

Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen
und murinen mesenchymalen Stammzellen:
Analyse einzelner Signalkomponenten und deren funktioneller
Bedeutung bei Proliferation und Invasion

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Marisa Karow
aus München

2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 – März 2008

in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie

an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt

der LMU München angefertigt

(Leiterin der Abteilung: Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum)

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 20. März 2008

.....

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und ich mich nicht anderweitig ohne Erfolg einer Doktorprüfung unterzogen habe.

München, den 20. März 2008

.....

(Unterschrift)

Dissertation eingereicht am: 20. März 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2007

	Gliederung	I
	Abkürzungsverzeichnis	VI
A	Zusammenfassung	1
B	Einleitung	3
B.1	Stammzellen	3
B.1.1	Definition.....	3
B.1.2	Adulte Stammzellen.....	3
B.1.2.1	Humane mesenchymale Stammzellen.....	4
B.1.2.2	Murine mesenchymale Stammzellen.....	5
B.1.3	Therapeutische Ansätze.....	6
B.2	Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg	8
B.2.1	Wnt-Signalwege.....	8
B.2.2	Wnt/ β -Catenin-Signalweg im Überblick.....	10
B.2.3	Signalweiterleitung an der Zelloberfläche.....	11
B.2.4	Signalweg im Cytoplasma – Abbau und Akkumulation von β -Catenin.....	14
B.2.5	Signalweiterleitung im Nukleus.....	16
B.2.6	Wnt/ β -Catenin-Signalweg in mesenchymalen Stammzellen.....	18
C	Fragestellungen und Ziele der Arbeit	19
	1. Untersuchung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges hinsichtlich seiner Bedeutung für die Proliferation und Invasion von hMSC.....	19
	2. Untersuchungen zur Frizzled-Rezeptoren-Expression und Regulation von Fzd8 als Korezeptor von LRP6.....	20
	3. Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges unter Einsatz des natürlichen Inhibitors Dkk-1.....	20
	4. Komparative Analyse der Basis-Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC und mMSC sowie Etablierung des Tcf/Lef-Reportersystems in mMSC.....	20

D	Material und Methoden	21
D.1	Material	21
D.1.1	Geräte.....	21
D.1.2	Bioinformatische Hilfsmittel.....	23
D.1.3	Chemikalien und Reagenzien	24
D.1.3.1	Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken.....	24
D.1.3.2	Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken	30
D.1.3.3	Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken	31
D.1.3.4	Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken.....	34
D.2	Methoden	36
D.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	36
D.2.1.1	Methoden für die Klonierung rekombinanter Gensequenzen	36
D.2.1.2	Isolierung von RNA aus Zellen.....	37
D.2.1.3	cDNA-Synthese	38
D.2.1.4	Quantitative RT-PCR.....	38
D.2.1.5	Semiquantitative RT-PCR.....	39
D.2.2	Mikrobiologische Methoden	40
D.2.2.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Stämme.....	40
D.2.2.2	Kultivierung und Selektion transformierter <i>E.coli</i> -Stämme	40
D.2.3	Zellbiologische Methoden.....	41
D.2.3.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
D.2.3.2	Kultivierung von MSC.....	41
D.2.3.3	Splitten konfluenter Zellen.....	42
D.2.3.4	Zellzahlbestimmung.....	42
D.2.3.5	Osteogene und adipogene Differenzierung der Stammzellen.....	42
D.2.3.6	Alizarin Rot- und Oil Red O-Färbung.....	43
D.2.3.7	Lipofektion von Plasmid-DNA und siRNA.....	43
D.2.3.8	Zellinvasionsstudien	44
D.2.3.9	Proliferationsstudien.....	45
D.2.4	Proteinchemische Methoden.....	45
D.2.4.1	Isolierung von Zytoplasma- und Membranproteinen.....	45
D.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	46
D.2.4.3	Proteinnachweis mittels Western Blot.....	46
D.2.4.4	Bestimmung endogener Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz.....	47
D.2.4.5	Gaussia-Luciferase-Aktivitätsmessung in stabil transfizierten mMSC.....	48
D.2.5	Datenanalyse.....	48

E	Ergebnisse.....	49
E.1	Wnt/β-Catenin-Signalweg in hMSC.....	49
E.1.1	Aktivierungsstudien	49
E.1.1.1	Exogene Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Stimulation mit Wnt3a und LiCl	49
E.1.1.1.1	Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin	49
E.1.1.1.2	Einfluss auf die Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP.....	50
E.1.1.1.3	Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten.....	51
E.1.1.1.4	Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit.....	52
E.1.1.2	Endogene Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Knockdown von APC und Axin2.....	53
E.1.1.2.1	Einfluss auf die zelluläre Konzentration von β -Catenin und die Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP.....	53
E.1.1.2.2	Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten.....	55
E.1.2	Inhibitionsstudien	55
E.1.2.1	Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Knockdown von β -Catenin und LRP5.....	55
E.1.2.1.1	Einfluss auf die Expression von β -Catenin und LRP5.....	56
E.1.2.1.2	Einfluss auf die Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP.....	57
E.1.2.1.3	Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten.....	58
E.1.3	Analyse der Funktion von Cyclin D1 und MT1-MMP in hMSC.....	58
E.2	Wnt-Rezeptoren in hMSC	60
E.2.1	Rolle von Frizzled-Rezeptoren in hMSC	60
E.2.1.1	mRNA-Expression von Fzds.....	60
E.2.1.2	Expression und Regulation des Rezeptors Frizzled 8 in hMSC.....	61
E.2.1.2.1	Regulation der mRNA-Expression von Fzd8 durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg.....	61
E.2.1.2.2	Einfluss des Fzd8-Knockdowns auf Proliferation und Invasion	61
E.2.1.2.3	Rolle von Fzd8 für die Weiterleitung des Wnt3a-Signals.....	62

E.2.2	Rolle von LRP6 und Dkk-1.....	65
E.2.2.1	mRNA- und Proteinexpression von LRP6.....	65
E.2.2.2	Einfluss des LRP6-Knockdowns auf Proliferation und Invasion	66
E.2.2.3	Einfluss von LRP6 auf die Expression von Wnt-Zielgenen und die Weiterleitung des Wnt3a-Signals.....	67
E.2.2.4	Regulation der Expression von Dkk-1.....	69
E.2.2.5	Einfluss der Stimulation mit Dkk-1 auf Parameter der Wnt-Signalwegs-Aktivierung	69
E.2.2.6	Einfluss der Stimulation mit Dkk-1 auf die Wnt-Zielgen-Expression bei gleichzeitigem Knockdown von LRP6.....	71
E.3	Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg in mMSC.....	72
E.3.1	Aktivierungsstudien mittels Wnt3a und LiCl	72
E.3.1.1	Einfluss auf β -Catenin sowie auf Cyclin D1 und MT1-MMP.....	72
E.3.1.2	Einfluss auf das Proliferationsverhalten.....	73
E.3.1.3	Einfluss auf das Invasionsverhalten.....	74
E.3.2	Inhibitionsstudien	75
E.3.2.1	Knockdown von β -Catenin und LRP5.....	75
E.3.2.1.1	Einfluss auf Cyclin D1 und MT1-MMP.....	76
E.3.2.1.2	Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten.....	76
E.3.2.2	Knockdown von Cyclin D1: Einfluss auf die Proliferation	77
E.3.2.3	Knockdown von MT1-MMP: Einfluss auf das Invasionsverhalten	78
E.3.3	Frizzled-Rezeptor-Expression in mMSC.....	79
E.3.4	Tcf/Lef-Reporter-Analysen	80
E.3.4.1	Klonierung eines Vektors zur Analyse β -Catenin-abhangiger Reporter-Expression.....	80
E.3.4.2	Stabile Transfektion von mMSC mit pcDNA3.1pTA _{Min} -TOPGLuc.....	81
E.3.4.3	Verifizierung der Wnt3a-Effekte hinsichtlich der Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP	83
E.3.4.4	Wnt3a-Klonierung und transiente Transfektion von Reporter-mMSC mit pN3-Wnt3a.....	84

F	Diskussion	86
F.1	Wnt/β-Catenin-Signalweg in hMSC.....	87
F.1.1	Aktivierung des Signalweges.....	87
F.1.2	Inhibition des Signalweges.....	90
F.1.3	Rolle des Wnt-Rezeptors Fzd8.....	91
F.1.4	Rolle von LRP6 und Dkk-1.....	94
F.2	Wnt/β-Catenin-Signalweg in mMSC.....	98
F.2.1	Aktivierung des Signalweges.....	99
F.2.2	Inhibition des Signalweges.....	101
F.2.3	Überexpression von Wnt3a in mMSC.....	102
F.3	Komparative Analyse der Expression von Frizzled-Rezeptoren in hMSC und mMSC	103
F.4	Resümee des Wnt-Signalweges in MSC	104
G	Schlussfolgerungen und Ausblick	106
H	Literaturverzeichnis.....	108
I	Curriculum Vitae.....	120
J	Danksagung.....	123

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen für Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges

APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
Arm	<i>armadillo</i>
β -Cat	β -Catenin
β -TrCP	β -transducin-repeat containing protein
CK	Casein Kinase
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
DEP	<i>Dvl, Egl, Pleckstrin</i>
DIX	<i>Dvl and Axin</i>
Dkk	<i>dickkopf</i>
Dvl	<i>dishevelled</i>
Fzd	Frizzled-Rezeptor
Gro	Groucho
GSK	<i>glycogen synthase kinase</i>
Lef	<i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
Lgs	<i>legless</i>
LRP	<i>low-density-lipoprotein receptor related protein</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PDZ	<i>postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1</i>
Porc	<i>porcupine</i>
Pygo	Pygopus
Ror	<i>orphan tyrosine kinase</i>
R-Spo	R-Spondin
sFRP	<i>secreted frizzled-related protein</i>
Tcf	<i>T cell-specific transcription factor</i>
TLE	<i>transducin-like enhancer of split</i>
Wg	<i>wingless</i>
Wif	<i>wnt inhibitory factor</i>
Wnt	<i>wingless and Int-1</i>

Allgemein gültige und anerkannte Abkürzungen für Proteine und andere Moleküle

ALAS1	<i>aminolevulinic acid synthase 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cad	Cadherin
Cam K	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
CRD	<i>cysteine rich domain</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
JNK	Jun-N-terminale Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT1-MMP	<i>membrane type 1-MMP</i>
PDE	Phosphodiesterase
PI ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
TGF	<i>tissue growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>

Weitere in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen

aMEM	<i>minimal essential medium alpha</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ds	doppelsträngig
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
ER	endoplasmatisches Reticulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
for	<i>forward</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
hMSC-L	hMSC der Firma Lonza
hMSC-P	hMSC aus dem Prockop Labor
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HSC	hämatopoetische Stammzellen
IMDM	<i>iscove's modified dulbecco's media</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mMSC	murine mesenchymale Stammzellen
Nc-siRNA	Negativ-Kontroll siRNA
NET	NaCl, EDTA, Triton X-100
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NP-40	Nonident P-40
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline with Tween-20</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rev	<i>reverse</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RT-PCR	<i>real time PCR</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	<i>tris buffered saline with Tween-20</i>
qRT-PCR	quantitative RT-PCR

Abkürzungen für Einheiten

bp	Basenpaare
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
RLU	<i>relative light units</i>
SD	<i>standard deviation</i>
U	Units
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenanteil in Prozent
w/v	Gewichtsanteil in Prozent

A Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) stellen aufgrund ihres Differenzierungspotentials einen großen Hoffnungsträger in der regenerativen Medizin dar. Entsprechend zahlreicher zell- und tierexperimenteller Untersuchungen scheint die klinische Anwendung dieser adulten Stammzellpopulation im Rahmen einer Zelltherapie in greifbare Nähe zu rücken, wobei MSC als Basis für einen Patienten-spezifischen Zell- und Gewebeersatz dienen könnten. In welcher Weise die regenerative Kapazität der MSC durch spezielle Signaltransduktionsmechanismen gesteuert wird, ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Vor diesem Hintergrund wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg sowohl in humanen (hMSC) als auch in murinen (mMSC) mesenchymalen Stammzellen untersucht. Diesem komparativen Ansatz lag das Ziel zugrunde, Gemeinsamkeiten und Unterschiede in diesen beiden Zellentitäten zu evaluieren, um damit langfristig den Grundstein für die Übertragbarkeit von Daten aus nachfolgend geplanten murinen *in vivo*-Modellen auf die klinische Situation legen zu können.

Hierzu wurden zunächst die Basis-Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges vergleichend analysiert. Eine Aktivierung des Wnt-Signalweges wurde über Stimulation mit Wnt3a bzw. LiCl in beiden Zellspezies sowie in einem RNA-Interferenz (RNAi)-basierten Ansatz durch Knockdown der für den β -Catenin-Abbaukomplex essentiellen Proteine APC und Axin2 in hMSC erreicht, während eine Inhibition durch die Transfektion von *small interfering RNAs* (siRNAs) gegen das transkriptionsaktivierende Protein β -Catenin bzw. den Wnt-Korezeptor LRP5 induziert wurde. Dabei zeigten sich neben zahlreichen Gemeinsamkeiten unter anderem hinsichtlich der Proliferation auch klare Unterschiede zwischen hMSC und mMSC. Dies betraf insbesondere die Steuerung von Matrix-Metalloproteinase (MMP)-medierten Invasionsprozessen, die im Falle von hMSC eine deutliche Wnt-Abhängigkeit aufwiesen, während die Invasionsfähigkeit von mMSC nicht durch den Wnt-Signalweg reguliert wurde. Diese Unterschiede in den zellulären Phänotypen spiegelten sich vorwiegend in einer Spezies-divergenten Regulation der Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP wider, da nur in hMSC die Aktivierung der Wnt-Signaltransduktionskaskade mit einer vermehrten MT1-MMP-Expression einherging.

Darüber hinaus konnte das Tcf/Lef-Reporter-System in mMSC etabliert werden, das die Quantifizierung β -Catenin-abhängiger Expression ermöglicht. Dies erfolgt mit Hilfe eines Reporterproteins, dessen Expression nur nach Translokation von β -Catenin in den Zellkern induziert wird. Mit diesem System konnte unter anderem auch der Nachweis der funktionellen Plasmid-kodierten Wnt3a-Expression erbracht werden.

Derartig generierte Reporter-mMSC könnten vor allen Dingen hinsichtlich einer Anwendung im *in vivo*-Mausmodell von großem Vorteil sein, da Wnt-aktive MSC mittels eines *in vivo*-Imaging-Systems visualisiert werden können, um ihre Rolle bei Geweberegenerationsprozessen aufzuklären.

In einem weiteren Teilprojekt wurde die Wirkung von Dkk-1, einem Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalweges, in hMSC eingehend untersucht. Dabei stand die Analyse der Wechselwirkungen zwischen Dkk-1 und seinem Rezeptor LRP6 im Vordergrund. Versuche zum LRP6-Knockdown brachten ein komplexes Regulationssystem zutage, das eine feinjustierte Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen impliziert. Die Ergebnisse zusätzlicher RNAi-basierter Experimente wiesen außerdem auf eine funktionelle Divergenz von LRP5 und LRP6 hin. So vermittelt der Wnt-Korezeptor LRP5 vornehmlich aktivierende Signale, wie sie z.B. durch Wnt3a ausgelöst werden, während LRP6 hauptsächlich eine repressive Funktion beispielsweise durch Bindung von Dkk-1 zuzuordnen ist.

Da neben den LRP-Rezeptoren auch Frizzled-Rezeptoren (Fzd) eine wesentliche Rolle bei der Wnt-Signalerfassung spielen, wurde zunächst das Fzd-Expressionsprofil in hMSC und mMSC mittels semiquantitativer RT-PCR-Analysen näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle bisher bekannten 10 Fzds auch in MSC exprimiert werden, dieses jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Zudem ergaben Wnt3a-Stimulationsexperimente in hMSC, dass die Expression von Fzd8 negativ durch Wnt3a beeinflusst wird. Um die Bedeutung von Fzd8 näher zu evaluieren, wurden daher Fzd8-Knockdown-Experimente durchgeführt. Diese ließen erkennen, dass die hMSC-Proliferation maßgeblich von der Fzd8-Expression abhängt, wobei allerdings Fzd8 keinen direkten Rezeptor für Wnt3a darstellt.

Zusammenfassend spiegeln die in der vorliegenden Promotionsarbeit erhobenen Daten zum Teil eindeutige Unterschiede zwischen basalen Wnt-regulierten Prozessen in hMSC und mMSC wider, denen insbesondere bei der präklinischen Validierung von therapeutischen Strategien in Mausmodellen eine tragende Rolle zukommt. Da der Wnt/ β -Catenin-Signalweg maßgeblich an der Steuerung des invasiven Verhaltens von hMSC beteiligt ist, wie dies in ähnlicher Weise von anderen Forschergruppen auch für die Metastasierung von Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, erscheint es zukünftig von vorrangigem Interesse, die hier erhobenen *in vitro*-Daten in einem *in vivo*-Mausmodell zu evaluieren. In diesem Kontext kann allerdings nur durch einen komparativen Ansatz, wie er dieser Arbeit zugrunde liegt, die Basis für ein Spezies-relevantes *drug design* bezüglich des Wnt-Signalweges entwickelt werden, um schließlich aussagekräftige Stammzelltherapien bzw. Anti-Tumorstrategien entwickeln zu können.

B Einleitung

B.1 Stammzellen

B.1.1 Definition

Die Begriffsbestimmung der Stammzelle basiert auf der Fähigkeit zur Selbsterneuerung gepaart mit der Eigenschaft, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Weissman, 2000; Cai et al., 2004). Dies setzt eine gleichzeitige symmetrische (Selbsterneuerung) und asymmetrische (Differenzierung) Zellteilung voraus (Morrison et al., 1997; Martin-Rendon and Watt, 2003). Darüber hinaus gibt es kontroverse Definitionen, die neben einer lebenslangen Selbsterneuerungsfähigkeit einen substantiellen Beitrag zur Geweberegeneration fordern (Cai et al., 2004). Derartige Zellen wurden bislang in zahlreichen Gewebetypen des menschlichen Körpers gefunden (Korbling and Estrov, 2003).

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die entwicklungsgeschichtliche Herkunft der Stammzellen. So unterscheidet man embryonale Stammzellen (ES) von solchen, die in adulten Geweben zu finden sind. 1981 konnten erstmalig ES-Zellen aus der inneren Zellmasse einer murinen Blastocyste gewonnen und *in vitro* kultiviert werden, was die Grundlage für die Generierung von ES-Zelllinien darstellt (Evans and Kaufman, 1981). Aus humanen Blastocysten wurden ES-Zellen dagegen erst in den späten 90er Jahren isoliert (Thomson et al., 1998). ES-Zellen bezeichnet man als pluripotent, was die Fähigkeit beinhaltet, in alle embryonale Gewebe zu differenzieren, wohingegen eine befruchtete Eizelle als totipotent gilt, da sie auch extraembryonale Gewebe (Trophoektoderm) bilden kann.

In der Embryonalentwicklung erfolgt zunächst die Spezifikation in die drei embryonalen Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. In der Folge werden die daraus entstehenden Zellen als multipotent bezeichnet, da sie bereits ein eingeschränkteres Differenzierungspotential aufweisen. Dieser Stammzellhierarchie weiter folgend werden die Zellen als oligo- und unipotent bezeichnet, wobei allerdings eine genaue Abgrenzung nur sehr schwer zu finden ist. So führte beispielsweise die Entdeckung der *multipotent adult progenitor cells* (MAPC) (Jiang et al., 2002a) zur Konfusion dieser Begriffsbestimmungen, da hier die bis dato angenommene Oligopotenz von im Knochenmark residierenden Stammzellen widerlegt wurde. Die MAPC weisen nämlich offensichtlich multipotente Eigenschaften auf.

B.1.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen zeichnen sich neben ihrer Zugehörigkeit zu einem Gewebe des postnatalen Organismus insbesondere dadurch aus, dass sie in verschiedene Zelltypen des entsprechenden Gewebes differenzieren können (Korbling and Estrov, 2003). Solche Gewebe-spezifischen adulten Stammzellen sind vor allem für Haut, Leber, Muskeln und das Knochenmark beschrieben worden (Korbling and Estrov, 2003). Darüber hinaus scheinen komplexe Organe wie die Lunge oder die Niere nicht durch einen einzigen Stammzelltyp aufrechterhalten zu werden. Vielmehr wird das Zusammenwirken verschiedener Stammzelltypen hinsichtlich der Gewebe-Homöostase dieser Organe diskutiert (Cantz et al., 2007).

Die Fähigkeit der Stammzellen, in verschiedene Richtungen zu differenzieren und damit in den Zellzyklus einzutreten oder „in Ruhe“ (*quiescence*) zu verbleiben, wird durch das Zusammenspiel multipler Faktoren reguliert, um die Balance zwischen Selbsterneuerung und asymmetrischer Zellteilung zu halten. So gibt es Gentranskripte, die schon vor der Zellteilung asymmetrisch in den Vorläuferzellen vorhanden sind und während der Mitose auch unterschiedlich zwischen den Tochterzellen aufgeteilt werden. Zudem kann man von einem speziellen Genexpressionsmuster ausgehen, das in Stammzellen für die Steuerung symmetrischer Zellteilungen verantwortlich ist. Darüber hinaus existieren zahlreiche externe Faktoren in der Stammzellnische, die Selbsterneuerung und asymmetrische Zellteilung steuern, wie z.B. *notch*, *numb* und *piwi* (Cai et al., 2004).

B.1.2.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Grundsätzlich können im Knochenmark zwei Stammzellpopulationen unterschieden werden, nämlich die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und die mesenchymalen Stammzellen (MSC). Im Rahmen der Isolierung der beiden Stammzellpopulationen aus dem Knochenmark erfolgt eine basale Unterscheidung hauptsächlich über die selektive Adhärenz der MSC an Plastik, zu der HSC nicht befähigt sind.

Für beide Stammzellpopulationen wurde ein multipotentes Differenzierungspotential beschrieben. So wurde für HSC, die bislang die am besten charakterisierte Stammzellpopulation darstellen, auch eine Beteiligung an der Regeneration von nicht-hämatopoetischen Geweben wie Haut, Lungenepithel, Leberparenchym, Nierenepithel, Pankreas und Skelettmuskel nachgewiesen (Herzog et al., 2003; Grove et al., 2004). Bei MSC konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Fähigkeit in Knochen, Knorpel, Sehne, Muskel und Fettgewebe zu differenzieren gezeigt werden (Baksh et al., 2004).

Interessanterweise ist in der Literatur eine morphologische Heterogenität der humanen mesenchymalen Stammzell-Population (hMSC) beschrieben (Pittenger et al., 1999; Muraglia et al., 2000), die einen Grund für die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Subpopulationen darstellen könnte. Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Aufklärung dieser Heterogenität stammen von der Arbeitsgruppe von Darwin Prockop, die zu den bis dato bekannten zwei Untergruppen eine dritte deklarierte (Colter et al., 2001; Smith et al., 2004) und ihre zellulären Eigenschaften näher charakterisierte. So kann man in einer hMSC-Population die spindelförmigen von den großen kuboidalen, abgeflachten Zellen (Colter et al., 2000) und den sehr kleinen RS-Zellen (*rapidly self-renewing*) unterscheiden (Colter et al., 2001).

Diese Populationsheterogenität, von der mit hoher Wahrscheinlichkeit auch *in vivo* auszugehen ist, impliziert ein Modell für die Differenzierung der Zellen *in vivo* (Abb. B-1), wonach es verschiedene Reifestadien der hMSC gibt, die unterschiedlich potente Vorläuferzellen mit variablem Differenzierungspotential beinhalten. Dies hat zur Folge, dass während der Reifung in eine bestimmte Richtung die Fähigkeit zur Selbsterneuerung gemeinsam mit dem uneingeschränkten Differenzierungspotential abnimmt (Baksh et al., 2004).

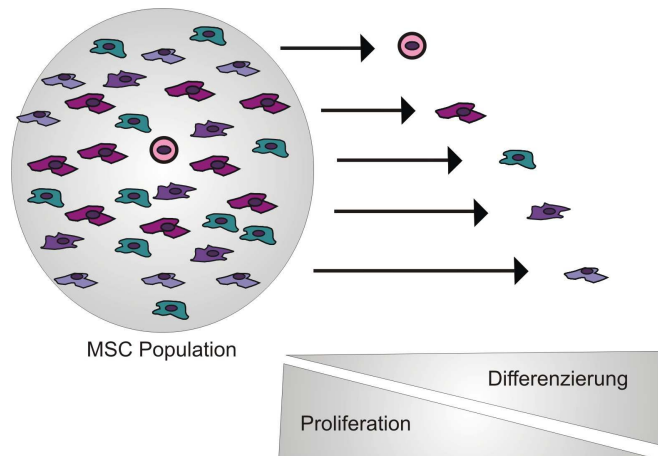


Abb. B-1: Modell der Differenzierung von hMSC *in vivo*.

Die hMSC-Population besteht *in vivo* aus Zellen mit verschiedenen Differenzierungspotentialen. Von oben nach unten dargestellt ist die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Richtungen vermindert. Des Weiteren nimmt während der Differenzierung das Proliferationsvermögen ab. (modifiziert nach Baksh et al., 2004)

Die Identifizierung von hMSC mit Hilfe eines einzigen definierten Markers ist auch Jahre nach ihrer Erstbeschreibung (Friedenstein et al., 1970) nicht möglich. Als Goldstandard galt und gilt selbst heute noch der CFU-F (*colony forming unit-fibroblast*)-Assay. Dieser dient dem Nachweis adherenter, spindelförmiger Zellen, die die Fähigkeit zum klonalen Wachstum aufweisen. Da die Nomenklatur mit der Entdeckung zahlreicher Subpopulationen sowie unterschiedlicher Isolierungsmethoden inhomogen ist, wird die selektive Adhärenz an Plastik als Hauptkriterium verwendet (Horwitz et al., 2005). Aufgrund eines mangelnden singulären Markers steht der definitive Beweis der Existenz der hMSC *in vivo* noch aus. Nichtsdestotrotz können diese Zellen aus adulten Organismen isoliert, *ex vivo* kultiviert und angereichert werden, wodurch sie ein vielversprechendes Werkzeug in Zell-basierten Therapieansätzen darstellen (Oreffo et al., 2005).

Ausserdem konnte die Arbeitsgruppe um Darwin Prockop zeigen, dass durch die Kultivierung von hMSC früher Passagen in Serum-freiem Medium ohne Zusatz von Zytokinen und Wachstumsfaktoren eine Subpopulation mit außergewöhnlichen Eigenschaften selektiert werden kann (Pochampally et al., 2004). Diese Zellen überdauerten eine weitere zwei- bis vierwöchige Kultivierung unter Serum-freien Bedingungen, wiesen nach diesem Zeitraum lange Telomere auf und zeigten eine erhöhte Expression der embryonalen Stammzellmarker Oct-4 (Pesce and Scholer, 2001) und hTERT (Hiyama and Hiyama, 2007), die in adulten Stammzellpopulationen nicht oder nur in seltenen Ausnahmefällen exprimiert werden (Beltrami et al., 2007; Zangrossi et al., 2007). Die Gesamtheit dieser Faktoren macht mesenchymale Stammzellen zu einem außerordentlich interessanten Forschungsobjekt, insbesondere auch deshalb, weil sie möglicherweise aufgrund ihrer multipotenten Differenzierungsfähigkeit eine Alternative zur Verwendung der ethisch kontrovers diskutierten ES-Zellen darstellen.

B.1.2.2 Murine mesenchymale Stammzellen

Murine MSC, ursprünglich auch als *fibroblast precursors* bezeichnet, wurden erstmals in den 70er Jahren beschrieben und fielen durch ihre Eigenschaft auf, Kolonien zu bilden (Friedenstein et al., 1976). Die primäre Isolierung muriner mesenchymaler Stammzellen (mMSC) erfolgte wie auch bei den humanen Pendanten über selektive Adhärenz an Plastik. Zudem konnte die *in vitro*-Differenzierung innerhalb des mesodermalen Keimblatts in Knochen, Knorpel, Fett und Muskel gezeigt werden (Pereira et al., 1995).

Ebenfalls analog zu den hMSC war die Anreicherung einer Subpopulation möglich, die als murine MAPC gelten (Jiang et al., 2002b). Allerdings war die Isolierung von mMSC aus Knochenmark problematisch, da ein großer Anteil kontaminierender hämatopoetischer Zellen, B-Zell-Vorläufer sowie Granulozyten- und Monozyten-Vorläuferzellen die selektive Anreicherung erschwerte. So war der mMSC-Anteil mit 10 – 20 % gemessen an der gesamten adhärenz Zellenpopulation zunächst sehr gering (Phinney et al., 1999).

Demzufolge beschäftigten sich einige Arbeitsgruppen mit der Optimierung reproduzierbarer Isolierungsprotokolle, um eine effiziente Anreicherung muriner MSC zu gewährleisten (Meirelles and Nardi, 2003; Peister et al., 2004). Dabei zeigten sich Unterschiede in den gleichen Zellen verschiedener Maus-Inzuchtstämme, die hauptsächlich in ihrem Wachstumsverhalten sowie in der differentiellen Expression der Oberflächenmarker CD34, *stem cell antigen-1* (Sca-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) lagen. Des Weiteren benötigen MSC aus unterschiedlichen Mäusestämmen auch eine unterschiedliche Zusammensetzung des Kultivierungsmediums (Peister et al., 2004).

Ein systematischer Vergleich zwischen MSC humanen und murinen Ursprungs erfolgte bislang nicht, allerdings wurden partiell einzelne zelluläre Eigenschaften verglichen. So konnte z.B. ein Unterschied im Wachstumsverhalten der Zellen festgestellt werden, wonach hMSC etwa 40 – 50 Zellteilungen durchlaufen, bevor sie die Proliferation einstellen (Stenderup et al., 2003), während mMSC mit mehr als 100 Zellteilungen ein ausgeprägteres Wachstumspotential zeigen (Meirelles and Nardi, 2003).

Eine komparative Untersuchung der an den phänotypischen Eigenschaften wie Proliferations- oder Invasionsverhalten beteiligten Signaltransduktionswege in hMSC und mMSC stand zu Beginn der Dissertationsarbeit noch vollkommen aus und sollte deshalb einen wesentlichen Schwerpunkt des Promotionsprojektes bilden.

B.1.3 Therapeutische Ansätze

Der Einsatz regenerativer Stammzellen in Patienten mit hereditären Erkrankungen, Traumen, Krebs oder chronischen Leiden (wie z.B. Osteoporose) ist das vordringliche Ziel der Stammzellforschung. Neben der angestrebten Verwendung von pluripotenten ES-Zellen, die aufgrund ihrer ethisch anfechtbaren Gewinnung aus potentiell lebensfähigen Embryonen allerdings höchst kontrovers diskutiert werden, rückt der Einsatz autologer adulter multipotenter Stammzellen zunehmend in den Fokus der therapieorientierten Stammzellforschung.

Ein wesentlicher Vorteil von adulten Stammzellen im Vergleich zu ES-Zellen liegt auch in ihrer Immuntoleranz nach autologer Transplantation. Die meisten bisher vollzogenen therapeutischen Anwendungen wurden mit HSC durchgeführt. Schon vor knapp 40 Jahren glückte dem amerikanischen Hämatologen Edward Donell Thomas die erste Knochenmarkstransplantation, wofür er 1990 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurde (Hong et al., 1968; Thomas et al., 1975). Die Knochenmarkstransplantation ist mittlerweile ein probates Verfahren, wenn aufgrund einer Krebserkrankung eine Chemotherapie nötig wird, die das Knochenmark schädigen kann, oder im Falle von Leukämien Spender-Knochenmark transplantiert werden muss. Die früher durchgeführte Entnahme des Knochenmarks aus dem Beckenkamm wird heute meist durch

die Gewinnung der HSC aus peripherem Blut der Spender ersetzt, die hierzu eine Woche vor Entnahme mit dem Wachstumshormon G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) stimuliert werden (Sung and Dror, 2007). Durch diese Behandlung werden die Stammzellen mobilisiert, was mit ihrem vermehrten Übertritt aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf einhergeht. Dies ist ein eindrucksvolles Beispiel für das Potential einer endogenen Mobilisierung von adulten Stammzellen, ohne sie zwingend nach *ex vivo*-Isolierung noch zusätzlich expandieren zu müssen.

Auch MSC wurden bereits erfolgreich in präklinischen und klinischen Studien angewandt. Das in diesem Zusammenhang wohl prominenteste Beispiel ist die pädiatrische Studie von Horwitz, in der isolierte, allogene hMSC bei *Osteogenesis imperfecta*-Patienten transplantiert wurden (Horwitz et al., 2002). Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung, bei der aufgrund eines genetisch bedingten Typ I Kollagen-Defekts schmerzhafte Knochenbrüche, verzögertes Knochenwachstum, Osteopenie und Deformationen des Skelettes auftreten (Martin and Shapiro, 2007). Jeder der sechs Patienten erhielt zweimalig eine Infusion allogener hMSC nachdem eine Standard-Knochenmarks-Transplantation vorangegangen war. Fünf der sechs behandelten Patienten zeigten ein Anwachsen der infundierten Zellen in Knochen, Haut und Knochenmark sowie eine Beteiligung an der Bildung von neuem Knochengewebe. Die Detektion dieser Zellen war aufgrund einer im Vorfeld durchgeführten retroviral-basierten Modifikation der hMSC mit einem Neomycin-Resistenzgen möglich. In dieser Studie konnten keinerlei toxische Effekte aufgrund der genetischen Veränderung beobachtet werden (Horwitz et al., 2002).

Dass die retrovirale Transduktion allerdings auch erhebliche Gefahren birgt, hat eine Studie unter der Leitung von Prof. Alan Fischer gezeigt, der pädiatrische Patienten mit einem schweren Immundefekt (SCID-X1 = *severe combined immune deficiency*) behandelt hat (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Hierbei wurde der Gendefekt der Gamma-C-Kette in CD34⁺-Knochenmarksstammzellen mittels retroviraler Gentherapie behoben. Der anfänglich vielversprechende Erfolg wurde allerdings wegen der Ausbildung von Leukämien in den beiden jüngsten Patienten deutlich eingeschränkt. Bei diesen Patienten kam es nämlich zur Insertion des retroviralen Vektors in den Bereich des LMO2-Protoonkogen-Promotors, was zu einer vermehrten Expression von LMO2 führte. Dies wiederum war mit der Entstehung einer Leukämie assoziiert (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Die Gefahr der malignen Transformation genetisch manipulierter und reimplantierter Stammzellen stellt deshalb ein noch nicht gelöstes Problem bezüglich einer therapeutischen Anwendung derart veränderter adulter Stammzellen dar (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Eine wichtige Alternative bietet hierzu die endogene und gezielte Aktivierung von Stammzellen in ihrer Nische. In diesem Zusammenhang sind die Signaltransduktionsmechanismen, die diese Prozesse steuern von essentiellem Interesse. Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, dem hierbei eine große Bedeutung zukommt, ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg.

B.2 Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg

B.2.1 Wnt-Signalwege

Die Bezeichnung Wnt setzt sich aus den Begriffen Wg für *wingless* und Int-1 zusammen. Ersteres stammt aus Experimenten mit *Drosophila melanogaster*, in denen eine Mutation im Wg-Gen zu einer flügellosen Variante führte. Int-1 hingegen ist abgeleitet vom Int-1-Gen, das mittlerweile Wnt-1 genannt wird. Dessen Aktivierung kann durch Integration des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) induziert werden, was die Entstehung von Brustkrebs in einem Mausmodell hervorruft (Nusse and Varmus, 1982). Der Wnt-Signalweg ist eine im gesamten Tierreich stark konservierte Signaltransduktionskaskade, durch die grundlegende zelluläre Interaktionen in multizellulären Organismen gesteuert werden. Die Existenz dieses Signalweges in der Seeanemone bis hin zu den Säugetieren deutet darauf hin, dass die Diversität der zahlreichen Wnt-Liganden eine frühe Entwicklung in der Evolution der Metazoa war, die etwa 650 Millionen Jahre zurückliegt (Gordon and Nusse, 2006; Kusserow et al., 2005). Entsprechend werden durch den Wnt-Signalweg viele grundlegende zelluläre Prozesse wie z.B. die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung oder Überleben versus Apoptose gesteuert (Hoppler and Kavanagh, 2007; Logan and Nusse, 2004).

Sowohl im humanen als auch im murinen System unterscheidet man 19 verschiedene Wnt-Liganden. Die Zugehörigkeit zu dieser Familie Cystein-reicher sezernierter Liganden erfolgt hauptsächlich nach ihrer Primärstruktur und nicht aufgrund funktioneller Gemeinsamkeiten. Demnach wundert es nicht, dass verschiedene Wnts mit einer Vielzahl unterschiedlicher Aktivitäten und Signalwegen assoziiert werden. Die klassische Einteilung in kanonische und nicht-kanonische Wnts basierte auf der Fähigkeit dieser Faktoren die Transformation von C57MG-Zellen, einer murinen Brustepithel-Zelllinie, zu induzieren (Wong et al., 1994). So wurde hoch transformierend gleichgesetzt mit kanonisch, wobei in dieser Gruppe Wnt1, 3, 3a und 7a enthalten sind. Als nicht-kanonisch - und damit nur schwach oder gar nicht transformierend - wurden Wnt2, 4, 5a, 5b, 6, 7b und 11 bezeichnet. Darüber hinaus glaubte man zunächst auch, dass diese zwei Klassen von Wnt-Liganden über verschiedene intrazelluläre Mechanismen agieren. In der Zwischenzeit wurde diese strikte Unterteilung allerdings aufgegeben, da man beispielsweise für Wnt5a entsprechend seiner Bindung an unterschiedliche Rezeptoren die Fähigkeit gefunden hat, β -Catenin-abhängige, kanonische bzw. β -Catenin-unabhängige, nicht-kanonische Signalwege zu induzieren (Mikels and Nusse, 2006).

Charakteristisch für Wnt-Proteine ist eine N-terminale Signalsequenz sowie eine hoch konservierte Verteilung von 23 Cysteinen und potentielle N-Glykosylierungsstellen. Ausserdem werden zahlreiche Vertreter der Wnt-Familie posttranslational modifiziert. Sie werden einerseits glykosyliert und andererseits palmytoyliert, wie es für Wnt3a (Willert et al., 2003; Takada et al., 2006) und Wnt5a (Kurayoshi et al., 2007) bekannt ist. So weiß man im Falle von Wnt3a, dass es in das Endoplasmatische Reticulum (ER) transloziert wird, wo auch die N-Glykosylierung erfolgt. Dies ist ein entscheidender Punkt für die Sekretion von Wnt3a. Zwar spielt die Lipidation durch Anfügen von Palmitat-Resten am Cys77 für die Glykosylierung keine tragende Rolle, allerdings ist die dadurch entstehende Hydrophobizität wichtig für die molekulare Funktion von Wnt3a. Neueste Daten zeigen, dass die Glykosylierung der Palmytoylierung vorangeht und beides essentiell für die Sekretion von aktivem Wnt3a ist (Komekado et al., 2007).

Die Signale, die über die extrazelluläre Bindung der bisher bekannten 19 Wnt-Liganden hervorgerufen werden, resultieren entweder im kanonischen oder in nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen. Auch wenn diese Unterscheidung nicht immer klar getroffen werden kann, so geht man doch meist von drei unterschiedlichen Wegen aus (Abb. B-2), wobei der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem kanonischen/ β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg gelegt wurde (Abb. B-2, links). In Abwesenheit des Wnt-Stimulus wird β -Catenin im Abbaukomplex phosphoryliert und nach Ubiquitinierung durch das Proteasom abgebaut.

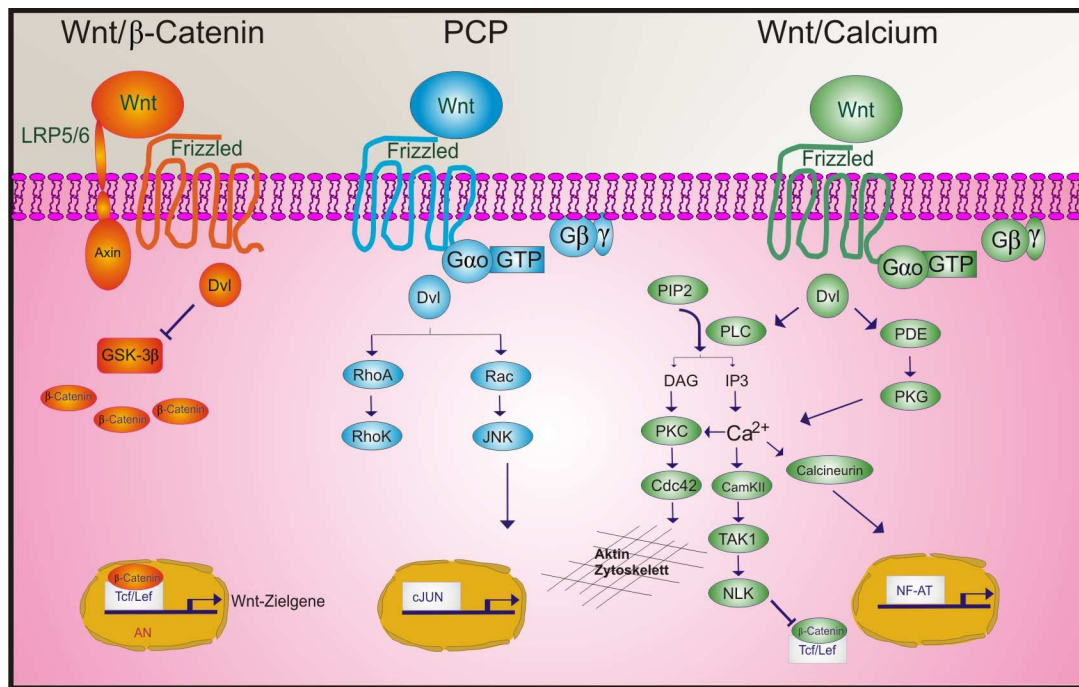


Abb. B-2: Schematische Zusammenfassung der Wnt-Signalwege Wnt/ β -Catenin, PCP und Wnt/Calcium.

(Detaillierte Erklärung im Text)

Die anderen Wege, die in weiten Teilen noch unerforscht sind und nur schwer voneinander abgegrenzt werden können, sind der *planar cell polarity* (PCP)-Signalweg (Abb. B-2, Mitte) und der Wnt/Calcium-Signalweg (Abb. B-2, rechts), der partiell über die Rekrutierung von trimeren G-Proteinen gesteuert wird (Semenov et al., 2007). Sie resultieren nicht in der Akkumulation des cytoplasmatischen β -Catenins, was den größten Unterschied zum kanonischen Signalweg darstellt. Vielmehr kommt es zur Aktivierung verschiedener Mechanismen, die teilweise vom *second messenger* Calcium abhängig sind.

Ein wichtiges Protein in allen drei Wnt-Signalwegen ist das Phosphoprotein Dvl (*dishevelled*), das Signale in drei separate Wnt-Signalwege, demnach sowohl kanonisch als auch nicht-kanonisch, weiterleiten kann. In Säugetieren gibt es insgesamt drei Dvl-Proteine (Dvl-1, Dvl-2, Dvl-3), deren struktureller Aufbau hoch konserviert ist und die jeweils aus drei Domänen (DIX, PDZ und DEP) bestehen. Nach Wnt-Bindung an die Zelloberfläche interagiert Dvl über seine DIX-Domäne mit Axin und die PDZ-Domäne mit CKI (*casein kinase I*) und GSK-3 β (*glycogen synthase kinase*) (Habas and Dawid, 2005). Darüber hinaus ist der genaue Mechanismus der Dvl-Wirkung allerdings nicht bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine nukleäre Lokalisation von Dvl für dessen Funktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg notwendig ist (Itoh et al., 2005).

Der ursprünglich in *Drosophila* entdeckte PCP-Signalweg, der vor allem während der embryonalen Gastrulation eine Rolle spielt, wird über Mitglieder der Frizzled Rezeptor (Fzd) Familie vermittelt, die die Jun-N-terminale Kinase (JNK) über Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) aktivieren (Adler, 2002) und cJUN (*jun oncogene*)-abhängige Transkription vermitteln. Ein zentraler Mediator hierbei ist Dvl, das zur Aktivierung von RhoA (*Ras homologous A*) und damit der Rho K (*Rho associated kinase*) führt. Die Initiation dieser Prozesse beispielsweise durch Bindung von Wnt11 dient der Kontrolle der Zellmigration und -polarität.

Im Wnt/Calcium-Signalweg kommt es über die Bindung diverser Wnts an Fzds vermutlich unter Beteiligung heterotrimerer GTP-bindender Proteine zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) sowie über die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zur Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CamKII). Zudem kann die cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*)-spezifische Phosphodiesterase (PDE) aktiviert werden, wodurch das zelluläre cGMP vermindert und die PKG (*protein kinase g*) inhibiert wird. Dies führt ebenfalls zur Erhöhung des Calciumspiegels, was wiederum CamKII und die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) moduliert, der z.B. in der Embryogenese entscheidend mitwirkt. Über PKC scheint Cdc42 (*cell division cycle 42 protein*) aktiviert zu werden, was die Zelladhäsion und Gewebeseperation während der Vertebraten-Gastrulation reguliert. Durch CamKII wird eine Phosphorylierungskaskade über TAK1 (TGF- β *activated kinase 1*) und NLK (*nemo-like kinase*) initiiert, die letztlich zur Inhibition des β -Catenin-Signalweges führt. Eine Rolle für diesen Wnt/Calcium-Signalweg wurde vor allen Dingen in Gastrulationsprozessen von *Xenopus* beschrieben, allerdings ist über seine biologische Funktion in Säugetieren sehr wenig bekannt.

Im Falle einiger Komponenten wie z.B. Fzd oder auch Dvl konnte eine überlappende Funktion im kanonischen (siehe B.2.2) und in den nicht-kanonischen Signalwegen gezeigt werden, wobei die Unterscheidung in den meisten Fällen noch nicht möglich ist (Habas and Dawid, 2005). Dementsprechend ist auch der genaue Mechanismus, durch den einundderselbe Fzd einmal den kanonischen und einmal den nicht-kanonischen Signalweg induzieren kann, nicht bekannt. Allerdings deuten einige Daten darauf hin, dass die Interaktion des(der) Fzd(s) mit LRP5/6 (*low-density-lipoprotein receptor related protein*) von vorrangiger Bedeutung ist, wobei der Rezeptorkomplex vielmehr als der Ligand selbst über den Signalweg zu entscheiden scheint (Liu et al., 2005).

B.2.2 Wnt/ β -Catenin-Signalweg im Überblick

Im kanonischen, β -Catenin-abhängigen Signalweg (Abb. B-3) führt die Abwesenheit des Wnt-Signals zu einer Degradation des β -Catenin-Proteins im Cytoplasma. Dies wird durch den sog. Abbaukomplex gewährleistet, der in der Hauptsache aus den Proteinen APC (*adenomatous polyposis coli*), Axin und GSK-3 β besteht, was schließlich zu einer Phosphorylierung von β -Catenin führt. Nach Ubiquitinierung wird β -Catenin durch das Proteasom abgebaut (Abb. B-3, links).

Dieser Zustand wird durch die Interaktion des Wnt-Liganden mit seinem heterodimeren Rezeptor (Fzd/LRP) an der Zelloberfläche unterbrochen und bewirkt nach Akkumulation schließlich die Translokation des hypophosphorylierten β -Catenins in den Zellkern. Dort wird die Expression der sog. Wnt-Zielgene wie beispielsweise Cyclin D1, MT1-MMP (*membrane-type 1-matrix metalloproteinase*), MMP-7 oder Dkk-1 (Dickkopf) mittels der Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie (*T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*) induziert (Abb. B-3, rechts).

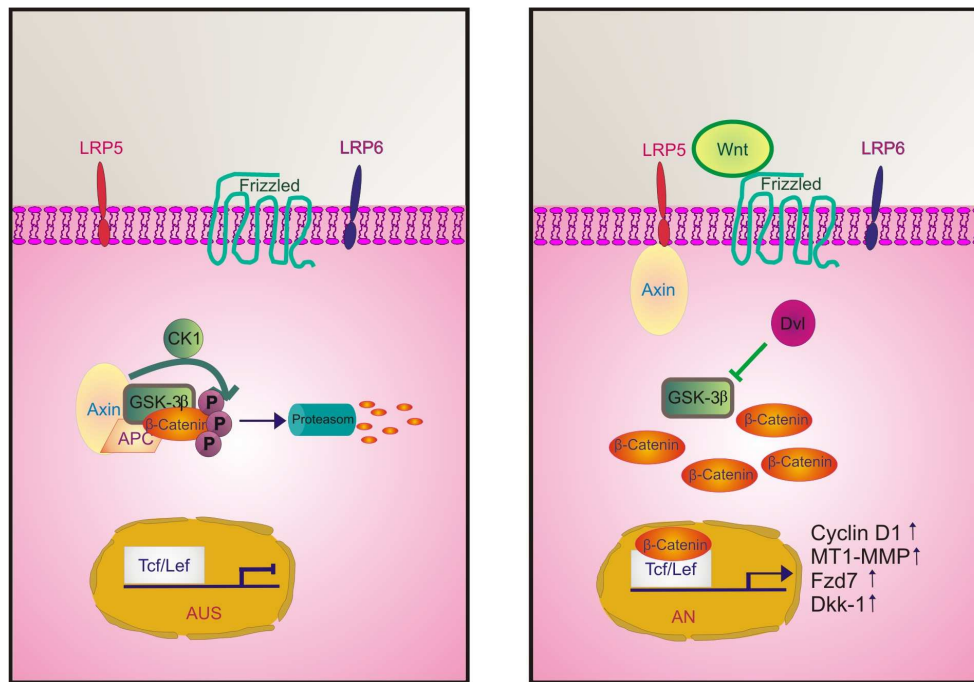


Abb. B-3: Schematischer Überblick über den β -Catenin-abhängigen, kanonischen Wnt-Signalweg.

In Abwesenheit des Wnt-Stimulus (links) wird β -Catenin im Abbaukomplex phosphoryliert und nach Ubiquitinierung durch das Proteasom abgebaut. Eine Wnt-Liganden-Bindung (rechts) führt zum Zerfall des Abbaukomplexes. β -Catenin wird darauffolgend in den Kern transloziert, wo es mit Hilfe von Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren die Transkription der Wnt-Zielgene (z.B. Cyclin D1, MT1-MMP, Dkk-1, Fzd7) induziert.

Abkürzungen: APC = *adenomatous polyposis coli*, CK = *casein kinase*, GSK = *glycogen synthase kinase*, Fzd = Frizzled-Rezeptor, LRP = *low-density-lipoprotein receptor related protein*, Tcf/Lef = *T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*.

B.2.3 Signalweiterleitung an der Zelloberfläche

Den 19 beschriebenen Wnt-Proteinen steht eine Vielzahl von Bindungspartnern an der Oberfläche Wnt-sensitiver Zellen zur Verfügung. Klassischerweise geht man vor allen Dingen beim kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg von einer heterodimeren Zusammensetzung des Wnt-Rezeptors, bestehend aus einem Mitglied der Frizzled-Rezeptor (Fzd)-Familie und den Korezeptoren LRP5 bzw. LRP6 aus. Darüber hinaus gibt es allerdings auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie Ror (Mikels and Nusse, 2006), Ryk (Lu et al., 2004) und den Korezeptor Kremen (Mao et al., 2002), die Wnt-Proteine binden können und Signale ins Zellinnere weiterleiten, wobei Kremen auch als Korezeptor für den Antagonisten Dkk-1 fungiert.

Dkk-1

Dkk-1 stellt einen natürlichen Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalweges dar und vermittelt seine Funktion durch Bindung an LRP6. Dies konnte durch *cross-linking* bzw. Koimmunpräzitationsexperimente von zwei Gruppen gleichzeitig gezeigt werden (Bafico et al., 2001; Semenov et al., 2001). Darüber hinaus wurde von diesen Autoren experimentell belegt, dass Dkk-1 nicht über Bindung an Fzd, sondern ausschließlich durch Bindung an LRP6 wirkt. Die Initiation einer Signaltransduktion war hierbei nicht nachweisbar, vielmehr ist der inhibitorische Effekt auf eine sterische Hinderung der Wnt-Fzd-Interaktion zurückzuführen. Neben der Bindung an LRP6 wurde auch für die membranständigen Proteine Kremen-1 und Kremen-2 gezeigt, dass sie Dkk-1 als Rezeptoren dienen. So bildet Kremen-2 mit LRP6 und Dkk-1 einen ternären Komplex, der nach Assoziation rasch endozytiert und damit von der Zelloberfläche entfernt wird (Mao et al., 2002).

Hinsichtlich der transkriptionellen Regulation von Dkk-1 konnte eine Abhängigkeit vom kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg ermittelt werden, die einen negativen *feedback*-Mechanismus impliziert (Niida et al., 2004; Gonzalez-Sancho et al., 2005).

LRP5 und LRP6

LRP5 und LRP6 (*low-density-lipoprotein receptor related protein*) sind sog. Typ I *single-pass* Transmembranproteine und stellen eine Untergruppe der *low-density-lipoprotein* (LDL) Rezeptorfamilie dar. Sie bestehen aus einer großen extrazellulären und einer kleinen cytoplasmatischen Domäne. Diverse Studien zeigen, dass sowohl LRP5 als auch LRP6 eine essentielle Rolle in der Wnt-Signalsignaltransduktionskaskade zukommt. Ein mutiertes LRP6-Protein, bei dem die intrazelluläre Domäne fehlt, ist vollständig inaktiv und blockiert den Wnt-Signalweg. Entsprechend gegenläufig verhält es sich bei Mutationen von LRP5 bzw. LRP6, die mit einem Fehlen der extrazellulären Domäne assoziiert sind, was zu einer konstitutiven Aktivierung des β -Catenin-Signalweges führt (He et al., 2004). Darüber hinaus ist die gleichzeitige Abwesenheit von LRP5 und LRP6 in Mausembryonen mit einem ähnlichen Phänotyp wie der Knockout von Wnt3 und β -Catenin verbunden (Cadigan and Liu, 2006). LRP6-Knockout-Mäuse sind perinatal letal (Kelly et al., 2004) und zeigen ähnliche Defekte wie sie nach Ausschalten von Wnt1, Wnt3 und Wnt7a auftreten. Dagegen sind LRP5-Knockout-Mäuse zwar lebensfähig, entwickeln allerdings im Erwachsenenalter Osteoporose (He et al., 2004).

Beim Menschen führen Mutationen im LRP5-Gen oftmals zu OPPG (*osteoporosis pseudoglioma syndrome*). Diese Erkrankung ist durch eine sehr schwere Osteoporose gekennzeichnet, die im Jugendalter ausbricht und neben den skelettalen Abnormitäten mit einer Erblindung einhergeht (Gong et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist das HBM (*high bone mass*)-Syndrom mit erhöhter Knochendichte, das ebenfalls die Folge einer Mutation im LRP5-Gen ist (Johnson et al., 2004).

Obwohl die Funktion der beiden Rezeptoren in der Weiterleitung des Wnt-Signals nicht vollständig geklärt ist, ist bekannt, dass zumindest einige Wnt-Proteine eine Bindung mit LRP5 und LRP6 eingehen können (Wnt1 und Wnt4 an LRP5 sowie Wnt1 und Wnt3a an LRP6). Indes scheint diese Bindung schwächer zu sein als die zwischen Wnt und Fzd (He et al., 2004). Auch die Frage nach der Assoziation von LRP5 und LRP6 mit Fzd ist weitgehend ungeklärt. Allerdings gibt es Beispiele in der Literatur, die zumindest *in vitro* darauf hinweisen, dass Fzds mit LRP5 bzw. LRP6 interagieren können. So konnte gezeigt werden, dass die CRD (*cysteine-rich domain*)-Domäne des murinen Fzd8 an Wnt1 und an die extrazellulären Domänen von LRP5 und LRP6 bindet (Tamai et al., 2000).

Frizzled-Rezeptorfamilie

Rezeptoren der Frizzled-Familie, von denen es jeweils 10 im humanen bzw. murinen System gibt, gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Diese sind durch drei charakteristische Regionen gekennzeichnet und durchspannen die Membran sieben Mal. Dabei enthält die extrazelluläre N-terminale Domäne die typischen CRD-Abschnitte, die für die Bindung der Liganden nötig sind. Die transmembranen alpha-Helizes sind von der intrazellulären Region abzugrenzen, die aus drei intrazellulären Loops und dem cytoplasmatischen C-Terminus besteht (Wang et al., 2006). Die größten Unterschiede hinsichtlich der Aminosäuresequenz sind im C-Terminus zu finden, während im N-Terminus eine hohe Homologie mit 20 stark konservierten Cysteinen beobachtet werden kann. Die Unterschiede in der Signalweiterleitung verschiedener Fzd nach Bindung

von Wnt scheinen vor allem durch die Diversität der intrazellulären Loops vermittelt zu werden (Wang et al., 2006).

