

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

Regulation lysosomaler Cysteinproteasen
durch extrazelluläre Matrixproteine
in humanen mesenchymalen Stammzellen

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

vorgelegt von
Carolin Regina Nicolaus
aus München

2011

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

Berichterstatterin: Prof. Dr. Marianne Jochum

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Manfred Schliwa
Priv. Doz. Dr. Wolfgang Thasler

Mitbetreuung durch die
habilitierte Mitarbeiterin: Priv. Doz. Dr. Dorit Nögler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2011

*Meinen Brüdern
Andreas und Tobias gewidmet*

INHALTSVERZEICHNIS

	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
A	ZUSAMMENFASSUNG	1
B	EINLEITUNG	2
B.1	Charakterisierung von Stammzellen im Vergleich mit Tumorzellen	2
B.2	Physiologische und pathophysiologische Rolle der lysosomalen Cysteinproteasen.....	3
B.3	Extrazelluläre Matrixproteine	5
B.4	Integrine.....	6
B.5	EZM-vermittelte Signaltransduktion	7
B.6	Zellmigration	8
C	FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT.....	9
D	MATERIAL UND METHODEN.....	11
D.1	Material.....	11
D.1.1	Geräte.....	11
D.1.2	Bioinformatische Hilfsmittel.....	12
D.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	12
D.1.3.1	Allgemeine Chemikalien und Materialien	13
D.1.3.2	Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken	14
D.1.3.3	Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken	17
D.1.3.4	Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken.....	18
D.1.3.5	Substrate und Inhibitoren	19
D.1.3.6	Antikörper, Konjugate und Proteine	19
D.2	Methoden	20
D.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	20
D.2.1.1	RNA-Isolierung.....	20
D.2.1.2	cDNA-Synthese	20
D.2.1.3	Semiquantitative RT-PCR.....	21
D.2.1.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	21
D.2.1.5	Quantitative RT-PCR.....	21
D.2.2	Zellbiologische Methoden.....	22
D.2.2.1	Kultivierung von hMSC.....	22
D.2.2.2	Zellzahlbestimmung.....	23

D.2.2.3	Osteogene Differenzierung der hMSC	23
D.2.2.4	Stimulation der hMSC mit Proteinen der extrazellulären Matrix	23
D.2.2.5	Zelladhäsionsassay	24
D.2.2.6	Vorbereitung der hMSC zur Identifizierung von Signalwegen	26
D.2.2.7	RNA-Interferenz	26
D.2.2.8	Transmigrationsassay	27
D.2.3	Proteinchemische Methoden	28
D.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	28
D.2.3.2	SDS-PAGE und Immundetektion mittels Immunoblot-Analyse	28
D.2.3.3	Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen	30
D.2.3.4	Subzelluläre Lokalisation mittels Immunfluoreszenz	30
D.2.4	Datenanalyse	31
E	ERGEBNISSE	32
E.1	mRNA-Expression lysosomaler Cysteinproteasen während der osteogenen Differenzierung der hMSC	32
E.1.1	Nachweis der mRNA-Expression der humanen Cathepsine mittels semiquantitativer RT-PCR	32
E.1.2	Nachweis der mRNA-Expression ausgewählter Cathepsine mittels quantitativer RT-PCR	33
E.2	Stimulation der hMSC mit Vitronektin	35
E.2.1	Morphologische Unterschiede der hMSC nach Vitronektinstimulation	35
E.2.2	Quantitativer Nachweis lysosomaler Cysteinproteasen durch qRT-PCR	35
E.2.3	Quantitativer Nachweis der Cathepsine B, K, L und X mittels ELISA	37
E.2.4	Detektion von intrazellulärem (Pro)Cathepsin X	39
E.3	Stimulation der hMSC mit Kollagen I und Laminin	40
E.4	Untersuchung zur Integrin-abhängigen Bindung von hMSC an EZM-Proteine und Procathepsin X	41
E.4.1	Bindung der hMSC an Vitronektin und an andere EZM-Proteine	41
E.4.2	RGD-abhängige Bindung der hMSC an Vitronektin über das Integrin $\alpha_V\beta_3$	42
E.4.3	RGD-abhängige Bindung der hMSC an Procathepsin X über das Integrin $\alpha_V\beta_3$	43
E.5	Integrin-vermittelte Signaltransduktion der hMSC nach Stimulation mit Vitronektin bzw. Procathepsin X	45
E.6	Niederregulation von Cathepsin X in hMSC	49
E.6.1	Transfektion von hMSC	49
E.6.2	Niederregulation von Cathepsin X	49
E.6.3	Transmigration Cathepsin X-defizienter hMSC	50

F	DISKUSSION	54
F.1	Vergleich der osteogenen Differenzierung der hMSC und der Differenzierung mittels Vitronektin in Bezug auf lysosomale Cysteinproteasen.....	54
F.2	RGD-vermittelte Bindung der hMSC an Procathepsin X	57
F.3	Integrin-vermittelte Signaltransduktion der hMSC nach Stimulation mit Vitronektin bzw. Procathepsin X.....	59
F.4	Transmigrationsfähigkeit von Cathepsin X-defizienten hMSC	60
F.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	62
G	LITERATURVERZEICHNIS	64
H	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
I	ANHANG	76
I.1	Danksagung	
I.2	Lebenslauf.....	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
A ₅₉₅	Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm
AK	Antikörper
AMV	Avian Myoblastitis Virus
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Cath	Cathepsin
d	Tag(e)
DABCO	1,2-Diazobicyclo-octan
DAPI	4, 6-Diamidin-2-Phenylindol
DEPC	DiEthylen PyroCarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (<i>double stranded desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ERK	Extrazelluläre-Rezeptor-Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix (Interzellulärsubstanz)
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gravitationskraft
GAPDH	Glyceralaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hEZM	humane extrazelluläre Matrix
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen (<i>human mesenchymal stem cells</i>)
hHSC	humane hämatopoetische Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
HUVEC	Endothelzellen aus menschlicher Nabelvene (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
kDA	Kilodalton
LM609	Monoklonaler Antikörper Anti- $\alpha_v\beta_3$
MAB1969	Monoklonaler Antikörper Anti- $\alpha_5\beta_1$
MW	Mittelwert(e)
OD	Optische Dichte
p90RSK	p90 ribosomale S6 Kinase
p38-MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat

RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferent (<i>interferent ribonucleic acid</i>)
siRNA	RNA-Interferenz (<i>short interfering RNA</i>)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Units

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

A ZUSAMMENFASSUNG

Eine zunehmende Zahl von Daten aus der Fachliteratur weist immer deutlicher darauf hin, dass Tumor- und Stammzellen trotz aller funktionellen Unterschiede, wie beispielsweise der Destruktion von gesundem Gewebe bzw. Regeneration von zerstörtem Gewebe, offensichtlich wesentliche Gemeinsamkeiten aufzeigen, insbesondere hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die z.B. den zellulären Prozessen Differenzierung/Transformation, Zellalterung, Apoptose und Migration/Invasion zugrunde liegen.

Im Gegensatz zur Situation bei Tumorzellen ist die Rolle lysosomaler Cysteinproteasen in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) bei diesen Prozessen jedoch noch weitgehend unbekannt und sollte daher im Rahmen dieser Arbeit genauer evaluiert werden.

So konnten wir erstmals nachweisen, dass lysosomale Cysteinproteasen sowohl in hMSC exprimiert als auch während deren Kultivierung sezerniert werden. Von den elf bekannten humanen lysosomalen Cysteinproteasen (Cathepsine) wurden vor allem Cathepsin B und Cathepsin K durch extrazelluläre Matrix (EZM)-Proteine, insbesondere durch Vitronektin, in ihrer Expression beeinflusst und zeigten eine kontinuierliche Erhöhung der Expression im Verlauf von 21 Tagen. Eine vermehrte Sekretion nach Vitronektinstimulation wurde proteinchemisch bei Cathepsin B und X nachgewiesen. Im Gegensatz dazu hatten Stimulationen mit Kollagen I und Laminin keinen signifikanten Einfluss auf die Expression bzw. Freisetzung dieser Proteasen.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass das Adhäsions-/Migrationsverhalten der hMSC durch EZM-Proteine vor allem über deren Wechselwirkung mit Adhäsionsmolekülen (Integrinen) beeinflusst wird. Zudem kann auch Procathepsin X in Abhängigkeit von Integrin $\alpha_v\beta_3$ an hMSC binden.

Durch die Interaktionen der hMSC mit EZM-Proteinen sowie mit Procathepsin X wird eine Reihe von Signaltransduktionswegen, darunter der ERK-Signalweg, aktiviert.

In Transmigrationsversuchen mit Cathepsin X-defizienten hMSC wurde zudem nachgewiesen, dass Procathepsin X – im Gegensatz zur Konstellation bei Tumorzellen – keine bedeutende Rolle bei der Migration der hMSC spielt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass gegen dieses Enzym gerichtete Tumortherapiestrategien nur geringe (oder gar keine) Auswirkungen auf die Stammzell-Mobilisation/Migration haben.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vitro*-Daten zeigen somit neue Erkenntnisse bezüglich der Regulation lysosomaler Cysteinproteasen durch extrazelluläre Matrixproteine in hMSC und stellen daher eine gute Basis für weitere *in vitro*- bzw. auch *in vivo*-Evaluierungen dar.

B EINLEITUNG

B.1 Charakterisierung von Stammzellen im Vergleich mit Tumorzellen

Adulte Stammzellen spielen in den letzten Jahren in Forschung und Klinik eine immer wichtigere Rolle. Als ethisch besser vertretbare Option im Vergleich zu embryonalen Stammzellen gewinnen diese Zellen vor allem hinsichtlich der Geweberegeneration (*Tissue Engineering*) immer mehr an Bedeutung (Bianco et al 2001; Körbling et al. 2003). Außerdem werden Stammzellen zunehmend mit Tumorzellen verglichen, wobei sich zeigte, dass diese Zellentitäten trotz vorhandener Gegensätze wie Regenerationsfähigkeit bzw. Destruktionspotential einige Gemeinsamkeiten wie z.B. Proliferation bzw. Selbsterneuerung, Transformation bzw. Differenzierung und Invasion bzw. Migration aufweisen (Reya et al. 2001, Reya et al. 2005).

Adulte Stammzellen sind im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt. Grundsätzlich lassen sich im Knochenmark zwei adulte Stammzellpopulationen unterscheiden: die humanen mesenchymalen Stammzellen (*human mesenchymal stem cells*, hMSC) und die humanen hämatopoetischen Stammzellen (*human hematopoietic stem cells*, hHSC). Über die selektive Adhärenz werden hMSC von hHSC unterschieden, da nur hMSC an Plastik adhären. So wurden die hMSC zuerst als adhärente Fibroblasten-ähnliche Zellen eingestuft (Fridenshtein et al. 1982), bevor sie als multipotente Zellen erkannt wurden (Friedenstein et al. 1987, Jackson et al. 2002). Diese Zellen sind in der Lage sich u. a. *in vitro* bzw. *in vivo* in die adipogene (Jaiswal et al. 2000), chondrogene (Mackay et al. 1998), osteogene (Pittenger et al. 1999, Salaszyk et al. 2004a), kardiogene (Toma et al. 2002) und neurogene Richtung (Benvenuti et al. 2006) zu differenzieren.

hMSC besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Selbstreplikation), Differenzierung und Migration (Pittenger et al. 1999, Jiang et al. 2002, Cai et al. 2004). Eine Voraussetzung für die Migration ist der Abbau von extrazellulärer Matrix (EZM) durch Proteasen. Zahlreiche Studien konnten bereits bei Tumorzellen die Bedeutung von Metalloproteasen sowie lysosomalen Cysteinproteasen bei der Invasion und auch bei der Interaktion mit der extrazellulären Matrix aufzeigen (Mohamed & Sloane 2006, Podgorski et al. 2007, Affara et al. 2009). Eine erhöhte Expression von Cathepsinen wurde bereits bei Brust-, Lungen-, Hirn-, Gastrointestinaltrakt-, Haut- und Prostatatumoren beschrieben (Jedeszko & Sloane, 2004). Ungeklärt ist jedoch, welche Rolle lysosomale Cysteinproteasen bei zellulären Prozessen wie Differenzierung, Adhäsion, intrazellulärer Signaltransduktion und Migration bei hMSC spielen und ob diese Proteasen durch EZM-Proteine wie Kollagen, Laminin oder Vitronektin reguliert werden.

Das Interesse an hMSC in Forschung und Klinik betrifft zum einen ihre Ähnlichkeit mit Tumorzellen hinsichtlich EZM-Abbau und Invasion bzw. Migration, zum anderen die Möglichkeit ihres therapeutischen Einsatzes z.B. in der Therapie lokaler Knochendefekte oder bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der Osteoporose (Bruder et al. 1994). Um Stammzellen im klinischen Bereich sinnvoll einsetzen zu können, müssen aber deren grundlegende Regulationsmechanismen erfasst und verstanden werden.

B.2 Physiologische und pathophysiologische Rolle der lysosomalen Cysteinproteasen

Lysosomale Cysteinproteasen sind wie die Aspartat-, Metallo- und Serinproteasen bei biologischen Prozessen nachweisbar und regulieren eine Vielzahl essentieller Vorgänge, um die Homöostase des gesamten Organismus zu gewährleisten (Chapman et al. 1997). Die Klassifikation dieser Proteasen erfolgte aufgrund ihres Reaktionsmechanismus, der abhängig von ihrem katalytischen Aminosäure-Rest (Cystein-Rest) ist (Koolman et al. 1997). Lysosomale Cysteinproteasen verwenden bei der Katalyse als Nukleophil die Thiolgruppe eines Cysteinrestes (Thiol-abhängige Cathepsine). Die Gruppe dieser Proteasen umfasst im humanen Organismus elf Vertreter: Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X (Buhling et al. 2000; Jedezszko et al. 2004). Der Begriff Cathepsin kommt aus dem Griechischen „καθελειν“ (verdauen) und wurde erstmalig 1929 beschrieben, als Willstätter und Bamann eine Protease mit schwach-saurem pH-Optimum entdeckten (Willstätter und Bamann, 1929). Weitere Studien konnten zeigen, dass diese Proteasen in Lysosomen lokalisiert sind und dort Proteine und Peptide abbauen (Coffey & De Duve, 1968).

Zahlreiche Erkenntnisse über Vorkommen und Funktion einiger Cathepsine bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wurden bereits veröffentlicht (Chapman et al. 1997, Jedezszko et al. 2004, Brooks et al. 2010). Neben der allgemeinen Funktion des intrazellulären Proteinabbaus liegen auch Daten über einige extrazelluläre Eigenschaften vor. Das Vorkommen von Cathepsinen auf der Zelloberfläche bzw. ihre Bindungsfähigkeit an Zelloberflächenstrukturen wurde bei Cathepsin B, S und X nachgewiesen (Mai et al. 2000, Nascimento et al. 2005, Lechner et al. 2006). Bei Tumor- und Endothelzellen wurde das Cathepsin B als wichtig für den EZM-Abbau identifiziert (Sloane et al. 2005, Cavallo-Medved et al. 2009). Cathepsin K, vorwiegend in Osteoklasten exprimiert, ist eine Kollagenase und Elastase und kann Kollagen I degradieren (Garnero et al. 1998).

Cathepsin X wird in Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen, sowie in entarteten Zellen exprimiert (Nägler et al. 1998; Nägler et al. 2004; Nägler et al. 2006). So wurde u. a. beim Prostatakarzinom und beim Magenkarzinom vom intestinalen Typ eine Überexpression von Cathepsin X nach-

gewiesen (Nägler et al. 2004; Krueger et al. 2005). Durch die Aufklärung der Procathepsin X-Struktur (Sivaraman et al. 2000) wurde deutlich, dass sich dieses Cathepsin vor allem hinsichtlich der Kürze seiner Proregion, bestehend aus nur 38 Aminosäuren, von den anderen Cathepsinen unterscheidet. Sehr interessant ist zudem die Anwesenheit eines Integrin-Bindungsmotives (RGD-Sequenz) in der Proregion des Cathepsin X. RGD-Motive dienen in der Regel als Erkennungssequenzen für Zelloberflächenrezeptoren vom Integrin-Typ. Aus der 3D-Struktur des Procathepsin X (Abb. B1) wird ersichtlich, dass das RGD-Motiv sehr gut zugänglich ist, und dementsprechend eine Bindung des extrazellulären Enzyms an Integrine möglich ist (Lechner et al. 2006).

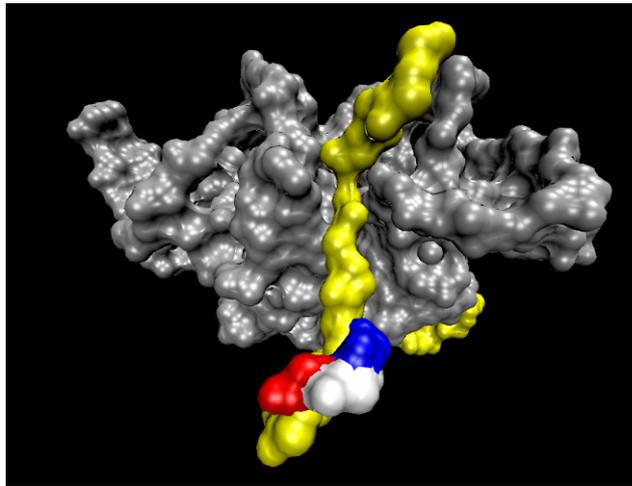


Abb. B.1 Struktur von Procathepsin X: Farbig markierte RGD-Sequenz in der Proregion.
(Sivaraman & Nägler et al. 2000).

Eine wichtige Fähigkeit zum EZM-Abbau ist die endoproteolytische Aktivität, welche die meisten Cathepsine aufweisen. Cathepsin X dagegen ist eine Carboxypeptidase, und eine Beteiligung dieses Enzyms an einer direkten Degradation der EZM ist demnach unwahrscheinlich. So zeigte eine Inhibition des aktiven Cathepsin X keinen Einfluss auf die Invasion von Zellen (Kos et al. 2005). Jedoch konnte eine Inhibition des Cathepsin X auf mRNA-Ebene eine reduzierte Tumorzellinvasion bewirken (Krueger et al. 2005). Möglicherweise liegt daher eine indirekte, nicht-proteolytische Wirkweise des Cathepsin X auf die EZM vor, die im Zusammenhang mit der Interaktion mit Integrienen steht (Lechner et al. 2006).

Interessanterweise ist die Interaktion der Cathepsine mit der EZM nicht auf den proteolytischen EZM-Abbau beschränkt, vielmehr werden einige Zellen in Anwesenheit von EZM-Komponenten auch zur vermehrten Sekretion einzelner Cathepsine angeregt (Koblinski et al. 2000). Obwohl die genauen Mechanismen dieser Wechselbeziehungen nicht ausreichend aufgeklärt sind, gibt es einige Hinweise auf eine Bindungsfähigkeit extrazellulärer Cathepsine an Adhäsionsmoleküle vom Integrintyp (Cheng et al. 2006, Lechner et al. 2006, Obermajer et al. 2008). Diese indirekte Wirkweise kann möglicherweise einen Einfluss lysosomaler Proteasen auf inflammatorische und invasive Prozesse erklären.

B.3 Extrazelluläre Matrixproteine

Die extrazelluläre Matrix (EZM), die in allen Interzellularräumen vorkommt und von den Zellen selbst gebildet wird, besteht u. a. aus Polysacchariden und verschiedenen Proteinen wie Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin und Vitronectin. Neben einer Stütz- und Haltefunktion hat die EZM v. a. regulatorische Bedeutung für die eingebetteten Zellen. So werden einerseits Adhäsion und Migration der Zellen über unterschiedliche Mechanismen, wie z. B. rezeptorvermittelte Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, von der EZM beeinflusst. Andererseits können die Zellen selbst Aufbau und Funktion der EZM verändern. Diese Wechselwirkungen scheinen dabei Grundlage vieler molekularbiologischer Vorgänge zu sein. Die Komponenten der EZM haben somit eine sehr dynamische Funktion zu erfüllen. Sie spielen neben dem Erhalt und der Entwicklung physiologischer Prozesse wie der Zelladhäsion, -differenzierung und -migration auch eine bedeutende Rolle bei pathologischen Vorgängen wie der Tumormetastasierung (Bosman et al. 2003; Lomberk 2010, Solinas et al. 2010). Wichtig für diese zahlreichen Mechanismen sind spezielle Zellrezeptoren, zu denen die Integrine zählen, die erst eine Kommunikation und Interaktion zwischen Zellen und EZM ermöglichen.

Kollagene, vor allem Kollagen I, sind Hauptbestandteile von Haut und Knochen. Laminin ist ein weiteres Protein, welches in der EZM nachweisbar ist. EZM-Proteine können an Integrine einer Zelle binden und somit eine Adhäsion der Zellen ermöglichen. Das Glykoprotein Vitronectin, dessen Name aus seiner Fähigkeit resultiert, an Glas (lat. *Vitro* = Glas) zu adhären (Hayman et al. 1983), ist ebenfalls Bestandteil der EZM. Es wird vor allem in der Leber synthetisiert (Kemkes et al 1987; Seger et al. 2000). Bekannt wurde es ursprünglich unter dem Begriff „*serum spreading factor*“, als seine Fähigkeit entdeckt wurde, Zellen anheften und migrieren zu lassen (Whately et al. 1980). Diese Eigenschaft wird auf das Vorhandensein eines RGD-Motives zurückgeführt, das eine Interaktion mit bestimmten Integrinen vermittelt. So kann Vitronectin aufgrund seiner RGD-Sequenz an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden und an Zelladhäsion und -migration beteiligt sein (Pytela et al. 1985, Xiong et al. 2002). Auch Auswirkungen auf die Differenzierungsfähigkeit von Zellen wurden nach Stimulation mit EZM-Proteinen dargestellt. So zeigte die Arbeitsgruppe um Salaszyk, dass durch Adhäsion der hMSC an Vitronectin und Kollagen I eine osteoblastäre Differenzierung der Zellen ausgelöst wird (Salaszyk et al. 2004a).

B.4 Integrine

Integrine sind heterodimere Membranglykoproteine und bestehen aus je einer α - und β -Untereinheit, die durch eine nicht-kovalente Bindung miteinander verbunden sind. In der Familie der Integrine gibt es mehr als achtzehn verschiedene α - und acht unterschiedliche β - Untereinheiten, die mindestens 22 heterodimere Paare bilden können (Hynes 2002, Abb. B.2). Als Zelloberflächenproteine sind Integrine nicht nur nötig, um die Zelladhäsion oder die Migration zu ermöglichen, sondern sie stellen auch wertvolle bidirektionale Signalvermittler dar. Nach Bindung eines Liganden an ein Integrin kann dieser über Signaltransduktionskaskaden durch Phosphorylierung u. a. Einfluss auf die Proliferation, Migration und Apoptose der Zelle nehmen. Die durch Integrine vermittelte Bindung der Zellen an die EZM setzt die Erkennung einer spezifischen Aminosäure-Bindungssequenz voraus. Die bisher wohl am häufigsten untersuchte Sequenz, ist die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) einiger EZM-Proteine.

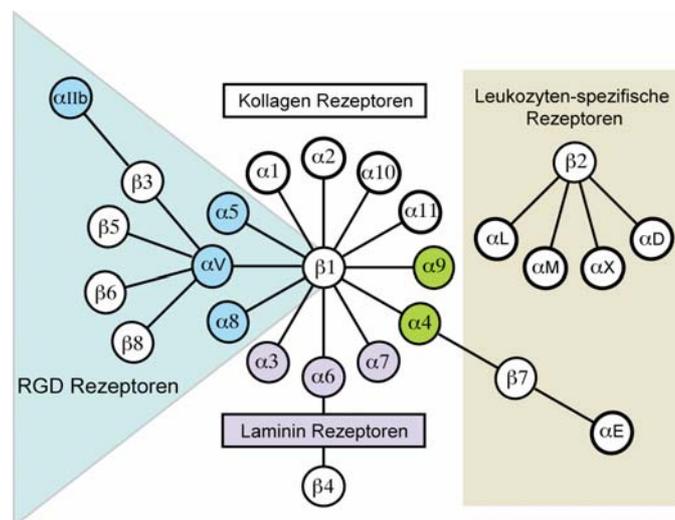


Abb. B.2 Die Integrin-Familie.

Integrine sind heterodimere Rezeptoren, wobei sich je eine α - mit einer β -Kette verbindet.

Integrine, die in der Abbildung blau unterlegt sind, erkennen das RGD-Motiv.

Modifiziert nach Richard O. Hynes (Hynes, 2002)

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$, zu Beginn seiner Entdeckung auch als Vitronektin-Rezeptor (Pytela et al. 1985) bekannt, erkennt das EZM-Protein Vitronektin mit hoher Affinität über dessen Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (Xiong et al. 2002; Wang et al. 2005). Eine Reihe anderer Liganden, wie z.B. Fibronektin, Fibrinogen, Osteopontin, von Willebrand Faktor und Prothrombin, wurden bereits identifiziert (Plow et al. 2000).

Am höchsten exprimiert ist das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf Osteoklasten, wo es mit der Knochenmatrix interagiert und eine wichtige Funktion bei der Knochenresorption inne hat. Des Weiteren findet man $\alpha_v\beta_3$ auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten und Thrombozyten. Darüber hinaus besteht

häufig eine Hochregulation von $\alpha_v\beta_3$ auf malignen Melanomzellen, wodurch die Zellen die Fähigkeit zur Invasion und folglich Metastasierung gewinnen (Kuphal et al. 2005). Die Erkenntnis, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese spielt (Brooks et al. 1994a), und durch Antagonisten eine Tumorregression erzielt werden kann (Brooks et al. 1994b), führten schließlich zum therapeutischen Einsatz des humanisierten monoklonalen Antikörpers LM609 (Vitaxin) (Gutheil et al. 2000).

Auch hMSC interagieren mit der EZM über Integrine, um Vorgänge wie Selbsterneuerung, Differenzierung, Migration und Geweberegeneration auszuführen (Docheva et al. 2007). Inwieweit das Integrin $\alpha_v\beta_3$ Bindungen der hMSC an spezifische EZM-Proteine und die lysosmale Cysteineprotease Procathepsin X vermittelt, werden in dieser Arbeit näher untersucht.

B.5 EZM-vermittelte Signaltransduktion

Signaltransduktion ist die Weiterleitung von Botschaften in das Innere einer Zelle, wobei die Zelle mit einer charakteristischen Antwort reagiert. Signaltransduktionskaskaden werden durch einen Liganden aktiviert oder deaktiviert und sind bei verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. Somit kann nach Bindung eines extrazellulären Signalstoffes an einen Membranrezeptor oder Ionenkanal der Zelle durch Phosphorylierung bzw. Veränderung der Ionenkanaldurchlässigkeit ein für den Liganden charakteristischer Einfluss auf die Zelle ausgeübt werden. Verschiedene Vorgänge wie Stoffwechsel, Wachstum, Differenzierung, Transkription und/oder Translation spezifischer Aminosäuren bzw. Proteine oder auch Zellalterung und Apoptose einer Zelle können somit durch intrazelluläre Kaskadenaktivierungen oder -deaktivierungen eingeleitet, verändert oder unterdrückt werden (Wozniak et al. 2004).

