten beobachtet. Dabei differenzierten diese murinen ESC in Osteoblasten, was über die Bildung von mineralisierten Knochenknötchen nachgewiesen wurde (Buttery et al., 2001). In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde gezeigt, dass die Präsenz von Osteoblasten in der Nähe der Stammzellen die frühe Osteogenese in hMSC auslösen kann, wobei konditioniertes Medium einen ähnlichen Effekt bewirkt, was auf die Wirkung von löslichen Faktoren schließen läßt. Übertragen auf die Situation *in vivo* bedeutet dies, dass zum einen Osteoblasten eine wichtige Kontrollfunktion in der Stammzell- und/oder Differenzierungsnische innehaben. Zum anderen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass Osteoblasten dazu in der Lage sind, über die Produktion löslicher Faktoren das Differenzierungsverhalten von hMSC über eine größere Entfernung zu steuern. Es ist bekannt, dass bei der *in vivo*-Differenzierung multiple Morphogene, Wachstumsfaktoren und Hormone beteiligt sind. Beispielsweise wird neben dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auch den BMPs (*bone morphogenic protein*) und dem TGF- $\beta$ -Signalweg eine wichtige Rolle zugesprochen (Friedman et al., 2006).

In der Promotionsarbeit wurden zum ersten Mal unter partieller Hemmung des kanonischen Wnt-Weges alle drei verschiedenen Differenzierungsansätze in ein und derselben Versuchsreihe verglichen. Hier zeigte sich, dass durch das chemische Differenzierungsmedium zwar meist höhere Expressionsniveaus des jeweils gemessenen Differenzierungsmarkers erreicht wurden, das Expressionsmuster an sich aber sehr große Ähnlichkeit mit denjenigen hMSC aufwies, die im zur Kontrolle verwendeten Osteoblastenwachstumsmedium kultiviert worden waren.

Die selektive Ausschaltung zweier Komponenten des Wnt-Signalwegs ( $\beta$ -Catenin, LRP5) mit anschließender Stimulation der Zellen durch kOGM brachten zum einen weitere Hinweise darauf, dass eine Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und der frühen Osteogenese in hMSC besteht. Gleichzeitig zeigte sich aber auch, dass die Ergebnisse nicht allein mit der Modulation des Wnt-Signalweges erklärbar waren, sondern eine weitere Regulation der Marker wahrscheinlich ist. Die Vermutung liegt also nahe, dass außer Wnt-Liganden auch andere Faktoren von Osteoblasten sezerniert werden, die ebenfalls mit der frühen Osteogenese assoziiert sind.

## G      **Ausblick**

Im Rahmen des zweiten Teils der Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die alternative Differenzierung von hMSC unter dem Einfluss von Osteoblasten frühe osteogene Expressionsmarker in ähnlicher Weise verändert, wie sie auch in den von uns verwendeten hOB vorkommen. Im Gegensatz dazu konnte dies bei Verwendung von chemischen Zusätzen im Differenzierungsmedium nicht bestätigt werden. Daraus resultiert eine weit- aus natürlichere Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen durch die Stimulation von Osteoblasten im Vergleich zur Verwendung chemischer Differenzierungszusätze mit dem Vorteil, dass auf körperfremde Substanzen, wie beispielsweise Dexamethason, verzichtet werden kann.

Aufbauend auf die Ergebnisse dieser Arbeit sollte das Konzept auf einen direkten Kokulturan- ansatz übertragen werden (Kim et al., 2003). Vorteilhaft wäre daran, dass dadurch insbesondere Fusionsereignisse, die eine schnellere Differenzierung ermöglichen könnten, genauestens untersucht würden. Dazu ist es nötig, Stammzellen und primäre Osteoblasten dauerhaft voneinander unterscheiden zu können. Dies könnte beispielsweise durch stabile Transfektionen und dem Einschleusen unterschiedlicher Fluoreszenzproteine in die beiden Zellarten realisiert werden.

Um diese Erkenntnisse für zukünftige therapeutische Verwendungen *in vivo* zugänglich machen zu können, müssen alternativ differenzierte MSC, die unter dem Einfluss von Osteoblasten generiert worden waren, im Mausmodell evaluiert werden. Dabei wäre zu überprüfen, ob die so differenzierten Zellen im Vergleich zu nativen Osteoblasten bzw. chemisch differenzierten Stammzellen eine bessere Regenerationskapazität in einem murinen Knochendefektmodell aufweisen.