Eine genaue Einteilung der Fzd bezüglich der Spezifität ihrer Liganden und der Rolle im kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweg ist - ebenso wie bei den verschiedenen Wnt-Proteinen - bislang nicht möglich, da auch hier multiple Rollen beschrieben sind. So kann Fzd7 sowohl im β -Catenin-abhängigen als auch im β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalweg agieren (Medina et al., 2000). Ebenso wenig bekannt sind die Kombinationsmöglichkeiten der Fzds mit LRPs und den dazugehörigen Wnt-Liganden.

Grundsätzlich unterscheidet man infolge der Wnt-Bindung an LRP und Fzd zwei Effekte, die zur Stabilisierung von β -Catenin führen (Abb. B-4). Das sog. Zwei-Signal-Modell besagt, dass die Bindung von Wnt an einen heterodimeren Rezeptor aus Fzd und LRP zwei separate Signale ins Cytoplasma verursacht, die als LRP/Axin-Zweig und Fzd/Dvl-Zweig beschrieben sind (Cadigan and Liu, 2006).

Das erste Signal beinhaltet die Phosphorylierung von spezifischen LRP-Regionen, die entsprechend PPPSP- bzw. CKI-Consensus-Sequenzen genannt werden, durch GSK-3 β und nachfolgend durch Ck1 γ . Dieser Prozess läuft innerhalb von 10-15 Minuten ab und gilt als Voraussetzung für die Rekrutierung von Axin zur Plasmamembran (Tamai et al., 2004; Mao and Niehrs, 2003). Dabei wird durch die phosphorylierten PPPSP-Regionen die Bindung von Axin an LRP5 (Mao et al., 2001) bzw. LRP6 (Tamai et al., 2004) vermittelt.

Das zweite Signal ist die Fzd-abhängige Phosphorylierung von Dvl, von der vermutet wird, dass trimere G-Proteine beteiligt sind (Katanaev et al., 2005). Der Mechanismus, durch den Dvl den β -Catenin-Abbaukomplex inhibiert, ist nicht klar.

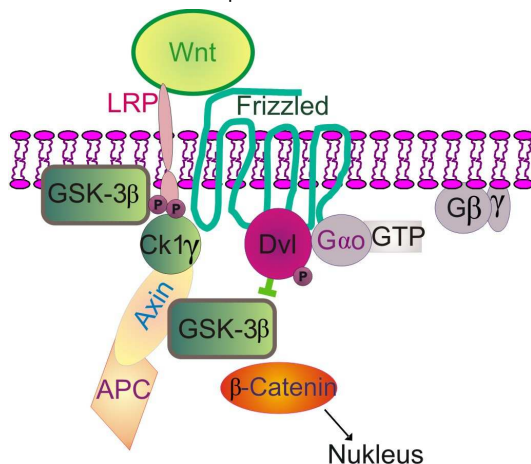


Abb. B-4: Zwei-Signal-Modell für die Signaltransduktion nach Bindung von Wnt an den heterodimeren Rezeptor.

Die Bindung von Wnt führt zur Oligomerisierung von Fzd und LRP und initiiert zwei unterschiedliche Signale. Das erste ist die Phosphorylierung von LRP durch die Kinasen GSK-3 β und Ck1 γ , wodurch es nach Rekrutierung von Axin an die Membraninnenseite zum Zerfall des β -Catenin Abbaukomplexes kommt. Das zweite Signal wird durch Fzds ermöglicht, die durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus in der Lage sind, Dvl zu aktivieren, was wiederum den APC-Axin-GSK-3 β -Komplex inhibiert. (modifiziert nach Cadigan and Liu, 2006)

Abkürzungen: APC = *adenomatous polyposis coli*, CK = *casein kinase*, Dvl = *dishevelled*, GSK = *glycogen synthase kinase*, GTP = *guanosine triphosphate*, LRP = *low-density-lipoprotein receptor related protein*, Tcf/Lef = *T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*.

B.2.4 Signalweg im Cytoplasma – Abbau und Akkumulation von β -Catenin

In den sog. *adherence junctions* verknüpft β -Catenin Mitglieder der Cadherin-Familie mit α -Catenin, was wiederum eine Verbindung zum Cytoskelett herstellt (Perez-Moreno and Fuchs, 2006). Somit kommt β -Catenin eine duale Funktion zu, einerseits bei der Ausbildung des Cytoskeletts und andererseits als Transkriptionsfaktor.

Die Struktur von β -Catenin ist hoch konserviert, wobei die zentrale Region aus 12 *armadillo repeats* aufgebaut ist (Abb. D-5A), die nach ihrer Entdeckung in *Drosophila melanogaster* benannt wurden, wo das Ortholog von β -Catenin als *armadillo* (arm) bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei um nicht exakt konservierte Sequenzwiederholungen von 42 Aminosäuren, die partiell auch im APC-Molekül zu finden sind (Willert and Nusse, 1998).

In Abb. D-5B sind fünf verschiedene Formen von β -Catenin dargestellt, die vor allem hinsichtlich des Phosphorylierungszustandes und der jeweiligen Bindungspartner divergieren (Gottardi and Gumbiner, 2004).

Man unterscheidet die am N-Terminus phosphorylierte und infolgedessen durch das Proteasom degradierbare Form von der geschlossenen Konformation, die nach Wnt-Bindung zur Translokation in den Zellkern und zur Assoziation mit Tcf/Lef führt.

In der dritten, der heterodimeren Catenin-Form aus α - und β -Catenin, steht β -Catenin für die Adhäsion, aber nicht für die Transkription zur Verfügung, da diese dimerisierte Form präferentiell von Cadherinen gebunden wird.

In der offenen Konformation kann β -Catenin sowohl Tcf/Lef als auch Cadherine binden. Dies wird unter anderem dadurch deutlich, dass man nach Inhibition der Zelladhäsionsfunktion von β -Catenin eine verstärkte Transkription von Wnt-Zielgenen beobachten kann. Im Gegensatz dazu wird durch eine Überexpression von Cadherinen die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin im Kern inhibiert (Gottardi and Gumbiner, 2004).

In der inaktiven Form ist β -Catenin so modifiziert, dass es für keine der soeben beschriebenen Rollen zur Verfügung steht.

Diese verschiedenen molekularen Formen von β -Catenin können dazu führen, dass Adhäsion und Wnt-Signaltransduktion in Zellen nicht zwingend gekoppelt sind und durchaus auch getrennt voneinander reguliert werden können.

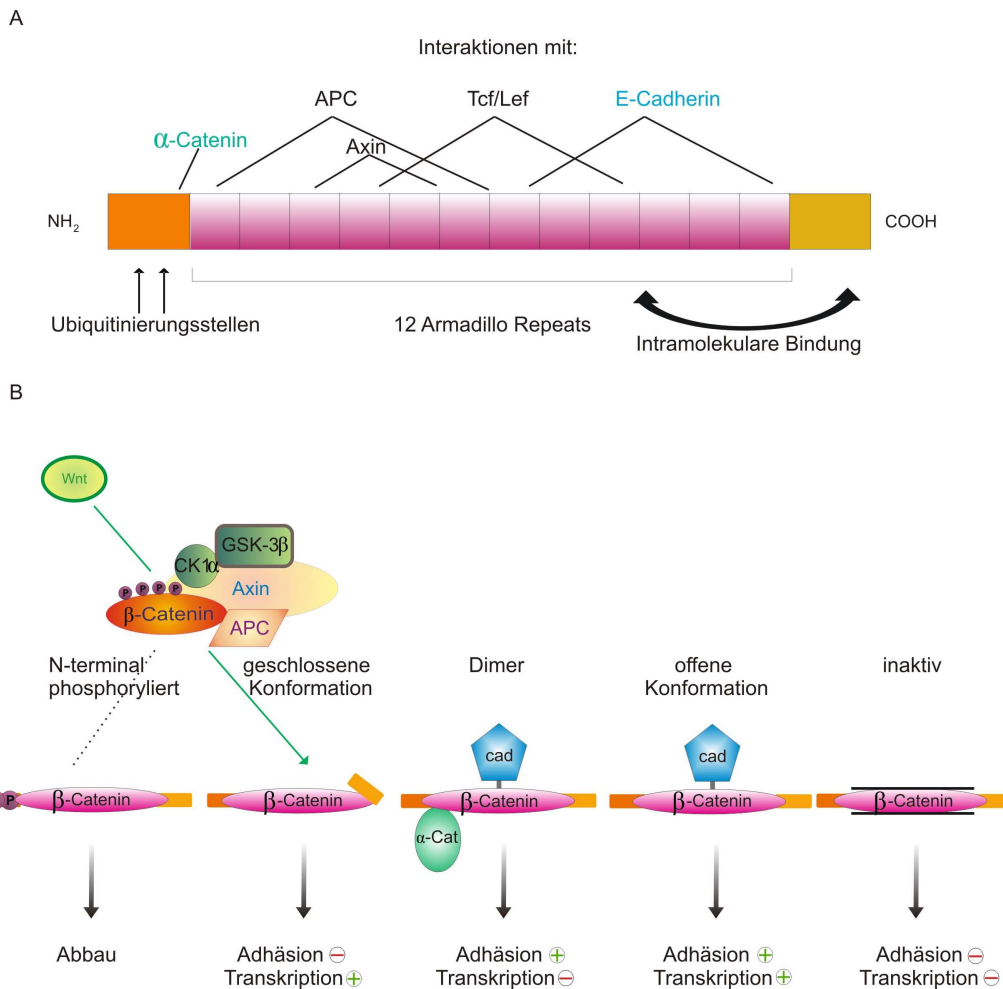


Abb. B-5: Molekularer Aufbau und Konformationen von β -Catenin.

A) N-terminal liegen die Phosphorylierungsstellen für $CK1\alpha$ und $GSK-3\beta$ sowie für die E3 Ubiquitin-Ligase. Zentral liegen 12 *armadillo repeats*, die als Bindungsstellen für eine Vielzahl interagierender Proteine dienen.

B) In Abwesenheit eines Wnt-Stimulus wird β -Catenin am N-Terminus phosphoryliert und durch das Proteasom abgebaut. Der C-terminale Bereich ist in der Lage, eine intramolekulare Bindung herzustellen, die nach Wnt-Stimulation für die Tcf/Lef-Bindung wichtig ist und zur geschlossenen Konformation führt. In der heterodimeren Catenin-Form aus α - und β -Catenin ist es an der Zelladhäsion beteiligt. In der offenen Konformation kann β -Catenin am Wnt-Signalweg und an der Zelladhäsion beteiligt sein. Die inaktive Form steht für keinen der beiden Wege zur Verfügung (Willert and Nusse, 1998; Gottardi and Gumbiner, 2004).

Abkürzungen: APC = *adenomatous polyposis coli*, cad = Cadherin, CK = *casein kinase*, Cat = Catenin, GSK = *glycogen synthase kinase*

Im basalen Aktivierungszustand einer Wnt-sensitiven Zelle kann man nur geringe Mengen an cytoplasmatischem β -Catenin nachweisen, da es in Abwesenheit der entsprechenden kanonischen Wnt-Liganden abgebaut wird. Die für die gesamte Phosphorylierung von β -Catenin entscheidende Sequenz ist $D^{32}SGXXSXXXTXXXS^{45}$. Abb. B-6 verdeutlicht den Prozess der Phosphorylierung von Ser^{45} durch die Kinase $CK1\alpha$, der essentiell für die nachfolgende Phosphorylierung durch $GSK-3\beta$ an Thr^{41} , Ser^{37} und Ser^{33} ist. Das so phosphorylierte β -Catenin wird über die Ser^{33} - und Ser^{37} -Reste vom F-Box Protein β -TrCP erkannt, das einen Teil des E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellt (Kikuchi et al., 2006).

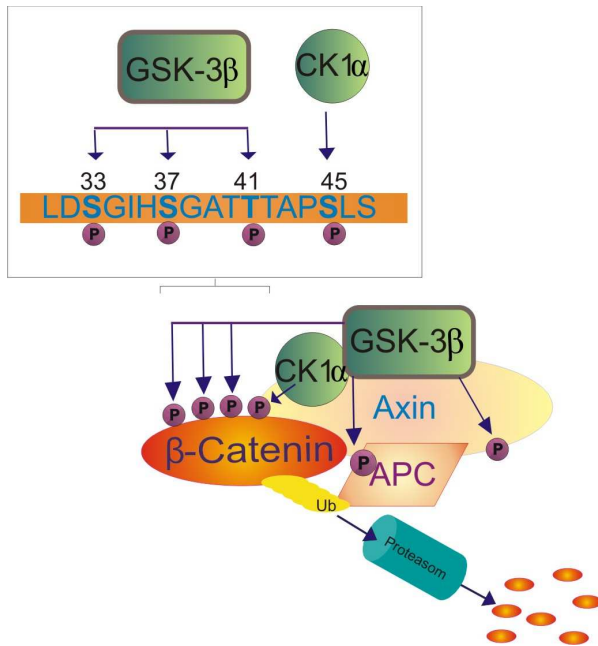


Abb. B-6: Regulation der β -Catenin-Degradation im Abbaukomplex unter Abwesenheit eines Wnt-Liganden.

Die Degradation von β -Catenin im Abbaukomplex wird durch N-terminale Phosphorylierung durch zwei Kinasen eingeleitet. Die erste Phosphorylierung erfolgt durch CK1 α an Ser⁴⁵ und gilt als essentielle Voraussetzung für die nachfolgende Phosphorylierung durch GSK-3 β an drei weiteren Phosphorylierungsstellen (Thr⁴¹, Ser³⁷, Ser³³). Ferner erfolgt eine Phosphorylierung von Axin und APC durch GSK-3 β , was die Bindung von β -Catenin an APC verstärkt. Hierdurch wird Axin stabilisiert. Diese vollständige Phosphorylierung ist eine notwendige Bedingung, dass β -Catenin durch Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Weges erkannt und abgebaut wird.

Abkürzungen: APC=adenomatous polyposis coli, CK=casein kinase, GSK=glycogen synthase kinase, LRP=low-density-lipoprotein receptor related protein, Tcf/Lef = T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor

Die Phosphorylierung und nachfolgende Degradation von β -Catenin kann nur im sog. Abbaukomplex erfolgen, der alle erforderlichen Proteine in eine räumliche Nähe bringt. Entscheidend für die Einbettung von β -Catenin sind vor allen Dingen die Proteine APC und Axin (Abb. 6). Die Folgen von Mutationen in APC werden vor allen Dingen in Fällen von erblich bedingtem bzw. sporadisch auftretendem Darmkrebs deutlich. Diese Mutationen sind mit hohen Leveln von β -Catenin und transkriptionell aktiven Tcf/Lef-Komplexen assoziiert, was ein stark gesteigertes Proliferationsvermögen der Zellen verursacht (Segditsas and Tomlinson, 2006). Wichtig hierbei ist, dass APC-Moleküle mit einer mutierten β -Catenin-Bindungsstelle oder einer mutierten Axin-Bindungsstelle nicht zum Abbau von β -Catenin beitragen können (Kawahara et al., 2000). Demzufolge ist eine Komplexbildung dieser Proteine von entscheidender Bedeutung.

Axin kann eine Vielzahl von Proteinen des Wnt-Weges binden. Unter anderem bildet Axin mit GSK-3 β einen Komplex, wodurch APC phosphoryliert und die Bindung von β -Catenin an APC verstärkt werden. Darüber hinaus phosphoryliert GSK-3 β auch β -Catenin, das fest an APC gebunden vorliegt (Abb. B-6) (Kikuchi et al., 2006).

B.2.5 Signalweiterleitung im Nukleus

Nach Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges kommt es zunächst zu einer Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Cytoplasma. Der genaue Mechanismus des anschließenden Imports in den Nukleus ist nicht geklärt, allerdings weiß man, dass β -Catenin kein *nuclear localization signal* (NLS) besitzt (Henderson and Fagotto, 2002). In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, ob APC nicht nur im Abbaukomplex, sondern auch während des Transportes von β -Catenin in den Zellkern eine Rolle als Bindungspartner spielt. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass APC zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma pendeln kann, was im Falle des Imports über ein NLS und im Falle des Exports über den CRM (*chromosome region maintenance*)1/Exportin-Weg ermöglicht wird (Henderson and Fagotto, 2002). Allerdings steht dies im Widerspruch zu Berichten des unabhängig von APC erfolgenden nukleären Exports von β -Catenin (Hendriksen et al., 2005).

Für die Translokation und die Funktion von β -Catenin im Kern erwiesen sich zwei nukleäre Proteine namens *legless* (Lgs) [mit dem humanen Ortholog BCL9 (Kramps et al., 2002)] und *Pygopus* (Pygo) (Thompson et al., 2002) [mit zwei humane Orthologen] als essentiell. Demnach scheint die Rolle von Lgs/BCL9 darin zu liegen, β -Catenin an Pygo zu binden, was wiederum β -Catenin dazu befähigt, Wnt-Zielgene über die Interaktion mit Tcf/Lef transkriptionell zu aktivieren.

Ein Meilenstein in der Aufklärung der transkriptionsaktivierenden Rolle von β -Catenin war die Entdeckung der Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor Lef-1 (Behrens et al., 1996). Lef ist ebenso wie Tcf (Hoppler and Kavanagh, 2007) Mitglied einer Untergruppe von HMG (*high mobility group*)-Box enthaltenden Transkriptionsfaktoren. Charakteristisch für diese Art der Transkriptionsfaktoren ist, dass sie nur gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren funktionell aktiv sind. So weisen sie zwar DNA-Bindungseigenschaften auf, können allerdings die Transkription nur mit Hilfe anderer Proteine aktivieren. Dabei binden sie über die HMG-Box direkt an DNA-Sequenzabschnitte [(Consensus-Sequenz (A/T)(A/T)CAA(A/T)GG)], wo sie in Abwesenheit von β -Catenin die Genexpression durch Interaktion mit sog. Korepressoren wie Groucho/TLE (*transducin-like enhancer of split*) und CtBP (*C-terminal-binding protein*) unterdrücken (Hurlstone and Clevers, 2002). Das heißt, dass nukleäres β -Catenin bestimmt, ob Tcf/Lef in β -Catenin-freien Komplexen als transkriptionelle Repressoren (in Abwesenheit eines Wnt Signals) oder in β -Catenin-enthaltenden Komplexen (nach Stimulation mit Wnt) als transkriptionelle Aktivatoren wirken.

Die Bindung zwischen β -Catenin und den Transkriptionsfaktoren erfolgt zwischen den ersten 50 Aminosäuren der Tcfs und den *armadillo-repeats* 3-10 von β -Catenin (siehe B.5-A). Die Bindung von Tcf an den Korepressor Groucho wird über dessen Q-Domäne an einer konservierten Region der Tcfs bewerkstelligt, die zwischen der β -Catenin-Bindungsdomäne und der HMG-Box liegt (Hurlstone and Clevers, 2002). Die Repression der Wnt-Zielgene, die Tcf/Lef-Bindungsstellen in ihren Promotorregionen beinhalten, erfolgt in Abwesenheit von β -Catenin durch Bindung von Groucho an Tcf/Lef über die Interaktion mit Histon-Deacetylasen. Hingegen wirkt β -Catenin nach Translokation in den Nukleus als Gerüst, um die Tcf/Lef-Proteine an spezifische *chromatin-remodeling*-Komplexe sowie an die schon erwähnten Wnt-Koaktivatoren Lgs/BCL9 und Pygo zu binden. Hierbei interagiert der N-terminale *armadillo repeat* von β -Catenin direkt mit Lgs/BCL9, wodurch wiederum Lef-1 mit Pygopus assoziiert.

Der C-terminale Teil der *armadillo repeats* enthält dagegen eine sehr starke Aktivierungsdomäne, die multiple *chromatin-remodeling*-Untereinheiten bindet. Dies führt schließlich zu einer offenen DNA-Konformation und damit einhergehend zur transkriptionellen Aktivierung der entsprechenden Wnt-Zielgene (Willert and Jones, 2006). In Abwesenheit von β -Catenin liegen Tcf/Lef zusammen mit dem Korepressor Groucho vor, was unter anderem Histondeacetylasen rekrutiert, die über die Eliminierung von Acetylgruppen der Histone letztlich eine dichter gepackte DNA ermöglichen, was die Transkription blockiert.

Wnt-Zielgene

Als Wnt-Zielgene werden solche Gene bezeichnet, die eine Tcf/Lef-Consensus-Sequenz in ihrer Promotorregion tragen und bei denen nachgewiesen werden konnte, dass diese für die Expression des entsprechenden Gens wichtig ist (www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html). Hierzu zählt beispielsweise das Gen Cyclin D1 (Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999), das als Zellzyklusregulator an der Proliferation eukaryontischer Zellen beteiligt ist. Aber auch Gene, die in die invasiven Prozesse verschiedener Zelltypen involviert sind wie die Matrix-Metalloproteinase MMP-7 (Brabletz et al., 1999; Gustavson et al., 2004) oder MT1-MMP (Takahashi et al., 2002; Hlubek et al., 2004) wurden als Wnt-Zielgene beschrieben.

Zudem gibt es Gene, die selbst Teil des Wnt-Signalweges sind und infolge einer Stimulation durch Wnt transkriptionell reguliert werden. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Dkk-1 (Niida et al., 2004; Gonzalez-Sancho et al., 2005), Axin2 (Jho et al., 2002b) oder Fzd7 (Willert et al., 2002) zu nennen.

Sehr wichtig ist die Beobachtung, dass die Wnt-abhängige transkriptionelle Regulation einzelner Gene in unterschiedlichen Zelltypen verschieden sein kann. So scheint die Anwesenheit von Consensus-Sequenzen in Promotorregionen nicht alleinig dafür ausschlaggebend zu sein, ob ein Gen über den Wnt-Signalweg reguliert wird. Hier ist offensichtlich der jeweilige Zelltyp bzw. Differenzierungszustand einer Zelle von großer Bedeutung. Ein Beispiel dafür ist das Gen Cyclin D1, dessen Expression in einer Kolonkarzinom-Zelllinie nach Knockdown von APC und einer damit normalerweise einhergehenden Aktivierung des Wnt-Weges entgegen den Erwartungen nicht induziert ist (Sansom et al., 2005).

B.2.6 Wnt/ β -Catenin-Signalweg in mesenchymalen Stammzellen

Die erste Beschreibung einer Rolle des Wnt-Signalweges in Stammzellen aus dem Knochenmark kam aus dem Labor von Prof. Irving Weissman aus Stanford, dessen Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in hämatopoetischen Stammzellen maßgeblich über den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert wird (Reya et al., 2003). Etwa ein Jahr später wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen eben diese Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auch in hMSC beschrieben. Die Autoren konnten belegen, dass der kanonische, über Wnt3a induzierte Signalweg die Proliferation der hMSC fördert und die Differenzierung inhibiert (Boland et al., 2004; De Boer et al., 2004). Weitere Arbeiten machten deutlich, dass aufgrund der Expression einer Vielzahl von Komponenten des Wnt-Signalweges von einer basalen Aktivität ausgegangen werden kann (Etheridge et al., 2004).

Darüber hinaus ist allerdings wenig bezüglich der Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in humanen ebenso wie in murinen mesenchymalen MSC bekannt. Letztere sind insbesondere für funktionelle *in vivo*-Untersuchungen zum Wnt/ β -Catenin-Signalweg im Tiermodell von großem Interesse.

C Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Basierend auf dem noch relativ eingeschränkten Kenntnisstand des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in humanen (hMSC) und vor allen Dingen in murinen (mMSC) mesenchymalen Stammzellen war die Klärung folgender Fragestellungen zu Beginn dieser Arbeit von vordringlichem Interesse:

- Kann das Invasionsverhalten von MSC – ähnlich der Proliferation – durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beeinflusst werden?
- Werden Frizzled-Rezeptoren in MSC exprimiert und wie erfolgt ihre Regulation?
- Welche Rolle spielen der Rezeptor LRP6 und der natürliche Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalweges Dkk-1 in der MSC-Biologie?
- Sind die basalen Wnt/ β -Catenin-Signalweg-Komponenten in hMSC und mMSC über die Spezies-Grenzen hinweg vergleichbar exprimiert bzw. gibt es Unterschiede im zellulären Phänotyp infolge einer Aktivierung bzw. Inhibition dieser Signaltransduktion?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte durch die folgenden wesentlichen Zielsetzungen erreicht werden:

1. Untersuchung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges hinsichtlich seiner Bedeutung für die Proliferation und Invasion von hMSC

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges sollte auf zweierlei Weise erfolgen, und zwar einerseits mittels exogener Stimulation durch Zugabe von Wnt3a bzw. LiCl und andererseits durch Knockdown einzelner Komponenten des β -Catenin-Abbaukomplexes, nämlich APC und Axin2. Neben der Analyse von Wnt-Zielgenen wie Cyclin D1 und MT1-MMP sowie des Proliferationsverhaltens sollte hierbei insbesondere der Untersuchung der Migrationsfähigkeit derartig stimulierter Zellen durch humane extrazelluläre Matrix (Invasion) eine vorrangige Bedeutung zukommen.

Des Weiteren sollten der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch einen RNAi-basierten Ansatz inhibiert und die Auswirkungen eines Knockdowns des transkriptionsaktivierenden β -Catenin bzw. des Wnt-Korezeptors LRP5 hinsichtlich der Wnt-Zielgen-Expression, Proliferation und Invasionsfähigkeit näher untersucht werden.

2. Untersuchungen zur Frizzled-Rezeptoren-Expression und Regulation von Fzd8 als Korezeptor von LRP6

Da neueste Literaturhinweise zeigen, dass LRP6 und der Fzd8 einen funktionellen Rezeptorkomplex bilden können, sollte neben der erstmaligen allgemeinen Evaluierung des Fzd-Expressionsprofils in hMSC vor allem die Expression von Fzd8 als Korezeptor von LRP6 in hMSC untersucht werden.

Darüber hinaus sollte exemplarisch für den Fzd8/LRP6-Rezeptorkomplex in einem RNAi-basierten Ansatz eruiert werden, welche Komponenten des Rezeptorkomplexes für die Weiterleitung des Wnt3a-Signals entscheidend sind.

3. Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges unter Einsatz des natürlichen Inhibitors Dkk-1

Zur Evaluierung des Hemmeffektes von Dkk-1 sollte zunächst die endogene Expression von Dkk-1 und seines Rezeptors LRP6 im Detail untersucht werden. Ein wichtiges Ziel stellte dabei die vergleichende funktionelle Charakterisierung des Dkk-1-Rezeptors LRP6 und des Wnt-Korezeptors LRP5 mittels RNAi dar. Hierbei sollten insbesondere die Effekte auf die Wnt-Zielgen-Expression, die Proliferation und Invasionskapazität von hMSC sowie die Konsequenzen für die Dkk-1-Bindung näher überprüft werden.

Schließlich sollte der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch die exogene Gabe eines rekombinanten Dkk-1 inhibiert werden. Auch hier sollten die Änderungen im zellulären Phänotyp insbesondere hinsichtlich eines modifizierten Proliferations- bzw. Invasionsverhaltens im Fokus stehen.

4. Komparative Analyse der Basis-Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC und mMSC sowie Etablierung des Tcf/Lef-Reportersystems in mMSC

Um die Grundvoraussetzung für *in vivo*-Experimente im Mausmodell zu schaffen, sollten mMSC im Vergleich zu hMSC untersucht werden. Dabei sollte vor allem geklärt werden, ob die Aktivierung bzw. Inhibition der β -Catenin-abhängigen Signaltransduktion im murinen System in gleicher Weise wie in den humanen Zellentitäten möglich ist, und inwieweit diese Einflussnahmen auf zelluläre Effekte wie z.B. Proliferation und Invasion vergleichbar sind.

In diesem Kontext erschien für Untersuchungen in mMSC die Etablierung des Tcf/Lef-Reporter-Systems vorrangig, das eine Reporter-gen-vermittelte Quantifizierung der β -Catenin-abhängigen Transkription ermöglicht.

D Material und Methoden

D.1 Material

D.1.1 Geräte

Autoklav 3850	Systemec GmbH, Wettengel
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator Galaxy S	RS Biotech, Irvine, England
Eismaschine AF-10	Scotsman, Frimont, Italien
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur	PeqLab, Erlangen
Gel-Bilderfassungssystem Intas Gel Imager	Intas, Göttingen
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Products, USA
Image Scanner	Pharmacia, Freiburg
Kühlschrank (4 °C)	Siemens, München
Magnetrührer Ika-Combimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskope:	
IX50 mit	Olympus, Feldkirchen-Westerham
CCD Kamera Typ 3CCD	Sony, Köln
UV-Lampe U-RFL-T	Olympus, Feldkirchen-Westerham
IX70 mit	Olympus, Feldkirchen-Westerham
POC Chamber	Pecon, Erbach
SensiCam QE	PCO CCD Imaging, Kehlheim
Tempcontrol 32-2	Pecon, Erbach
Uniblitz VCM-D1 Shutter	Vincent Associates, Rochester, USA
UV-Lampe BH2-RFL-T3	Olympus, Feldkirchen-Westerham
Mikrowellenöfen R-6270	Sharp, Osaka, Japan
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
Orbitalschüttler:	
Certomat R	Braun Biotech International, Melsungen
Infrons TR150 mit	Infrons AG, Bottmingen, Schweiz
Heissluft Inkubatoröfen ITE	Infrons AG, Bottmingen, Schweiz
PCR Thermal Cycler:	
Gene Amp 2400	Perking Elmer, Langen
LightCycler II	Roche, Mannheim
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter:	
Typ 526 mit pH Elektrode	WTW, Weilheim
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Proteintransfereinheiten:

Mini Protean Electrophoresis Cell
Mini Trans Blot Electrophoretic
Transfer Cell

BioRad, München
BioRad, München

Sicherheitswerkbänke:

BDK 7419, Modell UVF 6.18S
Herasafe Typ HS12

BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Heraeus Instruments, Göttingen

Spannungsquellen:

Consort E143
Mighty Slim

PeqLab, Erlangen
Hoefler, Heidelberg

Stickstofftank Locator 4

Sigma, Taufkirchen

Spectrofluorimeter Safire 2

Tecan, Crailsheim

Tiefkühlgefrierschrank:

Colora UF 85-300S (-80 °C)
Liebherr Premium Frost (-20 °C)

Colora, Lorch

Liebherr, Ochsenhausen

Transluminator DarkReader

Clare Chemical Research, Dolores, USA

Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9

Jouan, Unterhaching

Vortex Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Waagen:

Analysenwaage, A 120 S
Technische Waage, MA AF200

Satorius, Göttingen

Satorius, Göttingen

Wärmeschränke:

B30
BE30

Memmert, Schwabach

Memmert, Schwabach

Wasserbäder:

WB-14
Exatherm U3electronic

Memmert, Schwabach

Julabo, Seelbach

Wasserdeionisierungseinheit Membrapure

MembraPURE, Bodenheim

Zentrifugen:

Varifuge 3.0 R
Sepatech Biofuge 15
Eppendorf 5415 D
Kühlzentrifuge, Eppendorf 5415 R

Heraeus Sepatech, München

Heraeus Sepatech, München

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

D.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

Image Master Labscan 3.0	Pharmacia, Freiburg
Image Quest QV 770	Intas, Göttingen
LightCycler Software 3.5	Roche, Mannheim
SECentral	SciEdSoftware, Cary, USA
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim

Für die Identifikation von potentiellen siRNA-Sequenzen wurden die mRNA-Transkripte (NCBI Nucleotide Datenbank, Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) der zu regulierenden Zielgene mit den Online-Programmen siRNATarget Finder* (Genscript, Piscataway, USA) und siRNA Design Tool[‡] (Qiagen, Hilden) analysiert und passende siRNAs ermittelt:

* (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>)

‡ (<http://www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing/CustomSiRna/SiRnaDesigner.aspx>)

Die Auswahl der siRNA-Sequenzen (19 Nukleotide) erfolgte unter Zuhilfenahme der 2004 von Angela Reynold beschriebenen Kriterien (Reynolds et al., 2004). Demzufolge wird die siRNA von 1-19 durchnummeriert, nach bestimmten Merkmalen untersucht und darauf basierend bewertet. Eine maximale Punktzahl von 10 Punkten konnte bei Einhaltung der in der folgenden Tabelle beschriebenen acht Kriterien erreicht werden. Bei Nicht-Einhaltung der Kriterien 7 und 8 erfolgte ein Punktabzug, weshalb die in Tab. D-1 angegebene mögliche Punktzahl bei 0 liegt.

Tab. D-1: Kriterien für die Auswahl der siRNA-Sequenzen nach A. Reynolds.

Kriterium	Voraussetzung	Mögliche Punkte
1	GC-Gehalt zwischen 36 und 52 %	1
2	A oder U an Positionen 15 - 19	5
3	Schmelztemperatur < 20 °C	1
4	A an Position 3	1
5	A an Position 19	1
6	U an Position 10	1
7	Kein G oder C an Position 19	0
8	Kein G an Position 10	0

Abkürzungen: A = Adenosin, G = Guanin, C = Cytosin, U = Uracil

Alle so ausgesuchten siRNA-Sequenzen wiesen mindestens eine Punktzahl von 6 auf, was zur bestmöglichen Knockdown-Effizienz führen sollte. Die Spezifität der siRNA-Zielsequenzen wurde abschließend in einem transkriptomweiten Vergleich mit dem BLAST Programm sichergestellt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Die Auswahl der Primersequenzen für die quantitative RT-PCR unter Verwendung der *Universal Probe Library*-Sonden erfolgte mit Hilfe der dafür auf der Homepage der Firma Roche zur Verfügung gestellten Software (<https://www.roche-applied-science.com/isis/rtpcr/upl/index.jsp>).

D.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien hatten „p. a.“ Qualität. Die Reaktions- und Kultivierungsgefäße wurden entweder steril bezogen oder vor der Verwendung bei 121 °C und 1 x 10⁵ Pa Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

D.1.3.1 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken

Chemikalien

Agarose, Nusive	Biozym, Hameln
Agarose, Seakem GTG	Biozym, Hameln
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
CyQuant Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes, USA
DAPI	Molecular Probes, USA
DNA Molekulargewichtsmarker <i>Generuler</i> 1kb	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
DNA Molekulargewichtsmarker <i>Ultra Low Range</i>	PeqLab, Erlangen
DNA Molekulargewichtsmarker V, VII	Roche, Mannheim
DNA-Auftragspuffer, 10 x	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Gelextraktionskit Nucleospin Extract II-Kits	Macherey-Nagel, Düren
Human Multiple Tissue cDNA Panel 1	Clontech, USA
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Klenow-Enzym	Roche, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
LightCycler TaqMan Master	Roche, Mannheim
Plazenta-cDNA	BD Biosciences, USA
puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads	GE Healthcare, England
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Quantitect Reverse Transcription-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs und Roche
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq Platinum Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

Vektoren

Klonierungs-Vektoren: pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO (Invitrogen)

Für die Sequenzierung von cDNA-Fragmenten, die für die Herstellung bestimmter Expressionsvektoren nötig waren, wurden die TOPO-Vektoren der Firma Invitrogen verwendet (Abb. D-1). Das Prinzip dieser Vektoren basiert auf der terminalen Adenosintransferase-Aktivität von Taq-Polymerasen. Diese ermöglicht das Anhängen von Desoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Da die verwendeten linearisierten Vektoren pCR2.1-TOPO bzw. pCR4-TOPO einen überhängenden 3'-Desoxythymidin-Rest haben, können PCR-Produkte sehr einfach in diese Plasmide ligiert werden, was durch die kovalent an den linearisierten Vektor gebundene Topoisomerase I katalysiert wird (Shuman, 1994). Mittels der Antibiotika-Resistenzgene Ampicillin und Kanamycin können die erfolgreich transformierten *E.coli*-Klone selektioniert werden.

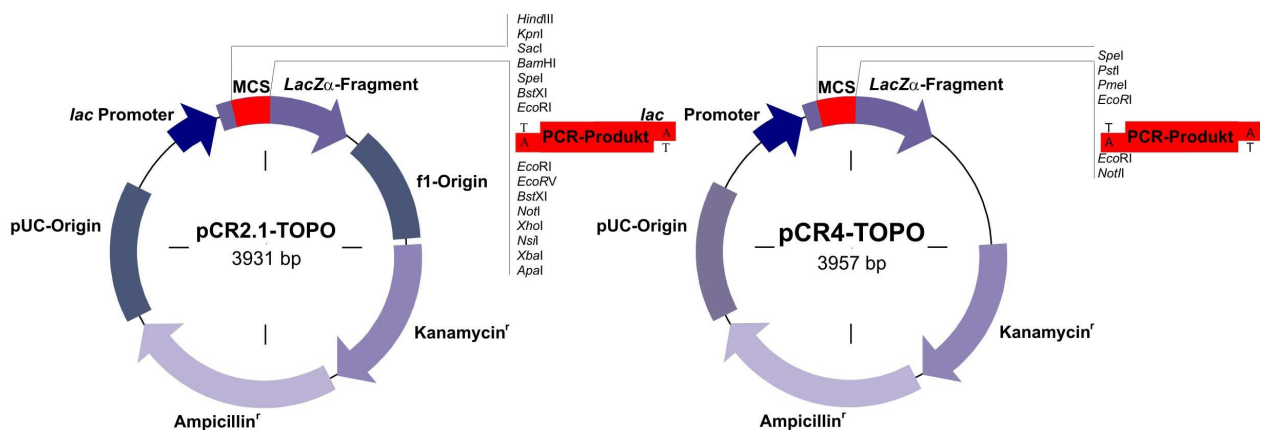


Abb. D-1: Vektorkarten von pCR2.0-TOPO und pCR4-TOPO

pEGFP-N3 (BD Clontech, USA)

Das Plasmid pEGFP-N3 kodiert für ein spezielles Derivat des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) der Qualle *Aequoria victoria* (Abb. D-2). Dieses wurde hinsichtlich der Expression und einer stärkeren Fluoreszenz für Säugetierzellen optimiert. Darüber hinaus kann man in dieses Plasmid das gewünschte Transgen in die *multiple cloning site* (MCS) am 5'-Ende der EGFP-kodierenden Sequenz einbringen, so dass eine Fusion des Transgens mit dem N-Terminus des EGFP entsteht. Die Selektion erfolgreich transformierter *E.coli*-Klone erfolgt über Kanamycin-Zugabe in das Medium.

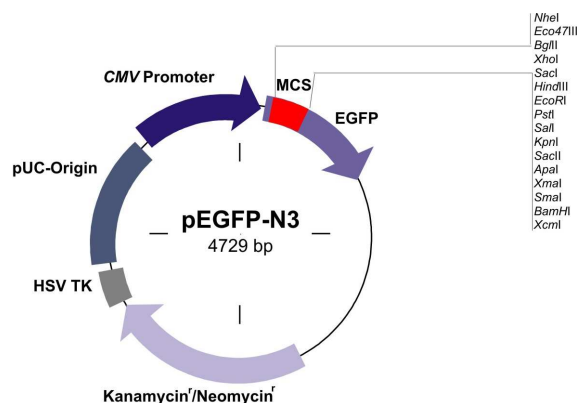


Abb. D-2: Vektorkarte des Reporterplasmids pEGFP-N3

Gaussia-Vektoren: pGLucBasic und pCMVGLuc (NEB)

Die beiden Vektoren pGLucBasic und pCMV-GLuc der Firma NEB dienen der Expression der Luciferase aus dem Tiefsee-Cephalopoden *Gaussia princeps*. Diese spezielle Luciferase, die ein für die Sekretion wichtiges Signalpeptid trägt, kann ohne die Zugabe von ATP im Überstand transfizierter Zellen bestimmt werden. Die Aktivität der Luciferase, die eine Oxidation des Substrates Coelenterazin katalysiert, kann über Lichtemission gemessen und im Luminometer quantifiziert werden. Der pGLucBasic-Vektor trägt die kodierende Sequenz für die Gaussia-Luciferase ohne einen Promotor und kann demnach für Promotorstudien nachträglich eingefügter Promotorsequenzen verwendet werden. Die Selektion transfizierter Zellen erfolgt über Neomycin-Zugabe ins Kulturmedium. Der CMV-GLuc-Vektor hingegen dient als Kontrollvektor für die konstitutive Expression der Gaussia-Luciferase. Auch hier können stabil transfizierte Zellklone über Selektion in Neomycinhaltigem Medium generiert werden. Das Gen für die prokaryontische Antibiotika-Resistenz ist in beiden Fällen Ampicillin.

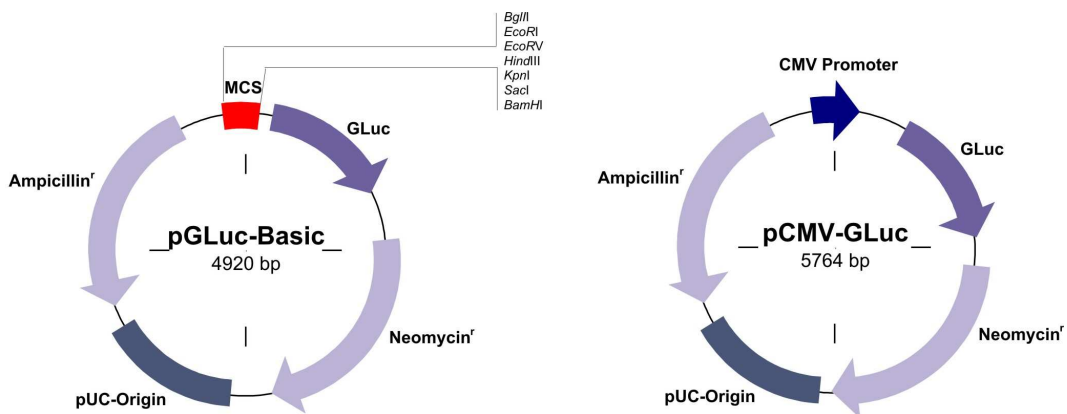


Abb. D-3: Vektorkarten der Gaussia-Luciferase-Plasmide pGLuc-Basic und pCMV-GLuc

pcDNA3.1 (Invitrogen)

Der Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen) ermöglicht die transiente und stabile Transfektion eukaryontischer Zellen mit dem Ziel ein Transgen, das in die MCS eingebracht wurde, konstitutiv überzuexprimieren. Es enthält den sehr starken Promotor des Cytomegalie Virus und die Poly-Adenylierungssequenz des *bovine growth hormone* (BGH) (Abb. D-4). Die Selektion stabil transfizierter eukaryontischer Zellen kann durch Zugabe von Neomycin ins Kulturmedium erfolgen, während die Zugabe von Ampicillin die Selektion in Prokaryonten ermöglicht.

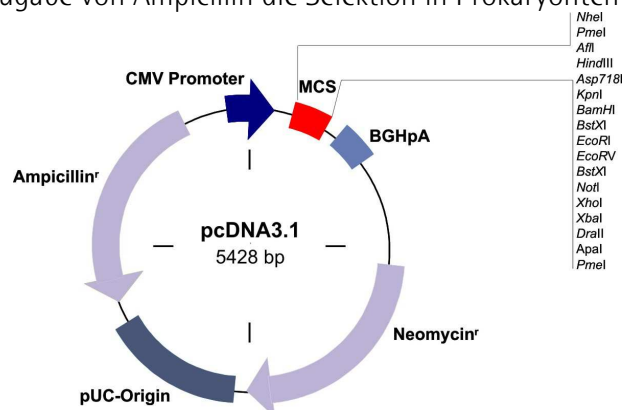


Abb. D-4: Vektorkarte des pcDNA3.1 Expressionsvektors

pSUPER8TOPflash

Der aus dem Labor von Prof. Randy Moon bezogene Vektor pSUPER8TOPflash dient dem Nachweis β -Catenin-abhängiger Expression. Es handelt sich um ein weit verbreitetes Reportersystem, bei dem die Expression der Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) Luciferase nur nach Translokation von β -Catenin in den Zellkern und Assoziation mit Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren erfolgen kann. Dieses Reportersystem ist dadurch gekennzeichnet, dass die Luciferase unter der Kontrolle eines minimalen Thymidin-Kinase Promotors (pTA_{Min}) aus dem Herpes simplex Virus steht, der für sich allein nur eine sehr geringe Aktivität aufweist. Unmittelbar vor dieser Promotorsequenz liegt ein DNA-Abschnitt, der aus acht aufeinander folgenden Tcf/Lef-Bindungsstellen (AGATCAAAGG) besteht, die jeweils von einer *Spacer*-Sequenz (GGGTA) getrennt sind. Das Rückgrat besteht aus dem pTA-Luc-Vektor (4864 bp) der Firma BD Clontech, über dessen *Mlu*I Schnittstelle in der *multiple cloning site* die 8xTcf/Lef-DNA-Sequenz eingebracht wurde (Abb. D-5).

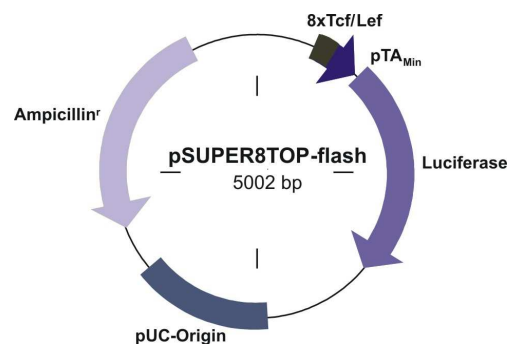


Abb. D-5: Vektorkarte des Reportervektors pSUPER8TOP-flash

Frizzled-Expressionsvektoren

Für den Nachweis von Fzd1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10 wurde vektorielle DNA als Positivkontrolle in die PCR eingesetzt. Mit Ausnahme des Fzd4-Expressionsvektors stammten alle Plasmide von der Firma Origene (Rockville, USA) und basierten auf dem Grundgerüst pCMV6-XL4 (4707 bp) bzw. pCMV6-XL5 (4482 bp). Die kodierende Sequenz von Fzd4 wurde in den pcDNA3.1-Vektor (5428 bp) der Firma Invitrogen eingebracht. Name und Herkunft aller Fzd-Expressionsplasmide können Tab. D-2 entnommen werden. Im Falle von Fzd7 und Fzd8 stand kein derartiges Plasmid zur Verfügung.

Tab. D-2: Fzd-Expressionsplasmide

Gen	Vektorbezeichnung	Vektorrückgrat	Insert-Größe (bp)	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
Fzd4	FZD4000000	pcDNA3.1	1614	Ampicillin	UMR cDNA Res. Center (Rolla, USA)
Fzd1	TC117910	pCMV6-XL4	4300	Ampicillin	Origene
Fzd2	TC127603	pCMV6-XL4	2170	Ampicillin	Origene
Fzd3	TC107940	pCMV6-XL5	3900	Ampicillin	Origene
Fzd5	TC117952	pCMV6-XL4	2500	Ampicillin	Origene
Fzd6	TC117911	pCMV6-XL5	3670	Ampicillin	Origene
Fzd9	TC117912	pCMV6-XL4	2000	Ampicillin	Origene
Fzd10	TC115678	pCMV6-XL4	3000	Ampicillin	Origene

Oligonukleotide für Plasmidkonstruktion und PCR

Oligonukleotide für die Herstellung der Wnt3a-Konstrukte (pN3-Wnt3a + pN3-Mock):

*Bgl*II-Wnt3a-for 5'-AGATCTATGGCCCCACTCGGATACTTCTTACTCCTCTGC -3'
*Eco*RI-Wnt3a-rev 5'-GAATTCCTACTTGCAGGTGTGCACGTCGTAGACGCGCGTGC -3'

Oligonukleotide für die Herstellung der TOP-Konstrukte:

*Hind*III-GLuc-for 5'-AAGCTTATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGC -3'
*Bam*HI-GLuc-rev 5'-GGATCCTTAGTCACCACCGGCCCCCTTGAT -3'

Primer für die quantitative RT-PCR (qRT-PCR):

Die Primer für die qRT-PCR von APC, Axin2, β -Catenin, Cyclin D1, EGFP, GAPDH, LRP5, MMP-2 sowie MT1-MMP wurden von Search LC (Heidelberg) bezogen und mit Hilfe des SYBR Green I Farbstoffs (Roche) quantifiziert. Im Falle der in Tab. D-3 zusammengefassten Gene erfolgte die Quantifizierung hingegen unter Verwendung der Universal Probe Library Sonden und des dazu benötigten Kits LightCycler-TaqMan-Master ebenfalls (Roche). Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der *ProbeFinder* Software der Firma Roche bestimmt.

Tab. D-3: Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer für die qRT-PCR.

Gen	Genbank -ID	forward-Primer-Sequenz reverse-Primer-Sequenz	Bindungsregion in der mRNA	Produkt bp
ALAS1- Maus	NM_020559	5'-(GGGCTTTGAGCAGCCTCT)-3' 5'-(ACAGGCAGCAGCGTCTTC)-3'	405-423 451-468	63
β -Catenin- Maus	NM_007614	5'-(GCAGCAGCAGTTTGTGGA)-3' 5'-(TGTGGAGAGCTCCAGTACACC)-3'	1180-1897 1927-1947	68
CyclinD1- Maus	NM_007631	5'-(CCATCCATGCGGAAAATC)-3' 5'-(CAGGCGGCTCTTCTCAG)-3'	297-314 417-434	134
Dkk-1- Human	NM_012242	5'-(CAGGCGTGCAAATCTGTCT)-3' 5'-(AATGATTTGATCAGAAGACACACATA)-3'	471-489 564-590	120
Fzd7- Human	NM_003507	5'-(AAGCGTTTGGATGAAAAGA)-3' 5'-(GATTCACATCGCCGTTATCA)-3'	1976-1995 2024-2043	68
Fzd7- Maus	NM_008057	5'-(GCTACTTCATGGTGGCAGTG)-3' 5'-(GGTAGCCATCGTCCGAGA)-3'	1022-1041 1094-1111	90
Fzd8- Human	NM_031866	5'-(CGCCACGCGTTAATTTCT)-3' 5'-(ATCTCGGGTCTGAAAACG)-3'	2336-2353 2381-2399	64
Fzd8- Maus	NM_008058	5'-(CTAGAGGTGCACCAGTTTGG)-3' 5'-(TGCTACACAGAAAGAAGTTGAGGT)-3'	199-219 248-271	73
Fzd9- Maus	XM_284144	5'-(TCTGCTGCCCTTACCAG)-3' 5'-(GGTGTAACCATAGCGGTACAAGT)-3'	58-75 152-174	117
Fzd10- Human	NM_007197	5'-(TTGGTTTTCCAGCGAAGG)-3' 5'-(CCACAAATTAGTTACACAAGAGGCTA)-3'	2400-2417 2436-2461	62
Fzd10- Maus	NM_175284	5'-(TTATGGTGGGTGGTCTCCTCAC)-3' 5'-(CTCATGGCCCCACTTCTTT)-3'	1088-1107 1132-1150	63
Lrp5- Maus	NM_008513	5'-(ACCCACCTGACAGGCATC)-3' 5'-(GCACAAGGATGGGCTGAG)-3'	3695-3712 3745-3762	68
LRP6- Human	NM_002336	5'-(ATCCGAAAGGCACAAGAAGA)-3' 5'-(GACTCGGAACTGAGCTCACA)-3'	3042-3061 3085-3105	64
MMP2- Maus	NM_008610	5'-(GCAGTGATGGCTTCTCTG)-3' 5'-(CCCATGGTAAACAAGGCTTC)-3'	1052-1070 1126-1145	94
MMP9- Maus	NM_013599	5'-(ACGACATAGACGGCATCCA)-3' 5'-(GCTGTGGTTCAGTTGTGGTG)-3'	1307-1325 1374-1393	87
MT1-MMP- Maus	NM_008608	5'-(CCCAAGGCAGCAACTTCA)-3' 5'-(CCCTGGAGGTAGGTAGCCATA)-3'	329-346 370-390	62

Primer für die semiquantitative RT-PCR:

Der qualitative Nachweis der 10 Frizzled-Rezeptoren in hMSC und mMSC wurde über semiquantitative RT-PCR und Analyse der PCR-Produkte im DNA-Agarosegel erbracht. Die Auswahl der Primer erfolgte hierbei meist wiederum unter Zuhilfenahme der Spezialsoftware der Firma Roche (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>). Unterschiede zwischen den humanen und murinen Primern gleicher Zieltranskripte sind in Tab. D-4 unterstrichen. Wenn möglich wurden - wie im Falle von Fzd1, 2, 3, 4, 5 und 6 - die orthologen Sequenzbereiche im humanen und murinen System herangezogen. Für den Nachweis der Rezeptoren Fzd1 und Fzd6 mussten keine neuen Primer generiert werden, weil hier eine vollständige Sequenzhomologie zwischen den humanen und murinen Sequenzen gegeben war. Im Gegensatz dazu mussten die orthologen Primersequenzen für den Nachweis von Fzd2, 3 und 5 im Maussystem partiell verändert werden.

Tab. D-4: Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer für die semiquantitative RT-PCR.

Gen	Genbank -ID	forward-Primer-Sequenz reverse-Primer-Sequenz	Bindungsregion in der cDNA	Produkt bp
Fzd1- Human	NM_0035015	5'-(CAGAGCGGGCAGCAGTACAA)-3' 5'-(GCGCGGGCAGGAGAACTT)-3'	702-721 1230-1247	545
Fzd1- Maus	NM_021457	5'-(CAGAGCGGGCAGCAGTACAA)-3' 5'-(GCGCGGGCAGGAGAACTT)-3'	665-684 1193-1210	545
Fzd2- Human	NM_001466	5'-(CCATCCTATCCAGCTACAAGTTTCT)-3' 5'-(GCAGCCCTCCTTCTTGGTG)-3'	754-779 1095-1113	359
Fzd2- Maus	NM_020510	5'-(CCGTCTATCTCAGCTAAGTTTCT)-3' 5'-(GCAGCCTCTTCTTGGTG)-3'	892-917 1232-1251	359
Fzd3- Human	NM_017412	5'-(ACAGCAAAGTGAGCAGCTACC)-3' 5'-(CTGTAAGTGCAGGGCGTGTA)-3'	1736-1756 1789-1808	72
Fzd3- Maus	NM_021458	5'-(ACAGCAAAGTGAGCAGCTACC)-3' 5'-(CGGTAAGTGCAGGGAGTGTA)-3'	2048-2068 2100-2120	72
Fzd4- Human	NM_012193	5'-(ACACCGCTCATCCAGTACG)-3' 5'-(TGCACATTGGCACATAAACA)-3'	274-265 300-319	72
Fzd4- Maus	NM_008055	5'-(ACGCGCTCATCCAGTACG)-3' 5'-(TGCACATTGGCACATAAAC)-3'	541-559 593-613	72
Fzd5- Human	NM_003468	5'-(TCTTCACGCTGCTCTACCG)-3' 5'-(GGTAGTGCTGCTCGTACAGGT)-3'	1355-1374 1403-1423	68
Fzd5- Maus	NM_022721	5'-(TCTTCACCTGCTCTACCG)-3' 5'-(GGTAGTGCTGCTCATACAGGT)-3'	2226-2254 2273-2294	68
Fzd6- Human	NM_003506	5'-(TTTTGTCTTTGTGCAACTCTGTTCA)-3' 5'-(AGCCAATTCTGGTCGAGCTTTTG)-3'	898-922 1676-1698	800
Fzd6- Maus	NM_008056	5'-(TTTTGTCTTTGTGCAACTCTGTTCA)-3' 5'-(AGCCAATTCTGGTCGAGCTTTTG)-3'	930-954 1707-1730	800
Fzd7- Human	NM_003507	5'-(AAGCGGTTTGGATGAAAAGA)-3' 5'-(GATTCACATCGCCGTTATCA)-3'	1976-1995 2024-2043	68
Fzd7- Maus	NM_008057	5'-(GCTACTTCATGGTGGCAGTG)-3' 5'-(GGTAGCCATCGTCCGAGA)-3'	1022-1041 1094-1111	90
Fzd8- Human	NM_031866	5'-(CGCCACGCGTTAATTTCT)-3' 5'-(ATCTCGGGTCTGGAAACG)-3'	2336-2353 2381-2399	64
Fzd8- Maus	NM_008058	5'-(CTAGAGGTGCACCAAGTTTGG)-3' 5'-(TGCTACACAGAAAGAACTTGGAGGT)-3'	199-219 248-271	73
Fzd9- Human	NM_003508	5'-(GGCCGGGCCCGGGCCAAGGC)-3' 5'-(GGGTCCGTCTTAGTCATGTG)-3'	1871-1890 1957-1977	106
Fzd9- Maus	XM_284144	5'-(AGCTGTCAAGGTGAGACAAGTG)-3' 5'-(AAGGCCCTGAGCTTACTGG)-3'	1881-1902 1935-1954	74
Fzd10- Human	NM_007197	5'-(TTGGTTTTCCAGCGAAGG)-3' 5'-(CCACAAATTAGTTACACAAGAGGCTA)-3'	2400-2417 2436-2461	62
Fzd10- Maus	NM_175284	5'-(TTATGGTGGGTGGTCCCTCAC)-3' 5'-(CTCATGGCCCCACTTCTTT)-3'	1088-1107 1132-1150	63

D.1.3.2 Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken

Chemikalien und Materialien

Ampicillin Natrium-Salz	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	BD Bioscience, USA
Bacto Hefeextrakt	BD Bioscience, USA
Bacto Trypton	BD Bioscience, USA
D-Glukose	Sigma, Deisenhofen
Erlenmeyerkolben 100, 250 und 1000 ml	Wagner und Munz, München
Glycerin	Serva, Heidelberg
Kanamycinsulfat	Roche, Mannheim
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen, Polystyrol 9 cm Ø	Greiner, Nürtingen

Bakterienstämme

Die Bakterienstämme der Stammsammlung wurden durch Transformation der nachfolgend aufgeführten *E.coli*-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden erhalten.