Wichtige Signaltransduktionsmoleküle sind die Integrine, da sie aufgrund ihrer transmembranalen Lokalisation sowohl Signale von außen in das Innere einer Zelle (*outside-in*) als auch vom Zellinneren in den extrazellulären Raum (*inside-out*) vermitteln können (Miranti et al. 2002). Zwei Zustandsformen der Integrine regeln diese bidirektionale Signalweiterleitung. In der inaktiven Konformation der Integrine haben intrazelluläre Signalproteine eine nur geringe Affinität um mit diesen zu interagieren. Lagert sich jedoch extrazellulär ein Ligand an die aminoternale Bindungsdomäne bzw. intrazellulär ein Protein an die carboxyterminale Bindungsdomäne des Integrins an, so kommt es durch die jeweilige Bindung zu Konformationsänderungen (Xiong et al. 2001, Emsley et al. 2000), d.h. inaktive Integrine werden durch Langstreckung ihrer Aktinfilamente aktiviert.

Da EZM-Proteine über Integrine an Zellen binden, ist es naheliegend, dass diese Proteine durch eine Aktivierung von Signalwegen Prozesse wie Adhäsion, Proliferation, Migration oder Differenzierung von Zellen beeinflussen können (Schwartz et al. 2002). Auch hMSC exprimieren Integrinuntereinheiten wie die α_1 -, α_2 -, α_3 -, α_v -, β_1 -, β_3 - und β_4 -Untereinheit (Pittenger et al. 1999), und folglich ist auch bei diesen Zellen eine EZM-vermittelte Signaltransduktion wahrscheinlich.

Da die EZM-Proteine Kollagen I und Vitronektin in verschiedenen Zellen eine Aktivierung des ERK-Signalweges bewirken (Chen et al. 1994, Zhu et al. 1995), scheint der durch Kollagen I und Vitronektin induzierte ERK-Signalweg auch bei der osteogenen Differenzierung von hMSC eine wichtige Rolle zu spielen (Salasznyk et al. 2004b, Kundu et al. 2006).

B.6 Zellmigration

Voraussetzung für Migration bzw. Invasion von Zellen sind die auf der Zelloberfläche vorhandenen Adhäsionsmoleküle bzw. Integrine, die neben der Anheftung der Zellen auch für die Regulation von Zellmigration bzw. -invasion verantwortlich sind. Die Migration an sich ist von großer physiologischer Bedeutung, da ohne diesen Mechanismus Entwicklung, Regeneration oder auch Immunabwehr undenkbar wären. Aus pathologischer Sicht ist die Invasion ein Instrument von Tumorzellen, um sich auch außerhalb ihres Entstehungsortes anzusiedeln.

Während wichtiger pathologischer Prozesse wie Inflammation oder Metastasierung, entwickeln einige Zellentitäten die Eigenschaft, zu migrieren. So können Leukozyten die Basalmembran der Blutgefäße durchwandern, um an den Ort eines entzündeten Gewebes zu gelangen, wobei sie sich – wie Tumorzellen bei der Metastasierung – proteolytische Enzyme wie die Metallo-, Serin, Aspartat- oder auch die Cysteinproteasen zunutze machen (Affara et al. 2009).

Auch hMSC besitzen die Fähigkeit der Migration, da sie vom Ort ihrer Entstehung, dem Knochenmark, zu beschädigtem Gewebe wandern, um die Geweberegeneration zu gewährleisten (Roufosse et al. 2004). Im Gegensatz zu Tumorzellen ist eine Beteiligung von proteolytischen Enzymen bei diesem Vorgang noch wenig geklärt (Ries et al. 2007). Ein wesentlicher Schritt zum weiteren Verständnis der Migrationsfähigkeit von hMSC ist daher der Nachweis der Beteiligung von lysosomalen Cysteinproteasen (v.a. von Cathepsin X) bei dieser Zellfunktion.

C FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT

Da zu Beginn der Dissertation über das Vorkommen und die Funktion von Cathepsinen und deren Regulation durch EZM-Proteine wie Kollagen I, Laminin und Vitronektin in hMSC noch wenig bekannt war, sollten diesbezüglich verschiedene Aspekte untersucht werden.

Aufgrund der verfügbaren Daten ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Cathepsine werden während der osteogenen Differenzierungsinduktion der hMSC exprimiert?
- Kann Procathepsin X an hMSC binden und ist diese Bindung abhängig vom RGD-Motiv in der Proregion des Enzyms?
- Werden Integrin-abhängige Signalwege in hMSC nach Stimulation mit Procathepsin X aktiviert?
- Beeinflusst Cathepsin X das Migrationsverhalten der hMSC?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte durch folgende wesentliche Zielsetzungen geklärt werden:

1. Expression und Freisetzung von Cathepsinen in hMSC

Untersucht werden sollten hMSC vor allem hinsichtlich des Einflusses von osteogener Differenzierung sowie von EZM-Proteinen auf die Expression lysosomaler Cysteinproteasen (Cathepsine), um unterschiedliche Expressionsmuster der Cathepsine zu identifizieren. Ebenso sollte die Freisetzung ausgewählter Cathepsine durch Stimulation von hMSC mit Vitronektin, Kollagen I und Laminin evaluiert werden, wobei die Zellen mit diesen EZM-Proteinen über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert wurden.

2. RGD-abhängige Adhäsion der hMSC

Vorab sollten Bindungseigenschaften der hMSC an diverse Moleküle näher analysiert werden, da die Bindungsfähigkeit Voraussetzung sowohl für die bidirektionale Signalweiterleitung als auch für die Migration von Zellen ist. Da bereits bei Endothelzellen (HUVEC) eine RGD-abhängige Bindung von Procathepsin X an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ nachweisbar war (Lechner et al. 2006), sollte dieser Mechanismus auch bei hMSC mittels eines Zelladhäsionsassays untersucht werden. Inwieweit eine Beteiligung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ bei der Adhäsion der hMSC an Vitronektin bzw. (Pro)Cathepsin X zu beobachten ist und welche Bedeutung die RGD-Bindungsstelle des Integrins für diese Bindungen hat, galt es zu charakterisieren.

3. Aktivierung Integrin-abhängiger Signalwege in hMSC

Rezeptoren wie die Integrine sind nicht nur für die Adhäsion von Zellen an die EZM verantwortlich, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell- oder auch Zell-Matrix-Kommunikation. Kommunikation kann durch die Bindung eines Liganden (Signals) an einen Rezeptor erfolgen, wodurch intrazelluläre Signalwege aktiviert werden können. Da Procathepsin X und Vitronektin ein RGD-Motiv aufweisen, könnten diese Moleküle als Liganden für Integrine dienen und somit Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Inwieweit das EZM-Protein Vitronektin und die lysosomale Cysteinprotease Procathepsin X intrazelluläre Kaskaden der hMSC aktivieren bzw. deaktivieren, sollte mittels Immunoblotanalyse geklärt werden.

4. Transmigrationsfähigkeit von Cathepsin X-defizienten hMSC

Voraussetzungen für die Migration von Zellen sind zum einen die Adhäsion der Zellen an extrazelluläre Matrixproteine und zum anderen die Degradation der EZM durch bestimmte proteolytische Enzyme. Erste Erkenntnisse hinsichtlich der Beteiligung von Cathepsinen an der Migration von hMSC sollten durch den Einsatz von Cathepsin X-defizienten hMSC gewonnen werden, wobei das Migrationsverhalten der Zellen nach Niederregulation von Cathepsin X in einem Transwell-Assay (mit hEZM- bzw. Vitronektin-beschichteten Membranen) untersucht werden sollte.

D MATERIAL UND METHODEN

D.1 Material

D.1.1 Geräte

Analysenwaage:

A 120 S Satorius, Göttingen

Autoklaven:

3850 Systec GmbH, Wettengel
VST 500-C 12D Zirbus, Bad Grund

CO₂-Inkubator:

Jouan IG150 Jouan GmbH, Unterhaching

Elektrische Präzisionswaage

Kern&Sohn, Frommern

Eismaschine AF-10

Scotsman, Frimont, Italien

Gefrierschrank (− 80 °C)

GFL, Burgwedel

Gefrierschrank (− 20 °C)

Liebherr, Ochsenhausen

Heizblock, HLC, BT 130-2

Medax Nagel GmbH, Kiel

Hybridisierungsöfen:

Mini Hybi H. Saur, Reutlingen

Kühlschrank

Liebherr, Ochsenhausen

Magnetrührer:

Ika-Combimag RCO Janke & Kunkel, Staufen
Ikamag RET Janke & Kunkel, Staufen

Mikroskope:

Inverses Fluoreszenz-Mikroskop IX50, IX70 Olympus, Mikro-Optik, München
Routinemikroskop Axiovert Typ S100 Zeiss, Jena

Mikrowellenöfen:

R-6270 Sharp, Osaka, Japan

Pipetus-akku

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

PCR-Multicycler PT-200

Biozym, Oldendorf

PCR Thermal Cycler: LightCycler® II

Roche, Mannheim

pH-Meter

Typ 114D WTW, Weilheim
pH-Elektrode Ingold, Steinbach-Taunus

Proteintransfereinheit:

Fast blot B33 Biometra, Göttingen

Schüttler:

Rotamax 120 Heidolph, Schwabach

Sicherheitswerkbank:

HeraSafe Heraeus Instruments, Mannheim

Spannungsquelle:

Mighty Slim, SX250 PowerSupply Hofer, Heidelberg

Spektrofluorimeter:

Safire 2

Tecan, Crailsheim

Spektrophotometer:

LKB Ultrospec III

Pharmacia, Freiburg

Uvikon 930

Kontron Instruments, Eching

Stickstofftank:

Cryosystem 4000

MVE Cryosystems, Jüchen

Transilluminator:

DarkReader™

Clare Chemical Research, Dolores, USA

Vortex Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Vertikale Proteinelektrophoreseeinheit:

Mighty Small II

Hofer, Heidelberg

Wärmeschränke:

B30

Memmert, Schwabach

BE30

Memmert, Schwabach

Wasserbäder:

WB-14

Memmert, Schwabach

Thermo Mix

Braun Biotech, Melsungen

Wasserdeionisierungseinheit:

Membrapure

MembrAPURE, Bodenheim

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 R

Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge Typ CT 4.22

Jouan, Unterhaching

Tischzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 D

Eppendorf, Hamburg

Varifuge 3.0 R

Heraeus Sepatech, München

Varifuge 3.2 RS

Heraeus Sepatech, München

D.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

Image-Pro PLUS

Media Cybernetics, Silver Spring, USA

Image-Scanner

Amersham Biotech, Freiburg

LightCycler Software 3.5

Roche, Mannheim

XFluor4 Safire2

Tecan, Crailsheim

D.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Für Arbeiten mit RNA wurde RNase-freies Wasser (Fa. Qiagen, Hilden) und „Aqua ad. injectabilia“ (Fa. Braun, Melsungen) verwendet. Alle weiteren molekularbiologischen Versuche wurden mit entionisiertem Wasser („HPLC-grade“) durchgeführt.

Die Reaktions- und Kultivierungsgefäße wurden entweder steril bezogen oder vor Gebrauch 20 Minuten bei 121 C und einem Überdruck von 1×10^5 Pa autoklaviert.

D.1.3.1 Allgemeine Chemikalien und Materialien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
4, 6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
1,4-Diazobicyclo-octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eppendorf Gefäße 0,5 ml und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Falkonröhrchen: 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glyzerol	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mowiol 4.88	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumkarbonat	Merck, Deisenhofen
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 2 M	Apotheke Klinikum Innenstadt, München
Orange G	Serva, Heidelberg
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	BioRad, USA
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Xylen Cyanol	Serva, Heidelberg

D.1.3.2 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken

Agarose, Nusive	Biozym, Hameln
Agarose, Seakem GTG	Biozym, Hameln
AmpoLabeling-LPR Kit	Superarray, Frederick, USA
iScript cDNA-Synthesis Kit	BioRad, USA
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS}	
SYBR green I Kit	Roche, Mannheim
LightCycler® Kapillaren	Roche, Mannheim
LightCycler® Primer Sets für	
<i>Alkalische Phosphatase, Cathepsin B, C,</i>	
<i>H, K, L, O, S, V, W, X</i> bzw. <i>GAPDH</i>	Search LC, Heidelberg
MEK1/2 Inhibitor <i>U0126</i>	Promega, Madison, WI, USA
PMA (Phorbol 12-Myristat-13-Acetat)	Promega, Madison, WI, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
siRNA Puffer	Qiagen, Hilden
Biotin-16-2'-deoxy-uridin-5'-triphosphat	
(<i>Biotin-16dUTP</i>)	Roche, Mannheim
Wortmannin Inhibitor PI3-Kinase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Primer für die semiquantitative RT-PCR

Die verwendeten Primer wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen sowie laut Herstellerangaben gelagert und verwendet. Alle Primer sind nachfolgend in 5'-3'-Richtung angegeben:

Cathepsin B-Primer

- 5`cat B1 *forward* Primersequenz CCT GTG AGC ACC ACG TCA AC
- 3`cat B1 *reverse* Primersequenz CTC GGC CAT GAT GTC CTT CT

Cathepsin C-Primer

- 5`cat C *forward* Primersequenz: GAA AAA TCC CAA GGC CCA AA
- 3`cat C *reverse* Primersequenz GCC TTC ACA GCC TTG AGC ATA C

Cathepsin F-Primer

- 5`cat F1 *forward* Primer sequenz ACC ATG CGG TGT TGC TTG T
- 3`cat F1 *reverse* Primersequenz AGC TGG CCA TGG TGT TCA C

Cathepsin H-Primer

- 5`cat H *forward* Primersequenz: AGG CCA TCG GCT TTG TCA A
- 3`cat H *reverse* Primersequenz CCC AAG AGT TTT TCA CGA TCC A

Cathepsin K-Primer

- 5`cat K *forward* Primersequenz: TGT CTG AGA ATG ATG GCT GTG G
- 3`cat K *reverse* Primersequenz GGA GGT CAG GCT TGC ATC AAT

Cathepsin L-Primer

- 5`cat L1 *forward* Primersequenz: TGA ACG CCT TTG GAG ACA TG
- 3`cat L1 *reverse* Primersequenz AAC CAC ACT GAC CCT GAT TCT TC

Cathepsin O-Primer

- 5`cat O *forward* Primersequenz AAT TAT GGC TGC AAT GGA GGC
- 3`cat O *reverse* Primersequenz TCT TGC CAG CTC ACT GCA TCT A

Cathepsin S-Primer

- 5`cat S *forward* Primersequenz CGT GCT GCC ACA TGT TCA AA
- 3`cat S *reverse* Primersequenz TTG TGG CCC CAG CTG TTT T

Cathepsin V-Primer

- 5`cat V *forward* Primersequenz TAC GGC TTT GAA GGA GCA AAT
- 3`cat V *reverse* Primersequenz AGA ATT AAG CAA TGA GTC TTT GA

Cathepsin W-Primer

- 5`cat W *forward* Primersequenz ACC GTG ACC ATC AAC ATG AAG C
- 3`cat W *reverse* Primersequenz AGC CGG AAA TAG CCC TTC TCT C

Cathepsin X-Primer

- 5`cat X1 *forward* Primersequenz ATG TGG GAC ATG CAA TGA ATT C
- 3`cat X1 *reverse* Primersequenz TCC GGT GTA GTT AGC CAG TCT TT

siRNA-Oligonukleotide

Die verwendeten siRNA-Oligonukleotide (*small interfering RNA*) wurden von Qiagen (Hilden) bezogen sowie laut Herstellerangaben gelagert und verwendet. Alle siRNA-Oligonukleotide sind nachfolgend in 5'-3'-Richtung angegeben:

Negativkontrolle-siRNA

DNA-Zielsequenz: AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT
Sense: UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT
Antisense: ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT

Cathepsin X 304-siRNA

DNA-Zielsequenz: AAC GGA TCG GAT CAA CAT CAA
Sense: CGG AUC GGA UCA ACA UCA AdTdT
Antisense: UUG AUG UUG AUC CGA UCC GdTdT

Cathepsin X 913-siRNA

DNA-Zielsequenz: AAT CGT GAC CAG CAC CTA TAA
Sense: UCG UGA CCA GCA CCU AUA AdTdT
Antisense: UUA UAG GUG CUG GUC ACG AdTdT

Cathepsin X Mismatch siRNA

DNA-Zielsequenz: AAC GGA GCG GAT CAA TAT CAA
Sense: CGG AGC GGA UCA AUA UCA AdTdT
Antisense: UUG AUA UUG AUC CGC UCC GdTdT

D.1.3.3 Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken

Chamber Slides	BD Biosciences, USA
DMEM Serum-freies Medium mit 2 mM L-Glutamin und 4 g/l Glukose	PAA, Österreich
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS 1x)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Lonza, Schweiz
Kryokonservierungsröhrchen	Nalgene, USA
Lipofectamine 2000 (Transfektionsreagenz)	Invitrogen, USA
MSC-Basalmedium (<i>MSCBM</i>)	Lonza, Schweiz
<i>MSC-Growth Supplement (MCGS)</i>	Lonza, Schweiz
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
Nutridoma	Roche, Mannheim
Osteogenes Zusatzmedium (<i>Osteogenic Differentiation BulletKit, PT-3002</i> , enthält <i>Basal Medium, PT-3924</i> und <i>Osteogenic SingleQuotKit, PT-4120</i>)	Lonza, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Schweiz
RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin	PAA, Österreich
Transwellplatte <i>Invasion Chambers: 6,5 mm Durchmesser</i> , 8 µm Porengröße, 24 Kavitäten	Costar, USA
Trypsin/EDTA-Lösung	Lonza, Schweiz
Zellkulturflaschen (75 cm ² Oberfläche)	Nunc, USA
Zellkulturplatten mit 6-, 12-, -24-, 96-Kavitäten	Nunc, USA

Humane Osteoblasten

Die verwendeten Osteoblasten wurden von der Firma Lonza (Basel, Schweiz) bezogen sowie laut Herstellerangaben gelagert und verwendet.

Humane mesenchymale Stammzellen

Die verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurden von der Firma Lonza (Basel, Schweiz) [ehemals Firma Cambrex (New Jersey, USA)] bezogen. Diese Zellen wurden durch Knochenmarkspunktion gewonnen und mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Fähigkeit der mesenchymalen Stammzellen an Kunststoff zu adhären, wird dazu genutzt, sie von haematopoetischen Stammzellen zu trennen. Laut Herstellerangaben sind hMSC hinsichtlich HIV, Hepatitis B, Hepatitis C, Mykoplasmen, Bakterien und Pilze negativ befundet. Die Fähigkeit der Zellen zur Differenzierung in drei mesodermale Richtungen (adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung) wird garantiert.

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Versuchen mit hMSC wurde mit Zellen von drei verschiedenen Spendern gearbeitet:

- männlich, 23 Jahre, Schwarz
- weiblich, 19 Jahre, Kaukasierin
- weiblich, 19 Jahre, Schwarz

Alle Versuche mit hMSC wurden in der fünften bis höchstens siebten Kultivierungspassage durchgeführt.

D.1.3.4 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken

Albumin Standardlösung	Pierce Biotechnology, Rockford
BC Assay Reagenz A und B	Uptima Interchim, Frankreich
BioMax Filme	Kodak, USA
BioMax Filmkassette	Kodak, USA
<i>human</i> Pro-Cathepsin B-ELISA	R&D Systems, USA
<i>human</i> Cathepsin K-ELISA	Biomedica, Österreich
<i>human</i> Cathepsin L-ELISA	ImmunoBiological Laboratories, Hamburg
Multiplex Western Blot Cocktail I: <i>Phospho-p90RSK, Phospho-AKT,</i> <i>Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2),</i> <i>Phospho-S6 Ribosomal ProteinDetection Kit</i>	PathScan, BioLabs, New England
Multiplex Western Blot Cocktail II: <i>Phospho-p90RSK, Phospho-p53,</i> <i>Phospho-p38MAPK, Phospho-S6</i> <i>Ribosomal Protein Detection Kit</i>	PathScan, BioLabs, New England
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schüll, Kassel
Whatman Filterpapier Nr.1	Whatman/Vetter, Ammerbuch

Der verwendete Lysis-Puffer (nicht denaturierend) für Proteinextraktion (pH 6,0; Lagerung bei 4°C) wurde wie folgt hergestellt: 50 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ + 0,2 M NaCl + 5 mM EDTA + 1% Triton X-100.

Das Einbettmedium Mowiol/DABCO für die Immunfluoreszenzfärbung war folgendermaßen zusammengesetzt: 5 g Mowiol 4.88 in 20 ml Tris pH 8,0 gelöst, für 16 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Zugabe von 10 ml 100% Glycerin, ebenfalls für 16 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Lagerung in 1 ml Aliquots bei -20 °C. Vor Verwendung 50 mg/ml DABCO (1,4-Diazobicyclo-octan) zugeben und für 20 Min. bei 5000 g zentrifugieren.

D.1.3.5 Substrate und Inhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem / Merck, Darmstadt
Single Component TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
Zyklisches RAD-Peptid: <i>cyclo(-Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val)</i>	Bachem, Weil am Rhein
Zyklisches RGD-Peptid: <i>cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)</i>	Bachem, Weil am Rhein

D.1.3.6 Antikörper, Konjugate und ProteineAntikörper & Konjugate

Alexa Fluor [®] 488 anti-Kaninchen IgG (H+L) (Ziege)	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Procathepsin X (Ziege)	R&D Systems, USA
anti-Procathepsin X (Kaninchen)	Nägler et al., 2006
anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ (LM609) (Maus)	Chemicon, US
anti-Integrin $\alpha_5\beta_1$ (MAB1969) (Maus)	Chemicon, US
anti-Maus HRP- <i>linked</i> (Ziege)	New England Biolabs, Beverly, USA
anti-Kaninchen HRP- <i>linked</i> (Ziege)	New England Biolabs, Beverly, USA
anti-Ziege/Schaf HRP- <i>linked</i> (Maus)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Proteine

humane Extrazelluläre Matrix	BD Biosciences, USA
humanes Fibronectin	Harbor Bio-Products, USA
humanes Kollagen I	Chemicon, USA
humanes Kollagen IV	Chemicon, USA
humanes Laminin	Chemicon, USA
humanes Vitronectin	Promega, Madison, USA
Procathepsin X	Sivaraman et al., 2000

Lagerung und Verwendung der Proteine erfolgte jeweils laut Herstellerangaben.

D.2 Methoden

D.2.1 Molekularbiologische Methoden

D.2.1.1 RNA-Isolierung

Die Isolation der Gesamt-RNA aus hMSC als initialer Schritt für die Quantifizierung der Transkript-expression erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben. Hierfür wurden ca. 1×10^5 der in der Zellkultur abgelösten und sedimentierten Zellen mit PBS gewaschen und in 350 μ l eines RLT-Puffers (β -Mercaptoethanol-haltiger Lysispuffer) unter Zusatz eines RNase-Inhibitors resuspendiert. Um eine effektive Zerstörung der Zellmembran zu erzielen und die Zellreste zu entfernen, wurde das Zelllysate in eine QIAshredder-Säule überführt und für 2 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 350 μ l 70 %igem Ethanol wurde das Gemisch auf eine RNeasy-Zentrifugationssäule überführt. Das Ethanol ermöglicht während der Zentrifugation (15 Sekunden bei 15000 g) eine optimale Bindung der RNA an die Silicagel-Membran der RNeasy-Zentrifugationssäule. Zur Entfernung nicht-RNA-haltiger Anteile wurden der RNeasy-Zentrifugationssäule 700 μ l RW1-Puffer zugegeben und für 15 Sekunden bei 15000 g zentrifugiert. Durch zweimaliges Waschen mit 500 μ l RPE-Puffer während der Zentrifugation (15 Sekunden bei 15000 g) wurden letzte Verunreinigungen aus der Säule entfernt. Die isolierte RNA wurde in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Bis zur Verwendung wurde die isolierte RNA bei -80 °C gelagert.

D.2.1.2 cDNA-Synthese

Zur Vorbereitung für die semiquantitative und quantitative RT-PCR wurde die isolierte Gesamt-RNA in einzelsträngige cDNA (*complementary* DNA) unter Verwendung von Zufalls-Primern (*Random Primer*) umgeschrieben. Für die Synthese der cDNA wurde der „*iScript cDNA-Synthesis Kit*“ gemäß Herstellerangaben verwendet. Zur cDNA-Synthese wurden 8 μ l der aus der RNA-Isolierung gewonnenen Probe eingesetzt und mit 20 U *AMV* Reverse Transkriptase, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTPs, 3,2 μ g *Random Primer* und 50 U RNase-Inhibitor zu einem Volumen von 20 μ l vermischt und wie folgt behandelt: 25 °C/10 Min. (Primer bindet an RNA) \rightarrow 42 °C/60 Min. (Reverse Transkription zur cDNA-Synthese) \rightarrow 99 °C/5 Min. (RNA wird denaturiert) $-$ 4 °C/5 Min (Abkühlung).

Da Vorversuche zeigten, dass Cathepsine in hohen Mengen detektierbar sind, wurden nach der cDNA-Synthese die Proben nochmals mit RNase-freiem Wasser verdünnt und in der qRT-PCR als 1:100 Verdünnung eingesetzt. Ausgenommen waren Proben aus den Transfektionsversuchen, die in einer Verdünnung von 1:40 in der qRT-PCR verwendet wurden. Bis zur Verwendung wurde die umgeschriebene cDNA bei -20 °C gelagert.

D.2.1.3 Semiquantitative RT-PCR

Für die Amplifikation kodierender Sequenzen ausgewählter Cathepsine wurden für die semiquantitative RT-PCR sequenzspezifische *forward* und *reverse* Primer der Firma Invitrogen laut Herstellerangaben verwendet.

Die PCR-Bedingungen waren bei allen Zielgenen identisch und wie folgt: 95 °C/1 Min; [95 °C/30 Sek → 58 °C/1 Min /58°C → 72°C/1,3 Min] × 45 Zyklen; 72 °C/6 Min. Nach abgeschlossener PCR wurden die PCR-Produkte mittels der Agarose-Gelelektrophorese visualisiert.

D.2.1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Bestimmung der Homogenität von PCR-Ansätzen wurden die DNA-Proben mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurden 2 %ige Agarosegele hergestellt, indem 1,6 g Agarose in 80 ml 1-fachem TAE-Laufpuffer (40 mM Tris/Base, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) eingewogen und mittels eines Mikrowellenofens für 3 Minuten bei 600 Watt geschmolzen wurde. Anschließend wurde die Lösung auf ca. 40 °C abgekühlt, 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen. Die entsprechenden Proben der DNA wurden mit 6-fachem Probenpuffer (30 %iges Glycerol, 0,25 %iges Bromphenolblau, 0,25 %iges Xylen Cyanol, 0,25 % iges Orange G) gemischt, in die Geltaschen geladen und in TAE-Puffer mit 5-7 V/cm für 0,5-3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte unter einem UV-Transilluminator (302 nm).