Sollten die Knochendefekte bei der Maus *in vivo* erfolgreich auf diese Weise behandelbar sein, so sollte als nächster Schritt der gleiche therapeutische Ansatz auch am Menschen angewendet werden. Vorstellbar ist, dass im Rahmen eines ausgedehnten angeborenen oder auch erworbenen Knochenleidens (z. B. Unfallfolge) zunächst hMSC sowie hOB vom Patienten entnommen werden. Nach Expansion und Differenzierung durch direkte oder indirekte Kokultur *in vitro* könnten diese Zellen daran anschließend entweder direkt oder angesiedelt auf einer Leitschiene reimplantiert werden, um den Defekt am Knochen durch autologe Zelltherapie zu beheben (Serakinci et al., 2006).

## H Literaturverzeichnis

Adams, G. B. and Scadden, D. T. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 7, 333-337 (2006).

Ai, M., Heeger, S., Bartels, C. F. and Schelling, D. K. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet* 77, 741-753 (2005).

Akune, T., Ogata, N., Hoshi, K., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Takagi, H., Azuma, Y., Kadowaki, T., Nakamura, K. and Kawaguchi, H. Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. *J Cell Biol* 159, 147-156 (2002).

Alonso, L. and Fuchs, E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev* 17, 1189-1200 (2003).

Arai, S. and Klingemann, H. G. Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch Med Res* 34, 545-553 (2003).

Avery, S., Inniss, K. and Moore, H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 15, 729-740 (2006).

Balemans, W., Devogelaer, J. P., Cleiren, E., Piters, E., Caussin, E. and Van Hul, W. Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res* 22, 708-716 (2007).

Ball, S. G., Shuttleworth, A. C. and Kielty, C. M. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 714-727 (2004).

Beauregard, C., Dickstein, G. and Lacroix, A. Classic and recent etiologies of Cushing's syndrome: diagnosis and therapy. *Treat Endocrinol* 1, 79-94 (2002).

Behrens, J. and Lustig, B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 48, 477-487 (2004).

Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. and Robey, P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180-192 (2001).

Bianco, P. and Robey, P. G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414, 118-121 (2001).

Bilodeau, M. and Sauvageau, G. Uncovering stemness. *Nat Cell Biol* 8, 1048-1049 (2006).

Biswas, A. and Hutchins, R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 16, 213-222 (2007).

Bodine, P. V. and Komm, B. S. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* (2006).

Boggs, D. R., Boggs, S. S., Saxe, D. F., Gress, L. A. and Canfield, D. R. Hematopoietic stem cells with high proliferative potential. Assay of their concentration in marrow by the frequency and duration of cure of W/W<sup>v</sup> mice. *J Clin Invest* 70, 242-253 (1982).

Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., Wu, D., Insogna, K. and Lifton, R. P. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346, 1513-1521 (2002).

Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342 (2003).

Bruder, S. P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-294 (1997).

Buttery, L. D., Bourne, S., Xynos, J. D., Wood, H., Hughes, F. J., Hughes, S. P., Episkopou, V. and Polak, J. M. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 7, 89-99 (2001).

Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. and Scadden, D. T. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846 (2003).

Carrington, J. L. Aging bone and cartilage: cross-cutting issues. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 700-708 (2005).

Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M. and Scadden, D. T. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287, 1804-1808 (2000).

Chidgey, A. P., Layton, D., Trounson, A. and Boyd, R. L. Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. *Nature* 453, 330-337 (2008).

Christakos, S., Dhawan, P., Liu, Y., Peng, X. and Porta, A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88, 695-705 (2003).

Colter, D. C., Sekiya, I. and Prockop, D. J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7841-7845 (2001).

Cooper, M. S., Hewison, M. and Stewart, P. M. Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol* 163, 159-164 (1999).

Copelan, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 354, 1813-1826 (2006).

Dacquin, R., Davey, R. A., Laplace, C., Levasseur, R., Morris, H. A., Goldring, S. R., Gebre-Medhin, S., Galson, D. L., Zajac, J. D. and Karsenty, G. Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J Cell Biol* 164, 509-514 (2004).