TOP 10 (Invitrogen)

Genotyp: F⁺ mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139Δ(ara-leu)7697 galK rpsL(Str^R) endA1 nupG

XL-10 GOLD (Stratagene, USA)

Genotyp: Tetr Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]

D.1.3.3 Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken

Chemikalien und Materialien

Alizarin Rot	Sigma, Deisenhofen
Amphotericin B	PAA, Österreich
β -Glycerolphosphat	Sigma, Deisenhofen
<i>chamber slides</i>	Nunc, Wiesbaden
Costar-Transwell-Filter 6,5 mm \varnothing , 5 μ m Poren \varnothing	Corning, Niederlande
Costar-Transwell-Filter 6,5 mm \varnothing , 8 μ m Poren \varnothing	Corning, Niederlande
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Diff-Quick	Medion Diagnostic, Schweiz
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Österreich
DMSO	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Sigma, Deisenhofen
Formalin, neutral gepuffert	VWR, Darmstadt
Genitacin	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Merck, Darmstadt
Humanserum	PAA, Österreich
IBMX	Sigma, Deisenhofen
IMDM mit L-Glutamin	PAA, Österreich
Indomethacin	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma, Deisenhofen
LiCl	Sigma, Deisenhofen
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Matrigel	BD Biosciences, USA
Mausserum	Innovative Research Inc. USA
MEM alpha mit L-Glutamin, ohne Nukleoside	PAA, Österreich
MSC-Basalmedium und Growth Supplement	Lonza, USA
Nutridoma	Roche, Mannheim
Oil Red O	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich
Pferdeserum	PAA, Österreich
siRNA-Puffer	Qiagen, Hilden
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Österreich
Zellkulturgefäße und -platten	Nunc, Wiesbaden

siRNAs

Tab. D-5: Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten siRNAs zur Transfektion von hMSC und mMSC.

siRNA	Genbank ID human murin	Target-Sequenz sense-Sequenz antisense-Sequenz	Spezifität
Negativ- kontrolle	-	5'-r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)d(TT)-3' 5'-r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)d(TT)-3'	-
APC#1	NM_000038	5'-AATGAGAGCACTGATGATAAA-3' 5'-r(UGAGAGCACUGAUGAUAAA)d(TT)-3' 5'-r(UUUUAUCAUCAGUGCUCUCA)d(TT)-3'	human
APC#2	NM_000038 NM_007462	5'-AAGACAAGAGCTAGAAGATAA-3' 5'-r(GACAAGAGCUAGAAGAUAA)d(TT)-3' 5'-r(UUAUCUUCUAGCUCUUGUC)d(TT)-3'	human/murin
Axin2#1	NM_004655	5'-AAGGACTTGTGCCGACTTCAA-3' 5'-r(GGACUUGUGCCGACUUCAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGAAGUCGGCACAAGUCC)d(TT)-3'	human
Axin2#2	NM_004655	5'-AAGTGAGTTGGTTGTCACCTA-3' 5'-r(GUGAGUUGGUUGUCACUUA)d(TT)-3' 5'-r(UAAGUGACAACCAACUCAC)d(TT)-3'	human
Axin2#3	NM_004655	5'-AAGAAGAGCGATCCTGTTAAT-3' 5'-r(GAAGAGCGAUCCUGUAAU)d(TT)-3' 5'-r(UUGUUGAGCAAGGCAACCA)d(TT)-3'	human
β-Catenin	NM_001904	5'-AATGGTTGCCTTGCTCAACAA-3' 5'-r(UGGUUGCCUUGCUCACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUUGAGCAAGGCAACCA)d(TT)-3'	human
β-Catenin	NM_007614	5'-AATGAGGACCTACACTTATGA-3' 5'-r(UGAGGACCUACACUUAUGA)d(TT)-3' 5'-r(UCAUAAGUGUAGGUCCUCA)d(TT)-3'	murin
Cyclin D1	NM_012242	5'-AACCACAGATGTGAAGTTCAT-3' 5'-r(CCACAGAUUGAAGUUCAU)d(TT)-3' 5'-r(AUGAACUUCACAUCUGUGG)d(TT)-3'	human
Cyclin D1	NM_007631	5'-AACCACAGATGTGAAGTTCAT-3' 5'-r(GCAUGUUCGUGGCCUCUAA)d(TT)-3' 5'-r(UUAGAGGCCACGAACAUGC)d(TT)-3'	murin
Fzd8#1	NM_031866 NM_008058	5'-AACTCTGTGCATGGACTACAA-3' 5'-r(CCAUCUGCCUGGAGGACUA)d(TT)-3' 5'-r(UAGUCCUCCAGGCAGAUGG)d(TT)-3'	human/murin
Fzd8#2	NM_031866	5'-AAGTACTTCATGTGCCTAGTA-3' 5'-r(GUACUUCAUGUGCCUAGUA)d(TT)-3' 5'-r(UACUAGGCACAUGAAGUAC)TT)-3'	human
LRP5	NM_002335	5'-AACCAACGACCTCACCATTGA-3' 5'-r(CCAACGACCUACCAUUGA)d(TT)-3' 5'-r(UCAAUGGUGAGGUUCGUUGG)d(TT)-3'	human
LRP5	NM_008513 NM_008513	5'-AACCAACGACCTCACCATTGA-3' 5'-r(CCAACGACCUACCAUUGA)d(TT)-3' 5'-r(UCAAUGGUGAGGUUCGUUGG)d(TT)-3'	human/murin
LRP6	NM_002336 NM_008514	5'-AATCAGCGAAGAAGCCATTAA-3' 5'-r(UCAGCGAAGAAGCCAUUAA)d(TT)-3' 5'-r(UUAAUGGCUUCUUCGCUGA)d(TT)-3'	human/murin
MT1-MMP	NM_004995	5'-AACCAAGCTGAAGGTAGAA-3' 5'-r(CCAGAAGCUGAAGGUAGAA)d(TT)-3' 5'-r(UUCUACCUUCAGCUUCUGG)d(TT)-3'	human

Säugetierzellen

hMSC-L (Lonza)

hMSC wurden von der Firma Lonza (USA), ehemals Cambrex (USA), bezogen. Die Zellen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmark des posterioren Beckenkamms isoliert, wobei ihre Abtrennung von hämatopoetischen Zellen durch selektive Adhärenz an Plastik erfolgt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch positiv für CD105, CD166, CD29 sowie CD44 und negativ für CD14, CD34 und CD45 getestet. Die Firma garantiert einen negativen Befund auf HIV, Mycoplasmen, Hepatitis-B und -C, Bakterien und Pilze sowie die mesodermale Differenzierungsfähigkeit der Zellen. Die adipogene Differenzierung wurde durch Lipidvakuolenbildung, die chondrogene Differenzierung durch Bildung von Kollagen 2 sowie die osteogene Differenzierung durch Mineralisierung nachgewiesen. Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden hMSC dreier Spender (Tab. D-6) herangezogen, die laut Firmenangabe normalgewichtig waren und keine Anzeichen für Herzerkrankungen, Diabetes, Krebs, Epilepsie oder andere Organdysfunktionen zeigten.

Tab. D-6: Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten Spender von hMSC-L

hMSC (Spender)	Lot-Nummer	Geschlecht	Alter (Jahre)
I	1F1061	weiblich	19
II	3F1451	weiblich	23
III	370664	weiblich	19

hMSC-P (Prockop)

Des Weiteren wurden hMSC von der Arbeitsgruppe von Prof. Darwin Prockop (Tulane University, New Orleans, USA) bezogen. Die Zellen wurden aus dem oberen Beckenkamm erwachsener Spender gewonnen und durch Dichtegradientenzentrifugation sowie anschließender selektiver Adhärenz an Plastik angereichert (Sekiya et al., 2002). Die verwendeten Zellen entstammen einem männlichen 27-jährigen Spender. Sie wurden im Prockop-Labor in die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung differenziert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab das folgende Expressionsprofil: Die Zellen waren positiv für CD44, CD166, CD90, CD105, CD147, CD49c, CD29, CD49f und CD59, wohingegen die Expression von CD36, CD34, CD117 und CD45 nicht nachgewiesen werden konnte.

mMSC (Prockop)

Ebenfalls aus dem Prockop-Labor stammten die mMSC, deren Isolierung, Selektion und Expansion in dieser Arbeitsgruppe optimiert wurde (Peister et al., 2004). Bevor die Zellen in Umlauf kamen, wurde die Differenzierungsfähigkeit in Richtung Knochen und Fett analysiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen entstammen einer männlichen Maus des Stammes C57Bl6 und erwiesen sich nach durchflußzytometrischer Analyse als positiv für Sca-1 und CD29, wohingegen eine Expression von CD34, CD11B und CD45 nicht nachgewiesen werden konnte.

D.1.3.4 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken

Chemikalien und Materialien

4 - 15 % Tris-HCl Acrylamidgele	Biorad, München
Acrylamid : Bisacrylamid (37,1 : 1)	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Carl Roth, Karlsruhe
BCA-Assay	Interchim, Frankreich
BioMax	Kodak, USA
BioMax Filmkassette	Kodak, USA
Brij35	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Cellophan	Carl Roth, Karlsruhe
DAPI	Molecular Probes, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma, Deisenhofen
ECL Plus Western Blotting Detektionsreagenz	Amersham Biosciences, Freiburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Fertig-Zymogramm Gel, 10 % Gelatine	BioRad, München
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Gelatin Sepharose 4B	Amersham Biosciences, USA
Gelatine	Merck, Darmstadt
Geltrocknungsrahmen	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
PhastGel Blue R (Coomassie)	Amersham Biosciences, Freiburg
Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope	BioRad, München
Proteaseninhibitor-Cocktail, Complete-Mini	Roche, Penzberg
SDS	Serva, Heidelberg
SeeBlue Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tris-Cl	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
WesternGlo Detektionsreagenz	R&D Systems, USA
Whatman Filterpapier Nr.1	Whatman/Vetter, Ammerbuch

Proteine und Antikörper/Konjugate

Rekombinante Proteine:

humanes Dkk-1	R&D Systems, USA
humanes LRP6/FC Chimäre	R&D Systems, USA
murines Wnt3a	R&D Systems, USA

Antikörper:

(alle Antikörper erkennen sowohl humane als auch murine Antigene)

<i>goat</i> anti-LRP5 (Y-20)	SCBT, USA
<i>goat</i> anti-LRP6 (C-20)	SCBT, USA
<i>goat</i> anti- β -Aktin (I-19)	SCBT, USA
<i>goat</i> anti- β -Catenin (C-18)	SCBT, USA
<i>mouse</i> anti-Dkk-1, monoklonal	R&D Systems, USA
<i>rabbit</i> anti-Cyclin D1	SCBT, USA
<i>rabbit</i> anti-MT1-MMP	Sigma, Deisenhofen

Konjugate:

<i>donkey</i> anti- <i>goat</i> HRP-linked	SCBT, USA
<i>donkey</i> anti- <i>goat</i> , F(ab)2-FITC	SCBT, USA
<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> HRP-linked	New England Biolabs, Frankfurt
<i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> HRP-linked	New England Biolabs, Frankfurt

D.2 Methoden

D.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die meisten verwendeten molekularbiologischen Methoden wurden nach Angaben von Sambrook et al. durchgeführt (Sambrook et al., 2001). Abweichende Methoden und neu etablierte Techniken werden einzeln erläutert.

D.2.1.1 Methoden für die Klonierung rekombinanter Gensequenzen

Plasmidisolierung aus *E.coli*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen erfolgte mit Hilfe des Plasmidisolierungs-Kits der Firma PeqLab und beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen (Birnboim and Doly, 1979).

Restriktion und Ligation von Restriktionsfragmenten

Die Restriktion mit spezifischen Endonukleasen wurde für die Linearisierung von Plasmiden oder zum Ausschneiden gewünschter DNA-Fragmente verwendet. Die analytische Restriktion diente der Überprüfung rekombinanter Plasmide, während durch präparative Restriktion die Subklonierung von DNA-Sequenzen angestrebt wurde, wobei jeweils 1 µg bzw. 2,5 pmol DNA eingesetzt wurden. Die Menge des Restriktionsenzym (RE) wurde in Anlehnung an folgende Faustregel ermittelt: als 1 U wurde die Menge an Restriktionsenzym festgesetzt, die benötigt wird, um 1 µg λ-Phagen-DNA (48.000 bp) in 1 Stunde bei optimalen Reaktionsbedingungen komplett zu verdauen.

$$\frac{\text{Anzahl der Nukleotide in } \lambda}{\text{Anzahl der Nukleotide im Vektor / Insert}} \times \frac{\text{Schnittstellen im Vektor / Insert}}{\text{Schnittstellen in } \lambda} = \text{Menge an RE [U]}$$

Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und bei Bedarf für die weitere Verarbeitung aus dem Agarosegel eluiert. Zuvor ausgeschnittene DNA-Fragmente wurden durch Ligation für die Herstellung rekombinanter DNA-Konstrukte miteinander verknüpft. Dabei wurde für die Ligation von überhängenden bzw. stumpfen Enden das Insert mit der Zielvektor-DNA im molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt, mit 400 Weiss U T4-DNA-Ligase versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Klenow-Enzym-vermittelte Auffüllreaktion

Das Klenow-Enzym entspricht der großen Untereinheit der DNA Polymerase I von *E.coli*. Es katalysiert die Addition von Desoxynukleotid-5'-Triphosphaten an das 3'-Hydroxylende eines Primers. Im Klenow-Enzym liegen noch die 5'→3'-Polymerase- und die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität vor, wohingegen die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität fehlt. Im Falle der Restriktion von DNA-Molekülen mit Enzymen, die ungleiche Enden generieren, kann das Klenow-Enzym eingesetzt werden, um Überhänge durch eine Auffüllreaktion zu komplementieren. Hierbei wurde 1 µg DNA mit 1 µl einer dNTP-Lösung (1 mM), 2 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) und einem mitgelieferten 10fach Puffer in einem Endvolumen von 20 µl für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von 2 µl 0,1 M EDTA-Lösung und 10minütiger Inkubation bei 65 °C.

Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Um sowohl die Größe als auch die Homogenität gewünschter DNA-Fragmente zu überprüfen, erfolgte die Auftrennung derselbigen durch Elektrophorese in 1-3%igen Agarosegelen. Die Gele wurden durch Lösen der entsprechenden Menge an Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris/Base; 20 mM Acetat; 2 mM EDTA, pH 8,3) und etwa zweiminütiges Erhitzen im Mikrowellenofen bei 600 Watt hergestellt. Nach Abkühlen dieser Lösung mit kaltem Wasser auf 55 °C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,05 % zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 10fach konzentriertem Gel-Ladepuffer versehen, in die Taschen des ausgehärteten Gels aufgetragen und in TAE-Puffer mit 5-7 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Visualisierung der DNA durch Interkolation von Ethidiumbromid erfolgte mittels eines UV-Transilluminators (302 nm).

Elution von DNA aus dem Agarosegel

Aus dem Agarosegel ausgeschnittene DNA-Banden wurden mit dem Gelextraktionskit Nucleospin Extract II der Firma Macherey-Nagel (Düren) zur Isolierung der gewünschten Fragmente behandelt. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge Solubilisierungspuffer wurde die Agarosegelbande bei 50 °C für 10 Minuten geschmolzen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in Anwesenheit chaotroper Salze an eine Silicamembran gebunden. Kontaminationen mit Salzen und löslichen makromolekularen Komponenten wurden durch Waschstreps mit ethanolhaltigem Puffer entfernt. Die Elution der DNA erfolgte unter Nidrigsalz-Bedingungen mit einem leicht alkalischen Puffer (5 mM Tris-Cl, pH 8,5).

DNA-Sequenzierung

Die automatisierte DNA-Sequenzierung mittels Fluoreszeinmarkierten Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977) wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der Software NCBI BLAST und SECentral.

D.2.1.2 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung der RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte mittels des RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden). Hierfür wurden die in der Zellkultur abgelösten und sedimentierten Zellen in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert, wodurch eine vollständige Lyse erreicht wurde. Die quantitative Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zugabe des Reduktionsmittels β-Mercaptoethanol (1 % Endkonzentration) zu dem mitgelieferten RLT-Puffer. Die Homogenisierung des Lysats wurde mittels einer QIAshredder-Säule erreicht, die bei maximaler Geschwindigkeit (16.100 x g) zwei Minuten zentrifugiert wurde. Das homogene Lysat wurde anschließend mit der äquivalenten Menge (350 µl) an 70 %igem Ethanol versetzt, da diese Ethanolkonzentration (35 %) eine optimale Bindung der RNA an die RNeasy-Mini Säule ermöglicht. Das Gemisch wurde daraufhin zentral auf die RNeasy-Mini Säule pipettiert und nach Zentrifugation (15 Sekunden, 16.100 x g) wurde der Durchfluss verworfen und ein neues Sammelröhrchen verwendet. Die Entfernung der nicht-RNA-haltigen Fraktion erfolgte durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer auf die RNeasy-Mini Säule und einem Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 16.100 x g. Angeschlossen wurde ein zweimaliger Waschstreps durch Zentrifugation mit 500 µl RPE-Puffer (15 Sekunden, 16.100 x g). Abschließend wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

D.2.1.3 cDNA-Synthese

Als Vorbereitung für die semiquantitative bzw. qRT-PCR wurde die isolierte Total-RNA mittels des Quantitect Reverse Transcription-Kit (Qiagen, Hilden) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und gleichzeitig der Verdau genomischer DNA vorgenommen. Als Ausgangsmaterial dienten zwischen 150 und 1000 ng Total-RNA in einem maximalen Volumen von 12 µl, deren Umschreiben in cDNA mittels Oligo-dT- und Zufalls-Primern erfolgte, die sowohl ein Binden an die 3'- als auch an die 5'-Regionen der mRNA garantieren. Die Reaktion wurde mit einem zweiminütigen Verdau der DNA bei 42 °C im PCR-Multicycler nach Zugabe von 2 µl gDNA *Wipeout Buffer* (7x) gestartet. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und durch Zugabe des in Tab. D-7 angegebenen Ansatzes wurde die reverse Transkription für 30 Minuten bei 42 °C durchgeführt. In einem abschließenden Schritt wurde die Reverse Transkriptase bei 95 °C für 3 Minuten inaktiviert.

Tab. D-7: cDNA-Synthese-Ansatz

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
Quantitect Reverse Transcriptase	1 µl	
Quantiscript RT Puffer 5x	4 µl	1 x
RT-Primer-Mix	1 µl	
Gesamt-RNA nach genomischer DNA-Eliminierungsreaktion	14 µl	
Totalvolumen	20 µl	

D.2.1.4 Quantitative RT-PCR

Das LightCycler-System der Firma Roche (Mannheim) diente dem quantitativen Nachweis von mRNA-Transkripten. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Methodiken angewandt:

Beim SYBR Green-System erfolgt die PCR-basierte Produktquantifizierung durch die Analyse der log-Phase der PCR, bei der die Vermehrung des PCR-Produktes mit einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals einhergeht. Hierbei interkaliert der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I in die entstehende dsDNA. Mit zunehmender Zyklenzahl nimmt die Menge an spezifischem ds-Produkt und somit auch die Fluoreszenz zu, die im LightCycler-System detektiert werden kann. Über die Verdünnungsreihe eines Standards mit genau definierter Kopienzahl wird eine Standardkurve erstellt, anhand derer bestimmt werden kann, wie viele Kopien der Matrize ursprünglich in der Probe vorlagen. Die PCR-Bedingungen richteten sich nach den Angaben des für diese RT-PCR benötigten Primerset-Herstellers Search-LC (www.search-LC.de). Demnach erfolgte eine Anfangsdenaturierung bei 95 °C für 10 Min, wobei 35 Zyklen mit 95 °C/10 Sek, 68 °C/10 Sek, 72 °C/16 Sek mit Fluoreszenzverstärkung 5 folgten. Abschließend wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur eine Schmelzkurvenanalyse mit den Parametern 95 °C → 58 °C/10 Sek → dT/dt 0,1 °C/Sek durchgeführt, die es erlaubt, Primerdimere und unspezifische Produkte zu identifizieren. Unabhängig von der Menge der für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA wurde jeweils 1 µl der cDNA-Lösung mit Aqua dest. auf 5 µl aufgefüllt. Dieses Volumen wurde in die dafür vorgesehenen LightCycler-Glas-Kapillaren pipettiert und mit 5 µl eines PCR-Ansatzes ergänzt, was zu einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Kapillare führte. Die PCR-Stocklösung setzte sich aus 3 µl Aqua dest., jeweils 1 µl Primer Set und 1 µl LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I der Firma Roche (Mannheim) zusammen, das neben SYBR Green I, die DNA-Polymerase, PCR-Puffer und dNTPs enthielt. MgCl₂ lag in allen Ansätzen in einer Endkonzentration von 1 mM vor.

Bei dem UPL-System, das auf dem TaqMan-Prinzip basiert, wird eine Sonde verwendet, die zum einen mit dem fluoreszierenden Reporterfarbstoff Fluoreszein und zum anderen mit einem Quencher markiert ist. Solange die Sonde intakt ist, liegt der Quencher in der Nähe des Farbstoffs und unterdrückt dessen Fluoreszenz durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Wenn die Sonde allerdings mit der Zielsequenz hybridisiert, kann die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase die Sonde abbauen, wobei Reporter und Quencher getrennt werden. So wird im Verlauf der PCR mit steigender Produktmenge immer mehr Fluoreszenz freigesetzt.

Die auf der Homepage der Firma Roche angebotene Plattform ermöglicht die Ermittlung der zu verwendenden Primersequenzen sowie der dazugehörigen Sonden. Letztere wird aus insgesamt 165 ausgewählt, wobei diese innerhalb der Sequenz lokalisiert ist, die durch die beiden Primer amplifiziert wird. Um die Spezifität und auch die entsprechende Schmelztemperatur zu erhalten, wurde in jede Sonde das Duplex-stabilisierende DNA-Analogon LNA (*locked nucleic acid*) eingebaut. Dieses Analogon enthält eine 2'-O, 4'-C Methylene-Brücke, die die Flexibilität des Ribofuranose-Rings einschränkt und damit zu stärkerer Hybridisierung mit erhöhter biologischer Stabilität führt. Die jeweilige Spezifität wird durch die entsprechende Kombination von Sonde und Primern gewährleistet.

Für einen Reaktionsansatz wurde 1 µl der zu analysierenden cDNA eingesetzt und mit einem Mix aus 9 µl zu einem Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Der Reaktionsmix beinhaltete 6,5 µl H₂O, jeweils 0,2 µl *forward* und *reverse* Primer mit einer Arbeitskonzentration von jeweils 10 µM, 0,1 µl Sonde (Endkonzentration 100 nM) und 2 µl TaqMan Master, der neben den Nukleotiden die *HotStart*-Polymerase enthielt. Die PCR-Bedingungen im LightCycler waren wie folgt: 95 °C/10 Min; [95 °C/10 Sek, 68 °C/10 Sek, 72 °C/1 Sek] x 45 Zyklen; 40 °C/30 Sek. Mit Hilfe verschiedener Verdünnungen von Kontroll-cDNAs, zu denen die Proben in Relation gesetzt wurden, konnten imaginäre Kopienzahlen ermittelt werden, die zur relativen Quantifizierung der Transkriptmengen in den Proben verwendet werden konnten und so einen Vergleich der Expressionsniveaus einzelner Transkripte erlaubten.

D.2.1.5 Semiquantitative RT-PCR

Die Amplifikation der kodierenden Sequenz von humanem Wnt3a erfolgte mit Hilfe einer *touch-down*-PCR aus Plazenta-cDNA (BD Clontech). Diese bestand aus drei Blöcken, in denen die *annealing*-Temperatur graduell wie folgt reduziert wurde: 95 °C/2 Min; [95 °C/15 Sek, 72 °C/2 Min, 72 °C/90 Sek] x 15 Zyklen; [95 °C/15 Sek, 70 °C/30 Sek, 72 °C/90 Sek] x 10 Zyklen; [95 °C/15 Sek, 66 °C/30 Sek, 72 °C/90 Sek] x 20 Zyklen; 72 °C/10 Min.

Der qualitative Nachweis aller murinen und humanen Fzds erfolgte durch semiquantitative RT-PCR. Hierfür wurde jeweils 1 µl cDNA (entsprechend 50 ng revers transkribierter Total-RNA) in die PCR eingesetzt. Diese erfolgte unter Einsatz der puReTag Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare), die jeweils 200 µM Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die Taq-Polymerase (2,5 U), BSA, KCl (50 mM) und MgCl₂ (1,5 mM) enthielten. Es handelte sich hierbei um Lyophilisate, die durch Zugabe von jeweils 1 µl *forward* und *reverse* Primer (10 µM), 1 µl Proben-cDNA und 22 µl H₂O gelöst wurden. Die PCR-Bedingungen waren bei allen Zielgenen gleich, variierten aber partiell in der *annealing*-Temperatur (49,9 – 56 °C) und waren wie folgt: 95 °C/ 5 Min; [95 °C/15 Sek, 49,9 °C/30 Sek, 72 °C/10 Sek] x 35 Zyklen; 72 °C/10 Min.

D.2.2 Mikrobiologische Methoden

Die meisten verwendeten mikrobiologischen Methoden in dieser Arbeit wurden nach Angaben von Sambrook et al. (2001) durchgeführt.

D.2.2.1 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Stämme

Für die Transformation wurden *E.coli*-Aliquots (100 µl) auf Eis aufgetaut und für 10 Minuten mit 0,85 µl β-Mercaptoethanol versetzt, wobei das Reaktionsgefäß etwa alle zwei Minuten angetippt wurde. Nach Zugabe des Ligationsansatzes erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen auf Eis, die durch einen Hitzeschock bei 42 °C für genau 45 Sekunden beendet wurde. Unmittelbar danach wurden die Zellen wieder für zwei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend durch Zugabe von 250 µl SOC-Medium (5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM D(+)-Glukose) bei 37 °C und 220 upm geschüttelt. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

D.2.2.2 Kultivierung und Selektion transformierter *E.coli*-Stämme

Wachstumsmedium

Das zur Kultivierung von *E.coli*-Stämmen verwendete Wachstumsmedium DYT-Medium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) hatte einen pH-Wert von 7,5 und wurde durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C und 1 x 10⁵ Pa Überdruck sterilisiert. Wenn die Zugabe hitzelabiler Lösungen erforderlich war, erfolgte dies durch Sterilfiltration mittels eines 0,22 µm Filters, nachdem das Medium auf 50 °C abgekühlt worden war. Für die Herstellung solider Kultivierungsplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Antibiotika als Selektionsmittel

Für die Selektion von resistenten *E.coli*-Klonen wurden die Medien oder Kultivierungsplatten mit Ampicillin bzw. Kanamycin versetzt. Die Endkonzentrationen betragen 200 µg/ml für Ampicillin und 50 µg/ml für Kanamycin, wobei die Stocklösungen von 200 mg/ml bzw. 50 mg/ml im Fall von Ampicillin in 70 %igem (v/v) Ethanol und bei Kanamycin in sterilem ddH₂O gelöst wurden.

Herstellung und Lagerung der *E.coli*-Stämme

Um die transformierten *E.coli*-Klone über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden einzelne Zellklone über Nacht in einer Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen und am nächsten Tag 3 ml dieser Kultur mit 500 µl sterilem Glycerin (100 %) versetzt. Diese Aliquots wurden bei -80 °C gelagert und in den laboreigenen Stammsammlungskatalog aufgenommen, worin der Bakteriengenotyp, das transformierte Plasmid und die jeweilige Resistenz verzeichnet wurden. Wenn nur eine kurze Lagerung nötig war, wurden die *E.coli*-Klone auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, bebrütet und bei 4 °C gelagert.

D.2.3 Zellbiologische Methoden

D.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Kryokonservieren der MSC-Populationen verlief nach gleichem Zeitschema, lediglich die Zusammensetzung der Einfriermedien war unterschiedlich und ist Tab. D-8 zu entnehmen. In jedem Fall wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und im Anschluss jeweils $0,5-1 \times 10^6$ hMSC bzw. $2-3 \times 10^6$ mMSC in 0,5-1 ml des entsprechenden Einfriermediums resuspendiert und in Kyroröhrchen verteilt. Diese wurden zunächst 2 Stunden bei -20 °C eingefroren, dann für weitere 12-16 Stunden bei -80 °C und abschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tab. D-8: Übersicht der Einfriermedien der verwendeten Zellen

	Medium [%]	FBS [%]	DMSO [%]	BSA [%]
hMSC-Lonza	75	10	10	5
hMSC-Prockop	65	30	5	-
mMSC	65	30	5	-

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen ($0,5 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ Zellen/Ampulle) zwei Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und in 5 ml 37 °C temperiertem Kultivierungsmedium resuspendiert. Vor Aussaat der Zellen in drei 75 cm²-Zellkulturflaschen (T75) wurden sie fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (600 x g). Die Resuspension des Sedimentes erfolgte nach Überstandabnahme in 3 ml Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Für die Kultivierung der Zellen wurden jeweils 10 ml Medium pro T75-Kulturflasche verwendet.

D.2.3.2 Kultivierung von MSC

Alle Zellen wurden bei 37 °C , 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und regelmäßig hinsichtlich einer Mykoplasmen-Kontamination überprüft. Hierzu wurde der Kit der Firma Minerva laut Herstellerangaben verwendet. Alle drei bzw. vier Tage wurde das dem jeweiligen Zelltyp entsprechende Medium gewechselt, dessen Zusammensetzung in Tab. D-9 zusammengefasst ist. Hatten die Zellen einen Konfluenzgrad von 90 bis 95 % erreicht, konnten sie erneut subkultiviert oder geerntet werden.

Tab. D-9: Zusammensetzung der verwendeten Kultivierungsmedien

Zelltyp	Medium	Zusätze
hMSC-Lonza	MSCBM	MSCGM Single Quot (10 % FBS, 200 mM L-Glutamin, 0,5 ml Pen/Strep)
hMSC-Prockop	aMEM	16,5 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
mMSC	IMDM	10 % FBS, 10 % Pferdeserum, 0,5 µg/ml Amphotericin B, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

D.2.3.3 Splitten konfluenter Zellen

Die Subkultivierung adhärenter MSC setzt das Ablösen der Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA voraus. Dazu wurde das Medium entfernt und die anhaftende Zellschicht in PBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen, welche durch das darin enthaltene Serum eine Inaktivierung des Trypsins bewirken könnte. Nach Zugabe der Trypsin/EDTA-Lösung und einer etwa 5-10-minütigen Inkubation bei 37 °C konnten die Zellen abgelöst und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt werden. Nach anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 500 - 1000 x g, wurden die Zellen im jeweiligen Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturkavität ausgesät.

D.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Um für Transfektionsexperimente mit einer definierten Zellzahl arbeiten zu können, wurde hierzu eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dies wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bewerkstelligt. Die Anzahl der enthaltenen Zellen wurde mikroskopisch ermittelt und deren Konzentration wie folgt berechnet:

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

D.2.3.5 Osteogene und adipogene Differenzierung der Stammzellen

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten osteogenen bzw. adipogenen Differenzierungen von hMSC und mMSC dienten der Überprüfung des Stammzellcharakters und wurden routinemäßig durchgeführt.

Sowohl hMSC als auch mMSC wurden grundsätzlich anhand derselben Protokolle differenziert. Die Zusammensetzung der Differenzierungsmedien (Tab. D-10) basierte auf den Angaben von (Jaiswal et al., 1997). Die osteogene Differenzierung konfluenter MSC erfolgte durch Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums über eine Dauer von 1, 2 oder 3 Wochen, wobei alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die adipogene Differenzierung wurde in zwei Zyklen durchgeführt, d.h. konfluente Zellen wurden fünf Tage lang mit Induktionsmedium behandelt, woran sich eine zweitägige Zugabe von Erhaltungsmedium anschloss.

Tab. D-10: Zusammensetzung des osteogenen und adipogenen Differenzierungsmediums.

Osteogenes Differenzierungsmedium	Endkonzentration
Dexamethason	100 nM
β-Glycerol-Phosphat	10 mM
L-Ascorbinsäure-Phosphat	50 μM
Adipogenes Differenzierungsmedium	Endkonzentration
Induktionsmedium	
Dexamethason	1 μM
IBMX	500 μM
Indomethacin	200 μM
Insulin	0,01 mg/ml
Erhaltungsmedium	
Insulin	0,01 mg/ml

D.2.3.6 Alizarin Rot- und Oil Red O-Färbung

Um die osteogene Differenzierung nachzuweisen, wurden die mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten Zellen nach 7 oder 14 Tagen mit Alizarin Rot gefärbt, was eine Visualisierung der Kalzifizierung erlaubt. Dazu wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 1 Stunde bei -20 °C in eiskaltem Ethanol (70 %) fixiert. Nach Rehydrierung mit Aqua dest. wurden die Zellen 10 Minuten mit Alizarin Rot-Lösung (40 mM, pH 4,1) auf dem Schüttler inkubiert. Durch Waschen mit PBS wurde die überschüssige Alizarin Rot-Lösung entfernt.

Für die Oil Red O-Färbung, die eine Rotfärbung der Lipidvakuolen ermöglicht, wurden die Zellen nach zweiwöchiger adipogener Differenzierung zunächst für zwei Minuten mit Formalin (10 %, neutral gepuffert) bei -20 °C fixiert und anschließend bei Raumtemperatur mit 50 % Ethanol inkubiert. Die Färbung erfolgte für 20 Minuten auf dem Schüttler mit Oil Red O-Lösung (0,2 % Oil Red O in Isopropanol gelöst). Abschließend wurde einmal mit Ethanol (50 %) und Aqua dest. gewaschen. Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen mikroskopisch.

D.2.3.7 Lipofektion von Plasmid-DNA und siRNA

Das Prinzip dieser Technik basiert auf der Wechselwirkung der anionischen Nukleinsäuren und des kationischen amphiphilen Transfektionsreagenzes. Durch Komplexbildung werden Mizellen generiert, die endozytotisch von der Zelle aufgenommen werden können.

Im Folgenden wird die Durchführung der Transfektion im Allgemeinen beschrieben, da sie unabhängig von der verwendeten Nukleinsäure (siRNA bzw. DNA) und der zu transfizierenden Zellart war. Die Angaben und Verhältnisse der eingesetzten DNA-/siRNA-Mengen können Tab. D-11 entnommen werden. 24 Stunden vor Transfektion wurden die Zellen etwa 35 % konfluent ausgesät. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) wurde in Serum-freiem DMEM aufgenommen und nach fünfminütiger Inkubation mit der Nukleinsäure gemischt, die ebenfalls in Serum-freiem Medium gelöst worden war. Hierauf erfolgte eine 20-minütige Inkubation dieser Lösung bei Raumtemperatur, was die Bildung der sog. Lipoplexe ermöglichte. Währenddessen wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen erneuert und anschließend die Lipofectamine 2000/Nukleinsäure-Lösung tropfenweise zugegeben. Nach sechsständiger Inkubation bei 37 °C wurde der Transfektionsansatz durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt.

Bei der Transfektion von DNA wurden abweichende Mengen eingesetzt, je nachdem, ob das Einbringen der Plasmid-DNA nur transient oder mit dem Ziel der stabilen Integration ins Genom erfolgte. War letzteres der Fall, wurden die Zellen am ersten Tag nach der Transfektion von der 10 cm Kulturschale, in der sie transfiziert worden waren, abgelöst und in eine T75-Kulturschale überführt. Zudem wurde das Medium mit 200 µg/ml des Antibiotikums Neomycin versetzt, wobei die Selektion über einen Zeitraum von 21 Tagen erfolgte. Nicht-transfizierte Zellen überstanden diese Prozedur nicht.

Tab. D-11: Transfektionsbedingungen von hMSC und mMSC

DNA-Transfektion	DNA	Lipofectamine 2000
hMSC-Lonza	0,2 µg/cm ²	1,5-fach
hMSC-Prockop	Transient: 0,3 µg/cm ²	1,5-fach
mMSC	Transient: 0,3 µg/cm ² ; Stabil: 0,1 µg/cm ²	1,5-fach
siRNA-Transfektion	siRNA	Lipofectamine 2000
hMSC-Lonza	25 nM	2-fach
hMSC-Prockop/mMSC	40 nM	2-fach

D.2.3.8 Zellinvasionsstudien

Die Invasion von hMSC und mMSC durch rekonstituierte Basalmembranen in Richtung eines Konzentrationsgradienten wurde in einem *in vitro*-Modell unter Verwendung des sog. Transwell-Systems untersucht. Dieses besteht aus Einsätzen, die in die Vertiefungen einer 24-Kavitäten-Platte eingebracht werden und eine Membran mit 5 bzw. 8 μm Porengröße enthalten. Dadurch entstehen zwei räumlich voneinander abgegrenzte Kompartimente, die mit unterschiedlichen Medien befüllt werden können (Abb. D-6).

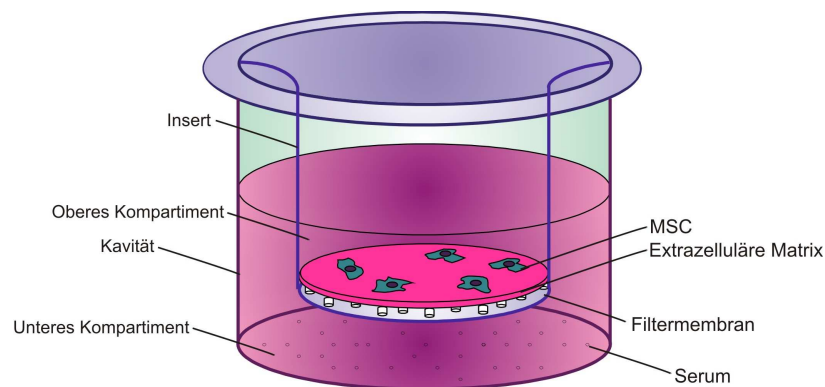


Abb. D-6: Schematische Darstellung des *in vitro*-Invasionsassays.

24 Stunden vor dem Einsetzen der Zellen in das obere Kompartiment wurden die Membranen im Falle der hMSC mit 10 μg humaner extrazellulärer Matrix (hECM) und entsprechend für die Mauszellen mit 10 μg Matrigel beschichtet. Beide extrazellulären Matrices wurden kommerziell erworben, wobei hECM aus humaner Plazenta (PAA, Österreich) und Matrigel aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Maussarkom (BD, USA) gewonnen wurde. Für die Beschichtung wurde die entsprechende Matrix in 200 μl Serum-freiem RPMI-Medium resuspendiert und in das obere Kompartiment pipettiert. Die Platten wurden dann geöffnet und unter sterilen Bedingungen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Flüssigkeit verdampfte und eine gleichmäßige Beschichtung der Membranen gewährleistet wurde. Bevor im Anschluss die Zellen eingebracht wurden, erfolgte ein Rehydrieren der Membranen mit 200 μl DMEM-Nutridoma (1 %). Im Falle der hMSC wurden 5000 Zellen eingesetzt, wohingegen 7500 mMSC in das obere Kompartiment eingebracht wurden. Das untere Kompartiment wurde mit 600 μl DMEM-Nutridoma (1 %) befüllt, das 10 % Humanserum im Fall von hMSC bzw. entsprechend für mMSC 10 % Mausserum enthielt. Nach 48 bzw. 6 Stunden wurde der hMSC- bzw. der mMSC-Invasionsansatz gestoppt.

Zur Bestimmung der transmigrierten Zellen wurden die auf der Filtermembran im oberen Kompartiment liegenden Zellen unter Zuhilfenahme eines Wattestäbchens entfernt, woraufhin die Visualisierung durchgewandelter Zellen auf der Unterseite der Membranen durch die Diff-Quick-Färbung (Interchim, Frankreich) ermöglicht wurde. Dies ist eine Schnellfärbemethode, bei der die Zellen durch kurzzeitiges sequentielles Eintauchen in die drei mitgelieferten Lösungen fixiert und gefärbt werden. Die Anzahl der Zellen, die die Membran durchquert hatten, wurde dann durch Lichtmikroskopie ermittelt und in Relation zur Gesamtheit aller eingesetzten Zellen gesetzt.

D.2.3.9 Proliferationsstudien

Die Untersuchung der Proliferation eukaryontischer Zellen erfolgte mittels des CyQuant-Assay-Proliferation Kit der Firma Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe). Dieser beruht auf dem Einsatz des fluoreszierenden Farbstoffs CyQuant, der unspezifisch in Nukleinsäuren interkaliert. Die Lyse der zu untersuchenden Zellen und die nachfolgende Inkubation mit dem Farbstoff ermöglichten eine Bestimmung der Zellzahlen im Vergleich zu einem Zellstandard. Dazu wurde unter Verwendung eines Neubauer Hämatocytometers eine Verdünnungsreihe der Zellen generiert, die ebenfalls mit dem Farbstoff inkubiert wurden. Nach Fluoreszenz-Bestimmung bei 480 nm Anregung und 520 nm Emission konnte so eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe sich die Zellzahlen in den jeweiligen Versuchsansätzen ermitteln ließen. Die Zellen wurden hierzu in einer Konfluenz von 25 – 35 % in den Vertiefungen einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät und darin transfiziert bzw. stimuliert. Danach erfolgte eine Kultivierung über einen Zeitraum von drei bis sieben Tagen. Im Anschluss daran wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und mindestens 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Ebenso wurden die Standardproben behandelt, nachdem deren Zellzahl bestimmt und sie in Eppendorfgefäße überführt worden waren. Die Lyse bei Raumtemperatur erfolgte unter Verwendung von 400 µl eines im Kit enthaltenen Lysepuffer. Anschließend wurden jeweils im Doppelansatz 100 µl einer jeden Probe in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Kavitäten-Platte pipettiert. Unmittelbar vor der Messung wurde der Farbstoff CyQuant, der zuvor ebenfalls im Lysepuffer gelöst worden war, in einer Verdünnung von 1: 200 zugegeben und die Emission bei 520 nm gemessen. Nach Doppelbestimmung aller Proben wurden die Messwerte jeweils prozentual in Relation zur entsprechenden Kontrolle dargestellt.

D.2.4 Proteinchemische Methoden

D.2.4.1 Isolierung von Zytoplasma- und Membranproteinen

Für die Isolierung der zytoplasmatischen Proteine β -Catenin und Cyclin D1 sowie des Membranproteins LRP5 wurden die mesenchymalen Stammzellen wie üblich durch Trypsinierung vom Kulturgefäß abgelöst und anschließend in eiskaltem PBS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden Aliquots à 40.000 Zellen hergestellt, die bei 500 x g für 5 Minuten sedimentiert wurden, woraufhin das Zellpräzipitat in 18 µl hypotonischem Lysepuffer (50 mM Na_2HPO_4 ; 50 mM NaH_2PO_4 ; 0,2 M NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 1 % (v/v) Proteaseninhibitor-Cocktail; pH 6,0) gelöst wurde. Nach Resuspension und Mischen erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, die durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 10 Minuten und 4 °C beendet wurde. Der so gewonnene Überstand mit den löslichen zytoplasmatischen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl Laemmli-Auftragspuffer (0,4 M Tris, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 10 % DTT, eine Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt.

Die Isolierung von MT1-MMP in hMSC-Zellextrakten erfolgte durch Zugabe eines Extraktionspuffers (50 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 % Triton X-100), der eine Mischung verschiedener Proteaseinhibitoren enthielt (Roche), zu adhärennten Zellen. Anschließend wurden die Zelllysate für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und nach Zentrifugation bei 13.000 x g für fünf Minuten der Überstand abgenommen und mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt.

Die Isolierung aller anderen in dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurde mit folgendem Protokoll erzielt: Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers in eiskaltem PBS von der Kulturschale abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch fünfminütige Zentrifugation bei 500 x g

sedimentiert. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 µl eines RIPA-Puffers (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA, pH 7,5) und der Inkubation auf einem Roller für 70 Minuten bei 4 °C. Die nachfolgende Zentrifugation bei 13.000 x g für 10 Minuten ermöglichte die Gewinnung sowohl der zytoplasmatischen Proteine als auch der Membranproteine aus dem Überstand, der mit 50 µl Laemmli-Auftragspuffer versetzt wurde. Zudem wurden an dieser Stelle jeweils 5 µl Probe entnommen, um eine Proteinbestimmung durchzuführen. Abschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie entweder direkt für die Analyse im Western Blot eingesetzt oder vorübergehend bei -20 °C gelagert wurden.

D.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinbestimmung wurde die colorimetrische BCA-Methode angewandt. Hierbei wird die Bildung eines blauen Cu^{2+} -Komplexes bei 560 nm nachgewiesen, der sich zwischen Peptidbindung und Bicinchonininsäure (BCA) in Gegenwart von Cu^{2+} bildet. Um dies zu erreichen, wurden 100 µl Lysat entweder direkt (wie im Falle der Gaussia-Luciferase-Proben) oder in einer geeigneten Verdünnung mit 100 µl BCA/ Cu^{2+} (24:1)-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C in den Vertiefungen einer transparenten 96-Kavitäten-Platte inkubiert. Zur Quantifizierung der Proben diente eine Standardkurve, die mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration erstellt wurde.

D.2.4.3 Proteinnachweis mittels Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus Lysaten eukaryontischer Zellen erfolgte mittels diskontinuierlicher Elektrophorese (Laemmli, 1970). Durch die Anwesenheit von SDS sowohl in den verwendeten Polyacrylamidgelen als auch in den Puffern werden die Proteine denaturiert und erhalten durch Anlagerung des Detergenzes negative Ladungen, was ihre Auftrennung nach der Molekülmasse ermöglicht. Entsprechend der Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine wurden Gele mit unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentration (zwischen 6 % und 12,5 %) verwendet. Die mit Laemmli-Auftragspuffer versehenen Proben wurden zunächst 5 Minuten bei 95 °C gekocht, danach für 10 Sekunden bei 5000 x g zentrifugiert und schließlich in die Taschen der Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben im Gel erfolgte für etwa 60-90 Minuten bei 120 V in einem SDS enthaltenden Laufpuffer (25 mM Tris-Base, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS). Hierfür wurde das TransBlot Module der Firma BioRad (München) verwendet. Zum Zweck der Visualisierung und Bewertung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurde ein Farbstoff-markierter Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wurde ebenfalls das Mini TransBlot Module der Firma Biorad verwendet. Das Transfersystem wurde in folgender Reihenfolge zusammengesetzt, wobei die Membran zuvor für 15 Minuten im Methanolhaltigen Transferpuffer (25 mM Tris-Base, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol) äquilibriert wurde: Kathode – Schwamm – Filterpapier – Gel – Nitrozellulosemembran – Filterpapier – Schwamm – Anode. Der Transfer dauerte 90 Minuten bei 70 mA.

Immundetektion der Zielproteine

Die Immundetektion (Gershoni and Palade, 1983) der Zielproteine wurde mit Hilfe der in Tab. D-12 angegebenen Antikörper-Verdünnungen und der jeweils entsprechenden HRP-Konjugate bewerkstelligt.

Tab. D-12: Reaktionsbedingungen für die Immundetektion.

Antikörper	Verdünnung	Puffersystem	HRP-Konjugat	Verdünnung
anti β -Actin	1:400	NET	anti <i>goat</i>	1:15.000
anti β -Catenin	1:750	NET	anti <i>goat</i>	1:15.000
anti-CyclinD1	1:400	NET	anti <i>rabbit</i>	1:15.000
anti-MT1-MMP	1:1000	TBST	anti <i>rabbit</i>	1:1500
anti-LRP5	1:400	NET	anti <i>goat</i>	1:15.000
anti-LRP6	1:200	TBST	anti <i>goat</i>	1:20.000

Um die Zielproteine auf der Membran zu visualisieren, erfolgte eine Reihe von Inkubationsschritten mit den entsprechenden Primär- und Sekundär-Antikörpern in zwei unterschiedlichen Puffersystemen, die nachfolgend beschrieben werden. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. In wenigen Ausnahmefällen wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler blockiert. Im Falle des NET-Puffersystems wurde die Nitrozellulosemembran unmittelbar nach dem Transfer der Proteine für eine Stunde in NET-Gelatine Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100, 0,25 % Gelatine) überführt, um die ungesättigten Proteinbindungsstellen zu blockieren. Im Anschluss wurde die Membran für eine weitere Stunde im selben Puffer mit dem jeweiligen Primär-Antikörper inkubiert. Bevor der mit Meerrettich-Peroxidase-Enzym markierte Sekundär-Antikörper zugegeben wurde, erfolgten drei Waschschrte à 10 Minuten in NET-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100). Angeschlossen wurde eine 60-minütige Inkubation des Sekundär-Antikörpers in NET-Puffer mit nachfolgendem dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten in NET. Beim TBS-T-Puffersystem wurde das Blockieren der Membran durch Inkubation in 5-%iger Magermilch-Lösung, für eine Stunde bei Raumtemperatur gewährleistet. Die Inkubation des Primär-Antikörpers für die gleiche Zeitdauer hingegen erfolgte in TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton X-100). Anschließend wurde die Membran zweimal 10 Minuten in TBS-T Puffer gewaschen, bevor der Sekundär-Antikörper wiederum in TBS-T Puffer für eine Stunde zugegeben wurde. Danach wurde erneut zweimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion mittels Chemilumineszenz wurden die Membranen für eine Minute im Entwicklerreagenz (R&D Systems) inkubiert.

D.2.4.4 Bestimmung endogener Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz

Um die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin in intakten Zellen nachzuweisen, wurden hMSC in den Vertiefungen von *chamber slides* (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und mit Wnt3a stimuliert. Diese ermöglichen die Kultivierung und Behandlung von adhärennten Zellen auf einem Objektträger, dem ein Plastik-Kammer-Gerüst aufgesetzt ist, wodurch verschiedene Kavitäten ausgebildet werden. Nach dreitägiger Stimulation von hMSC mit Wnt3a erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen durch 30-minütige Inkubation bei 37 °C in einer Fixierlösung (4 % Paraformaldehyd, 0,2-% Triton X-100). Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 Minuten in PBS-T (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1 % Tween) gewaschen, wonach eine

Inkubation in der Blockierungslösung (3 % BSA in Aqua dest.) für eine Stunde in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur angeschlossen wurde. Danach wurden jeweils 80 µl Primär-Antikörper-Lösung (Verdünnung des anti-β-Catenin Antikörpers aus *goat* 1:15) zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abklopfen der Antikörperlösung wurde zweimal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Ebenfalls für die Dauer von einer Stunde wurde die Inkubation des mit FITC-markierten anti-*goat* Sekundär-Antikörpers (1:25) im Dunkeln durchgeführt. Nach erneutem Abklopfen der Lösung und zweimaligem fünfminütigen Waschen in PBS-T für je 5 Minuten wurden die Zellkerne mit DAPI (Molecular Probes, USA) gefärbt. Zu diesem Zweck wurden die hMSC 1 Minute in einer DAPI-Lösung (1:10.000) im Dunkeln inkubiert und abschließend wieder in PBS-T gewaschen. Das Plastik-Kammer-Gerüst des Objektträgers wurde mit Hilfe eines Öffners abgetrennt und nach Zugabe von 10 µl ProLong Antifade der Firma Molecular Probes wurden die Zellträger mit Glasdeckgläsern bedeckt und zum Aushärten in den Kühlschrank gelegt.

D.2.4.5 Gaussia-Luciferase-Aktivitätsmessung in stabil transfizierten mMSC

Die Bestimmung der Gaussia-Luciferase-Aktivität wurde unter Verwendung des Gaussia-Luciferase-Kits der Firma NEB im Überstand genetisch modifizierter mMSC durchgeführt. Diese Zellen hatten das Plasmid pcDNA3pTA_{min}TOPGLuc stabil in ihr Genom inkorporiert und konnten so für die Visualisierung von Wnt/β-Catenin-regulierten Reporteraktivitäten eingesetzt werden. Mit Hilfe dieses Systems konnte die subzelluläre Lokalisation und damit einhergehend die transkriptionell aktive Fraktion von β-Catenin quantifiziert werden. Denn nur nach Translokation von β-Catenin in den Zellkern mit nachfolgender Komplexbildung mit Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren kommt es zur Expression des Reportergens Gaussia-Luciferase, welche dann nach Sekretion im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Die Reporterzellen wurden hierzu in die Vertiefungen einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät. 48 Stunden nach Stimulation bzw. Knockdown erfolgten die Überstand-Abnahme (50 µl) und der Transfer in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Kavitäten-Platte. Unmittelbar vor der Messung im Luminometer bei 470 nm wurde das 100-fach konzentrierte Gaussia-Luciferase Substrates zugegeben, das zuvor in einem mitgelieferten Puffer in einem Endvolumen von 50 µl gelöst wurde. Die so erhaltenen *relative light units* (RLU) wurden über die Gesamtproteinmenge in jeder Kavität normiert, die im Anschluss an den Assay ermittelt wurde. Zu diesem Zweck wurden in jede Vertiefung 120 µl eines Puffers (50 mM HEPES/KOH, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP40, pH 7,4) gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es erfolgte eine Proteindoppelbestimmung jeder Probe wie in Abschnitt C.2.4.2 beschrieben mit jeweils 100 µl des entsprechenden Zellkulturüberstandes.

D.2.5 Datenanalyse

Die statistische Signifikanz wurde ermittelt, indem die Mittelwerte ± SD zweier Triplikat-Ansätze mit dem Student's T-Test miteinander verglichen wurden. Dazu wurde das Excel Programm (Microsoft Office XP) verwendet. Als statistisch signifikant wurden P-Werte angesehen, die kleiner als 0,05 (*) bzw. 0,01 (**) waren, womit die beobachteten Unterschiede mit einer Fehlerquote von <5 % bzw. <1 % belegt waren.

E Ergebnisse

E.1 Wnt/ β -Catenin-Signalweg in hMSC

Für die Untersuchung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurde ein dualer Ansatz angewandt. Dabei wurde einerseits der Signalweg durch gezielte Beeinflussung verschiedener Komponenten aktiviert, die an der Initiation bzw. Weiterleitung des Wnt-Signals beteiligt sind. Zum anderen erfolgte die RNAi-vermittelte Repression aktivierender Signalmoleküle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges.

E.1.1 Aktivierungsstudien

Die Aktivierung wurde zunächst durch externe Zugabe von Wnt3a und LiCl durchgeführt. Des Weiteren wurde durch Transfektion von siRNAs der inhibitorischen Komponenten APC und Axin2 des Wnt/ β -Catenin-Signalweges eine endogene Aktivierung angestrebt.

E.1.1.1 Exogene Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Stimulation mit Wnt3a und LiCl

Für die exogene Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges wurden hMSC mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem Wnt3a stimuliert. Alternativ erfolgte die Zugabe von LiCl. Li⁺-Ionen inhibieren GSK-3 β , wodurch es zu einem verminderten Abbau von β -Catenin kommt, was wiederum mit einer Aktivierung des Wnt-Weges einhergeht (siehe auch B.2.2).