D.2.1.5 Quantitative RT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit dem sog. LightCycler® der Firma Roche durchgeführt. Mit Hilfe der qRT-PCR kann die absolute bzw. relative Quantifizierung von mRNA-Transkripten erfasst werden. Die qRT-PCR ist ein „Echtzeit“-Verfahren, d. h. Quantifizierung und Visualisierung finden parallel zur Amplifikation statt. Das Prinzip dieser Detektion basiert auf dem Mechanismus der Interkalation von "SYBR Green"-Molekülen in doppelsträngige DNA (dsDNA), wodurch Fluoreszenz erzeugt wird. Je mehr PCR-Produkte gebildet werden, desto mehr Interkalationen entstehen, und desto stärker ist das Fluoreszenzsignal.

Da die Konzentrationen in den eingesetzten Proben unbekannt waren, wurde die relative Anzahl der Transkripte durch eine Standardverdünnungsreihe mit definierter Kopienanzahl berechnet. Der Standard ist eine im Kit enthaltene Positivkontrolle und wurde in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:100 und 1:1000 eingesetzt. Um die unterschiedliche Zellenanzahl zu berücksichtigen, wurde zusätzlich jede Probe auf GAPDH detektiert, welches als sog. *housekeeping*-Gen fungierte.

Ein Reaktionsansatz, der direkt in die Glaskapillaren pipettiert wurde, bestand aus 5 µl cDNA einer Probe bzw. eines Standards und jeweils 1 µl spezifischen Primer, 1 µl LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR green I Mix und 3 µl Wasser (*water, PCR Grade* aus LightCycler® Kit). Das resultierende Gemisch mit einem Volumen von 10 µl wurde anschließend bei 500 g in einer vorgekühlten Tischzentrifuge 4 Minuten bei einer Temperatur von + 4 °C zentrifugiert. Die Kapillare wurde anschließend in das LightCycler®-Kapillarrondell eingesetzt und die qRT-PCR gestartet.

Die PCR-Bedingungen in einem LightCycler-Lauf richteten sich nach den Herstellerangaben der sequenzspezifischen Primer und waren wie folgt: 95°C/10 Min; [95°C/10 Sek → 68°C/10 Sek/58°C → 72°C/16 Sek] × 35 Zyklen, Fluoreszenzverstärkung 5. Anschließend erfolgte durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur (95 °C → 58 °C/10 Sek → dT/dt 0,1 °C/Sek) die Schmelzkurvenanalyse, mit dem Ziel, Primerdimere und unspezifische Produkte zu identifizieren.

Die in dieser Arbeit graphisch dargestellten Expressionsergebnisse sind relative Werte – bezogen auf die jeweilige Standardkurve – und wurden durch das *housekeeping*-Gen GAPDH normiert.

D.2.2 Zellbiologische Methoden

D.2.2.1 Kultivierung von hMSC

Die in dieser Arbeit verwendeten hMSC wurden im Labor kryokonserviert gelagert und vor ihrer Kultivierung im Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C aufgetaut, um dann in 5 ml Stammzellmedium resuspendiert zu werden. Das Stammzellmedium (*MSCGM*) enthielt neben 440 ml Basalmmedium (*MSCBM*) folgende weitere Zusätze: 50 ml fetales Kälberserum (FKS, enthalten in *MCGS*), 10 ml L-Glutamin und 0,5 ml Penicillin / Streptomycin.

Nach der Resuspension der Zellen erfolgte die Zentrifugation bei 400 g und der Überstand wurde entfernt. Die Zellen wurden in 3 ml *MSCGM* resuspendiert. Die Suspension wurde auf drei 75 cm²-Zellkulturflaschen gleichmäßig verteilt, nachdem pro Flasche 9 ml *MSCGM* zugegeben wurde. Die Zellkulturflaschen wurden im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) bei einer Temperatur von 37 °C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach jeweils drei bis vier Tagen wurde das Medium der Zellen durch frisches *MSCGM* ersetzt. Bei einer erzielten Konfluenz von ca. 80 % konnten die Zellen entweder subkultiviert oder für Versuche verwendet werden.

Die Zellen wurden geerntet, indem zuerst das Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 3 ml PBS gewaschen wurden. Dieser Waschschrift ist notwendig, um Mediumrückstände zu entfernen, da im Medium enthaltenes Serum das später notwendige Trypsin inaktivieren kann. Nachfolgend wurde PBS durch 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung ausgetauscht und dieses für eine ca. 10-minütige Inkubation

im Brutschrank auf den Zellen belassen. Die Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurde mit Hilfe des Mikroskops kontrolliert und bei erfolgreicher Ablösung die Trypsinierung durch Zugabe von 3 ml MSCGM inhibiert. Um das noch enthaltene Trypsin vollständig zu entfernen, wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falkonröhrchen überführt und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt. Für den Fall einer weiteren Kultivierung wurden die Zellen in 1 ml MSCGM resuspendiert und die Anzahl der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Zur weiteren Kultivierung oder für Versuche wurden pro cm^2 5×10^3 Zellen ausgesät.

D.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Anzahl der enthaltenen Zellen wurde mikroskopisch ermittelt und die Zelldichte wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n_{\text{Zellen_total}}}{n_{\text{Quadrate}}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

D.2.2.3 Osteogene Differenzierung der hMSC

Zur osteogenen Differenzierung wurden konfluierende hMSC in osteogenem Zusatzmedium über eine Dauer von bis zu 21 Tagen kultiviert, wobei alle drei bis vier Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung der hMSC wurde die Alizarin Rot-Färbung, basierend auf der Visualisierung der Kalzifizierung, im Labor Dr. P. Neth durchgeführt.

D.2.2.4 Stimulation der hMSC mit Proteinen der extrazellulären Matrix

Um den Einfluss von EZM-Proteinen auf die Cathepsin-Expression und Cathepsin-Sezernierung zu untersuchen, wurden die verwendeten Kavitäten mit den EZM-Proteinen Kollagen I, Laminin bzw. Vitronektin (1 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet und ca. 6 Stunden bei 4 °C inkubiert. Den Kavitäten der Zellkulturplatten für die unstimulierten Kontrollen wurde nur PBS zugegeben. Diese wurden ebenfalls für den gleichen Zeitraum inkubiert. Die Versuchsansätze wurden in Triplikaten bzw. Duplikaten durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubation konnten hMSC ausgesät werden. Dazu wurden die Zellen geerntet, bei 600 g zentrifugiert und in MSCGM resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden wie folgt ausgesät:

- 12-Kavitäten-Zellkulturplatten 1×10^4 Zellen in 1 ml MSCGM pro Kavität
- 6-Kavitäten-Zellkulturplatten 3×10^4 Zellen in 2 ml MSCGM pro Kavität

Zusätzlich wurde dem Medium der mit dem EZM-Protein beschichteten Platten 5 µg Kollagen I, Laminin bzw. Vitronektin pro ml MSCGM zugegeben. Die Zellkulturplatten wurden für 7, 14 bzw. 21 Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Zum Nachweis der Cathepsin-Expression mittels qRT-PCR wurden die Zellen nach 7, 14 bzw. 21 Tagen wie folgt geerntet: Zunächst wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und danach für 5-15 Minuten mit 0,4 ml Trypsin/EDTA pro Kavität inkubiert. Der Ablösungsvorgang wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch Zugabe von 0,6 ml MSCGM gestoppt. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten, 600 g, 4 °C) vom Überstand getrennt. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sediment bei -80°C zur späteren RNA-Isolierung gelagert. Bei den restlichen Kavitäten der Zellkulturplatten wurde der Überstand durch frisches MSCGM ersetzt, den stimulierten hMSC erneut 5 µg Kollagen I, Laminin bzw. Vitronektin pro ml MSCGM zugegeben und für weitere 7 Tage im Brutschrank inkubiert.

Zum Nachweis der Cathepsin-Sezernierung mittels proteinchemischer Methoden wurden nach 7, 14 bzw. 21 Tagen Lysate aus je zwei Kavitäten der stimulierten und unstimulierten 6-Kavitätenplatten wie folgt hergestellt: Nach Abnahme des Überstandes und einem Waschschrift mit 2 ml PBS wurden die Zellen mit 400 µl Lysispuffer pro Kavität inklusive Protease Inhibitor Cocktail Set III in einer Verdünnung von 1:100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren der Suspension in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß wurden die Proben auf Eis 10 Minuten inkubiert, unterbrochen von zwei- bis dreimaligem Vortexen. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C wurden die Lysate von restlichen Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand (=Lysat) wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für spätere Versuche bei -20 °C gelagert.

D.2.2.5 Zelladhäsionsassay

Zur Durchführung des Zelladhäsionsassays wurden 96-Kavitätenplatten mit Proteinen beschichtet, um die Bindung von hMSC an diese Proteine untersuchen zu können. Hierfür wurden die Kavitäten jeweils mit 100 µl Fibronektin (5 µg/ml), Kollagen I (5 µg/ml), Kollagen IV (5 µg/ml), Laminin (5 µg/ml) bzw. Vitronektin (1 µg/ml) beschichtet. Als Negativkontrolle wurden zusätzliche Kavitäten mit BSA-Beschichtung (5 µg/ml in PBS gelöst; 100 µl/Kavität) mitgeführt.

Nach Inkubation über Nacht bei +4 °C wurde die jeweilige Lösung aus den Kavitäten entfernt und mit 7,5 % BSA (gelöst in destilliertem Wasser; 100 µl/Kavität) bei +4 °C für 4 Stunden inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Währenddessen wurden die hMSC wie folgt vorbereitet: Das Medium (MSCGM) der hMSC wurde durch DMEM (ohne fetales Kälberserum, FKS) ersetzt und die Zellen für 30 Minuten im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch

Trypsinierung geerntet. Nach Zugabe von 6 ml DMEM (ohne FKS) wurde die Suspension in ein 15 ml Falkonröhrchen überführt und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 1 ml DMEM (ohne FKS; mit 0.2 mM MnCl_2) resuspendiert. Dem Medium wurde Mn^{2+} zugegeben, damit Integrine durch divalente Kationen ihre aktive Konformation annehmen und dadurch ihre Bindungsfähigkeit an spezifische Liganden gewährleistet ist (Smith et al. 1994). Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt und durch Zugabe von DMEM auf 4×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Abhängig von der Versuchsreihe wurden die Zellen in mehrere 1,5 ml Eppendorfgeläße aufgeteilt und jeweils mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper LM609 (10 $\mu\text{g/ml}$), Integrin $\alpha_5\beta_1$ -Antikörper MAB1969 (Verdünnung 1:50), Procathepsin X (50 $\mu\text{g/ml}$), Procathepsin X-Mutanten (AAA- bzw. RAD-Sequenz anstatt der physiologischen RGD-Sequenz; jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$), Vitronektin oder zyklischen Peptiden (RAD, RGD; jeweils 5 μM) für 10 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert.

Vor Aussaat der Zellen wurde die 96-Kavitätenplatte von der Blockierungslösung auf saugfähigem Zellstoff entleert und verbleibende Reste wurden vorsichtig abpipettiert. Zellen (unstimuliert bzw. nach Präinkubation) wurden in die Kavitäten überführt (100 $\mu\text{l/Kavität}$; d. h. 4×10^4 Zellen pro Kavität) und die Inkubation erfolgte für 60 Minuten im CO_2 -Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C.

Anschließend wurde die Platte auf saugfähigem Zellstoff entleert und verbleibende Reste erneut abpipettiert. Nun folgten mehrere Waschschrte mit 100 μl DMEM (ohne FKS/ MnCl_2) pro Kavität. Nach jedem Waschschrte wurde die Waschlösung aus den Kavitäten entfernt. Daraufhin wurden die Zellen durch 1 %-iges Glutaraldehyd (gelöst in PBS) fixiert (100 $\mu\text{l/Kavität}$) und die Fixierungslösung nach 10 Minuten entfernt. Die adhärenen und fixierten Zellen wurden mit 0,1 %-igem Kristallviolett (gelöst in Aqua dest.; 100 $\mu\text{l/Kavität}$) gefärbt. Dieses Prinzip basiert auf der Anfärbung der vorwiegend DNA-assoziierten Nukleoproteine durch Kristallviolett. Die Färbelösung wurde für 25 Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Nach der Färbung wurde die Platte erneut entleert und in eine Wanne mit Leitungswasser gelegt, um extrazelluläre Farbrete zu entfernen. Dieser Waschschrte wurde nach Abpipettieren des Leitungswassers aus den Kavitäten wiederholt. Die Platte wurde bei Raumtemperatur 5-10 Minuten getrocknet, um dann die adhärenen, fixierten und gefärbten Zellen mit 0,5 %-igem TritonX-100 (gelöst in Aqua dest.; 50 $\mu\text{l/Kavität}$) durch 20-bis 30-minütige Inkubation zu lysieren.

Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 595 nm, unter Verwendung des Gerätes XFluor4 Safire2 der Firma Tecan. Dabei werden adhärenen Zellen aufgrund der Farbstoffmarkierung (0,1 % Kristallviolett) durch Extinktion bestimmt.

D.2.2.6 Vorbereitung der hMSC zur Identifizierung von Signalwegen

Zur Stimulation bzw. Inhibition bestimmter Signaltransduktionswege in hMSC wurden die Zellen in 6-Kavitätenplatten in einer Zelldichte von 6×10^4 Zellen in 2 ml MSCGM ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen zu gewährleisten.

Am Folgetag wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 2 ml frisches MSCGM pro Kavität zugegeben. Zur Stimulation wurde PMA in einer Konzentration von 50 ng/ml, das EZM-Protein Vitronektin bzw. Procathepsin X in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt. Die Zellen wurden zum einen allein mit PMA, Vitronektin bzw. Procathepsin X stimuliert und zum anderen wurden jeweils dem PMA, dem Vitronektin bzw. dem Procathepsin X der Inhibitor Wortmannin bzw. U0126 zugegeben. Zur Inhibition bestimmter Signalkaskaden wurden U0126 in einer Konzentration von 10 µM bzw. Wortmannin in einer Verdünnung von 1:100 (verdünnt in MSCGM) verwendet. Als Kontrolle wurden hMSC einer weiteren Kavität unstimuliert belassen. Anschließend wurden die Zellen für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

Um die Lysate aufzubereiten, wurde den Zellen 100 µl Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid (SDS)-Probenpuffer, bestehend aus 62,5 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 50 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), 0,01 % Bromphenolblau (pH 6.8), pro Kavität zugegeben. Nach auf- und abpipettieren wurde das Gemisch bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht, um eine ausreichende Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400 g und + 4 °C für 5 Minuten. Die Lysate wurden für spätere Versuche bei - 20 °C gelagert.

D.2.2.7 RNA-Interferenz

Um gezielt Proteine in Zellen auszuschalten (Niederregulation oder *Knockdown*) wurde die sog. siRNA (*small interfering RNA*) eingesetzt. SiRNA ermöglicht es, mRNA-Transkripte sequenzspezifisch abzubauen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Transfektion Lipid-basiert, d.h. unter Verwendung des kationischen Lipidreagenzes *Lipofectamine 2000* wird siRNA lipophiler und damit befähigt, Zellmembranen zu durchwandern.

Die Transfektion der hMSC erfolgte in 6- bzw. 12-Kavitätenplatten bei einer Zellzahl von ca. 1×10^4 Zellen/Kavität (ca. 30-50 % Konfluenz). Nach Aussaat der Zellen in die Kavitäten wurden diese für 24 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium (MSCGM) durch das jeweilige Transfektionsgemisch ersetzt. Das Transfektionsgemisch wurde wie folgt hergestellt: siRNA (25 nM) wurde in serumfreiem Medium (DMEM) verdünnt und in einem weiteren Ansatz wurde *Lipofectamine 2000* (1,8 µg/ml) ebenfalls in serumfreiem Medium verdünnt. Beide Ansätze wurden maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Mischung des Lipofectaminansatzes mit dem

siRNA-Ansatz wurde dieses Gemisch für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde in jede Kavität einer 12-Kavitätenplatte 800 µl MSCGM bzw. einer 6-Kavitätenplatte jeweils 1,5 ml MSCGM vorgelegt und 200 µl siRNA/Lipid-Gemisch für 12-Kavitätenplatten (enthält neben 196,95 µl DMEM 1,25 µl siRNA und 1,8 µl Lipofectamine 2000) bzw. jeweils 500 µl für 6-Kavitätenplatten (enthält neben 492,5 µl DMEM 2,5 µl siRNA und 5 µl Lipofectamine 2000) tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 6 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium mit dem enthaltenen Transfektionsgemisch entfernt und durch 1 ml bzw. 2 ml frisches Stammzellmedium (MSCGM) pro Kavität ersetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einer unspezifischen siRNA (Negativkontrolle-siRNA), zwei Cathepsin X spezifischen siRNAs (Cathepsin X 304-siRNA, Cathepsin X 913-siRNA) und einem Derivat des CathXsi304, welches zwei Mutationen in seiner Sequenz aufweist (Cathepsin X Mismatch-siRNA), gearbeitet. Der Nachweis der Niederregulation von Cathepsin X wurde mit der qRT-PCR und dem ELISA-Verfahren erbracht.

D.2.2.8 Transmigrationsassay

Zur Bestimmung der Migration von hMSC wurde das sog. Transwell-System verwendet. Hierbei erfolgt die Migration der Zellen durch eine rekonstituierte Basalmembran entlang eines Konzentrationsgefälles. Vor Aussaat transfizierter, prästimulierter bzw. unbehandelter Zellen in die sog. *Inserts* der Transwellplatte (Fa. Costar) wurden die *Inserts* über Nacht mit jeweils 10 µg humaner EZM (gelöst in RPMI) bzw. 10 µg Vitronektin beschichtet. Am nächsten Tag wurde jedes *Insert* mit serumfreiem Medium (RPMI) für zwei Stunden befeuchtet. In das untere Kompartiment der Transwellplatte wurde jeweils 600 µl DMEM (enthält 10 % humanes Serum; sterilfiltriert) gegeben. 5×10^3 Zellen pro *Insert* wurden in 200 µl Medium ausgesät. Dieses Medium bestand aus DMEM mit 1 % Nutridoma und 10 % MSCGM. Bei Stimulationsversuchen wurde nicht-transfizierten hMSC vor Aussaat 10 µg/ml Vitronektin bzw. 1 µM RGD-Peptid zugegeben. Nach Aussaat der hMSC in die mit hEZM bzw. Vitronektin beschichteten *Inserts* wurden diese auf die Kompartimente gesetzt, welche DMEM und humanes Serum enthielten. Nach 48-stündiger Inkubation im CO₂-Brutschrank bei 37 °C, wurde das Medium in den *Inserts* entfernt.

Nicht migrierte Zellen wurden mit einem mit PBS angefeuchtetem Wattestäbchen entfernt. Anschließend wurden die *Inserts* mit PBS gewaschen (800 µl/*Insert*, 2 Minuten), um dann die Zellen mit 100 %-igem und - 20 °C temperiertem Methanol zu fixieren (800 µl/*Insert*; bei + 4 °C 10 Minuten inkubieren). Nach Entfernung des Methanol wurde dieses durch Permeabilitätslösung, bestehend aus PBS + 0,2 % TritonX-100 (800 µl/*Insert*; 10 Minuten inkubieren), ersetzt. Dadurch wurden die Zellen für das nachfolgende 4, 6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) permeabilisiert. Nachdem das TritonX-100

entfernt wurde, erfolgte die Färbung der Zellen mit DAPI. DAPI hat die Eigenschaft, sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der kleinen DNA-Furche anzulagern, um dann unter Anregung durch ultraviolettes Licht blaues Licht zu emittieren. Hierfür wurde DAPI im Verhältnis 1:7500 mit PBS verdünnt und 600 µl pro *Insert* verteilt. Die nachfolgende Inkubation der Zellen wurde für 5 Minuten durchgeführt. Die *Inserts* wurden dreimal mit PBS (800 µl/*Insert*) für je 2 Minuten gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde 1 ml PBS in den *Inserts* belassen.

Die Analyse migrierter Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop IX70 unter Verwendung eines 4× Objektivs. Es wurde immer ein Gesichtsfeld fotografiert und unter Anwendung des Programmes ImageProPlus konnten die Zellen durch ihre fluoreszierenden Zellkerne ausgezählt werden. Für spätere Analysen wurden die Transwellplatten mit Parafilm bedeckt und bei + 4 °C gelagert.

D.2.3 Proteinchemische Methoden

D.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die BCA-Methode verwendet. Dieses Prinzip basiert auf der photometrischen Messung eines blauen Cu^{2+} -Komplexes, welcher sich zwischen Peptidbindungen und Bicinchoninicsäure (BCA) bildet.

Die Proben aus den Transfektionsversuchen wurden als 1:10 Verdünnung (verdünnt in Aqua dest.) und sonstige Proben als 1:20 Verdünnung vorbereitet. Als Standard wurde Albumin (Albumin Standardlösung 2 mg/ml) in einer Standardverdünnungsreihe (1000 mg/ml, 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62,5 mg/ml, 31,3 mg/ml, 15,6 mg/ml) eingesetzt. Da die zu testenden Proben eine unbekannte Menge an Gesamtprotein enthalten, sind die Verdünnungen der Standardreihe mit definierter Proteinmenge als sog. Referenzwerte und zur Quantifizierung der Proben notwendig. Die Bestimmung der Standardwerte und Proben erfolgte in Duplikaten. Nachdem jeweils 100 µl Standard bzw. Proben in die Kavitäten pipettiert wurden, konnten 100 µl pro Kavität $\text{BCA}/\text{Cu}^{2+}$ (Verdünnung 24:1) zugegeben werden. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

D.2.3.2 SDS-PAGE und Immundetektion mittels Immunoblot-Analyse

Für die Auftrennung von Proteinen komplexer Lysatgemischen wurde die „diskontinuierliche Elektrophorese“ (Laemmli. 1970) angewendet. Durch das vorhandene SDS wird eine Denaturierung und negative Ladung der Proteine gewährleistet, um eine Auftrennung der Proteine nach ihrem spezifischen Molekulargewicht, d. h. unabhängig von ihrer Ladung, zu ermöglichen. In Abhängigkeit des Molekulargewichtes der zu detektierenden Moleküle wird das Gel mit einem definierten Prozentanteil an Acrylamid ausgewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit 12 %igen Trenngelen (12 % Acrylamid) gearbeitet, da diese Gele für die zu trennenden Proteine der Größe 15 bis 80 kDa geeignet sind. Hierfür wurden die 12 %igen Trenngele aus folgenden Zugaben hergestellt: 4,5 ml dH₂O, 2,5 ml Puffer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8), 3 ml 40 %iges Acrylamid, 100 µl 10-prozentiges SDS, 10 µl TEMED und 100 µl 10-prozentiges APS. Die Sammelgele, in welche die Proben pipettiert wurden, um anschließend im Trenngel in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes getrennt zu werden, wurden aus folgenden Komponenten hergestellt: 5,675 ml dH₂O, 2,5 ml Puffer (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8), 1,65 ml 40-prozentiges Acrylamid, 100 µl 10-prozentiges SDS, 10 µl TEMED und 100 µl 10-prozentiges APS.

Da den Proben bereits im Lyseschritt der SDS Probenpuffer zugegeben wurde, konnten jeweils 20 µl der Proben sofort auf das Sammelgel aufgetragen werden. Um die unterschiedlichen Banden der einzelnen Proben anhand des jeweiligen Molekulargewichtes zu identifizieren, wurde neben den zu detektierenden Proben 5 µl eines im Kit enthaltenen biotinylierten Molekulargewichtsmarkers (*biotinyliated protein ladder detection pack*) als Molekularstandard auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils 10 µl einer ebenfalls im Kit enthaltenen Positiv- bzw. Negativkontrolle auf das Sammelgel pipettiert. Die Trennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer (250 mM Tris/HCl, 192 mM Glyzin, 0,1 % SDS, pH 8,3) mittels Elektrophorese für ca. 20 Minuten bei 80 Volt und dann für eine Stunde bzw. bis zur vollständigen Trennung der Proteine bei 100 Volt.

Für die immunologische Detektion mittels der Immunoblot-Analyse wurden zunächst die aufgetrennten Proteine vom Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurden das Gel, die Filterpapiere (Whatmann Filterpapier Nr. 1, zugeschnitten auf 9 × 6 cm) und die Nitrozellulosemembran in Transblotpuffer (45 mM Tris/HCl, 39 mM Glyzin, 0,00375 % SDS, 20 % Methanol, pH 8,3) für 5 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurde in der Sandwichmethode (Anode – neun Filterpapiere – Nitrozellulosemembran – Trenngel – neun Filterpapiere – Kathode) der Transfer der Proteine von dem Trenngel auf die Nitrozellulosemembran bei einer Stromstärke von 100 mA für eine Stunde durchgeführt.

Nach dem Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran wurde die Membran mit TBST (65 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween, 3 % BSA) für 3 × 15 Minuten inkubiert. Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen der Proteine durch das enthaltene BSA abgesättigt.

Die Detektion der Zielproteine (phosphorylierte Signalproteine) spezifischer Signaltransduktionskaskaden erfolgte mit den im *Multiplex Western Blot Cocktail I* bzw. *Cocktail II* enthaltenen Antikörpern. Dazu wurde die Membran über Nacht bei + 4 °C mit den ersten Antikörpern (Phospho-p90RSK Antikörper, Phospho-AKT Antikörper, Phospho-pERK1/2 Antikörper, Phospho-S6 Ribosomales Protein Antikörper, eIF4E Antikörper für *Cocktail I*; Phospho-p90RSK Antikörper, Phospho-p53 Antikörper, Phospho-p38 MAP Kinase Antikörper, Phospho-S6 Ribosomales Protein Antikörper, eIF4E Antikörper für *Cocktail II*) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert.

Am Folgetag wurde die Membran 3×15 Minuten mit TBST gewaschen, um dann mit den zweiten Antikörpern ("anti-rabbit IgG HRP-linked" zur Detektion der spezifischen Proteine der jeweiligen Signaltransduktionskaskaden bzw. "anti-biotin HRP-linked" zur Detektion des Molekularstandards) in einer Verdünnung von 1:2000 für eine Stunde inkubiert zu werden. Nach einigen Waschschrritten mit TBST und einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit dem im Kit enthaltenen *LumiGLO*[®] Reagenz (bestehend aus 0,25 ml LumiGLO[®], 0,25 ml 20-fache Peroxidase, 4,5 ml dH₂O), wurde die Detektion der Proteine durch achtminütiges Auflegen von Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

D.2.3.3 Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen

Konzentrationen von (Pro)Cathepsin B, (Pro)Cathepsin K bzw. L wurden in den Lysaten und Überständen mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits laut Herstellerangaben bestimmt.