De Boer, J., Siddappa, R., Gaspar, C., van Apeldoorn, A., Fodde, R. and van Blitterswijk, C. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 34, 818-826 (2004).

De Boer, J., Wang, H. J. and Van Blitterswijk, C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 10, 393-401 (2004).

Deng, J., Petersen, B. E., Steindler, D. A., Jorgensen, M. L. and Laywell, E. D. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 24, 1054-1064 (2006).

Derfoul, A., Perkins, G. L., Hall, D. J. and Tuan, R. S. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 24, 1487-1495 (2006).

Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R. and Prockop, D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107, 275-281 (1999).

Eberhart, C. G. In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg Clin N Am* 18, 59-69, viii-ix (2007).

Eckfeldt, C. E., Mendenhall, E. M. and Verfaillie, C. M. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 726-737 (2005).

Ferrari, S. L., Deutsch, S. and Antonarakis, S. E. Pathogenic mutations and polymorphisms in the lipoprotein receptor-related protein 5 reveal a new biological pathway for the control of bone mass. *Curr Opin Lipidol* 16, 207-214 (2005).

Fodde, R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 38, 867-871 (2002).

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K. and Gerasimov, U. V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263-272 (1987).

Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. and Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274 (1976).

Friedman, M. S., Long, M. W. and Hankenson, K. D. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 98, 538-554 (2006).

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

Ganss, B., Kim, R. H. and Sodek, J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 79-98 (1999).

Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F. H., McQueney, M. S., Foged, N. T., Delmas, P. D. and Delaisse, J. M. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 273, 32347-32352 (1998).

Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S. and Lian, J. B. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280, 33132-33140 (2005).

Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F. H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W. N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J. A., Beighton, P., Black, G. C., Boles, R. G., Boon, L. M., Borrone, C., Brunner, H. G., Carle, G. F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M. L., Hall, B., Hennekam, R. C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C. A., Keppler-Noreuil, K.,

- Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R. S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M. J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B. R. and Warman, M. L. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-523 (2001).
- Habas, R., Dawid, I. B. and He, X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17, 295-309 (2003).
- Hadjiargyrou, M., Lombardo, F., Zhao, S., Ahrens, W., Joo, J., Ahn, H., Jurman, M., White, D. W. and Rubin, C. T. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 277, 30177-30182 (2002).
- Hall, C. L., Kang, S., MacDougald, O. A. and Keller, E. T. Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J Cell Biochem* 97, 661-672 (2006).
- Harada, S. and Rodan, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349-355 (2003).
- Hoelters, J., Ciccarella, M., Drechsel, M., Geissler, C., Gulkan, H., Bocker, W., Schieker, M., Jochum, M. and Neth, P. Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* 7, 718-728 (2005).
- Huang, W., Yang, S., Shao, J. and Li, Y. P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 12, 3068-3092 (2007).
- Hung, S. H., Yeh, C. H., Huang, H. T., Wu, P., Ho, M. L., Chen, C. H., Wang, C., Chao, D. and Wang, G. J. Pioglitazone and dexamethasone induce adipogenesis in D1 bone marrow stromal cell line, but not through the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway. *Life Sci* 82, 561-569 (2008).
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. and Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312 (1997).
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lissberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. and Verfaillie, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49 (2002).
- Jilka, R. L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 41, 182-185 (2003).
- Johnson, M. L., Harnish, K., Nusse, R. and Van Hul, W. LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J Bone Miner Res* 19, 1749-1757 (2004).
- Johnson, M. L. and Rajamannan, N. Diseases of Wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord* (2006).
- Karsenty, G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol* 11, 343-346 (2000).
- Katoh, M. and Katoh, M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 13, 4042-4045 (2007).

Kim, H., Lee, J. H. and Suh, H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med J* 44, 187-197 (2003).

Klemm, D. J., Leitner, J. W., Watson, P., Nesterova, A., Reusch, J. E., Goalstone, M. L. and Draznin, B. Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J Biol Chem* 276, 28430-28435 (2001).

Knoblich, J. A. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 11-20 (2001).

Komori, T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab* 21, 193-197 (2003).

Krishnan, V., Bryant, H. U. and Macdougald, O. A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 116, 1202-1209 (2006).

Lavker, R. M. and Sun, T. T. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13473-13475 (2000).

Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M. and Kliewer, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272, 3406-3410 (1997).

Li, X., Yu, X., Lin, Q., Deng, C., Shan, Z., Yang, M. and Lin, S. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol* 42, 295-303 (2007).

Mandelin, J., Hukkanen, M., Li, T. F., Korhonen, M., Liljestrom, M., Sillat, T., Hanemaaijer, R., Salo, J., Santavirta, S. and Kontinen, Y. T. Human osteoblasts produce cathepsin K. *Bone* 38, 769-777 (2006).

Manelli, F. and Giustina, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 11, 79-85 (2000).

Manolagas, S. C. Role of cytokines in bone resorption. *Bone* 17, 63S-67S (1995).

Manolagas, S. C. and Jilka, R. L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 332, 305-311 (1995).

Marshman, E., Booth, C. and Potten, C. S. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-98 (2002).

Mbalaviele, G., Sheikh, S., Stains, J. P., Salazar, V. S., Cheng, S. L., Chen, D. and Civitelli, R. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J Cell Biochem* 94, 403-418 (2005).

Meads, M. B., Hazlehurst, L. A. and Dalton, W. S. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 14, 2519-2526 (2008).

Mehlhorn, A. T., Niemeyer, P., Kaiser, S., Finkenzeller, G., Stark, G. B., Sudkamp, N. P. and Schmal, H. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng* 12, 2853-2862 (2006).

- Mikesch, J. H., Steffen, B., Berdel, W. E., Serve, H. and Muller-Tidow, C. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 1638-1647 (2007).
- Miller, J. R. The Wnts. *Genome Biol* 3, REVIEWS3001 (2002).
- Mitchell, D. R. and Lyles, K. W. Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms for bone loss; evaluation of strategies for prevention. *J Gerontol* 45, M153-158 (1990).
- Miyabayashi, T., Teo, J. L., Yamamoto, M., McMillan, M., Nguyen, C. and Kahn, M. Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5668-5673 (2007).
- Mountford, J. C. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med* 18, 1-12 (2008).
- Nakashima, A., Katagiri, T. and Tamura, M. Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 280, 37660-37668 (2005).
- Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M. and Ries, C. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1892-1903 (2006).
- Neth, P., Ries, C., Karow, M., Egea, V., Ilmer, M. and Jochum, M. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev* 3, 18-29 (2007).
- Nostro, M. C., Cheng, X., Keller, G. M. and Gadue, P. Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell* 2, 60-71 (2008).
- Nusse, R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res* 18, 523-527 (2008).
- Ogawa, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81, 2844-2853 (1993).
- Oktem, O. and Oktay, K. Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1127, 20-26 (2008).
- Ong, S. Y., Dai, H. and Leong, K. W. Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 12, 3477-3485 (2006).
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245 (1996).
- Pereira, R. M., Delany, A. M. and Canalis, E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 28, 484-490 (2001).
- Piters, E., Boudin, E. and Van Hul, W. Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys* 473, 112-116 (2008).
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).

- Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74 (1997).
- Prokhorova, T. A., Harkness, L. M., Frandsen, U., Ditzel, N., Burns, J. S., Schroeder, H. D. and Kassem, M. in *Stem Cells Dev* (2008).
- Qiang, Y. W., Walsh, K., Yao, L., Kedei, N., Blumberg, P. M., Rubin, J. S., Shaughnessy, J., Jr. and Rudikoff, S. Wnts induce migration and invasion of myeloma plasma cells. *Blood* 106, 1786-1793 (2005).
- Ratajczak, M. Z. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 15, 293-300 (2008).
- Rattis, F. M., Voermans, C. and Reya, T. Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol* 11, 88-94 (2004).
- Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R. and Roman-Roman, S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18, 1842-1853 (2003).
- Reseland, J. E., Syversen, U., Bakke, I., Qvigstad, G., Eide, L. G., Hjertner, O., Gordeladze, J. O. and Drevon, C. A. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 16, 1426-1433 (2001).
- Reya, T. and Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850 (2005).
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. and Weissman, I. L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414 (2003).
- Richardson, D. W. and Dodge, G. R. Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflamm Res* 52, 39-49 (2003).
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50, 649-657 (1987).
- Rosenberg, L. C., Choi, H. U., Tang, L. H., Johnson, T. L., Pal, S., Webber, C., Reiner, A. and Poole, A. R. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem* 260, 6304-6313 (1985).
- Ross, S. and Hill, C. S. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 383-408 (2008).
- Salasznyk, R. M., Westcott, A. M., Klees, R. F., Ward, D. F., Xiang, Z., Vandenberg, S., Bennett, K. and Plopper, G. E. Comparing the protein expression profiles of human mesenchymal stem cells and human osteoblasts using gene ontologies. *Stem Cells Dev* 14, 354-366 (2005).
- Sambrook, P. and Lane, N. E. Corticosteroid osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15, 401-413 (2001).

- Schinner, S., Ulgen, F., Papewalis, C., Schott, M., Woelk, A., Vidal-Puig, A. and Scherbaum, W. A. Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* 51, 147-154 (2007).
- Serakinci, N. and Keith, W. N. Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer* 42, 1243-1246 (2006).
- Shahdadfar, A., Fronsdal, K., Haug, T., Reinholt, F. P. and Brinchmann, J. E. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23, 1357-1366 (2005).
- Shaw, M. The role of lithium clinics in the treatment of bipolar disorder. *Nurs Times* 100, 42-46 (2004).
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522-5527 (1999).
- Sierra, J., Villagra, A., Paredes, R., Cruzat, F., Gutierrez, S., Javed, A., Arriagada, G., Olate, J., Imschenetzky, M., Van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Stein, G. S., Stein, J. L. and Montecino, M. Regulation of the bone-specific osteocalcin gene by p300 requires Runx2/Cbfa1 and the vitamin D3 receptor but not p300 intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 23, 3339-3351 (2003).
- Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Eur J Med Res* 2, 457-464 (1997).
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. and Kai, T. Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104 (2001).
- Stains, J. P. and Civitelli, R. Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75, 72-80 (2005).
- Takayama, Y. and Mizumachi, K. Effect of bovine lactoferrin on extracellular matrixcalcification by human osteoblast-like cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 226-230 (2008).
- Tare, R. S., Babister, J. C., Kanczler, J. and Oreffo, R. O. Skeletal stem cells: Phenotype, biology and environmental niches informing tissue regeneration. *Mol Cell Endocrinol* 288, 11-21 (2008).
- Taupin, P. and Gage, F. H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69, 745-749 (2002).
- Terskikh, A. V., Miyamoto, T., Chang, C., Diatchenko, L. and Weissman, I. L. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood* 102, 94-101 (2003).
- Tetsu, O. and McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426 (1999).
- Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M. D., Burguera, B. and Riggs, B. L. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140, 1630-1638 (1999).
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147 (1998).

Veeman, M. T., Axelrod, J. D. and Moon, R. T. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5, 367-377 (2003).

Vestergaard, P., Rejnmark, L. and Mosekilde, L. Reduced relative risk of fractures among users of lithium. *Calcif Tissue Int* 77, 1-8 (2005).

Warlick, E. D., O'Donnell, P. V., Borowitz, M., Grupka, N., Decloe, L., Garrett-Mayer, E., Borrello, I., Brodsky, R., Fuchs, E., Huff, C. A., Luznik, L., Matsui, W., Ambinder, R., Jones, R. J. and Douglas Smith, B. Myeloablative allogeneic bone marrow transplant using T cell depleted allografts followed by post-transplant GM-CSF in high-risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 32, 1439-1447 (2008).

Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Parfitt, A. M. and Manolagas, S. C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102, 274-282 (1998).

Weissman, I. Stem cell research: paths to cancer therapies and regenerative medicine. *Jama* 294, 1359-1366 (2005).

Westendorf, J. J., Kahler, R. A. and Schroeder, T. M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341, 19-39 (2004).

Wilson, A. and Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6, 93-106 (2006).

Xie, X. J., Wang, J. A., Cao, J. and Zhang, X. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxic conditions. *Acta Pharmacol Sin* 27, 1153-1158 (2006).

Yamaguchi, Y., Mann, D. M. and Ruoslahti, E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346, 281-284 (1990).

Yoon, J., Shim, W. J., Ro, Y. M. and Lim, D. S. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol* 84, 715-721 (2005).

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. and Li, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841 (2003).

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. and Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32, e103 (2004).

**Bücher:**

Joe Sambrook, David W. Russell (2001) „Molecular Cloning: A Laboratory Manual.“ Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3<sup>rd</sup> Edition

Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto (2004) „Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease.“ Saunders Verlag, 7<sup>th</sup> Edition

**Dissertation:**

Marisa Karow (2008) „Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Analyse einzelner Signalkomponenten und deren funktioneller Bedeutung bei Proliferation und Invasion“

---

# Curriculum Vitae

## Persönliche Angaben

Friedrich Matthias Josef Ilmer

geboren am 10. März 1981

als erstes Kind von Dres. med. Gabriele und Friedrich Ilmer in München

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Fremdsprachen: Englisch und Spanisch fließend in Laut und Schrift

## Ausbildung

- seit Sept. 2008* Assistenzarzt für Gynäkologie und Geburtshilfe an der  
1. Universitätsfrauenklinik der LMU München
- Mai 2008* Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München (2,0)
- 2007 – 2008* Praktisches Jahr (München; Aguascalientes, Mexiko)
- 2005 – 2007* Experimenteller Teil der Dissertation zum Dr. med.
- 2005 – 2006* Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“
- 2003* Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München (3,0)
- 2002 – 2003* Auslandssemester an der *Universidad Miguel Hernández (UMH) de Elche* in San Juan (Alicante, Spanien)
- 2001 – 2008* Studium der Humanmedizin an der *Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)* in München
- 2000 – 2001* Grundwehrdienst bei der Luftwaffe in Bayreuth und Kaufbeuren
- 2000* Allgemeine Hochschulreife (Abitur) in Mindelheim (1,8)
- 1991 – 2000* Maristenkolleg Mindelheim (Gymnasium)
- 1987 – 1991* Grundschule Mindelheim

## Famulaturen

- 2006* Anästhesie (*National University of Ireland, Galway*)
- 2006* Neurochirurgie (*Uniklinikum Großhadern der LMU München*)
- 2004* Pädiatrie (*Hospital Universitario de San Juan, UMH, Spanien*)
- 2004* Chirurgische Notaufnahme (*Krankenhaus München Bogenhausen*)

---

## Praktisches Jahr

- 2007 – 2008 Gynäkologie & Geburtshilfe (*Hospital de la Mujer, Aguascalientes, México*)
- 2007 Chirurgie (*Lehrkrankenhaus Schwabing, München*)
- 2007 Innere Medizin (*Uniklinikum Großhadern der LMU München*)

## Wissenschaft

- 2005 – 2008 Dissertation (Thema: „*Osteoblasten-induzierte frühe Osteogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges*“) in der AG Neth  
Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der  
LMU München  
(Leitung: Frau Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum)

## Stipendien

- 2006 Reisekostenstipendium der *Glaxo-Smith-Kline Stiftung* (1.000 €)
- 2005 – 2006 Stipendiat und gewählter Sprecher des Promotionsstudienganges „*Molekulare Medizin*“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre (*FöFoLe*) der Medizinischen Fakultät der LMU München
- 2002 – 2003 Erasmusaustauschprogramm für Anatomie und Neuroanatomie an der *Universidad San Miguel Hernández* de San Juan, Spanien  
(Schirmherrschaft: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reinhard Putz)

## Publikationen

### 1. Originalarbeiten

- 2009 „*Human Osteoblast-Derived Factors Induce Early Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells*“  
**Ilmer M.**, Karow M., Geissler C., Jochum M., Neth P.  
Manuskript angenommen in *Tissue Engineering*
- 2007 „*The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion*“  
Neth P, Ries C, Karow M, Egea V, **Ilmer M**, Jochum M.  
*Stem Cell Rev.* 2007 Jan;3(1):18-29

---

## 2. Posterpräsentationen

- 2006                      Keystone Symposium „Wnt and beta-Catenin Signaling in Development and Disease“ in Snowbird, Utah (USA)  
*„Osteoblasts Induce Early Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells by Activating the Wnt-Signaling Pathway“*  
**Ilmer, M.**, Ciccarella, M., Ruiz-Heinrich, L., Jochum, M., Neth, P.
- 2005                      4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES) in München  
*„Osteoblast Environment Favours Induction of Osteogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells“*  
**Ilmer, M.**, Ciccarella, M., Maiostre, J., Jochum, M., Neth, P.
- 2005                      Keystone Symposium „Stem Cells, Cancer and Senescence“ in Singapore  
*„Effects of Wnt Signaling on the Invasive Behavior of Human Mesenchymal Stem Cells“*  
Ciccarella, M., Egea, V., Ries, C., Hoelters, J., **Ilmer, M.**, Maiostre, J., Jochum, M., Neth, P.
- 2005                      Keystone Symposium „Stem Cells“ in Banff, Alberta (Canada)  
*„Wnt Signaling Regulates the Invasion Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells“*  
Ciccarella, M., Egea, V., Ries, C., Hoelters, J., **Ilmer, M.**, Maiostre, J., Mutschler, W., Jochum, M., Neth, P.

## 3. Vorträge

- 2006                      Statusseminar “Molekulare Medizin“ in Herrsching  
*„Osteoblasten-induzierte frühe Osteogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen durch Aktivierung des Wnt-Signalweges“*  
**Ilmer, M.**, Ciccarella, M., Ruiz-Heinrich, L., Jochum, M., Neth, P.
- 2006                      23<sup>rd</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors in Tiers, Italien  
*„Osteoblasts-induced Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells and Expression of Cathepsin K“*  
**Ilmer, M.**, Ciccarella, M., Ruiz-Heinrich, L., Jochum, M., Neth, P.

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich in persönlicher und professioneller Hinsicht gefördert und gefordert haben, mich prägten und dazu beigetragen haben, der zu werden, der ich heute bin.

Vornehmlich möchte ich folgenden Personen meinen Dank aussprechen, die mich insbesondere in der Zeit meiner Promotion unterstützten:

Frau Prof. Marianne Jochum: für die Möglichkeit an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie forschen zu dürfen und die Mittel dafür bereitzustellen sowie für die Gelegenheit an internationalen Kongressen teilzunehmen. Des Weiteren möchte ich ihr für das unermüdliche Korrekturlesen sämtlicher veröffentlichter Arbeiten danken.

Peter Neth: dafür, dass er mir die Chance gegeben hat, mit ihm Forschung betreiben zu dürfen, für zahlreiche und detaillierte Besprechungen, in denen er mir sein unglaublich breites Wissen einprägte, für die Förderung und Forderung eigener Ideen und deren Umsetzung sowie die Vermittlung ethischer Normen in der Wissenschaft. Nicht vergessen möchte ich sein offenes Ohr für Probleme anderer Natur.

Marisa Karow: für die Vermittlung ihres hervorragenden methodischen Wissens, anregende Diskussionen und Fachsimpeleien, die zur Entwicklung interessanter Projekte führten, und zu guter letzt diverser lustiger Feiern auch abseits des Laborlebens.

Meinen Kollegen der AG Neth: für ein arbeitsames und gleichzeitig freundschaftliches und angenehmes Arbeitsklima, das die praktische Ausarbeitung wesentlich erleichtert hat.

Herr Prof. Jürgen Heesemann: für die Aufnahme in das Programm „Molekulare Medizin“, das Wissenschaft sowohl finanziell als auch ideologisch unterstützt.

---

Meinem besten Freund Golo: der für mich seit langem wie ein großer Bruder ist.

Meinen Schwestern Doris und Kristina: dafür, dass sie da sind und mich mit ihren Interessen nicht vergessen lassen, dass es auch andere Sichtweisen und wichtige Dinge gibt.

Meinen Eltern: dafür, dass sie mich in jeglicher Hinsicht immer unterstützt haben, für eine ungestörte Jugend und Schulzeit, mich zum Studium der Medizin motiviert und mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben; für zahlreiche gute Ratschläge in allen Lebenslagen und stets für mich da zu sein.

**Danke**

---

Alles sollte so einfach wie möglich gemacht werden -  
aber nicht einfacher.

**Albert Einstein**