E.1.1.1.1 Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin

Die Behandlung von hMSC mit 150 ng/ml Wnt3a resultierte in einem deutlichen Anstieg der Absolutmengen des β -Catenin-Proteins, was im Zelllysat mittels Western Blot nachgewiesen wurde. Um eine semiquantitative Aussage zu erhalten, wurden die Proteinsignale von β -Catenin densitometrisch ausgewertet und auf die jeweiligen Proteinmengen von β -Actin normalisiert. Die Analyse ergab einen Anstieg ab dem dritten Tag auf eine maximale Akkumulation von β -Catenin nach einem Zeitraum von sieben Tagen (2,2-fach) (Abb. E-1). Nach LiCl-Stimulation konnte mittels Western Blot kein deutlich erhöhter Proteinlevel von β -Catenin nachgewiesen werden.

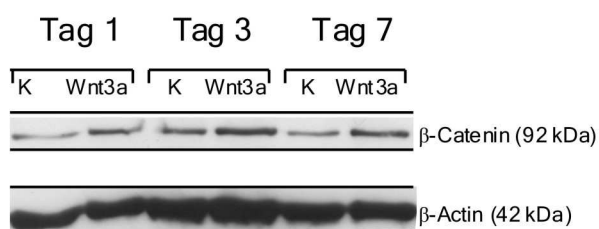


Abb. E-1: Akkumulation von β -Catenin in hMSC nach Stimulation mit Wnt3a.

hMSC wurden für 7 Tage mit 150 ng/ml Wnt3a stimuliert. Es erfolgte ein Vergleich der β -Catenin-Protein-Level (92 kDa) in Lysaten nicht-stimulierter (K) und stimulierter Zellen (Wnt3a). Die Proteinmengen wurden densitometrisch analysiert und auf β -Actin (42 kDa) normalisiert.

Die Translokation von β -Catenin in den Zellkern konnte sowohl nach Wnt3a- als auch nach LiCl-Stimulation mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden (Abb. E-2). So wick das vorwiegend perinukleäre Fluoreszenz-Signal von β -Catenin in den Kontrollen infolge der siebentägigen Stimulation einer hauptsächlich nukleären Fluoreszenz, was durch Kollokalisation mit der Kern-Färbung (DAPI) in besonderem Maße deutlich wurde.

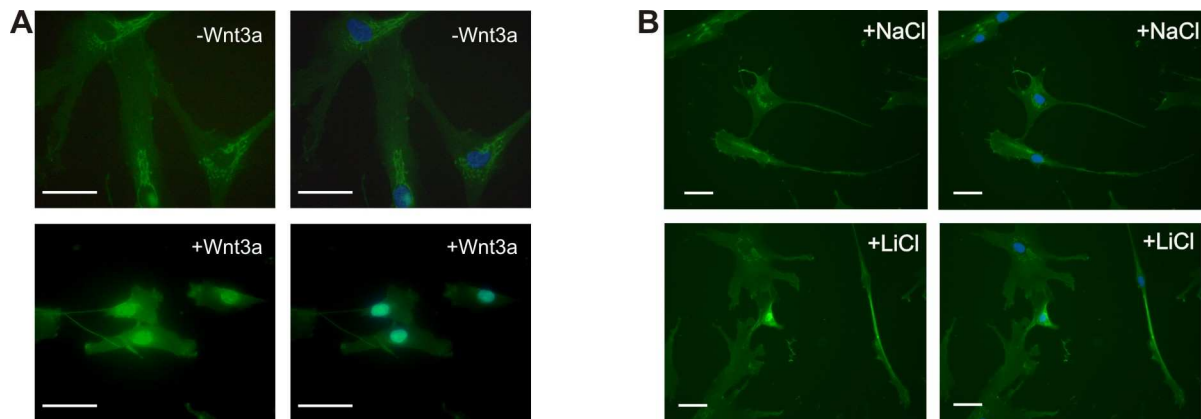


Abb. E-2: Immunhistologischer Nachweis der β -Catenin-Expression nach Wnt3a- und LiCl-Stimulation.

Die Immunfluoreszenz wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen β -Catenin (jeweils linke Seite) nach siebentägiger Stimulation durchgeführt.

Zusätzlich erfolgte eine Darstellung der Zellkerne durch DAPI-Färbung (jeweils rechte Seite). Balken = 50 μ m.

A) Wnt3a-Stimulation erfolgte mit 150 ng/ml. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

B) LiCl-stimulierte (2mM) Zellen wurden mit NaCl-behandelten Zellen verglichen.

E.1.1.1.2 Einfluss auf die Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP

Die Effekte auf das Transkriptom der hMSC, die durch die Translokation von β -Catenin in den Kern bedingt waren, wurden mittels qRT-PCR untersucht. Hierbei wurden exemplarisch die Expressionsprofile von Cyclin D1 (Shtutman et al., 1999) und MT1-MMP (Takahashi et al., 2002) bestimmt, da diese Zielgene nachweislich durch den Wnt/ β -Catenin-Weg reguliert werden. Es zeigte sich, dass die Cyclin D1-Expression signifikant induziert war (Tag1, 7). Die Transkriptmenge von MT1-MMP hingegen war nur leicht erhöht (Abb. E-3A). Nach LiCl-Stimulation der Zellen war vor allem die Expression von Cyclin D1 deutlich induziert (Abb. E-3B), wohingegen die MT1-MMP-Expression am Tag 1 nur leicht erhöht war. Am Tag 7 war keines der beiden Wnt-Zielgene signifikant induziert.

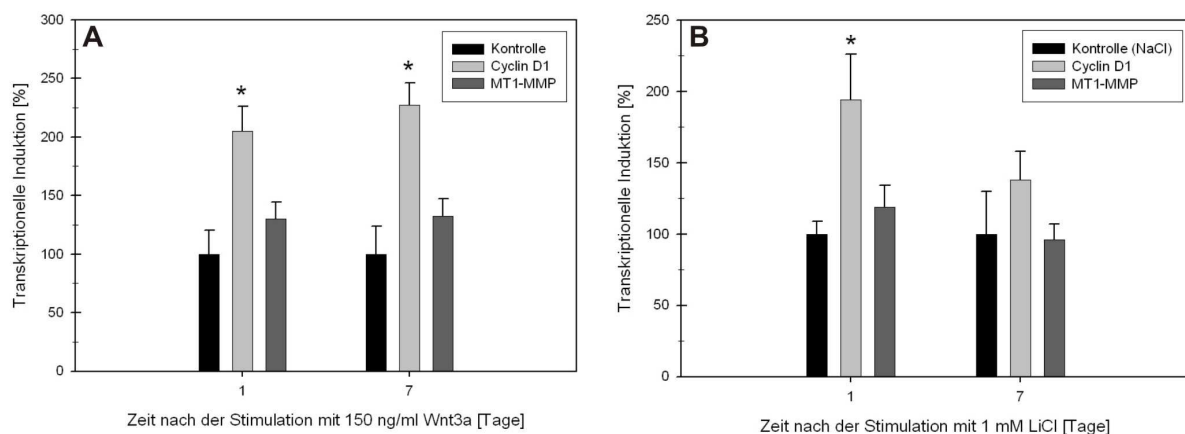


Abb. E-3: mRNA-Expressionsprofil von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Wnt3a- und LiCl-Stimulation.

Die Transkriptmengen von Cyclin D1 und MT1-MMP wurden nach einem und sieben Tagen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

A) Die Daten der mit 150 ng/ml Wnt3a-stimulierten hMSC wurden prozentual im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle dargestellt.

B) Als Referenz für die mit 1 mM LiCl stimulierten Proben dienten die mit den entsprechenden NaCl-Konzentrationen behandelten Proben (100 %).

E.1.1.1.3 Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten

Um zu klären, ob die Wnt3a- bzw. LiCl-Stimulation in einer höheren Zellteilungsrate resultiert, wurde der CyQuant-Proliferation-Assay eingesetzt. In beiden Fällen konnte ein gesteigertes Wachstum festgestellt werden, wobei dies im Fall von Wnt3a im niedrigen Konzentrationsbereich tendenziell dosisabhängig war, bevor ab 100 ng/ml ein Plateau erreicht wurde (Abb. E-4A).

Auch die LiCl-Stimulation ging bei 1 mM und 4 mM mit einer gesteigerten Proliferation einher (Abb. E-4B). Dagegen führten hohe Mengen LiCl (40 mM) zu einem drastischen Rückgang der Proliferation (nicht dargestellt).

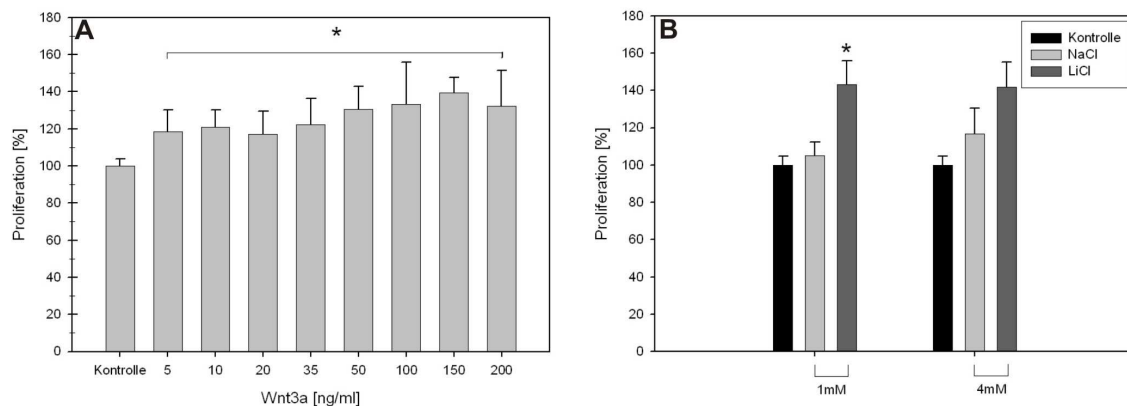


Abb. E-4: Proliferationsverhalten nach Stimulation mit Wnt3a und LiCl.

hMSC wurden für die Dauer von sieben Tagen mit Wnt3a bzw. LiCl stimuliert, wonach die Proliferation mittels CyQuant-Assay bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

A) Wnt3a (0 – 200 ng/ml)-stimulierte Zellen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle (100 %).

B) Die Proliferation LiCl (1 mM und 4 mM)-stimulierter hMSC wurde in Relation zur nicht-stimulierten Kontrolle (100 %) gesetzt. Als zusätzliche Kontrolle dienten NaCl-stimulierte Zellen.

Das Invasionsverhalten der hMSC wurde in einem Transwell-System untersucht. Dabei wurde die Fähigkeit der Zellen evaluiert, eine rekonstituierte Basalmembran in Richtung eines Konzentrationsgradienten aus Humanserum zu durchwandern. Eine starke Induktion des Invasionsverhaltens zeigte sich vor allem infolge der Stimulation mit Wnt3a (Abb. E-5A). Aber auch nach Stimulation mit LiCl (4 mM) konnte eine gesteigerte Invasionsrate beobachtet werden (Abb. E-5B).

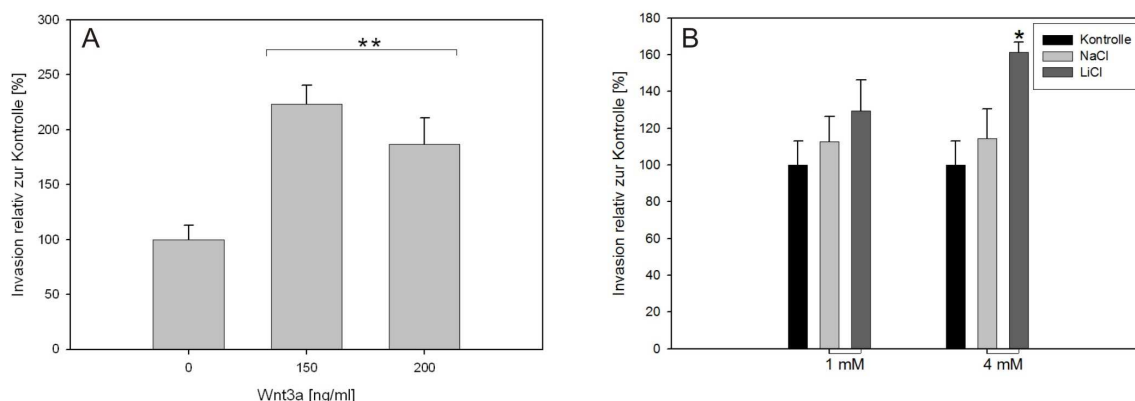


Abb. E-5: Invasionsverhalten nach Stimulation mit Wnt3a bzw. LiCl.

Die Fähigkeit hECM zu durchwandern wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

A) Proliferation nach Stimulation mit Wnt3a (150, 200 ng/ml) im Vergleich mit unstimulierten Kontrollzellen.

B) Effekte der NaCl- und LiCl-Zugabe (je 1 mM und 4 mM) in Relation zur nicht behandelten Kontrollgruppe (100 %).

E.1.1.1.4 Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit

Um zu untersuchen, ob die Stimulationen der mesenchymalen Stammzellen mit Wnt3a und LiCl selbst zu einer Differenzierung der Zellen führt bzw. die Differenzierungsfähigkeit der hMSC einschränkt, wurden folgende Experimente durchgeführt:

Einerseits wurden hMSC sieben Tage lang mit Wnt3a bzw. LiCl stimuliert und anschließend einer Alizarin Rot- und Oil Red O-Färbung unterzogen, um eine mögliche Differenzierung der Zellen in die osteogene und adipogene Richtung zu überprüfen (siehe D.2.3.6). Eine solche Differenzierung der hMSC wurde jedoch weder nach Wnt3a- noch nach LiCl-Stimulation beobachtet (Abb. E-6A).

Andererseits wurden gleich im Anschluss an die siebentägige Stimulation mit Wnt3a bzw. LiCl die hMSC durch Zugabe der entsprechenden Komponenten chemisch (D.2.3.5) in die osteogene und adipogene Richtung differenziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass weder Wnt3a, noch LiCl zu einer Veränderung der charakteristischen Stammzeleigenschaften führte. So waren die vorstimulierten hMSC immer noch in gleichem Maße fähig in die mesodermale Richtungen (osteogen/adipogen) zu differenzieren (Abb. E-6B).

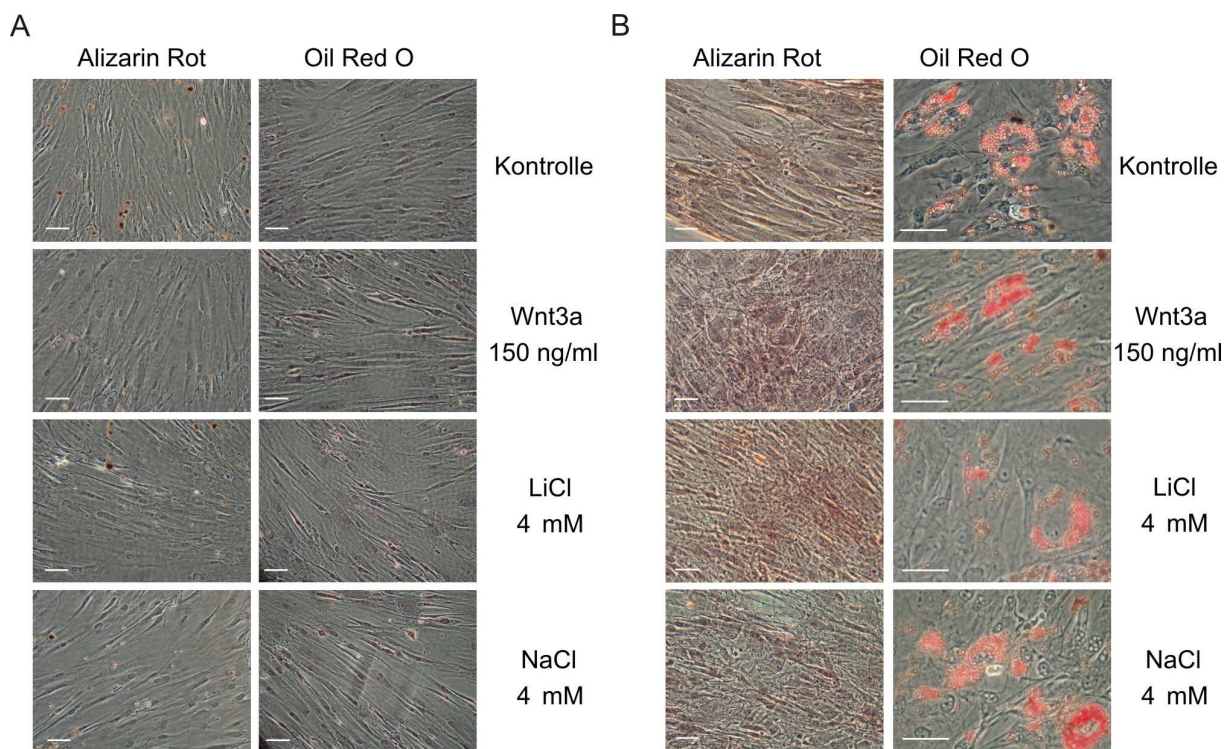


Abb. E-6: Differenzierungsstatus und Differenzierungsvermögen von Wnt3a- und LiCl-stimulierten hMSC.

Die Differenzierungen in die osteogene und adipogene Richtung wurden chemisch induziert und entsprechend durch Alizarin Rot- und Oil Red O-Färbung nachgewiesen. Die Zellen wurden mit 150 ng/ml Wnt3a bzw. 4 mM LiCl stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert bzw. mit 4 mM NaCl behandelt. Balken = 50 µm
A) hMSC wurden nach vorangehender siebentägiger Behandlung mit Wnt3a oder LiCl zum Nachweis einer etwaig eingetretenen osteogenen bzw. adipogenen Differenzierung mittels Alizarin Rot-bzw. Oil Red O-Färbung überprüft.

B) Sieben Tage mit Wnt3a bzw. LiCl stimulierte hMSC wurden in die osteogene (links) bzw. adipogene (rechts) Richtung differenziert und gefärbt.

E.1.1.2 Endogene Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Knockdown von APC und Axin2

Um die durch die exogene Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges erhaltenen Resultate auf intrazellulärem Niveau näher zu charakterisieren, wurde in einem RNAi-basierten Ansatz die Expression der in den Abbau von β -Catenin involvierten Komplexproteine APC und Axin2 reduziert. Hierdurch sollte eine gezielte endogene Aktivierung der Wnt-Signaltransduktionskaskade erreicht werden.

E.1.1.2.1 Einfluss auf die zelluläre Konzentration von β -Catenin und die Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP

Für den Knockdown von APC und Axin2 wurden jeweils zwei bzw. drei spezifische siRNAs ausgewählt und in hMSC transfiziert. In Abb. E-7 sind die Knockdown-Effizienzen der siRNAs dargestellt, die die stärkste Reduktion der entsprechenden mRNA-Level hervorriefen. Diese wurden über den Zeitraum einer Woche nach Transfektion mittels qRT-PCR bestimmt.

Im Falle der APC-siRNA zeigte sich am Tag 1 nach Transfektion ein hoch signifikanter Abfall der APC-mRNA-Expression (97 %) während am Tag 3 und 7 der Knockdown nur noch schwach ausgeprägt war.

Ein ähnlicher Verlauf war bei Axin2 zu beobachten, wobei die Reduktion der Axin2-mRNA am Tag 1 nach Transfektion weniger stark ausfiel. Am Tag 7 war kein Einfluss des Knockdowns mehr feststellbar.

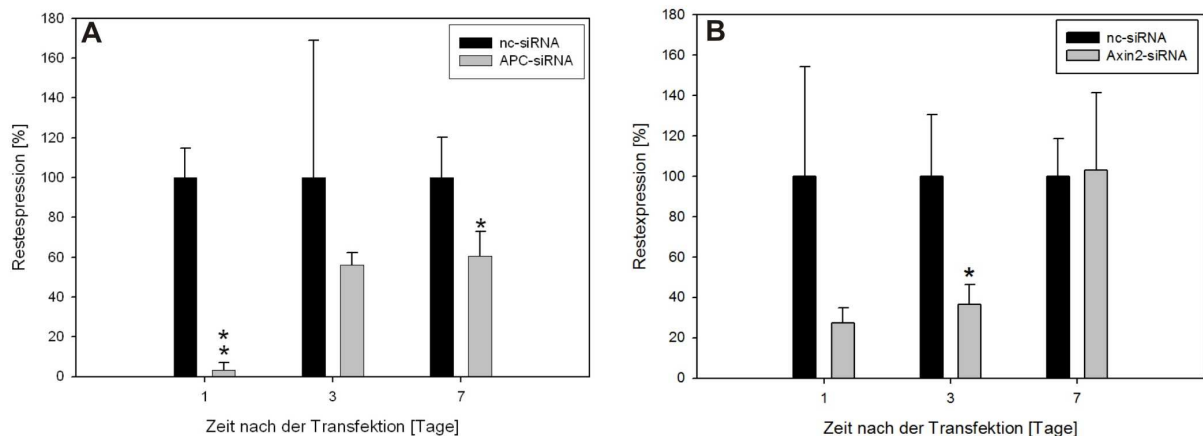


Abb. E-7: Knockdown-Effizienzen der siRNAs gegen APC und Axin2.

Mittels qRT-PCR erfolgte die Bestimmung der Knockdown-Effizienz der siRNAs am Tag 1, 3 und 7 nach Transfektion. Die Knockdown-Effizienzen wurden prozentual im Verhältnis zur nc-siRNA-Transfektion dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05 **P<0,01.

A) Knockdown von APC.

B) Knockdown von Axin2.

Um zu überprüfen, ob bzw. in welchem Ausmaß die verringerte mRNA-Expression von APC und Axin2 mit einer vermehrten Akkumulation von β -Catenin einhergeht, wurden semiquantitative Western Blot-Analysen von Zelllysaten durchgeführt. Sowohl der Knockdown von APC als auch der von Axin2 führten hierbei zu einem Anstieg des β -Catenin-Proteinlevels (Abb. E-8), der am siebten Tag nach Transfektion am deutlichsten wurde.

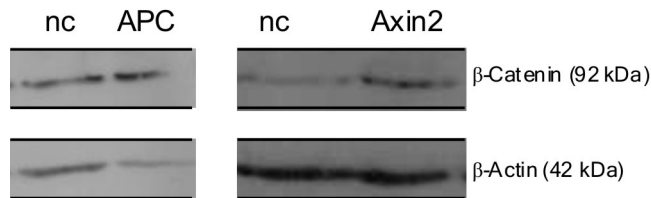


Abb. E-8: Nachweis des β -Catenin-Proteinlevels nach Knockdown von APC und Axin2.

Der semiquantitative Proteinnachweis von β -Catenin (92 kDa) erfolgte mittels Western Blot. Dabei wurden Lysate von hMSC eingesetzt, die sieben Tage zuvor mit APC- bzw. Axin2-siRNA transfiziert worden waren. Als Auftragskontrolle diente β -Actin (42 kDa).

Wie schon für die Stimulationsexperimente mit Wnt3a und LiCl dargestellt, wurden auch in den Knockdown-Versuchen die Transkriptmengen von Cyclin D1 und MT1-MMP bestimmt.

Im Fall des APC-Knockdowns wurde einen Tag nach Transfektion eine deutliche Reduktion der beiden Wnt-Zielgene beobachtet, während die entsprechenden Transkripte am Tag 3 eine signifikante Induktion zeigten, aber am Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr verändert waren (Abb. E-9A).

Beim Axin2-Knockdown konnte die höchste Induktion im Falle von MT1-MMP am Tag 3 nach siRNA-Transfektion festgestellt werden, während die Expression von Cyclin D1 am Tag 7 Maximalwerte aufwies (Abb. E-9B).

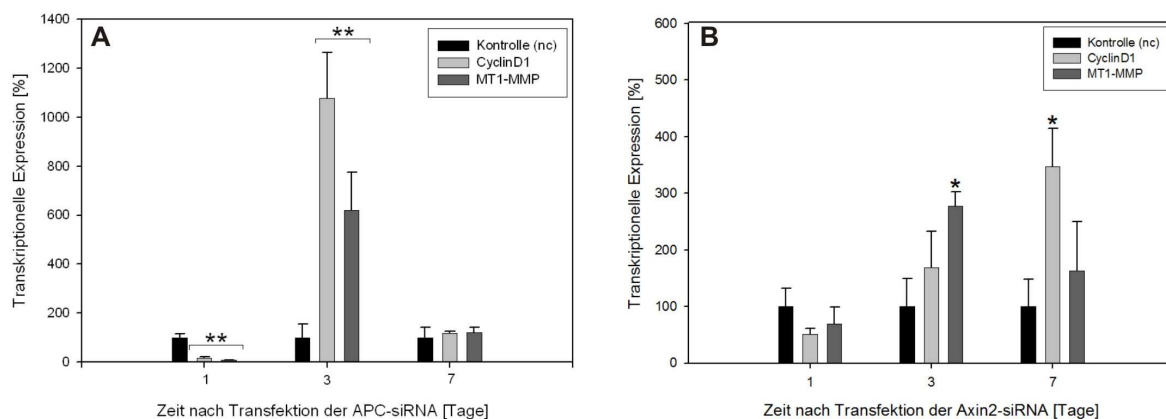


Abb. E-9: mRNA-Expressionsprofil von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Knockdown von APC und Axin2.

Die Transkriptmengen von Cyclin D1 und MT1-MMP in den Knockdown-Zellen wurden am Tag 1, 3 und 7 nach Transfektion mittels qRT-PCR bestimmt und mit derjenigen der nc-siRNA-transfizierten Kontrollgruppe (100 %) verglichen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

A) Wnt-Zielgen nach Transfektion APC-Knockdown.

B) Wnt-Zielgen-Expression nach Axin2-Knockdown.

E.1.1.2.2 Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten

Analog zu den Experimenten, in denen der Wnt-Signalweg durch exogene Faktoren aktiviert wurde, erfolgte auch nach Knockdown von APC und Axin2 eine Untersuchung der Proliferation und des Invasionsverhaltens der Zellen.

Nach Knockdown von APC, konnte sowohl eine gesteigerte Zellteilungsrate (Abb. E-10A) als auch eine erhöhte Invasionsfähigkeit der hMSC beobachtet werden (Abb. E-10B).

Interessanterweise wirkte sich der Knockdown von Axin2 reprimierend auf das Wachstumsvermögen (Abb. E-10A) der Zellen aus und hatte keinen Einfluß auf das Invasionsverhalten (Abb. E-10B).

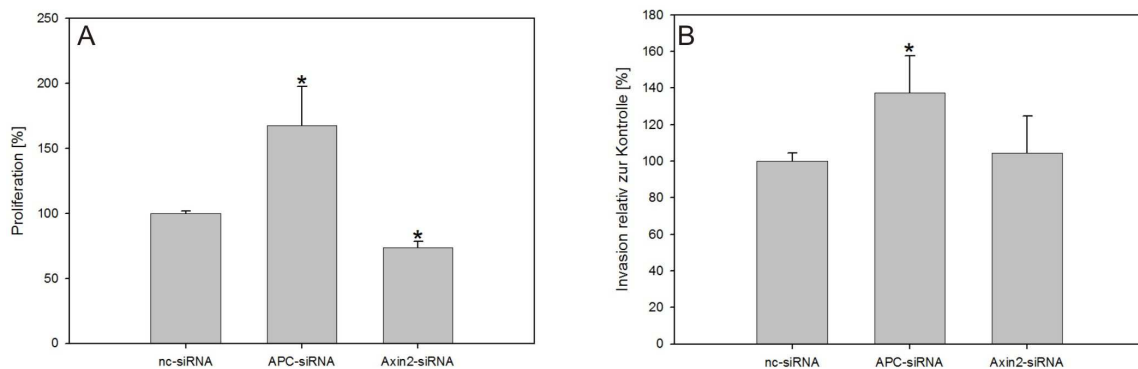


Abb. E-10: Proliferations- und Invasionsverhalten nach Transfektion der siRNAs gegen APC und Axin2.

Nach Transfektion mit APC- bzw. Axin2-siRNAs wurden die Proliferation von hMSC mittels CyQuant-Assay bzw. die Invasionsfähigkeit mittels des Transwell-Systems im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC untersucht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

A) Proliferation von APC- und Axin2-Knockdown-Zellen sieben Tage nach Transfektion.

B) Invasionsverhalten (für eine Dauer von 48 Stunden analysiert) einen Tag nach Transfektion.

E.1.2 Inhibitionsstudien

In einem weiteren Ansatz wurde der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ebenfalls unter Verwendung der RNAi-Technologie inhibiert. Hierbei wurde die Expression zentraler Komponenten des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges, nämlich des transkriptionsaktivierenden Proteins β -Catenin und des Wnt-Korezeptors LRP5, mittels siRNA-Transfektion vermindert.

E.1.2.1 Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Knockdown von β -Catenin und LRP5

Die mit Hilfe der Angaben von Angela Reynolds (Reynolds et al., 2004) ausgewählten siRNAs gegen β -Catenin und LRP5 erwiesen sich als hoch effizient, was zunächst auf mRNA- und im Anschluss daran auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte.

E.1.2.1.1 Einfluss auf die Expression von β -Catenin und LRP5

Abb. E-11 gibt die Reduktion der β -Catenin- und LRP5-mRNA über einen Zeitraum von sieben Tagen wieder. Die höchste Knockdown-Effizienz auf mRNA-Ebene konnte einen Tag nach Transfektion nachgewiesen werden. In beiden Fällen war die Reduktion der endogenen Transkriptlevel über einen relativ langen Zeitraum von sieben Tagen fast ohne merkliche Abnahme der Knockdown-Effizienz beobachtbar.

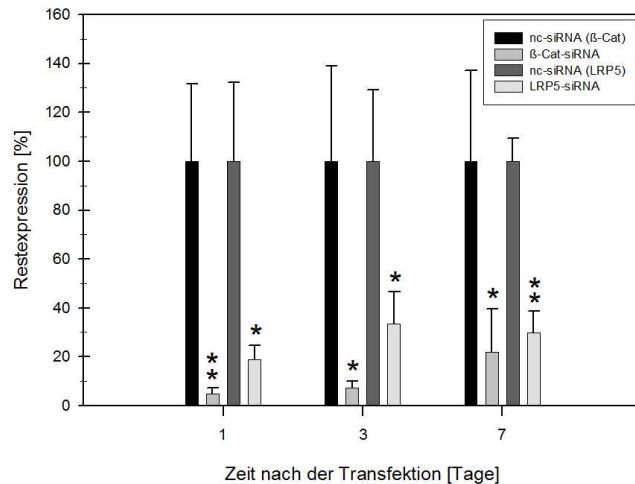


Abb. E-11: Knockdown von β -Catenin und LRP5 in hMSC.

Die Überprüfung der Knockdown-Effizienz von β -Catenin und LRP5 erfolgte mittels qRT-PCR. Dargestellt ist jeweils die verbliebene mRNA-Expression in den Knockdown-Zellen im Vergleich zu den mit nc-siRNA transfizierten hMSC am Tag 1, 3 und 7 nach Transfektion.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Der Nachweis des jeweiligen Knockdowns auf Proteinebene erfolgte mittels semiquantitativer Western Blot-Analyse. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Gegebenheiten des mRNA-Knockdowns eine deutliche Verzögerung (bis zu sieben Tage) der Reduktion auf Protein-Ebene. Da bei der Herstellung des Lysates ein Spaltprodukt mit reduziertem Molekulargewicht des membrangebundenen LRP5 in die lösliche Fraktion freigesetzt wird, kann dieses ebenso wie β -Catenin (Abb. E-12A) in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. E-12B).

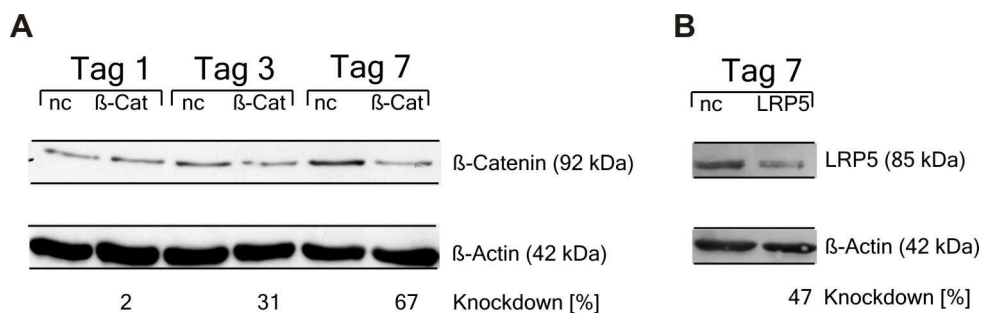


Abb. E-12: Nachweis der Reduktion der Proteinmengen von β -Catenin und LRP5 nach siRNA-Transfektion.

Western Blot-Analysen von hMSC-Lysaten zum Nachweis des Knockdowns von β -Catenin (92 kDa) und LRP5 (85 kDa) auf Proteinebene. Die Proteinmengen wurden densitometrisch ausgewertet und auf β -Actin (42 kDa) normalisiert.

A) β -Catenin-Proteinlevel in der löslichen Fraktion der hMSC-Lysate am Tag 1, 3 und 7 nach Transfektion der β -Catenin-siRNA.

B) LRP5-Proteinlevel in der löslichen Fraktion des hMSC-Lysates am Tag 7 nach Transfektion der LRP5-siRNA.

E.1.2.1.2 Einfluss auf die Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP

Zur Überprüfung ob bzw. inwiefern eine verringerte β -Catenin-Proteinmenge sich auch auf die Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP auswirkt, wurden deren Transkriptmengen mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich sieben Tage nach Transfektion der β -Catenin-siRNA eine deutliche Abnahme der Expression von beiden Wnt-Zielgenen (Abb. E-13).

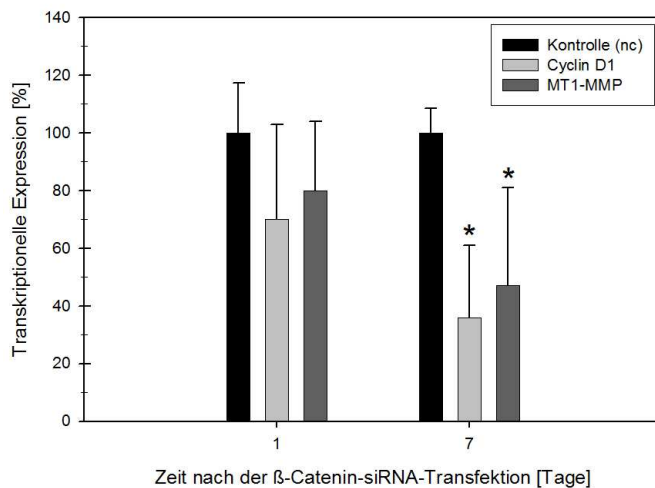


Abb. E-13: mRNA-Expressionsprofil der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP nach Knockdown von β -Catenin.

Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP einen und sieben Tage nach Transfektion der β -Catenin-siRNA untersucht. Prozentual angegeben sind die jeweiligen mRNA-Expressionslevel in den Knockdown-Zellen im Vergleich zu den mit nc-siRNA transfizierten Kontrollzellen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes dargestellt. * $P < 0,05$.

Zusätzlich zu diesen Knockdown-Experimenten wurde ein ergänzender Versuch durchgeführt, womit die Bedeutung von β -Catenin und LRP5 für die Weiterleitung des Wnt3a-vermittelten Signals in den Zellkern bis hin zur Expression des Wnt-Zielgens Cyclin D1 näher evaluiert werden sollte. Hierfür wurden hMSC mit den siRNAs gegen β -Catenin bzw. LRP5 transfiziert und am Tag 6 - zum Zeitpunkt des maximalen Knockdowns von β -Catenin und LRP5 auf Protein-Ebene - für 24 Stunden mit Wnt3a stimuliert. Im Vergleich zu den mit nc-siRNA-transfizierten Zellen, die nach Stimulation mit Wnt3a eine deutliche Induktion des Cyclin D1-Transkriptniveaus zeigten, war die Expression in den Knockdown-Zellen in beiden Fällen nicht induziert. Vielmehr konnte eine Reduktion der Cyclin D1-Expression beobachtet werden (Abb. E-14).

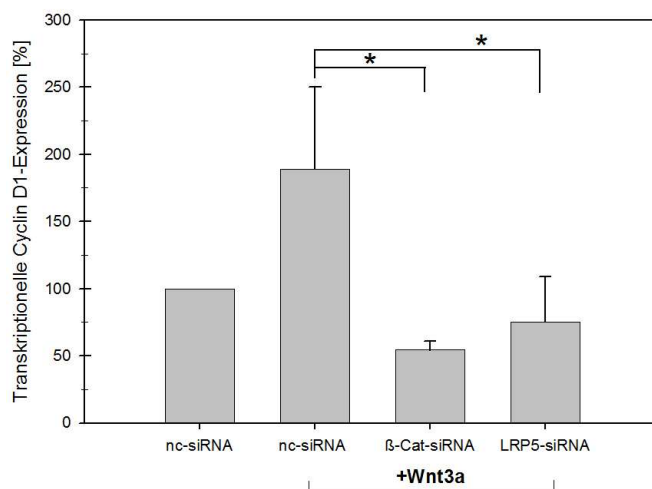


Abb. E-14: Cyclin D1-mRNA-Expression in Kontrollzellen sowie in β -Catenin- und LRP5-Knockdown-Zellen nach Stimulation mit Wnt3.

Die mRNA-Expression des Wnt-Zielgens Cyclin D1 wurde sowohl in unstimulierten als auch in mit Wnt3a stimulierten Kontrollzellen (nc-siRNA) bestimmt und vergleichend zur Expression in β -Catenin- und LRP5-Knockdown-Zellen untersucht.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

E.1.2.1.3 Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten

Um die Folgen der Reduktion von β -Catenin und LRP5 auf das phänotypische Verhalten der hMSC zu beurteilen, wurden Proliferations- und Invasionsvermögen der transfizierten Zellen getestet. Dabei konnte eine Verminderung der proliferativen Eigenschaften beobachtet werden, die im Fall des β -Catenin Knockdowns etwas stärker ausgeprägt war als nach LRP5-Knockdown (Abb. E-15A). Darüber hinaus war auch das Invasionsverhalten derartig behandelter hMSC deutlich eingeschränkt (Abb. E-15B), wobei der β -Catenin-Knockdown zu einer sehr starken Verminderung des Invasionsvermögens um ca. 70 % führte.

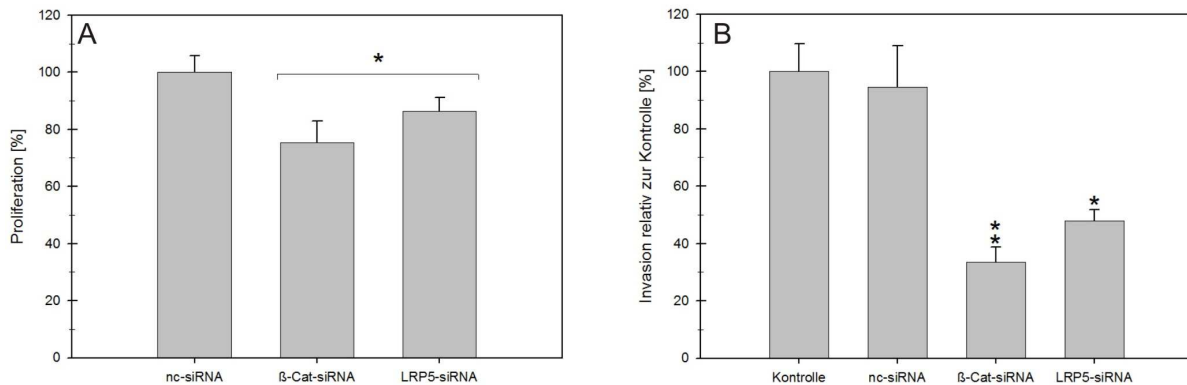


Abb. E-15: Proliferations- und Invasionsvermögen von hMSC nach Knockdown von β -Catenin und LRP5.

Die Proliferation bzw. das Invasionsvermögen wurden am Tag 7 nach Transfektion entsprechend mittels CyQuant-Assay und Transwell-System in β -Catenin- bzw. LRP5-Knockdown-Zellen untersucht.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

A) Zellteilungsrate von β -Catenin- und LRP5-siRNA-transfizierten hMSC im Vergleich zu nc-siRNA-behandelten Kontrollzellen (100 %).

B) Das Invasionsexperiment von β -Catenin- und LRP5-Knockdown-hMSC wurde fünf Tage nach Transfektion für die Dauer von 48 Stunden im Vergleich zu den nicht-transfizierten Kontrollzellen durchgeführt und am Tag 7 nach Transfektion ausgewertet.

E.1.3 Analyse der Funktion von Cyclin D1 und MT1-MMP in hMSC

Um zu überprüfen, inwiefern die Änderungen im zellulären Phänotyp, die sowohl nach Aktivierung als auch im Zuge einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beobachtet wurden, mit dem Expressionsniveau der beiden Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP assoziiert werden können, wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown von beiden Faktoren durchgeführt. Abb. E-16 zeigt die Knockdown-Effizienz der eingesetzten siRNAs auf mRNA-Ebene über einen Zeitraum von sieben Tagen nach Transfektion.

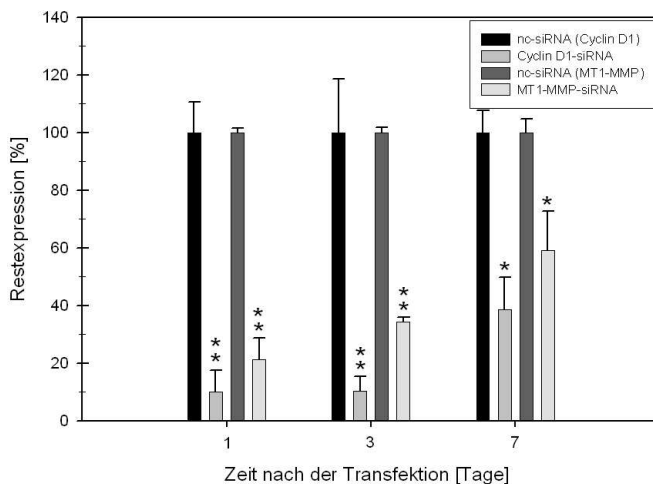


Abb. E-16: Knockdown von Cyclin D1 und MT1-MMP in hMSC.

Die nach siRNA-Transfektion verbliebenen mRNA-Level von Cyclin D1 und MT1-MMP wurden mittels qRT-PCR einen, drei und sieben Tage nach Transfektion bestimmt und mit demjenigen in nc-siRNA-transfizierten Kontrollzellen (100 %) verglichen.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Zudem konnte die verminderte Expression in beiden Fällen auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. E-17).

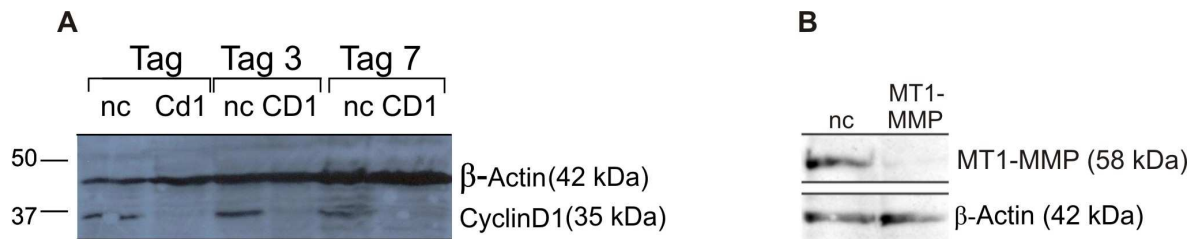


Abb. E-17: Nachweis der Reduktion von Cyclin D1 und MT1-MMP auf Proteinebene nach Transfektion der entsprechenden siRNA in hMSC.

Mittels Western Blot-Analyse wurden die Proteinlevel von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Transfektion der entsprechenden siRNAs bestimmt. Als Auftragskontrolle diente β-Actin (42 kDa).

A) Die Analyse des Knockdowns von Cyclin D1 erfolgte in Zelllysaten vom Tag 1, 3 und 7 nach Transfektion der Cyclin D1-siRNA.

B) Die Analyse des Knockdowns von MT1-MMP erfolgte in Zelllysaten vom Tag 3 nach Transfektion.

Die beiden folgenden Experimente zeigten eindeutig einen Zusammenhang zwischen der hMSC-Proliferation und der Cyclin D1-Expression einerseits sowie der Invasion und der MT1-MMP-Expression andererseits. In den jeweiligen Versuchsansätzen wurde die Expression von Cyclin D1 bzw. MT1-MMP mittels siRNA-Transfektion reduziert und daraufhin die Proliferation bzw. das Invasionsverhalten der Zellen untersucht.

Der Cyclin D1-Knockdown führte zu einer Verringerung der Proliferation (Abb. E-18A), während der MT1-MMP-Knockdown die Invasionsfähigkeit reduzierte (Abb. E-18B).

Dass die in nicht-transfizierten hMSC durch Wnt3a- oder LiCl-vermittelte Steigerung der Proliferation bzw. der Invasion in den Knockdown-Zellen nicht mehr hervorzurufen war, deutet zudem auf die Wichtigkeit der Zielgene Cyclin D1 für die Proliferation (Abb. E-18A) und MT1-MMP für die Invasivität (Abb. E-18B) hin.

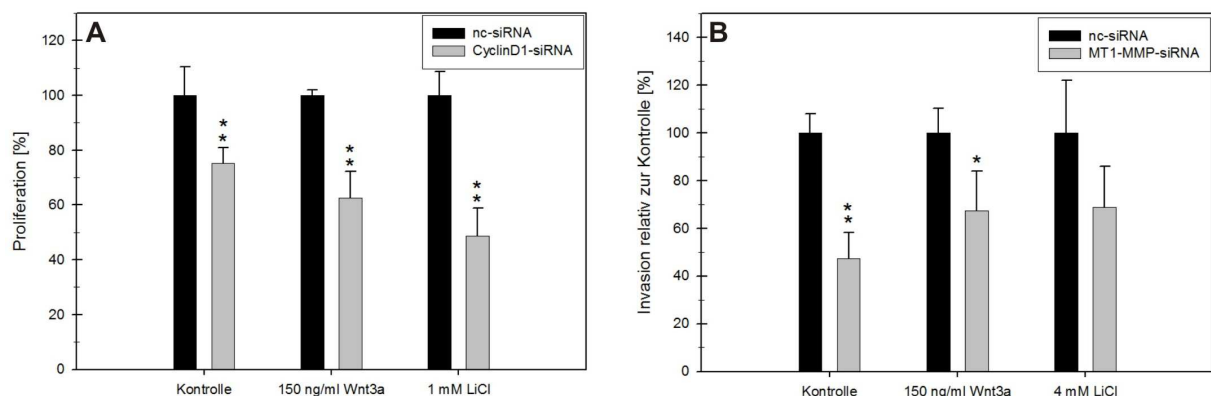


Abb. E-18: Proliferation von Cyclin D1-Knockdown-Zellen sowie Invasionsverhalten von MT1-MMP-Knockdown-Zellen nach Wnt3a- und LiCl-Stimulation.

Die Proliferation bzw. das Invasionsvermögen von Cyclin D1- bzw. MT1-MMP-siRNA-transfizierten hMSC wurde mittels des CyQuant-Assay bzw. Transwell-Systems untersucht und mit den Effekten einer zusätzlichen Wnt3a- (150 ng/ml) bzw. LiCl-Stimulation (1 mM) am Tag 7 nach Transfektion verglichen.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05 **P<0,01.

A) Die Proliferation der Cyclin D1-Knockdown-Zellen wurde im Vergleich zu den nc-siRNA transfizierten Zellen (100 %) analysiert.

B) Die Invasivität von MT1-MMP-Knockdown-Zellen wurde mit derjenigen der entsprechenden Kontrollzellen verglichen.

E.2 Wnt-Rezeptoren in hMSC

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Initiation des Wnt-Signalweges deuten viele Arbeiten darauf hin, dass zur Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges ein ternärer Komplex aus Wnt-Ligand, Frizzled Rezeptor (Fzd) und den Korezeptoren LRP5 bzw. LRP6 gebildet werden muss. Allerdings gibt es bislang nur eine Arbeit (Etheridge et al., 2004), die sich mit dieser Thematik in hMSC beschäftigt hat, wobei etliche Komponenten unberücksichtigt blieben. Deshalb wurde in diesem Teilprojekt der vorliegenden Promotionsarbeit erstmals die Expression aller 10 bisher bekannten Fzds sowie die Rolle eines speziellen Vertreters (Fzd8) und weitere Wnt-Korezeptoren (LRP5, LRP6) sowie des Liganden Dkk-1 untersucht.

E.2.1 Rolle von Frizzled-Rezeptoren in hMSC

E.2.1.1 mRNA-Expression von Fzds

Plasmid-DNA, die die entsprechende kodierende Sequenz des jeweiligen Rezeptors trug, wurde als Positivkontrolle in die PCR eingesetzt. Derartige Plasmide standen für Fzd7 sowie 8 nicht zur Verfügung.

Die Basal-Expression aller Fzds konnte auch in hMSC erstmalig festgestellt werden, wobei Fzd10 nur in sehr geringen Mengen detektiert wurde. Fzd1, 2 und 6 hingegen zeigten eine deutlich höhere Expression, während für die Rezeptoren Fzd3, 4, 5, 7, 8 und Fzd9 nur eine moderate Expression festzustellen war (Abb. E-19).

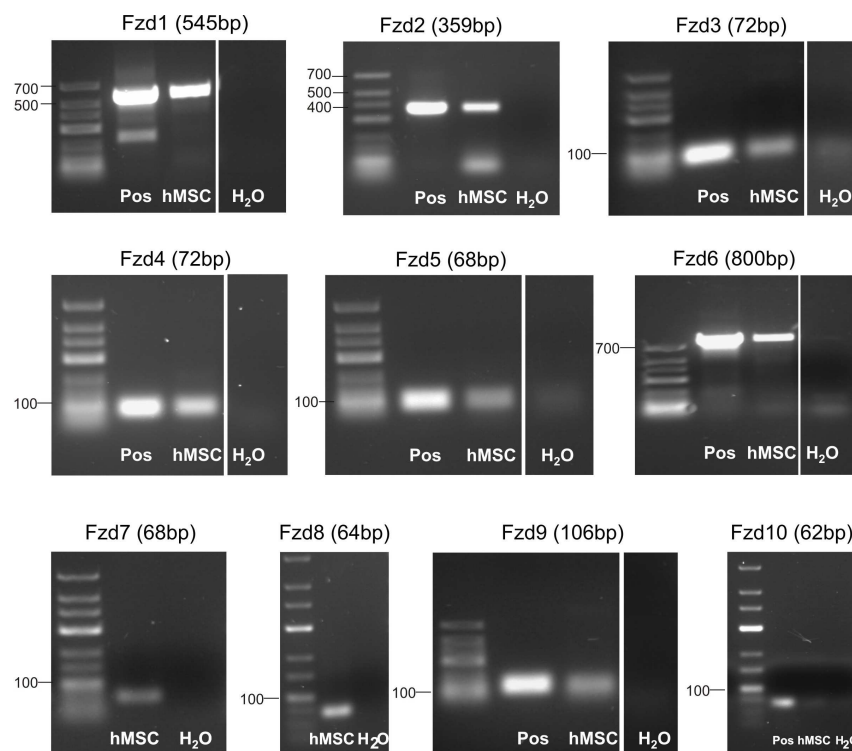


Abb. E-19: Analyse des Fzd-Expressionsprofils in hMSC.

Der qualitative Nachweis der Fzd1-10-Expression erfolgte mittels RT-PCR aus revers transkribierter hMSC-Total-RNA. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert. Im Falle von Fzd1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und Fzd10 konnte eine vektorielle Positivkontrolle (Pos) in die PCR eingesetzt werden. Als Negativkontrolle wurde anstelle der Proben-DNA 1 μ l Aqua dest. (H₂O) verwendet.

E.2.1.2 Expression und Regulation des Rezeptors Frizzled 8 in hMSC

E.2.1.2.1 Regulation der mRNA-Expression von Fzd8 durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Im Rahmen des Nachweises der Expression der 10 Fzds erfolgte auch eine Transkript-Analyse nach Wnt3a-Stimulation. Hierbei konnte klar eine Wnt-Abhängigkeit der mRNA-Expression von Fzd8 beobachtet werden. Abb. E-20A zeigt die zeitabhängige Reduktion der mRNA-Expression von Fzd8, die am ersten Tag ihren Höhepunkt fand.

Zudem konnte eine Induktion der mRNA-Expression von Fzd8 nach β -Catenin-Knockdown nachgewiesen werden (Abb. E-20B).

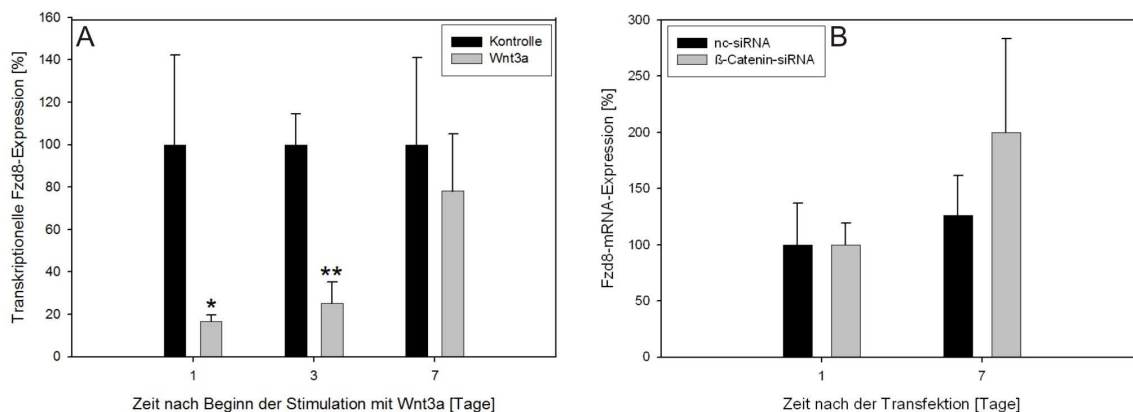


Abb. E-20: mRNA-Expressionsprofil von Fzd8 nach Stimulation mit Wnt3a und Knockdown von β -Catenin.

Mittels qRT-PCR wurde das Fzd8-Transkriptniveau in mit Wnt3a stimulierten bzw. β -Catenin-siRNA-transfizierten hMSC bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

A) mRNA-Expressionsprofil von Fzd8 am Tag 1, 3 und 7 nach Stimulation mit Wnt3a (150 ng/ml) im Vergleich zu demjenigen in nicht-stimulierten Kontrollzellen.

B) mRNA-Expression von Fzd8 am Tag 1 und 7 nach Transfektion der β -Catenin-siRNA im Vergleich zu demjenigen in nc-siRNA-transfizierten Kontrollzellen.

E.2.1.2.2 Einfluss des Fzd8-Knockdowns auf Proliferation und Invasion

Um die Funktion von Fzd8 in hMSC näher zu untersuchen, wurde die ausgewählte siRNA gegen Fzd8 in hMSC transfiziert. Die 24 Stunden später bestimmte Knockdown-Effizienz zeigte zunächst nur einen Wert von ca. 60 % (Abb. E-21), woraufhin eine zweite siRNA ausgewählt und getestet wurde, die allerdings ebenfalls nicht zu einem höherem Knockdown-Effekt auf mRNA-Ebene führte. Die gleichzeitige Transfektion beider siRNAs bewirkte hingegen eine markante Reduktion der Fzd8-mRNA-Expression von etwa 97 % (Abb. E-21).

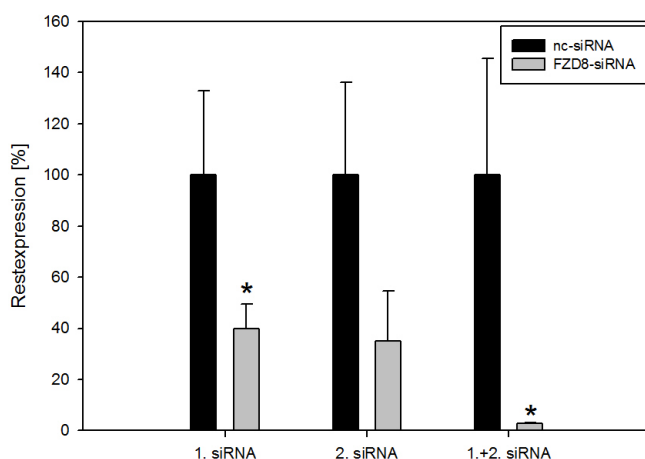


Abb. E-21: Reduktion der mRNA-Expression von Fzd8 durch Transfektion verschiedener Fzd8-siRNAs.

Durch qRT-PCR wurden die verschiedenen Knockdown-Effizienzen der verwendeten Fzd8-siRNAs einen Tag nach Transfektion ermittelt.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

Nachdem durch Kotransfektion beider Fzd8-siRNAs eine hohe Knockdown-Effizienz erreicht worden war, wurden die Änderungen des hMSC-Phänotyps hinsichtlich ihrer Proliferations- und Invasionsfähigkeit untersucht.

Diese Experimente zeigten, dass die Zellteilungsraten nach Knockdown von Fzd8 eindeutig vermindert waren (Abb. E-22A), wohingegen die Fähigkeit, hECM zu invadieren, leicht erhöht war (Abb. E-22B).

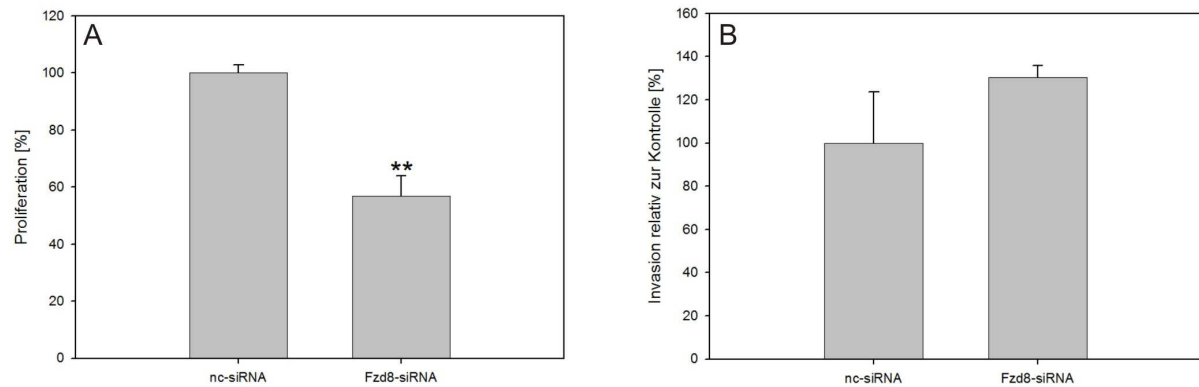


Abb. E-22: Proliferations- und Invasionsvermögen von Fzd8-Knockdown-Zellen.

Das Proliferations- und Invasionsverhalten von Fzd8-siRNA-transfizierten hMSC wurde entsprechend mit dem CyQuant-Proliferations-Assay bzw. dem Transwell-System evaluiert.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. ** $P < 0,01$.

A) hMSC-Proliferation am siebten Tag nach Fzd8-siRNA-Transfektion im Vergleich zu den nc-siRNA-transfizierten Kontrollzellen.

B) Die Untersuchung der Invasionsfähigkeit der Fzd8-Knockdown-Zellen wurde am Tag 5 nach Transfektion der entsprechenden siRNAs gestartet. Die Invasionsraten der Knockdown-Zellen am Tag 7 nach Transfektion sind in Relation zu denjenigen der nc-siRNA-transfizierten Kontrollzellen dargestellt.

E.2.1.2.3 Rolle von Fzd8 für die Weiterleitung des Wnt3a-Signals

Um zu überprüfen, ob der durch Wnt3a-Stimulation transkriptionell beeinflusste Rezeptor Fzd8 (Abb. E-20A) eine Rolle als Rezeptor für den Wnt3a-Liganden spielt, wurden hMSC mit Fzd8-siRNA transfiziert und sowohl am Tag 1 als auch 7 nach siRNA-Transfektion mit Wnt3a (150 ng/ml) stimuliert. Jeweils 24 Stunden später erfolgte die Transkriptquantifizierung.

Die Transfektion der Fzd8-siRNA mit gleichzeitiger Wnt3a-Stimulation resultierte in einem drastischen Rückgang des mRNA-Expressionsniveaus, das lediglich noch 7 % des Ausgangswertes betrug (Abb. E-23). Die Knockdown-Effizienzen auf mRNA-Ebene unterschieden sich am ersten und siebten Tag nach Transfektion nicht wesentlich, wohingegen der Einfluss der Wnt3a-Stimulation zu beiden Zeitpunkten unverändert erheblich war. Daraus ließ sich ableiten, dass die Wnt3a-vermittelte Reduktion der mRNA-Expression von Fzd8 unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Fzd8 auf der Zelloberfläche zu sein scheint. Anderenfalls hätte die hier beschriebene Reduktion der Fzd8-mRNA-Expression am siebten Tag nach Transfektion der Fzd8-siRNA nicht mehr in gleichem Maße möglich sein sollen, da zu diesem Zeitpunkt zumindest von einer zumindest partiell reduzierten Oberflächenexpression von Fzd8 auszugehen ist, die experimentell durch die Transfektion induziert wurde.

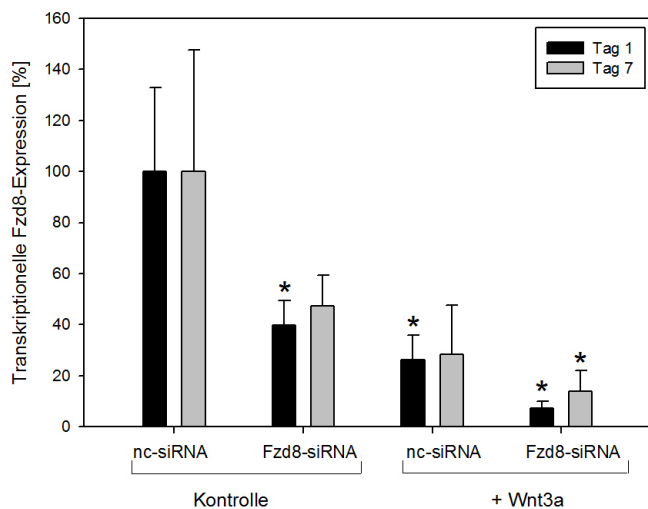


Abb. E-23: Bestimmung der mRNA-Expression von Fzd8 nach Knockdown und gleichzeitiger Wnt3a-Stimulation.

Mittels qRT-PCR erfolgte der Nachweis der mRNA-Kopien von Fzd8 einen und sieben Tage nach Transfektion der Fzd8-siRNA und einer 24-stündige Stimulation mit Wnt3a (150 ng/ml). Dargestellt sind die Expressionslevel am Tag 1 und 7 jeweils in Relation zur nicht-stimulierten, mit nc-siRNA-transfizierten Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

Diese Aussage wurde zudem durch die mRNA-Quantifizierung des Wnt-Zielgens MT1-MMP bekräftigt, die für mit nc-siRNA bzw. Fzd8-siRNA transfizierten hMSC ein vergleichbares Muster ergab (Abb. E-24). Diese Daten implizieren darüber hinaus, dass An- oder Abwesenheit von Fzd8 keinen Einfluss auf die durch Wnt3a vermittelte Expression des Wnt-Zielgens hat. Schließlich zeigen die Daten auch, dass die Reduktion des Fzd8-Expressionsniveaus nicht mit einer Verminderung der MT1-MMP Expression einhergeht.

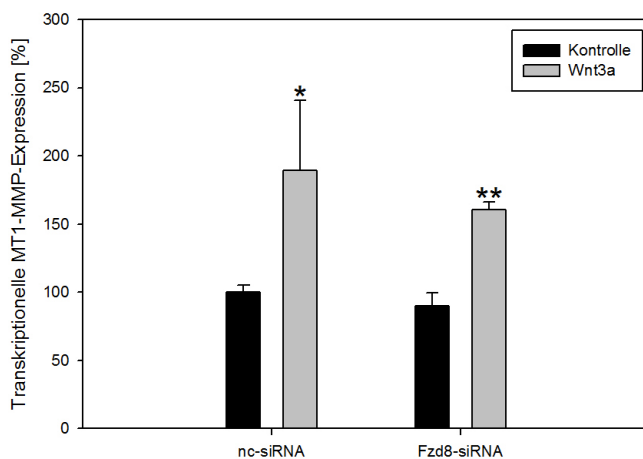


Abb. E-24: Transkriptquantifizierung von MT1-MMP in mit nc-siRNA bzw. Fzd8-siRNA transfizierten hMSC mit und ohne Wnt3a Stimulation.

Mit Hilfe der qRT-PCR erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von MT1-MMP am Tag 7 nach Fzd8-Knockdown, wobei die Stimulation mit Wnt3a (150 ng/ml) am sechsten Tag nach Transfektion für 24 Stunden durchgeführt wurde. Die Daten sind in Relation zur nicht-stimulierten mit nc-siRNA transfizierten Kontrollgruppe dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

In ähnlicher Weise deutet das nachfolgende Invasionsexperiment darauf hin, dass der Rezeptor Fzd8 nicht selbst als Interaktionspartner für den Liganden Wnt3a fungiert. Die Invasion durch hECM wurde wiederum im Transwell-System zwischen dem fünften und siebten Tag nach Transfektion der Fzd8-siRNA untersucht. Derartig modifizierte hMSC wurden vergleichend mit nc-siRNA transfizierten hMSC mit bzw. ohne Wnt3a-Stimulus evaluiert. Hierbei konnte die bereits bekannte Induktion der Invasionsfähigkeit von Wnt3a-stimulierten hMSC reproduziert werden, allerdings völlig unabhängig von der Anwesenheit oder des Knockdowns von Fzd8 (Abb. E-25).

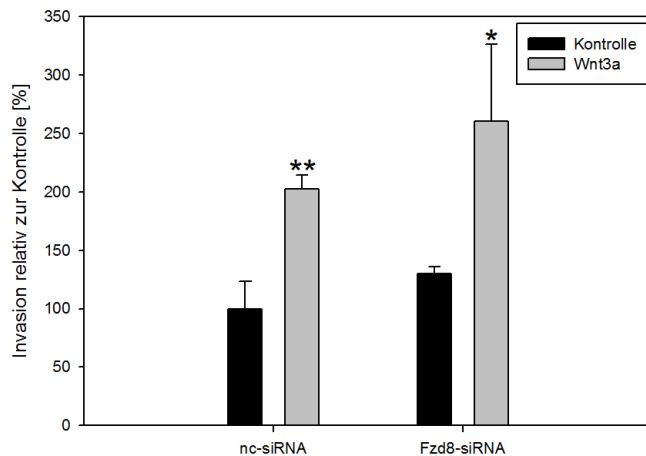


Abb. E-25: Invasion von hMSC nach Knockdown von Fzd8 und gleichzeitiger Wnt3a-Stimulation.

Die für die Untersuchung der Invasion durch hECM im Transwell-System eingesetzten Zellen wurden fünf Tage zuvor mit Fzd8-siRNA transfiziert und mit 150 ng/ml Wnt3a stimuliert. Dargestellt sind die Daten in Relation zur mit nc-siRNA transfizierten, nicht-stimulierten Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05 **P<0,01.

Um die bisher erhaltenen Resultate in einen größeren Kontext zu stellen und der Frage näher zu kommen, ob Fzd8 an der Weiterleitung des Wnt3a-Signals beteiligt ist, wurden noch Kotransfektionsexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die siRNA gegen Fzd8 zusammen mit derjenigen gegen die Korezeptoren LRP5 oder LRP6 transfiziert. Sechs Tage später wurden derartig transfizierte Zellen 24 Stunden lang mit Wnt3a stimuliert und im Anschluss daran erfolgte eine Quantifizierung der Transkriptmengen des Wnt-Zielgens Cyclin D1 (Abb. E-26).

Auch diese Daten deuten darauf hin, dass Fzd8 im Rezeptorkomplex, der für die Weiterleitung des Wnt3a-Signals entscheidend ist, keine Rolle zu spielen scheint. So war die Erhöhung der mRNA-Expression von Cyclin D1 nach Wnt3a-Stimulation in den Kontrollzellen eindeutig zu beobachten, und die Induktion bei Kotransfektion mit der LRP6-siRNA ebenfalls noch klar feststellbar.

Interessanterweise war bei Kotransfektion mit der LRP5-siRNA kein Anstieg der mRNA-Expression von Cyclin D1 feststellbar.

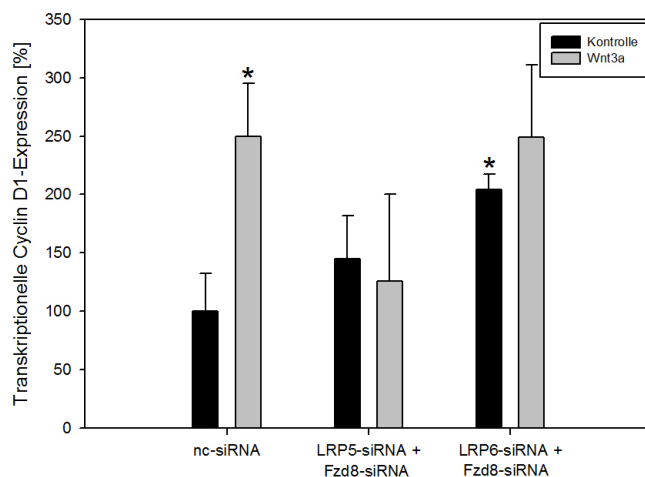


Abb. E-26: Nachweis der mRNA-Expression von Cyclin D1 in hMSC nach Transfektion der Fzd8-siRNA in Kombination mit derjenigen gegen LRP5 oder LRP6 und gleichzeitiger Wnt3a-Stimulation.

Mittels qRT-PCR erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von Cyclin D1 in hMSC, die sieben Tage zuvor mit den verschiedenen siRNAs transfiziert worden waren. Einen Tag vor Beendigung des Experimentes wurde mit 150 ng/ml Wnt3a stimuliert. Dargestellt sind alle Daten in Abhängigkeit von der mit nc-siRNA transfizierten aber nicht stimulierten Kontrollgruppe (100 %).

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05.

E.2.2 Rolle von LRP6 und Dkk-1

Die im vorangegangenen Ergebnisteil beschriebene Untersuchung der Expression von Frizzled-Rezeptoren in hMSC erweiterte bereits durchaus das Wissen über die mögliche Beteiligung einzelner Rezeptorkomponenten an der Wnt3a-Signalaufnahme an der Zelloberfläche. Um eine Aussage über weitere in diesem Prozess wichtige, aus der Literatur bekannte Rezeptoren treffen zu können, wurde nun die basale und Wnt3a-assoziierte Expression von LRP6 in hMSC detaillierter untersucht. Zudem wurden auch die Effekte einer verminderten LRP6-Expression nach Stimulation mit Dkk-1, einem natürlichen Antagonisten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, evaluiert.

E.2.2.1 mRNA- und Proteinexpression von LRP6

Zunächst konnte der Nachweis der Expression von LRP6 mittels semiquantitativer RT-PCR erbracht werden (Abb. E-27).

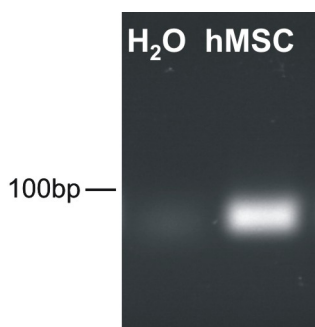


Abb. E-27: Expression von LRP6 in hMSC-cDNA.

Das PCR-Produkt mit der Größe von 63 bp ist lediglich im Testansatz und nicht in der Negativkontrolle nachweisbar, in der H_2O statt der jeweiligen cDNA eingesetzt wurde.

Darüber hinaus erfolgte eine Quantifizierung der Transkriptmengen mittels qRT-PCR. Hierbei wurden cDNAs von Zellen eingesetzt, die über einen Zeitraum von drei Tagen mit 150 ng/ml Wnt3a stimuliert worden waren. Die Auswertung (Abb. E-28) ergab, dass die Basalexpression von LRP6 durch Wnt3a deutlich induziert wird.

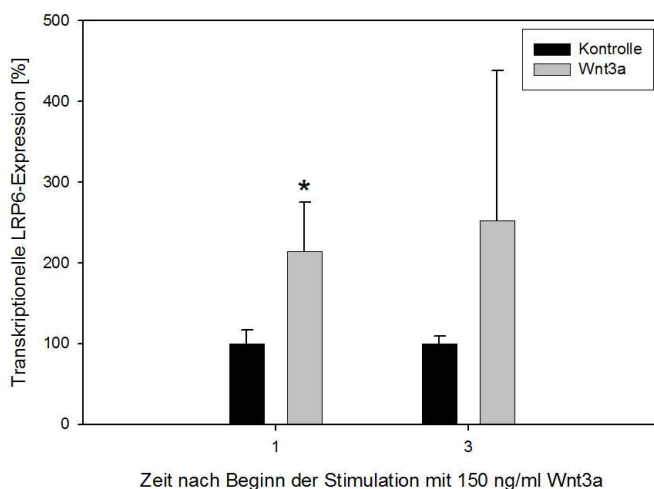


Abb. E-28: mRNA-Expressionsprofil von LRP6 in hMSC mit und ohne Stimulation mit Wnt3a.

hMSC wurden über einen Zeitraum von drei Tagen mit Wnt3a (150 ng/ml) stimuliert. Danach erfolgte mittels qRT-PCR die Quantifizierung der Transkriptmengen von LRP6 im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen (100 %).

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

E.2.2.2 Einfluss des LRP6-Knockdowns auf Proliferation und Invasion

Zur Klärung der Rolle von LRP6 in hMSC, wurde eine LRP6-spezifische siRNA entworfen. Die Knockdown-Effizienz wurde wiederum mittels qRT-PCR überprüft (Abb. E-29). Die höchste Effizienz konnte hierbei am ersten Tag nach Transfektion beobachtet werden und belief sich auf etwa 65 %.

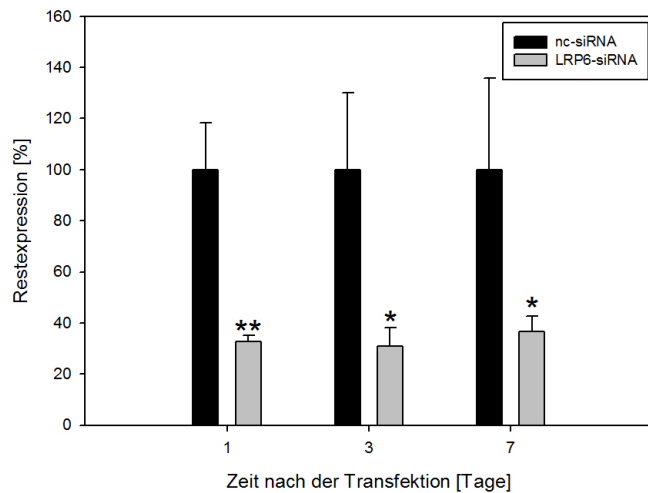


Abb. E-29: Nachweis des LRP6-Knockdowns in hMSC auf mRNA-Ebene.

Dargestellt ist die jeweilige transkriptionelle Restexpression von LRP6 am ersten, dritten und siebten Tag nach Transfektion der LRP6-siRNA im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten Zellen.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05 **P<0,01.

Wie auch bei den anderen in dieser Arbeit beschriebenen siRNA-Transfektionsexperimenten erfolgte eine Überprüfung der Proliferation und der Invasionsfähigkeit der LRP6-Knockdown-Zellen.

Hierbei konnte im Vergleich zu den mit nc-siRNA transfizierten Kontrollzellen nach LRP6-siRNA-Transfektion eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit beobachtet werden (Abb. E-30A).

In gleicher Weise war auch die Invasivität der LRP6-Knockdown-Zellen erhöht (Abb. E-30B)

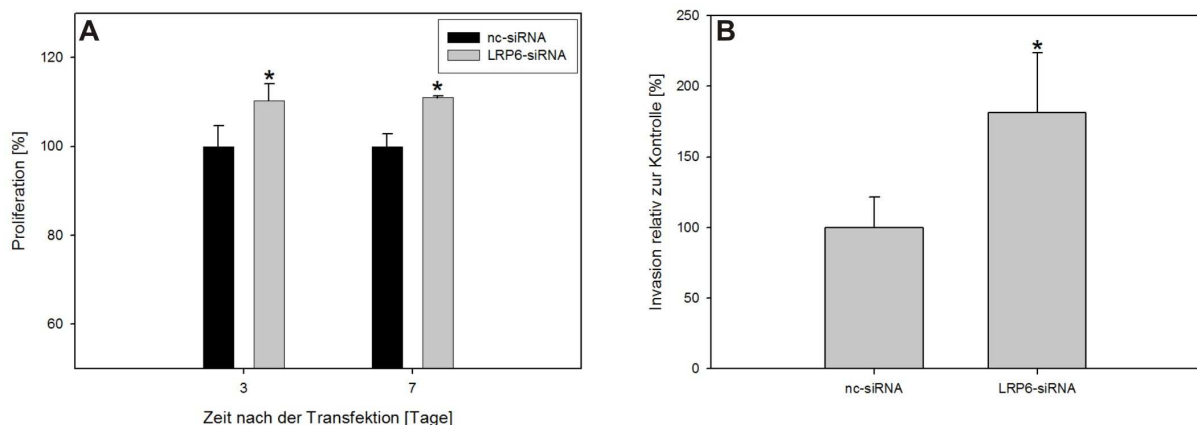


Abb. E-30: Proliferations- und Invasionsvermögen von hMSC nach Knockdown von LRP6.

Die Darstellung der Proliferations- bzw. Invasionsraten von LRP6-Knockdown-Zellen erfolgt im Verhältnis zur nc-siRNA-Transfektion. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05

A) Die Proliferation wurde mit Hilfe des CyQuant-Assays am Tag 3 und 7 analysiert.

B) Die Invasionsfähigkeit wurde drei Tage nach Transfektion für einen Zeitraum von 48 Stunden im Transwell-System untersucht.

E.2.2.3 Einfluss von LRP6 auf die Expression von Wnt-Zielgenen und die Weiterleitung des Wnt3a-Signals

Auch im Falle des LRP6-Knockdowns wurde die mRNA-Expression der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP bestimmt. Entgegen den ursprünglichen Erwartungen zeigte sich hier allerdings eine Induktion und keine Reduktion der mRNA-Expressionslevel von Cyclin D1 und MT1-MMP, die unmittelbar 24 Stunden nach Transfektion auftrat und über einen Zeitraum von einer Woche anhielt (Abb. E-31).

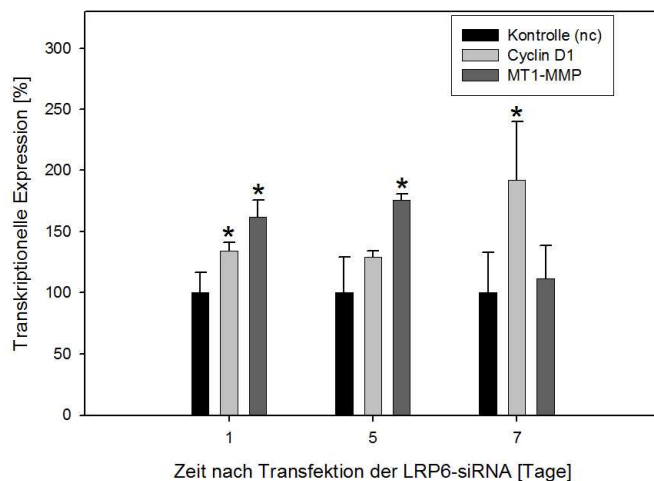


Abb. E-31: Veränderung der mRNA-Expressionsprofile von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Knockdown von LRP6 in hMSC.

Die Bestimmung des mRNA-Expressionsverlaufs von Cyclin D1 und MT1-MMP erfolgte mittels qRT-PCR. Die Transkriptmengen der Wnt-Zielgene in LRP6-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wurden am Tag 1, 5 und 7 nach Transfektion der LRP6-siRNA verglichen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die Induktion der Wnt-Zielgen-Expression mit Beteiligung von β -Catenin erfolgte. Dazu wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die Expression der Zielgene sieben Tage nach gemeinsamem Knockdown von β -Catenin und LRP6 in hMSC evaluiert wurde. Die erhobenen Daten wurden mit den Effekten verglichen, die der einzelne Knockdown von β -Catenin- bzw. LRP6 jeweils alleine hervorrief.

Wie in Abb. E-32 zu sehen ist, zeigt der Vergleich mit den für dieses Experiment entscheidenden Kontrollen einerseits eine Induktion der Zielgene nach Knockdown von LRP6 und andererseits eine Expressionsreduktion nach Knockdown von β -Catenin. Betrachtet man allerdings die Expression der Wnt-Zielgene nach Kotretransfektion beider siRNAs, war keine Induktion, sondern vielmehr noch eine weitere geringfügige Expressionsreduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten.

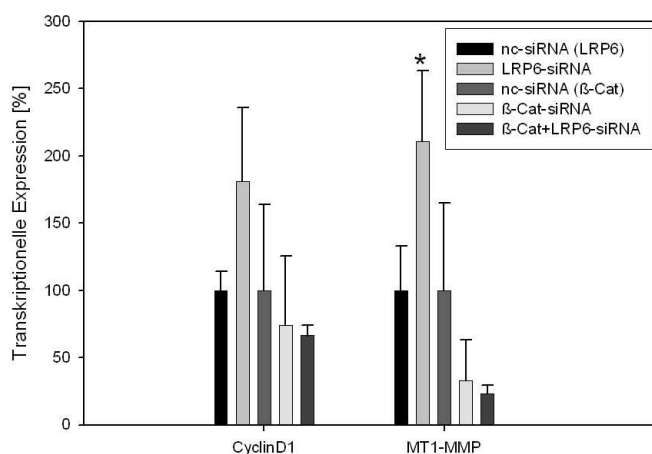


Abb. E-32: Expression der Wnt-Zielgene nach Knockdown von β -Catenin und LRP6, sowie nach Kotretransfektion beider siRNAs in hMSC.

Durch qRT-PCR wurden die mRNA-Expressionslevel von Cyclin D1- und MT1-MMP in hMSC am siebten Tag nach jeweiliger Einzel-Transfektion der β -Catenin- bzw. LRP6-siRNA sowie nach Kotretransfektion beider siRNAs bestimmt. Die Ergebnisse wurden jeweils auf die entsprechende nc-siRNA-transfizierte Kontrolle normiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

Da die erzielten Resultate eine Beteiligung von β -Catenin an der Induktion der Wnt-Zielgene nach Knockdown von LRP6 nahelegte, wurde die Proteinmenge von β -Catenin nach Knockdown von LRP6 überprüft. Die Western Blot-Analyse zeigte hierbei eine deutliche Zunahme der β -Catenin-Proteinmenge in LRP6-Knockdown-Zellen (Abb. E-33).

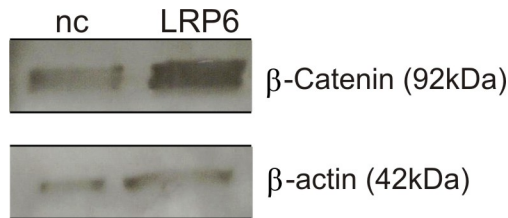


Abb. E-33: Western Blot-Nachweis der β -Catenin-Protein-expression in hMSC nach Knockdown von LRP6.

Sieben Tage nach Transfektion der LRP6-siRNA erfolgte nach Lyse der Zellen die Detektion von β -Catenin in hMSC-Lysaten mittels Western Blot. Zum Nachweis der β -Catenin-Proteinlevel (92 kDa) wurde ein spezifischer Antikörper verwendet. Als Auftragskontrolle diente β -Actin (42 kDa).

Zur Klärung, ob die Anwesenheit von LRP6 wichtig für die Weiterleitung des von Wnt3a vermittelten Signals ist, wurden LRP6-Knockdown-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, mit einer veränderten Zielgenexpression auf den Wnt3a-Stimulus zu reagieren. Zudem wurden auch LRP5-Knockdown-Zellen und hMSC, die einer Kotransfektion mit LRP5- und LRP6-siRNA unterzogen wurden, ebenfalls sechs Tage nach Transfektion mit 150 ng/ml Wnt3a behandelt und die mRNA-Expression von Cyclin D1 am Tag 7 analysiert.

Im Vergleich zu den nc-Kontrollen, bei denen durch Wnt3a eine Induktion der mRNA-Expression von Cyclin D1 hervorgerufen wurde, war in den LRP5-Knockdown-Zellen nach Stimulation mit Wnt3a keine Erhöhung mehr zu beobachten (Abb. E-34). Im Falle der LRP6-Knockdown-Zellen war die Wnt3a-vermittelte Erhöhung der Cyclin D1-Transkriptmenge allerdings in ähnlichem Maße wie in den mit nc-siRNA transfizierten hMSC feststellbar. Eine weitere Zunahme war bei Kotransfektion der beiden siRNAs gegen LRP5 und LRP6 nicht mehr zu sehen (Abb. E-34).

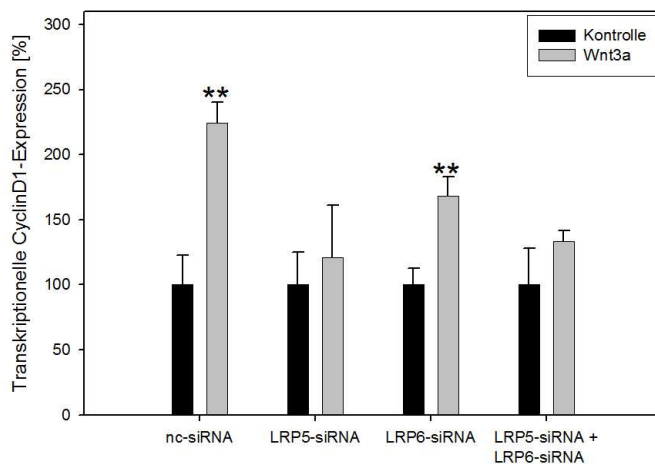


Abb. E-34: Cyclin D1-Transkriptlevel nach Knockdown von LRP5 und LRP6 jeweils alleine und in einem gemeinsamen Ansatz ohne und mit Wnt3a-Stimulation.

Durch qRT-PCR wurde die Cyclin D1-mRNA-Expression in den verschiedenen Ansätzen sieben Tage nach Transfektion bestimmt. Der Wnt3a-Stimulus (150 ng/ml) erfolgte für die Dauer von 24 Stunden am sechsten Tag nach Transfektion. Dargestellt sind die Expressionslevel von Cyclin D1 in jedem Set jeweils in Relation zur nicht-stimulierten Kontrolle.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. ** $P < 0,01$.

E.2.2.4 Regulation der Expression von Dkk-1

Neben Faktoren, die den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren können, existieren auch Antagonisten, welche sich inhibitorisch auf die Signaltransduktion auswirken. Letztere können in zwei Gruppen unterteilt werden, von denen die einen an die Liganden binden und die anderen, wie Dkk-1, die Rezeptoren blockieren. In unserem Projekt haben wir uns auf die Expression und Funktion von Dkk-1 in hMSC konzentriert.

Mittels qRT-PCR konnte zunächst eine deutliche Basalexpression von Dkk-1 in hMSC auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die in der Literatur beschriebene Wnt-abhängige Regulation der Dkk-1-Expression überprüft. Dazu wurden sowohl cDNAs von hMSC verwendet, die mit 150 ng/ml Wnt3a stimuliert worden waren, als auch solche aus mit LRP6- bzw. β -Catenin-siRNA transfizierten hMSC.

Wie in Abb. E-35A dargestellt konnte eine gesteigerte Expression von Dkk-1 nach Stimulation mit Wnt3a beobachtet werden.

Eine vergleichbare Erhöhung zeigte sich auch nach LRP6-Knockdown, während die Dkk-1-Expression nach Knockdown von β -Catenin tendenziell reduziert war (Abb. E-35B).

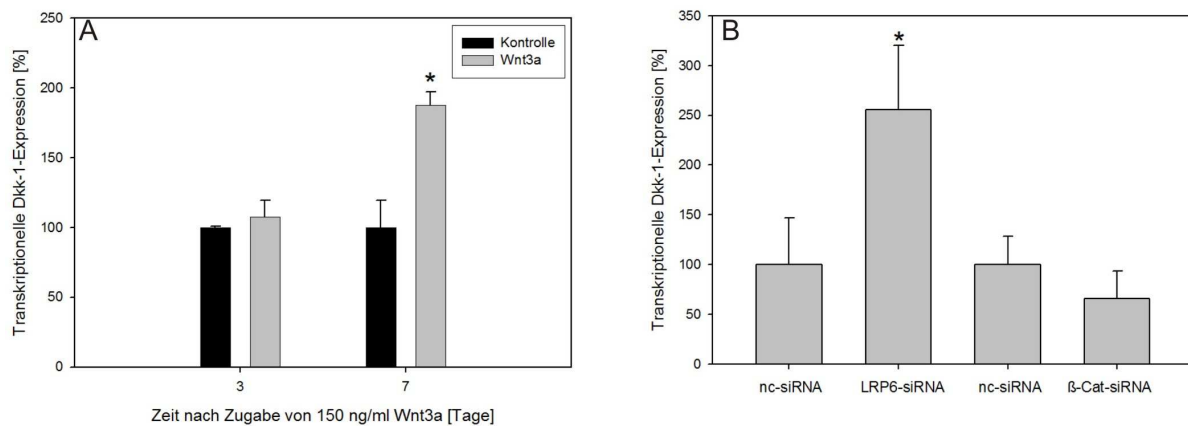


Abb. E-35: Dkk-1-Transkripte nach Wnt3a-Stimulation sowie LRP6- und β -Catenin-Knockdown.

Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von Dkk-1 in Wnt3a-stimulierten und Knockdown-Zellen ermittelt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

A) Bestimmung der Dkk-1-Transkriptmengen drei und sieben Tage nach Stimulation mit 150 ng/ml Wnt3a. Prozentual dargestellt ist die Dkk-1-Expression jeweils in Relation zur nicht stimulierten Kontrolle.

B) Sieben Tage nach Transfektion der LRP6- bzw. β -Catenin-siRNA erfolgte die Bestimmung der Dkk-1 Transkriptmengen in Relation zur jeweiligen nc-siRNA-transfizierten Kontrollgruppe.

E.2.2.5 Einfluss der Stimulation mit Dkk-1 auf Parameter der Wnt-Signalwegs-Aktivierung

Um den Einfluss von exogen zugegebenem Dkk-1 auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu untersuchen, wurden hMSC mit steigenden Mengen an rekombinantem Dkk-1 stimuliert und die Bestimmung der Wnt-Zielgen-Expression als Maß für die Wnt-Signalwegs-Aktivierung herangezogen.

Abb. E-36 zeigt einen deutlichen transkriptionellen Effekt von Dkk-1 auf das Zielgen MT1-MMP. Demnach konnte mit 100 – 150 ng/ml Dkk-1 nach einer 24-stündigen Inkubationszeit eine verminderte Expression beobachtet werden (Abb. E-36A), die sich allerdings nach einer einwöchigen Inkubationszeit eher in eine Steigerung der mRNA-Expression von MT1-MMP veränderte (Abb. E-36B). Die Expression von Cyclin D1 war zu keinem Messzeitpunkt merklich verändert.

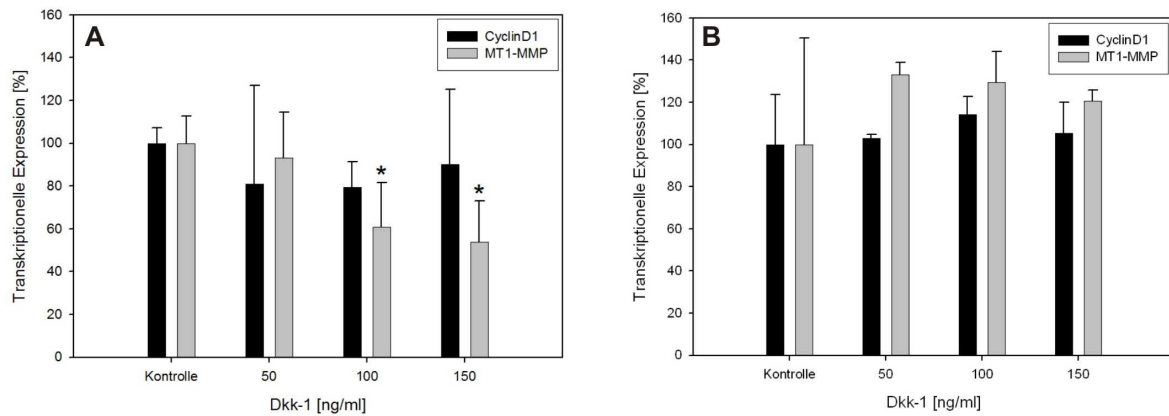


Abb. E-36: Wnt-Zielgen-Expression nach Stimulation von hMSC mit Dkk-1.

hMSC wurden einen bzw. sieben Tage mit Dkk-1 (0 – 150 ng/ml) stimuliert und die mRNA-Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP mittels qRT-PCR analysiert. Normiert wurde auf nicht-stimulierte Kontrollzellen.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05.

A) Cyclin D1- und MT1-MMP-Transkripte am Tag 1 nach Beginn der Dkk-1-Stimulation.

B) Cyclin D1- und MT1-MMP-Transkripte am Tag 7 nach Beginn der Dkk-1-Stimulation.

Darüber hinaus wurden auch die Proliferations- und Invasionsfähigkeit der Zellen nach sieben-tägiger Stimulation mit Dkk-1 untersucht. Hierbei konnte sowohl eine leichte Reduktion der Proliferations- (Abb. E-37A) als auch der Invasionsfähigkeit (Abb. E-37B) beobachtet werden, die beide von der Dkk-1-Dosis abhängig waren. Interessanterweise zeigte sich bei diesen Untersuchungen eine Aufhebung des genannten Effektes bei höheren Dkk-1-Konzentrationen.

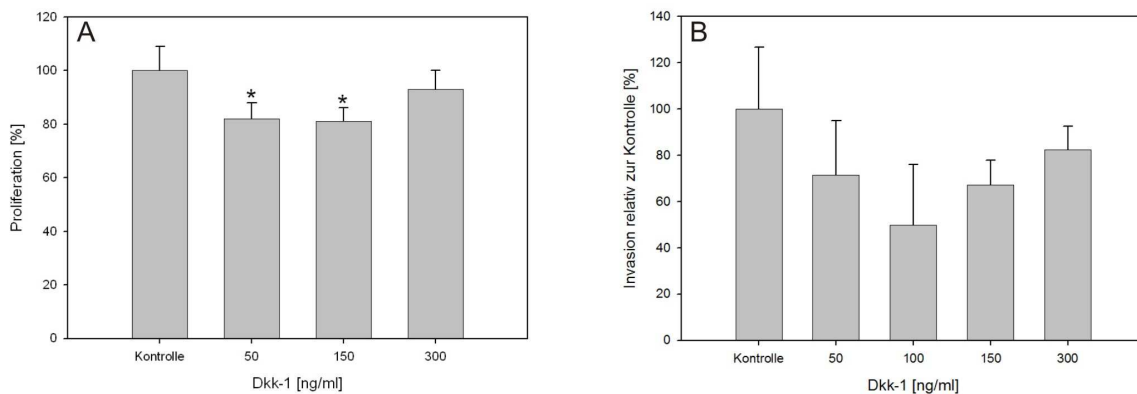


Abb. E-37: Proliferation und Invasionsfähigkeit von hMSC unter Stimulation mit Dkk-1.

Das Proliferations- und Invasionsverhalten von mit Dkk-1 stimulierten hMSC wurde entsprechend mit dem CyQuant-Proliferations-Assay bzw. dem Transwell-System evaluiert.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05.

A) Prozentual dargestellt sind die Effekte der sieben-tägigen Behandlung von hMSC mit steigenden Dkk-1-Mengen (0, 50, 150 und 300 ng/ml) im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollzellen.

B) Steigende Mengen Dkk-1 (50 – 300 ng/ml) wurden eingesetzt, um die Invasionsfähigkeit über einen Zeitraum von 48 Stunden zu untersuchen. Normierung erfolgte über nicht-stimulierte Kontrollzellen.

E.2.2.6 Einfluss der Stimulation mit Dkk-1 auf die Wnt-Zielgen-Expression bei gleichzeitigem Knockdown von LRP6

Mit dem Ziel, herauszufinden, ob die beobachteten Effekte nach Stimulation mit Dkk-1 auf einer Bindung von Dkk-1 an LRP6 beruhen, wurden LRP6-Knockdown-Zellen mit einem neutralisierenden Antikörper gegen Dkk-1 inkubiert und anschließend die Expression der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP gemessen.

Wie in Abb. E-38 dargestellt, ergab sich durch Neutralisation des endogen exprimierten und in den Zellkulturüberstand sezernierten Dkk-1 mittels anti-Dkk-1 eine deutliche Induktion der Expression von beiden Wnt-Zielgenen. Darüber hinaus konnte die durch Knockdown von LRP6 induzierte Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP durch Zugabe des Dkk-1-neutralisierenden Antikörpers sogar noch verstärkt werden (Abb. E-38). Diese Potenzierung weist klar auf eine essentielle Rolle von LRP6 für die Bindung von Dkk-1 hin.

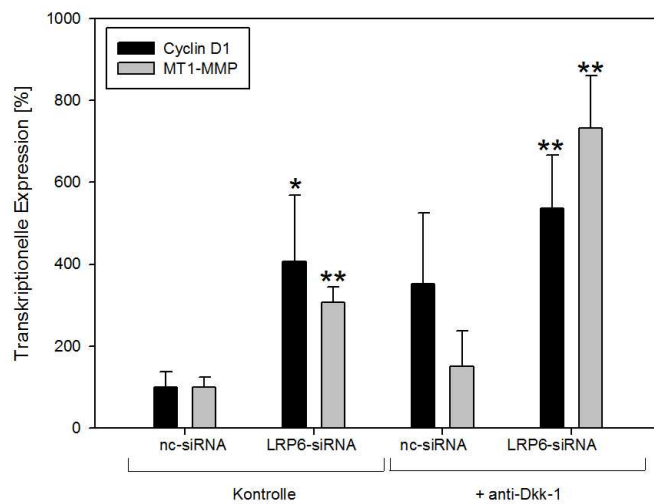


Abb. E-38: Bestimmung der Wnt-Zielgen-expression nach Knockdown von LRP6 und gleichzeitiger Inkubation mit anti-Dkk-1.

Mit Hilfe der qRT-PCR erfolgte der Nachweis der mRNA-Expressionen von Cyclin D1 und MT1-MMP in mit nc- bzw. LRP6-siRNA transfizierten hMSC. Drei Tage nach Transfektion wurde die zwei Tage währende Inkubation mit dem neutralisierenden anti-Dkk-1-Antikörper (1,25 µg/ml) gestartet. Dargestellt sind die Daten in Relation zur nicht-stimulierten, mit nc-siRNA transfizierten Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05 **P<0,01.

E.3 Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in mMSC

Ein Großteil der in humanen mesenchymalen Stammzellen durchgeführten Experimente zur Untersuchung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges wurde im gleichen Zelltyp murinen Ursprungs wiederholt. Diese Experimente sollen der Vorbereitung von *in vivo*-Studien in der Maus dienen, die zur Überprüfung der erhaltenen *in vitro*-Daten in naher Zukunft geplant sind. Bei der Evaluierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in mMSC wurde deshalb die Signaltransduktionskaskade nach gleichem Schema wie in hMSC zum einen aktiviert und zum anderen inhibiert.

E.3.1 Aktivierungsstudien mittels Wnt3a und LiCl

E.3.1.1 Einfluss auf β -Catenin sowie auf Cyclin D1 und MT1-MMP

Zur Aktivierung des Wnt-Signalweges wurden mMSC mit verschiedenen Mengen an rekombinantem Wnt3a stimuliert und im Anschluss daran die Proteinmengen von β -Catenin untersucht. Die Akkumulation des β -Catenin-Proteins im Cytoplasma wurde mit Hilfe eines Immunoblots mit Zelllysaten vom vierten Tag nach Beginn der Wnt3a-Stimulation nachgewiesen (Abb. E-39).

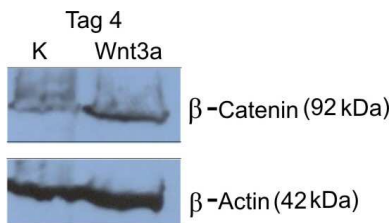


Abb. E-39: Nachweis der Induktion von β -Catenin nach Stimulation mit Wnt3a.

Die Effekte einer viertägigen Stimulation von mMSC mit 50 ng/ml Wnt3a auf den β -Catenin-Proteingehalt wurden mittels semiquantitativer Western Blot-Analyse untersucht. Als Auftragskontrolle diente β -Actin (42 kDa).

Ferner wurden die mRNA-Expressionsniveaus der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP evaluiert. Hierbei konnte sowohl am Tag 1 als auch vermehrt am Tag 3 eine dosisabhängige Induktion der mRNA-Expression von Cyclin D1 infolge der Wnt3a-Stimulation beobachtet werden. Interessanterweise war bei einer Konzentration von 75 ng/ml Wnt3a kein Unterschied zu unstimulierten Kontrollzellen erkennbar (Abb. E-40A).

Die mRNA-Expression von MT1-MMP blieb dagegen unabhängig von der eingesetzten Wnt3a-Menge weitgehend unverändert (Abb. E-40B).

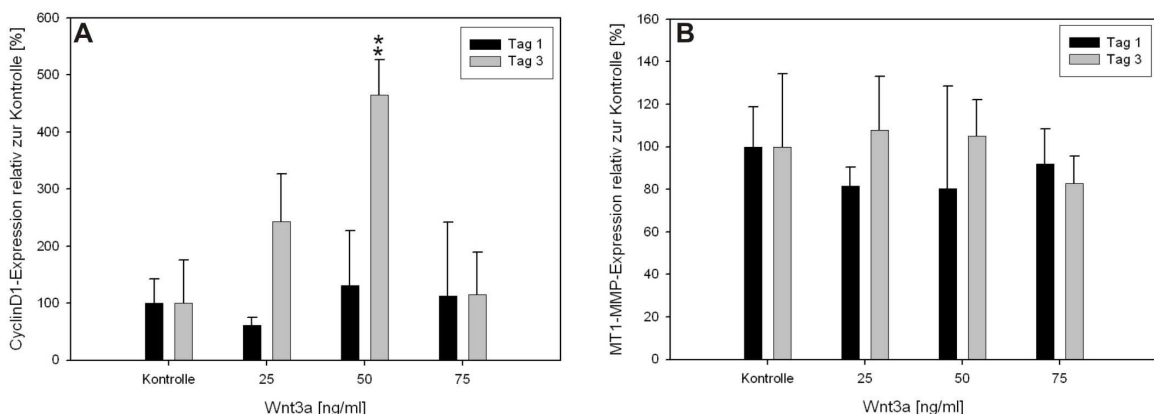


Abb. E-40: mRNA-Expressionsprofil von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Stimulation mit Wnt3a.

hMSC wurden einen bzw. drei Tage mit Wnt3a (25, 50, 75 ng/ml) stimuliert und die mRNA-Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP mittels qRT-PCR bestimmt. Normiert wurde auf nicht-stimulierte Kontrollzellen.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

A) Cyclin D1-Transkripte am Tag 1 und 3 nach Beginn der Wnt3a-Stimulation.

B) MT1-MMP-Transkripte am Tag 1 und 3 nach Beginn der Wnt3a-Stimulation

Die dreitägige Stimulation der Zellen mit LiCl (2, 10 mM) bewirkte eine leichte Erhöhung der Cyclin D1-Transkripte (Abb. E-41A), während die MT1-MMP-Transkripte unverändert blieben (Abb. E-41B).

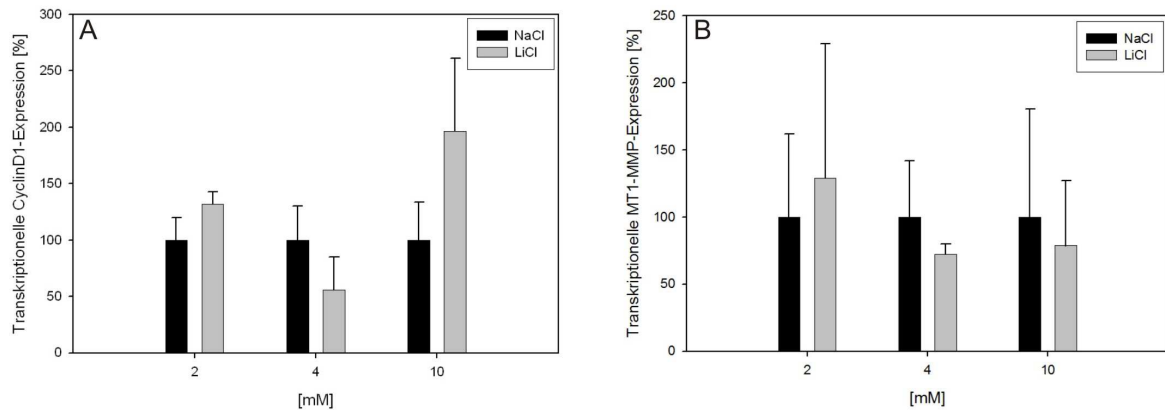


Abb. E-41: mRNA-Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Behandlung mit LiCl.

mMSC wurden 3 Tage mit LiCl (2, 4, 10 mM) stimuliert und die mRNA-Expressionslevel von Cyclin D1 und MT1-MMP mittels qRT-PCR untersucht. Als Kontrollen dienten mit den jeweiligen NaCl-Konzentrationen behandelte mMSC (100 %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes.

- A) mRNA-Expressionsmuster von Cyclin D1.
- B) mRNA-Expressionsmuster von MT1-MMP.

E.3.1.2 Einfluss auf das Proliferationsverhalten

Zur Untersuchung der mMSC Proliferation nach Wnt/ β -Catenin-Signalweg-Aktivierung wurden mMSC mit steigenden Mengen an Wnt3a bzw. LiCl stimuliert und vier Tage später das Wachstumsverhalten analysiert. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Zellproliferation bis zu einer Wnt3a-Konzentration von 40 ng/ml. Höhere Konzentrationen hingegen bewirkten keinen weiteren proliferationsfördernden Effekt (Abb. E-42A).

Die Stimulation mit bis zu 10 mM LiCl hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellteilungsrate, während höhere Mengen (40 mM) die Proliferation von mMSC sehr deutlich verminderten (Abb. E-42B).

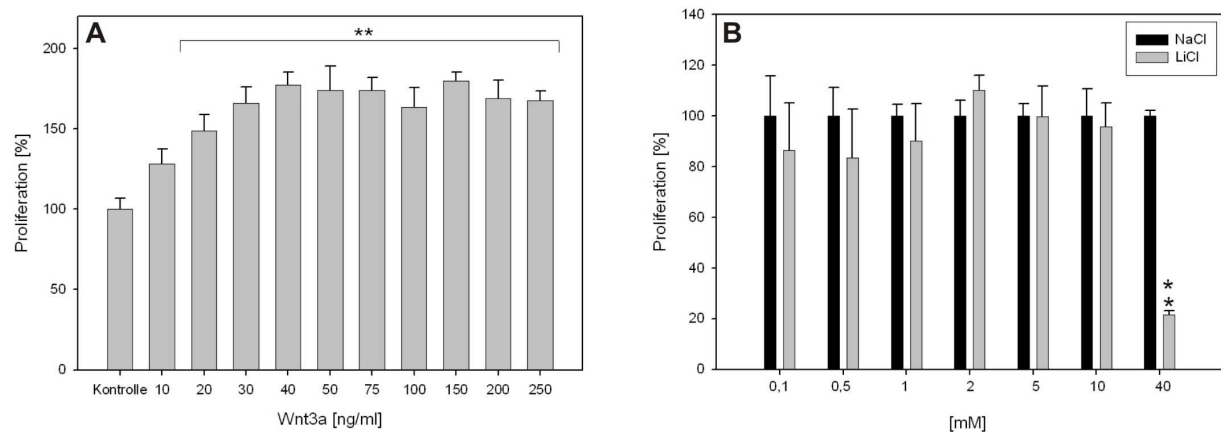


Abb. E-42: Proliferationsvermögen nach Stimulation mit Wnt3a und LiCl.

Die Proliferation von mMSC wurde vier Tage nach Beginn der Stimulation mit Wnt3a und LiCl analysiert und mit derjenigen unstimulierter bzw. NaCl-stimulierter Kontrollzellen verglichen.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. $**P < 0,01$.

- A) Proliferationsverhalten von mMSC in Abhängigkeit von steigenden Wnt3a-Konzentrationen (0-250 ng/ml).
- B) Proliferationsverhalten von mMSC in Abhängigkeit von steigenden LiCl-Konzentrationen (0,1-40 mM).

E.3.1.3 Einfluss auf das Invasionsverhalten

Für diese Experimente wurde der durchwegs aus humanen Komponenten bestehende Transwell-Assay (D.2.3.9) zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit humaner mesenchymaler Stammzellen an die Verwendung von Mauszellen angepasst. Dementsprechend wurden mit Matrigel beschichtete Membranen und Mausserum als Chemotaxin eingesetzt.

Bei Zugabe von Wnt3a ließ sich keine erhöhte Invasivität der mMSC beobachten, vielmehr war mit steigenden Wnt3a-Konzentrationen bis zu 100 ng/ml ein abnehmendes Invasionsvermögen zu verzeichnen (Abb. E-43A).

Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei LiCl-Konzentrationen von 4 mM und 10 mM. Auch hier führte die Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer verminderten Invasivität (Abb. E-43B).

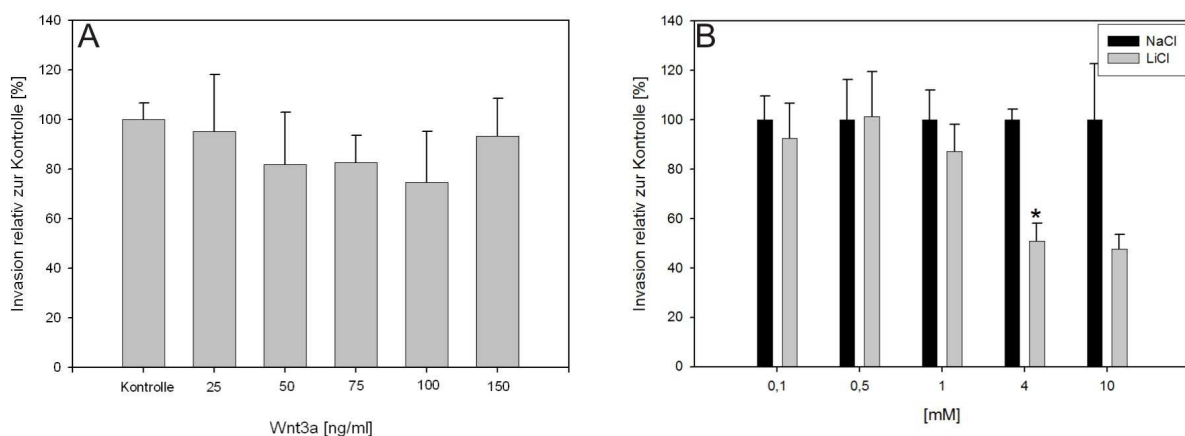


Abb. E-43: Invasivität nach Stimulation mit Wnt3a bzw. LiCl.

Die Invasionsfähigkeit von mMSC durch Matrigel wurde mit Hilfe eines Transwell-Systems über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.
A) Invasivität nach Stimulation mit Wnt3a (0 – 150 ng/ml) im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollzellen.
B) Invasivität nach Stimulation mit LiCl (0,1 – 10 mM) im Vergleich zu NaCl-behandelten Kontrollzellen.

E.3.2 Inhibitionsstudien

Aufgrund der erfolgreichen Strategie, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in humanen MSC mittels RNAi gegen β -Catenin und LRP5 zu blockieren, wurde diese Vorgehensweise auch auf mMSC übertragen.

E.3.2.1 Knockdown von β -Catenin und LRP5

Zunächst wurden die siRNA-Sequenzen für die Mausegene nach gleichem Schema wie für die humanen Zielgene ermittelt (Reynolds et al., 2004) und auf ihre Effizienz getestet. Dafür wurden die siRNAs gegen β -Catenin bzw. LRP5 in mMSC transfiziert und 24 Stunden später die β -Catenin- bzw. LRP5-Transkriptmengen untersucht und in Relation zu den jeweiligen Kontrollen gesetzt. Während der β -Catenin-Knockdown am Tag 1 62 % und nach vier Tagen nur noch 35 % betrug, wurde im Falle des LRP5-Knockdowns eine deutlich höhere Effizienz beobachtet (86 % am Tag 1 und 65 % am Tag 4) (Abb. E-44).

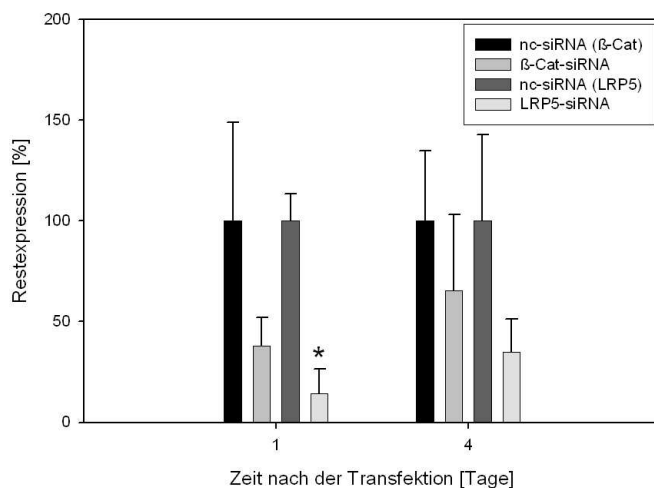


Abb. E-44: Knockdown von β -Catenin und LRP5 in mMSC.

Die Bestätigung des β -Catenin- und LRP5-Knockdowns erfolgte über die Analyse der Transkriptmengen mittels qRT-PCR unmittelbar einen und vier Tage nach Transfektion der entsprechenden siRNAs. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

Somit war der lang anhaltende Knockdown, der bei humanen mesenchymalen Stammzellen vor allem im Fall von β -Catenin erreicht wurde, im murinen Zelltyp deutlich kürzer ausgeprägt. Dennoch konnte die Reduktion der mRNA-Transkriptmengen von β -Catenin mit einer Verzögerung von vier Tagen auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. E-45).

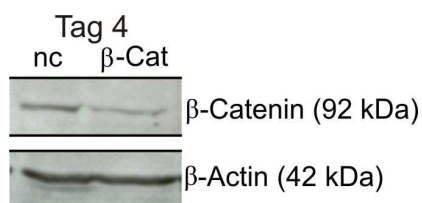


Abb. E-45: Knockdown von β -Catenin auf Proteinebene.

Die Reduktion des β -Catenin-Proteinlevels in mMSC konnte am Tag 4 nach Transfektion der β -Catenin-siRNA über Western Blot-Analyse gezeigt werden. Als Proteinauftragskontrolle diente β -Actin (42 kDa).

E.3.2.1.1 Einfluss auf Cyclin D1 und MT1-MMP

Der Einfluss des Knockdowns von β -Catenin (Abb. E-46A) und LRP5 (Abb. E-46B) auf Cyclin D1 und MT1-MMP wurde ebenfalls über die Bestimmung der Transkriptmengen dieser Gene untersucht. In beiden Fällen konnte eine Reduktion der Cyclin D1-mRNA-Expression beobachtet werden, wohingegen die MT1-MMP-Expression weitgehend unverändert blieb.

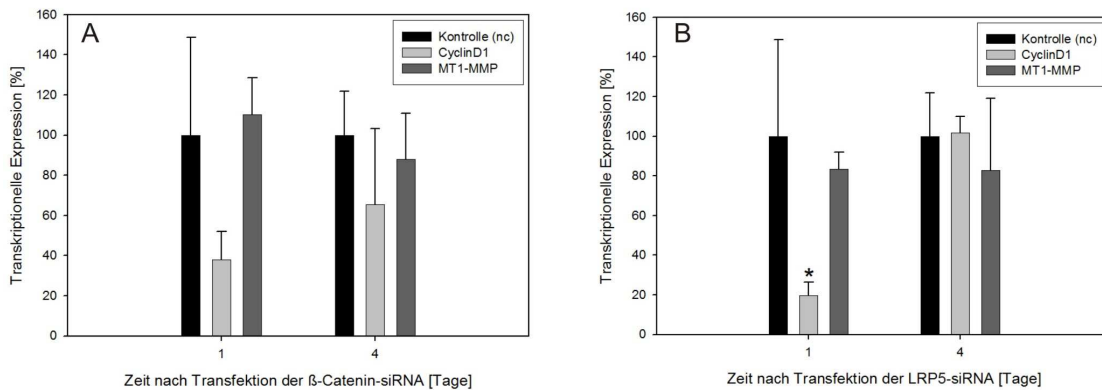


Abb. E-46: Wnt-Zielgen-Expression nach Knockdown von β -Catenin und LRP5.

Die Cyclin D1- bzw. MT1-MMP-Transkripte wurden am Tag 1 und 4 nach Transfektion der β -Catenin- bzw. LRP5-siRNA mittels qRT-PCR bestimmt und mit derjenigen in mit nc-siRNA transfizierten mMSC verglichen.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05.

A) mRNA-Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Knockdown von β -Catenin.

B) mRNA-Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Knockdown von LRP5.

E.3.2.1.2 Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten

Der Knockdown von β -Catenin und LRP5 zeigte unterschiedliche Effekte sowohl auf das Wachstum der Zellen, als auch auf ihre Invasivität. So führte der LRP5-Knockdown zu einer verminderten Zellteilungsrates, während der β -Catenin-Knockdown keinen merklichen Effekt zeigte (Abb. E-47A).

Entgegen den Erwartungen wurde nach Knockdown von β -Catenin eine zunehmende Invasivität der mMSC beobachtet (Abb. E-47B). Der LRP5-Knockdown ließ hingegen keinen derartigen Effekt auf die Invasion erkennen. In keinem der beiden Fälle ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe.

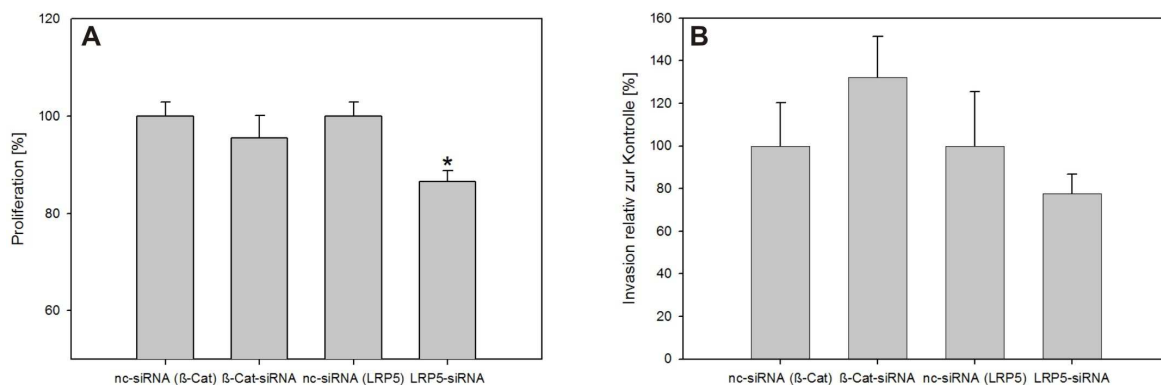


Abb. E-47: Proliferation und Invasionsvermögen von β -Catenin- bzw. LRP5-Knockdown-Zellen.

Das Proliferations- und Invasionsverhalten von mit β -Catenin- und LRP5-siRNA transfizierten mMSC wurde mittels des CyQuant-Proliferations-Assays bzw. des Transwell-Systems analysiert. Normiert wurde auf die mit nc-siRNA transfizierte Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05.

A) Proliferation vier Tage nach siRNA-Transfektion.

B) Invasivität (gemessen für die Dauer von 6 Stunden) zwei Tage nach siRNA-Transfektion.

E.3.2.2 Knockdown von Cyclin D1: Einfluss auf die Proliferation

Da die Stimulation von mMSC sowohl mit Wnt3a als auch mit LiCl lediglich zu einer Induktion der Cyclin D1-Transkriptlevel führte, während die MT1-MMP-Expression unverändert blieb, wurde zur Klärung der Rolle von Cyclin D1 die Expression dieses Zellzyklusproteins blockiert. Dazu wurde eine spezifische siRNA gegen Cyclin D1 ausgewählt und in mMSC transfiziert, wobei sich eine Knockdown-Effizienz von 82 % ergab (Abb. E-48).

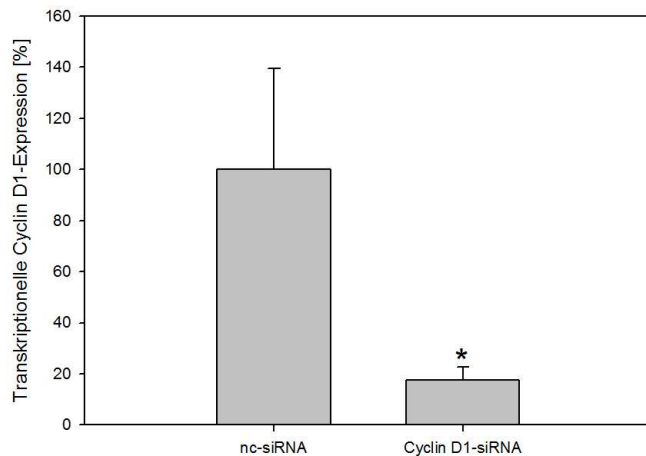


Abb. E-48: Nachweis des Cyclin D1-Knockdowns in mMSC.

Die Bestimmung der Knockdown-Effizienz der siRNA gegen murines Cyclin D1 erfolgte mittels qRT-PCR 24 Stunden nach Transfektion im Vergleich zur nc-siRNA-Transfektion. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob Cyclin D1 an der durch Wnt3a-vermittelten gesteigerten Zellteilungsrate (Abb. 42A) der mMSC beteiligt war. So wurden drei Tage nach Transfektion der Cyclin D1-siRNA die Zellen mit 50 ng/ml Wnt3a stimuliert, während die Kontrollzellen unbehandelt blieben. 48 Stunden später wurden die Zellen lysiert und die Proliferation der Zellen analysiert. Abb. E-49 zeigt deutlich, dass der Knockdown von Cyclin D1 das Wachstumsvermögen der mit Cyclin D1-siRNA transfizierten Zellen einschränkt und die Wachstumsinduktion - die für gewöhnlich nach Stimulation mit Wnt3a beobachtet werden kann - nicht mehr in gleichem Maße erfolgt.

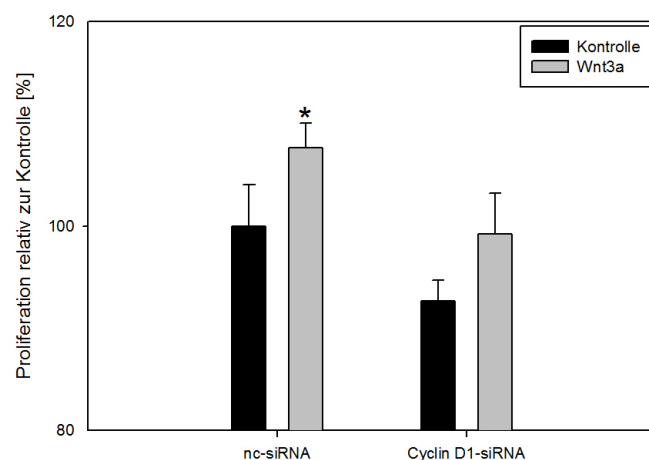


Abb. E-49: Proliferationsverhalten von mMSC nach Knockdown von Cyclin D1 und Stimulation mit Wnt3a.

Mittels des CyQuant-Assays wurde die Proliferation von mMSC fünf Tage nach Transfektion der Cyclin D1-siRNA untersucht. 48 Stunden zuvor wurden die Zellen mit 50 ng/ml Wnt3a stimuliert, wohingegen die Kontrollzellen unbehandelt blieben. Die Normierung der Daten erfolgte über die nicht-stimulierten, jedoch mit nc-siRNA transfizierten Kontrollzellen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$.

E.3.2.3 Knockdown von MT1-MMP: Einfluss auf das Invasionsverhalten

Um zu klären, ob es einen Zusammenhang zwischen der verminderten Invasionsfähigkeit von mMSC und der reduzierten MT1-MMP-mRNA-Expression nach Stimulation mit Wnt3a gibt, wurde die Expression von MT1-MMP in einem RNAi-basierten Ansatz blockiert.

Die Transfektion mit der MT1-MMP-spezifischen siRNA ergab eine um 76 % verminderte mRNA-Expression von MT1-MMP (Abb. E-50A).

Auch auf Proteinebene wirkte sich der Knockdown aus und resultierte nach zwei Tagen in einer deutlich verminderten Proteinexpression von MT1-MMP (Abb. E-50B).

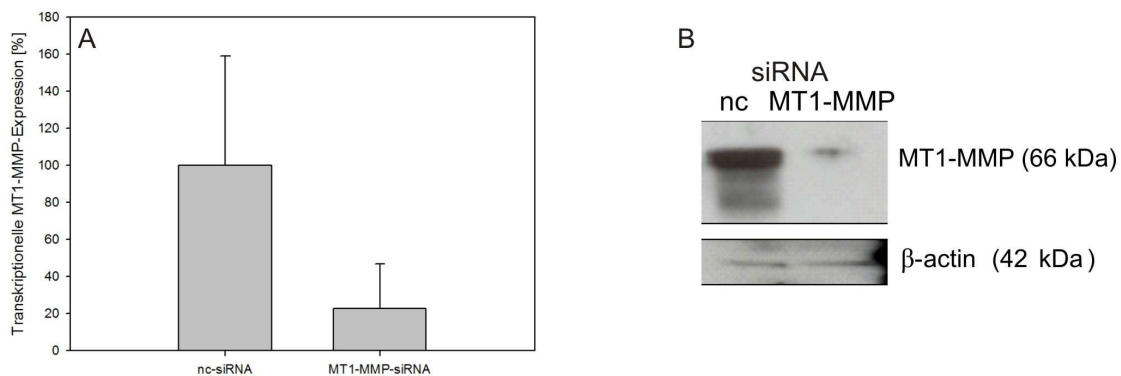


Abb. E-50: Nachweis des MT1-MMP-Knockdowns auf mRNA- und Proteinebene.

Der Knockdown von MT1-MMP wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR sowie auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen. Als Kontrolle dienten mit nc-siRNA transfizierte mMSC.

A) Knockdown-Effizienz der MT1-MMP-siRNA am Tag 1 nach Transfektion.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes.* $P < 0,05$

B) Immunoblot des murinen MT1-MMP-Proteins (66 kDa) 2 Tage nach Transfektion.

Als Proteinauftragskontrolle diente β -Actin (42 kDa).

Um die Bedeutung von MT1-MMP für die Invasionsfähigkeit von mMSC zu untersuchen, wurden MT1-MMP-Knockdown-Zellen im Transwell-System getestet, wobei sich eine signifikant verminderte Invasionsfähigkeit zeigte (Abb. E-51).

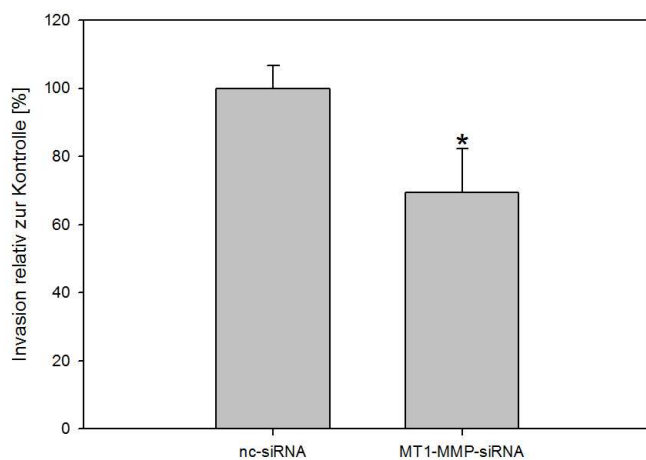


Abb. E-51: Invasionsfähigkeit von mMSC mit MT1-MMP-Knockdown.

Mit Hilfe des Transwell-Systems wurde die Invasionsfähigkeit von mMSC zwei Tage nach Transfektion der MT1-MMP-siRNA für die Dauer von 6 Stunden getestet.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes.* $P < 0,05$

E.3.3 Frizzled-Rezeptor-Expression in mMSC

Analog zu den Untersuchungen in hMSC erfolgte - im Sinne einer weiteren Vergleichsmöglichkeit - die Analyse der Fzd-Expression auch in mMSC.

Die in Abb. B-52 dargestellten Daten zeigen die Auftrennung der PCR-Produkte im DNA-Agarosegel mit entsprechender Positivkontrolle im Fall von Fzd1, 2, 3, 4, 5, 6 und 10. Hierbei handelte es sich um Plasmide, welche die jeweiligen Fzd-Sequenzen tragen und unter gleichen Bedingungen in die PCR eingesetzt wurden. Für die Detektion von Fzd7, 8, 9 und 10 wurde das UPL-Sonden-System der Firma Roche verwendet. Auch diese PCR-Amplifikate wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Eine Aussage über die Expression von Fzd10 kann nur bedingt getroffen werden, da neben dem spezifischen auch ein unspezifisches Signal detektiert wurde.

Alle anderen Rezeptoren wurden mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen, wenn auch mit unterschiedlichen Expressionsniveaus. So war vor allen Dingen die Expression von Fzd1, 2 und Fzd6 im Vergleich zu den anderen deutlich höher.

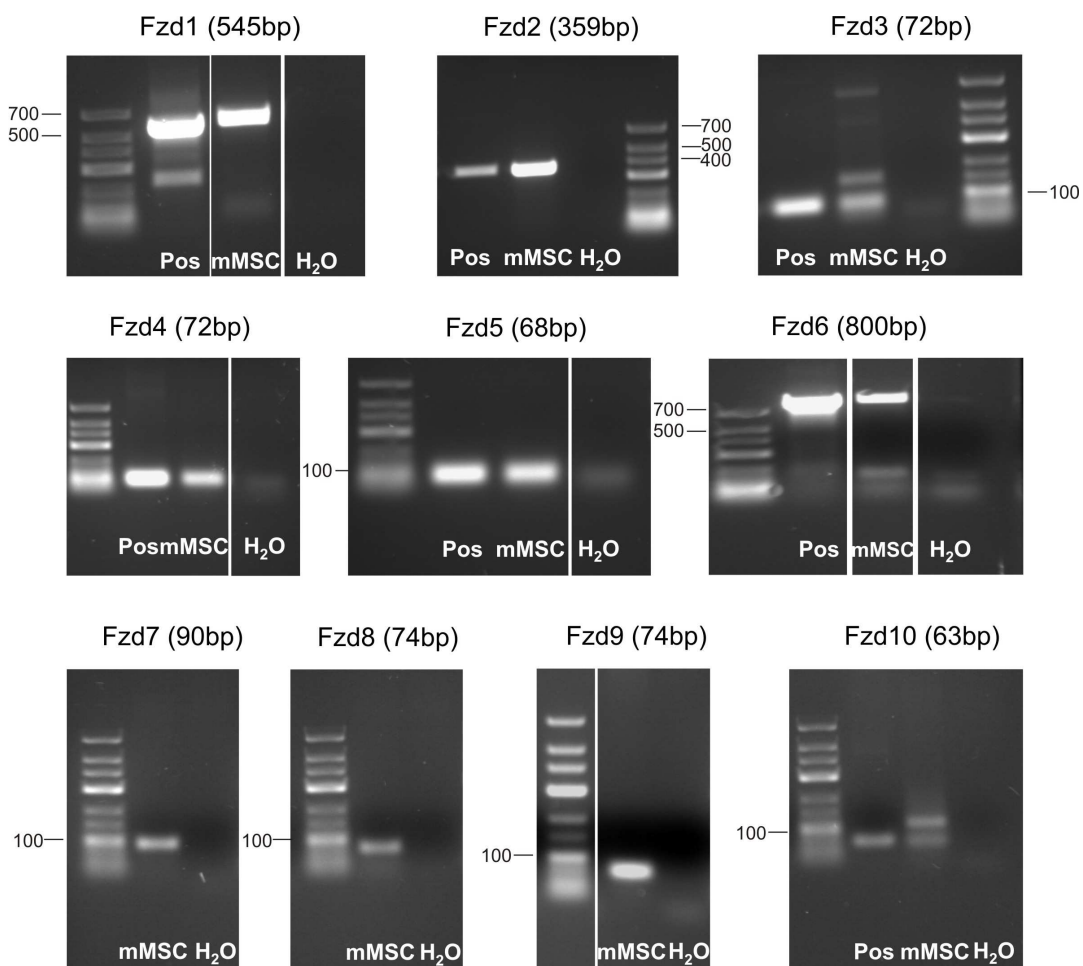


Abb. E-52: Nachweis der Expression von Fzd1-10 in mMSC.

Der qualitative Nachweis der Fzd-Expression in mMSC erfolgte mittels RT-PCR. Hierzu wurde Gesamt-RNA von mMSC revers transkribiert und die Expression von Fzd1-10 untersucht. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese visualisiert.

Im Falle von Fzd1, 2, 3, 4, 5, 6 und Fzd10 konnte eine vektorielle Positivkontrolle (Pos) in die PCR eingesetzt werden. Dies war bei Fzd7, 8 und 9 nicht der Fall. Als Negativkontrolle wurde anstelle der Proben-DNA 1 µl Aqua dest. (H₂O) verwendet.

E.3.4 Tcf/Lef-Reporter-Analysen

Die Tatsache, dass Wnt-Zielgene Tcf/Lef-Bindungsstellen innerhalb ihrer Promotorsequenzen tragen, ist die Grundlage dieses Reportersystems. Demnach erfolgt die Expression der Gaussia-Luciferase nur nach Translokation von β -Catenin in den Kern der Reporterplasmid-tragenden MSC.

E.3.4.1 Klonierung eines Vektors zur Analyse β -Catenin-abhängiger Reporter-Expression

Das Plasmid pcDNA3.1pTA_{Min}TOPGLuc wurde aus insgesamt drei Vektoren hergestellt (Abb E-53). Aus dem Vektor SUPER8TOP, der die Luciferase-kodierende Sequenz unter der Kontrolle des minimalen Promotors pTA_{Min} mit 8 aufeinander folgenden Tcf/Lef-Bindungsstellen trägt, wurde zunächst die Luciferase-Sequenz (3051 bp Insert; 1951 bp Vektor) mittels Restriktionsverdau durch *Bam*HI und *Hind*III entfernt. Die gleichen Restriktionsenzyme wurden auch zur Präparation der Gaussia-Luciferase-Sequenz (608 bp) aus dem pGLucBasic-Vektor verwendet, was eine Ligation in das Vektorrückgrat des SUPER8TOP über die passenden DNA-Enden möglich machte. Da dieser Vektor allerdings keine kodierende Sequenz für eine Antibiotika-Resistenz in Eukaryontenzellen trug, wurde ein letzter Klonierungsschritt vollzogen. Hierfür wurde mittels einer PCR der DNA-Abschnitt mit der Sequenz für den β -Catenin-abhängigen minimalen Promotor inklusive der dahinter liegenden Gaussia-Luciferase amplifiziert, wobei an die Enden Schnittstellen für *M*feI und *Hind*III angehängt wurden. Dieser so generierte DNA-Abschnitt wurde dann an der Stelle, wo vorher die kodierende Sequenz für den CMV-Promotor lag in das Rückgrat des käuflich zu erwerbenden pcDNA3.1-Vektors eingebracht.

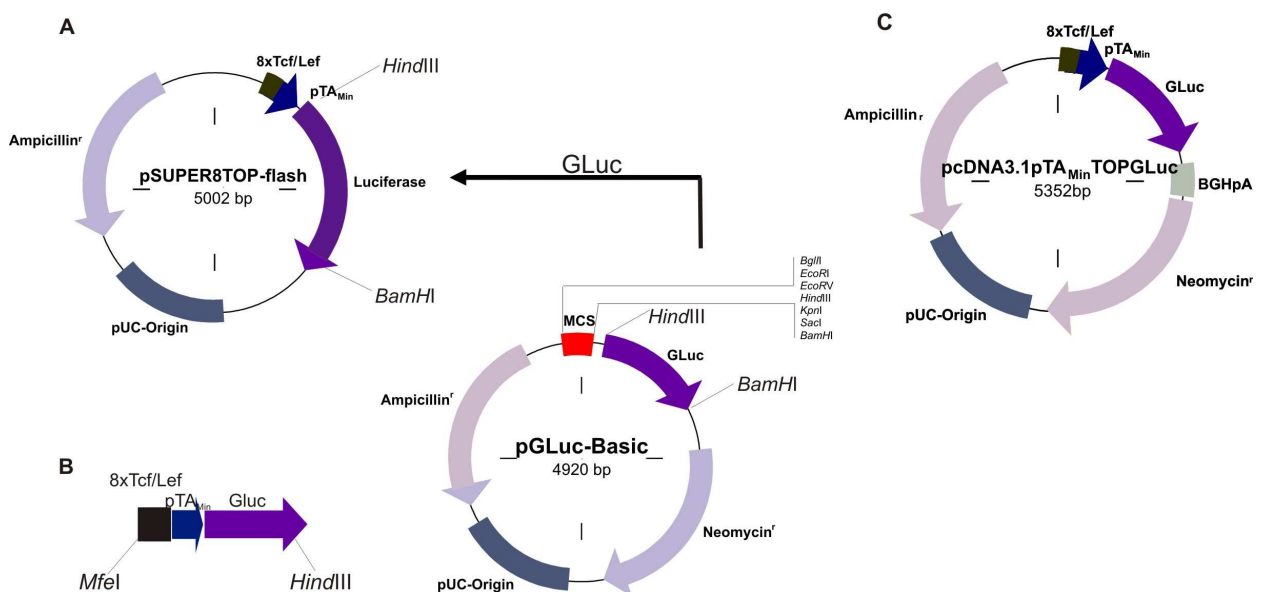


Abb. E-53: Schematische Darstellung der Klonierung von pcDNA3.1pTA_{Min}TOPGLuc.

- Dargestellung der beiden Ausgangsvektoren für die Klonierung pSUPER8TOP und pGLuc-Basic. Zunächst wurde die kodierende Sequenz der Gaussia-Luciferase mittels *Hind*III und *Bam*HI Restriktionsverdau aus dem pGLucBasic Vektor entfernt und danach in den SUPER8TOP Vektor eingebracht, aus dem zuvor die kodierende Sequenz für die nicht-sezernierte Luciferase entfernt worden war.
- Darstellung der mittels PCR amplifizierten Sequenz aus dem in A) entstandenen Plasmid mit den eingefügten Restriktionsenzymchnittstellen *M*feI und *Hind*III.
- Vektorkarte des entstandenen Plasmids pcDNA3.1pTA_{Min}TOPGLuc.

E.3.4.2 Stabile Transfektion von mMSC mit pcDNA3.1pTA_{Min}TOPGLuc

Zum Reporter-gen-basierten Nachweis der Translokation von β -Catenin in den Nucleus von mMSC, war eine stabile Transfektion mit dem Reporterplasmid pcDNA3.1pTA_{Min}TOPGLuc notwendig. mMSC wurden hierfür wie unter D.2.3.7 beschrieben transfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen einem 21-tägigen Antibiotika-Selektionsdruck ausgesetzt, der nur das Überleben solcher Zellen ermöglichen sollte, die das Plasmid stabil in ihre genomische DNA integriert hatten. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte mMSC, die mit der gleichen Neomycinkonzentration behandelt wurden und diesem Selektionsdruck nicht standhielten.

Induzierbarkeit der Gaussia-Luciferase-Expression in Reporter-mMSC

Die so generierten stabil transfizierten Zellen (Reporter-mMSC) wurden in einem nächsten Schritt neu ausgesät und mit steigenden Mengen von Wnt3a stimuliert. Zwei Tage später wurde der Zellkulturüberstand hinsichtlich der Gaussia-Luciferase-Aktivität getestet.

Wie in Abb. E-54 dargestellt, ergab die Analyse einen dosisabhängigen Anstieg der Luciferase-Aktivität, die auf eine vermehrte Translokation von β -Catenin in den Kern zurückzuführen ist.

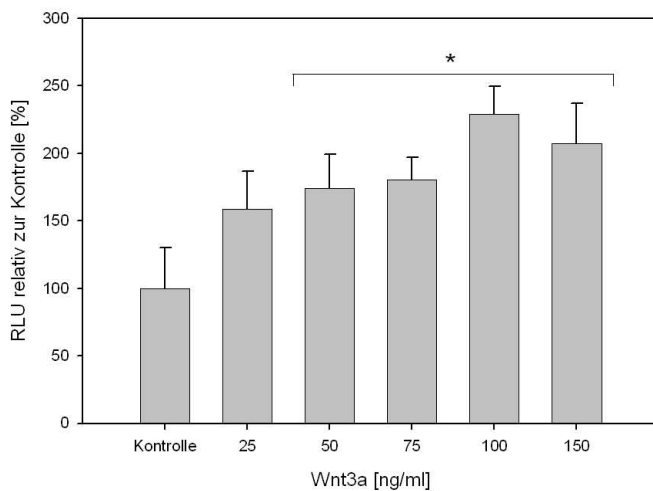


Abb. E-54: Gaussia-Luciferase-Expression in Reporter-mMSC.

Bestimmung der Gaussia-Luciferase-Aktivität in Zellkulturüberständen von mMSC, die 48 Stunden mit Wnt3a (0 – 150 ng/ml) stimuliert worden waren. *Relative light units* (RLU) wurden auf die Gesamtproteinmenge in jedem Ansatz normiert und in Relation zur nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05.

In einem gleichartig konzipierten Versuchansatz wurden die Reporter-mMSC mit LiCl stimuliert und die Gaussia-Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt. Hierbei konnten die höchsten Werte bei einer LiCl-Konzentration von 10 mM beobachtet werden (Abb. E-55).

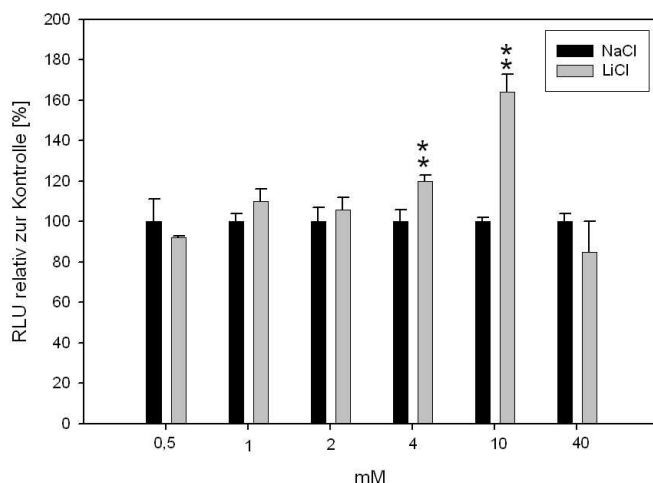


Abb. E-55: Gaussia-Luciferase-Expression in Zellkulturüberständen LiCl-stimulierter Reporter-mMSC.

In einem über zwei Tage konditioniertem Zellkulturüberstand von stabil transfizierten mMSC wurde die Aktivität der Gaussia-Luciferase luminometrisch ermittelt. Die RLU-Werte wurden auf die Gesamtproteinmenge in jedem Ansatz normiert und in Relation zur nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05 **P<0,01.

Einfluss von Serum auf die Gaussia-Luciferase-Expression

In diesem Ansatz sollten einzelne Komponenten von Inkubationsmedien dahingehend überprüft werden, ob sie den Wnt/ β -Catenin-Signalweg beeinflussen. Hierfür wurden Reporter-mMSC für die Dauer von 48 Stunden in verschiedenen Medien inkubiert und anschließend die Gaussia-Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand quantifiziert. Verglichen wurden das mMSC-Kultivierungsmedium IMDM, das 10 % fötales Rinderserum und 10 % Pferdeserum enthält, mit Serum-freiem DMEM und einer 1:1 Mischung der beiden Medien. Zudem wurde DMEM getestet, das mit 1 % Nutridoma supplementiert worden war.

Abb. E-56 zeigt deutlich eine im Serum-Anteil des IMDM-Mediums zu vermutende Inhibition der Reporter-genaktivität, welche partiell durch Ausverdünnen des Serums mit DMEM-Medium aufgehoben werden konnte.

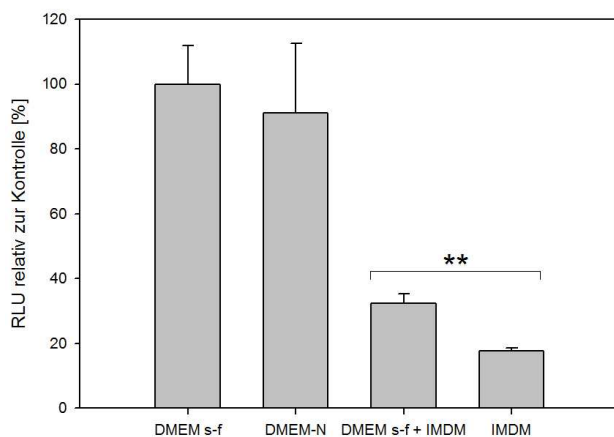


Abb. E-56: Gaussia-Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Inkubation von mMSC mit verschiedenen Medien.

Nach einer zweitägigen Inkubation in den unterschiedlichen Medien (DMEM s-f, DMEM-N, IMDM) wurden die Überstände hinsichtlich der Gaussia-Luciferase-Aktivität analysiert. Bei der Kombination der beiden Medien erfolgte eine Mischung im Verhältnis 1:1. RLU wurden auf die Gesamtproteinmenge in jedem Ansatz normiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. ** $P < 0,01$. Abkürzungen: N= Nutridoma, s-f = Serum-frei

Analyse der β -Catenin-abhängigen Expression der Gaussia-Luciferase nach Knockdown von β -Catenin und LRP5

Zusätzlich zu den Stimulationsexperimenten, in denen eine Induktion der Gaussia-Luciferase-Expression infolge einer vermehrten Translokation von β -Catenin in den Nukleus nachgewiesen wurde, sind Knockdown-Experimente durchgeführt worden. Dazu wurden Reporter-mMSC transient mit siRNAs gegen verschiedene Komponenten des Wnt-Signalweges transfiziert.

Der Knockdown von β -Catenin ergab eine verminderte Gaussia-Luciferase-Expression, was auf eine intrinsische Basalaktivität des Wnt-Signalweges schließen lässt.

Ein vergleichbarer Effekt war nach Transfektion der siRNA gegen den Wnt-Korezeptor LRP5 feststellbar (Abb. E-57).

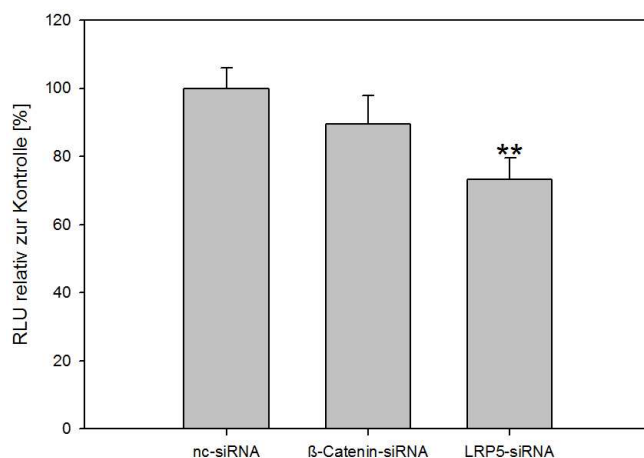


Abb. E-57: Bestimmung der Gaussia-Luciferase-Expression nach Knockdown von β -Catenin und LRP5.

Reporter-mMSC wurden mit siRNAs gegen β -Catenin bzw. LRP5 transfiziert. Zwei Tage später erfolgte die Bestimmung der Gaussia-Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand. RLU wurden jeweils auf die Gesamtproteinmenge in jedem Ansatz normiert und in Relation zur nc-siRNA-transfizierten Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

E.3.4.3 Verifizierung der Wnt3a-Effekte hinsichtlich der Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP

Um die von hMSC abweichenden Daten bezüglich der MT1-MMP-Zielgenexpression und der Invasivität von mMSC nach Wnt3a-Stimulation zu erhärten, wurden Reporter-mMSC eingesetzt. Sie wurden über den Zeitraum von drei Tagen in Serum-freiem DMEM mit Wnt3a stimuliert. Diese Umstellung auf Serum-freie Bedingungen erfolgte aufgrund der oben beschriebenen inhibitorischen Effekte des Serums auf die basale Wnt-Aktivität der Zellen. Da letztere unter diesen Bedingungen höher war, musste auch eine höhere Konzentration Wnt3a eingesetzt werden, um ähnliche induzierende Wirkungen zu erhalten.

Nach zweitägiger Stimulation mit 150 ng/ml Wnt3a war die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch erhöhte Gaussia-Luciferase-Aktivität - und damit Translokation von β -Catenin in den Zellkern - zu verifizieren. Anschließend wurden die Zellen lysiert und deren mRNA-Expressionslevel von Cyclin D1 bzw. MT1-MMP bestimmt.

Während Wnt3a eine mit der Gaussia-Luciferase-Aktivität parallele Erhöhung der Cyclin D1-Expression zeigte (Abb. E-58A), war auch in den Reporter-mMSC der Transkriptlevel von MT1MMP deutlich erniedrigt (Abb. E-58B)

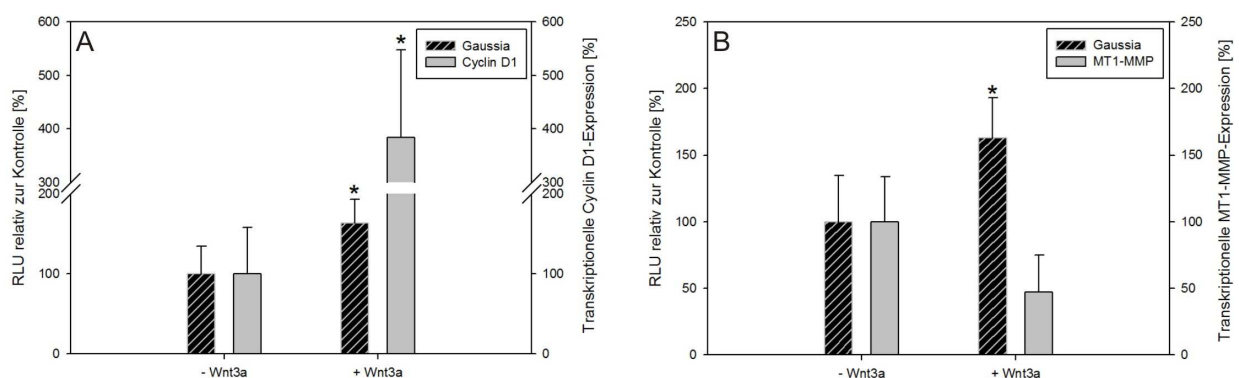


Abb. E-58: Gaussia-Luciferase-Aktivität und mRNA-Expression von CyclinD1 bzw. MT1-MMP von Reporter-mMSC ohne und mit Wnt3a-Stimulation.

Die luminometrische Bestimmung der Gaussia-Luciferase-Aktivität sowie die Analyse der Wnt-Zielgen-Expression mittels qRT-PCR erfolgte nach zweitägiger Stimulation mit Wnt3a (150 ng/ml). Normiert wurde auf nicht-stimulierte Kontrollzellen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05

A) Gaussia-Luciferase-Aktivitätslevel und mRNA-Expression von Cyclin D1.

B) Gaussia-Luciferase-Aktivitätslevel und mRNA-Expression von MT1-MMP.

Zudem wurden Reporter-mMSC für 48 Stunden mit Wnt3a prä-stimuliert und im Zellkulturüberstand die Gaussia-Luciferase-Aktivität bestimmt. Durch die erhöhte Gaussia-Luciferase-Aktivität (Abb. E-59) war die Translokation von β -Catenin indirekt nachzuweisen. Anschließend wurden die Zellen in den Transwell-Assay eingesetzt und für weitere 6 Stunden mit Wnt3a stimuliert. Wie in Abb. E-59 dargestellt zeigte sich eine drastisch reduzierte Invasionsfähigkeit der Reporter-mMSC. Dies steht im auffälligen Gegensatz zu den Beobachtungen in hMSC, deren Invasivität nach Wnt3-Stimulation deutlich erhöht war (siehe auch Abb. E-5).

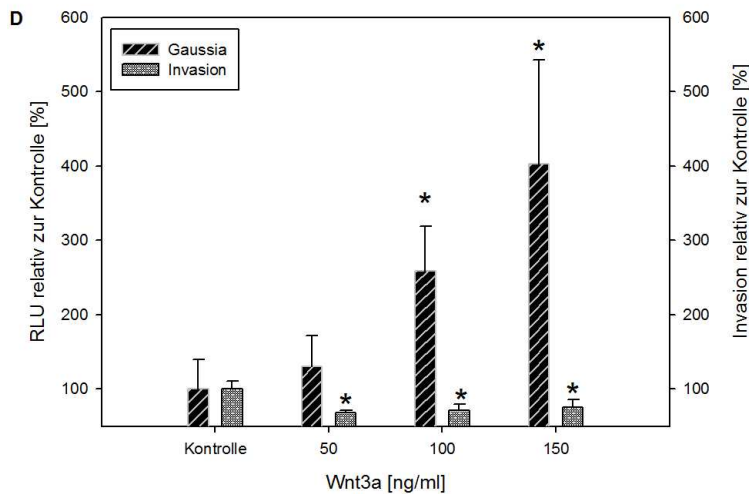


Abb. E-59: Gaussia-Luciferase-Aktivität bzw. Invasivität von Reporter-mMSC nach Stimulation mit Wnt3a.

Nach zweitägiger Prä-Stimulation mit Wnt3a (0 – 150 ng/ml) wurde die Gaussia-Luciferase-Aktivität bestimmt. Die gleichen Zellen wurden anschließend unter Wnt3a-Stimulationsbedingungen hinsichtlich ihrer Invasivität untersucht. In beiden Fällen erfolgte Normierung auf die unstimulierte Kontrolle. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. *P<0,05.

E.3.4.4 Wnt3a-Klonierung und transiente Transfektion von Reporter-mMSC mit pN3-Wnt3a

Da für die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges Wnt3a – dessen Bildung bisher weder in hMSC noch in mMSC nachgewiesen wurde – eine wesentliche Rolle spielt, war es ein weiteres Ziel dieser Promotionsarbeit, das Expressionsplasmids pN3-Wnt3a zu generieren. Mit dessen Hilfe sollte untersucht werden, ob MSC überhaupt die für die Bildung und Sezernierung von Wnt3a benötigte Maschinerie besitzen, d.h., ob sie in der Lage sind, diesen Wnt-Liganden nach ektopischem Einbringen des entsprechenden Gens zu exprimieren. Dies wurde durch den Einsatz von Reporter-mMSC möglich, die eine Aussage über die ektopische Wnt3a-Expression und autokrine Bindung durch die Tcf/Lef-abhängige Expression des Reporters Gaussia-Luciferase erst möglich machten.

Die kodierende Sequenz von humanem Wnt3a wurde zunächst aus Plazenta-cDNA amplifiziert (Saitoh et al., 2001). Modifizierte Primer wurden verwendet, die eine anschließende Exzision des amplifizierten DNA-Abschnitts mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Eco*RI ermöglichten. Nach erfolgreicher PCR, die ein Produkt mit entsprechender Größe (1058 bp) ergab, wurde das PCR-Produkt in den pCR2.1 TOPO Vektor eingebracht. Durch Sequenzierung konnte die korrekte Sequenz für humanes Wnt3a in Übereinstimmung mit dem Datenbankeintrag NM_033131 bestätigt werden. Danach erfolgte die Exzision des entsprechenden Sequenzabschnitts durch Restriktionsenzym-Verdau mit *Bgl*II und *Eco*RI und die Ligation in den vorher mit denselben Enzymen geschnittenen Zielvektor pN3-Mock (Abb. E-60). Dieser basierte auf dem Ursprungsvektor pEGFP-N3 der Firma BD Clontech (USA), aus dem durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Not*I die kodierende Sequenz von EGFP entfernt wurde. Nach einer Klenow-Enzym-vermittelten Auffüllreaktion war der Vektor mittels einer Ligasereaktion rezirkularisiert worden.

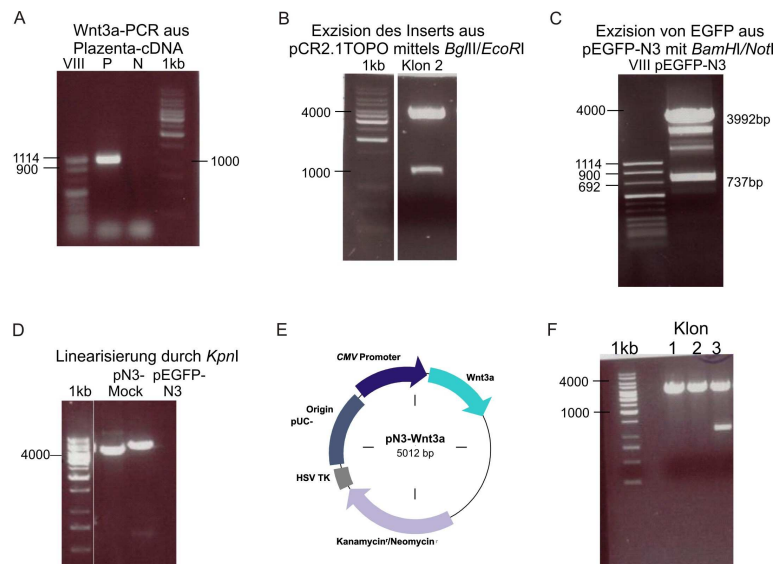


Abb. E-60: Klonierung des pN3-Wnt3a-Expressionsvektors.

- A) PCR zur Amplifikation der Wnt3a-kodierenden Sequenz (1058 bp) aus Plazenta-cDNA.
 B) Nachweis der Exzision der Wnt3a-DNA aus dem Sequenzierungsvektor pCR2.1 TOPO.
 C) Exzision der EGFP kodierenden Sequenz (737 bp) aus pEGFP-N3, um die Wnt3a-Sequenz einzubringen.
 D) Linearisierung von pN3-Mock und pEGFP-N3 durch Restriktionsverdau mit *KpnI*.
 E) Schematische Abbildung von pN3-Wnt3a.
 F) Analyse des durch Sequenzierung nachweislich positiven pN3-Wnt3a Klons (Klon 3).
 Abkürzungen: N = Negativkontrolle, P = Plazenta-cDNA; VIII und 1kb = DNA-Größenstandards

Zur Überprüfung der Funktionalität des neu generierten Plasmids pN3-Wnt3a wurden Reporter-mMSC transient transfiziert. Zwei Tage später wurde die Gaussia-Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand quantifiziert, wobei sich eine etwa 20%ige Induktion bei den mit pN3-Wnt3a transfizierten Zellen (Abb. E-61A) zeigte.

Ferner konnte mittels Western Blot ein deutlich höherer β -Catenin-Level in den mit pN3-Wnt3a transfizierten mMSC im Vergleich zu pN3-Mock-Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. E-61B).

Dies kann als indirekter Hinweis auf eine endogene Wnt3a-Bildung mit nachfolgender Wirkung auf die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges gewertet werden.

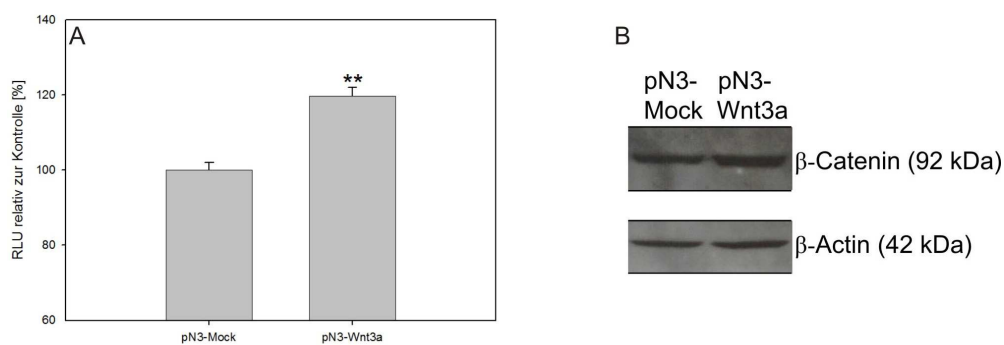


Abb. E-61: Gaussia-Luciferase-Expression in Wnt3a-überexprimierenden Zellen und Bestimmung der β -Catenin-Proteinlevel.

- Die Transfektion des Plasmids pN3-Wnt3a erfolgte in Reporter-mMSC. Als Kontrolle diente pN3-Mock.
 A) Expression der Gaussia-Luciferase-Aktivität. (RLU wurden auf die Proteinmenge jedes Ansatzes normiert). Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD eines Triplikat-Ansatzes. ** $P < 0,01$.
 B) β -Catenin-Proteinlevel. Als Auftragskontrolle diente β -Actin (42 kDa).

F Diskussion

Die Aufklärung von molekularen Signaltransduktionsmechanismen, die es mesenchymalen Stammzellen (MSC) ermöglichen, ihre Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierung aufrecht zu erhalten, ist von vordringlichem Interesse, um vor allem die Beteiligung von MSC bei der Organregeneration nach operativen Eingriffen sowie bei der Vorbeugung degenerativer Erkrankungen verstehen zu können (Korbling and Estrov, 2003). In diesem Kontext wurde in meiner Arbeit der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und seine Rolle bei der Proliferation und Invasion von MSC auf unterschiedlichen Ebenen untersucht, da diese zellulären Prozesse eine wesentliche Voraussetzung für die Wanderung einer ausreichenden Anzahl von Stammzellen aus der Stammzellnische an den Ort der erforderlichen Geweberegeneration darstellen.

Parallel zu den Analysen in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) erfolgte auch eine vergleichende Evaluierung der Hauptkomponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bei den murinen Pendanten (mMSC). Obwohl die Signaltransduktionkomponenten bzw. -mechanismen in beiden MSC-Populationen bis zur Translokation von β -Catenin in den Zellkern offensichtlich hoch konserviert sind, zeigten sich jedoch gravierende Unterschiede im Wnt-abhängigen Invasionsverhalten, was – zumindest zum Teil – auf eine differente Wnt-Zielgensteuerung in beiden Spezies-verschiedenen Zellpopulationen zurückzuführen ist. Diese Erkenntnis impliziert eine grundsätzlich unterschiedliche Regulation der Migrations-/Invasionseigenschaften von hMSC und mMSC, was zukünftig gerade bei der Übertragbarkeit von Daten aus murinen *in vivo*-Modellen auf die klinische Situation zum Einsatz von MSC für Regenerationsprozesse besonders berücksichtigt werden muß.

Nachfolgend werden nun die wesentlichen erzielten Ergebnisse im Kontext der aktuellen Fachliteratur diskutiert.

F.1 Wnt/ β -Catenin-Signalweg in hMSC

F.1.1 Aktivierung des Signalweges

Proliferation und Differenzierung in Stimulationsexperimenten

Um den Einfluss der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von hMSC zu eruieren, wurden die Zellen exogen durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von rekombinantem Wnt3a-Protein einerseits und von LiCl andererseits stimuliert. LiCl wurde aufgrund seines inhibitorischen Effektes auf die GSK-3 β und der damit verbundenen intrazellulären Akkumulation von β -Catenin mit nachfolgender Translokation in den Zellkern alternativ zur Aktivierung des Signalweges über Wnt-Proteine eingesetzt (Klein and Melton, 1996). Beide experimentellen Ansätze resultierten in einer dosisabhängigen Steigerung der Proliferationskapazität der hMSC. Dies entsprach bereits veröffentlichten Daten, bei denen durch Wnt3a-enhaltendes konditioniertes Medium gesteigerte Proliferationsraten von hMSC erzielt werden konnten (Boland et al., 2004).

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit sowohl der Differenzierungsstatus als auch die Differenzierungsfähigkeit von Wnt3a- bzw. LiCl-stimulierten Zellen untersucht. Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass hMSC durch Stimulation mit den eingesetzten Konzentrationen von Wnt3a bzw. LiCl weder in die adipogene noch in die osteogene Richtung differenzieren. Nach einer einwöchigen Vorstimulation mit diesen Substanzen war nach wie vor die Differenzierung mittels geeigneter Agenzien in die mesodermalen Richtungen in gleichem Maße wie in den unstimulierten Kontrollzellen möglich. Dies kann verlässlich allerdings nur für die hier eingesetzten Wnt3a-Konzentrationen ausgesagt werden, da Wnt3a seine Wirkung als Morphogen vermittelt, d.h. dosisabhängig unterschiedliche Effekte induzieren kann (Cadigan and Nusse, 1997). Demnach scheint bei Experimenten mit Wnt3a im Allgemeinen die Titration der eingesetzten Mengen sehr wichtig zu sein. Eine exakte Konzentrationsbestimmung und Reproduzierbarkeit der Wnt3a-Menge sind aber bei Verwendung eines konditionierten Mediums, wie es in anderen Untersuchungen eingesetzt wurde (Boland et al., 2004), nur bedingt gegeben.

Neben den Effekten auf die Proliferation resultierte die Wnt3a-Stimulation in einem verminderten Abbau von β -Catenin, der mit einer Translokation des transkriptionsaktivierenden Proteins β -Catenin in den Zellkern einherging. Diese Änderung der subzellulären Lokalisation von β -Catenin, die allgemein als Voraussetzung für die Aktivierung der Wnt-Zielgen-Expression gilt, entspricht den Literaturbeschreibungen und beweist die Fähigkeit von hMSC auf einen Wnt-Stimulus zu reagieren (Tolwinski and Wieschaus, 2004).

Auch die Induktion der Wnt-Zielgen-Expression konnten wir in hMSC nach Wnt3a-Stimulation ebenso wie nach Behandlung mit LiCl beobachten. Exemplarisch wurde hierfür die Expression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 und der membranständigen Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP analysiert, wobei deren Expressionsstatus im Vergleich zur Kontrolle als Maß für die Aktivierung des Wnt-Signalweges verwendet wurde. Sowohl Cyclin D1 (Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999) als auch MT1-MMP (Takahashi et al., 2002; Hlubek et al., 2004) wurden schon vor einiger Zeit in diversen Zellspezies (z.B. Tumorzellen) als direkte Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beschrieben.

Migrations-/Invasionsfähigkeit von hMSC nach Stimulation mit Wnt3a und LiCl

Für den therapeutischen Einsatz von hMSC zur Geweberegeneration gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Strategieansätze. Zum einen besteht die Möglichkeit, die Zellen vorwiegend aus dem Knochenmark zu entnehmen, *ex vivo* zu expandieren und sie danach – mit oder ohne genetische Modifikation – wieder zu transplantieren (Barrilleaux et al., 2006). Zum anderen kann diese Stammzellpopulation auch endogen mittels Zytokinen aktiviert werden. Diese endogene Aktivierung hat eine vermehrte Mobilisierung aus dem Knochenmark zur Folge, wobei eine gezielte Migration/Invasion in bestimmte Körperregionen eine wesentliche Voraussetzung für eine adäquate Geweberegeneration darstellt (Korbling and Estrov, 2003).

Um die an den Migrations-/Invasionsprozessen beteiligten Signaltransduktionsmechanismen besser verstehen zu können, wurde die Invasionsfähigkeit humaner MSC nach Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Wnt3a und LiCl untersucht. In beiden Fällen konnte im Transwell-System eine deutlich gesteigerte Invasivität durch humane extrazelluläre Matrix beobachtet werden. Dass diese vermehrte Invasionsfähigkeit mit der transkriptionellen Aktivierung des MT1-MMP-Gens zusammenhing, ließ sich in einem gesonderten Experiment untermauern: Nach Verminderung der Expression von MT1-MMP war durch Wnt3a-Stimulation keine Induktion der Invasivität von hMSC mehr erreichbar.

Die Rolle von MT1-MMP für die Migrationsfähigkeit von hMSC konnte darüber hinaus von einer kooperierenden Arbeitsgruppe gezeigt werden, die die Expression von MMP-2, MT1-MMP und TIMP-2 als essentiell für die Invasion beschrieb (Ries et al., 2007). Hierbei ist die Bildung eines ternären Komplexes aus MT1-MMP, TIMP-2 und MMP-2 entscheidend, der zur Aktivierung von proMMP-2 führt (Itoh et al., 2001). Aktive MT1-MMP und MMP-2 spielen eine bedeutende Rolle bei der Invasionsfähigkeit von hMSC (Ries et al., 2007), da beide Proteinase als wichtige extrazelluläre Matrix-degradierende Enzyme bekannt sind. Während das mRNA-Expressionsniveau von MT1-MMP in hMSC durch den Wnt-Signalweg reguliert wird, ist das bei MMP-2 interessanterweise nicht der Fall. Allerdings wurde eine Wnt-abhängige Regulation der MMP-2-Transkriptlevel für andere Zelltypen wie z.B. Effektor-T-Zellen beschrieben (Wu et al., 2007).