Um (Pro)Cathepsin X in Lysaten und Überständen quantitativ nachweisen zu können, wurde ein im Labor erarbeitetes und bereits veröffentlichtes ELISA-Testsystem verwendet (Nägler et al. 2006).

D.2.3.4 Subzelluläre Lokalisation mittels Immunfluoreszenz

Immunhistochemische Lokalisationsstudien wurden mit dem IX70 Phasenkontrastmikroskop (Olympus) ausgeführt, das mit einer Fluoreszenzlampe und den entsprechenden Fluoreszenzfiltern ausgestattet war.

Zur subzellulären Lokalisation von (Pro)Cathepsin X wurden hMSC aus dem Stimulationsversuch mit Vitronektin verwendet, die 21 Tage mit Vitronektin bzw. unstimuliert in einer 6-Kavitätenplatte inkubiert und wie im Folgenden beschrieben aufbereitet wurden.

Die Überstände in der jeweiligen Kavität wurden entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, um Mediumüberreste zu eliminieren. Im Anschluss wurde den Zellen 0,4 ml Trypsin/EDTA pro Kavität zugegeben und die Zellen 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und der Trypsinierungsvorgang durch 0,6 ml MSCGM inhibiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 400 g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in 2 ml MSCGM resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und ca. 2×10^3 Zellen pro cm² auf einem Objektträger mit 4-Kavitäten (Chamber Slides, Fa. BD Bioscience) ausgesät. Zur Verbesserung der Adhäsion wurden die Kavitäten vorab mit Poly-L-Lysin (300 µl Poly-L-Lysin/Kavität) beschichtet, für 5 Minuten inkubiert und die Kavitäten mit PBS gewaschen. Nach Inkubation der Zellen über Nacht im CO₂-Brutschrank, wurde das Medium entfernt, die Zellen mittels 3,7 %igem Paraformaldehyd fixiert (Inkubation 10 Minuten bei +4 °C) und mit PBS gewaschen, um das restliche Paraformaldehyd zu

entfernen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,2 % Triton-X-100 für 2 Minuten. Um unspezifische Bindungsdomänen zu blockieren, wurden pro Kavität 500 µl Blockierungslösung (3 % BSA in PBS) zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurde der erste Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X (aus Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:100 in 0,1 % BSA/PBS (250 µl/Kavität) zugefügt und über Nacht bei + 4 °C inkubiert. Danach wurden die Antikörpersuspension abgenommen, die Zellen mit 0,1 % BSA (gelöst in PBS) sechsmal für je 5 Minuten gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, und der zweite Antikörper [Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen IgG (H+L) (Ziege), Konzentration 2 mg/ml gelöst in PBS; 250 µl/Kavität] zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS dreimal für je 5 Minuten gewaschen. Abschließend erfolgte die Einbettung der Präparate in Mowiol/DABCO-Lösung.

D.2.4 Datenanalyse

Für die statistische Datenanalyse wurde der *Student t-Test* mit zweiseitiger Verteilung angewendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,001$ (***) angenommen. Statistische Analysen wurden mittels "Microsoft Office Excel 2003" (Microsoft, Unterschleißheim) durchgeführt.

E ERGEBNISSE

Anmerkung: Im Folgenden wird der Name „Procathepsin X“ unterschiedlich geschrieben. Im Falle einer nicht eindeutigen Zuordnung der Proform eines Cathepsins bzw. des gereiften Enzyms, wird das „Pro“ in Klammern gesetzt. Bei eindeutiger Identifizierung wird „Procathepsin“ oder „Cathepsin“ angegeben.

E.1 mRNA-Expression lysosomaler Cysteinproteasen während der osteogenen Differenzierung der hMSC

Der Stammzellcharakter von hMSC beinhaltet die Differenzierungsfähigkeit in mindestens drei mesodermale Phänotypen, darunter in die osteoblastäre Richtung. Da bereits aus der Literatur bekannt war, dass hMSC in Anwesenheit von Vitronektin bzw. Kollagen I eine Osteoblasten-ähnliche Differenzierung erfahren (Salaszyk et al. 2004a), wurde zunächst eine chemisch induzierte Kontrolldifferenzierung mit osteogenem Kultivierungsmedium durchgeführt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mit der semiquantitativen RT-PCR und anschließenden Auftrennung der DNA-Fragmente über die Agarose-Gelelektrophorese sowie mittels quantitativer RT-PCR evaluiert, ob lysosomale Cysteinproteasen in hMSC exprimiert werden, und inwieweit sich die Expression während der osteogenen Differenzierung verändert.

E.1.1 Nachweis der mRNA-Expression der humanen Cathepsine mittels semiquantitativer RT-PCR

Für die osteogene Differenzierung wurden hMSC über einen Zeitraum von 21 Tagen mit osteogenem Zusatzmedium inkubiert, um einen ersten Hinweis auf die Expression der elf im humanen Genom codierten Cysteinproteasen (Cathepsine B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X) in hMSC zu bekommen. Der qualitative Nachweis der Cathepsin-Expression in stimulierten bzw. unstimulierten hMSC und in Osteoblasten erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR. Die PCR-Produkte wurden nach 45 Zyklen über die Agarose-Gelelektrophorese visualisiert (Abb. E.1).

Zur Kontrolle der osteogenen Differenzierung wurden die Zellen anhand der Alizarin Rot-Färbung im Labor Dr. P. Neth überprüft (Daten nicht gezeigt).

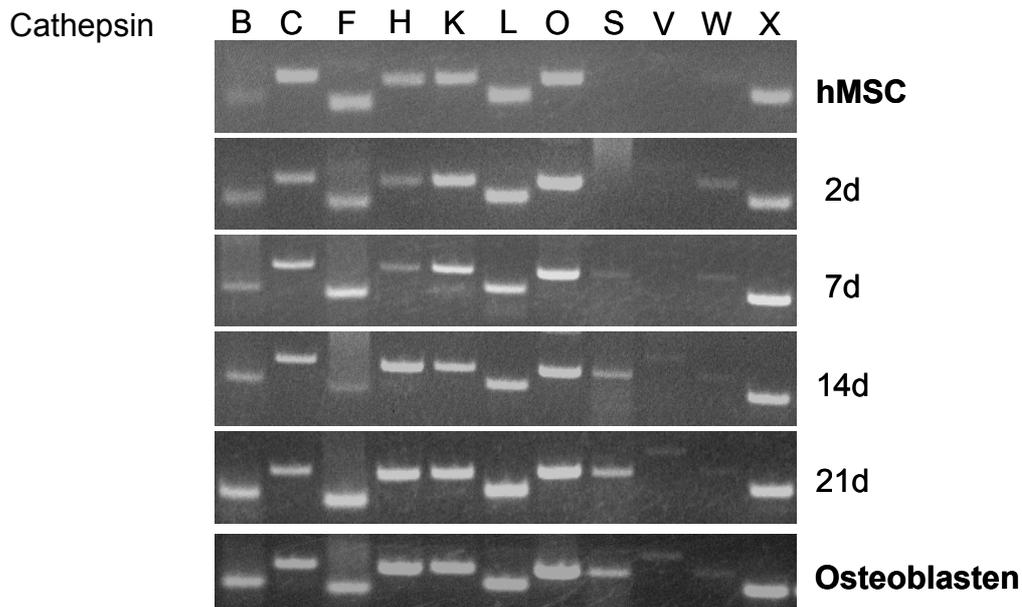


Abb. E.1 Nachweis der Expression von Cathepsinen in hMSC und während osteogener Differenzierung (nach 2, 7, 14 und 21 Tagen) sowie in Osteoblasten.
 Acht der elf lysosomalen Cysteinproteasen sind in hMSC mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene nachweisbar. In Osteoblasten dagegen werden alle elf Cathepsine exprimiert.

Acht der elf lysosomalen Cysteinproteasen sind in hMSC exprimiert, wobei sie sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. So lassen sich die Cathepsine S, V und W in den unstimulierten hMSC nach 45 Zyklen PCR nicht detektieren. Jedoch scheinen die gewebespezifischen Cathepsine S (Shi et al. 1994), V (Brömme et al. 1998) und W (Linnevers et al. 1996) sowie die Cathepsine B, H und K während der osteogenen Differenzierung eine Expressionsinduktion zu erfahren (Abb. E.1).

E.1.2 Nachweis der mRNA-Expression ausgewählter Cathepsine mittels quantitativer RT-PCR

Der quantitative Nachweis der Cathepsin-Expression in hMSC erfolgte mittels qRT-PCR unmittelbar nach Beginn der Inkubation, nach 24 und 48 Stunden, sowie nach 4, 7, 14 und 21 Tagen. Detektiert wurden die Cathepsine B, H, K, L, O, S und X. Da bei Cathepsin C und F in der PCR keine Expressionsinduktion erkennbar war (vgl. Abb. E.1) und die Cathepsine V und W gewebespezifisch sind, wurden diese Cathepsine in der qRT-PCR nicht berücksichtigt.

Bei den Cathepsinen B, H und K zeigt sich eine Induktion der Expression während chemisch induzierter osteogener Differenzierung (Abb. E.2, Grafen A-C). Die Expression der Cathepsine L, O und S scheint nach 48 Stunden induziert zu werden und erfährt vor allem nach 21 Tagen eine Expressionszunahme (Abb. E.2, Grafen D-F). Die Expression von Cathepsin X während osteogener Differenzierung zeigt keine eindeutige Konzentrations-Zeit-Beziehung und lässt somit keinen langfristigen Einfluss des Differenzierungsschemas auf die Transkription bzw. Expression dieses Cathepsins vermuten

(Abb. E.2, Grafik G). Die alkalische Phosphatase (AP), ein Marker Osteoblasten (Doty et al. 1976), dient der osteogenen Differenzierungskontrolle. Die alkalische Phosphatase steigt bis Tag 7 kontinuierlich an, danach ist ein leichter Abfall der Expression ähnlich wie bei Cathepsin X erkennbar (Abb. E.2, Grafik H).

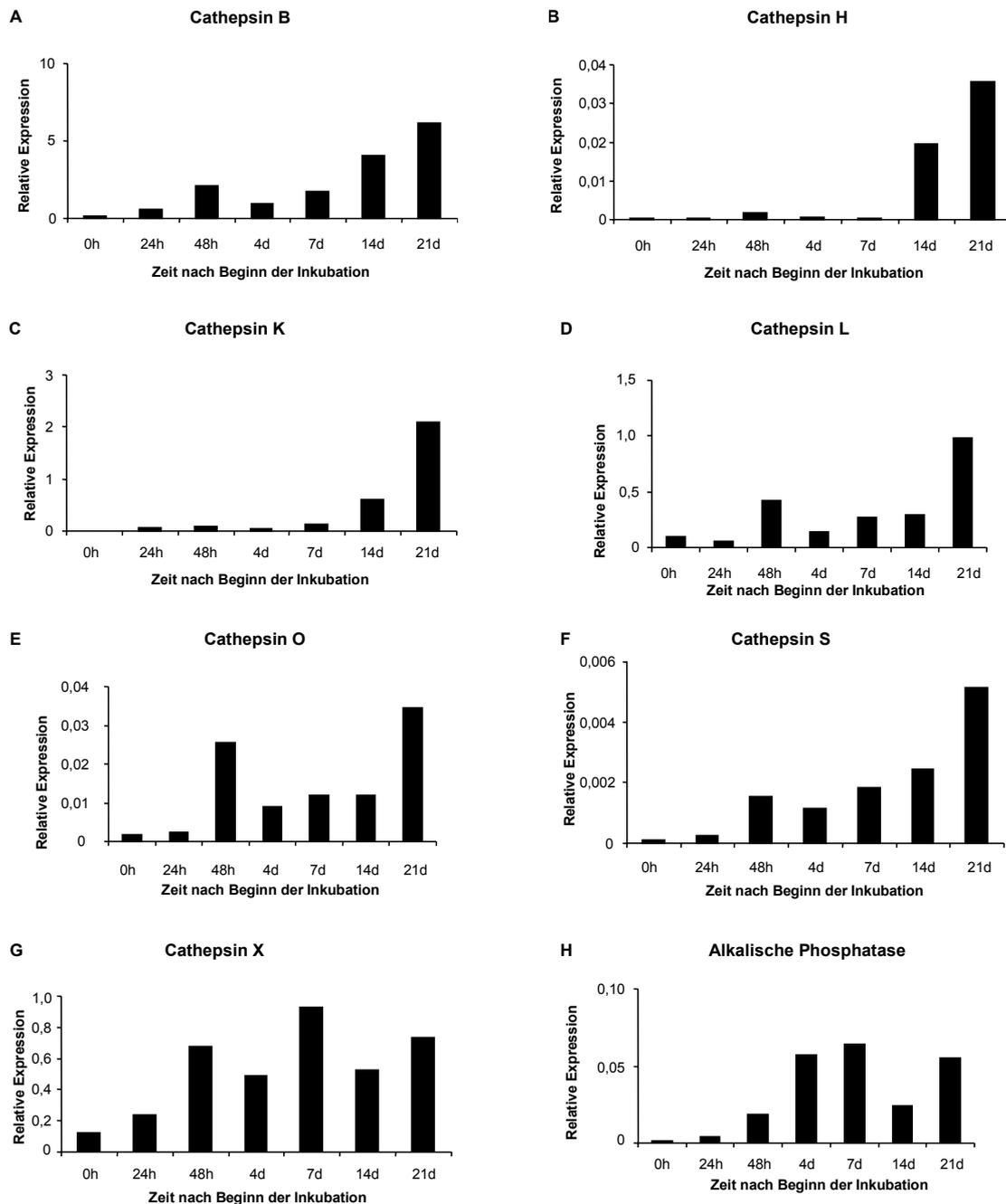


Abb. E.2 Nachweis der Expression von Cathepsinen in hMSC nach Inkubation mit osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage.

Jeweils angegeben sind die relativen Kopienzahlen nach qRT-PCR und die Werte sind normiert auf das *housekeeping*-Gen GAPDH.

A-G: Expression der Cathepsine B, H, K, L, O, S und X

H: Expression der alkalischen Phosphatase

E.2 Stimulation der hMSC mit Vitronektin

Durch Stimulation mit den EZM-Proteinen Vitronektin und Kollagen I differenzieren hMSC zu Osteoblasten (Salaszyk et al. 2004a). Inwieweit die Expression lysosomaler Cysteinproteasen durch Stimulation der hMSC mit Vitronektin beeinflusst wird, ist nicht geklärt. Um den Einfluss von Vitronektin auf die Expression und Freisetzung lysosomaler Cysteinproteasen in hMSC zu erfassen, wurden die Zellen 7, 14 und 21 Tage mit Vitronektin stimuliert. Nach jeweils 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und im Vergleich zu unstimulierten hMSC hinsichtlich Expression (qRT-PCR) und Sekretion (ELISA) verschiedener Cysteinproteasen untersucht. Die Morphologie der Zellen wurde nach 21 Tagen dokumentiert. (Pro)Cathepsin X wurde in unstimulierten hMSC im Vergleich zu Vitronektin stimulierten hMSC nach 21 Tagen mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz visualisiert.

E.2.1 Morphologische Unterschiede der hMSC nach Vitronektinstimulation

Morphologisch unterscheiden sich stimulierte von unstimulierten hMSC nach 21 Tagen v.a. durch längere Osteoblasten-ähnliche Zellkörper und vermehrte Bildung perinukleärer Granula bzw. Vakuolen-ähnlicher Strukturen (Abb. E 3 A, B).

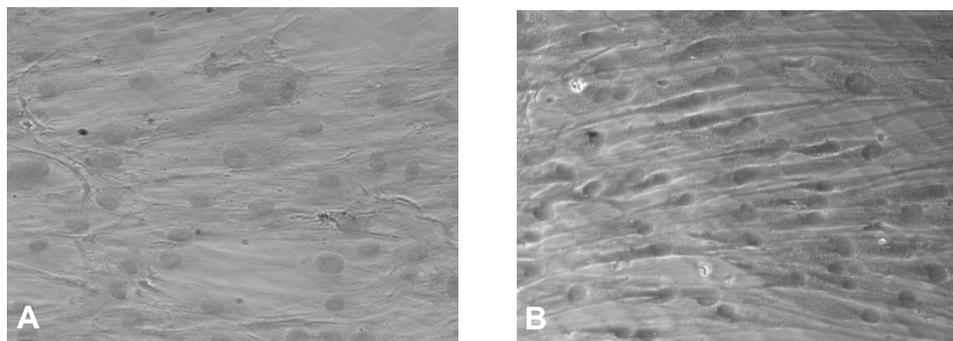


Abb. E.3 Morphologie der mit Vitronektin stimulierten und unstimulierten hMSC.

A: Unstimulierte hMSC nach 21 Tagen

B: hMSC nach Stimulation mit Vitronektin zeigen nach 21 Tagen längere Osteoblasten-ähnliche Zellkörper mit perinukleär granulaartigen bzw. Vakuolen-ähnlichen Veränderungen

E.2.2 Quantitativer Nachweis lysosomaler Cysteinproteasen durch qRT-PCR

Die Expression lysosomaler Cysteinproteasen nach Stimulation mit Vitronektin im Vergleich zu unstimulierten hMSC wurde mit der quantitativen RT-PCR untersucht. Eine durch Vitronektin signifikant erhöhte Expression konnte für die Cathepsine B, C, F, H, K, O und S (Abb. E.4, Grafen A, B, C, D, E und G) nachgewiesen werden. Überraschend war dabei die Expressionserhöhung von Cathepsin K (Abb. E.4, Grafik E), da dieses Cathepsin eigentlich osteoklastenspezifisch ist (Drake et al 1996). Die Cathepsine V und W konnten nicht detektiert werden. Es zeigt sich auch eine Expressionszunahme durch Stimulation mit Vitronektin bei Cathepsin L, diese Induktion ist jedoch nicht signifikant (Abb. E.4, Grafik F).

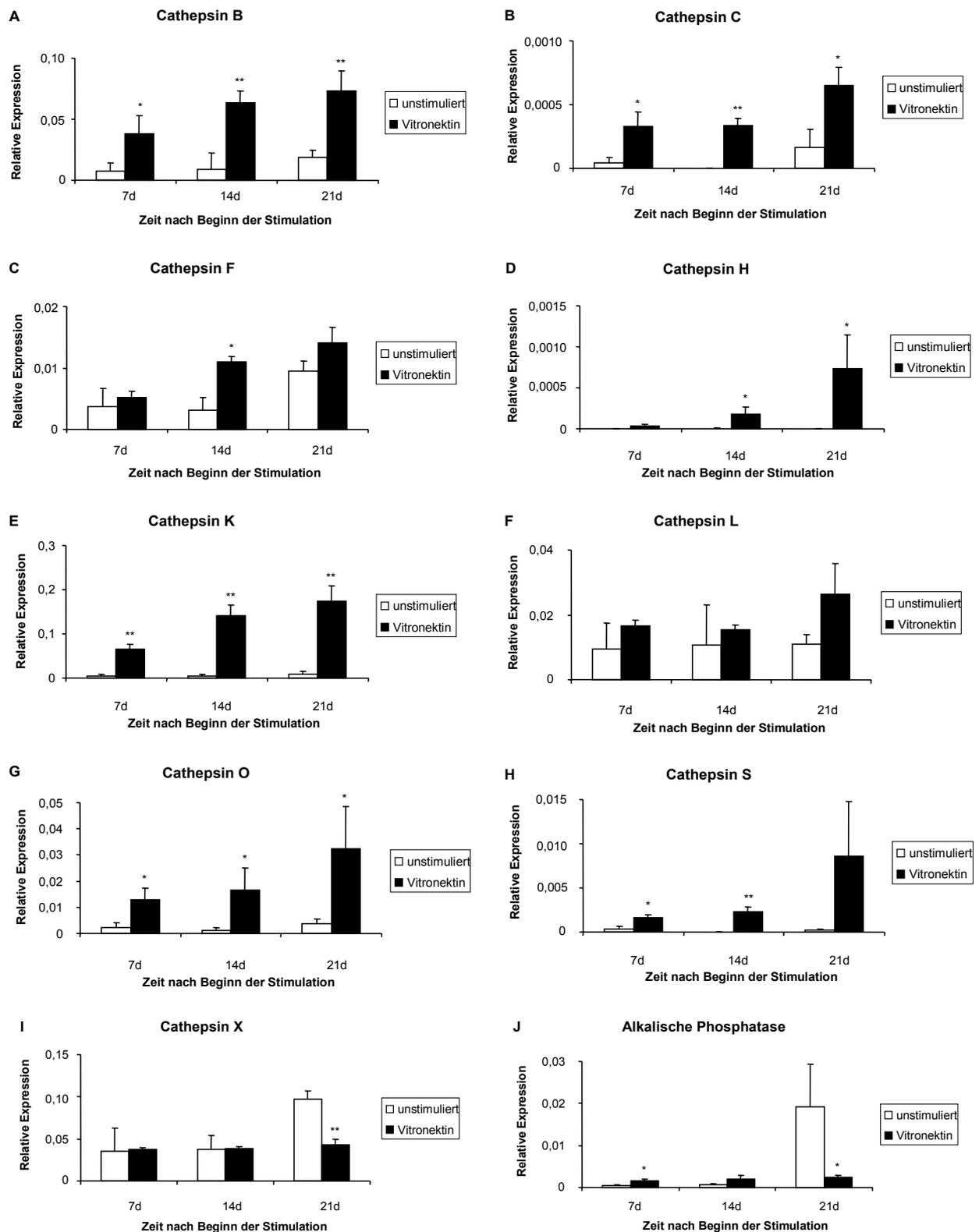


Abb. E.4 Nachweis der Expression von Cathepsinen in hMSC nach Stimulation mit Vitronektin über 21 Tage. Jeweils angegeben sind die relativen Kopienzahlen nach qRT-PCR und die Werte sind normiert auf das *housekeeping*-Gen GAPDH. Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A-I: Expression der Cathepsine B, C, F, H, K, L, O, S und X

J: Expression der alkalischen Phosphatase

Die Expression von Cathepsin X wird, wie auch im osteogenen Differenzierungsversuch (vgl. Abb. E.2), kaum durch Vitronektin beeinflusst. Das Expressionsmuster der stimulierten im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ist nach 7 Tagen und 14 Tagen weitestgehend identisch. Nach 21 Tagen ist eine signifikante Reduktion der Expression durch Vitronektin erkennbar. Die Stimulation der hMSC mit Vitronektin bewirkt somit keine Expressionsinduktion von Cathepsin X (Abb. E.4, Grafik I). Die Expression der alkalischen Phosphatase als Marker der osteogenen Differenzierung ist durch Vitronektinstimulation nach 7 Tagen signifikant erhöht, nach 21 Tagen zeigt sich ein gegenteiliges Ergebnis (Abb. E.4, Grafik J).

Nach einer Inkubationszeit von 21 Tagen ist Cathepsin K im Vergleich zu Cathepsin B, L und X am höchsten exprimiert (Abb. E.5).

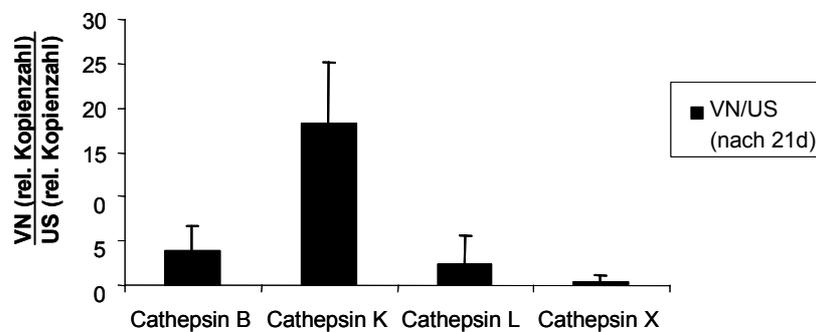


Abb. E.5 Vergleich der quantitativen Expressionsinduktion einzelner Cathepsine.

Angegeben sind die relativen Kopienzahlen nach 21 Tagen Vitronektinstimulation (VN), verglichen mit den entsprechenden unstimulierten Kontrollen (US). Die Ergebnisse sind MW+SD.

Somit ist ein divergierender Einfluss von Vitronektin auf die Expression der in hMSC nachweisbaren Cathepsine erkennbar. Auswirkungen der Vitronektinstimulation auf die Freisetzung einzelner Cathepsine werden im Folgenden anhand der ELISA-Daten dargestellt.

E.2.3 Quantitativer Nachweis der Cathepsine B, K, L und X mittels ELISA

Um den Einfluss von Vitronektin auf lysosomale Cysteinproteasen genauer beschreiben zu können, wurden die verschiedenen Detektionsmuster auf Proteinebene mittels ELISA für die (Pro)Cathepsine B, K, L und X analysiert.

Der ELISA für (Pro)Cathepsin B detektiert in den Zelllysaten (Pro)Cathepsin B nur in geringen Mengen, und es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bei den stimulierten im Vergleich zu den unstimulierten hMSC (Abb. E.6, Grafik A). Im Zellkulturüberstand der stimulierten Proben ist jedoch ein signifikant erhöhter Nachweis von (Pro)Cathepsin B im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen erkennbar (Abb. E.6, Grafik B). Dies spricht für eine erhöhte Sekretion von (Pro)Cathepsin B nach Stimulation mit Vitronektin.

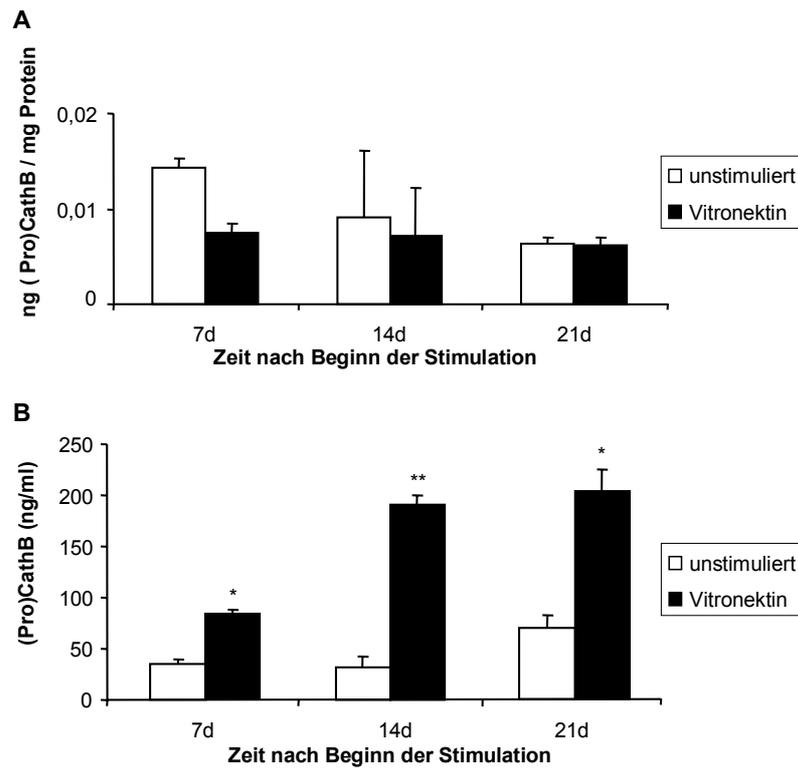


Abb. E.6 (Pro)Cathepsin B nach Stimulation mit Vitronectin.

Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A: Lysate

B: Überstände

Ein ähnliches Ergebnis lässt der (Pro)Cathepsin X-ELISA erkennen. In den Lysaten der mit Vitronectin stimulierten Proben ist eine deutliche Reduktion von (Pro)Cathepsin X zu beobachten (Abb. E.7, Grafik A).

Die Überstände der mit Vitronectin stimulierten Proben dagegen zeigen einen signifikant erhöhten Nachweis von (Pro)Cathepsin X (Abb. E.7, Grafik B). Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für eine Sekretionszunahme von (Pro)Cathepsin X durch Vitronectinstimulation.

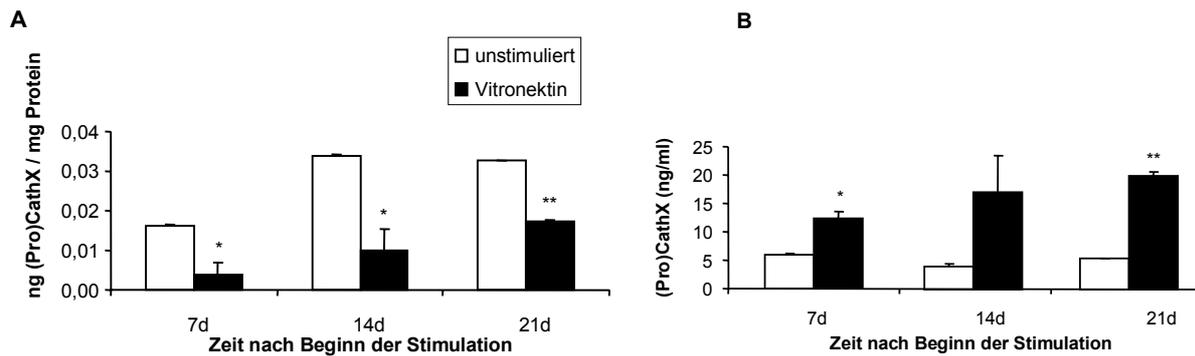


Abb. E.7 (Pro)Cathepsin X nach Stimulation mit Vitronectin.

Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A: Lysate

B: Überstände

Zur Quantifizierung der Cathepsine K und L wurden ebenfalls ELISAs durchgeführt. Beim (Pro)-Cathepsin K bzw. (Pro)Cathepsin L lagen jedoch alle Werte unter dem kleinsten Wert der Standardkurve (Daten nicht gezeigt).

E.2.4 Detektion von intrazellulärem (Pro)Cathepsin X

Intrazelluläres (Pro)Cathepsin X wurde mittels Immunfluoreszenz in unstimulierten und mit Vitronectin stimulierten hMSC nach 21 Tagen detektiert. Unterschiede in den Detektionsmustern sind hier nicht zu erkennen (Abb. E.8).

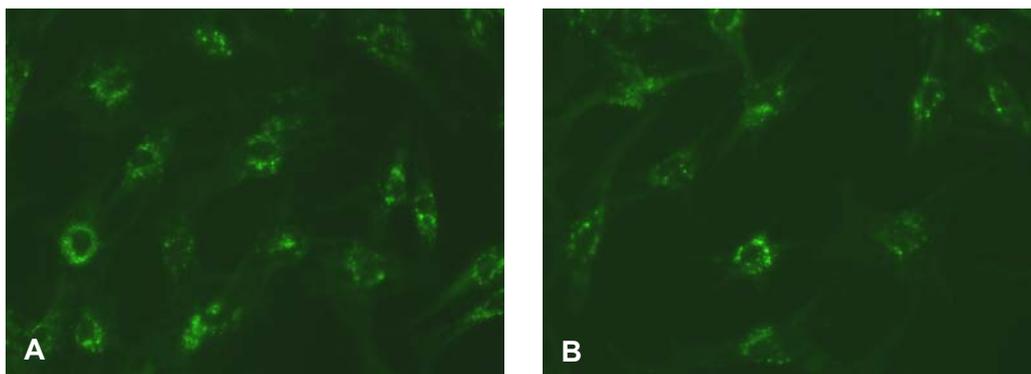


Abb. E.8 Detektion von intrazellulärem (Pro)Cathepsin X mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die Detektion erfolgte mit einem primären Antikörpern gegen humanes (Pro)Cathepsin X und nachfolgender Inkubation mit einem zweiten gelabelten Antikörper gegen den primären Antikörper (Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)).

A: Detektion von intrazellulärem (Pro)Cathepsin X in unstimulierten hMSC

B: Detektion von intrazellulärem (Pro)Cathepsin X in hMSC stimuliert mit Vitronectin

E.3 Stimulation der hMSC mit Kollagen I und Laminin

Ob Vitronectin im Vergleich mit weiteren EZM-Proteinen eine besondere Rolle in der Regulation des (Pro)Cathepsin X auf Proteinebene zukommt, sollte durch Stimulationen der hMSC mit Kollagen I bzw. Laminin evaluiert werden.

Nach Stimulation der hMSC mit Kollagen I zeigt sich bei den Lysaten der hMSC kein relevanter Effekt (Abb. E.9, Grafik A). In den Überständen der Proben ist nach Stimulation der hMSC nach 7 Tagen ein reduzierter Nachweis von (Pro)Cathepsin X im Vergleich zu den unstimulierten Proben erkennbar. Nach 14 und 21 Tagen ist kein signifikanter Einfluss auf die lysosomale Cysteinprotease nachweisbar (Abb. E.9, Grafik B).

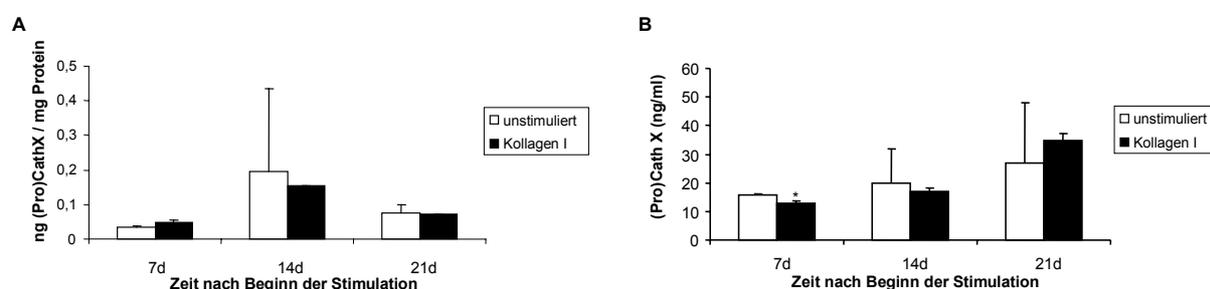


Abb. E.9 (Pro)Cathepsin X nach Stimulation mit Kollagen I:
Die Ergebnisse sind MW + SD eines Duplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$.
A: Lysate
B: Überstände

Auch nach Stimulation der hMSC mit dem EZM-Protein Laminin ist kein Einfluss auf (Pro)Cathepsin X in den Lysaten und Überständen zu beobachten (Abb. E.10).

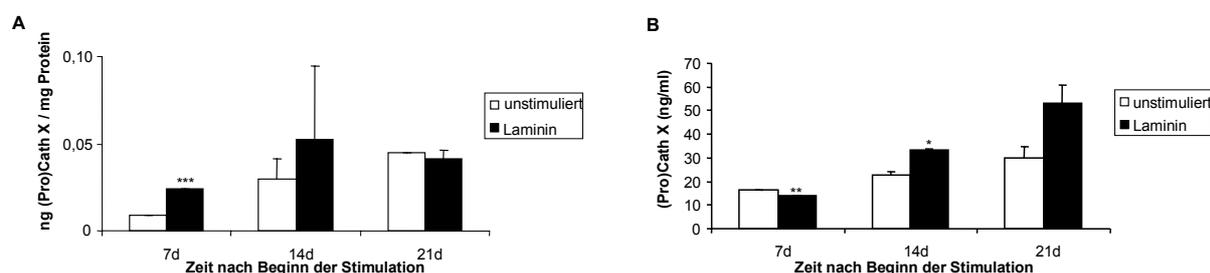


Abb. E.10 (Pro)Cathepsin X nach Stimulation mit Laminin.
Die Ergebnisse sind MW + SD eines Duplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.
A: Lysate
B: Überstände

E.4 Untersuchung zur Integrin-abhängigen Bindung von hMSC an EZM-Proteine und Procathepsin X

Um einen möglichen Mechanismus der Wirkungsweise von EZM-Proteinen bzw. von Proteasen auf Zellen aufzuzeigen, ist die Identifizierung potentieller Bindungspartner sinnvoll. Der Frage, ob hMSC in der Lage sind, an bestimmte EZM-Proteine und auch an die lysosomale Cysteinprotease Procathepsin X zu binden, sollte ebenso nachgegangen werden, wie der Frage nach den Mechanismen einer Bindung.

Zunächst wurde die optimale Zellzahl für diese Versuchsreihe in einem Vorversuch ermittelt. Hierzu wurden unterschiedliche Zellanzahlen auf Vitronektin ausgesät und die Adhäsionsfähigkeit der hMSC durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) ermittelt. Als Kontrollen dienten zum einen die Aussaat der hMSC auf Vitronektin, nachdem die Zellen mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper LM609 präinkubiert wurden, und zum anderen die Aussaat der hMSC auf BSA. Wie Abb. E.11 zeigt, ist es sinnvoll mit einer Zellzahl von mindestens 4×10^4 Zellen pro Kavität zu arbeiten.

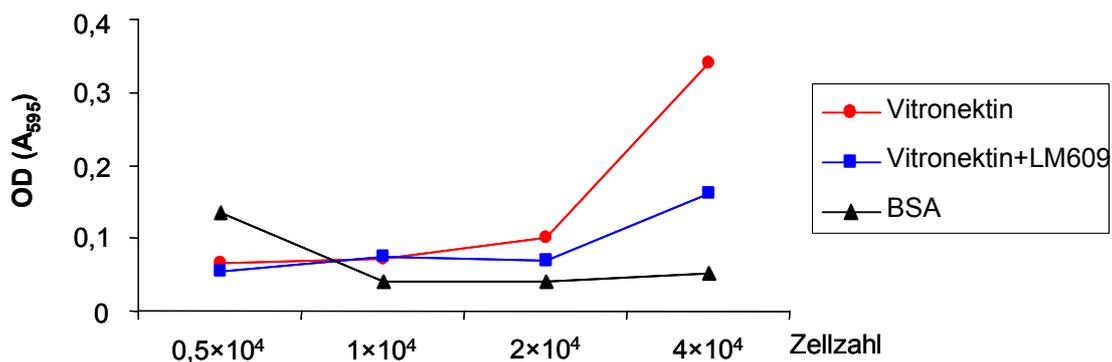


Abb. E.11 Bestimmung der optimalen Zellzahl für Zelladhäsionsassay.
Mindestens 4×10^4 Zellen pro Kavität sollten ausgesät werden.

E.4.1 Bindung der hMSC an Vitronektin und an andere EZM-Proteine

Die wichtigsten Bestandteile der EZM sind neben Polysacchariden die Proteine Vitronektin, Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV und Laminin. Die EZM und deren Komponenten, die intrazellulär gebildet werden und nach Sezernierung interzellulär vorliegen, scheinen eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie der Adhäsion und Migration zu spielen.

Für den folgenden Versuch wurden 96-Kavitätenplatten mit verschiedenen EZM-Proteinen beschichtet und die hMSC mit einer Zellzahl von 4×10^5 Zellen pro Kavität ausgesät. Nach Inkubation der Zellen, mehreren Waschgängen und Färbung mit Kristallviolett ist erkennbar, dass hMSC im Vergleich zur Negativkontrolle BSA (unspezifische Bindung) an Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV, Laminin und Vitronektin adhären (Abb. E.12).

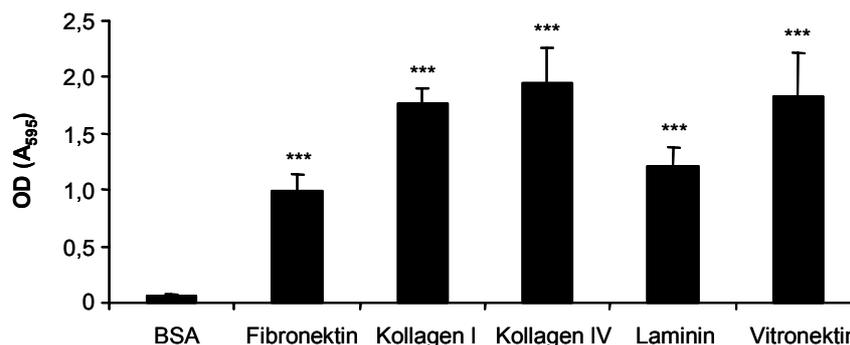


Abb. E.12 Bindungsfähigkeit der hMSC an Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV, Laminin und Vitronectin.

Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes. ***p < 0,001.

E.4.2 RGD-abhängige Bindung der hMSC an Vitronectin über das Integrin $\alpha_v\beta_3$

Vitronectin bindet an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ einer Zelle über sein RGD-Motiv (Arginin–Glycin–Aspartat) (Wang et al. 2004; Xiong et al. 2002). Ob dieser Bindungsmechanismus auch bei hMSC nachweisbar ist, wurde im Folgenden genauer untersucht. Dazu wurde eine 96-Kavitätenplatte mit Vitronectin beschichtet und die hMSC mit einer Zellzahl von 4×10^5 Zellen pro Kavität jeweils unbehandelt sowie präinkubiert mit Procathepsin X und den zyklischen RGD-Peptiden bzw. RAD-Peptiden ausgesät. Das zyklische RGD-Peptid bindet an RGD-abhängige Integrine d.h. es blockiert durch Präinkubation der Zellen und nachfolgender Aussaat eine Adhäsion bzw. imitiert durch eine Beschichtung der Platte mit zyklischen RGD-Peptiden eine Bindung. Als Kontrolle diente das zyklische RAD-Peptid, dessen Motiv durch den Austausch von Glyzin durch Alanin von RGD-abhängigen Integrinen nicht erkannt werden kann.

Präinkubation mit den zyklischen RAD- bzw. RGD-Peptiden zeigt nach RGD-Peptid-Präinkubation eine deutlich verminderte Adhäsion der hMSC (Abb. E.13, Grafik A). Zwar tritt auch eine verminderte Adhäsion nach RAD-Präinkubation auf, jedoch ist hier die Affinität des RGD-Peptides im Vergleich dazu eindeutig höher, d.h. das RGD-Peptid wirkt spezifischer als das RAD-Peptid bei gleicher Konzentration. Dies lässt darauf schließen, dass ein RGD-abhängiger Vitronectinrezeptor auf der Oberfläche der hMSC vorhanden ist. Eine verminderte Adhäsion der Zellen an Vitronectin, nachdem diese mit Procathepsin X inkubiert wurden, zeigt eine ähnlich reduzierte Bindung wie nach RAD-Präinkubation.

Ob diese Bindung der hMSC abhängig ist von der Existenz des Integrins $\alpha_v\beta_3$, wurde mit Hilfe eines Integrinantikörpers, dem sog. LM609, untersucht. Durch Präinkubation der hMSC mit diesem Antikörper wird eine Adhäsion an Vitronectin (VN) signifikant reduziert (Abb. E.13, Grafik B).

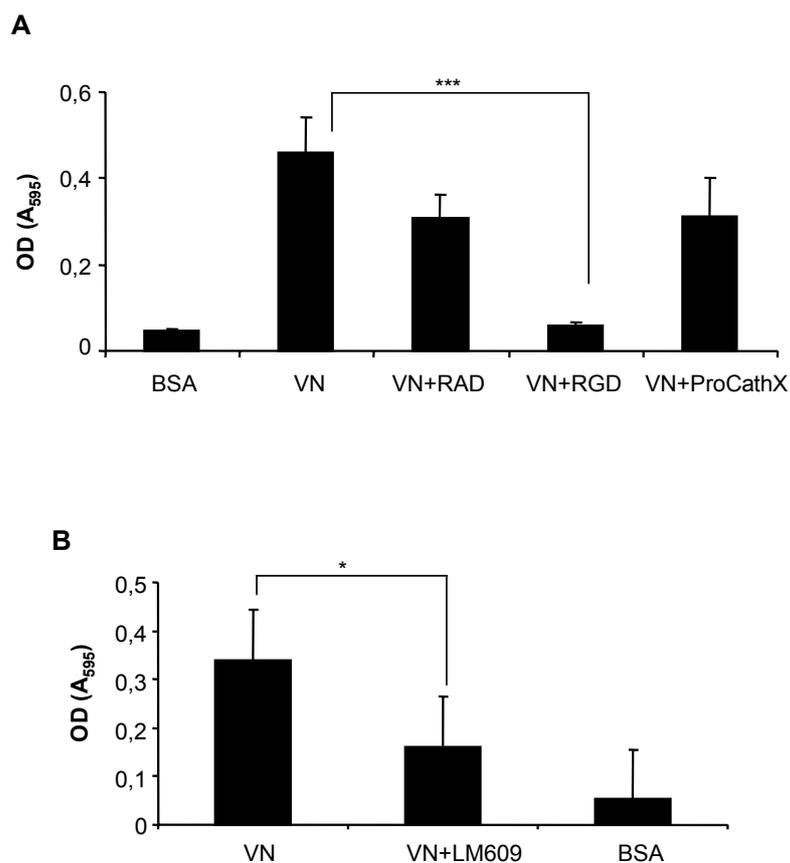


Abb. E.13 Bindungsfähigkeit der hMSC an Vitronectin.

Die Ergebnisse sind MW + SD eines vierfachen Ansatzes. *p < 0,05, ***p < 0,001.

A: Bindung in Abhängigkeit des RGD-Bindungsmotives

B: Bindung in Abhängigkeit des Integrins $\alpha_v\beta_3$

E.4.3 RGD-abhängige Bindung der hMSC an Procathepsin X über das Integrin $\alpha_v\beta_3$

Wie bereits bekannt, enthält das Procathepsin X in seiner Pro-Region eine RGD-Domäne (Arg-Gly-Asp) vergleichbar mit der des Vitronectin (Nägler et al. 1998). Ob und durch welche Mechanismen eine Bindung der hMSC an die lysosomale Cysteinprotease wie dem (Pro)Cathepsin X erfolgt, wurde durch folgende Zelladhäsionsversuche untersucht.

Durch Beschichtung der Platten mit Vitronectin, Procathepsin X, Cathepsin X und zwei seiner Mutanten AAA-Cathepsin X und RAD-Cathepsin X, bei welcher die RGD-Sequenz durch die AAA- bzw. RAD-Sequenz ausgetauscht wurde, sollte nach Aussaat der hMSC die Bindungsfähigkeit der hMSC an die eben genannten Komponenten erfasst werden. Die Bindung an Vitronectin dient hier als Positivkontrolle und die Bindung an BSA als Negativkontrolle.

Die Adhäsion der hMSC ist sowohl an Cathepsin X als auch an die Cathepsin X-Mutanten AAA-Cathepsin X und RAD-Cathepsin X, im Vergleich zur Bindung an die Pro-Form der Protease (ProCathX), signifikant reduziert (Abb. E.14). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die RGD-Sequenz der Pro-Region des Cathepsin X für die Adhäsion der hMSC an die Protease wichtig ist.

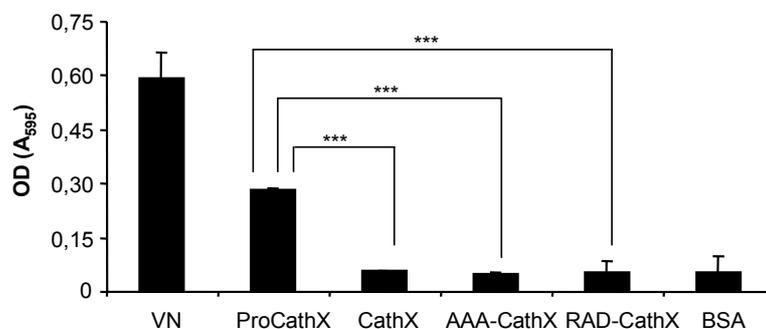


Abb. E.14 Bindungsfähigkeit der hMSC an Procathepsin X.

Vitronektin (VN) dient hier als Positivkontrolle und BSA dient als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind MW + SD eines vierfachen Ansatzes. ***p < 0,001.

Ein weiterer Versuch soll die Bedeutung der RGD-Sequenz bei der Bindung der hMSC an Procathepsin X untermauern und aufklären, inwieweit das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bei der Adhäsion der hMSC an Procathepsin X beteiligt ist. Dazu wurde erneut eine Platte mit Procathepsin X beschichtet und hMSC jeweils unbehandelt ausgesät bzw. präinkubiert mit den zyklischen RAD-Peptiden und RGD-Peptiden sowie mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper (LM609) ausgesät (Abb. E.15).

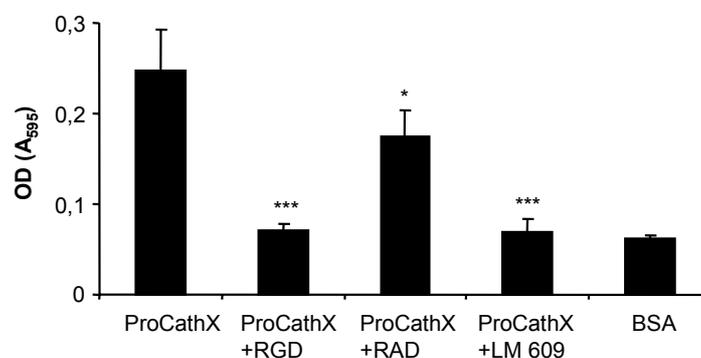


Abb. E.15 Bindungsfähigkeit der hMSC an Procathepsin X in Abhängigkeit von der RGD-Bindungsdomäne und dem Integrin $\alpha_v\beta_3$.

Die Ergebnisse sind MW + SD eines vierfachen Ansatzes. *p < 0,05, ***p < 0,001.

Die Ergebnisse aus den Abb. E.14 und E.15 sprechen dafür, dass das RGD-Motiv für die Bindung der Zelle an die Protease ausschlaggebend ist. Nach Präinkubation mit den zyklischen RGD-Peptiden werden die RGD-Bindungsstellen der Zelle bereits besetzt und nach Aussaat der Zellen auf Procathepsin X ist eine adäquate Adhäsion nicht mehr möglich. Die Bindungsfähigkeit ist vielmehr signifikant reduziert. Im Vergleich dazu ist die Adhäsion an Procathepsin X nach Präinkubation mit den zyklischen RAD-Peptiden nur gering reduziert.

Nach der Präinkubation der hMSC mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper (LM609) ist eine deutlich verminderte Bindung der Zellen an Procathepsin X nachweisbar. Somit ist eine Beteiligung des Integrins $\alpha_v\beta_3$ an der Interaktion der hMSC mit der lysosomalen Protease anzunehmen.

Um einen weiteren Hinweis für diese Hypothese zu erhalten, wurden hMSC vor Aussaat auf eine mit Procathepsin X beschichtete Platte mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper (LM609) bzw. dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ -Antikörper (MAB1969) präinkubiert. Als Kontrolle wurden hMSC unbehandelt auf die mit Procathepsin X beschichteten Platte ausgesät. Wie Abb. E.16 zeigt, ist erneut eine reduzierte Adhäsion der hMSC nach Präinkubation mit dem $\alpha_v\beta_3$ -AK (LM609) nachweisbar. Nach Präinkubation mit dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ -Antikörper (MAB1969) ist jedoch keine verminderte Bindungsfähigkeit der hMSC an Procathepsin X zu erkennen.

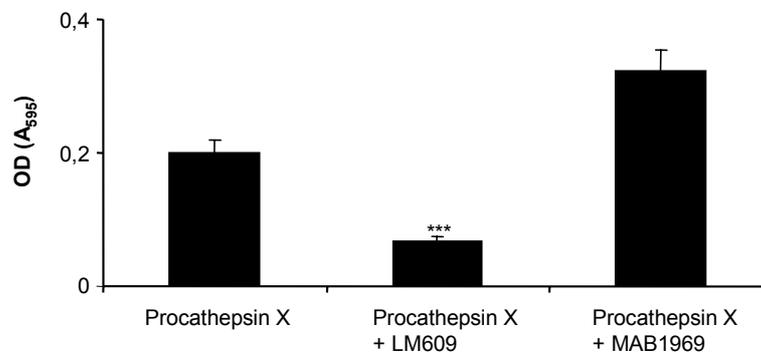


Abb. E.16 Bindungsfähigkeit der hMSC an Procathepsin X in Abhängigkeit von Integrin $\alpha_v\beta_3$.
Die Ergebnisse sind MW + SD eines vierfachen Ansatzes. ***p < 0,001.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass hMSC an Procathepsin X binden, diese Bindung RGD-abhängig ist und das Integrin $\alpha_v\beta_3$ an dieser Interaktion beteiligt ist.

E.5 Integrin-vermittelte Signaltransduktion der hMSC nach Stimulation mit Vitronektin- bzw. Procathepsin X

Die extrazelluläre Matrix dient nicht nur der Stabilität, sondern übt auch eine regulative Funktion aus (Jadlowiec et al. 2004). Die im Ergebnisteil bereits gezeigten Daten demonstrierten, dass (Pro)-Cathepsin X nach Stimulation mit Vitronektin von den hMSC sezerniert wird und dass Procathepsin X an den Vitronektinrezeptor (Integrin $\alpha_v\beta_3$) der hMSC binden kann. Somit war es naheliegend zu überprüfen, ob Procathepsin X Signalkaskaden durch extrazelluläre Bindung an die hMSC induziert. Hierzu wurden Signaltransduktionswege nach -Stimulation der hMSC mit Vitronektin bzw. Procathepsin X identifiziert. Um aktivierte oder deaktivierte Signalwege nachzuweisen, wurden hMSC mit Vitronektin bzw. Procathepsin X behandelt sowie mit Inhibitoren wie U0126 [MEK 1/2 Inhibitor; inhibiert den ERK- (Extrazelluläre-Rezeptor-Kinase-) Signalweg] bzw. Wortmannin [PI3K-Inhibitor = Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor; inhibiert den PI3K/AKT-Signalweg] zusätzlich inkubiert.

Abbildung E.17 zeigt zum vereinfachten Verständnis eine schematische Darstellung der Signaltransduktionswege, die im folgenden Versuch mittels eines Antikörper Cocktails im Immunoblot (Western Blot Cocktail II) untersucht wurden. Der Nachweis phosphorylierter und damit aktivierter Signalproteine wurde mit dem Multiplex Western Blot Cocktail II und I durchgeführt.

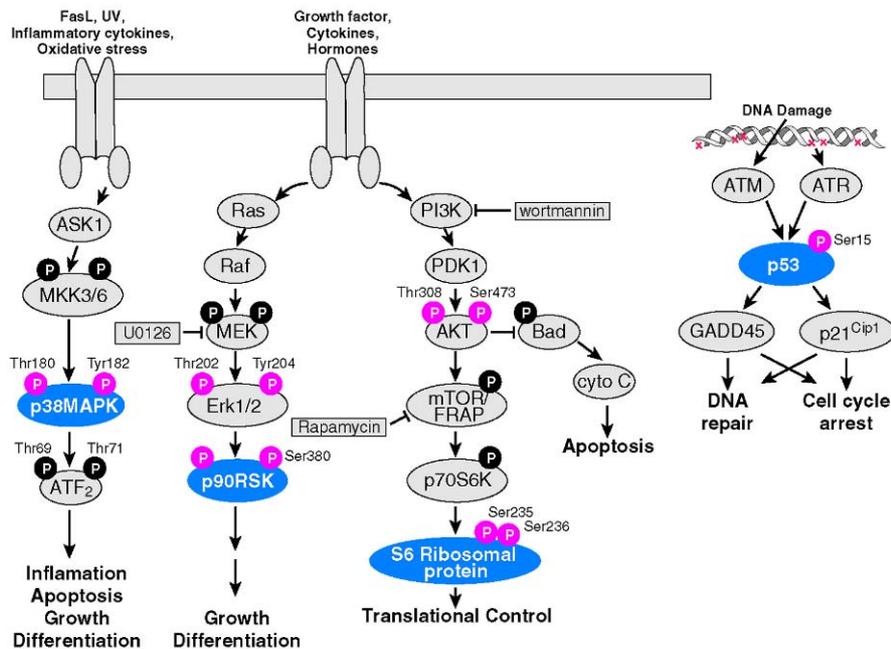


Abb. E.17 Schematische Darstellung der untersuchten Signaltransduktionswege
 (Abbildung des Multiplex Western Blot Cocktails II von Cell Signaling Technology Inc., USA:
www.cellsignal.com/products/7110.html)

In einem ersten Versuch ist zu sehen, dass bei den mit Vitronektin stimulierten hMSC das *S6-Ribosomale Protein*, die *p90RSK* (p90 ribosomale S6 Kinase) und die *p38-MAPK* (p38 Mitogenaktivierte Protein-Kinase) verstärkt in phosphorylierter und damit aktivierter Form vorliegen (Abb. E.18). Dies sind Hinweise darauf, dass Vitronektin die Translation via *S6-Ribosomalem Protein* beeinflussen kann, via *p90RSK* (Kinase aus dem *ERK*-Signalweg) eine Beteiligung bei Wachstum und Differenzierung aufweist und via *p38-MAPK* möglicherweise Einfluss auf Inflammation, Wachstum, Differenzierung und/oder Apoptose nimmt.

Stimulation der hMSC mit PMA (Phorbol 12-Myristate-13-Acetate; bindet und aktiviert Proteinkinase C) aktiviert mehrere Signalwege gleichzeitig. Dies ermöglicht einen besseren Nachweis der Wirksamkeit der Inhibitoren. Dieser Versuch zeigt, dass der verwendete Inhibitor Wortmannin (PI3Kinase-Inhibitor), im Vergleich zur PMA-Positivkontrolle, das *Phospho-S6-Ribosomale Protein* nur gering inaktiviert. Durch den MEK 1/2 Inhibitor U0126 ist die *Phospho-p90RSK* und auch die *Phospho-p38 MAPK* vermindert nachweisbar (Abb. E.18).

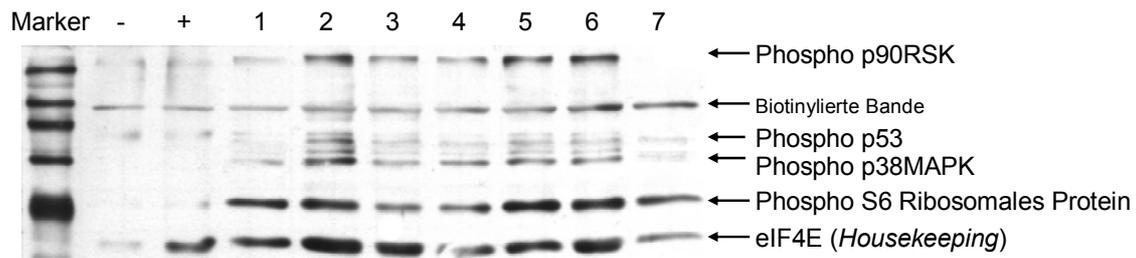


Abb. E.18 Immunoblot von Zelllysaten der hMSC nach Vitronektinstimulation.
 Marker (aus dem Multiplex Western Blot Cocktail II-Kit), (-) Negativkontrolle, (+) Positivkontrolle (ebenfalls enthalten im Kit), 1=unstimulierte hMSC, 2=mit PMA-stimulierte, 3=PMA-stimuliert und Inhibitor Wortmannin, 4=PMA-stimuliert und Inhibitor U0126, 5=mit Vitronektin stimulierte, 6=Vitronektin-stimuliert und Inhibitor Wortmannin, 7=Vitronektin-stimuliert und Inhibitor Wortmannin.

Im nächsten Versuch wurden die hMSC u.a. auch mit Procathepsin X stimuliert (D.19). Bei unstimulierten hMSC sind das *Phospho-p53* und das *Phospho-S6-Ribosomale Protein* detektierbar. Die Phosphorylierung dieser beiden Proteine wird sowohl nach Stimulation mit Vitronketin als auch mit Procathepsin X induziert. Die Bande des *Phospho-S6-Ribosomalen Proteins* ist nach Stimulation mit dem Inhibitor Wortmannin vermindert sichtbar. Im Vergleich zu den unstimulierten hMSC ist die *Phospho-p90RSK* sowohl nach Inkubation mit Vitronektin als auch mit Procathepsin X vermehrt detektierbar. Nach Einsatz des Inhibitors U0126 ist die phosphorylierte Form dieser Kinase vermindert nachweisbar.

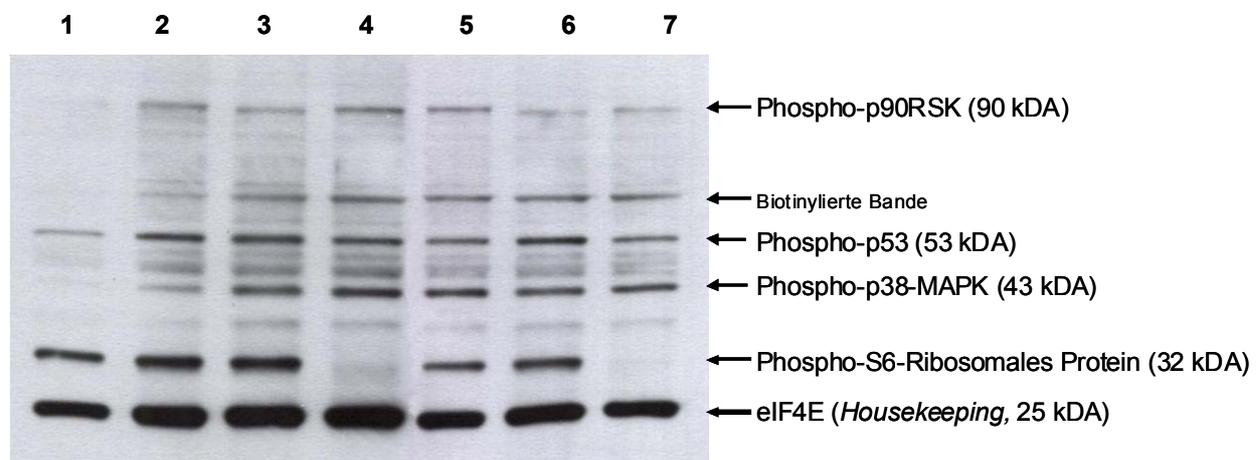


Abb. E.19 Immunoblot von Zelllysaten der hMSC nach Stimulation mit Vitronektin bzw. Procathepsin X. 1=unstimulierte hMSC, 2=mit Vitronektin stimulierte, 3= Vitronektin-stimuliert und Inhibitor U0126, 4= Vitronektin-stimuliert und Inhibitor Wortmannin, 5=mit Procathepsin X stimuliert, 6=Procathepsin X-stimuliert und Inhibitor U0126, 7=Procathepsin X-stimuliert und Inhibitor Wortmannin.

Die Detektion mittels des Multiplex Western Blot Cocktail II zeigt somit eine Aktivierung des *ERK*-Signalweges nach Stimulation mit Procathepsin X. Um diese Aussage zu verifizieren, wurde ein weiterer Versuch mit einem anderen Antikörper Cocktail (Western Blot Cocktail I) durchgeführt, der auf eine Detektion des *ERK*- sowie des *AKT*-Signalweges beschränkt ist (Abb. E.20).

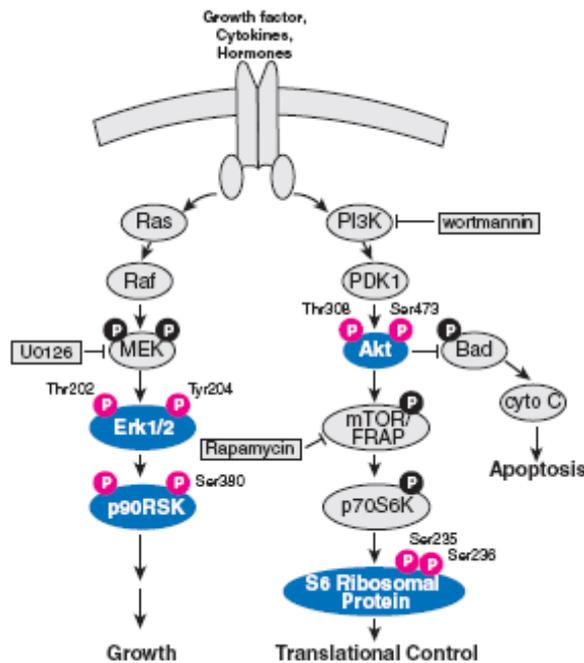


Abb. E.20 Schematische Darstellung der untersuchten Signaltransduktionswege.
 (Abbildung des Multiplex Western Blot Cocktails I von Cell Signaling Technology Inc., USA:
www.cellsignal.com/products/7100.html)

Im Multiplex Western Blot Cocktail I konnte nicht wie im Cocktail II das *Phospho-p90RSK* detektiert werden. In der folgenden Versuchsanordnung (Abb. E.21) wurde das *Phospho-S6-Ribosomale Protein* wie im Cocktail II auf ähnliche Weise detektiert. Sowohl nach Stimulation mit Vitronektin als mit nach Procathepsin X ist eine Induktion des *Phospho-ERK 1/2*-Signalweges erkennbar. Eine Reduktion dieses *Phospho-ERK 1/2*-Signalweges ist hingegen nach Einsatz des Inhibitors U0126 ersichtlich. Interessanterweise ist eine Aktivierung des AKT-Signalweges nach Procathepsin X-Stimulation nur in Anwesenheit des Inhibitors U0126 erkennbar.

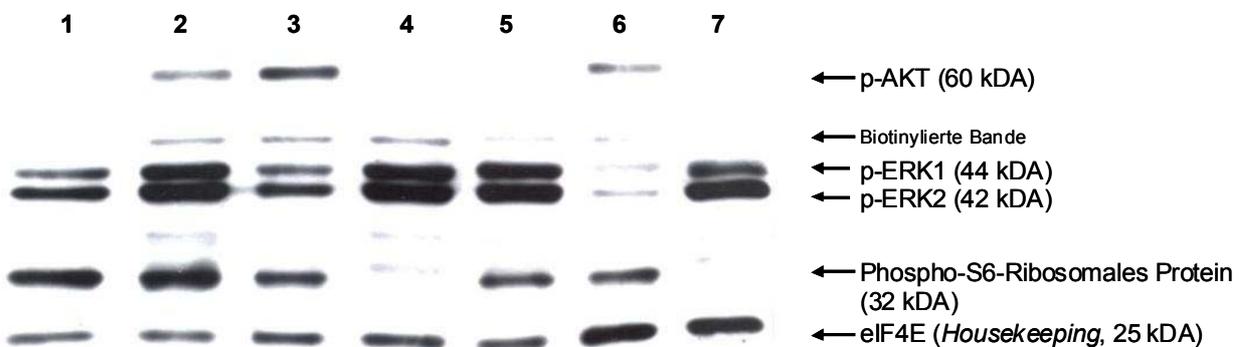


Abb. E.21 Immunoblot nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin bzw. Procathepsin X.
 1=unstimulierte hMSC, 2=Vitronektin-stimuliert, 3= Vitronektin-stimuliert und Inhibitor U0126,
 4= Vitronektin-stimuliert und Inhibitor Wortmannin, 5=Procathepsin X-stimuliert, 6=Procathepsin
 X-stimuliert und Inhibitor U0126, 7=Procathepsin X-stimuliert und Inhibitor Wortmannin.

E.6 Niederregulation von Cathepsin X in hMSC

E.6.1 Transfektion von hMSC

Um eine selektive Niederregulation von Cathepsin X zu erzielen, wurde mit der siRNA-Technologie gearbeitet. Durch RNA-Interferenz (RNAi) werden mRNA-Transkripte Sequenz-spezifisch abgebaut. Dazu bindet die siRNA an eine komplementäre Sequenz, wodurch die RNA doppelsträngig vorliegt und aufgrund dieser unphysiologischen Form abgebaut wird. Somit werden ausgewählte Signale der Gene ausgeschaltet, ohne direkt auf das Genom einzuwirken.

In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) wurden verschiedene Transfektionsreagenzien getestet und es zeigte sich, dass für hMSC das *Lipofectamin 2000* am effizientesten ist. Bei dieser Lipid-basierenden Transfektion wird die siRNA durch *Lipofectamin 2000* lipophiler gemacht und befähigt, Zellmembranen zu durchwandern.

E.6.2 Niederregulation von Cathepsin X

Mittels einer Transfektionszeitkinetik wurde der optimale Zeitpunkt identifiziert, zu dem der größte Anteil der Cathepsin X-mRNA herunterreguliert ist. Zur Niederregulation wurde eine Cathepsin X-spezifische siRNA (*CathXsi913*) verwendet. Als Negativkontrollen dienten eine unspezifische siRNA sowie eine "mismatch"-Kontrolle (*CathXsiMismatch*), bei der im Vergleich zur Cathepsin X-spezifischen siRNA zwei Basen ausgetauscht wurden. Die Niederregulation des Cathepsin X zeigt auf mRNA-Ebene nach 3 Tagen eine hohe Effizienz (*CathXsi913*), wobei nach 7 Tagen keine Niederregulation mehr vorhanden zu sein scheint (Abb. E.22).

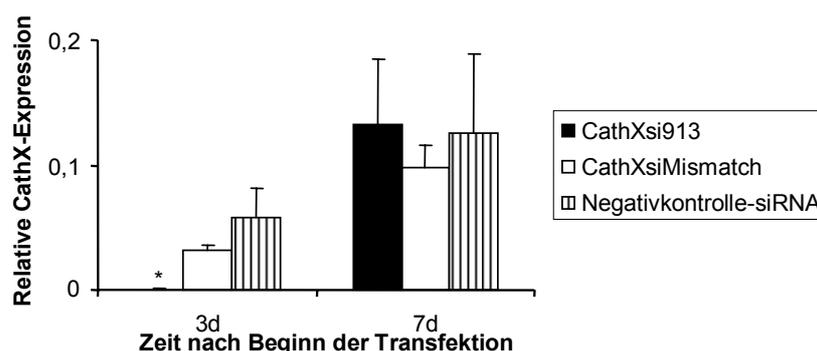


Abb. E.22 qRT-PCR zur Bestimmung der Transfektionseffizienz.

Niederregulation von Cathepsin X erfolgte durch *CathXsi913*. Die Negativkontrolle-siRNA entspricht einer unspezifischen siRNA und *CathXsiMismatch* entspricht einem Derivat von *CathXsi304*. Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ebenfalls nach 3 Tagen ist ein signifikant reduzierter Nachweis von (Pro)Cathepsin X nach Transfektion der hMSC mit *CathXsi913* in den Lysaten und Überständen der hMSC mittels ELISA erkennbar (Abb. E.23).

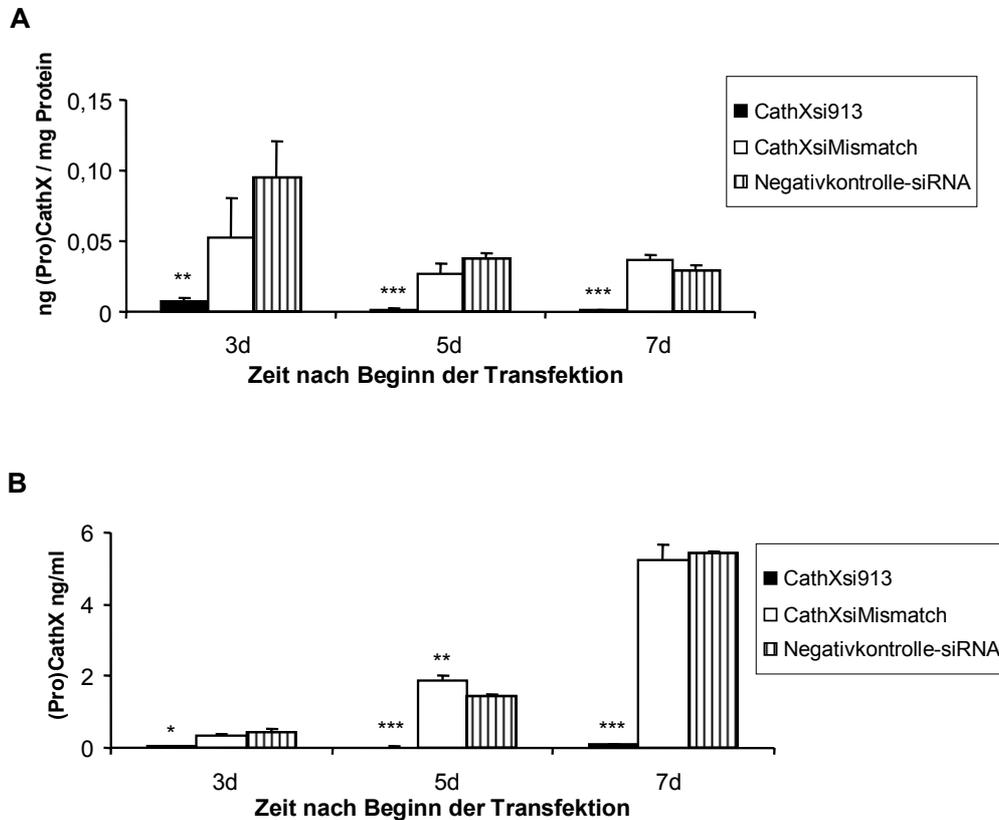


Abb. E.23 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels ELISA. Niederregulation von Cathepsin X erfolgte durch *CathXsi913*. Die Negativkontrolle-siRNA entspricht unspezifischer siRNA und *CathXsiMismatch* entspricht einem Derivat von *CathXsi304*. Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.
A: Lysate
B: Überstände

E.6.3 Transmigration Cathepsin X-defizienter hMSC

Um zu klären, ob die Transmigration der hMSC von der Cysteinprotease Cathepsin X abhängt, wurde Cathepsin X zunächst mittels RNA-Interferenz niederreguliert und danach das Invasionsverhalten der hMSC in einem Transwellsystem untersucht. Die verwendeten siRNAs für die Cathepsin X-Niederregulation sind hier zwei Cathepsin X-spezifische siRNAs (*CathX304* und *CathX913*). Als Negativkontrollen wurden die siRNA, die keine Sequenzübereinstimmung mit der bekannten mRNA zeigt (Negativkontrolle) sowie ein Derivat von *CathX304* (*CathXsi-Mismatch*) und die Vehikelkontrolle (Transfektionsreagenz *Lipofectamin 2000* ohne siRNA) eingesetzt.

Wie Abb. E.24 zeigt, ist am Tag 4 nach Transfektion eine effektive Niederregulation von Cathepsin X durch *CathXsi304* und *CathXsi913* auf RNA-Ebene erreicht. Dieser Versuch dient dem Transfektionsnachweis für den darauf folgenden Transmigrationsversuch.

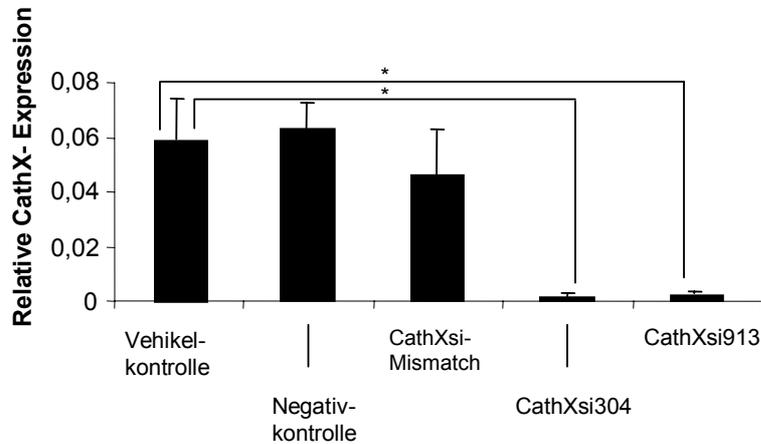


Abb. E.24 Nachweis der Niederregulation von Cathepsin X in hMSC.

Mittels qRT-PCR zeigt sich eine signifikante Reduktion von Cathepsin X am Tag 4 nach Transfektion mit *CathXsi304* und *CathXsi913* im Vergleich zu den Kontrollen Vehikelkontrolle (nur Lipo-fectamin 2000), Negativkontrolle (unspezifische siRNA) und *CathXsiMismatch* (Derivat der *CathXsi304*). Die Ergebnisse sind MW + SD eines Duplikat-Ansatzes. *p < 0,05 versus Vehikelkontrolle.

Verglichen mit den Kontrollen (Vehikelkontrolle, Negativkontrolle, *CathXsiMismatch*) zeigt sich bei der Migration der hMSC durch die hEZM keine Beteiligung von Cathepsin X. Die Zellen, bei denen die Protease niederreguliert wurde (*CathXsi304*, *CathXsi913*), zeigten im Vergleich zu den beiden Kontrollen sogar eine vermehrte Migration (Abb. E.25).

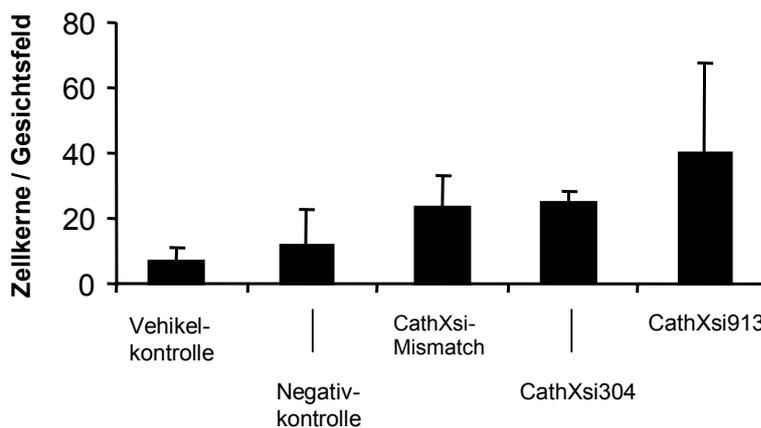


Abb. E.25 Transmigration der Cathepsin X-niederregulierten hMSC durch hEZM-beschichtete Membranen

Nach 48 Stunden Migration der hMSC durch hEZM zeigt sich nach CathepsinX-*Knockdown* (*CathXsi304* und *CathXsi913*) keine Reduktion der Migration im Vergleich zu den Kontrollen Vehikelkontrolle (nur Lipofectamin2000), Negativkontrolle (unspezifische siRNA) und *CathXsiMismatch* (Derivat der *CathXsi304*). Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes.

Ein weiterer Versuch zur Migration von hMSC sollte den Einfluss von Vitronektin auf diesen Mechanismus untersuchen. Dabei wurden hMSC mit Vitronektin, mit den zyklischen RGD-Peptiden und mit Vitronektin + zyklische RGD-Peptide stimuliert, um anschließend die Migration der Zellen zu analysieren (Abb. E.26).

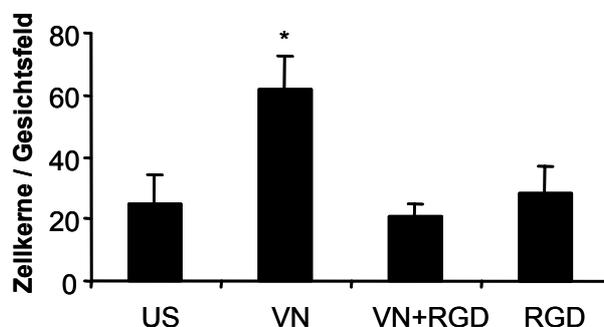


Abb. E.26 Transmigration der hMSC durch hEZM-beschichtete Membranen in Abhängigkeit von Vitronektin.

Die Migration der hMSC wird durch Stimulation mit Vitronektin (VN) im Vergleich zu den unstimulierten hMSC (US) signifikant verstärkt. Nach Inkubation der hMSC mit den zyklischen RGD-Peptiden und zusätzlicher Stimulation der hMSC und durch alleinige RGD-Peptide-Zugabe ist diese Migrationszunahme nicht erkennbar. Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes. * $p < 0,05$.

Hinsichtlich der Migration der hMSC zeigt sich, dass die Zellen nach Stimulation mit Vitronektin vermehrt die hEZM durchwandern. Werden die RGD-abhängigen Rezeptoren der hMSC durch die zyklischen RGD-Peptide blockiert, so bewirkt eine Stimulation mit Vitronektin keine vermehrte Migration der Zellen. Auch nach Stimulation der hMSC mit den zyklischen RGD-Peptiden zeigt sich keine gesteigerte Migration im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Nach Stimulation der Zellen mit Procathepsin X sowie mit einer Mutante des Procathepsin X (AAA-Cathepsin X) als auch mit den zyklischen RGD-Peptiden ist kein signifikanter Effekt auf die Migration der hMSC zu erkennen (Abb. E.27).

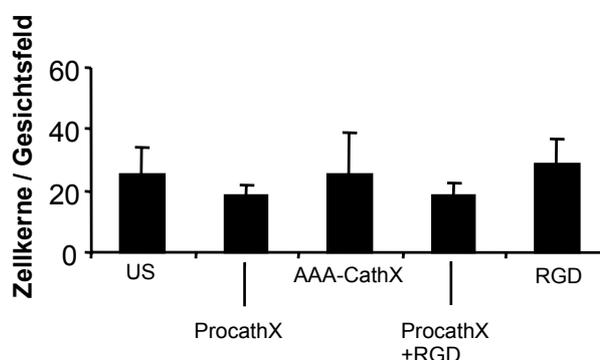


Abb. E.27 Transmigration der hMSC durch hEZM-beschichtete Membranen nach Stimulation.