Diese Zelltyp-spezifische Regulation der Wnt-abhängigen Expression trifft auch auf andere Gene zu, wie dies beispielsweise für Cyclin D1 in kolorektalen Krebszellen nach Verlust von APC gezeigt wurde (Sansom et al., 2005).

Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch APC-/Axin2-Knockdown-Experimente

Die bis dato beschriebenen Ansätze zur Aktivierung der Wnt-Signaltransduktionskaskade basierten alle auf der exogenen Stimulation der Zellen. Darüber hinaus wurde eine alternative Strategie angewandt, um die Expression von Wnt-Zielgenen und die damit verbundenen Veränderungen des zellulären Verhaltens von hMSC zu induzieren. Zu diesem Zweck wurde in einem RNAi-basierten Ansatz die Expression von APC (Ha et al., 2004) und Axin2 (Axil/Conductin) (Behrens et al., 1998), beides Mitglieder des β -Catenin-Abbaufkomplexes, reduziert. Die Etablierung dieser auf der Transfektion von *small interfering RNAs* (siRNAs) beruhenden Methode erwies sich als äußerst wirksam in hMSC, da die sehr kleinen siRNAs mit sehr hoher Effizienz transfiziert werden können (Hoelters et al., 2005). Die Knockdown-Effizienz der jeweiligen mRNA-Entitäten, die von diversen Aspekten abhängt (Reynolds et al., 2004), lag zwischen 60 und 95 %.

Einfluss auf die Wnt-Zielgen-Expression:

Axin2 ist im Gegensatz zu APC selbst als Wnt-Zielgen bekannt, dessen Expression infolge eines negativen *feedback-loop* induziert wird (Lustig et al., 2002; Jho et al., 2002a).

Der Knockdown von APC und Axin2 führte zu einem verminderten Abbau von β -Catenin. Die daraus resultierenden erhöhten β -Catenin-Proteinmengen waren mit einer Translokation in den Nukleus und damit einer einhergehenden transkriptionellen Aktivierung der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP verbunden. Dies entspricht den Literatur-Berichten nach gezieltem Ausschalten von APC (Sansom et al., 2004) und den Effekten von Mutationen, die eine veränderte APC-Expression verursachen (Bienz and Clevers, 2000). Vor allem letzteres hat weit reichende Konsequenzen und ist der Grund für die meisten sporadisch auftretenden kolorektalen Krebserkrankungen sowie der vererbten Darmkrebsform *familial adenomatous polyposis* (Fodde, 2002).

Nicht nur die Induktion der Zielgene, sondern auch deren verminderte Expression am ersten Tag nach Transfektion der spezifischen APC-siRNA in hMSC war sehr deutlich und könnte durch die Rolle von nukleärem APC erklärt werden. Diesbezüglich gibt es nämlich Hinweise darauf, dass APC im Nukleus überschüssiges β -Catenin binden kann, wodurch dessen transkriptionsaktivierende Rolle verhindert wird (Rosin-Arbesfeld et al., 2003). Denkbar wäre zudem, dass es wegen der Fähigkeit von APC, zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma zu pendeln, eine Balance der beiden APC-Formen gibt (Neufeld et al., 2000), die eine unterschiedliche Halbwertszeit aufweisen. Demnach könnten die Effekte, die einen Tag nach Transfektion der APC-siRNA beobachtet wurden, durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der nukleären APC-Form bedingt sein, wodurch die Wnt-Zielgene zunächst reprimiert würden. Im weiteren Zeitverlauf könnte eine Abnahme beider APC-Formen zu der beobachteten Induktion der Zielgenexpression geführt haben.

Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten:

Einhergehend mit der transkriptionellen Induktion der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP waren nach Knockdown von APC auch die Proliferations- und die Invasionsfähigkeit der hMSC induziert. Auch dies entspricht den Effekten, die nach Mutation von APC bei verschiedenen Krebsformen beschrieben sind (Senda et al., 2007).

Überraschenderweise war dieser Phänotyp nach Knockdown von Axin2 nicht zu beobachten, da hier die Proliferation negativ beeinflusst war und die Invasionsfähigkeit gänzlich unberührt blieb. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die kürzlich beschriebene Kooperation von Axin2 mit GSK-3 β sein, die eine Tumorzell-Dedifferenzierung und Gewebe-invasive Aktivität von Tumorzellen ermöglichen. Dies erfolgt in Brustkrebszellen über die Axin2-abhängige Regulation der nukleären GSK-3 β -Aktivität, die wiederum verantwortlich für die Modulation der Snail1-Stabilität ist. Dieser Zinc-Finger Transkriptionsfaktor ist sowohl in normalen als auch neoplastischen Zellen wichtig für den epithelialen-mesenchymalen Übergang und damit für invasive Prozesse (Yook et al., 2006). Da dies - mit Ausnahme der transkriptionellen Axin2-Aktivierung - unabhängig von β -Catenin erfolgt, würde auch die in unserer Arbeit beschriebene Induktion der Expression von Cyclin D1 und MT1-MMP nach Knockdown von Axin2 nicht im Gegensatz zu den verminderten Proliferations- und unveränderten Invasionsraten stehen.

Alle genannten Effekte, die infolge der Wnt-Aktivierung auftraten, deuten auf eine essentielle Rolle des Wnt-Signalweges bei der Steuerung des Invasionsverhaltens von hMSC hin, was bis dato noch nicht in der Fachliteratur beschrieben wurde. Bisher wurde eine Assoziation des Wnt-Weges mit zellulärer Invasion hauptsächlich in Tumorzellen beobachtet. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise die Transmigration von Myelom-Plasmazellen durch endotheliale Zellen und Matrigel nach Inkubation mit Wnt3a-konditioniertem Medium beschrieben (Qiang et al., 2005). Darüber hinaus zeigt die Mehrzahl der humanen kolorektalen Krebszellen eine konstitutive Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Bienz and Clevers, 2000), was mit einer fortwährenden Akkumulation von β -Catenin einhergeht. Zudem ist β -Catenin an der invasiven Front von Kolon-Karzinomzellen fast ausschließlich nukleär lokalisiert, was auf eine vermehrte β -Catenin-abhängige Transkription hinweist (Brabletz et al., 2001). Ein weiteres Beispiel stellt die transendotheliale Migration von Monocyten dar, die durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert wird (Tickenbrock et al., 2006).

F.1.2 Inhibition des Signalweges

β -Catenin-Knockdown-Experimente

Um die Hypothese der Assoziation der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionskaskade mit der Proliferation und darüber hinaus der Invasivität der hMSC zu untermauern, wurde ein reverses Experiment durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Wnt-Signalweg durch Knockdown des intrazellulären Mediators β -Catenin einerseits und des Oberflächen-residierenden Korezeptors LRP5 andererseits inhibiert. Da die Resultate eine deutlich höhere Halbwertszeit dieser Proteine verglichen mit den korrespondierenden mRNAs implizieren, wurden alle Folgeexperimente im Zeitfenster der niedrigsten Proteinexpressionsraten nach RNAi – also zwischen Tag 5 und 7 – durchgeführt.

Der Knockdown von β -Catenin resultierte in einer verminderten Expression der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP, was sowohl mit einer nachhaltigen Reduktion der Zellproliferation als auch mit einer deutlichen Verminderung der Invasionsfähigkeit der hMSC einherging. Ähnliche Beobachtungen wurden in Kolon-Krebszellen gemacht, bei denen der Knockdown von β -Catenin zu einer transkriptionellen Reduktion der Zielgenexpression und einer geringeren Zellteilungsrate *in vitro* und *in vivo* führte (Verma et al., 2003). Die Wnt-abhängige transkriptionelle Regulation des Zellzyklusregulators Cyclin D1 wurde erstmalig in Kolon-Karzinomzellen beschrieben (Tetsu and McCormick, 1999).

Dass die verminderte Expression von Cyclin D1 auch der Grund für die reduzierte Zellteilungsrate der mit β -Catenin-siRNA transfizierten hMSC war, konnte in einem weiteren Versuch gezeigt werden, bei dem nach Knockdown von Cyclin D1 zunächst eine deutlich verringerte Proliferationsfähigkeit der Zellen zu beobachten war. Interessanterweise wurde dieser Effekt durch Wnt3a-stimulierende Bedingungen noch verstärkt, was wiederum die Rolle des Wnt-Signalweges in der hMSC-Biologie bekräftigt.

LRP5-Knockdown-Experimente

Ein ähnliches Bild lieferten die LRP5-Knockdown-Experimente. Dieser Wnt-Korezeptor, dessen Expression im Gegensatz zu LRP6 in hMSC bereits beschrieben wurde (Etheridge et al., 2004), ist an der Weiterleitung der Wnt-Signale involviert (Johnson et al., 2004). Im Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist hierfür zusätzlich ein Mitglied der Frizzled-Rezeptorfamilie (Fzd) notwendig, wobei der jeweilige Rezeptorkomplex über die Art der Signalweiterleitung in der Zelle entscheidet (Liu et al., 2005; Cong et al., 2004). Bislang wurde in der Literatur der Rezeptorkomplex, der in hMSC für die Wnt3a-Signalweiterleitung maßgeblich ist, nicht beschrieben.

Wenn wir auch den für die Weiterleitung des Wnt3a-Signals verantwortlichen Fzd noch nicht identifizieren konnten, so erhielten wir durch unsere Untersuchungen doch zumindest klare Hinweise auf die Beteiligung von LRP5, da der Knockdown dieses Rezeptors ebenso wie derjenige von β -Catenin zu einer verminderten Proliferations- und Invasionsrate der transfizierten hMSC führte. Letzteres ist in ähnlicher Weise in der Literatur für Osteosarkom-Zellen beschrieben, wonach die Inhibition von LRP5 eine verminderte Motilität und Invasionsfähigkeit dieser Zellen bewirkte (Hoang et al., 2004). Diese Daten implizierten zudem eine metastatische Rolle für LRP5 und die Vermutung, LRP5 könnte als Marker für die Progression von Osteosarkomen dienen (Hoang et al., 2004).

Um abschließend zu bestätigen, dass die beobachteten zellulären Effekte nach Knockdown von LRP5 und β -Catenin die Folge einer verminderten Sensitivität für das Wnt3a-Signal darstellen, wurden Knockdown-hMSC mit Wnt3a stimuliert. Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass ohne die Anwesenheit des Korezeptors LRP5, der das Wnt3a-Signal an der Zelloberfläche aufnimmt, ebenso wie ohne den intrazellulären Mediator β -Catenin, der für die Weiterleitung verantwortlich ist, keine Induktion des Wnt-Zielgens Cyclin D1 mehr möglich ist.

Zusammenfassend lassen unsere Daten zweifellos erkennen, dass hMSC, ähnlich wie Tumorzellen, den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg nicht nur zur Kontrolle der Zellteilung, sondern auch zur Koordination ihrer migratorischen/invasiven Eigenschaften nutzen. Die Annahme solcher Eigenschaften für die Regulation der gerichteten Migration durch Gewebe könnte Teil eines Programms während der Stammzell-Aktivierung sein, das hMSC für einen optimalen Beitrag zur Geweberegeneration benötigen (Beachy et al., 2004; Pardal et al., 2003).

F.1.3 Rolle des Wnt-Rezeptors Fzd8

Regulation

Vor dem Hintergrund der transkriptionellen Regulation der Expression von LRP6 und Dkk-1 in hMSC und den Berichten über die Assoziation von LRP6 und Fzd8 bei der Weiterleitung des R-Spondin1-Signals (Nam et al., 2006), wurde die Fzd8-Expression in hMSC näher untersucht. Hierbei fiel eine sehr deutliche Änderung des mRNA-Niveaus von Fzd8 nach β -Catenin-Knockdown sowie nach Wnt3a-Stimulation auf. Interessanterweise war das Fzd8-Expressionsniveau nach Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Wnt3 reduziert, während es nach Inhibition des Wnt-Signalweges durch β -Catenin-Knockdown induziert war.

Klassische Wnt-Zielgene sind durch die Anwesenheit einer oder mehrerer Tcf/Lef-Consensus-Sequenzen in ihren Promotorregionen charakterisiert (Hurlstone and Clevers, 2002). Somit unterliegt ihre Expression der Kontrolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und wird üblicherweise nach dessen Aktivierung aufgrund einer vermehrten β -Catenin-Translokation in den Zellkern induziert. Beispiele aus der Literatur, die auch in der hier vorliegenden Promotionsarbeit für hMSC bestätigt werden konnten, sind Cyclin D1 (Tetsu and McCormick, 1999), sowie Dkk-1 (Niida et al., 2004; Gonzalez-Sancho et al., 2005) und MT1-MMP (Takahashi et al., 2002).

Eine standardisierte experimentelle Vorgehensweise für den Nachweis eines negativ regulierten Wnt-Zielgens gibt es – im Gegensatz zu positiv regulierten Wnt-Zielgenen – bisher nicht, was unter anderem an der geringen Zahl der bekannten negativ regulierten Gene und dem gänzlich unbekanntem Mechanismus einer solchen Regulation liegt. In der Fachliteratur finden sich lediglich Spekulationen über mögliche Mechanismen. So konnte in einem *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Haarfollikel-Morphogenese nach Wnt-Aktivierung und damit β -Catenin-Stabilisierung die transkriptionelle Reduktion der E-Cadherin-Expression beobachtet werden (Jamora et al., 2003). Die Autoren vermuten die Rekrutierung weiterer Cofaktoren wie Snail, die hier die ungewohnte Repressor-Aktivität vermitteln.

Üblicherweise kommt es nach Translokation von β -Catenin zu einer Aktivator-Konversion der als Repressor fungierenden Tcf/Lef Proteine (Brantjes et al., 2002). Ob dies auch im Falle der negativ regulierten Fzd8-Expression nach Wnt3-Stimulation vorliegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Fzd8-Knockdown

Die Tatsache, dass es sich bei Fzd8 um eine Komponente des Wnt-Signalweges handelt, dessen Expression in hMSC negativ durch Wnt3a reguliert wird, macht Fzd8 zu einem außerordentlich interessanten Forschungsobjekt. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Rezeptor nicht nur um ein transkriptionelles Zielgen des Wnt-Signalweges handelt, sondern möglicherweise auch um einen spezifischen Rezeptor für Wnt3a, wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown der mRNA-Expression von Fzd8 in hMSC durchgeführt. Die Analyse dieser Fzd8-Knockdown-Zellen ergab eine deutlich verminderte Zellteilungsrate, während die Invasion weitgehend unbeeinflusst blieb.

Zur Klärung, ob Fzd8 wichtig für die Weiterleitung des Wnt3a-vermittelten Signals ist, welches wiederum in der Reduktion des mRNA-Expressionsniveaus von Fzd8 resultiert, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Aufgrund einer noch weitgehend unveränderten Expression auf Proteinebene am ersten Tag nach Transfektion der Fzd8-siRNA und einer deutlich reduzierten Proteinexpression fünf Tage später wurden Fzd8-Knockdown-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Wnt3a stimuliert. Die Fzd8-Transkriptlevel nicht-stimulierter Zellen zeigten eine Knockdown-Effizienz von 63 %, bei Wnt3a-stimulierten Zellen lag sie bei 70 %. Gesetzt den Fall, dass Fzd8 essentiell für die Weiterleitung des Wnt3a-Signals und damit einhergehend auch für die eigene Down-Regulation ist, hätte diese Reduktion bei deutlich geringerer Fzd8-Expression eine Woche nach Transfektion der Fzd8-siRNA nicht mehr möglich sein sollen. Allerdings konnte die Wnt3a-vermittelte Reduktion der Fzd8-Transkriptlevel unabhängig von Fzd8-Expression auf der Zelloberfläche erfolgen. Die gleiche Tendenz war bei der Bestimmung der MT1-MMP-mRNA-Expression feststellbar, die nach Wnt3a-Stimulation gänzlich unbeeinflusst von der Fzd8-Expression induziert war. Dementsprechend war auch die Induktion der Invasivität der hMSC nach Wnt3a-Stimulation sowohl in den Kontrollzellen (mit nc-siRNA transfiziert) als auch in den Fzd8-Knockdown-Zellen

möglich. Ferner konnte nach Knockdown von Fzd8 kein Einfluss auf die Expression klassischer Wnt-Zielgene wie Cyclin D1 und MT1-MMP beobachtet werden.

Ein weiteres Experiment, das einige der bisherigen Daten bestätigen konnte, war die Kotransfektion der Fzd8-siRNA mit derjenigen gegen LRP5 bzw. LRP6. Die Analyse der Cyclin D1-Expression als Indiz für den Aktivierungsstatus des Wnt-Signalweges ergab, dass die Wnt3a-vermittelte Induktion der mRNA-Expression von Cyclin D1 in Fzd8/LRP5-Knockdown-Zellen im Vergleich zu denjenigen in Kontrollzellen nicht mehr möglich war. Dieser zelluläre Phänotyp wird aber vornehmlich durch das Fehlen von LRP5 verursacht, da nach singulärem Knockdown von LRP5 ein ähnliches Expressionsverhalten von Cyclin D1 beobachtet werden konnte. Ferner bestätigte sich die Induktion der Wnt-Zielgen-Expression nach Knockdown von LRP6, das für diese Effekte im Kotransfektionsexperiment ausschlaggebend schien. Darüber hinaus konnte nach Stimulation mit Wnt3a die Induktion der Wnt-Zielgen-Expression im Fzd8/LRP6-Kotransfektionsansatz noch verstärkt beobachtet werden.

Bis dato gibt es keinerlei Vergleichsmöglichkeiten unserer Daten bezüglich der Funktion von Fzd8 mit Resultaten in der aktuellen Fachliteratur. Allerdings wurden teilweise konträre Funktionen anderer Frizzled-Rezeptoren beschrieben. So erwies sich beispielsweise humanes Fzd1 als möglicher Rezeptor für die Wnt3a-vermittelte Signalweiterleitung (Gazit et al., 1999), während für murines Fzd1 eine antagonistische Rolle im kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg gezeigt werden konnte (Roman-Roman et al., 2004). Ebenso scheint humanes Fzd6 als negativer Regulator zu agieren (Golan et al., 2004). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass durch einen variierenden Rezeptorkomplex mittels ein und demselben Liganden unterschiedliche zelluläre Effekte induziert werden können. So kann z.B. Wnt5a an zwei distinkte Rezeptorkompositionen binden, von denen einer Fzd4 enthält. Nach Bindung von Wnt5a an Fzd4/LRP5 kommt es zur β -Catenin-abhängigen Induktion der Wnt-Zielgen-Expression, während die Bindung von Wnt5a an Ror2, eine *orphan tyrosine kinase*, den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibiert (Mikels and Nusse, 2006). Die Tragweite derartiger Erkenntnisse wird vor allen Dingen vor dem Hintergrund deutlich, dass Wnt5a sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen in verschiedenen Zelltypen fungieren kann. Dadurch wird eine in hohem Maße ausgeprägte Feinjustierung des Wnt-Signalweges erreicht, wodurch die entsprechenden Zellen ihren Phänotyp den jeweiligen Bedingungen anpassen können.

Zusammenfassend implizieren die Erkenntnisse der Regulation der Expression von Fzd8 durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Möglichkeit der endogenen Regulation dieses Signalweges, um möglicherweise eine Überaktivierung infolge der Wnt3a-Bindung einzudämmen. In diesem Kontext ist die Kenntnis, für welchen Liganden Fzd8 als Rezeptor zur Auslösung einer negativen Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges dient, von essentiellem Interesse.

F.1.4 Rolle von LRP6 und Dkk-1

Expression von LRP6

Analysiert man die aktuelle Fachliteratur bezüglich des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in MSC, so fällt auf, dass vor allen Dingen die Prozesse der Ligandenbindung an der Zelloberfläche fast vollständig ungeklärt sind. Auch die synonyme Schreibweise der Rezeptoren LRP5/6 macht die Defizite in der Unterscheidung der Funktion dieser beiden Rezeptoren deutlich, die nur in sehr wenigen Arbeiten explizit komparativ untersucht wurde (Mi and Johnson, 2005). Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen der Promotionsarbeit zusätzlich auch eine Analyse der Expression, Regulation und Funktion des Rezeptors LRP6 in der Weiterleitung des kanonischen Wnt3a-Signals in hMSC.

Unser Resultat der semiquantitativen RT-PCR, mit der ein eindeutiger Nachweis der LRP6-mRNA-Expression möglich war, steht zumindest partiell im Gegensatz zu den bisher publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen, die eine LRP6-Expression in hMSC entweder nicht (Etheridge et al., 2004) oder doch (Gregory et al., 2005) nachweisen konnten. Interessanterweise konnten wir darüber hinaus im Rahmen der Expressionsanalysen in hMSC eine Regulation der LRP6-Transkriptmengen durch Wnt3a beobachten. Dies widerspricht allerdings den kürzlich publizierten Daten bezüglich einer negativen Regulation der mRNA-Expression von LRP6 durch Wnt3a in einer murinen embryonalen Fibroblastenzelllinie (Khan et al., 2007). Ob diesem Unterschied eine Spezies-Spezifität oder vielmehr die Tatsache zugrunde liegt, dass es sich bei den embryonalen Fibroblasten um eine immortalisierte Zelllinie handelt, ist nicht geklärt. Die in dieser Arbeit beschriebene negative Regulation würde für einen Wnt3a-induzierten negativen *feedback*-Mechanismus des eigenen Rezeptors stehen. Im Gegensatz dazu sprechen unsere Daten der positiven Regulation der LRP6-Expression nach Wnt3a-Stimulation für einen anderen negativen *feedback*-Mechanismus, auf den noch näher eingegangen wird (siehe Abb. F-1).

Schon vor längerer Zeit wurde über die Homo-Dimerisierung von LRP6 nach Überexpression in HEK293-Zellen berichtet. Diese Homo-Dimerisierung hatte eine Inaktivierung des Rezeptors zur Folge, was die Vermutung nahe legte, dass die Wnt-Bindung eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne induziert. Aufgrund des Wegfalls einer allosterischen Inhibition der intrazellulären Regionen erfolgte eine Separation der Domänen und damit die Bildung einer aktiven Form (Liu et al., 2003), die mit der Induktion des β -Catenin/Tcf-Signaling einherging. Diese Erkenntnisse konnten nun kürzlich auf die endogene LRP6-Expression einer murinen embryonalen Fibroblastenzelllinie (NIH3T3) ausgeweitet werden, in denen LRP6 ebenfalls in einer offensichtlich inaktiven dimeren Form auf der Zelloberfläche vorkommt (Khan et al., 2007). Ob LRP6 homo- oder heterodimere Komplexe beispielsweise mit LRP5 oder auch Oligomere höherer Ordnung bilden kann, ist bisher ungeklärt. Die Arbeitsgruppe um Anna Bafico (Khan et al., 2007) konnte zeigen, dass die Wnt3a-Stimulation zu einer Liganden-induzierten Clathrin- und Caveolin-vermittelten Internalisierung von LRP6 führt. Diese resultiert intrazellulär in einer Phosphorylierung des Rezeptors und der Assoziation mit Axin, die abhängig von der Dauer der Stimulation ist. Demnach wird LRP6 nach Ausbleiben der Stimulation „recycled“ und gelangt wieder zur Membran, worauf der Rezeptor einer nächsten Runde der Internalisierung unterzogen werden kann.

LRP6-Knockdown

Um die Rolle des LRP6-Rezeptors in hMSC detaillierter zu untersuchen, wurde wiederum ein RNAi-basierter Ansatz angewandt. Entsprechend den phänotypischen Effekten – wie gesteigerte Proliferation und Invasionsfähigkeit infolge des LRP6-Knockdowns in hMSC – konnte eine Induktion der Wnt-Zielgen-Expression beobachtet werden.

Dies entspricht den Beschreibungen von Zellkulturstudien, die ergaben, dass die Modifikation der extrazellulären Region von LRP6 mit verbleibender Membranverankerung zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Weges führt (Liu et al., 2003). Während allerdings in der Arbeit von Liu et al. mit Hilfe des TOP-Reporter Assays nur indirekt die Beteiligung von β -Catenin gezeigt werden konnte, erfolgte dies im Rahmen unserer Arbeit über den direkten Nachweis des Protein-niveaus von β -Catenin nach Knockdown von LRP6. Die gleichzeitige Beteiligung von β -Catenin an der Induktion der Wnt-Zielgene konnte darüber hinaus mit Hilfe eines Kotransfektionsexperimentes klar demonstriert werden. Während der Knockdown von LRP6 alleine die Erhöhung der Wnt-Zielgen Transkriptmengen bewirkte, war dies nach Kotransfektion der β -Catenin- und LRP6-siRNA – und damit des gleichzeitigen Knockdowns beider Gene – ebenso wie nach singulärem Knockdown von β -Catenin nicht mehr möglich.

Im Bestreben, die Rezeptorkomposition für die Wnt3a-Ligandenbindung näher zu charakterisieren, wurden Experimente durchgeführt, die eine diesbezügliche Aussage ermöglichen sollten. Zwar war der Nachweis der direkten Bindung von Wnt3a und LRP6 nicht Gegenstand der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente, dennoch konnten bereits Hinweise auf eine untergeordnete Rolle von LRP6 als Wnt3a-Rezeptor in der hMSC-Biologie erhalten werden. Das für diesen Zweck konzipierte Experiment basierte auf der Wnt3a-abhängigen transkriptionellen Induktion des Wnt-Zielgens Cyclin D1. Während die Anhebung der Transkriptlevel nach Stimulation mit Wnt3a in LRP6-Knockdown-Zellen ebenso wie in den Kontrollzellen möglich war, konnte dies in LRP5-Knockdown-Zellen nicht mehr beobachtet werden, was eine unterschiedliche Rolle beider LRPs vermuten lässt. Über die Wichtigkeit von LRP5 für die Wnt3a-vermittelte Signalweiterleitung wurde auch in anderen Arbeiten berichtet (Kato et al., 2002). In meiner Arbeit lieferte die Abwesenheit beider Rezeptoren durch Kotransfektion der LRP5- und LRP6-siRNA ein ähnliches Bild wie der singuläre Knockdown von LRP5, was wiederum die Wichtigkeit von LRP5 für die Weiterleitung des Wnt3a-vermittelten Signals verdeutlicht.

Gewiss muss der Knockdown von LRP6 auch auf Proteinebene noch sichergestellt werden, um die Aussage zu untermauern, dass LRP6 nur eine untergeordnete Rolle in der Weiterleitung des Wnt3a-Signals spielt. Ferner stehen eine Analyse des LRP6-Promotors hinsichtlich möglicher Tcf/Lef-Bindungsstellen und gegebenenfalls Promotorstudien noch aus, die eventuell die transkriptionelle Induktion von LRP6 nach Wnt3a-Stimulation in hMSC erklären könnten.

Zusammenfassend betrachtet implizieren die erzielten Ergebnisse eine inhibitorische Funktion für LRP6 im basalen Wnt-Aktivierungszustand der unstimulierten hMSC. Allerdings sollte Wnt3a unter solch basalen Kultivierungskonditionen keine Rolle für den Aktivierungszustand des Wnt-Signalweges spielen, da es von hMSC selbst nicht exprimiert wird (Etheridge et al., 2004). Vielmehr scheint es in der natürlichen Nische der hMSC in der Stromamatrix des Knochenmarks exprimiert zu sein, was *in vivo* durchaus auf eine Rolle in der Wnt3a-vermittelten Regulation der hMSC-Population hindeutet (Baksh and Tuan, 2007). Aus diesem Grund wurde die Expression anderer intrinsisch exprimierter Wnt-Liganden wie z.B Dkk-1 in hMSC untersucht.

Expression von Dkk-1

Grundsätzlich werden in Vertebraten vier Hauptmitglieder der Dkk-Familie unterschieden, von denen Dkk-1 als erstes beschrieben wurde und als direktes transkriptionelles Wnt-Zielgen eine Sonderstellung einnimmt (Niida et al., 2004; Gonzalez-Sancho et al., 2005). Diese Beobachtung, die zunächst in Kolon-Karzinomzellen gemacht wurde und einen negativen *feedback*-Mechanismus des Wnt-Signalweges darstellt, konnten wir auch in hMSC bestätigen. So waren die Dkk-1-Transkriptlevel nach Wnt3a-Stimulation von hMSC induziert, während die Expression nach Knockdown von β -Catenin deutlich vermindert war. Auch in diesem Falle bestätigte sich die Induktion der Wnt-Zielgene nach Knockdown von LRP6, da auch das Dkk-1-Expressionsniveau klar erhöht war.

Der Mechanismus der Inhibition des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Dkk-1 wurde zeitgleich von zwei Gruppen beschrieben und machte deutlich, dass Dkk-1 weder an Wnt bindet noch die Wnt-Fzd Interaktion beeinflusst (Semenov et al., 2001; Bafico et al., 2001). Vielmehr zeigten *cross-linking*-Experimente, dass Dkk-1 in einem binären 1:1-Komplex mit LRP6 assoziiert und damit die Fähigkeit des LRP6-Rezeptors einschränkt, mit Wnt/Fzd zu interagieren. Diese Arbeiten schließen einen Mechanismus aus, durch den Dkk-1 durch Bindung an LRP6 ein inhibitorisches Signal ins Zellinnere weiterleitet. Vielmehr scheint Dkk-1 nach LRP6-Bindung eher sterisch die funktionelle Interaktion zwischen Wnt und seinem Rezeptor-Komplex zu stören (Bafico et al., 2001).

Auch aus der Literatur ist bekannt, dass Dkk-1 (Bafico et al., 2001; Semenov et al., 2001) und Dkk-2 (Li et al., 2002) Liganden von LRP6 darstellen. Darüber hinaus wurde erst kürzlich *mouse* Crispin/R-spondin (*roof plate-specific* spondin) als weiterer Ligand für LRP6 beschrieben (Nam et al., 2006). Dieser stammt aus einer Familie sezernierter konservierter Proteine (Kamata et al., 2004; Kazanskaya et al., 2004), von denen es vier unterschiedliche Mitglieder im humanen System gibt (Kim et al., 2006), wobei humanes R-Spondin1 als Aktivator des Wnt-Signalweges gilt (Wei et al., 2007). Das aktivierende Potential scheint dabei über eine Inhibition der durch Dkk-1 vermittelten Internalisierung von LRP6 mediiert zu werden (Binnerts et al., 2007). Darüber hinaus kommt es durch R-Spondin1 zu einer Phosphorylierung von LRP6. Dies ist besonders interessant, da die Phosphorylierung von LRP6, die in der Stabilisierung von β -Catenin und damit der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges resultiert, einerseits durch Wnt3a verstärkt und andererseits durch simultane Stimulation mit Dkk-1 antagonisiert werden kann (Wei et al., 2007). Diese Erkenntnisse gepaart mit dem in weiten Teilen mit Wnt-Proteinen überlappenden Expressionsmuster auch während der Embryogenese sprechen für einen positiven *feedback*-Mechanismus der R-Spondine, der den Wnt-Signalweg verstärken kann. Die Expression der R-Spondine in hMSC wurde bisher nicht untersucht, wäre allerdings von außerordentlich hohem Interesse, vor allen Dingen, weil Dkk-1 als Antagonist der R-Spondine intrinsisch in hMSC exprimiert wird (Gregory et al., 2003), was mit den in unserer Arbeit erhobenen Daten übereinstimmt. Eigene Vorarbeiten (hier nicht dargestellt) zeigten inzwischen, dass hMSC auch R-Spondin1 auf mRNA-Ebene exprimieren, womit eine wichtige Voraussetzung für dessen Funktion in hMSC gegeben ist.

Inhibitorische Wirkung von Dkk-1

Neben der Regulation der Dkk-1-Transkriptlevel durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg konnten wir auch den inhibitorischen Effekt von exogen zugegebenem Dkk-1 in hMSC zeigen, der in einer Reduktion der transkriptionellen Expressionslevel von MT1-MMP einen Tag nach Stimulation resultierte. Damit einhergehend war eine dosisabhängige Abnahme der Proliferation sowie der Invasivität nach Stimulation mit Dkk-1 feststellbar. Darüber hinaus konnte durch Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen Dkk-1 die Rolle von endogen exprimiertem Dkk-1 beleuchtet werden. Demnach zeigten derartig behandelte Zellen eine Induktion der Wnt-Zielgen-Expression, was wiederum bestätigt, dass hMSC in ihrem basalen Aktivierungszustand unter Zellkulturbedingungen Dkk-1 exprimieren.

Schlussfolgerung

Aufgrund der erzielten Daten bezüglich LRP6 und Dkk-1 lässt sich folgende Hypothese hinsichtlich der Funktion dieser Faktoren im Wnt/ β -Catenin-Signalweg ableiten (Abb. F-1). In MSC existiert eine in hohem Maße regulierte Balance zwischen aktivierenden Signalen (wie den kanonischen Wnt-Liganden oder z.B. auch den R-Spondinen) und inhibierenden Faktoren wie Dkk-1. Da Dkk-1 als Rezeptor für LRP6 zur Verfügung steht und damit die Bindung aktivierender Wnt-Liganden blockiert (Bafico et al., 2001), führt die Abwesenheit von LRP6 zu einer geringeren Inhibition des Wnt-Weges. Dies wiederum kann in einer gesteigerten Bindung von Wnt-Liganden resultieren, wobei der Wnt-Weg durch Akkumulation und Translokation von β -Catenin in den Zellkern aktiviert und somit die Induktion der Wnt-Zielgen-Expression möglich wird.

Über die Frage, welche Liganden den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren und von hMSC selbst exprimiert werden, wurde bereits spekuliert. Hier bieten sich neben Wnt3a weitere Wnt-Proteine ebenso wie die neuerdings beschriebenen nicht mit Wnt verwandten Mediatoren R-Spondin1 und auch Norrin an. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Norrin als Ligand für den Fzd4/LRP6-Rezeptorkomplex fungiert (Xu et al., 2004), was einen hoch spezifischen Prozess darstellt (Smallwood et al., 2007).

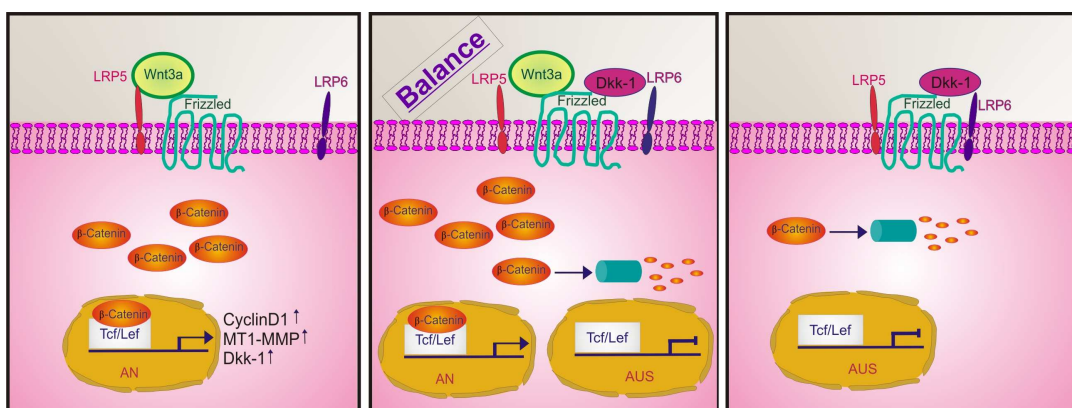


Abb. F-1: Hypothese zur Erklärung der transkriptionellen Wnt-Zielgen-Induktion nach Knockdown von LRP6.

Im Basalzustand von hMSC liegt eine Balance (Mitte) vor zwischen der Situation, bei der die Wnt-Bindung zur Aktivierung des Wnt-Signalweges führt (links) und dem Zustand, in dem der Wnt-Weg durch Dkk-1-Bindung inhibiert wird (rechts). Deswegen bewirkt der Knockdown von LRP6 eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des aktivierten Status.

F.2 Wnt/ β -Catenin-Signalweg in mMSC

Hintergrund

Obwohl die bisher beschriebenen *in vitro*-Daten von hMSC lediglich Hinweise auf die Wichtigkeit des Wnt/ β -Catenin-Signalweges unter physiologischen Bedingungen liefern können, stellen sie trotzdem die Grundlage für weiterführende Experimente dar. Gemeint ist die Etablierung eines verlässlichen *in vivo*-Modells, das die Untersuchung der Rolle des kanonischen, durch Wnt3a vermittelten Signalweges im natürlichen Zellverband ermöglicht. Beispiele hierfür sind artifizielle transgene Tiermodelle, die eine Visualisierung der Wnt-Aktivität über das Einbringen eines transkriptionell Tcf/Lef-abhängigen Reporters wie β -Galaktosidase oder GFP (*green fluorescent protein*), ermöglichen (Maretto et al., 2003; Moriyama et al., 2007). Hierbei handelt es sich vor allen Dingen um Mausmodelle. Allerdings wurden die Komponenten des Wnt-Signalweges in mMSC im Speziellen bisher nicht erforscht, was aber eine zwingende Voraussetzung für die Konzeption von geeigneten *in vivo*-Modellen darstellt, die auch eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation erlauben.

mMSC besitzen ebenso wie die Pendanten im humanen System die Fähigkeit, in Knochen, Knorpel, Fett und Muskel zu differenzieren (Pereira et al., 1995). Darüber hinaus ergaben weiterführende Experimente, dass mMSC in neuronale Vorläuferzellen (Woodbury et al., 2000) und *in vitro* wie *in vivo* in Lungen- und Nierenepithel (Anjos-Afonso et al., 2004) differenzieren können. Dies macht sie zu viel versprechenden Kandidaten für die Überprüfung des therapeutischen Potentials von mesenchymalen Stammzellen in klinikrelevanten *in vivo*-Mausmodellen.

Die meisten therapeutischen Ansätze beinhalten eine Gewinnung der Zellen aus dem jeweiligen Individuum, eine selektive Anreicherung und gegebenenfalls genetische Modifikation *ex vivo* sowie die finale Reimplantation *in vivo*. Allerdings konnte während dieser Prozesse speziell bei mMSC das Auftreten von Chromosomenanomalien und damit eine gehäuft einhergehende maligne Transformation beobachtet werden. Bei systemischer Infusion von mMSC wurde ein Einwandern ins Lungenparenchym beobachtet, was schließlich zu einer Osteosarkom-Bildung führte (Aguilar et al., 2007; Tolar et al., 2007). Ähnliche Vorgänge konnten bei hMSC wohl aufgrund ihrer noch sehr beschränkten klinischen Anwendung bislang nicht beobachtet werden.

Hinsichtlich der Überprüfung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und seines möglichen Einflusses auf eine verbesserte Geweberegeneration, der aufgrund seiner Beteiligung an den migratorischen/invasiven Eigenschaften von hMSC impliziert ist, ist die Etablierung eines geeigneten Mausmodells von großem Interesse. Als wesentliche Voraussetzung dafür sollten deshalb in diesem Promotionsprojekt bereits die basalen Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in mMSC untersucht werden, um später das mögliche Auftreten abweichender *in vivo*-Effekte im Vergleich zu Daten aus hMSC-Zellexperimenten erklären zu können

F.2.1 Aktivierung des Signalweges

TOP-Reportersystem-basierte Analyse der β -Catenin-abhängigen Transkription

Die Experimente mit mMSC wurden ebenso konzipiert wie diejenigen mit humanen MSC. Zunächst erfolgte die Stimulation der Zellen mit Wnt3a und LiCl, was zur Akkumulation wie auch zur Translokation von β -Catenin in den Zellkern führte und entsprechend durch Western Blot- bzw. RT-PCR-Analysen gezeigt werden konnte.

Zusätzlich zu den in hMSC gewählten Nachweismethoden wurde aber im Falle der mMSC auch das TOP-Reporter-System verwendet, das die Visualisierung einer β -Catenin-abhängigen Expression eines Reportergens (wie z.B. Luciferase) möglich macht und zukünftig auch im *in vivo*-Mausmodell eingesetzt werden könnte. Dieses 1997 erstmalig beschriebene System (Korinek et al., 1997), das aufgrund der Tcf/Lef-Bindungsstellen im Promoter des Reportergens einen Indikator für dessen β -Catenin-abhängige Expression darstellt, konnte in hMSC nicht erfolgreich angewandt werden. Der Grund hierfür lag in der sehr geringen basalen Zellteilungsrate kombiniert mit der fortschreitenden Seneszenz der hMSC während der Kultivierung. Diese beiden Aspekte fallen bei den mMSC weniger stark ins Gewicht, da sie eine deutlich stärkere Proliferationsrate aufweisen (Meirelles and Nardi, 2003), was eine stabile Transfektion des Reporterplasmids möglich machte.

Einfluss auf die Regulation von Wnt-Zielgenen

Der im Rahmen dieser Arbeit generierte Vektor nutzt die Vorteile einer sezernierten Form der Luciferase aus dem Tiefsee-Cephalopoden *Gaussia princeps* (Tannous et al., 2005) zum Nachweis ihrer β -Catenin-abhängigen Expression. So konnte die durch Wnt3a- bzw. LiCl-Stimulation gesteigerte Translokation von β -Catenin in den Zellkern durch die Induktion und extrazelluläre Freisetzung der *Gaussia*-Luciferase-Aktivität bestätigt werden. Umso mehr erstaunten die Ergebnisse der Analyse der Expression endogener Wnt-Zielgene, da im Gegensatz zu hMSC lediglich die Expression von Cyclin D1 und nicht diejenige von MT1-MMP induziert war. Dies deutet darauf hin, dass die mRNA-Expression von MT1-MMP in mMSC - anders als in hMSC - nicht unter der Kontrolle des Wnt-Signalweges steht.

Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich für die murine prämyoblastische Vorläuferzelllinie C2C12 beschrieben, bei der die Stimulation mit Wnt3a nicht in der transkriptionellen Induktion der MT1-MMP-Expression resultierte (Nakashima and Tamura, 2006). Ein Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen Struktur des humanen und murinen MT1-MMP-Promotors liegen.

Betrachtet man nämlich den Promotor in beiden Spezies indem man ein 2600 bp langes Fragment oberhalb des Startcodons vergleicht, so findet man im humanen Promotor neben den bereits publizierten Tcf/Lef-Bindungsstellen an den Positionen -1404 bis -1411 sowie -900 bis -907 (Takahashi et al., 2002) noch eine weitere an Position -2567 bis -2574. Interessanterweise scheint nur die Consensus-Sequenz an Position -900 bis -907 im murinen Promotor des MT1-MMP Gens konserviert zu sein. Dies könnte ein Grund für die ausbleibende Induktion der mRNA-Expression von MT1-MMP sowohl nach Wnt3a- als auch nach LiCl-Stimulation in den von uns beschriebenen Studien gewesen sein.

Einfluss auf das Proliferationsverhalten

Analog zu den Studien in hMSC wurden die Folgen der Stimulation und damit Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf die Zellteilungsrate der mMSC untersucht. Hier konnte im Falle von Wnt3a eine deutlich dosisabhängige Induktion der Proliferationsrate über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet werden, die im Einklang mit der transkriptionellen Induktion der Cyclin D1-Expression steht (Massague, 2004). Dies entsprach den Effekten der Stimulation in hMSC, allerdings konnte die Erhöhung der Proliferation zu einem früheren Zeitpunkt, und ebenso wie die Induktion der Wnt-Zielgen-Expression, bei niedrigeren Konzentrationen beobachtet werden. Da das von uns verwendete rekombinante Wnt3a murinen Ursprungs war, ist besonders hervorzuheben, dass vergleichbare Effekte bei mMSC mit jeweils etwa der Hälfte der eingesetzten Konzentration beobachtet werden konnten (75 ng/ml in mMSC versus 150 ng/ml Wnt3a in hMSC).

Einen weiteren Gegensatz zu hMSC ergab die Behandlung mit LiCl, dessen Fähigkeit, den Wnt-Signalweg zu aktivieren (Klein and Melton, 1996), durch Anstieg der Cyclin D1-Expression (10 mM LiCl) ebenso wie durch β -Catenin-abhängige Gaussia-Luciferase-Expression (4 mM und 10 mM) gezeigt werden konnte, wenngleich diese Effekte auch weniger deutlich ausgeprägt waren als bei der Stimulation mit Wnt3a. Die niedrigere Stimulationskraft von LiCl ist auch aus der Literatur bekannt (Sievers et al., 2006). Allerdings war mit LiCl kein positiver Einfluss auf das Wachstumsverhalten der mMSC feststellbar. Lediglich der auch in hMSC beobachtete negative, vermutlich apoptotische Effekt konnte mit 40 mM LiCl festgestellt werden. Dieser mag an der nicht eindeutig festgelegten Substratspezifität von LiCl liegen, das neben GSK-3 β auch andere Proteine beeinflusst (Price and Heninger, 1994). So spielt LiCl z.B. im Glykocogen-Metabolismus eine Rolle und hat eine inhibitorische Funktion auf die Inositol-Monophosphatase, die für die Generierung des *second messengers* IP₃ (Inositoltriphosphat) benötigt wird (Hallcher and Sherman, 1980). Während GSK-3 β schon bei geringen Konzentrationen auf die LiCl-Behandlung reagiert, scheinen höhere Konzentrationen andere Substrate zu betreffen, was mit negativen Effekten auf die Zellen einhergehen kann.

Einfluss auf das Invasionsverhalten

Da die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC mit einer gesteigerten Invasionsfähigkeit einherging, wurde auch das invasive Verhalten der mMSC infolge der Wnt-Aktivierung untersucht. Überraschender Weise resultierte aber weder die Stimulation mit Wnt3a noch die mit LiCl in einer erhöhten Invasionsrate durch Matrigel. Vielmehr konnte im Falle der Wnt3a-Stimulation eine geringe und im Falle der LiCl-Behandlung eine deutliche Verminderung der Invasion beobachtet werden. Die drastische Reduktion der Invasivität von LiCl-behandelten Zellen trat bei Konzentrationen von 4 mM und 10 mM auf und kann somit nicht auf möglicherweise apoptotische Effekte zurückgeführt werden, die bei den Proliferationsuntersuchungen erst bei 40 mM zu beobachten waren.

Die niedrigere Invasivität von mMSC könnte zumindest teilweise durch die Beobachtung erklärt werden, dass die MT1-MMP-mRNA-Expression in Mauszellen nicht unter der Kontrolle des Wnt/ β -Catenin-Weges steht (Nakashima and Tamura, 2006). Darüber hinaus weisen die eigenen Daten in mMSC, wie bereits erwähnt, auf eine repressive Funktion des Wnt/ β -Catenin-Signalweges hinsichtlich der MT1-MMP-Expression hin.

Um zu untermauern, dass es bei den im Invasionsassay eingesetzten Zellen trotz fehlender Effekte der Wnt-Aktivierung auf die Invasivität dennoch zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges und damit zu einer Translokation von β -Catenin gekommen war, wurden zusätzlich Reporter-mMSC eingesetzt. Während die dreitägige Vorstimulation mit Wnt3a in einer deutlich dosisabhängigen Induktion der Gaussia-Reporter-Aktivität resultierte, konnte in den gleichen Zellen wiederum keine Induktion der Invasionsfähigkeit beobachtet werden.

Zusammenfassend lassen diese Daten den Schluss zu, dass die Cyclin D1-mRNA-Expression in mMSC genauso wie in den humanen Pendanten über den Wnt/ β -Catenin-Weg reguliert wird, wohingegen die MT1-MMP-Expression offenbar nicht über diesen Mechanismus gesteuert wird. Dem zu Folge scheint die Rolle des Wnt-Signalweges auf die Steuerung des Proliferationsverhaltens der mMSC beschränkt zu sein. Allerdings steht eine detaillierte Analyse anderer an der Invasion beteiligter Proteasen wie MMP-2 und MMP-9 ebenso wie die Untersuchung der Rolle der natürlichen Inhibitoren dieser Proteasen, der TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), vor allen Dingen im Vergleich zu hMSC noch aus (Ries et al., 2007; De Becker et al., 2007).

F.2.2 Inhibition des Signalweges

Vergleichbar mit den Experimenten in hMSC wurde auch in mMSC ein dualer Ansatz verwendet, um die Rolle des Wnt-Signalweges in dieser Stammzellpopulation zu untersuchen. Hierbei erfolgte der siRNA-vermittelte Knockdown von β -Catenin mit geringerer Effizienz als bei hMSC, während der von LRP5 ähnlich stark ausgeprägt war.

Allerdings konnte der in hMSC lang andauernde Knockdown-Effekt von mehr als sieben Tagen in mMSC nicht reproduziert werden, was an der deutlich höheren Proliferationsrate der mMSC liegen könnte. Dass die bei einer höheren Proliferation auftretende Verdünnung der siRNAs und die damit kürzer währende Knockdown-Dauer an der Zellteilungsrate und nicht an der Zell-internen Halbwertszeit der siRNAs liegt, zeigte eine Studie, die eine klare Abhängigkeit der siRNA-Effekte von der Proliferationsrate der transfizierten Zellen beschrieb (Bartlett and Davis, 2006).

Auch in den Inhibitionsstudien galt die Visualisierung der subzellulären Verteilung von β -Catenin als Indiz für den Aktivierungsstatus des Wnt-Signalweges. Hierbei konnte sowohl nach Knockdown von β -Catenin als auch von LRP5 eine verminderte Gaussia-Luciferase-Aktivität beobachtet werden, wodurch die Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Weges nachgewiesen worden war. Nichtsdestotrotz war nur eine Reduktion des Cyclin D1-mRNA-Expressionsniveaus erkennbar, während die Transkriptmengen von MT1-MMP nach Knockdown von β -Catenin und LRP5 unverändert blieben.

In ähnlicher Weise war auch lediglich die Proliferation und nicht die Invasivität der siRNA-transfizierten mMSC beeinflusst. Während der LRP5-Knockdown zu einer verminderten Zellteilungsrate der transfizierten Zellen führte, war dieser Effekt nach Knockdown von β -Catenin weniger stark ausgeprägt. Dies könnte in der geringeren Knockdown-Effizienz der eingesetzten β -Catenin-siRNA im Vergleich zu derjenigen für LRP5 begründet sein.

Ebenfalls analog zu den hMSC-Daten konnte auch in mMSC ein direkter Zusammenhang zwischen der Cyclin D1-Expression und der Proliferationsfähigkeit der Zellen gezeigt werden, da der Knockdown von Cyclin D1 in einer verminderten Proliferationsrate resultierte. Ausserdem konnte die Wnt3a-vermittelte Induktion der Zellteilungsrate in Cyclin D1-Knockdown-Zellen nicht mehr erreicht werden. Ob Cyclin D1 auch für die Invasion der mMSC relevant ist, wie es für andere Zelltypen beschrieben wurde (Li et al., 2006), ist im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht worden.

F.2.3 Überexpression von Wnt3a in mMSC

Sowohl in hMSC als auch in mMSC konnte gezeigt werden, dass Wnt3a den kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg aktivieren kann. Dennoch wird dieser Wnt-Ligand von hMSC nicht endogen exprimiert. Ob dagegen mMSC Wnt3a bilden können, ist bisher nicht untersucht worden.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Expression und vor allen Dingen die Sekretion des aktiven Wnt3a-Proteins ein komplexer Prozess ist, wollten wir testen, ob murine mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, Wnt3a infolge einer Überexpression zu sezernieren. Nach Synthese im ER wird Wnt3a glykosyliert und durch das ER-Protein *porcupine* palmytoiliert (Kadowaki et al., 1996), woraufhin es aus dem Golgi-Apparat austretend vermutlich in Vesikeln an die Zelloberfläche gebracht wird. Der Prozess der Sezernierung konnte erst kürzlich mit der Entdeckung des *wntless* (WLS) Proteins aufgeklärt werden, das unabhängig von der Lipidmodifikation essentiell für die Sekretion Wnt-exprimierender Zellen nötig ist (Banziger et al., 2006; Bartscherer et al., 2006).

Ob mMSC das Protein WLS exprimieren wurde bisher nicht beschrieben, allerdings deuten unsere Daten darauf hin, dass zumindest mMSC in der Lage sind, ektopisches Wnt3a zu exprimieren und in aktiver Form zu sezernieren. Dies konnte mittels eines Expressionsplasmids (pN3-Wnt3a) gezeigt werden, das im Labor generiert wurde und die kodierende Sequenz für humanes Wnt3a trägt. So ergab die transiente Transfektion des Plasmids pN3-Wnt3a in Tcf/Lef-Reporterzellen eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit einem Leervektor behandelt wurden (pN3-Mock). Darüber hinaus deuten die erhöhten β -Catenin-Proteinmengen darauf hin, dass diese Induktion aufgrund der Sekretion und der anschließenden autokrinen Bindung an die Zellen erfolgte. Hiermit konnte zumindest für mMSC nicht nur die Fähigkeit nachgewiesen werden, das Wnt3a-Signal zu empfangen, es wurden vielmehr auch Hinweise auf die Möglichkeit, aktives Wnt3a zu sezernieren, erhalten.

F.3 Komparative Analyse der Expression von Frizzled-Rezeptoren in hMSC und mMSC

Frizzled-Rezeptoren sind aufgrund ihrer Struktur in die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) einzuteilen, die mit etwa 50 % den Großteil der Zielstrukturen von Medikamenten einnehmen (Takahashi-Yanaga and Sasaguri, 2007). Dies hebt im besonderen Maße ihre Wichtigkeit hervor und stellt, gepaart mit der Rolle des Wnt-Signalweges bei vielen entwicklungsbiologischen, neoplastischen und regenerativen Prozessen (Fodde and Brabletz, 2007; Aguilera et al., 2007), ein außerordentlich interessantes und klinikrelevantes Forschungsfeld dar.

Um die Frage nach dem bzw. den beteiligten Fzds an der Weiterleitung des Wnt3a-Signals in hMSC und mMSC zu beantworten, war zunächst eine genaue Kenntnis der Expression der 10 verschiedenen Fzds von großer Bedeutung, was ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit darstellte. Dabei konnte in hMSC die basale Expression aller Fzds gezeigt werden, allerdings in unterschiedlich hohen Expressionsraten, was vor allem im Fall der sehr niedrigen Expression von Fzd9 und Fzd10 deutlich wurde. Dies steht jedoch nur partiell im Einklang mit den bisher publizierten Daten. Denn zwei andere Arbeitsgruppen, die ebenfalls das Fzd-Expressionsprofil in hMSC untersuchten, kamen zu der Erkenntnis, dass Fzd9 (Boland et al., 2004) bzw. Fzd1, Fzd7, Fzd8 und Fzd10 (Etheridge et al., 2004) nicht exprimiert werden.

Ebenso wie in hMSC haben wir auch das Fzd-Expressionsprofil in mMSC untersucht, wozu es keinerlei Vergleichsdaten in der Literatur gibt. Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte hierbei die Expression aller Rezeptoren nachgewiesen werden, wenn auch - entsprechend den hMSC-Daten - mit deutlich unterschiedlichen Expressionsleveln. Die Expression von Fzd10 stellte sich dabei im Vergleich zu den restlichen Rezeptoren, ähnlich zu den Untersuchungen in hMSC, auffällig niedrig dar.

Insbesondere vor dem Hintergrund, dass Fzds als GPCRs putative Zielstrukturen für eine Medikamentenentwicklung darstellen und der Tatsache, dass in unseren Experimenten in hMSC vor allen Dingen Fzd8 besonders auffiel, scheint auch hier zukünftig ein Vergleich zur Situation in mMSC von ausserordentlich hohem Interesse. Um dann nämlich die Rolle von Fzd8 unter physiologischen Bedingungen für die MSC-Funktion genauer untersuchen zu können, würde sich ebenfalls ein *in vivo*-Mausmodell anbieten, mittels dessen die Hypothese evaluiert werden könnte, dass Fzd8 negativ reguliert wird, um das Wnt3a-vermittelte Signal einzudämmen.

F.4 Resümee des Wnt-Signalweges in MSC

Wie in Abb. F-2 zusammenfassend dargestellt ist, wurden sowohl in hMSC als auch in mMSC diverse Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf verschiedenen Ebenen untersucht.

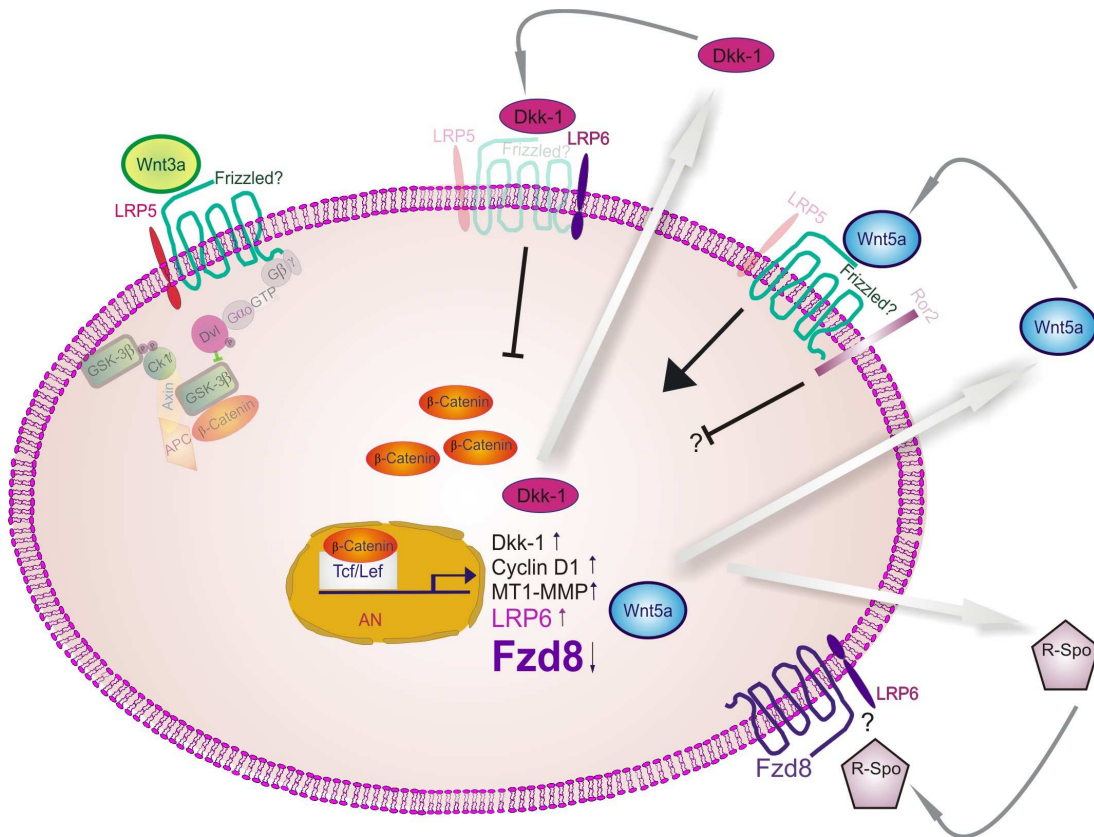


Abb. F-2: Schematischer Überblick über die Kenntnisse des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in MSC.

(Detaillierte Erklärung im Text)

Die Stimulation mit Wnt3a bzw. LiCl konnte erfolgreich eingesetzt werden, um den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu aktivieren, was über die Analyse der Expression der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP erfolgte. Zudem resultierte die Aktivierung in einer gesteigerten Zellteilungsrate ebenso wie in einer Erhöhung der Invasivität der MSC, wobei die invasionsregulierende Funktion des Wnt-Signalweges erstmalig für hMSC gezeigt werden konnte. Konträre Daten wurden bei der Analyse der gleichen Prozesse in murinen MSC erhalten, da die Stimulation dieser Zellpopulation mit Wnt3a in einer verminderten Expression von MT1-MMP resultierte, was auch mit einer reduzierten Invasivität einherging.

Eine zusätzliche Bestätigung der Beobachtungen in hMSC wurde in den Knockdown-Experimenten von β -Catenin und LRP5 bei hMSC erhalten, die darüber hinaus deutlich machten, dass es einen basalen Wnt-Aktivierungszustand in diesen Zellen gibt. Die Prozesse, die nach Wnt3a-Bindung an seinen putativ heterodimeren Rezeptor aus LRP5 bzw. LRP6 und Fzd im Zellinneren ablaufen und möglicherweise G-Proteine beinhalten, sind in hMSC gänzlich unerforscht und machen sie zu einem wichtigen zukünftigen Forschungsobjekt, insbesondere aufgrund der Tatsache, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine wesentliche Zielstruktur für die Wirkung von zahlreichen Medikamenten darstellen.

Ebenso waren Experimente von außerordentlich hoher Priorität, die den Rezeptorkomplex für die Wnt3a-vermittelte Signalweiterleitung beinhalten. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen auf eine essentielle Rolle von LRP5 hin, während LRP6 – entgegen den Erkenntnissen aus anderen Zellsystemen (Khan et al., 2007) – nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Dennoch kann der Nachweis einer Regulation der mRNA-Expression von LRP6 in hMSC durch Wnt3a-Stimulation von hMSC als sehr interessante Beobachtung gewertet werden. Dies ist besonders hinsichtlich der Funktion von LRP6 als Rezeptor für Dkk-1 von hohem Interesse. Dkk-1 wird ebenfalls von hMSC exprimiert und über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert. In hMSC haben wir auch eine konstitutive Expression von Dkk-1 festgestellt. Betrachtet man die mRNA-Expression von LRP6 und Dkk-1 unter dem Gesichtspunkt der negativen *feedback*-Regulation, so führt möglicherweise die Induktion der beiden Gene zu einem Eindämmen des Wnt3a-vermittelten Signals. Dies könnte auch die beobachteten Effekte nach Knockdown von LRP6 erklären, wonach die Wnt-Zielgen-Expression (gemessen an Cyclin D1, MT1-MMP sowie Dkk-1) induziert war.

Insgesamt betrachtet scheint es eine in hohem Maße abgestimmte Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen zu geben, die eine überschießende Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges verhindert. Dass dies auch eine hohe klinische Relevanz beinhaltet, wird durch eine Vielzahl von Berichten verdeutlicht, wonach eine Dysregulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges mit Erbkrankheiten (Luo et al., 2007) oder malignen Entartungen (Polakis, 2007) einhergehen kann.

Geht man allerdings nicht nur von einer parakrinen, sondern auch – wie im Falle von Dkk-1 – von einer autokrinen Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC aus, so steht die Suche nach anderen Wnt-Liganden noch aus. hMSC exprimieren Wnt3a nicht selbst, sondern scheinen in ihrer natürlichen Nische parakrin auf den Wnt3a-Stimulus zu reagieren (Baksh and Tuan, 2007). Wenn auch in der vorliegenden Promotionsarbeit nicht nach einem Wnt-Ligand gesucht wurde, der autokrin das kanonische Wnt-Signaling induzieren kann und möglicherweise antagonistisch zu Dkk-1 agiert, so existieren doch Vorarbeiten von anderen Forschergruppen, die auf autokrine Wnt-Liganden hinweisen. So ist bekannt, dass hMSC beispielsweise in der Lage sind, Wnt5a zu exprimieren (Etheridge et al., 2004; Boland et al., 2004; Baksh et al., 2007), das je nach Rezeptorkomplex den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg sowohl aktivieren als auch inhibieren kann (Mikels and Nusse, 2006). Weitere, wenn auch nicht einheitliche Erkenntnisse wurden bezüglich der Expression des kanonischen Wnt-Liganden Wnt1 (Boland et al., 2004; Etheridge et al., 2004; Baksh et al., 2007) oder des erst kürzlich beschriebenen Liganden R-Spondin1 erhoben, der seine Effekte ähnlich wie bzw. synergistisch zu Wnt3a ausübt (Wei et al., 2007). Dieser Ligand ist vor allem deshalb so interessant, weil Fzd8 und LRP6 als die verantwortlichen Rezeptoren beschrieben wurden (Nam et al., 2006).

Wie wir hier zeigen konnten, werden sowohl LRP6 als auch Fzd8 in hMSC exprimiert, wobei die Fzd8-Expression einer negativen Regulation durch Wnt3a unterliegt. Bezüglich der Gesamtheit der Fzds konnte allerdings die Frage nach dem (den) beteiligten Fzd(s) für Wnt3a nur partiell beantwortet werden. So wurde erstmalig die Expression aller 10 Fzd in hMSC und mMSC nachgewiesen und gezeigt, dass Fzd8 in hMSC nicht selbst als Rezeptor für Wnt3a zu dienen scheint. Inwiefern die Fzd8-Regulation eine wesentliche Rolle für die Balance des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC spielt, bleibt zu untersuchen und stellt ein vorrangiges Ziel künftiger Arbeiten dar.

G Schlussfolgerungen und Ausblick

Abschließend bleibt festzustellen, dass zu Beginn der Promotionsarbeit die molekularen Mechanismen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in der MSC-Biologie weitgehend ungeklärt waren und z. T. auch jetzt noch sind. Die eigenen Daten konnten die Wnt-abhängige Regulation der Invasion zeigen und zumindest partiell dazu beitragen, den zugrunde liegenden Mechanismus aufzudecken. So lassen z.B. die Untersuchungen zur Expression von LRP6, Dkk-1 und Fzd8 sowie deren Rolle in der hMSC-Biologie auf eine feinjustierte Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges schließen. Mit weiterführenden Analysen der verantwortlichen Mechanismen könnte langfristig der Grundstein für eine pharmakologische Manipulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges gelegt werden, um zum einen Wnt-abhängige Tumoren besser bekämpfen zu können, ohne dabei Wnt-regulierte Stammzeleigenschaften zu beeinträchtigen. Zum anderen bietet ein detailliertes Verständnis dieser Signaltransduktionskaskade auch die Möglichkeit die regenerative Kapazität endogener Stammzellen nicht nur bei schweren Verletzungen, sondern auch im Rahmen von degenerativen Erkrankungen gezielt zu fördern.

Die Bedeutung der Kenntnisse der Regulationsmechanismen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC kommt insbesondere dann zum Tragen, wenn man seine Rolle in der Steuerung des Invasionsverhaltens dieser Stammzellpopulation bedenkt. Besonders wichtig ist dies vor dem Hintergrund, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch bei zahlreichen Tumoren aufgrund genetischer bzw. epigenetischer Veränderungen persistierend aktiv ist. Dies führt schließlich dazu, dass derartige Zellen stark proliferierende Eigenschaften eng assoziiert mit einem hohen invasiven Potential aufweisen, was die Grundvoraussetzung für den Status einer metastasierenden Tumorerkrankung darstellt. Somit läge es auf der Hand, Tumorthérapien zu entwickeln, die eine Interferenz dieses gestörten Gleichgewichts in der Wnt-Signaltransduktionskaskade zum Ziel haben. Da aber die Steuerung von Stamm- und Tumorzellen oftmals durch dieselben Signaltransduktionskaskaden erfolgt, ist bei einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges im Rahmen einer Tumorthérapie größte Vorsicht geboten, um nicht das endogene Stammzellpotential ebenfalls zu stören. Dies war z.B. in einem murinen Darmkrebs-Modell der Fall, wo durch adenovirale Dkk-1-Administration die gastrointestinale Stammzellnische zerstört wurde, was zum Tod der Mäuse führte (Kuhnert et al., 2004).

Grundsätzlich ist mit einem fundierten Wissen hinsichtlich der molekularen Mechanismen eine gezielte Manipulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf jeder Ebene denkbar (Luo et al., 2007) (Abb. G-1), wie dies zum Teil auch in der vorliegenden Promotionsarbeit erfolgte.

Auf der extrazellulären Ebene angefangen, könnte man beispielsweise durch RNAi oder auch durch neutralisierende Antikörper die Liganden selbst in ihrer Funktion inhibieren oder die natürlichen Inhibitoren bzw. Antagonisten in Rahmen einer Tumorthérapie einsetzen. So wurde z.B. die Invasionsfähigkeit von SAOS-2 Zellen durch ektopische Dkk-3 Expression und durch den Einsatz einer LRP5 dominant-negativen Mutante reduziert (Hoang et al., 2004). In einem anderen Experiment machte sich eine amerikanische Arbeitsgruppe die Wnt-bindenden Eigenschaften der CRD des Fzd8 zunutze und generierte damit einen löslichen Wnt-Rezeptor. Dieser konnte sowohl *in vitro* und als auch *in vivo* appliziert werden und reduzierte das autokrine Wnt-Signal der Tumorzellen in kompetitiver Weise (DeAlmeida et al., 2007).

Neuerdings mehren sich auch Berichte über sog. *small-molecules*, die hinsichtlich ihres Effektes auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg getestet werden. Ein Beispiel stellt das erst kürzlich beschriebene Purin-Derivat QS11 dar, das in einem Hochdurchsatz-Screening von 100.000 solcher synthetischer Heterozyklen gefunden wurde und synergistisch zu Wnt3a agiert (Zhang et al., 2007).

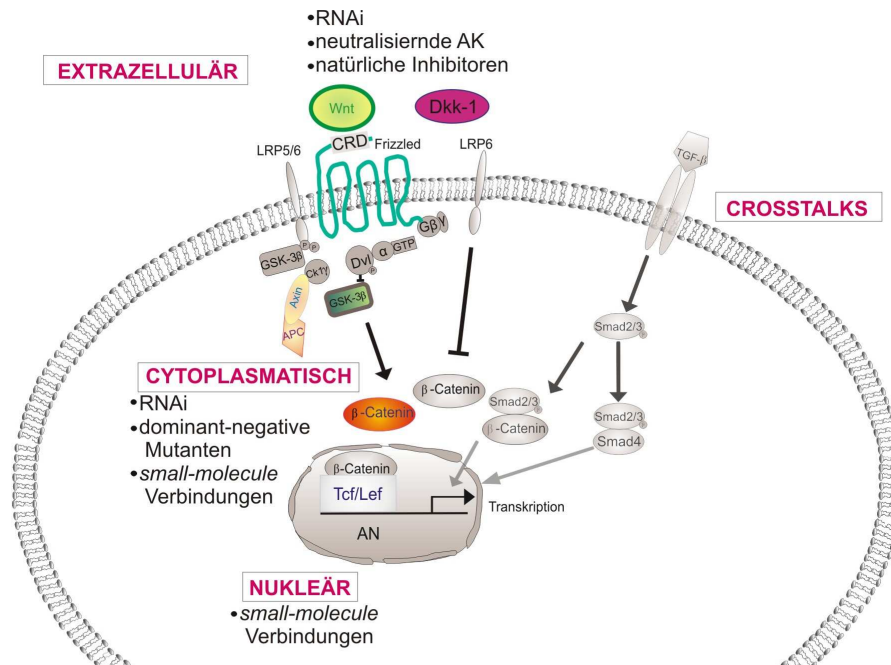


Abb. G-1: Möglichkeiten zur Beeinflussung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges.

(Detaillierte Beschreibung im Text)

Auf intrazellulärer Ebene sind Manipulationen von APC und Axin2 denkbar, vor allen Dingen aber die direkte Wirkung auf cytoplasmatische β -Catenin-Level (Verma et al., 2003; Luu et al., 2004). Ebenso ist GSK-3 β als ein mögliches Ziel von pharmakologischem Interesse, was auch in der Vergangenheit schon gezeigt wurde. Dies betrifft vor allem die Entdeckung der synthetischen Verbindung *6-bromoindirubin-3'-oxime* (BIO) und dessen Funktion als Agonist im Wnt-Signalweg (Sato et al., 2004).

Auf nukleärer Ebene kommen insbesondere die Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie als Zielmoleküle (Lepourcelet et al., 2004) inklusive ihrer Interaktion mit β -Catenin in Frage. In diesem Kontext wurden bereits eine Vielzahl natürlicher Verbindungen daraufhin getestet, ob sie die Komplexierung von β -Catenin und Tcf/Lef verhindern können.

Nicht zuletzt sollten bei einer therapeutischen Einflussnahme die möglichen Synergien des Wnt/ β -Catenin-Signalweges mit anderen Signaltransduktionskaskaden bedacht werden. So wurde beispielsweise in hMSC die Kooperation des Wnt- mit dem TGF- β -Signalweg beschrieben, die nicht erst im Nukleus, sondern schon im Cytoplasma beginnt (Jian et al., 2006; Liu et al., 2006; Amini et al., 2007). Je weiter oben man in den Wnt/ β -Catenin-Signalweg eingreift, desto wahrscheinlicher ist die Interferenz mit zusätzlichen Signalwegen, was allerdings auch von Vorteil sein kann, wenn man beispielsweise in Tumorzellen zwei Signalwege wie z.B. den Wnt/ β -Catenin- und den TGF- β -Signalweg gleichzeitig inhibieren will (Torrance et al., 2000).

H Literaturverzeichnis

- Adler,P.N. (2002). Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2, 525-535.
- Aguilar,S., Nye,E., Chan,J., Loebinger,M., Spencer-Dene,B., Fisk,N., Stamp,G., Bonnet,D., and Janes,S.M. (2007). Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the Lung. *Stem Cells*. 6, 1586-1594.
- Aguilera,O., Munoz,A., Esteller,M., and Fraga,M.F. (2007). Epigenetic alterations of the Wnt/beta-catenin pathway in human disease. *Endocr. Metab Immune. Disord. Drug Targets*. 7, 13-21.
- Amini,N.S., Ebrahim,R.P., Van Dam,K., Cassiman,J.J., and Tejpar,S. (2007). TGF-beta modulates beta-Catenin stability and signaling in mesenchymal proliferations. *Exp. Cell Res.* 313(3), 2887-2895.
- Anjos-Afonso,F., Siapati,E.K., and Bonnet,D. (2004). In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J. Cell Sci.* 117, 5655-5664.
- Bafico,A., Liu,G., Yaniv,A., Gazit,A., and Aaronson,S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683-686.
- Baksh,D., Song,L., and Tuan,R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell Mol. Med.* 8, 301-316.
- Baksh,D. and Tuan,R.S. (2007). Canonical and non-canonical wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.*212 (3), 817-826.
- Baksh,D., Yao,R., and Tuan,R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*.6, 1384-1392.
- Banziger,C., Soldini,D., Schutt,C., Zipperlen,P., Hausmann,G., and Basler,K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509-522.
- Barrilleaux,B., Phinney,D.G., Prockop,D.J., and O'Connor,K.C. (2006). Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 12, 3007-3019.
- Bartlett,D.W. and Davis,M.E. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* 34, 322-333.
- Bartscherer,K., Pelte,N., Ingelfinger,D., and Boutros,M. (2006). Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125, 523-533.
- Beachy,P.A., Karhadkar,S.S., and Berman,D.M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432, 324-331.
- Behrens,J., Jerchow,B.A., Wurtele,M., Grimm,J., Asbrand,C., Wirtz,R., Kuhl,M., Wedlich,D., and Birchmeier,W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280, 596-599.

- Behrens,J., von Kries,J.P., Kuhl,M., Bruhn,L., Wedlich,D., Grosschedl,R., and Birchmeier,W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-642.
- Beltrami,A.P., Cesselli,D., Bergamin,N., Marcon,P., Rigo,S., Puppato,E., D'Aurizio,F., Verardo,R., Piazza,S., Pignatelli,A., Poz,A., Baccarani,U., Damiani,D., Fanin,R., Mariuzzi,L., Finato,N., Masolini,P., Burelli,S., Belluzzi,O., Schneider,C., and Beltrami,C.A. (2007). Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver and bone marrow). *Blood*. **110(9)**, 3838-3446.
- Bienz,M. and Clevers,H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311-320.
- Binnerts,M.E., Kim,K.A., Bright,J.M., Patel,S.M., Tran,K., Zhou,M., Leung,J.M., Liu,Y., Lomas,W.E., III, Dixon,M., Hazell,S.A., Wagle,M., Nie,W.S., Tomasevic,N., Williams,J., Zhan,X., Levy,M.D., Funk,W.D., and Abo,A. (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 14700-14705.
- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Boland,G.M., Perkins,G., Hall,D.J., and Tuan,R.S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* **93**, 1210-1230.
- Brabletz,T., Jung,A., Dag,S., Hlubek,F., and Kirchner,T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* **155**, 1033-1038.
- Brabletz,T., Jung,A., Reu,S., Porzner,M., Hlubek,F., Kunz-Schughart,L.A., Knuechel,R., and Kirchner,T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 10356-10361.
- Brantjes,H., Barker,N., van Es,J., and Clevers,H. (2002). TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol. Chem.* **383**, 255-261.
- Cadigan,K.M. and Liu,Y.I. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* **119**, 395-402.
- Cadigan,K.M. and Nusse,R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286-3305.
- Cai,J., Weiss,M.L., and Rao,M.S. (2004). In search of "stemness". *Exp. Hematol.* **32**, 585-598.
- Cantz,T., Manns,M.P., and Ott,M. (2007). Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.* **331(1)**, 271-282.
- Cavazzana-Calvo,M., Hacein-Bey,S., de Saint,B.G., Gross,F., Yvon,E., Nusbaum,P., Selz,F., Hue,C., Certain,S., Casanova,J.L., Bousso,P., Deist,F.L., and Fischer,A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672.
- Colter,D.C., Class,R., DiGirolamo,C.M., and Prockop,D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 3213-3218.
- Colter,D.C., Sekiya,I., and Prockop,D.J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 7841-7845.
- Cong,F., Schweizer,L., and Varmus,H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* **131**, 5103-5115.

- De Becker,A, Van Hummelen,P, Bakkus,M, Vande,B, I, De Wever,J, De Waele,M, and Van,R, I (2007). Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 92, 440-449.
- De Boer,J, Wang,H.J, and Van Blitterswijk,C. (2004). Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 10, 393-401.
- DeAlmeida,V.I, Miao,L, Ernst,J.A, Koeppen,H, Polakis,P, and Rubinfeld,B. (2007). The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo. *Cancer Res.* 67, 5371-5379.
- Etheridge,S.L, Spencer,G.J, Heath,D.J, and Genever,P.G. (2004). Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22, 849-860.
- Evans,M.J and Kaufman,M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fodde,R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 38, 867-871.
- Fodde,R and Brabletz,T. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 150-158.
- Friedenstein,A.J., Chailakhjan,R.K., and Lalykina,K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393-403.
- Friedenstein,A.J., Gorskaja,J.F., and Kulagina,N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267-274.
- Gazit,A, Yaniv,A, Bafico,A, Pramila,T, Igarashi,M, Kitajewski,J, and Aaronson,S.A. (1999). Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene* 18, 5959-5966.
- Gershoni,J.M. and Palade,G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131, 1-15.
- Golan,T, Yaniv,A, Bafico,A, Liu,G, and Gazit,A. (2004). The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 279, 14879-14888.
- Gong,Y, Slee,R.B, Fukai,N, Rawadi,G, Roman-Roman,S, Reginato,A.M, Wang,H, Cundy,T, Glorieux,F.H, Lev,D, Zacharin,M, Oexle,K, Marcelino,J, Suwairi,W, Heeger,S, Sabatakos,G, Apte,S, Adkins,W.N, Allgrove,J, Arslan-Kirchner,M, Batch,J.A, Beighton,P, Black,G.C, Boles,R.G, Boon,L.M, Borrone,C, Brunner,H.G, Carle,G.F, Dallapiccola,B, De Paepe,A, Floege,B, Halfhide,M.L, Hall,B, Hennekam,R.C, Hirose,T, Jans,A, Juppner,H, Kim,C.A, Keppeler-Noreuil,K, Kohlschuetter,A, LaCombe,D, Lambert,M, Lemyre,E, Letteboer,T, Peltonen,L, Ramesar,R.S, Romanengo,M, Somer,H, Steichen-Gersdorf,E, Steinmann,B, Sullivan,B, Superti-Furga,A, Swoboda,W, van den Boogaard,M.J, Van Hul,W, Vikkula,M, Votruba,M, Zabel,B, Garcia,T, Baron,R, Olsen,B.R, and Warman,M.L. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-523.
- Gonzalez-Sancho,J.M, Aguilera,O, Garcia,J.M, Pendas-Franco,N, Pena,C, Cal,S, Garcia,d.H, Bonilla,F, and Munoz,A. (2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24, 1098-1103.
- Gordon,M.D and Nusse,R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* 281, 22429-22433.

- Gottardi,C.J. and Gumbiner,B.M. (2004). Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J. Cell Biol.* 167, 339-349.
- Gregory,C.A., Perry,A.S., Reyes,E., Conley,A., Gunn,W.G., and Prockop,D.J. (2005). Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.* 280, 2309-2323.
- Gregory,C.A., Singh,H., Perry,A.S., and Prockop,D.J. (2003). The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.* 278, 28067-28078.
- Grove,J.E., Bruscia,E., and Krause,D.S. (2004). Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22, 487-500.
- Gustavson,M.D., Crawford,H.C., Fingleton,B., and Matrisian,L.M. (2004). Tcf binding sequence and position determines beta-catenin and Lef-1 responsiveness of MMP-7 promoters. *Mol. Carcinog.* 41, 125-139.
- Ha,N.C., Tonzuka,T., Stamos,J.L., Choi,H.J., and Weis,W.I. (2004). Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol. Cell* 15, 511-521.
- Habas,R. and Dawid,I.B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J. Biol.* 4, 2.
- Hacein-Bey-Abina,S., Von Kalle,C., Schmidt,M., McCormack,M.P., Wulffraat,N., Leboulch,P., Lim,A., Osborne,C.S., Pawliuk,R., Morillon,E., Sorensen,R., Forster,A., Fraser,P., Cohen,J.I., de Saint,B.G., Alexander,I., Wintergerst,U., Frebourg,T., Aurias,A., Stoppa-Lyonnet,D., Romana,S., Radford-Weiss,I., Gross,F., Valensi,F., Delabesse,E., Macintyre,E., Sigaux,F., Soulier,J., Leiva,L.E., Wissler,M., Prinz,C., Rabbitts,T.H., Le Deist,F., Fischer,A., and Cavazzana-Calvo,M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Hallcher,L.M. and Sherman,W.R. (1980). The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255, 10896-10901.
- He,X., Semenov,M., Tamai,K., and Zeng,X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677.
- Henderson,B.R. and Fagotto,F. (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep.* 3, 834-839.
- Hendriksen,J., Fagotto,F., van,d., V, van Schie,M., Noordermeer,J., and Fornerod,M. (2005). RanBP3 enhances nuclear export of active (beta)-catenin independently of CRM1. *J. Cell Biol.* 171, 785-797.
- Herzog,E.L., Chai,L., and Krause,D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
- Hiyama,E. and Hiyama,K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *Br. J. Cancer* 96, 1020-1024.
- Hlubek,F., Spaderna,S., Jung,A., Kirchner,T., and Brabletz,T. (2004). Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* 108, 321-326.
- Hoang,B.H., Kubo,T., Healey,J.H., Yang,R., Nathan,S.S., Kolb,E.A., Mazza,B., Meyers,P.A., and Gorlick,R. (2004). Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res.* 64, 2734-2739.

- Hoelters,J., Ciccarella,M., Drechsel,M., Geissler,C., Gulkan,H., Bocker,W., Schieker,M., Jochum,M., and Neth,P. (2005). Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J. Gene Med.* 7, 718-728.
- Hong,R., Gatti,R.A., and Good,R.A. (1968). Hazards and potential benefits of blood-transfusion in immunological deficiency. *Lancet* 2, 388-389.
- Hoppler,S. and Kavanagh,C.L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J. Cell Sci.* 120, 385-393.
- Horwitz,E.M., Gordon,P.L., Koo,W.K., Marx,J.C., Neel,M.D., McNall,R.Y., Muul,L., and Hofmann,T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 8932-8937.
- Horwitz,E.M., Le Blanc,K., Dominici,M., Mueller,I., Slaper-Cortenbach,I., Marini,F.C., Deans,R.J., Krause,D.S., and Keating,A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 7, 393-395.
- Hurlstone,A. and Clevers,H. (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.* 21, 2303-2311.
- Itoh,K., Brott,B.K., Bae,G.U., Ratcliffe,M.J., and Sokol,S.Y. (2005). Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol.* 4, 3.
- Itoh,Y., Takamura,A., Ito,N., Maru,Y., Sato,H., Suenaga,N., Aoki,T., and Seiki,M. (2001). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J.* 20, 4782-4793.
- Jaiswal,N., Haynesworth,S.E., Caplan,A.I., and Bruder,S.P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell Biochem.* 64, 295-312.
- Jamora,C., DasGupta,R., Kocieniewski,P., and Fuchs,E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422, 317-322.
- Jho,E.H., Zhang,T., Domon,C., Joo,C.K., Freund,J.N., and Costantini,F. (2002b). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 22, 1172-1183.
- Jho,E.H., Zhang,T., Domon,C., Joo,C.K., Freund,J.N., and Costantini,F. (2002a). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 22, 1172-1183.
- Jian,H., Shen,X., Liu,I., Semenov,M., He,X., and Wang,X.F. (2006). Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* 20, 666-674.
- 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., and Verfaillie,C.M. (2002a). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jiang,Y., Vaessen,B., Lenvik,T., Blackstad,M., Reyes,M., and Verfaillie,C.M. (2002b). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896-904.
- Johnson,M.L., Harnish,K., Nusse,R., and Van Hul,W. (2004). LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1749-1757.

- Kadowaki,T., Wilder,E., Klingensmith,J., Zachary,K., and Perrimon,N. (1996). The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev.* *10*, 3116-3128.
- Kamata,T., Katsube,K., Michikawa,M., Yamada,M., Takada,S., and Mizusawa,H. (2004). R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim. Biophys. Acta* *1676*, 51-62.
- Katanaev,V.L., Ponzilli,R., Semeriva,M., and Tomlinson,A. (2005). Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* *120*, 111-122.
- Kato,M., Patel,M.S., Levasseur,R., Lobov,I., Chang,B.H., Glass,D.A., Hartmann,C., Li,L., Hwang,T.H., Brayton,C.F., Lang,R.A., Karsenty,G., and Chan,L. (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* *157*, 303-314.
- Kawahara,K., Morishita,T., Nakamura,T., Hamada,F., Toyoshima,K., and Akiyama,T. (2000). Down-regulation of beta-catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with Axin and beta-catenin. *J. Biol. Chem.* *275*, 8369-8374.
- Kazanskaya,O., Glinka,A., del,B.B., I, Stannek,P., Niehrs,C., and Wu,W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev. Cell* *7*, 525-534.
- Kelly,O.G., Pinson,K.I., and Skarnes,W.C. (2004). The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* *131*, 2803-2815.
- Khan,Z., Vijayakumar,S., Villanueva,d.I.T., Rotolo,S., and Bafico,A. (2007). Analysis of endogenous LRP6 function reveals a novel feedback mechanism by which Wnt negatively regulates its receptor. *Mol. Cell Biol.* *20*, 7291-7301.
- Kikuchi,A., Kishida,S., and Yamamoto,H. (2006). Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp. Mol. Med.* *38*, 1-10.
- Kim,K.A., Zhao,J., Andarmani,S., Kakitani,M., Oshima,T., Binnerts,M.E., Abo,A., Tomizuka,K., and Funk,W.D. (2006). R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* *5*, 23-26.
- Klein,P.S. and Melton,D.A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 8455-8459.
- Komekado,H., Yamamoto,H., Chiba,T., and Kikuchi,A. (2007). Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells* *12*, 521-534.
- Korbling,M. and Estrov,Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.* *349*, 570-582.
- Korinek,V., Barker,N., Morin,P.J., van Wichen,D., de Weger,R., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., and Clevers,H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* *275*, 1784-1787.
- Kramps,T., Peter,O., Brunner,E., Nellen,D., Froesch,B., Chatterjee,S., Murone,M., Zullig,S., and Basler,K. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* *109*, 47-60.
- Kuhnert,F., Davis,C.R., Wang,H.T., Chu,P., Lee,M., Yuan,J., Nusse,R., and Kuo,C.J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 266-271.

- Kurayoshi,M., Yamamoto,H., Izumi,S., and Kikuchi,A. (2007). Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem. J.* 402, 515-523.
- Kusserow,A., Pang,K., Sturm,C., Hrouda,M., Lentfer,J., Schmidt,H.A., Technau,U., von Haeseler,A., Hobmayer,B., Martindale,M.O., and Holstein,T.W. (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433, 156-160.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lepourcelet,M., Chen,Y.N., France,D.S., Wang,H., Crews,P., Petersen,F., Bruseo,C., Wood,A.W., and Shivdasani,R.A. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 5, 91-102.
- Li,L., Mao,J., Sun,L., Liu,W., and Wu,D. (2002). Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J. Biol. Chem.* 277, 5977-5981.
- Li,Z., Wang,C., Prendergast,G.C., and Pestell,R.G. (2006). Cyclin D1 functions in cell migration. *Cell Cycle* 5, 2440-2442.
- Liu,G., Bafico,A., and Aaronson,S.A. (2005). The mechanism of endogenous receptor activation functionally distinguishes prototype canonical and noncanonical Wnts. *Mol. Cell Biol.* 25, 3475-3482.
- Liu,G., Bafico,A., Harris,V.K., and Aaronson,S.A. (2003). A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor. *Mol. Cell Biol.* 23, 5825-5835.
- Liu,Z., Tang,Y., Qiu,T., Cao,X., and Clemens,T.L. (2006). A dishevelled-1/Smad1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* 281, 17156-17163.
- Logan,C.Y. and Nusse,R. (2004). The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781-810.
- Lu,W., Yamamoto,V., Ortega,B., and Baltimore,D. (2004). Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119, 97-108.
- Luo,J., Chen,J., Deng,Z.L., Luo,X., Song,W.X., Sharff,K.A., Tang,N., Haydon,R.C., Luu,H.H., and He,T.C. (2007). Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab Invest* 87, 97-103.
- Lustig,B., Jerchow,B., Sachs,M., Weiler,S., Pietsch,T., Karsten,U., van de,W.M., Clevers,H., Schlag,P.M., Birchmeier,W., and Behrens,J. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell Biol.* 22, 1184-1193.
- Luu,H.H., Zhang,R., Haydon,R.C., Rayburn,E., Kang,Q., Si,W., Park,J.K., Wang,H., Peng,Y., Jiang,W., and He,T.C. (2004). Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Curr. Cancer Drug Targets.* 4, 653-671.
- Mao,B. and Niehrs,C. (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302, 179-183.
- Mao,B., Wu,W., Davidson,G., Marhold,J., Li,M., Mechler,B.M., Delius,H., Hoppe,D., Stannek,P., Walter,C., Glinka,A., and Niehrs,C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664-667.

- Mao,J., Wang,J., Liu,B., Pan,W., Farr,G.H., III, Flynn,C., Yuan,H., Takada,S., Kimelman,D., Li,L., and Wu,D. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* 7, 801-809.
- Maretto,S., Cordenosi,M., Dupont,S., Braghetta,P., Broccoli,V., Hassan,A.B., Volpin,D., Bressan,G.M., and Piccolo,S. (2003). Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3299-3304.
- Martin,E. and Shapiro,J.R. (2007). Osteogenesis imperfecta:epidemiology and pathophysiology. *Curr. Osteoporos. Rep.* 5, 91-97.
- Martin-Rendon,E. and Watt,S.M. (2003). Stem cell plasticity. *Br. J. Haematol.* 122, 877-891.
- Massague,J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298-306.
- Medina,A., Reintsch,W., and Steinbeisser,H. (2000). Xenopus frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech. Dev.* 92, 227-237.
- Meirelles,L.S. and Nardi,N.B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.* 123, 702-711.
- Mi,K. and Johnson,G.V. (2005). Role of the intracellular domains of LRP5 and LRP6 in activating the Wnt canonical pathway. *J. Cell Biochem.* 95, 328-338.
- Mikels,A.J. and Nusse,R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS. Biol.* 4, e115.
- Moriyama,A., Kii,I., Sunabori,T., Kurihara,S., Takayama,I., Shimazaki,M., Tanabe,H., Oginuma,M., Fukayama,M., Matsuzaki,Y., Saga,Y., and Kudo,A. (2007). GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. *Genesis.* 45, 90-100.
- Morrison,S.J., Shah,N.M., and Anderson,D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.
- Muraglia,A., Cancedda,R., and Quarto,R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 7), 1161-1166.
- Nakashima,A. and Tamura,M. (2006). Regulation of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression by WNT3A and bone morphogenetic protein-2 in osteoblastic differentiation. *Front Biosci.* 11, 1667-1678.
- Nam,J.S., Turcotte,T.J., Smith,P.F., Choi,S., and Yoon,J.K. (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 13247-13257.
- Neufeld,K.L., Nix,D.A., Bogerd,H., Kang,Y., Beckerle,M.C., Cullen,B.R., and White,R.L. (2000). Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12085-12090.
- Niida,A., Hiroko,T., Kasai,M., Furukawa,Y., Nakamura,Y., Suzuki,Y., Sugano,S., and Akiyama,T. (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23, 8520-8526.
- Nusse,R. and Varmus,H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.
- Oreffo,R.O., Cooper,C., Mason,C., and Clements,M. (2005). Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev.* 1, 169-178.

- Pardal,R., Clarke,M.F., and Morrison,S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 895-902.
- Peister,A., Mellad,J.A., Larson,B.L., Hall,B.M., Gibson,L.F., and Prockop,D.J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103, 1662-1668.
- Pereira,R.F., Halford,K.W., O'Hara,M.D., Leeper,D.B., Sokolov,B.P., Pollard,M.D., Bagasra,O., and Prockop,D.J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4857-4861.
- Perez-Moreno,M. and Fuchs,E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev. Cell* 11, 601-612.
- Pesce,M. and Scholer,H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19, 271-278.
- Phinney,D.G., Kopen,G., Isaacson,R.L., and Prockop,D.J. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell Biochem.* 72, 570-585.
- Pittenger,M.F., Mackay,A.M., Beck,S.C., Jaiswal,R.K., Douglas,R., Mosca,J.D., Moorman,M.A., Simonetti,D.W., Craig,S., and Marshak,D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Pochampally,R.R., Smith,J.R., Ylostalo,J., and Prockop,D.J. (2004). Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 103, 1647-1652.
- Polakis,P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 45-51.
- Price,L.H. and Heninger,G.R. (1994). Lithium in the treatment of mood disorders. *N. Engl. J. Med.* 331, 591-598.
- Qiang,Y.W., Walsh,K., Yao,L., Kedei,N., Blumberg,P.M., Rubin,J.S., Shaughnessy,J., Jr., and Rudikoff,S. (2005). Wnts induce migration and invasion of myeloma plasma cells. *Blood* 106, 1786-1793.
- Reya,T., Duncan,A.W., Ailles,L., Domen,J., Scherer,D.C., Willert,K., Hintz,L., Nusse,R., and Weissman,I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- Reynolds,A., Leake,D., Boese,Q., Scaringe,S., Marshall,W.S., and Khvorova,A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326-330.
- Ries,C., Egea,V., Karow,M., Kolb,H., Jochum,M., and 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.
- Roman-Roman,S., Shi,D.L., Stiot,V., Hay,E., Vayssiere,B., Garcia,T., Baron,R., and Rawadi,G. (2004). Murine Frizzled-1 behaves as an antagonist of the canonical Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 5725-5733.
- Rosin-Arbesfeld,R., Cliffe,A., Brabletz,T., and Bienz,M. (2003). Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *EMBO J.* 22, 1101-1113.
- Saitoh,T., Hirai,M., and Katoh,M. (2001). Molecular cloning and characterization of WNT3A and WNT14 clustered in human chromosome 1q42 region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 1168-1175.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *74*, 5463-5467.
- Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Battle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., Clarke, A.R., and Winton, D.J. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* *18*, 1385-1390.
- Sansom, O.J., Reed, K.R., van de, W.M., Muncan, V., Winton, D.J., Clevers, H., and Clarke, A.R. (2005). Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine. *J. Biol. Chem.* *280*, 28463-28467.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* *10*, 55-63.
- Segditsas, S. and Tomlinson, I. (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* *25*, 7531-7537.
- Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G., and Prockop, D.J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* *20*, 530-541.
- Semenov, M.V., Habas, R., Macdonald, B.T., and He, X. (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* *131*, 1378.
- Semenov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kuhl, M., Sokol, S., and He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* *11*, 951-961.
- Senda, T., Iizuka-Kogo, A., Onouchi, T., and Shimomura, A. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med. Mol. Morphol.* *40*, 68-81.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 5522-5527.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* *269*, 32678-32684.
- Sievers, S., Fritsch, C., Grzegorzczak, M., Kuhnen, C., and Muller, O. (2006). Absolute beta-catenin concentrations in Wnt pathway-stimulated and non-stimulated cells. *Biomarkers* *11*, 270-278.
- Smallwood, P.M., Williams, J., Xu, Q., Leahy, D.J., and Nathans, J. (2007). Mutational analysis of Norrin-Frizzled4 recognition. *J. Biol. Chem.* *282*, 4057-4068.
- Smith, J.R., Pochampally, R., Perry, A., Hsu, S.C., and Prockop, D.J. (2004). Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* *22*, 823-831.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* *33*, 919-926.
- Sung, L. and Dror, Y. (2007). Clinical applications of granulocyte-colony stimulating factor. *Front Biosci.* *12*, 1988-2002.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* *11*, 791-801.

- Takahashi,M., Tsunoda,T., Seiki,M., Nakamura,Y., and Furukawa,Y. (2002). Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* 21, 5861-5867.
- Takahashi-Yanaga,F. and Sasaguri,T. (2007). The Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway as a Target in Drug Discovery. *J. Pharmacol. Sci.* 104, 293-302.
- Tamai,K., Semenov,M., Kato,Y., Spokony,R., Liu,C., Katsuyama,Y., Hess,F., Saint-Jeannet,J.P., and He,X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535.
- Tamai,K., Zeng,X., Liu,C., Zhang,X., Harada,Y., Chang,Z., and He,X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol. Cell* 13, 149-156.
- Tannous,B.A., Kim,D.E., Fernandez,J.L., Weissleder,R., and Breakefield,X.O. (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol. Ther.* 11, 435-443.
- Tetsu,O. and McCormick,F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Thomas,E., Storb,R., Clift,R.A., Fefer,A., Johnson,F.L., Neiman,P.E., Lerner,K.G., Glucksberg,H., and Buckner,C.D. (1975). Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292, 832-843.
- Thompson,B., Townsley,F., Rosin-Arbesfeld,R., Musisi,H., and Bienz,M. (2002). A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* 4, 367-373.
- Thomson,J.A., Itskovitz-Eldor,J., Shapiro,S.S., Waknitz,M.A., Swiergiel,J.J., Marshall,V.S., and Jones,J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Tickenbrock,L., Schwable,J., Strey,A., Sargin,B., Hehn,S., Baas,M., Choudhary,C., Gerke,V., Berdel,W.E., Muller-Tidow,C., and Serve,H. (2006). Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1306-1313.
- Tolar,J., Nauta,A.J., Osborn,M.J., Panoskaltsis,M.A., McElmurry,R.T., Bell,S., Xia,L., Zhou,N., Riddle,M., Schroeder,T.M., Westendorf,J.J., McIvor,R.S., Hogendoorn,P.C., Szuhai,K., Oseth,L., Hirsch,B., Yant,S.R., Kay,M.A., Peister,A., Prockop,D.J., Fibbe,W.E., and Blazar,B.R. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25, 371-379.
- Tolwinski,N.S. and Wieschaus,E. (2004). A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS. Biol.* 2, E95.
- Torrance,C.J., Jackson,P.E., Montgomery,E., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Wissner,A., Nunes,M., Frost,P., and Discafani,C.M. (2000). Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat. Med.* 6, 1024-1028.
- Verma,U.N., Surabhi,R.M., Schmaltieg,A., Becerra,C., and Gaynor,R.B. (2003). Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 9, 1291-1300.
- Wang,H.Y., Liu,T., and Malbon,C.C. (2006). Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal.* 18, 934-941.
- Wei,Q., Yokota,C., Semenov,M.V., Doble,B., Woodgett,J., and He,X. (2007). R-spondin 1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 15903-15911.

- Weissman,I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.
- Willert,J., Epping,M., Pollack,J.R., Brown,P.O., and Nusse,R. (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC. Dev. Biol.* 2, 8.
- Willert,K., Brown,J.D., Danenberg,E., Duncan,A.W., Weissman,I.L., Reya,T., Yates,J.R., III, and Nusse,R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- Willert,K. and Jones,K.A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.* 20, 1394-1404.
- Willert,K. and Nusse,R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 95-102.
- Wong,G.T., Gavin,B.J., and McMahon,A.P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol. Cell Biol.* 14, 6278-6286.
- Woodbury,D., Schwarz,E.J., Prockop,D.J., and Black,I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364-370.
- Wu,B., Crampton,S.P., and Hughes,C.C. (2007). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity.* 26, 227-239.
- Xu,Q., Wang,Y., Dabdoub,A., Smallwood,P.M., Williams,J., Woods,C., Kelley,M.W., Jiang,L., Tasman,W., Zhang,K., and Nathans,J. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116, 883-895.
- Yook,J.I., Li,X.Y., Ota,I., Hu,C., Kim,H.S., Kim,N.H., Cha,S.Y., Ryu,J.K., Choi,Y.J., Kim,J., Fearon,E.R., and Weiss,S.J. (2006). A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1398-1406.
- Zangrossi,S., Marabese,M., Broggini,M., Giordano,R., D'Erasmus,M., Montelatici,E., Intini,D., Neri,A., Pesce,M., Rebulli,P., and Lazzari,L. (2007). Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells.*25 (7), 1675-1680.
- Zhang,Q., Major,M.B., Takanashi,S., Camp,N.D., Nishiya,N., Peters,E.C., Ginsberg,M.H., Jian,X., Randazzo,P.A., Schultz,P.G., Moon,R.T., and Ding,S. (2007). Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 7444-7448.

I Curriculum Vitae

Persönliche Daten

NAME: Marisa Karow, geb. Ciccarella
 GEBURTSDATUM UND -ORT: 21. Januar 1979 in München
 ADRESSE: Steinsdorfstr.3
 80538 München
 FAMILIENSTAND: verheiratet seit 28. September 2006
 STAATSANGEHÖRIGKEIT: italienisch

Schulbildung

1985 – 1989 Grundschole Allershausen
 1989 – 1998 Dom-Gymnasium Freising
 Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

NOVEMBER '98 – DEZEMBER '03 Ludwig-Maximilians-Universität München
 Studium der Biologie
 Mündliche Hauptdiplomprüfungen in den Fächern Immunologie,
 Mikrobiologie, Medizinische Mikrobiologie, Anthropologie und
 Humangenetik
 Diplomarbeit: **Molekulare Charakterisierung von humanen
 mesenchymalen Stammzellen mittels
 Microarray-Technik und RNA-Interferenz im
 Rahmen der osteogenen Differenzierung**
 Chirurgisches Forschungslabor der Chirurgischen Klinik und
 Poliklinik; Klinikum Innenstadt; LMU München
 Betreuung: Prof. Dr. Wolf Mutschler und Dr. Peter Neth
 und Fakultät für Biologie Department II; Humanbiologie
 Betreuung: Prof. Dr. Thomas Cremer
 Abschluss: Dipl. Biol
 SEIT JANUAR 2004 Promotionsarbeit: **Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in
 humanen und murinen mesenchymalen
 Stammzellen: Analyse einzelner Signalkompo-
 nenten und deren funktioneller Bedeutung in
 Proliferations- und Invasionsprozessen**
 Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie; Klinikum
 Innenstadt; LMU München
 Betreuung: Prof. Dr. Marianne Jochum und Dr. Peter Neth
 und Fakultät für Biologie Department II; Humanbiologie
 Betreuung: Prof. Dr. Thomas Cremer

Fortbildung

SEPTEMBER '06 Erfolgreiche Teilnahme am 17. Versuchstierkundlichen Kurs
 der TIZ-BIFO München

Lehrtätigkeit

OKTOBER '05 – OKTOBER '07

Mitbetreuung im Praktikum für Klinische Chemie und Hämatologie
Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Preise und Stipendien

SEPTEMBER '07

Young Researcher Travel Grant von Tebu-bio für das Keystone Symposium "WNT-SIGNALING IN DEVELOPMENT AND DISEASE" in Berlin (500 Euro)

JANUAR '05

Reisekostenbeihilfe der Glaxo Smith Kline Stiftung für das Keystone Symposium „MOLECULAR REGULATION OF STEM CELLS" in Banff, Canada (700 Euro)

Publikationen

Karow, M., Popp, T., Egea, V., Ries, C., Jochum, M., and Neth, P. (2007). *Wnt-signaling in mouse mesenchymal stem cells: Impact on proliferation, invasion and MMP-expression*. (Manuskript eingereicht in Journal of Cellular and Molecular Medicine)

Neth, P., Ries, C., **Karow, M.**, Egea, V., Ilmer, V., and Jochum, M. (2007). *The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: Influence on cellular invasion*. Stem Cell Rev. 3, 18-29.

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

*Neth, P., ***Ciccarella, M.**, Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M., Ries, C. (2006). *Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells; 24 (8):1892-1903.

*Hölters, J., ***Ciccarella, M.**, Drechsel, M., Geissler, C., Gülkan, H., Böcker, W., Schieker, M., Jochum, M., Mutschler, W., Neth, P. (2005) *Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells*. J. Gene Med. 7(6):718-728

* these authors contributed equally to this work

§ verheiratet: Karow

Vorträge und Posterpräsentationen

"WNT-SIGNALING IN DEVELOPMENT AND DISEASE"

September 2007, Berlin, Deutschland

Karow, M., Kolben, T., Egea, V., Ries, C., Jochum, M., and Neth, P. *Studying the role of LRP6 in human mesenchymal stem cells.* (Poster)

24ND WINTER SCHOOL "PROTEASES AND THEIR INHIBITORS"

März 2007, Tiers, Italien

Karow, M., Egea, V., Ries, C., Jochum, A., and Neth, P. *Wnt signaling in human and mouse mesenchymal stem cells – similarities and differences.* (Vortrag)

23ND WINTER SCHOOL "PROTEASES AND THEIR INHIBITORS"

März 2006, Tiers, Italien

Cicarella, M., Gerg, M., Egea, V., Ries, C., Jochum, M., Krüger, A., and Neth, P. *Wnt signaling and in vivo-colonization pattern of mesenchymal stem cells.* (Vortrag)

22ND WINTER SCHOOL "PROTEASES AND THEIR INHIBITORS"

März 2005, Tiers, Italien

Cicarella, M., Egea, V., Ries, C., Hölters, H., Ilmer, M., Jochum, M., and Neth, P. *Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells.* (Vortrag)

KEYSTONE SYMPOSIUM "MOLECULAR REGULATION OF STEM CELLS"

Februar 2005, Banff, Alberta, Canada

Cicarella, M., Egea, V., Ries, C., Hölters, J., Ilmer, M., Jochum, M., and Neth, P. *Wnt signalling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells.* (Poster)

2ND INTERNATIONAL MEETING STEM CELL NETWORK NORTH RHINE WESTPHALIA

April 2004, Bonn, Deutschland

Cicarella, M., Hölters, J., Drechsel, M., Geißler, C., Gülkan, H., Schieker, M., Mutschler, W., Jochum, M., and Neth, P. *Knockdown of gene expression by RNA interference in human mesenchymal stem cells.* (Poster)

KEYSTONE SYMPOSIUM "STEM CELLS"

Januar 2004, Keystone, Colorado, USA

Cicarella, M., Hölters, J., Geißler, C., Gülkan, H., Schieker, M., Mutschler, W., Jochum, M., and Neth, P. *Knockdown of Gene Expression by RNA Interference in Human Mesenchymal Stem Cells.* (Poster)

2ND ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY

Septmeber 2003, Genua, Italien

Cicarella, M., Hölters, J., Geißler, C., Gülkan, H., Schieker, M., Mutschler, W., Jochum, M., and Neth, P. (2003). *RNA interference in human mesenchymal stem cells.* (Poster)

J Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die entweder direkt durch fachliche Kompetenz oder indirekt durch warmherzige Beziehungen am Verfassen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Ausserordentlich dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Cremer, Leiter des Lehrstuhls für Anthropologie und Humangenetik im Department Biologie II der LMU München, für die Vertretung meiner Promotion an der Fakultät für Biologie.

Prof. Dr. Marianne Jochum, Leiterin der Abteilung Klinische Chemie und Klinische Biochemie am Klinikum der LMU München, hat mir die Ausübung meiner Tätigkeit als Doktorandin ermöglicht. Ausserdem möchte ich mich für die großzügige finanzielle sowie fachliche Unterstützung und ihr großes Interesse an meiner Arbeit sehr herzlich bedanken.

Ganz besonders dankbar bin ich meinem Betreuer Dr. Peter Neth, vor allen Dingen für seine freiheitliche Politik im Umgang mit mir. Darüber hinaus, dass er mich meine Ideen nicht nur in die Tat umsetzen ließ, sondern mir zu ihnen verholfen hat. Seine Fähigkeit, Menschen zu motivieren und in ihrer Arbeit zu unterstützen ist beispiellos. Auch für die Initiation und das stetige Voranbringen des Doktorandenseminars bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin bin ich zu großem Dank verpflichtet:

- Claudia Geißler hat mich in die hohe Kunst des praktischen Arbeitens eingeführt und das mit unvergleichlicher Akribie und Geduld getan. Darüber hinaus bin ich ihr überaus dankbar für die Unterstützung bei meiner Arbeit. Lourdes Ruiz-Heinrich danke ich insbesondere für die fortwährende Hilfe im Laboralltag und ihr hinreizendes Gemüt.
- Dr. Christian Ries möchte ich für die Offenheit bei der Initiation der Kooperation unserer beiden Gruppen danken, insbesondere für die Hilfestellung und die wertvollen Vorschläge für das Verfassen unserer Publikationen.
- PD Dr. Alexander Faussner hat großen Anteil an der Motivation und den Ideen, die ich für meine zukünftige Arbeit habe, wofür ich ihm danken möchte.
- Prof. Dr. Christian Sommerhoff möchte ich für seine überaus konstruktiven Beiträge während unseres Abteilungsseminars danken.
- Den ehemaligen und jetzigen Doktoranden/innen Marei Drechsel, Matthias Ilmer, Thomas Kolben und Birgit Profanter in der Arbeitsgruppe Neth, danke ich für das stets kollegiale Verhältnis und die gute Atmosphäre im Labor.
- Den folgenden ehemaligen und jetzigen Kollegen/innen, die mir ein wunderbares Umfeld in der Abteilung beschert haben, bin ich ebenso überaus dankbar:
Prof. Dr. Edwin Fink, Dr. Irina Kalatskaya, Dr. Oliver Popp, Thomas Pitsch und Dr. Dorit Nägler sowie allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Abteilung für das stets angenehme Arbeitsklima; im Besonderen möchte ich an dieser Stelle Göran Wennerberg und Jens Feierler erwähnen.

- Karola Rügamer-Biese und Evelyn Themel möchte ich für die professionelle Hilfe in allen Fragen der Bürokratie und der netten Atmosphäre im Sekretariat danken
- Victoryia Sidarovich hat durch ihre lebensbejahende und positive Ausstrahlung nicht nur meinen Laboralltag in besonderem Maße erhellt.
- Tanja Popp möchte ich für die Hilfestellung danken, die sie mir vor allen Dingen im mMSC-Projekt gegeben hat. Ohne ihre moralische Unterstützung hätte diese Arbeit nicht zum gleichen Resultat geführt.
- Virginia Egea-Alonso hat durch ihre stetige Hilfe sowie gute Ratschläge und auch Kritik nicht nur wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, sondern meine Zeit im Labor maßgeblich verschönert. Unsere beispiellose Kooperation hat meine persönlichen Vorstellungen von Zusammenarbeit geprägt.

Beiden, Tanja und Virginia, bin ich unendlich dankbar für ihre Hilfe in allen Laborbezogenen und ebenso privaten, positiven wie auch unerfreulichen Situationen.

- Meinem ehemaligen Arbeitskollegen Jürgen Hölters möchte ich überaus für die Grundsteinlegung meiner persönlichen Freude am Forschen danken, und dass er - auch nach Beendigung seiner Doktorarbeit im Labor - in vielen konstruktiven Gesprächen immer wieder meinen Ehrgeiz weckt, fortzufahren. Er begleitet mein Leben als Kollege und Freund.

Meinen Schwiegereltern Dr. Lutz und Fleur Karow kann ich nicht genug für ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit danken. Ebenso den Großeltern meines Mannes Dr. Karl-Hans und Irene Ahl.

Michele und Luciana Ciccarella, meine Eltern, haben dies alles ermöglicht. Durch ihre beispiellose Einstellung bescherten sie mir ein wunderschönes Erwachsenwerden, gaben mir die Möglichkeit zu studieren und ohne Zwänge meine eigenen persönlichen und beruflichen Entscheidungen zu treffen. Dies gilt auch für meine Schwester Samantha Ciccarella, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite steht.

Mein allerherzlichster Dank gilt meinem Mann Robin Karow, der mir wie niemand anderer dazu verholfen hat meine Persönlichkeit reifen zu lassen. Über das Private hinaus hat er dadurch in unermesslicher Weise im beruflichen Teil meines Lebens zum Gelingen dieser Arbeit bei.