Stimulation der hMSC mit Procathepsin X, der Mutante AAA-Cathepsin X bzw. Procathepsin X + RGD-Peptide und mit den zyklischen RGD-Peptiden allein, zeigt keinen Einfluss auf die Migration der hMSC. Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes.

Es zeigte sich, dass weder nach Stimulation mit Procathepsin X eine erhöhte Transmigration, noch nach Niederregulation von Cathepsin X eine reduzierte Transmigration erkennbar ist.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden Unterschiede in der Transmigration von Cathepsin X-niederregulierten hMSC durch eine Membran mit Vitronektinbeschichtung im Vergleich zu einer Beschichtung mit hEZM analysiert. Wie Abb. E.28 zeigt, ist hier eine verminderte Transmigration der hMSC nach Niederregulation des Cathepsin X (*CatXsi304*; *CatXsi913*) im Vergleich zu den Kontrollen (Negativkontrolle; *CatXsiMismatch*) bei der Vitronektinbeschichtung nachweisbar. Eine verminderte Migration Cathepsin X-defizienter hMSC bei hEZM-beschichteter Matrix zeigt sich nicht.

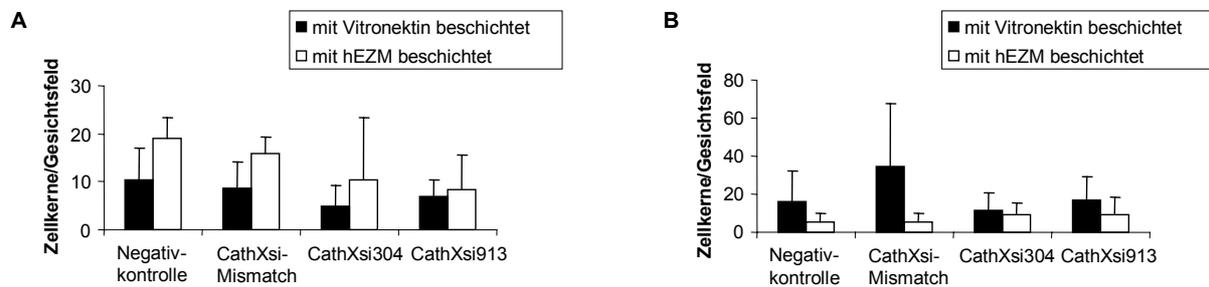


Abb. E.28 Transmigrationsassay mit Cathepsin X-niederregulierten hMSC.

Aufgezeigt ist die Migration von hMSC durch Vitronektin-beschichtete Membranen, im Vergleich zur Beschichtung mit hEZM. Die Transfektion erfolgte jeweils mit *CathXsi304* und *CathXsi913*, im Vergleich zu den Kontrollen Negativkontrolle (unspezifische siRNA) und *CathXsiMismatch* (Derivat der *CathXsi304*).

Die Ergebnisse sind MW + SD eines Triplikat-Ansatzes.

F DISKUSSION

Stammzellen erfüllen im Vergleich zu Tumorzellen regenerative Aufgaben, wohingegen das Ziel von Tumorzellen die Destruktion von Gewebe und Organen ist. Trotz dieses funktionalen Unterschiedes weisen Stammzellen und Tumorzellen eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf, wie z.B. die Fähigkeit der Selbsterneuerung bzw. Proliferation, der Differenzierung bzw. Transformation sowie der Migration bzw. Invasion. Beide Zelltypen wirken demzufolge nicht nur am Ort ihrer Entstehung, sondern besitzen vielmehr die Eigenschaften, ihre ursprüngliche Lokalisation zu verlassen. Hierfür müssen extrazelluläre Barrieren mit Hilfe von Proteasen abgebaut werden, um eine Migration der Zellen bzw. Invasion von Gewebestrukturen zu ermöglichen. Lysosomale Cysteinproteasen werden – neben Proteasen anderer Klassen – vor allem von Tumorzellen sezerniert, um extrazelluläre Matrix abzubauen und somit zur Invasion beizutragen. Diese Proteasen spielen nicht nur bei der Tumordinvasion, sondern auch bei weiteren Erkrankungen wie der Muskeldystrophie, der Osteoporose oder der rheumatoiden Arthritis eine Rolle (Yasuda et al 2005, Podgorski 2009, Brömme et al. 2009), wo sie vorwiegend aus Entzündungszellen freigesetzt werden.

Im Gegensatz zu Tumor- und Entzündungszellen wurden Stammzellen bisher hinsichtlich ihres proteolytischen Potentials kaum charakterisiert. In diesem Zusammenhang war es für uns von besonderem Interesse, die Expression von Cathepsinen sowie deren Rolle bei der Differenzierung und Migration von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) aufzuklären.

F.1 Vergleich der osteogenen Differenzierung der hMSC und der Differenzierung mittels Vitronektin in Bezug auf lysosomale Cysteinproteasen

Mesenchymale Stammzellen können *in vitro* durch Inkubation in osteogenem Kultivierungsmedium in Osteoblasten differenzieren, wobei der chemische Zusatz Dexamethason bei der Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt (Bruder et al. 1997, Jaiswal et al. 1997, Pittenger et al. 1999). Jaiswal et al. setzten unterschiedliche Konzentrationen an Dexamethason ein und erkannten, dass erst eine Konzentration von 100 nM die Aktivität der alkalischen Phosphatase als Marker der osteogenen Differenzierung und die Proliferationsfähigkeit der hMSC signifikant erhöht (Jaiswal et al. 1997). Überraschenderweise differenzieren hMSC auch dann zu Osteoblasten, wenn sie in Anwesenheit von Vitronektin oder Kollagen I kultiviert werden (Salasnyk et al. 2004a).

Über die Regulation lysosomaler Cysteinproteasen während der osteogenen Differenzierung war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch wenig bekannt. Unser primäres Ziel war es daher, zunächst

Veränderungen der Cysteinproteasen-Expression auf mRNA- und Proteinebene im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu erfassen.

Als Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde die Expression der alkalischen Phosphatase bestimmt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der chemisch induzierten osteogenen Differenzierung eine Hochregulation der Expression der alkalischen Phosphatase. Bei der Differenzierung durch das EZM-Protein Vitronektin war jedoch nicht bei jedem Spender und zu jedem Zeitpunkt eine signifikant erhöhte Expression dieses Differenzierungsmarkers nachweisbar.

Nach Kundu et al. (2006) konnte eine osteogene Differenzierung von hMSC durch Vitronektin bzw. Kollagen I induziert werden. Nachweisbar war dies durch die erhöhte Detektion der alkalischen Phosphatase bzw. der sichtbaren Mineralisierung anhand der van Kossa-Färbung. Bei genauerer Datensichtung ist jedoch erkennbar, dass Kundu et al. (2006) neben den EZM-Proteinen den Zusatz Dexamethason verwendeten. Neben der Beschichtung der Zellkulturplatten mit Vitronektin wurde in unserer Versuchsanordnung dagegen kein Dexamethason zugegeben, sondern ausschließlich Stammzellmedium (MSCGM) und das EZM-Protein Vitronektin verwendet. In den hier gezeigten Daten war eine signifikante Expressionszunahme nach 7 Tagen mit nachfolgender Expressionsabnahme zu beobachten. Da die alkalische Phosphatase ein sehr früher Marker der Osteogenese ist (Jaiswal et al. 1997), also zu Beginn schnell ansteigt und im weiteren Verlauf abnimmt, könnte dies eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse darstellen.

Bezüglich der Cathepsin-Expression wurde zunächst die semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Diese Untersuchung zeigte, dass alle elf im humanen Genom codierten Cathepsine in hMSC während der chemisch induzierten osteogenen Differenzierung exprimiert werden. In unstimulierten hMSC waren nur acht der elf Cathepsine (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O und X) detektierbar. Zur genaueren Analyse wurden die Cathepsine mittels quantitativer RT-PCR erfasst, wobei eine Hochregulation der Expression bei den Cathepsinen B, H, K, L, O und S während der chemisch induzierten osteogenen Differenzierung erkennbar war. Um diesen Effekt auch nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin aufzuzeigen, wurden hMSC für 7, 14 und 21 Tage jeweils auf Vitronektin kultiviert. Dabei wurden unter anderem die Cathepsine B und K hochreguliert, wohingegen Cathepsin X in seiner Expression kaum beeinflusst wurde. Die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen mit Vitronektin bestätigen die ermittelten Daten bezüglich der chemisch induzierten Osteogenese.

EZM-Proteine wirken sowohl auf die Expression als auch auf die extrazelluläre Freisetzung verschiedener Cathepsine. Diese können dann die EZM abbauen. Beispielsweise zeigte eine Zellinteraktion mit dem EZM-Protein Kollagen I eine Sekretion von Cathepsin B sowohl bei Fibroblasten der Brust als auch bei Tumorzellen des Prostatakarzinoms (Koblinski et al. 2002,

Podgorski et al. 2005). Dementsprechend haben wir nun auch erstmals die Sekretion ausgewählter Cathepsine nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin untersucht.

Auf Proteinebene wurde Cathepsin B in den Überständen der hMSC nach Vitronektinstimulation vermehrt nachgewiesen. Die Cathepsin B-Konzentration in den entsprechenden Zelllysaten war dagegen erniedrigt, was möglicherweise auf die erhöhte Sekretion zurückzuführen ist. Eine Hochregulation von Cathepsin B auf mRNA- und Protein-Ebene wurde vor allem bei malignen Prozessen detektiert (Mai et al. 2002; Podgorski et al. 2003; Roshy et al. 2003) und dabei dem Cathepsin B eine Beteiligung bei der Tumorprogression zugeschrieben. Welche Funktion der erhöhte extrazelluläre Anteil dieser Cysteinprotease von hMSC hat, konnte in unserem Ansatz nicht geklärt werden.

Die erhöhte Expression von Cathepsin K zeigte sich sowohl während der chemisch induzierten osteogenen Differenzierung als auch nach Stimulation mit Vitronektin. Cathepsin K gehört zur Gruppe der kollagenolytischen Proteasen (Garnero et al. 1998) und ist vermehrt in Osteoklasten nachweisbar (Drake et al. 1996; Littlewood-Evans et al. 1997). Osteoklasten stammen aus der haematopoetischen Stammzelllinie und sind für die Knochenresorption verantwortlich, wogegen Osteoblasten aus der mesenchymalen Stammzelllinie hervorgehen und eine Hauptaufgabe beim Knochenaufbau erfüllen. Die Funktion der Osteoklasten ist somit gegensätzlich zur Funktion der Osteoblasten. Es gibt bereits Hinweise, dass Cathepsin K am Abbau der Knochenmatrix beteiligt ist, da Kollagen und Osteonektin, die in der Knochenmatrix enthalten sind, als Substrate dieser Cysteinprotease nachgewiesen wurden (Bossard et al. 1996). Eine Erklärung für eine ebenfalls erhöhte Expression von Cathepsin K in Osteoblasten liefern Mandelin et al. (2006). Danach sind Osteoblasten zur Matrixumgestaltung befähigt und sezernieren nachweislich Cathepsin K, um unzureichend prozessiertes Kollagen I abzubauen. Cathepsin K kann somit neben der alkalischen Phosphatase als weiterer Marker der osteogenen Differenzierung angesehen werden. Ein entsprechender Nachweis auf mRNA-Ebene gelang uns sowohl bei hMSC als auch bei deren Differenzierung zu Osteoblasten. Auf Proteinebene konnten wir allerdings Cathepsin K mittels ELISA nicht detektieren, da die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Testsystems lag. Welche Auswirkungen die Expressionsinduktion von Cathepsin K nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin auf die umgebende Matrix hat, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Bei unseren Untersuchungen galt ein besonderes Interesse der Expression von Cathepsin X, da diese Protease bereits bei Tumorzellen vermehrt nachgewiesen wurde (Nägler et al. 2004; Krueger et al. 2005). Entsprechend unserer qRT-PCR-Daten hatten weder die chemische Differenzierung mittels osteogenem Kultivierungsmedium noch die Differenzierung mittels Vitronektin einen Einfluss auf die mRNA-Expression von Cathepsin X. Jedoch wurde mithilfe eines ELISAs eine vermehrte Sezernierung des Proteins aus stimulierten hMSC nachgewiesen. Dabei wurde die besondere Rolle des

EZM-Proteins Vitronektin anhand des Vergleichs mit den Ergebnissen aus Stimulationsversuchen mit Kollagen I bzw. Laminin erkannt. Weder Laminin noch Kollagen I zeigten einen ähnlich fördernden Effekt auf die Sekretion von (Pro)Cathepsin X wie Vitronektin. Der genaue Mechanismus des durch Vitronektinstimulation erhöht nachweisbaren (Pro)Cathepsin B und X in den Überständen der hMSC konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Morphologische Unterschiede der hMSC nach Vitronektinstimulation im Vergleich zu unstimulierten hMSC zeigten sich mikroskopisch durch verlängerte Zellkörper und vermehrt sichtbare perinukleäre Granula. Über Immunfluoreszenz wurde intrazelluläres (Pro)Cathepsin X in Vitronektin-stimulierten und unstimulierten hMSC lokalisiert, jedoch waren keine quantitativen Unterschiede erkennbar, was ggfs. der vermehrten Sekretion von Cathepsin X nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin zugeschrieben werden könnte.

F.2 RGD-vermittelte Bindung der hMSC an Procathepsin X

Integrine sind Zelloberflächenproteine, die sowohl für die Adhäsion und Migration von Zellen als auch für die bidirektionale Weiterleitung von Signalen wichtig sind. Auch hMSC sind zur Adhäsion und Migration befähigt, um z. B. aus dem Ursprungsort (Knochenmark) zu beschädigtem Gewebe zu gelangen. Es wird angenommen, dass dabei Integrine eine wesentliche Rolle spielen (Chamberlain et al. 2007, Docheva et al. 2007). Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unklar. Die Aufklärung einer Integrin-vermittelten Bindung zwischen hMSC und Vitronektin bzw. Procathepsin X war demnach ein weiteres Teilprojekt, das wir mit unterschiedlichen Methoden angegangen haben.

Da Vitronektin eine RGD-Sequenz aufweist und über diese an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet (Pytela et al. 1985, Xiong et al. 2002; Wang et al. 2005), wurde Integrin $\alpha_v\beta_3$ zunächst unter dem Namen Vitronektin-Rezeptor bekannt. In der vorliegenden Arbeit haben wir gezeigt, dass auch hMSC in RGD-abhängiger Weise über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ an Vitronektin binden können. Durch Blockierung der RGD-Bindungsdomäne der hMSC mit dem zyklischen RGD-Peptid zeigte sich eine signifikant verminderte Adhäsion an Vitronektin. Zudem wurde nach Präinkubation der hMSC mit dem monoklonalen $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper (LM609) eine reduzierte Adhäsion an Vitronektin erkennbar.

Die RGD-Sequenz ist nicht nur im EZM-Protein Vitronektin (Xiong et al. 2002; Wang et al. 2005) vorhanden, sondern auch bei einigen Proteasen. So unterscheidet sich Procathepsin X aufgrund seiner Pro-Region von den anderen Cathepsinen. Die Proform des Cathepsin X besitzt eine RGD-Sequenz in seiner Pro-Region (Nägler et al. 1998) und wird von verschiedenen Zellen in dieser Form sezerniert. Es war daher naheliegend, zu untersuchen, ob diese Protease RGD-vermittelt an Integrine von hMSC

binden kann, da bereits in Endothelzellen (HUVEC) eine RGD-Sequenz-abhängige Bindung des Procathepsin X an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ nachgewiesen wurde (Lechner et al. 2006).

Da wir vermuteten, dass Procathepsin X in ähnlicher Weise in hMSC mit Integrinen interagiert, wurde dies mittels unterschiedlicher Versuchsanordnungen untersucht.

Hierfür setzten wir Procathepsin X-Mutanten ein, welche eine Interaktion mit RGD-erkennenden Integrinen unterbinden (Cherny et al. 1993). Die Mutanten AAA-Cathepsin X und RAD-Cathepsin X, bei denen die RGD-Sequenz durch eine AAA- bzw. RAD-Sequenz ausgetauscht ist, zeigten eine reduzierte Bindungsfähigkeit an hMSC. Ebenso war die Bindung von prozessiertem Cathepsin X (ohne Pro-Region) an hMSC vermindert. Lediglich die Bindung von Procathepsin X mit einem intakten RGD-Motiv war möglich. Die RGD-Abhängigkeit dieser Interaktion konnte in einem zweiten Versuchsansatz auch durch die Verwendung von zyklischen RGD-Peptiden demonstriert werden. Durch Bindung des zyklischen RGD-Peptides an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ kann eine RGD-abhängige Bindung durch nachfolgend verminderte Adhäsion der Zellen identifiziert werden (Aumailley et al. 1991; Dijkgraaf et al. 2006). Nach Präinkubation der hMSC mit dem zyklischen RGD-Peptid zeigte sich auch eine signifikant verminderte Adhäsion an Procathepsin X. Im Vergleich dazu übte eine Präinkubation mit dem zyklischen RAD-Peptid keine vergleichbar reduzierte Adhäsion an Procathepsin X aus. Zudem ließ sich mit dem blockierenden anti- $\alpha_v\beta_3$ Antikörper LM609 die Adhäsion der hMSC an Procathepsin X verhindern, während der anti- $\alpha_5\beta_1$ Antikörper MAB1969 die Bindung erlaubte. Daraus kann eindeutig gefolgert werden, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$ die Interaktion von hMSC mit Procathepsin X vermittelt, womit die von unserer Arbeitsgruppe an anderen Zellentitäten (z.B. HUVEC) gezeigten Ergebnisse (Lechner et al. 2006) bestätigt wurden.

Zusammenfassend belegen unsere Daten, dass die Bindung von Procathepsin X an hMSC über das RGD-Motiv in der Pro-Region der Cysteinprotease Integrin-vermittelt stattfindet. Welche physiologische Bedeutung dieser Interaktion zukommt, konnte allerdings noch nicht evaluiert werden. Die Aufklärung der Bindungsmechanismen von hMSC ist jedoch von großer Wichtigkeit, da die Adhäsion ein erster Schritt für weitere Vorgänge wie EZM-Abbau und Migration ist.

F.3 Integrin-vermittelte Signaltransduktion der hMSC nach Stimulation mit Vitronektin bzw. Procathepsin X

Durch die Identifizierung von Signaltransduktionswegen nach Stimulation mit verschiedenen Signalstoffen können Rückschlüsse auf Funktion und Regulation der Zelle genommen werden. So wurde bereits nachgewiesen, dass es durch die Integrin $\alpha_3\beta_1$ -vermittelte Adhäsion von hMSC an Laminin-5 zu einer Phosphorylierung des osteogenen Transkriptionsfaktors *Runx2/CBFA-1* über den *ERK*-Signaltransduktionsweg kommt (Klees et al. 2004). Auch Cysteinproteasen sollen neben dem EZM-Abbau Signaltransduktionskaskaden beeinflussen, indem sie beispielsweise Zellrezeptoren oder Wachstumsfaktoren aktivieren (Obermajer et al. 2008a und 2008b).

In unseren Experimenten kam es durch Vitronektinstimulation der hMSC zu einer vermehrten Phosphorylierung der *p90RSK* und damit zur Aktivierung des *ERK*-Signalweges sowie der *p38-MAPK* und des *S6 Ribosomalen Proteins*. Der *ERK*-Signalweg ist u.a. verantwortlich für das Wachstum und die Differenzierung von Osteoblasten (Lai et al. 2001). Nach Jaiswal et al. sind die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (*ERK* und *p38-MAPK*) an der osteogenen Differenzierung von hMSC beteiligt. Dabei zeigte sich, dass nach Blockierung von *ERK* die adipogene anstatt der osteogenen Differenzierung der hMSC stattfindet (Jaiswal et al. 2000). Die in unseren Untersuchungen nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin verstärkt nachgewiesenen Kinasen *Phospho-p38-MAPK* und *Phospho-p90-RSK* lassen somit auf eine Induktion der osteogenen Differenzierung durch Vitronektin schließen. Die Phosphorylierung des *S6 Ribosomalen Proteins* könnte für die Beeinflussung der Translation in der Zelle stehen, was allerdings in weiteren Untersuchungen verifiziert werden müsste.

Da (Pro)Cathepsin X von den hMSC sezerniert wird und in der Lage ist, an hMSC Integrin-vermittelt zu binden, muss die Möglichkeit einer Signalweiterleitung in das Innere der Zelle in Betracht gezogen werden. Daher haben wir hMSC auch mit Procathepsin X stimuliert und entsprechende Signalwege identifiziert. Nach Stimulation mit Procathepsin X war u.a. *Phospho-p90RSK* vermehrt detektierbar, weshalb ähnlich wie nach Vitronektinstimulation, eine Aktivierung des *ERK*-Signalweges anzunehmen ist.

Um den *ERK*-Signalweg sowohl nach Vitronektin- als auch nach Procathepsin X-Stimulation genauer zu analysieren, wurden Antikörper eingesetzt, die auf die *ERK*- und *AKT*-Signalwege beschränkt waren (Multiplex Western Blot Cocktail I). Hierbei ließ sich bestätigen, dass Vitronektin den *ERK*-Signalweg ebenso wie den *AKT*-Signalweg aktiviert. Interessanterweise war der *AKT*-Signalweg nach Stimulation der hMSC mit Procathepsin X nur nach Inhibition des *ERK*-Signalweges aktivierbar.

Da bereits nachgewiesen wurde, dass (Pro)Cathepsin X bei diversen Tumorgeschehen hochreguliert wird (Nägler et al. 2004; Krueger et al. 2005), und wie von uns jetzt gezeigt, (Pro)Cathepsin X auch nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin vermehrt sezerniert wird, sollte in weiteren Untersuchungen der genaue Mechanismus der Aktivierung des *ERK*-Signalweges durch (Pro)Cathepsin X untersucht werden.

Unsere Daten lassen somit nur sehr allgemein gehaltene Aussagen bezüglich der Wirkung von Vitronektin bzw. Procathepsin X zu. Unumstritten ist jedoch, dass Procathepsin X Integrin-vermittelt an der Modulation von Signaltransduktionswegen beteiligt ist. So identifizierten bereits Kos et al. die β_2 -Untereinheit der Integrine als Substrat von Cathepsin X. Dadurch wird zum einen die Adhäsion von Monozyten/Makrophagen verstärkt und zum anderen die Reifung dendritischer Zellen reguliert (Kos et al. 2009).

F.4 Transmigrationsfähigkeit von Cathepsin X-defizienten hMSC

Proteasen sind an zahlreichen physiologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt. Sie spielen vor allem im Zusammenhang mit tumorösen Prozessen wie Invasion und Metastasierung eine wesentliche Rolle (Stetler-Stevenson et al. 1993; Koblinski et al. 2000; Reiser et al. 2004; Wang et al. 2005). So konnten beispielsweise die Cysteinproteasen Cathepsin B und Cathepsin X bei diversen Tumorgeschehen identifiziert werden, was sich durch eine Hochregulation dieser Proteasen darstellte (Podgorski et al. 2003; Nägler et al. 2004; Krüger et al. 2005). Sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionen scheinen hierbei von Bedeutung zu sein.

Im Detail wurde bereits einigen Cathepsinen eine entscheidende Beteiligung an der Migration von Zellen zugesprochen. So soll das Cathepsin L durch eine intrazelluläre Interaktion mit der α_3 - Untereinheit des Integrins $\alpha_3\beta_1$ die Migration der Podozyten induzieren (Reiser et al. 2004). Die nachgewiesene Kollokalisierung des Cathepsin S mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ deutet auf eine Beteiligung an der Migration vaskulärer glatter Muskelzellen hin (Cheng et al. 2006). Bei den Cathepsinen B, K, L und S wurde die Fähigkeit zur direkten Degradation der EZM als Voraussetzung für die Invasion erkannt (Reddy et al. 1995; Serveau-Avesque et al. 2006).

Inwieweit Cathepsin X an der Migration der hMSC Anteil hat, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert. Ein direkter EZM-Abbau ist unwahrscheinlich, da Cathepsin X nur Monocarboxypeptidaseaktivität besitzt (Nägler et al. 1999; Devanathan et al. 2005). Es ließe sich im Falle des Cathepsin X dann eher ein indirekter Effekt durch Interaktion mit Integrinen vermuten (Lechner et al. 2006).

Die selektive Niederregulation des Cathepsin X unter Anwendung der RNA-Interferenz sollte Aufschluss über eine Beteiligung dieser Protease an der Migration von hMSC geben. Die Niederregulation des Cathepsin X wurde mittels ELISA bzw. qRT-PCR überprüft. Der effizienteste Zeitpunkt der Transfektion wurde zwischen Tag 3 und 7 eingegrenzt, wobei eine Diskrepanz zwischen der noch deutlichen Niederregulation auf Proteinebene an Tag 7 nach Transfektion und der bereits ineffizienten Niederregulation auf mRNA-Ebene am gleichen Tag besteht. Ursächlich für diese Diskrepanz könnte sein, dass die Menge an Cathepsin X auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) bzw. auf Proteinebene (ELISA) abhängig von der Geschwindigkeit der Transkription bzw. der Halbwertszeit des Cathepsin X ist.

Im Transmigrationsassay mit Cathepsin X-defizienten hMSC konnte keine relevante Beteiligung der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin X bei der Migration der hMSC durch hEZM-beschichtete Membranen festgestellt werden. Deshalb wurden weitere Transmigrationsversuche durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in der Migration transfizierter hMSC bei Vitronektinbeschichtung im Vergleich zu einer Beschichtung mit hEZM zu analysieren. Interessanterweise zeigte sich eine verminderte Migration der Cathepsin X-defizienten hMSC bei Vitronektinbeschichtung, nicht aber bei hEZM-Beschichtung. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wäre die direkte Interaktion zwischen extrazellulärem Procathepsin X und dem Vitronektin-Rezeptor (Integrin $\alpha_v\beta_3$), welche die Migration der hMSC bei Vitronektinbeschichtung begünstigen könnte.

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit dargestellten untergeordneten Rolle des Cathepsin X bei der Migration von hMSC zeigte sich bei Endothelzellen (HUVEC), dass die Migration Cathepsin X-defizienter HUVEC durch hEZM-beschichtete Membranen reduziert ist (Lechner et al. 2006). Auch bei der Migration/Invasion von Magenkarzinomzellen konnte eine Beteiligung des Cathepsin X nachgewiesen werden (Krueger et al. 2005). Diese Unterschiede könnten eventuell auf die erhöhte Cathepsin X-Expression in Endothel- und Tumorzellen im Vergleich zu hMSC zurückzuführen sein.

Eine weitere Arbeitsgruppe versuchte durch Cathepsin X-Überexpression in T-Lymphozyten eine Beteiligung dieser Protease an der Zellmigration zu erforschen. Da eine vermehrte Migration der T-Lymphozyten ohne Degradation der EZM erzielt wurde, vermuteten die Autoren eine durch Cathepsin X verursachte Aktivitätsänderung des Integrin β_2 Rezeptors LFA-1 (Jevnikar et al. 2008).

Eine vermehrte Invasion von Melanomzellen wurde durch eine vermehrte Induktion von Metalloproteasen (MMP) und nicht durch Cysteinproteasen erklärt (Bafettiet al. 1998). Eine Interaktion der Metalloproteasen mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde ebenfalls in Melanomzellen gezeigt. Brooks et al. (1996) beschrieben, dass die MMP-2 auf der Oberfläche invasiver Zellen lokalisiert ist und durch eine Interaktion mit dem Integrin den EZM-Abbau und somit die Invasion der Zellen ermöglicht.

Da kürzlich Ries et al. (2007) eine essentielle Bedeutung von diversen Metalloproteasen für die Invasivität von hMSC belegt haben, könnten auch in unseren Experimenten diese Proteasen vorrangig für die Migration der hMSC verantwortlich gewesen sein.

Die Tatsache, dass in Tumorzellen die Cathepsin X-Expression um einiges höher liegt als in hMSC sowie die Möglichkeit, dass erst das Zusammenspiel mehrerer Cathepsine einen Effekt bewirkt und dass die Ausschaltung nur eines einzigen Cathepsins keine relevante Auswirkung auf die Migration der hMSC hat, könnten weitere Gründe für unsere Ergebnisse sein. Da nach Vitronektinstimulation der hMSC neben Cathepsin X auch Cathepsin B vermehrt freigesetzt wird und bereits eine Beteiligung des Cathepsin B bei der Migration von Zellen wie z.B. den Keratinozyten im Rahmen einer Wundheilung nachgewiesen wurde (Büth et al. 2004), sollte in zukünftigen Versuchen geklärt werden, ob eventuell erst eine gemeinsame Niederregulation dieser beiden Proteasen die Migration der hMSC signifikant reduzieren kann.

F.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Regulationsmechanismen lysosomaler Cysteinproteasen durch extrazelluläre Matrixproteine erstmals in hMSC untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Hochregulation der mRNA zahlreicher Cathepsine nach Stimulation der hMSC mit verschiedenen EZM-Proteinen. So konnte eine erhöhte Expression u.a. von Cathepsin B und K nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin belegt werden. Desweiteren konnte eine vermehrte Freisetzung von (Pro)Cathepsin B und X durch Vitronektinstimulation nachgewiesen werden, nicht jedoch nach Stimulation mit Kollagen I oder Laminin. Es muss jedoch betont werden, dass mit dieser Versuchsanordnung nicht zwischen einer vermehrten Freisetzung und einer verminderten Aufnahme der Cathepsine unterschieden werden kann. Dazu sollten Exo- und Endozytosemechanismen mit rekombinanten markierten (z.B. biotinylierten) Cathepsinen untersucht werden.

Die Suche nach den Bindungsmechanismen zwischen hMSC und (Pro)Cathepsin X bzw. EZM-Proteinen war ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit. In diesem Kontext war bereits bekannt, dass Vitronektin über sein RGD-Motiv an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet. Unsere Daten zeigten zum einen, dass dies auch für hMSC zutrifft und zum anderen, dass auch Procathepsin X eine RGD-abhängige Bindung mit hMSC eingeht.

Integrine sind nicht nur bei der Zelladhäsion von Bedeutung, sondern gewährleisten auch die bidirektionale Signalweiterleitung. Signaltransduktionswege der hMSC wurden sowohl nach Vitronektin- als auch nach Procathepsin X-Stimulation untersucht und es zeigte sich, dass bei der Signalweiterleitung vor allem der ERK-Signalweg eine Rolle spielt. Ausgehend von diesen Daten sollten in weiteren

Versuchen, z.B. durch Stimulation mit diversen anderen Cathepsinen oder Inkubation mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper, die Bedeutung der Integrin-vermittelten Signalwege für die Adhäsion, Migration und Differenzierung der hMSC geklärt werden.

Vor diesem Hintergrund sollen in Zukunft mögliche Auswirkungen von diversen gegen Cathepsine gerichteten Tumortherapiestrategien auf Stammzellen analysiert werden. Dabei müssen vor allem Mechanismen untersucht werden, die aus therapeutischer Sicht eine bessere Mobilisierbarkeit von Stammzellen für die Geweberegeneration gewährleisten, ohne dass dabei eventuelle Tumorprozesse initiiert bzw. beschleunigt werden.

G LITERATURVERZEICHNIS

1. Affara, N.I., Andreu, P., Coussens, L.M. (2009) Delineating protease functions during cancer development. *Methods Mol. Biol.* 539, 1-32
2. Aleku, M., Schulz, P., Keil, O., Santel, A., Schaeper, U., Dieckhoff, B., Janke, O., Endruschat, J., Durieux, B., Röder, N., Löffler, K., Lange, C., Fechtner, M., Möpert, K., Fisch, G., Dames, S., Arnold, W., Jochims, K., Giese, K., Wiedenmann, B., Scholz, A., Kaufmann, J. (2008) Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer Res.* 1. 86(23):9788-9798
3. Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R., Kessler, H. (1991) Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment. *FEBS Letters.* 291:50-54
4. Bafetti, L. M., Young, T. N., Itoh, Y., Stack, M. S. (1998). Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 273: 143-149
5. Benvenuti, S., Saccardi, R., Luciani, P., Urbani, S., Deledda, C., Cellai, I., Francini, F., Squecco, R., Rosati, F., Danza, G., Gelmini, S., Greeve, I., Rossi, M., Maggi, R., Serio, M., Peri, A. (2006) Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp Cell Res.* 312(13): 2592-2604
6. Bianco, P., Robey, P.G. (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature*; Vol. 414, 118-121
7. Bosman, F.T., Stamenkovic, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200(4): 423-428
8. Bossard, M.J., Tomaszek, T.A., Thompson, S.K., Amegadzie, B.Y., Hanning, C.R., Jones, C., Kurdyla, J.T., McNulty, D.E., Drake, F.H., Gowen, M., Levy, M.A. (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. *J. Biol. Chem.* Vol. 271, No. 21: 12517-12542
9. Brömme, D., Li, Z., Barnes, M., Mehler, E. (1998) Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry.* 38: 2377-2385

10. Brömme, D., Lecaille, F. (2009) Cathepsin K inhibitors of osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investis Drugs*. 18(5): 585-600
11. Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheresch, D.A. (1994a) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*. 264(5158): 569-571
12. Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., Cheresch, D.A. (1994b) Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 79(7): 1157-1164
13. Brooks, P.C., Strömblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F.H., Cheresch, D.A. (1995) Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest*. 96(4):1815-1822
14. Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., Cheresch, D.A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 85(5):683-693
15. Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E., Hall, D.M. (2010) Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*. 112(1): 3-25
16. Bruder, S.P., Fink, D.J., Caplan, A.I. (1994) Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 56(3): 283-294
17. Bruder, S.P., Jaiswal, N., Haynesworth, S.E. (1997) 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
18. Büth, H., Wolters, B., Hartwig, B., Meier-Bornheim, R., Veith, H., Hansen, M., Sommerhoff, C.P., Schaschke, N., Machleidt, W., Fusenig, N.E., Boukamp, P., Brix, K. (2004) HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration. *J Cell Biol*. 83(11-12):781-795
19. Buhling, F., Fengler, A., Brandt, W., Ansorge, S., Nägler, D.K. (2000) Review: Novel cysteine proteases of the papain family. *Adv Exp Med Biol*. 477: 241-254
20. Cai, J., Weiss, M.L., Mao, M.S. (2004) In search of "stemness". *Exp Hematol*. 32, 585-598

21. Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Blum, G., Bogyo, M., Caglic, D., Sloane, B.F. (2009) Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. *Exp Cell Res.* 315(7): 1234-1246
22. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 25: 2739-2749
23. Chapman H.A., Riese R.J., Shi G.-P. (1997) Emerging roles of cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 59: 63-88
24. Chen, Q., Kinch, M.S., Lin, T.H., Burrige, K., Juliano, R.L. (1994) Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 269(43): 26602-26605
25. Cheng, X.W., Kuzuya, M., Nakamura, K., Di, Q., Liu, Z., Sasaki, T., Kanda, S., Jin, H., Shi, G.P., Murohara, T., Yokota, M., Iguchi, A. (2006) Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin $\alpha_v\beta_3$. *Am J Pathol.* 168: 685-694
26. Cherny, R.C., Honan, M.A., Thiagarajan, P. (1993) Site-directed mutagenesis of the arginine-glycine-aspartic acid in vitronectin abolishes cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 268: 9725-9729
27. Coffey, J.W., De Duve, C. (1968). Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 243, 3255-3263
28. Devanathan, G., Turnbull, J.L., Ziomek, E., Purisima, E.O., Menard, R., Sulea, T. (2005) Carboxy-monopeptidase substrate of human cathepsin X. *Biochem Biophys Res Commun.* 329: 445-452
29. Dijkgraaf, I., Kruijtzter, J.A.W., Frielink, C., Soede, A.C., Hilbers, H.W., Oyen, W.J.G., Corstens, F.H.M., Liskamp, R.M.J., Boerman, O.C. (2006) Synthesis and biological evaluation of potent $\alpha_v\beta_3$ -integrin receptor antagonists. *Nuclear Medicine and Biology.* 33: 953-961
30. Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., Schieker, M. (2007) Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med.* 11(1): 21-38

31. Doty, S.B., Schofield, B.H. (1976) Enzyme histochemistry of bone and cartilage cells. *Prog Histochem Cytochem.* 8(1):1-38
32. Drake, F.H., Dodds, R.A., James, I.E., Connor, J.R., Debouck, C., Richardson, S., Lee-Rykaczewski, E., Coleman, L., Riemann, D., Barthlow, R., Hastings, G., Growen, M. (1996) Cathepsin K but not cathepsin B, L or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J. Biol. Chem.* Vol. 271, Number 21: 12511-12516
33. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., Sharp, Ph.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 4 (6): 457-467
34. Dykxhoorn, D.M., Lieberman, J. (2006) Knocking down disease with siRNA. *Cell.* 126; 231-235
35. Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Liddington, R.c. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 101 (1): 47-56
36. Fire, A. et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811
37. Fridenshtein, A.I. (1982) Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh. Patol.* 44 (10): 3-11
38. Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Gerasimov, U.I. (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 20: 263-272
39. Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F.H., McQueney, M.S., Foged, N.T., Delmas, P.D., Delaisse, J.M. (1998) The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J. Biol. Chem.* 273(48):32347-32352
40. Gutheil, J. C., Campbell, T.N., Pierce, P.R., Watkins, J.D., Huse, W.D., Bodkin, D.J., Cheresch, D.A. (2000) Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alpha_v beta₃. *Clin Cancer Res* 6, 3056-3061
41. Hayman, E. G., Pierschbacher, M.D., Ohgren, Y., Ruoslahti, E. (1983) Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 4003-4007

42. Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signalling machines. *Cell*. 110(6):673-687
43. Jackson, K. A., Majka, S.M., Wulf, G.G., Goodell, M.A. (2002) Stem cells: a minireview. *J Cell Biochem. Suppl.* 38: 1-6
44. Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder S.P. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell Biochem.* 64: 295-312
45. Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R., Pittenger, M.F. (2000) Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 9645-9652
46. Jedeszko, C., Sloane, B.F. (2004) Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.* 385(11): 1017-1027
47. Jevnikar, Z., Obermajer, N., Bogyo, M., Kos, J. (2008) The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J Cell Sci.* 121(Pt16): 2652-2661
48. 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., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., Verfaillie, C.M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418(6893): 41-49
49. Kemkes-Matthes, B., Preissner, K.T., Langenscheidt, F., Matthes, K.J., Müller-Berghaus, G. (1987) S protein/vitronectin in chronic liver diseases: correlations with serum cholinesterase, coagulation factor X and complement component C3. *Eur J Haematol.* 39(2):161-165
50. Klees, R.F., Salasznyk, R.M., Kingsley, K., Williams, W.A., Boskey, A., Plopper, G.E. (2005) Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. *Molecular Biology of the Cell.* Vol. 16: 881-890
51. Klemencic, I., Carmona, A.K., Cezari, M.H., Juliano, L., Guncar, G., Turk, D., Krizaj, I., Turk, V., Turk, B. (2000) Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydiptidase. *Eur J Biochem.* 267(17): 5404-5412
52. Koblinski, J.E., Ahram, M., Sloane, B.F. (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta.* 291(2): 113-135

53. Koblinski, J.E., Dosesco, J., Sameni, M., Moin, K., Clark, K., Sloane, B.F. (2002) Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B. *J. Biol. Chem.* 277(35): 32220-32227
54. Körbling, M., Estrov, Z., Champlin, R. (2003) Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplantation*, Nature Publishing Group. 32: 23-24
55. Kos, J., Sekirnik, A., Premzl, A., Zavasnik Bergant, V., Langerholc, T., Turk, B., Werle, B., Golouh, R., Repnik, U., Jeras, M., Turk, V. (2005) Carboxypeptidases cathepsin X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res.* 306(1):103-113
56. Kos, J., Jevnikar, Z., Obermajer, N. (2009) The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr.* 3(2): 164-166
57. Krueger, S., Kalinski, T., Hundertmark, T., Wex, T., Kuster, D., Peitz, U., Ebert, M., Nägler, D.K., Kellner, U., Malfertheiner, P., Naumann, M., Rocken, C., Roessner, A. (2005) Up-regulation of cathepsin X in helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *J. Pathol.* 207(1): 32-42
58. Kundu, A.K., Putnam, A.J. (2006) Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 347(1): 347-357
59. Kuphal, S., Bauer, R., Bosserhoff, A.K. (2005) Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24: 195-222
60. Laemmli, U. K. (1979) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227(5259): 680-685
61. Lai, C.F., Chaudhary, L., Fausto, A., Halstead, L.R., Ory, D.S., Avioli, L.V., Cheng, S.L. (2001) Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 276(17): 14443-14450
62. Lechner, A.M., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., Jochum, M., Nägler, D.K. (2006) RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin $\alpha_v\beta_3$ mediates cell-adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 281(51): 39588-39597
63. Linnevers, C., Smeekens, S.P., Brömme, D. (1996) Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8⁺ T-lymphocytes. *FEBS Letters* 404: 253-259

64. Littlewood-Evans, A., Kokubo, T., Ishibashi, O., Inaoka, T., Wlodarski, B., Gallagher, J.A., Bilbe, G. (1997) Localization of cathepsin K in human osteoclasts by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Bone*. 20:81-86
65. Lomberk, G. (2010) The extracellular matrix and cell migration. *Pancreatology*. 10(1): 4-5
66. Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., Pittenger, M.F. (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 4(4): 415-428
67. Mai, J., Waisman, D.M., Sloane, B.F. (2000) Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta*. 1477(1-2): 215-230
68. Mai, J., Sameni, M., Mikkelsen, T., Sloane, B.F. (2002) Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progress of gliomas. *Biol Chem*; 383:1407-1413
69. Mandelin, J., Hukkanen, M., Li, T.F., Korhonen, M., Liljeström, M., Sillat, T., Hanemaaijer, R., Salo, J., Santavirta, S., Kontinen, Y.T. (2006) Human osteoblasts produce cathepsin K. *Bone*. 38: 769-777
70. Miranti, C.K., Brugge, J.S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol*. 4(4): E83-90
71. Mohamed, M.M., Sloane, B.F. (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 6: 764-775
72. Nägler, D.K., Ménard, R. (1998) Human procathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Letters* 434: 135-139
73. Nägler, D. K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E. O., Menard, R., (1999) Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry*. 38: 12648
74. Nägler, D.K., Ménard, R. (2003) Family C1 cysteine proteases: biological diversity or redundancy? *Biol Chem*. 384: 837-843
75. Nägler, D.K., Krüger, S., Kellner, A., Ziomek, E., Menard, R., Buhtz, P., Krams, M., Roessner, A., Kellner, U. (2004) Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate*. 60: 109-119

76. Nögler, D.K., Lechner, A.M., Oettl, A., Kozaczynska, K., Scheuber, H.-P., Gippner-Steppert, C., Bogner, V., Biberthaler, P., Jochum, M. (2006) An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J. Immunol. Methods.* 10226: 1-10
77. Nascimento, F.D., Rizzi, C.C., Nantes, I.L., Stefe, I., Turk, B., Carmona, A.K., Nader, H.B., Juliano, L., Tersariol, I.L. (2005) Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch Biochem Biophys.* 436: 323-332
78. Obermajer, N., Repnik, U., Jevnikar, Z., Turk, B., Kreft, M., Kos, J. (2008a) Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of beta 2 integrins. *Immunology.* 124(1):76-88
79. Obermajer, N., Jevnikar, Z., Doljak, B., Kos, J. (2008b) Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connect Tissue Res.* 49(3): 193-196
80. 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., Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* Vol. 284: 143-147
81. Podgorski, I., Sloane, B.F. (2003) Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem. Soc Symp.* (70):263-276
82. Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Sloane, B.F. (2007) Cathepsin K in the bone microenvironment: link between obesity and prostate cancer? *Biochem. Soc. Trans.* 35: 701-703
83. Podgorski, I. (2009) Future of anticathepsin K drugs: dual therapy for skeletal disease and atherosclerosis? *Future Med Chem.* 1(1): 21-34
84. Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. (1985) A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 5766-5770
85. Reddy, V.Y., Zhang, Q.Y., Weiss, S.J. (1995) Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsin B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(9): 3849-3853

86. Reiser, J., Oh, J., Shirato, I., Asanuma, K., Hug, A., Mundel, T.M., Honey, K., Ishidoh, K., Kominami, E., Kreidberg, J.A., Tomino, Y., Mundel, P. (2004) Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha 3 integrin. *J. Biol. Chem.* 279: 34827-34832
87. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature.* 414: 105-111
88. Reya, T., Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434(7035):843-850
89. Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M., Neth, P. (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109(9): 4055-4063
90. Roshy, S., Sloane, B.F., Moin, K. (2003) Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Re.* 22(2-3):271-286
91. Roufosse, C.A., Direkze, N.C., Otto, W.R., Wright, N.A. (2004) Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(4): 585-597
92. Salaszyk, R.M., Williams, W.A., Boskey, A., Batorsky, A., Plopper, G.E. (2004a) Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotechnol.* 1: 24-34
93. Salaszyk, R.M., Klees, R.F., Hughlock, M.K., Plopper, G.E. (2004b) ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Commun Adhes.* 11(5-6): 137-153
94. Schwartz, M.A., Ginsberg, M.H. (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol.* 4(4): E65-68
95. Seger, D., Shaltiel, S. (2000) Evidence showing that the two-chain form of vitronectin is produced in the liver by a selective furine cleavage. *FEBS Letters* 480: 169-174
96. Serveau-Avesque, C., Martino, M.F., Hervé-Grépinet, V., Hazouard, E., Gauthier, F., Diot, E., Lalmanach, G. (2006) Active cathepsin B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell.* 98(1): 15-22

97. Shi, G.-P., Webb, A.C., Foster, K.E., Knoll, J.H.M., Lemere, C.A., Munger, J.S., Chapman, H.A. (1994) Human cathpsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 269: 11530-11536
98. Sivaraman, J., Nägler, D.K., Zhang, R., Menard, R., Cygler, M. (2000) Crystal structure of human procathepsin X: A cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine; *J. Mol. Biol.* 295: 939-951
99. Sloane, B.F., Yan, S., Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Cher, M.L., Mai, J., Cavallo-Medved, D., Sameni, M., Dosesescu, J., Moin, K. (2005) Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 15: 149-157
100. Smith, J.W., Piotrowicz, R.S., Mathis, D. (1994) Mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J. Biol. Chem.* 269(2): 960-967
101. Solinas, G., Marchesi, F., Garlanda, C., Mantovani, A., Allavena, P. (2010) Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 29(2): 243-248
102. Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S., Liotta, L.A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 541-573
103. Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., Kessler, P.D. (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 105(1): 93-98
104. Wang, X., Ferreira, A.M., Shao, Q., Laird, D.W., Sandig, M. (2005) $\beta 3$ integrins facilitate matrix interactions during transendothelial migration of PC3 prostate tumor cells. *Prostate.* 63(1): 65-80
105. Whateley, J.G., Knox, P. (1980) Isolation of a serum component that stimulates the spreading of cells in culture. *Biochem J.* 185: 349-354
106. Willstätter, R., Bamann, E. (1929) Über die Proteasen der Magenschleimhaut. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie* 180: 127-143
107. Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta.* 1692 (2-3): 103-119

108. Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha v beta 3. *Science*. 294 (5541): 339-345
109. Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. (2002) Crystal Structure of the extracellular segment of integrin alpha v beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*. 296 (5565): 151-155
110. Yasuda, Y., Kaleta, J., Brömme, D. (2005) The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 57(7): 973-993
111. Zhu, X., Assoian, R.K. (1995) Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 6(3): 273-282

H ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. B.1	Struktur von Procathepsin X.....	4
Abb. B.2	Die Integrin-Familie	6
Abb. E.1	Nachweis der Expression von Cathepsinen in hMSC und während osteogener Differenzierung (nach 2, 7, 14 und 21 Tagen) sowie in Osteoblasten	33
Abb. E.2	Nachweis der Expression von Cathepsinen in hMSC nach Inkubation mit osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage.....	34
Abb. E.3	Morphologie der mit Vitronektin stimulierten und unstimulierten hMSC	35
Abb. E.4	Nachweis der Expression von Cathepsinen in hMSC nach Stimulation mit Vitronektin über 21 Tage	36
Abb. E.5	Vergleich der quantitativen Expressionsinduktion einzelner Cathepsine	37
Abb. E.6	(Pro)Cathepsin B nach Stimulation mit Vitronektin	38
Abb. E.7	(Pro)Cathepsin X nach Stimulation mit Vitronektin.....	39
Abb. E.8	Detektion von intrazellulärem (Pro)Cathepsin X mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	39
Abb. E.9	(Pro)Cathepsin X nach Stimulation mit Kollagen I.....	40
Abb. E.10	(Pro)Cathepsin X nach Stimulation mit Laminin	40
Abb. E.11	Bestimmung der optimalen Zellzahl für Zelladhäsionsassay.....	41
Abb. E.12	Bindungsfähigkeit der hMSC an Fibronektin, Kollagen I, Kollagen IV, Laminin und Vitronektin.....	42
Abb. E.13	Bindungsfähigkeit der hMSC an Vitronektin	43
Abb. E.14	Bindungsfähigkeit der hMSC an Procathepsin X.....	44
Abb. E.15	Bindungsfähigkeit der hMSC an Procathepsin X in Abhängigkeit von der RGD-Bindungsdomäne und dem Integrin $\alpha\beta 3$	44
Abb. E.16	Bindungsfähigkeit der hMSC an Procathepsin X in Abhängigkeit vom Integrin $\alpha\beta 3$	45
Abb. E.17	Schematische Darstellung der untersuchten Signaltransduktionswege.....	46
Abb. E.18	Immunoblot von Zelllysaten der hMSC nach Vitronektinstimulation	47
Abb. E.19	Immunoblot von Zelllysaten der hMSC nach Stimulation mit Vitronektin bzw. Procathepsin X	47
Abb. E.20	Schematische Darstellung der untersuchten Signaltransduktionswege.....	48
Abb. E.21	Immunoblot nach Stimulation der hMSC mit Vitronektin bzw. Procathepsin X.....	48
Abb. E.22	qRT-PCR zur Bestimmung der Transfektionseffizienz	49
Abb. E.23	Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels ELISA	50
Abb. E.24	Nachweis der Niederregulation von (Pro)Cathepsin X in hMSC	51
Abb. E.25	Transmigration der Cathepsin X-niederregulierten hMSC durch hEZM-beschichtete Membranen	51
Abb. E.26	Transmigration der hMSC durch hEZM-beschichtete Membranen in Abhängigkeit von Vitronektin.....	52
Abb. E.27	Transmigration der hMSC durch hEZM-beschichtete Membranen nach Stimulation	52
Abb. E.28	Transmigrationsassay mit Cathepsin X-niederregulierten hMSC	53

I ANHANG

I.1 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Leiter des Lehrstuhles "Bakteriologie" des Max von Pettenkofer-Institutes und Leiter des Promotionsstudienganges "Molekulare Medizin", danke ich für die Möglichkeit, im Rahmen dieses Promotionsstudienganges wissenschaftlich tätig sein zu dürfen.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum, Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für die zusätzliche finanzielle Unterstützung der Experimente sowie für die Ratschläge und Korrekturen vor allem während der Erstellung der Promotionsschrift.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dorit Nägler für die nicht nur tatkräftige und immer verfügbare Unterstützung während der experimentellen Arbeit und schriftlichen Ausarbeitung, sondern auch für ihren unermüdlichen persönlichen Einsatz und ihre motivierenden Worte.

Zudem bin ich Herrn PD Dr. Peter Neth für seine großzügige fachliche Unterstützung in allen Belangen der mesenchymalen Stammzellforschung außerordentlich dankbar.

Bei der praktischen Ausführung meiner Arbeit möchte ich vor allem folgenden Personen sehr danken: Dr. Annette Lechner für das methodische Einarbeiten, ihre Geduld und freundschaftliche Begleitung; Dr. Marisa Karow für ihre unermüdliche Hilfe bezüglich der Handhabung der mesenchymalen Stammzellen; Maximilian Fruth für seine motivierende Gesellschaft; Ruza Hell und Lourdes Ruiz-Heinrich für ihre wertvolle technische Mithilfe sowie Annemarie Oetl für ihr immer offenes Ohr.

Erwähnen möchte ich auch Marcus Beissner, Dr. Virginia Egea, Dr. Matthias Illmer, Dr. Oliver Popp, Dr. Birgit Profanter, Stefan Simon und Josef Steckenbiller, um ihnen allen für ihre Unterstützung zu danken.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die meinen Werdegang gefördert und mir das Studium ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Rainer Haseneder, Thomas Nicolaus und meinen Brüdern Andreas und Tobias Boltze.

I.2 Lebenslauf

Name:	Carolin Regina Nicolaus (geb. Boltze)
geboren:	21.10.1977 in München
Eltern:	Irene Boltze, geb. Belzner, Arzthelferin Dipl. Kfm. Michael Boltze, Betriebswirt
1984 bis 1988	Grundschule Kirchheim bei München
1988 bis 1995	Gymnasium Kirchheim bei München
1995 bis 1997	Edith-Stein-Gymnasium, München
07/1997	Allgemeine Hochschulreife
08/1997 bis 02/2000	Ausbildung zur Buchhändlerin, Firma H. Hugendubel, München
03/2000 bis 04/2001	AuPair, Baltimore, USA
05/2001 bis 09/2001	AuPair, Reims, Frankreich
10/2001 bis 03/2002	Studium der Kommunikationswissenschaft an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
04/2002	Beginn des Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
03/2004	Ärztliche Vorprüfung
02/2005 bis 12/2006	Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation bei Prof. Dr. M. Jochum, Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
04/2008	Zweite Ärztliche Prüfung
Seit 10/2008	Assistenzärztin für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin