

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten (IPEK)

Campus Innenstadt

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber

**Bedeutung des reversion-inducing cysteine-rich
protein with Kazal motifs (RECK) für
Wachstum, Beweglichkeit und Differenzierung
humaner mesenchymaler Stammzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Christian Mahl

aus

München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Christian Ries

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Regina Fluhrer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, 4. September 2017

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Christian Mahl, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Bedeutung des reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) für Wachstum, Beweglichkeit und Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 27. September 2017

*Der, die, das.
Wer? Wie? Was?
Wieso? Weshalb? Warum?
Wer nicht fragt bleibt dumm!
Tausend tolle Sachen
Die gibt es überall zu sehen.
Manchmal muss man fragen,
Um sie zu verstehen.*

Volker Ludwig

Inhaltsverzeichnis

A	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
B	ÜBERSICHT	12
B.1	Zusammenfassung	12
B.2	Summary.....	14
C	EINLEITUNG	16
C.1	Humane mesenchymale Stammzellen.....	16
C.1.1	Eigenschaften von hMSCs	16
C.1.2	Immunologische Typisierung von hMSCs.....	16
C.1.3	Funktionen von hMSCs.....	17
C.1.3.1	Differenzierung.....	17
C.1.3.2	Immunmodulation.....	18
C.1.4	Therapeutische Einsatzmöglichkeiten von hMSCs.....	18
C.2	Zellbeweglichkeit	19
C.2.1	Zelluläre Fortbewegungsarten.....	19
C.2.2	Migration und Invasion	20
C.2.2.1	Definitionen.....	20
C.2.2.2	Rolle von Chemotaxis.....	21
C.2.2.3	Bedeutung der Adhäsion.....	21
C.2.2.4	Einfluss der Proteolyse	23
C.3	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs	24
C.3.1	Eigenschaften von RECK.....	24
C.3.2	Molekulare Funktionen von RECK.....	25
C.3.2.1	Regulation der Proteolyse.....	25
C.3.2.2	Regulation nicht-proteolytischer Prozesse	26

C.3.3	Pathophysiologische Bedeutung von RECK.....	26
C.3.4	Expression von RECK.....	27
C.4	Mikro-RNAs	28
C.4.1	Hemmung der RECK-Expression durch miRNAs.....	28
C.4.2	Der kanonische Reifeprozess von miRNAs	28
C.4.3	Mechanismus der miRNA-vermittelten Translationshemmung.....	29
C.5	Der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg	30
C.5.1	Eigenschaften der Wnts.....	30
C.5.2	Funktionen des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.....	30
C.5.2.1	Inaktiver Zustand.....	30
C.5.2.2	Aktiver Zustand	30
C.5.3	Antagonisten des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.....	32
D	ZIELSETZUNG	33
E	MATERIAL UND METHODEN	35
E.1	Material.....	35
E.1.1	Zellen.....	35
E.1.1.1	Charakteristika der hMSC-Spender.....	35
E.1.2	Agenzien für die Zellkultur	35
E.1.3	Chemikalien für Lösungen, Puffer und Spezialmedien.....	35
E.1.4	Lösungen, Puffer und Spezialmedien.....	36
E.1.5	Zellbiologische Techniken	38
E.1.5.1	Agenzien und Kits	38
E.1.6	Molekularbiologische Techniken	38
E.1.6.1	Agenzien und Kits	38
E.1.6.2	siRNAs.....	38
E.1.6.2.1	Charakteristika der siRNAs	39

E.1.6.3	mRNA-Primer für qRT-PCR.....	39
E.1.6.3.1	Charakteristika der mRNA-Primer	40
E.1.6.4	miRNA-Primer für qRT-PCR.....	40
E.1.6.5	snoRNA-Primer für qRT-PCR	40
E.1.7	Proteinbiochemische Techniken.....	40
E.1.7.1	Agenzien und Kits	40
E.1.7.2	Antikörper.....	41
E.1.7.2.1	Antikörper für Co-Immunopräzipitation.....	41
E.1.7.2.2	Primärantikörper für Westernblot.....	41
E.1.7.2.3	Sekundärantikörper für Westernblot.....	41
E.1.8	Geräte	41
E.1.8.1	Analytische Waagen	41
E.1.8.2	Wasserbäder.....	41
E.1.8.3	Zellkultur	42
E.1.8.4	Mikroskope und Zubehör	42
E.1.8.5	Spektrometer und Platten.....	43
E.1.8.6	Zentrifugen	43
E.1.8.7	Schüttler.....	43
E.1.8.8	qRT-PCR.....	43
E.1.8.9	Westernblot und Zymographie	43
E.1.8.10	Kühl- und Gefriertechnik.....	44
E.1.8.11	Sonstiges	44
E.1.9	Software.....	44
E.2	Methoden	45
E.2.1	Zellbiologische Techniken	45
E.2.1.1	Kultivierung von hMSCs.....	45
E.2.1.2	Kryokonservierung von hMSCs	46

E.2.1.3	Differenzierung von hMSCs.....	47
E.2.1.3.1	Adipogene Differenzierung und Oil Red O Färbung.....	47
E.2.1.3.2	Osteogene Differenzierung und Alizarin Red S Färbung.....	48
E.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl.....	48
E.2.1.4.1	Neubauer improved-Zählkammer.....	48
E.2.1.4.2	CyQUANT® Zellproliferationsassay.....	50
E.2.1.4.3	WST-8 Zellvitalitätsassay.....	50
E.2.1.5	Bestimmung der zellulären Beweglichkeit.....	51
E.2.1.5.1	Scratch-Assay.....	51
E.2.1.5.2	μ-Slide Chemotaxis ^{3D} -Assay.....	52
E.2.1.5.3	Transwellassay.....	55
E.2.1.5.4	Adhäsionsassay.....	56
E.2.2	Molekularbiologische Techniken.....	57
E.2.2.1	Transfektion von hMSCs.....	57
E.2.2.2	Luziferaseassay.....	57
E.2.2.3	Isolierung von RNA aus hMSCs.....	58
E.2.2.3.1	mRNA-Isolierung.....	58
E.2.2.3.2	miRNA- und snoRNA-Isolierung.....	59
E.2.2.4	Synthese von cDNA aus RNA.....	60
E.2.2.4.1	cDNA-Synthese aus mRNA.....	60
E.2.2.4.2	cDNA-Synthese aus miRNA und snoRNA.....	60
E.2.2.5	Analyse von cDNA mittels qRT-PCR.....	61
E.2.2.5.1	mRNA-stämmige cDNA (Rotor-LightCycler).....	61
E.2.2.5.2	miRNA- und snoRNA-stämmige cDNA (Rotor-LightCycler).....	61
E.2.2.5.3	mRNA-stämmige cDNA (Multiwell-LightCycler).....	62
E.2.3	Proteinbiochemische Techniken.....	62
E.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	62

E.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	63
E.2.3.3	SDS-PAGE und Westernblot.....	63
E.2.3.4	Zymographie.....	65
E.2.3.5	Co-Immunopräzipitation.....	67
E.2.4	Durchführung und statistische Datenanalyse	67
F	ERGEBNISSE	69
F.1	Knockdown von RECK in hMSCs.....	69
F.2	Einfluss von RECK auf das Wachstum von hMSCs	70
F.3	Einfluss von RECK auf die Beweglichkeit von hMSCs	71
F.3.1	Effekte von RECK auf die Invasion und MMP-/TIMP-Expression	71
F.3.1.1	Invasionspotential	71
F.3.1.2	Expression von MMPs und TIMPs	72
F.3.2	Effekte von RECK auf die hMSC-Migration.....	73
F.3.2.1	Wundheilungspotential	73
F.3.2.2	Adhäsionspotential	74
F.3.2.3	Chemotaktisches und migratorisches Potential	75
F.3.2.3.1	Etablierung des μ -Slide Chemotaxis ^{3D} -Assays.....	75
F.3.2.3.2	Migrationsanalyse	76
F.3.2.4	Transkription zellbeweglichkeitsassoziierter RNAs	77
F.3.2.4.1	Biosynthese ausgewählter mRNAs.....	77
F.3.2.4.2	Biosynthese ausgewählter miRNAs.....	79
F.4	Rolle von RECK bei der Differenzierung von hMSCs.....	79
F.4.1	Abhängigkeit der Differenzierung von der RECK-Expression.....	79
F.4.2	Abhängigkeit der RECK-Expression von der Differenzierung.....	81
F.4.3	RECK und der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg	81
F.4.3.1	Auswirkung von β -Catenin auf die Transkription von PPAR γ	81
F.4.3.2	Auswirkung von RECK auf Expression und Aktivität von β -Catenin.....	82

F.4.3.3	Mechanismen der RECK-abhängigen Stabilisierung von β -Catenin	83
F.4.3.3.1	Transkription von β -Catenin	83
F.4.3.3.2	Interaktion mit DKK1	84
G	DISKUSSION	85
G.1	Abhängigkeit der RECK-Expression vom Zelltyp	85
G.2	Auswirkungen von RECK auf das Zellwachstum	85
G.2.1	Zellproliferation.....	85
G.2.2	Zellvitalität	86
G.3	Steuerung der Zellbeweglichkeit durch RECK	86
G.3.1	Invasion	86
G.3.2	Migration	87
G.4	RECK als molekularer Schalter der Differenzierung.....	89
G.4.1	Auswirkungen von RECK auf Osteogenese und Adipogenese.....	89
G.4.2	Auswirkungen von Osteogenese und Adipogenese auf RECK.....	90
G.5	Positive Effekte von RECK auf den kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg	91
G.6	Zusammenfassung zur Rolle von RECK in hMSCs.....	92
G.7	Therapeutische Relevanz von RECK.....	92
H	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
I	DANKSAGUNG	119

A Abkürzungsverzeichnis

Kurzform	Vollständige Bezeichnung
ADAM10	a disintegrin and metalloprotease domain 10
ADRM1	adhesion regulating molecule 1
Ago	Argonaute
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA	analysis of variance
APC	adenomatous polyposis coli
APN	Aminopeptidase N
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
AXIN	axis inhibition protein
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BAR	β-Catenin-aktivierter Reporter
BCL9	B-cell lymphoma 9
BHLHB8	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 8
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMPRI A	bone morphogenetic protein receptor type-1A
bp	Basenpaar(e)
CCD	charge-coupled device
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
C/EBPβ	CCAAT/enhancer-binding protein beta
Cer	cerberus-related protein
c-Jun	cellular Jun
CKIα	casein kinase I isoform alpha
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
COM	displacement of the center of mass
CRD	cysteinreiche Domäne
CUL1	Cullin 1
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DKK1	Dickkopf-verwandtes Protein 1
DL-DTT	DL-Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA (cytosine-5)-methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DPBS-T	DPBS-Tween [®] 20
DSLR	digital single lens reflex
DVL	Dishevelled
ECL [™]	enhanced chemiluminescence

Kurzform	Vollständige Bezeichnung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	EGF receptor
eIF-2 α	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor-2 alpha
EMILIN3	elastin microfibril interfacier 3
EPS	electrophoresis power supply
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FBXW1A	F-box/WD repeat-containing protein 1A
FDA	Food and Drug Administration
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
FKS	fötales Kälberserum
FMI	forward migration index
Fra-1	FOS-related antigen 1
FRAT1	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1
Frzb-1	frizzled-related protein 1
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
FZD	Frizzled
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBP	GSK3-bindendes Protein
GC	Guanin/Cytosin
GDE2	Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase 2
gDNA	genomic DNA
GHRHR	growth hormone-releasing hormone receptor
GITC	Guanidinisothiocyanat
glut1	Glukosetransporter 1
gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Gpr124	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 124
GRP78	glukosereguliertes Protein, 78 kDa
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
HER-2/Neu	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HGFR	hepatocyte growth factor receptor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HLA-DR	human leukocyte antigen-D related
hMSC	human MSC
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1
Hs	<i>homo sapiens</i>
Hsc70	heat shock cognate 70
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
HuS	Humanserum
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICAM2	intercellular adhesion molecule 2

Kurzform	Vollständige Bezeichnung
IFN- γ	Interferon gamma
IGF1	insulin-like growth factor 1
IGF1R	IGF1 receptor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6RA	IL-6-Rezeptor alpha
IR1	inverted hexanucleotide repeat separated by 1 nucleotide
JAB1	Jun activation domain-binding protein 1
kDa	Kilodalton
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LEF	lymphoid enhancer factor
LFA3	lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen 3
LPHN2	Latrophilin 2
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
MDA	multi-dimensional acquisition
MENA	mammalian enabled
miR / miRNA	micro RNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRF4	muskelspezifischer Regulationsfaktor 4
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal stem cell
MSCA-1	MSC antigen-1
MSCGM TM	MSC growth medium
MT-MMP	Membran-Typ-MMP
MTA1	metastasenassoziiertes Protein 1
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MyoD	Myoblastendeterminationsprotein 1
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ / NADH	Nicotinamidadeninukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFIA	nukleärer Faktor I/A
NOTUM	notum pectinacetylerase homolog
NP-40	Nonidet TM P-40
nt	Nukleotid(e)
N-WASP	neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
Oct-4	octamer-binding protein 4
p.A.	<i>pro analysi</i>
PACT	protein activator of the interferon-induced protein kinase
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PERK	protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase
PGE2	Prostaglandin E2
plvap	plasmalemma vesicle-associated protein

Kurzform	Vollständige Bezeichnung
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Porc	Porcupine
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
pre-miRNA	precursor miRNA
pri-miRNA	primary miRNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pygo	pygopus homolog
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RAD51	DNA repair protein RAD51 homolog 1
Ran-GTP	Ras-verwandtes nukleäres Protein mit Guanosintriphosphat
RbAp46	Retinoblastom-assoziiertes Protein 46
RECK	reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
RELM β	resistin-like molecule beta
rHRE	reverse hypoxia-responsive element
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RPLP0	ribosomal protein, large, P0
rpm	revolutions per minute
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT	Reverse Transkription
RUNX2	Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
SKP1	S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 1
SMAD	mothers against decapentaplegic homolog
SNORD44	snoRNA, C/D box 44
snoRNA	small nucleolar RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SP	Spezifitätsprotein
SPI	Serinproteaseinhibitor
SSEA-4	stadiumspezifisches embryonisches Antigen-4
STAT3	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
STRO-1	stromal precursor antigen-1
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS-Tween [®] 20
TCF	T-Zell-Faktor
Tgat	triple functional domain-related transforming gene in adult T-cell leukemia tumor cells
TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TLE1	transducin-like enhancer protein 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha

Kurzform	Vollständige Bezeichnung
TRBP	trans-activation response RNA-binding protein
TRE	12- <i>O</i> -tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-responsive element
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
ULT	ultra low temperature
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
UV	Ultraviolett
UW	University of Washington
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
v-Ki- <i>ras</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
w/v	weight per volume
WIF-1	Wnt inhibitory factor 1
Wnt	wingless-type mouse mammary tumor virus integration site
WST-8	water-soluble tetrazolium-8
WTX	Wilms-Tumorgen auf dem X-Chromosom
Zn ²⁺	Zinkion
ZNF814	Zinkfingerprotein 814

B Übersicht

B.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Rolle des zellmembranebundenen Glykoproteins RECK in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs). Bisher wurde RECK vornehmlich in Tumorzellen untersucht, wo eine verringerte RECK-Expression häufig mit einer verstärkten zellulären Invasivität und Malignität dieser Tumoren korreliert. In physiologisch gesunden Zellen, wie hMSCs, ist über die Rolle von RECK bislang nur sehr wenig bekannt. Charakteristisch für hMSCs ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung in mesenchymale Zelltypen wie Knochen- und Fettzellen. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften gelten hMSCs als vielversprechendes Hilfsmittel für zelltherapeutische Anwendungen in der Klinik. Voraussetzung hierfür ist jedoch ein tieferes Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen, die das Verhalten von hMSCs steuern. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Bedeutung von RECK für Wachstum, Beweglichkeit und Differenzierung von hMSCs zu untersuchen.

Das Abschalten der endogenen RECK-Expression durch einen RNAi-vermittelten Knockdown in hMSCs ergab keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Teilungsrate oder der mitochondrialen Stoffwechselaktivität dieser Zellen. Des Weiteren zeigten hMSCs in Abwesenheit von RECK, entgegen bisheriger Erkenntnisse in Tumorzellen, keine Änderung im Proteolyse-abhängigen Invasionsverhalten. Dies stand im Einklang mit der Beobachtung, dass die basalen Biosyntheseraten EZM-degradierender Proteinase wie MMP-2 und MT1-MMP oder des endogenen MMP-Inhibitors TIMP-1 in RECK-defizienten hMSCs unverändert blieben. Allerdings gelang erstmals der Nachweis, dass RECK als Repressor der zellulären Expression von TIMP-2 und TIMP-3 fungiert. Darüber hinaus wiesen RECK-Knockdown-hMSCs trotz ihrer vergleichsweise besseren Adhäsion an Plastikoberflächen eine schnellere und gerichtete Migration als Kontrollzellen auf. Dieser Umstand konnte dadurch erklärt werden, dass hMSCs in Abwesenheit von RECK ein deutlich erhöhtes chemotaktisches Potential aufwiesen. Weiterführende Untersuchungen ließen jedoch keinen signifikanten Einfluss von RECK auf die Transkription der migrationsrelevanten Gene *IGF1*, *MENA*, *N-WASP* und *VEGFA* oder der miRNAs let7f, miR-124, miR-126-3p, miR-126-5p und miR-335 erkennen. Offenbar sind davon abweichende, bislang unbekannte Faktoren an der Regulation der chemotaktischen Migration von hMSCs durch RECK beteiligt. Untersuchungen zur Differenzierung von hMSCs zeigten, dass RECK in diesem Zusammenhang die Funktion eines molekularen Schalters erfüllt: RECK hemmt einerseits die Adipogenese von hMSCs und fördert andererseits deren Osteogenese, wie Zellfärbungen mit Oil Red O und Alizarin Red S sowie Quantifizierungen der

Differenzierungsmarker PPAR γ und ALP belegten. Zudem gelang der Nachweis, dass die endogene Biosynthese von RECK während der Adipogenese von hMSCs herunter- und während deren Osteogenese hochreguliert wird.

Diese Beobachtungen lassen auf die Existenz reziproker Rückkopplungsschleifen hinsichtlich der RECK-Expression sowie der adipogenen und osteogenen Differenzierung in hMSCs schließen. Ferner wird die Adipogenese von hMSCs durch den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg gehemmt, was in β -Catenin-Knockdown-Zellen durch den Nachweis einer gegenüber Kontrollzellen verstärkten Biosynthese von PPAR γ bestätigt werden konnte. Außerdem wurde erstmals gezeigt, dass RECK als positiver Modulator der Aktivität des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungiert. So wiesen hMSCs in Abwesenheit von RECK eine Abnahme von β -Catenin auf Proteinebene, eine reduzierte Aktivität β -Catenin-abhängiger Promotoren und verringerte mRNA-Mengen der bekannten positiven Wnt/ β -Catenin-Zielgene *DKK1*, *AXIN2* und *RUNX2* auf. Dabei induziert RECK seinen positiven Effekt auf die β -Catenin-Aktivität, ohne auf die Transkription von β -Catenin einzuwirken oder direkt an der Zelloberfläche mit DKK1, dem wichtigsten Inhibitor des Signalwegs, zu interagieren.

Zusammengefasst belegen diese Studien, dass RECK in hMSCs eine bedeutende Funktion als Aktivator der Osteogenese ausübt und gleichzeitig als Repressor der Adipogenese und der chemotaktischen Migration dieser Zellen fungiert. Eine mögliche therapeutische Relevanz dieser Erkenntnisse muss in weiterführenden experimentellen und klinischen Untersuchungen verifiziert werden. Denkbar wäre ein zelltherapeutischer Einsatz RECK-überexprimierender hMSCs bei Patienten mit Osteoporose, um durch die Substituierung geschädigter Zellen mit funktionellen Osteoblasten den Heilungsverlauf im Knochengewebe zu fördern.

B.2 Summary

The present thesis is dealing with the role of the cell membrane-bound glycoprotein RECK in human mesenchymal stem cells (hMSCs). Up to now, RECK has been primarily investigated in cancer cells, where a reduced expression of RECK often correlates with an increased cellular invasiveness and malignancy of these tumors. In healthy cells such as hMSCs, there is very few information about the role of RECK so far. A characteristic feature of hMSCs is their ability of self-renewal and differentiation into mesenchymal cell types such as bone and fat cells. Because of their particular properties, hMSCs represent a promising tool for therapeutical applications in the clinic. However, this requires a deeper understanding of the cellular and molecular mechanisms that control the behavior of hMSCs. Therefore, the aim of the present study was to investigate the importance of RECK for growth, motility and differentiation of hMSCs.

Upon abrogation of endogenous RECK expression in hMSCs by using RNAi-mediated knock-down technology did not alter proliferation and mitochondrial metabolic activity of these cells. Furthermore, in absence of RECK the hMSCs showed no changes in proteolytic invasion which differs from previous findings in cancer cells. These data in hMSCs were consistent with the observation, that the basal biosynthesis rates of ECM-degrading proteases such as MMP-2 and MT1-MMP as well as levels of the endogenous MMP inhibitor TIMP-1 remained unchanged in RECK-deficient hMSCs. However, RECK was demonstrated for the first time to act as a repressor of the cellular expression of TIMP-2 and TIMP-3 in this context. Despite their increased adhesion to plastic surfaces, RECK-depleted hMSCs exhibited a faster and more directed migration in comparison to control cells. This circumstance could be explained by the fact that hMSCs indicated a clearly elevated chemotactic potential in absence of RECK. However, subsequent investigations revealed no significant influence of RECK on the transcription of genes and miRNAs relevant in cell migration such as *IGF1*, *MENA*, *N-WASP* as well as *VEGFA* and *let7f*, *miR-124*, *miR-126-3p*, *miR-126-5p* and *miR-335*, respectively. These findings indicate that other so far unknown factors are crucial in the regulation of the chemotactic migration of hMSCs. Studies on hMSC differentiation revealed a role of RECK as a molecular switch in this context: RECK inhibits the adipogenesis of hMSCs and simultaneously promotes osteogenesis, as demonstrated by specific cell staining using Oil Red O and Alizarin Red S as well as quantification of the differentiation markers PPAR γ and ALP, respectively. On the other hand, endogenous protein levels of RECK were found to be downregulated during adipogenesis and up-regulated during osteogenesis by hMSCs.

These observations suggest the existence of reciprocal feedback loops between RECK expression levels and adipogenic or osteogenic differentiation in hMSCs. The canonical

Wnt/ β -catenin pathway is a well-known inhibitor of adipogenesis in hMSCs. This was confirmed by the detection of an increased biosynthesis of PPAR γ in β -catenin knockdown cells as compared to control cells. Moreover, it was shown for the first time that RECK acts as a positive modulator of the activity of the canonical Wnt/ β -catenin pathway. This was demonstrated in RECK-depleted hMSCs by their decreased β -catenin protein levels, reduced activity of β -catenin-dependent gene promoters and diminished transcription of direct Wnt/ β -catenin target genes including *DKK1*, *AXIN2* and *RUNX2*. Interestingly, RECK's effect on β -catenin activity is not a result of alterations in β -catenin transcription or cell surface interaction of RECK with DKK1, the most important inhibitor of the pathway.

Taken together, these studies provide evidence that RECK plays important roles in hMSCs by activating osteogenesis while repressing adipogenesis and chemotactic migration in these cells. The therapeutic relevance of these findings has to be verified in further experimental and clinical investigations. It can be speculated that RECK-overexpressing hMSCs upon application into patients with osteoporosis may substitute damaged cells with functional osteoblasts and thus might promote healing of bone tissue.

C Einleitung

C.1 Humane mesenchymale Stammzellen

C.1.1 Eigenschaften von hMSCs

hMSCs erhielten ihre heutige Bezeichnung 1991 von Arnold Caplan [1] und zählen zu den sogenannten „multipotenten mesenchymalen Stromazellen“. Dieser Oberbegriff kommt anstelle von „humanen mesenchymalen Stammzellen“ zur Anwendung, wenn bei einer Reinkultur kein Stammzellcharakter nachgewiesen wurde oder eine Mischkultur vorliegt, in der nicht alle Zellen eine Stammzellaktivität aufweisen [2]. 1968 analysierten Friedenstein *et al.* die Differenzierung verschiedener Zelltypen aus Knochenmarkproben von Mäusen. Dabei fiel auf, dass bestimmte Zellen, später bekannt als MSCs, unter geeigneten Kultivierungsbedingungen dazu fähig waren, sich zu spezialisierten Zellen des Mesenchyms, den Fibroblasten, weiterzuentwickeln [3]. Eine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe erbrachte 1976 den Nachweis, dass MSCs nach Bestrahlung in der Lage sind, ihre ursprüngliche Anzahl wieder herzustellen, und somit die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen [4]. Außerdem wurden 1982 durch murine *in vivo*-Transplantationsansätze die zwei wichtigsten Schlüsseleigenschaften von MSCs bestätigt, nämlich in andere Zelltypen auszudifferenzieren sowie sich selbst zu erneuern [5]. Im menschlichen Knochenmark sind etwa 0,001-0,01% aller Zellen hMSCs [6].

C.1.2 Immunologische Typisierung von hMSCs

Um hMSCs klar von anderen Zelltypen abgrenzen zu können, wurden 2006 von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie spezifische immunologische Unterscheidungskriterien vorgeschlagen: Demnach sollen diese Zellen die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 exprimieren. Zudem sind negative Nachweise auf CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR erforderlich [7].

Speziell für hMSCs aus dem Knochenmark wurden 43 weitere CDs [8,9,6,10,11] sowie BMP1A [9], Nanog-3 [12], Oct-4 [12], SSEA-4 [13] und STRO-1 [9] als positive Marker ebenso wie zwei weitere CDs als negative Marker [9] für die Identifikation beschrieben. CD44 [6,14], CD56 [11], CD146 [15], MSCA-1 [10] und Nestin [10] werden von diesen Zellen hingegen heterogen in Abhängigkeit von endo- und exogenen physiologischen Faktoren wie ihrer Passagenzahl oder dem Sauerstoffgehalt in ihrer unmittelbaren Umgebung exprimiert.

C.1.3 Funktionen von hMSCs

C.1.3.1 Differenzierung

MSCs aus dem Knochenmark sind durch ihre Multipotenz in der Lage, wichtige Zelltypen mesodermalen Ursprungs zu bilden. Dazu zählen charakteristischerweise Knochen-, Knorpel- und Fettzellen [6] sowie Stromazellen, welche die Hämatopoese unterstützen [16]. Eine keimblattübergreifende, etwa endodermale Differenzierung in Leber- [17] und Muskelzellen [18] ist jedoch ebenso möglich wie ihre Umwandlung in Nervenzellen des Ektoderms [19]. Aufgrund dieser als Transdifferenzierung bezeichneten Fähigkeit, unter passenden Kultivierungsbedingungen keimblattübergreifend zu differenzieren, werden MSCs mittlerweile auch als pluripotent bezeichnet [20] (Abb. 1).

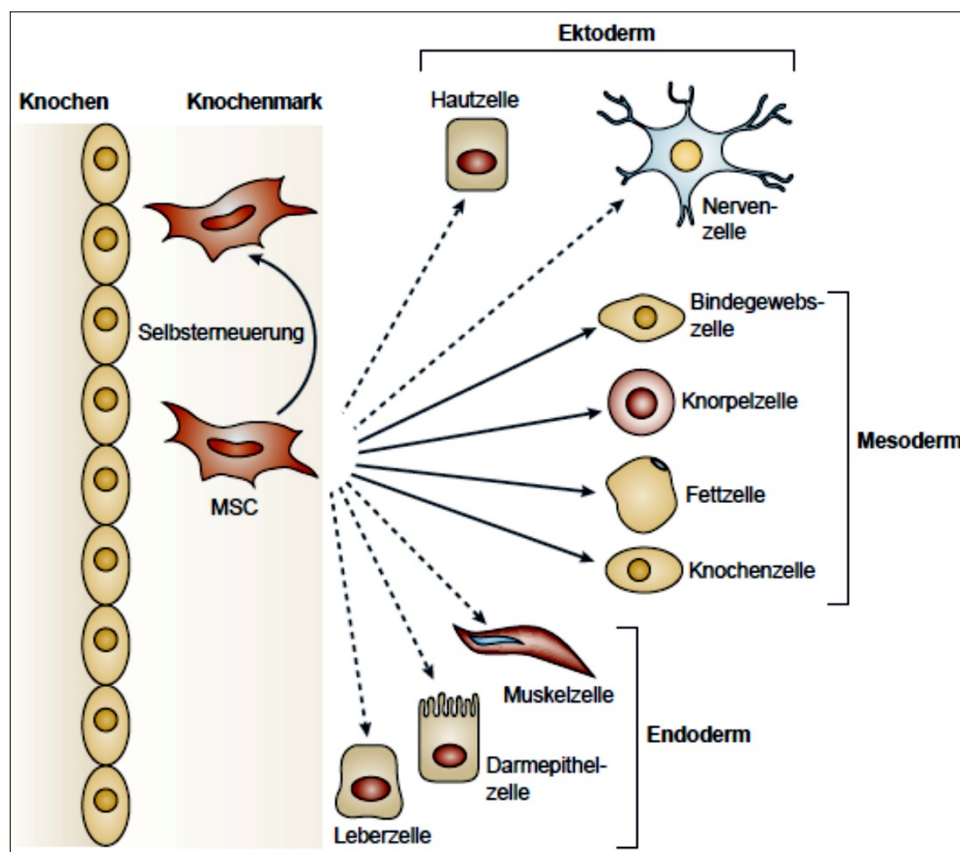


Abb. 1 Differenzierungspotential von MSCs. Schematische Darstellung ausgewählter multi- (—) und pluripotenter (- -) Differenzierungen sowie der Selbsterneuerung von MSCs aus einer Stammzellnische im Knochenmark. (Bildmaterial von Uccelli *et al.*, 2008 mit Modifikationen [21])

Diese Eigenschaft ist jedoch insofern mit Vorsicht zu betrachten, als es *in vivo* vereinzelt zu Fusionen von MSCs mit nicht mesodermalen Empfängerzellen kommt und dann fälschlicherweise von einer Transdifferenzierung ausgegangen wird [22].

Ähnlich vielfältig wie ihr Differenzierungspotential sind auch die Organe, in denen MSCs außerhalb des Knochenmarks auftreten können. So ist deren Isolierung aus perivaskulären Wachstumsnischen in Bauchspeicheldrüse, Gehirn, Leber, Lunge, Milz, Niere, Skelettmuskeln, Thymus und größeren Blutgefäßen möglich [23]. Ferner können diese Zellen aus Fettgewebe [24] und Haut [25] gewonnen werden, wobei ihre Umwandlungsfähigkeit in Osteo-, Chondro- und Adipozyten trotz voneinander abweichender Transkriptome vergleichbar ist [26]. Darüber hinaus macht es beispielsweise für die Regeneration von Knochen mit Hilfe von MSCs keinen Unterschied, ob letztere aus dem Fettgewebe oder dem Knochenmark stammen, solange die Zellen nur entsprechend lange in einem osteogenen Differenzierungsmedium vorinkubiert werden [27].

C.1.3.2 Immunmodulation

Eine weitere Schlüsseleigenschaft von MSCs ist ihr immunmodulatorisches Potential. Darunter versteht man ihre Fähigkeit, die Immunantwort eines Organismus abschwächen zu können. Dabei müssen sich die Zellen in einem inflammatorischen Milieu befinden, welches IFN- γ zusammen mit einem oder mehreren der drei Zytokine IL-1 α , IL-1 β und TNF- α enthält [28]. Das vielseitigste aller von MSCs bei der Immunmodulation sezernierten regulatorischen Proteine ist PGE2. Es blockiert sowohl die Proliferation als auch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen [29], verhindert die Reifung dendritischer Zellen [30], unterbindet die makrophagenvermittelte Migration neutrophiler Granulozyten [31] und hemmt die Proliferation von Helfer- und Effektor-T-Zellen [32]. Ferner inhibieren MSCs über bisher unbekannte humorale Faktoren die Proliferation von B-Lymphozyten [33]. Im Gegensatz zu diesen zellkontaktunabhängigen Effekten löst die direkte Interaktion mit MSCs bei Helfer- oder Effektor-T-Zellen eine Apoptose aus, welche in der Folge die Proliferation regulatorischer T-Zellen durch Makrophagen fördert [34].

C.1.4 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten von hMSCs

Aufgrund dieser vielfältigen biologischen Eigenschaften stellen MSCs eine vielversprechende Grundlage für eine Vielzahl therapeutischer Anwendungen dar. So wurde ihre Differenzierungskapazität bereits für die erfolgreiche Zellregeneration bei Vernarbungen des Lebergewebes [35], Knorpelschäden [36], Störungen des Knochenstoffwechsels [37], Schlaganfällen [38] und Herzmuskelerkrankungen [39] eingesetzt. Zudem gelang durch das immunmodulatorische Potential dieser Zellen eine Behandlung chronischer Entzündungen von Haut [40], Skelettmuskeln [41], Nervenfasern [42] und dem Verdauungstrakt [43] sowie die Vermeidung von

Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen [44]. Bis jedoch ein auf hMSCs basierendes Behandlungsverfahren offiziell zugelassen werden kann, sind zahlreiche klinische Studien mit positivem Verlauf erforderlich. Nach Informationen des nationalen amerikanischen Gesundheitsinstituts (www.clinicaltrials.gov) wurden mit hMSCs bereits 286 Studien durchgeführt, 45 Studien sind noch aktiv und 301 Studien befinden sich derzeit in der Planungs- oder Rekrutierungsphase.

Bislang erhielt allerdings kein hMSC-basierendes Konzept eine Medikamentenzulassung durch die FDA, was unter anderem auf einige Schwierigkeiten bei der therapeutischen Anwendung zurückzuführen ist. Über den Blutkreislauf verabreichte MSCs erreichen nämlich nicht immer das gewünschte Zielorgan des Patienten, da es zur Adhäsion an den Blutgefäßwänden kommen kann [45]. Zudem kann von den Zellen Gefahr für den aufnehmenden Organismus ausgehen, wenn diese die Invasivität [46] und Proliferation [47] bereits vorhandener Krebszellen fördern oder aufgrund chromosomaler Mutationen selbst maligne Tumore ausbilden [48]. Die Auswahl geeigneter MSCs für therapeutische Zwecke wird außerdem von ihrem heterogenen Proliferations- und Differenzierungspotential [49], dem sukzessiven Verlust ihrer Multipotenz mit zunehmenden Zellteilungen [50] sowie der Abhängigkeit ihrer Differenzierung vom Kultivierungsuntergrund [51] erschwert. Diese und zahlreiche weitere Hürden gilt es für aktuelle und zukünftige Studien zu überwinden, um MSCs für medizinische Anwendungen beim Menschen nutzbar zu machen.

C.2 Zellbeweglichkeit

C.2.1 Zelluläre Fortbewegungsarten

Um von einem Ort zum anderen zu gelangen, ist die physische Interaktion einer Zelle mit ihrer Umgebung erforderlich. Eukaryotische Zellen haben dafür vielfältige Strategien entwickelt: Urgeschlechtszellen bei der Embryogenese aber auch Leukozyten bewegen sich auf amöboide Weise fort. Während erstere dabei bläschenförmige Ausstülpungen aufweisen [52], bilden letztere eher Pseudo- und Filopodien aus [53]. Für Fibroblasten hingegen ist die mesenchymale Fortbewegung typisch [54]. Zudem können Zellen auch in Gruppen wandern und Distanzen in Form linearer Zellketten [55] oder als flächendeckender Zellverbund [56] überwinden. Ferner zeigten Beobachtungen an Fibrosarkomzellen, dass Wechsel zwischen zwei Fortbewegungsarten möglich sind [57] (Abb. 2a). Die Wahl der Fortbewegungsart wird von zahlreichen zellulären Parametern sowie der Beschaffenheit der EZM im jeweiligen Gewebe beeinflusst. Eine Fortbewegungsart kann somit von jeder beliebigen Zelle genutzt werden, solange diese die erforderlichen Eigenschaften besitzt und sich zudem in der passenden Umgebung

befindet (Abb. 2b). HMSCs, wie auch die weiter ausdifferenzierten Fibroblasten, nutzen primär die mesenchymale Fortbewegungsart, die sich unter anderem durch eine starke Zell-EZM-Adhäsion und dreidimensionale Beweglichkeit mit Hilfe der Proteolyse definiert. Appliziert man hMSCs in die Blutbahn, finden sich diese Zellen nach einer gewissen Zeit in zahlreichen Organen des Empfängers wieder, beispielsweise in der Haut und in Knochen [58].

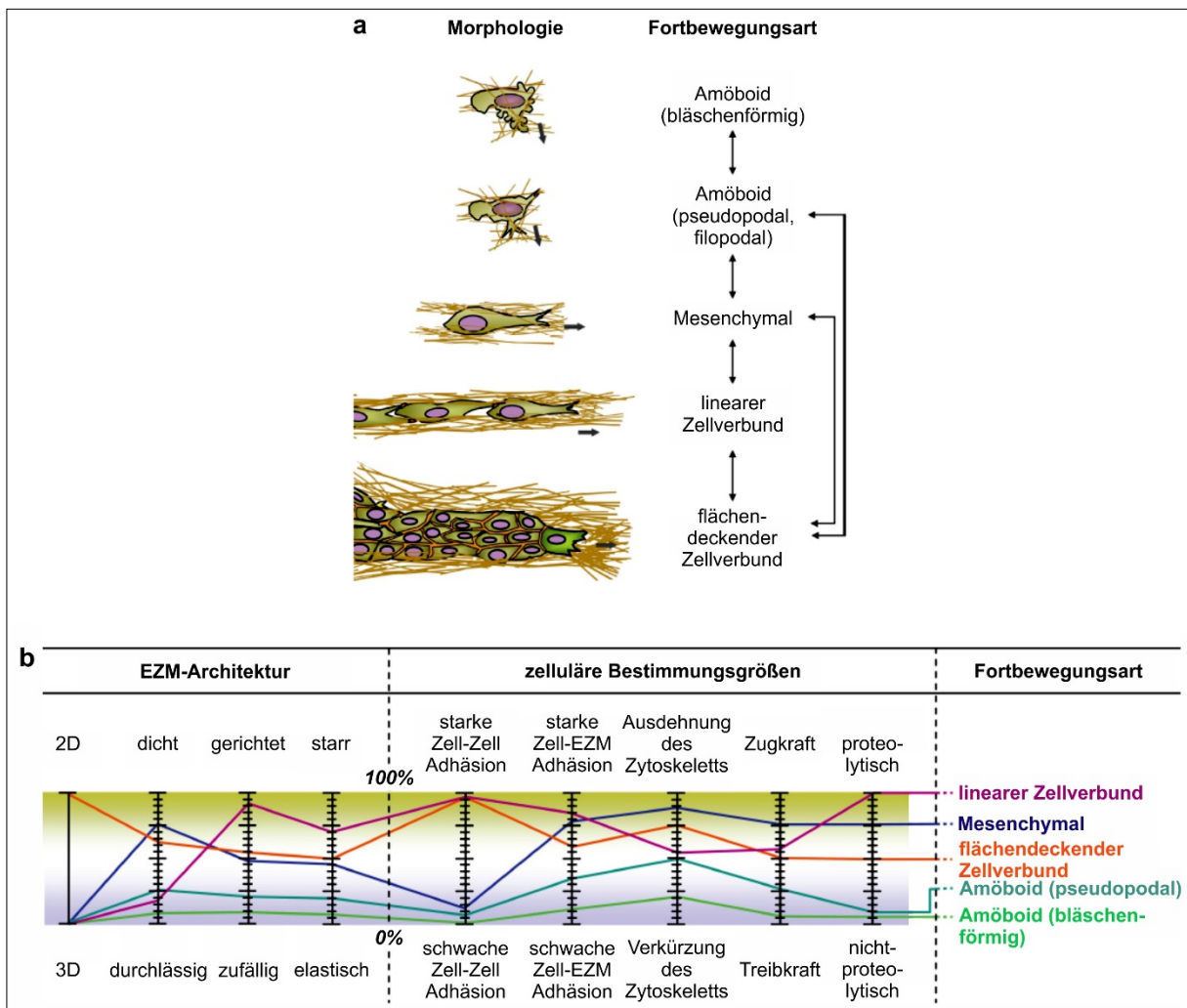


Abb. 2 Zelluläre Migration und Invasion. (a) Schematische Darstellung verschiedener Fortbewegungsarten. **(b)** Charakterisierung der Fortbewegungsarten durch das „Tuningmodell“. Jede Determinante besitzt dabei eine Skalierung mit Abstufungen von 5% und 25%, um relative Unterschiede graphisch hervorzuheben. (Bildmaterial von Friedl und Wolf, 2010 mit Modifikationen [59])

C.2.2 Migration und Invasion

C.2.2.1 Definitionen

Migration ist ein Überbegriff für die zufällige (ungerichtete) oder chemotaktische (gerichtete) Fortbewegung von Zellen mit Hilfe von Zelladhäsionsproteinen.

Der Terminus Invasion jedoch impliziert zusätzlich die Fähigkeit von Zellen, mittels extrazellulärer proteolytischer Aktivität durch Barrieren aus EZM zu migrieren.

C.2.2.2 Rolle von Chemotaxis

Chemotaxis beschreibt die positive oder negative Beeinflussung der Bewegungsrichtung einer Zelle durch einen Stoffkonzentrationsgradienten. Bei positiver Chemotaxis erfolgt eine gerichtete Bewegung von Zellen zur Quelle eines Lockstoffes in Form löslicher Proteine [60]. Die Wahrnehmung dieser meist als Chemokine bezeichneten Proteine erfolgt durch ihre Interaktion mit spezifischen, an der Zelloberfläche befindlichen Chemokinrezeptoren. Die Nomenklatur eines Chemokins leitet sich von der Abfolge und Anzahl der Cysteine an seinem Aminoterminus ab (Abb. 3).

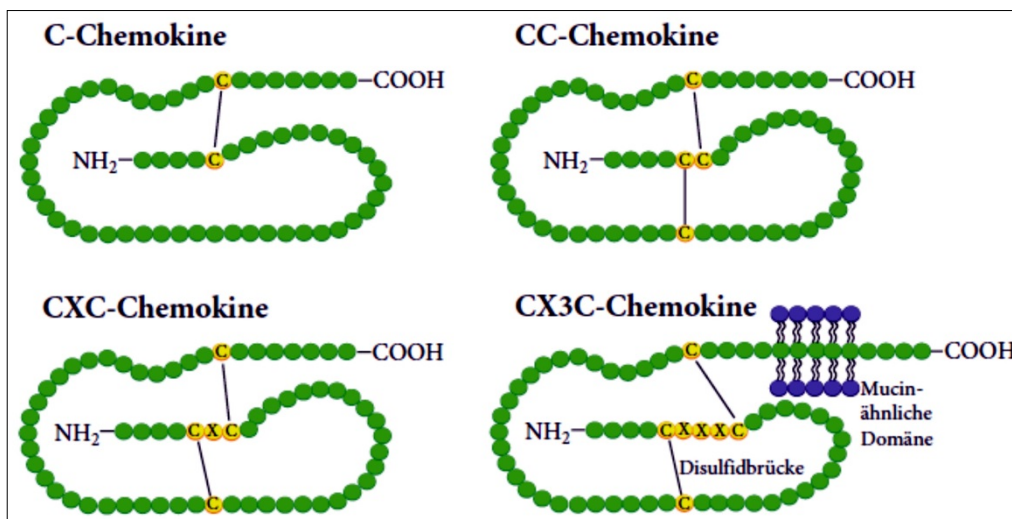


Abb. 3 Einteilung von Chemokinen nach ihrer Struktur. Schematische Übersicht der vier bekannten Chemokinfamilien. Die an den charakteristischen intramolekularen Bindungsmotiven beteiligten Cysteine (C) und andere Aminosäuren (X) sind gelb hervorgehoben. Amino- (NH₂-) und Carboxy- (-COOH) Termini sind in Summenformeln dargestellt. (Bildmaterial von Knerlich-Lukoschus und Held-Feindt, 2015 mit Modifikationen [61])

HMSCs verfügen über die CC-Chemokinrezeptoren 1-10 und die CXC-Chemokinrezeptoren 1-7 sowie den C- und den CX3C-Chemokinrezeptor [62-64].

Darüber hinaus ist bekannt, dass hMSCs zusätzlich die Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR, FGFR2, HGFR, IGF1R, PDGFR α , PDGFR β und TIE1 besitzen, deren Expression die chemotaktischen Aktivitäten ebenfalls maßgeblich beeinflusst [65].

C.2.2.3 Bedeutung der Adhäsion

Adhäsion umfasst die Anheftung einer Zelle an benachbarte Zellen oder Komponenten der EZM. Ähnlich wie sich ein Mensch mit seinen Händen festhält und mit seinen Füßen

fortbewegt, nutzen hMSCs eine Reihe von Zelladhäsionsproteinen, um den Zellverbund aufrecht zu erhalten oder die Zugkräfte ihres Zytoskeletts in Bewegungsenergie umzusetzen. Zell-Zell-Kontakte von hMSCs finden über ALCAM, ICAM2, LFA3, P-Selektin und VCAM1 statt, während die Interaktion mit der EZM zu Fortbewegungszwecken durch Heterodimere aus sechs α - und drei β -Integrinuntereinheiten erfolgt [66,67] (Abb. 4).

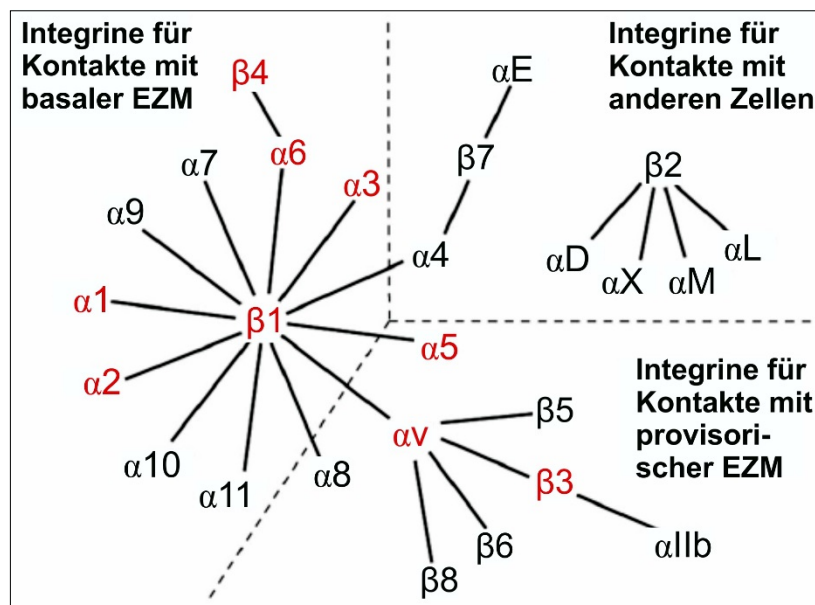


Abb. 4 Integrinuntereinheiten und ihre Heterodimere. Schematische Übersicht der 18 α - und 8 β -Integrinuntereinheiten. Die 24 bekannten Heterodimere sind mit Verbindungsstrichen (—) gekennzeichnet. In hMSCs exprimierte, rot hervorgehobene Untereinheiten bilden 8 verschiedene Integrinvarianten aus. (Bildmaterial von Zhang und Chen, 2012 mit Modifikationen [68])

Eine dieser Varianten, Integrin $\alpha v \beta 3$, fungiert als Rezeptor für EZM-Proteine wie Fibronectin [69], Kollagen I [70], Laminin [71], Osteopontin [72], Tenascin [73], Thrombospondin [74] und Vitronectin [75] sowie für Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor [76]. Auch die Anheftung von hMSCs an künstliche Plastikoberflächen *in vitro* [7] ist wahrscheinlich auf die Mitwirkung von $\alpha v \beta 3$ zurückzuführen. Osteogen ausdifferenzierte hMSCs, so genannte Osteoblasten, adhären in serumhaltigem Medium über polystyroladsorbiertes Vitronectin an Kultivierungsgefäßoberflächen [77]. Unter serumfreien Bedingungen hingegen nutzen Osteoblasten eigens synthetisiertes Fibronectin für die Adhäsion an Polystyrol, Glas, Aluminium und Stahl [78]. Vermutlich dienen Vitronectin und Fibronectin auch bei undifferenzierten hMSCs zusammen mit dem Integrin $\alpha v \beta 3$ als Bindeglieder zwischen der Zelle und der natürlichen oder künstlichen Oberfläche, auf der sie sich fortbewegt.

C.2.2.4 Einfluss der Proteolyse

Die größte und physiologisch bedeutendste Gruppe EZM-degradierender Proteasen ist die der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Wie ihr Name schon andeutet, degradieren diese Enzyme eine Vielzahl bekannter Proteine der EZM, und ihre Substratpräferenz ermöglicht die Einteilung in Untergruppen wie Gelatinasen, Matrilysine, Kollagenasen und Stromelysine (Abb. 5). Die 24 Vertreter der MMPs werden entweder als lösliche Enzyme aus den Zellen sezerniert oder sind durch spezielle Transmembrandomänen und GPI-Anker als sogenannte MT-MMPs fest auf der Zelloberfläche verankert. Die proteolytische Aktivität aller MMPs ist von einem Zn^{2+} in der katalytischen Domäne abhängig. Des Weiteren werden die meisten MMPs als inaktive Proenzyme gebildet. Diese so genannten Zymogene müssen erst durch Abspaltung ihres N-terminalen Propeptids in den aktiven Zustand überführt werden. Als natürlicher regulatorischer Gegenpart aktiver MMPs fungieren die TIMPs. Diese interagieren über ihren N-Terminus nicht-kovalent mit MMPs und bilden dabei einen Chelatkomplex mit dem katalytischen Zn^{2+} aus.

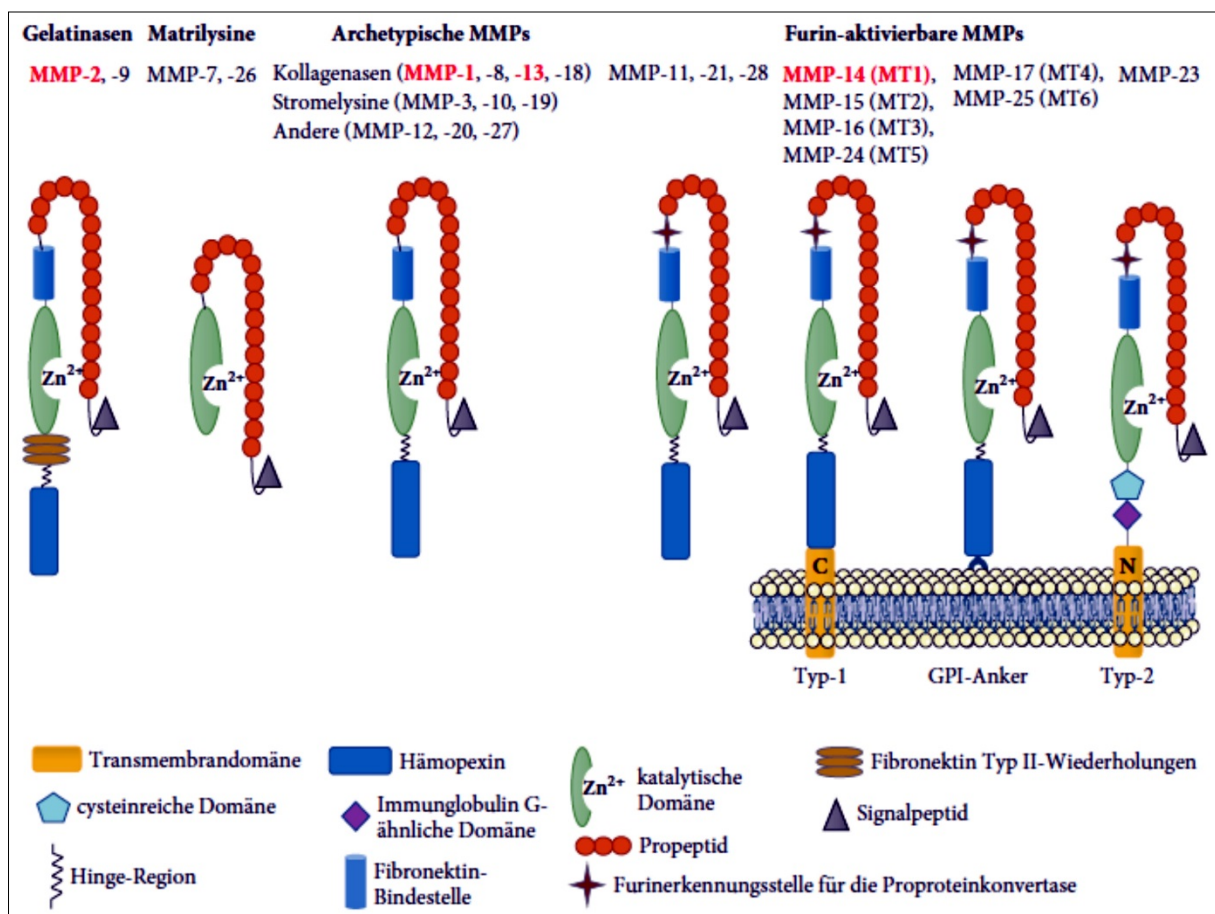


Abb. 5 Die Familie der MMPs. Schematische Darstellung der wichtigsten MMPs, eingeteilt nach ihren strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten und Unterschieden. Alle von hMSCs exprimierte MMPs sind dabei rot hervorgehoben. (Bildmaterial von Brkic *et al.*, 2015 mit Modifikationen [79])

Dies führt zu einer reversiblen Inhibierung der proteolytischen MMP-Aktivität [80]. HMSCs exprimieren MMP-1, MMP-2, MMP-13 und MT1-MMP [81,65] (Abb. 5). Dadurch ist es diesen Zellen möglich, Proteine wie Dermatansulfat-Proteoglykan, Fibronectin, Gelatin, Kollagene vom Typ IV, V und VII sowie Laminin und Vitronectin durch Degradation zu überwinden [82,83]. Darüber hinaus sezernieren hMSCs TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 [81,84]. MMP-1, MMP-2 und MMP-13 werden dabei von allen drei TIMPs gleichermaßen effektiv gehemmt, während MT1-MMP lediglich von TIMP-2 und TIMP-3 inhibiert wird [85].

C.3 Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs

C.3.1 Eigenschaften von RECK

Neben den TIMPs gibt es weitere Proteine, die als natürliche MMP-Inhibitoren fungieren. Dazu zählt das Glykoprotein RECK, das 1998 von Takahashi *et al.* in immortalisierten, embryonalen Mausfibroblasten beschrieben wurde [86].

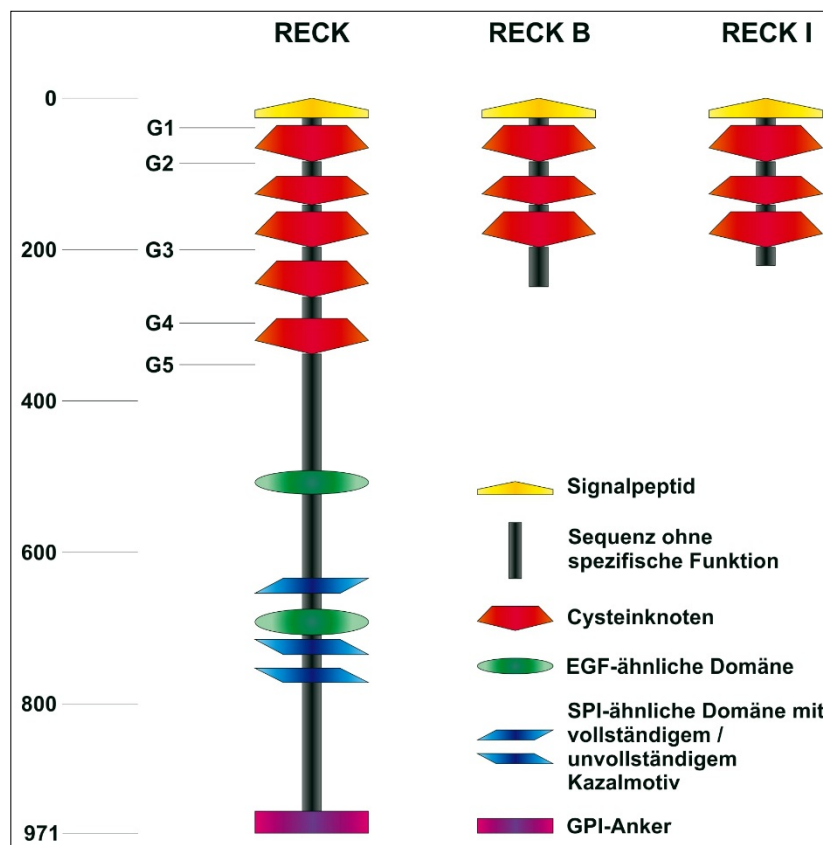


Abb. 6 Aufbau von RECK. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von RECK und seiner Spleißvarianten RECK B und RECK I. Die relativen Größen der einzelnen Abschnitte stimmen mit den durch Sequenzierung bestimmten Relationen überein. Die Skalierung gibt die AS-Positionen zwischen dem N-Terminus (AS 0) und dem C-Terminus (AS 971) wieder. Asparaginreste, welche als potenzielle Glykosylierungsstellen des Proteins fungieren, sind mit G1 (AS 39), G2 (AS 86), G3 (AS 200), G4 (AS 297) und G5 (AS 352) gekennzeichnet.

RECK besteht aus 971 AS, weist eine Molekülmasse von etwa 110 kDa auf und wurde bisher in 15 verschiedenen Gewebetypen des menschlichen Körpers nachgewiesen. Durch einen C-terminalen GPI-Anker ist RECK in der Plasmamembran integriert und besitzt neben einem ausgedehnten Cysteinemotiv und fünf potenziellen Glykosylierungsstellen auch Domänen, die Ähnlichkeiten mit EGF sowie SPI aufweisen (Abb. 6). Namensgebend für RECK sind sowohl die in der SPI-ähnlichen Domäne enthaltenen Kazal-Motive als auch der Cysteinanteil von 9%. Außerdem erfahren v-Ki-*ras*-transfizierte Zellen durch die Transfektion mit RECK-cDNA eine morphologische Reversion und erhalten so ihren flachen Phänotyp zurück [86]. Des Weiteren ist RECK in der Lage, Homodimere zu bilden [87].

Das im menschlichen Genom auf dem p-Arm (Bande 13.3) von Chromosom 9 lokalisierte *RECK*-Gen erstreckt sich über eine Länge von 87.551 bp, gliedert sich in 21 Exons sowie 20 Introns und enthält 13 SNPs [88]. Die Promotorregion von *RECK* weist eine Bindestelle für C/EBP β , zwei Bindestellen für SP1 und SP3 [89], einen IR1 [90] sowie zwei rHREs [91] auf. Das Gen wird von Zellen in eine mRNA mit 4.427 bp transkribiert, von der zwei Spleißvarianten mit 1.548 bp und 1.101 bp bekannt sind, die in verkürzte Formen von RECK mit 248 AS und 220 AS translatiert werden [92] (Abb. 6).

C.3.2 Molekulare Funktionen von RECK

C.3.2.1 Regulation der Proteolyse

RECK beeinträchtigt die Funktion von MMP-2, MMP-7, MMP-9 sowie MT1-MMP und MT4-MMP auf unterschiedliche Weise. Die Expression von RECK in Zellen reduziert am *MMP-9*-Promotor die Bindungsaffinität von Fra-1 und c-Jun zum TRE und blockiert so indirekt die Transkription von MMP-9 [93]. Ferner kann RECK die Sekretion von proMMP-9 aus der Zelle vermindern [86]. Darüber hinaus erfolgt durch direkte Interaktion von RECK mit MMP-9 [86], MMP-7 [87], MMP-2 und MT1-MMP [94] eine Inhibition der enzymatischen Aktivitäten dieser MMPs, wofür keine GPI-vermittelte Verankerung von RECK in der Plasmamembran erforderlich ist. Durch Bindung von RECK an MT1-MMP wird zudem die Aktivierung von proMMP-2 verhindert [94]. Auch proMT4-MMP kann in Gegenwart von RECK nicht aktiviert werden [95]. Für die beschriebenen Effekte auf MMPs sind zum einen die beiden C-terminalen Kazal-Motive von Bedeutung, die sowohl die Sekretion von proMMP-9 aus der Zelle als auch dessen proteolytische Aktivität unterbinden [96]. Zum anderen ist dafür offenbar die Glykosylierung von RECK mitverantwortlich, denn G4 trägt zur Inhibierung der proMMP-9-Sekretion bei, während G5 die Aktivierung von proMMP-2 blockiert [97]. Diese Beobachtungen würden die erhöhte Invasivität von Zellen, welche die trunkierten Varianten

RECK B und RECK I ohne Kazal-Motive und ohne G4 und G5 exprimieren, erklären [92]. Die Proteolyse-hemmende Wirkung von RECK beschränkt sich allerdings nicht ausschließlich auf MMPs, sondern betrifft auch ADAM10 [98] und APN [99].

C.3.2.2 Regulation nicht-proteolytischer Prozesse

Neben der Proteolyse beeinflusst RECK auch andere Zellfunktionen: RECK ist beispielsweise in die Steuerung von Proliferation und Apoptose involviert. Jedenfalls korreliert die Expression von RECK unmittelbar mit den Transkriptmengen von LPHN2 sowie BHLHB8, EMILIN3, GHRHR, NFIA, RELM β und ZNF814, die maßgeblich an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind [100]. Außerdem löst die Bindung zwischen RECK und GRP78 die Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums aus, welche die Aktivierung von eIF-2 α durch PERK beinhaltet. Dies erhöht die Sensitivität von Zellen gegenüber apoptotischen Signalen und kann so zu deren Absterben führen [101]. Des Weiteren hemmt RECK die Aktivierung von EGFR [102] und bindet an HER-2/Neu [103], was in beiden Fällen zu einer reduzierten Aktivität von ERK1/2 sowie AKT1 führt und in der Folge sowohl Zellwachstum als auch Angiogenese inhibiert. Gleichzeitig kommt es durch den Einfluss von RECK auf die beiden Zelloberflächenrezeptoren zu einer negativen Modulation der JAB1- und RAD51-Biosynthese, wodurch die DNA-Reparatur der Zellen eingeschränkt wird [104]. Die RECK-vermittelte Hemmung von EGFR blockiert zudem die Expression von HIF-2 α , was sich wiederum negativ auf das Zellwachstum auswirkt [105]. Einen weiteren Mechanismus zur Regulation der Angiogenese stellt die Inhibierung von STAT3 dar, welche durch die Bindung von RECK an β 1-Integrin, Galectin-1, gp130, IL-6RA, IL-8 oder uPAR induziert wird [106].

C.3.3 Pathophysiologische Bedeutung von RECK

Fehlregulationen von RECK sind aufgrund des Einflusses auf Zellwachstum und Apoptose, Migration und Invasion sowie Angiogenese oftmals mit gravierenden Auswirkungen auf den betroffenen Organismus verbunden:

In Tiermodellen erwies sich die vollständige Abwesenheit von RECK als lethal. So überlebten Zebrafische ohne RECK-Expression maximal 12 Tage [107], und auch RECK-defiziente Mäuse starben spätestens Mitte der 11. Lebenswoche [94]. Beim Menschen ist die veränderte Biogenese von RECK an einer Reihe pathophysiologischer Vorgänge beteiligt, insbesondere der Entstehung und Ausbreitung maligner Erkrankungen. In diesem Zusammenhang zeigen Untersuchungen von Tumorgewebe aus 12 unterschiedlichen Organen übereinstimmend, dass eine

niedrige RECK-Expression in den Tumorzellen mit einer vermehrten Metastasierung und einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korreliert [108-111,92,112-118].

Ferner begünstigt selbst funktional eingeschränktes RECK die Proliferation und Invasion von Tumorzellen, was an der Variante RECK B bei Patienten mit Glioblastomen nachgewiesen wurde [92].

Auch geringfügige Modifikationen, wie etwa SNPs in der Genstruktur von *RECK*, können einen großen Einfluss auf Entwicklung und Verlauf von Tumorerkrankungen haben. So korreliert eine Variante des in Exon 13 befindlichen rs11788747-SNP bei Tumoren von Leber [119] und Niere [120] mit der Metastasenbildung. Zudem wurde eine im Promotorbereich von *RECK* gelegene SNP-Variante von rs10814325 besonders häufig im Gewebe von Leber- [119] und Lungentumoren [121] detektiert. Brustkrebspatienten, welche positiv auf diesen rs10814325-SNP getestet wurden, wiesen außerdem eine kürzere Lebenserwartung auf [122].

C.3.4 Expression von RECK

Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression von RECK in Zellen streng kontrolliert: Während die Faktoren SP1 und SP3 die Transkription von RECK durch Interaktion mit den SP1/SP3-Bindestellen des *RECK*-Promotors fördern, hemmen HDAC4 [123] und HDAC1 [124] einschließlich ihrer Korepressoren HIF-1 α [91], MTA1 [125] und RbAp46 [126] durch Bindung an die SP-Proteine die RECK-Expression. Des Weiteren regulieren FXR [90] und MRF4 [127] die RECK-Transkription auf positive, ADRM1 [128], mTOR [129] und MyoD [127] hingegen auf negative Weise. Zusätzlich kann die mRNA-Biosynthese von *RECK* durch eine Hypermethylierung des *RECK*-Promotors blockiert werden, ausgelöst von DNMT1 [130] und DNMT3b [131].

Die Translation der RECK-mRNA wird durch zwei Vertreter der SMADs reguliert. Dem positiven Einfluss von SMAD3 steht dabei der negative Einfluss von SMAD7 gegenüber [132].

Die Aktivität des RECK-Proteins kann durch direkte Interaktion mit anderen Proteinen inhibiert werden. So ist das Genprodukt von *Tgat* in der Lage, die Glykosylierung von G4 und G5 durch Bindung seiner 15 C-terminalen AS zu blockieren [133]. Zudem induziert GDE2 eine proteolytische Spaltung von RECK am GPI-Anker und entfernt das Glykoprotein auf diese Weise von der Zelloberfläche [134]. Einen ähnlichen Effekt hat die durch MMP-2 oder MMP-7 induzierte Proteolyse, wodurch RECK sowohl N-terminal als auch zentral gespalten wird [87].

C.4 Mikro-RNAs

C.4.1 Hemmung der RECK-Expression durch miRNAs

Die posttranskriptionelle Regulation von RECK erfolgt nicht nur über Proteine wie die SMADs, sondern auch über nichtkodierende RNAs. Aktuell sind 22 Vertreter der ausschließlich regulatorisch wirksamen miRNAs bekannt, welche die Translation dieses Glykoproteins direkt hemmen [135-151]. Dabei ist miR-21 sowohl die erste [152] als auch die am besten beschriebene RECK-regulierende miRNA.

C.4.2 Der kanonische Reifeprozess von miRNAs

Wie die meisten miRNAs wird miR-21 über den kanonischen Reifeprozess exprimiert. Dieser beginnt mit der Transkription eines miRNA-Gens durch die RNA-Polymerase II (Abb. 7).

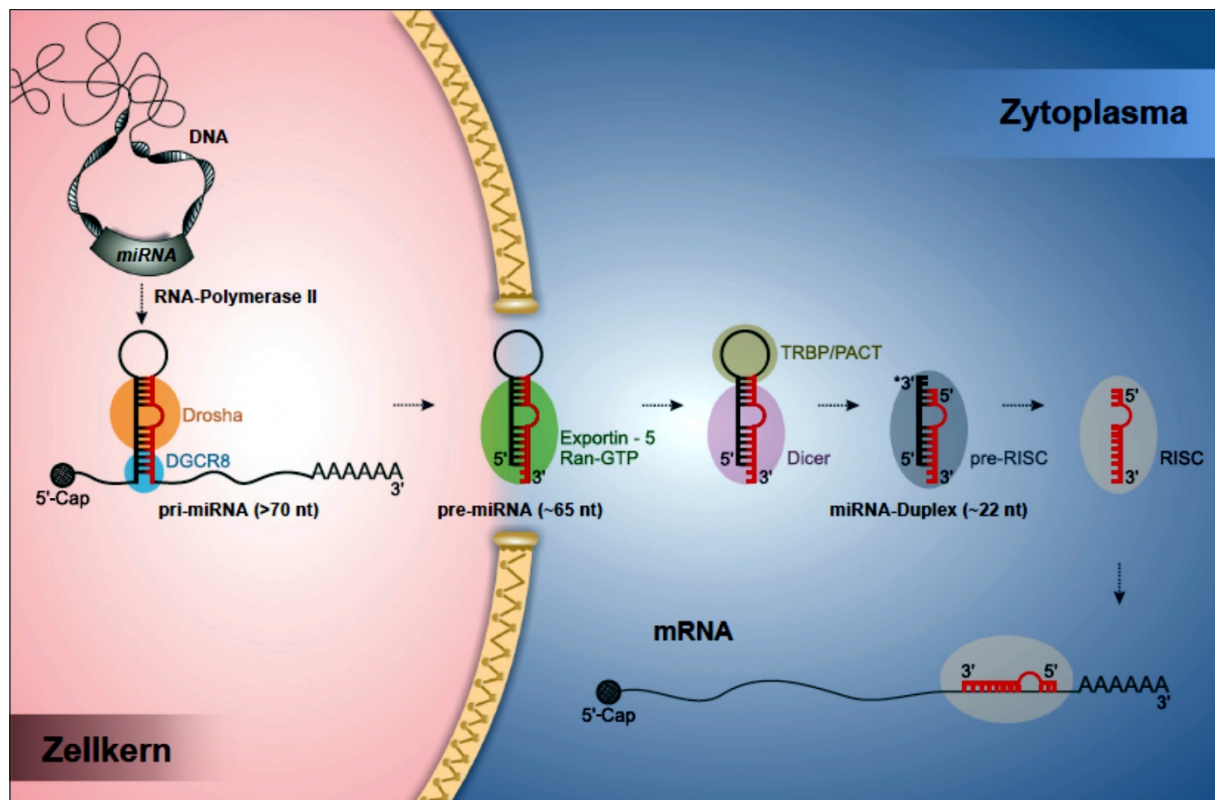


Abb. 7 Der kanonische miRNA-Reifeprozess. Schematische Übersicht der Abläufe in Zellkern und Zytoplasma mit den beteiligten Proteinen sowie den miRNA-Zwischenstufen. (Bildmaterial von Bavia *et al.*, 2016 mit Modifikationen [153])

Die dabei entstehende pri-miRNA hat eine Länge von mehr als 70 nt, besitzt eine Haarnadelform und weist sowohl eine 5'-Cap-Struktur als auch einen 3'-Poly(A)-Schwanz an ihren beiden Enden auf [154]. Anschließend interagiert die pri-miRNA im Zellkern mit dem sogenannten Mikroprozessor, einem aus zwei Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex. Das

Doppelstrang-RNA-bindende DGCR8 hält die Typ III Ribonuklease Drosha in Position, während diese das Transkript auf etwa 65 nt verkürzt. Die neu gebildete pre-miRNA ist nun frei von den 5'- und 3'-Modifikationen, hat aber noch eine Haarnadelstruktur [155]. Für die weitere Prozessierung wird die pre-miRNA mit Hilfe von Exportin-5 und dessen Kofaktor Ran-GTP ins Zytoplasma transportiert [156]. Dort interagiert das Transkript wie bereits im Zellkern mit einem Proteinkomplex, welcher hier aus den drei Untereinheiten TRBP, PACT und Dicer, einer weiteren Typ III Ribonuklease, aufgebaut ist. Das von TRBP und PACT stabilisierte Dicer entfernt den Haarnadelbogen der pre-miRNA, worauf ein etwa 22 nt langes miRNA-Duplex-Molekül zurückbleibt [157,158]. Dieses wird nun von der Hsc70/Hsp90-Chaperonmaschinerie unter Verbrauch von ATP auf Ago1, Ago2, Ago3 oder Ago4 transferiert, wodurch der pre-RISC entsteht [159,160]. Im pre-RISC wird das miRNA-Duplex-Molekül in die beiden jeweils komplementären Stränge 3p und 5p aufgetrennt, wobei der RNA-Strang mit dem höheren Pyrimidinanteil sowie dem größeren Aufkommen an 5'-Cytidinbasen entfernt und meist degradiert wird [161].

C.4.3 Mechanismus der miRNA-vermittelten Translationshemmung

Die nun ausgereifte miRNA bindet innerhalb des RISC-Multifaktorkomplexes mit ihrer etwa 7 nt langen, 5'-terminalen Seed-Erkennungssequenz an eine mRNA mit komplementärer nt-Abfolge [162] (Abb. 7). Sind Ago1, Ago3 oder Ago4 am RISC beteiligt, so kommt es lediglich zu einer reversiblen Hemmung der Translation. In Anwesenheit von Ago2 wird die mRNA hingegen durch Endonukleaseaktivität vollständig abgebaut. Beide Mechanismen beeinträchtigen somit vorübergehend oder dauerhaft die Proteinbiosynthese des Zielgens [163]. Je nach Drosha-Prozessierung können mehrere Varianten einer miRNA auftreten. Da sich diese geringfügig in ihrer Sequenz unterscheiden, kann es außerdem zu einer veränderten Strangauswahl im pre-RISC kommen. Somit besteht die Möglichkeit, dass ein- und dieselbe miRNA mehr als nur eine Ziel-mRNA aufweist [164].

Computermodelle haben gezeigt, dass mRNAs von mehr als 60% aller menschlichen Gene potenzielle Bindestellen für die aktuell bekannten 2.588 miRNAs enthalten (www.mirbase.org), was auf eine hohe Konservierung ihrer 3' untranslatierten Bereiche zurückgeführt wurde [165]. Daher haben diese nichtkodierenden, regulatorischen RNAs einen weitreichenden Einfluss auf eine Vielzahl wichtiger physiologischer Prozesse, wie beispielsweise die vom kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg gesteuerte Embryogenese [166] sowie die Neubildung von Gehirn- [167], Herz- [168] und Lungengewebe [169].

C.5 Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg

C.5.1 Eigenschaften der Wnts

Nusse und Varmus beschrieben 1982 erstmals das proto-Onkogen *int1*, dessen Genprodukt in Mäusen die Bildung von Tumoren der Brustdrüsen induziert [170]. 5 Jahre später wurde in *Drosophila melanogaster* das Homolog *wingless* entdeckt [171] und der Name *int1* im Laufe der Zeit auf *Wnt1* angepasst. Die Vertreter der Wnt-Familie werden von Porc, einem Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums, posttranslational N-glykosyliert [172] und palmitoyliert [173], bevor sie aus der Zelle ausgeschleust werden und als Agonisten des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungieren.

C.5.2 Funktionen des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

C.5.2.1 Inaktiver Zustand

Im inaktiven Zustand dieses Signalwegs phosphoryliert GSK3 β sowohl APC [174] als auch AXIN1 [175], was zur Bindung von zytoplasmatischem β -Catenin an die beiden phosphorylierten Proteine und damit zur Bildung eines Destruktionskomplexes führt (Abb. 8a). Die ebenfalls an AXIN1 gebundene CKI α induziert nun zusammen mit GSK3 β eine duale Phosphorylierung von β -Catenin [176]. Die Ubiquitinligase SCF, bestehend aus SKP1, CUL1 und FBXW1A, erkennt das phosphorylierte β -Catenin und ubiquitinyliert es umgehend [177]. Das mit AXIN1, APC, β -Catenin und SCF interagierende WTX unterstützt dabei den Vorgang der Ubiquitinylierung [178], welche in der Folge den Abbau des modifizierten β -Catenins durch das Proteasom induziert [179]. Im Zellkern bleibt die Interaktion der Transkriptionsfaktoren TCF und LEF mit dem Groucho-verwandten Transkriptionsrepressor TLE1 bestehen [180], was die Hemmung der Expression von spezifischen Zielgenen durch eine TLE1-assoziierte HDAC nach sich zieht [181].

C.5.2.2 Aktiver Zustand

Die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erfolgt durch die gleichzeitige Bindung eines Wnt-Proteins an ein FZD-Protein und einen der beiden Co-Rezeptoren LRP5 und LRP6 [182] (Abb. 8b). Die Formation dieses Rezeptorkomplexes induziert die duale Phosphorylierung von LRP5/6 durch membrangebundenes CKI α und GSK3 β , was die Bindung von AXIN1 an LRP5/6 ermöglicht [183]. Dies wiederum erleichtert eine Bindung zwischen dem an FZD befindlichen DVL [184] und AXIN1 [185] durch räumliche Annäherung. DVL rekrutiert nun das GBP-verwandte FRAT1 zum Destruktionskomplex, welches seinerseits mit GSK3 β interagiert [186]. Dadurch wird zum einen die zuvor erwähnte, duale Phosphorylierung von

β -Catenin durch $CKI\alpha$ und $GSK3\beta$ inhibiert, zum anderen wird die $GSK3\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von APC und AXIN1 blockiert, worauf hin sich β -Catenin vom Destruktionskomplex löst und im Zytoplasma akkumuliert [174,175]. Durch Poren der Kernmembran transloziert β -Catenin anschließend in den Zellkern, wo es TLE1 von TCF/LEF verdrängt und seinerseits mit den Transkriptionsfaktoren interagiert [187]. Eine Rekrutierung von BCL9 und Pygo1 oder Pygo2 zum Transkriptionskomplex initiiert schließlich den Transkriptionsstart β -Catenin-spezifischer Zielgene [188]. Auf solche Weise hochregulierte Gene werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit positive Zielgene genannt, während im aktiven Zustand herunterregulierte Gene als negative Zielgene bezeichnet werden.

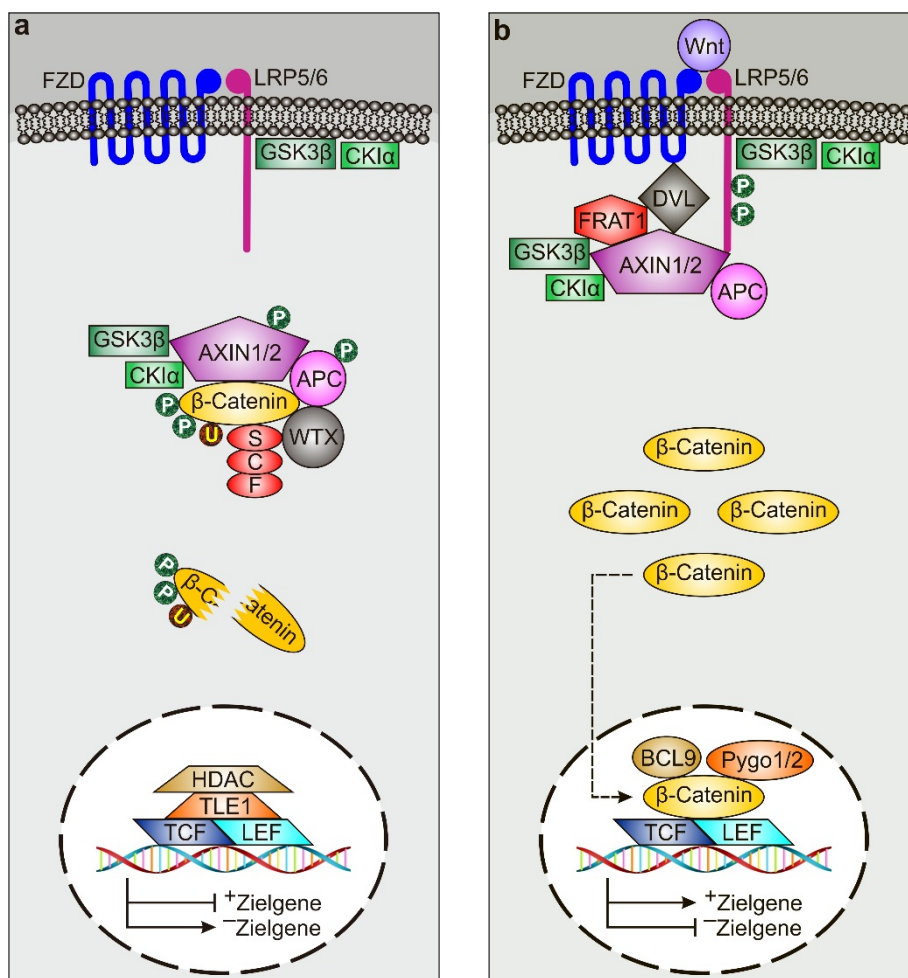


Abb. 8 Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Schematische Darstellung des inaktiven (a) und des aktiven Zustands (b) mit Phosphorylierungen (P) und Ubiquitinylierungen (U) der beteiligten Faktoren. Zellkern (weiß), Zytoplasma (hellgrau) und extrazellulärer Raum (dunkelgrau) sind farblich hervorgehoben. Die Translokation (---) von β -Catenin in den Zellkern sowie stattfindende (\uparrow) und unterbundene (T) Transkriptionen positiver ($+$) und negativer ($-$) Zielgene sind durch Pfeilverbindungen gekennzeichnet. (Bildmaterial der DNA-Doppelhelix von www.veriware.org mit Modifikationen)

Die Aktivierungsintensität des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist abhängig von der Wnt-FZD-Kombination im Rezeptorkomplex. Während beispielsweise Wnt7b-FZD5 eine starke Expression positiver Zielgene hervorruft, erzielt Wnt4-FZD6 diesbezüglich kaum eine Wirkung. Ferner scheinen Wnt4, Wnt5a und Wnt9a sowie FZD3 und FZD6 tendenziell schwache Agonisten zu sein, während Wnt3, Wnt3a, Wnt6, Wnt7b und Wnt9b sowie FZD1, FZD2, FZD5 und FZD8 für eine eher starke Aktivierung sorgen [189].

C.5.3 Antagonisten des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

Für eine effiziente Steuerung der Zielgentranskription existieren auch einige Antagonisten, welche die Aktivität des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs hemmen. Viele dieser Proteine binden hierbei Komponenten des Rezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche. So werden Wnts von Cer [190], Frzb-1 [191] und WIF-1 [192] sowie LRPs von DKK1 [193] und Sclerostin [194] an der Komplexbildung gehindert. Darüber hinaus induziert die Aktivität von NOTUM die Depalmitoylierung von Wnts [195] und die Expression von AXIN2 die Bildung zusätzlicher Destruktionskomplexe [196].

D Zielsetzung

RECK gilt als effektiver MMP-Inhibitor und wird in der onkologischen Diagnostik als Biomarker zur Einschätzung der Malignität von Tumorerkrankungen verwendet. In den vergangenen 18 Jahren seit der Erstbeschreibung von RECK erfolgte der weitaus größte Teil aller zu diesem Glykoprotein durchgeführten wissenschaftlichen Studien im pathophysiologischen Kontext von Tumorzellen. Somit blieben die potentiellen Funktionen von RECK in gesunden Körperzellen bis dato weitgehend unerforscht. Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von RECK für die Funktionalität primärer Stammzellen (hMSCs) zu untersuchen, die eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Vorgängen im Organismus wie Geweberegeneration und Wundheilung spielen.

- Zunächst sollte unter Verwendung von qRT-PCR und Westernblot analysiert werden, ob und in welchem Umfang RECK von hMSCs exprimiert wird.
- Im Falle einer nachweisbaren RECK-Expression in hMSCs war vorgesehen, dessen Rolle bei den zentralen Stammzellfunktionen Wachstum, Beweglichkeit und Differenzierung zu untersuchen. Hierzu war geplant, hMSCs mit spezifischen, gegen RECK gerichteten siRNAs zu transfizieren, um die Biosynthese von RECK in diesen Zellen selektiv herunterzuregulieren.
- Im Rahmen der Wachstumsanalyse sollten Zellproliferation und Zellvitalität von RECK-exprimierenden und RECK-defizienten hMSCs mit Hilfe des CyQUANT[®] Zellproliferationsassays und des WST-8 Zellvitalitätsassays quantifiziert werden.
- Weitere Versuche sahen eine Untersuchung der Zellbeweglichkeit von hMSCs mit und ohne RECK-Knockdown vor. Hierzu sollte das Invasionspotential der Zellen anhand des Transwellassays bestimmt sowie deren Expression ausgewählter MMPs und TIMPs durch qRT-PCR und Westernblot analysiert werden. Zudem war geplant, die Fähigkeiten der hMSCs zur Wundheilung, Adhäsion und chemotaktischer Migration mittels Scratch-Assay, Adhäsionsassay und μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay zu quantifizieren. Beim Auftreten unterschiedlicher Migrationspotentiale sollte eine Expressionsbestimmung ausgewählter, zellbeweglichkeitsassoziiierter RNAs mit Hilfe der qRT-PCR Aufschluss über molekulare Mechanismen innerhalb der Zellen geben.

- Die Rolle von RECK bei der Differenzierung von hMSCs sollte in zweierlei Hinsicht analysiert werden: Zum einen war vorgesehen, die adipogene und osteogene Differenzierung RECK-exprimierender und RECK-defizienter Zellen durch die Expression von Differenzierungsmarkern wie PPAR γ und ALP mit Hilfe der qRT-PCR und anhand von Zellfärbungen durch die spezifischen Farbstoffe Oil Red O und Alizarin Red S zu untersuchen. Zum anderen war geplant, die RECK-Expression in hMSCs während der Adipogenese und Osteogenese dieser Zellen mittels qRT-PCR und Westernblot zu quantifizieren.
- Abschließend war eine Analyse der RECK-vermittelten Signalübertragung in hMSCs vorgesehen. Dabei sollte der Schwerpunkt auf den für Stammzellfunktionen besonders bedeutenden kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg liegen. Zunächst war geplant, mit Hilfe von qRT-PCR und Westernblot die mRNA- und Proteinlevel von PPAR γ in hMSCs mit und ohne β -Catenin-Knockdown zu bestimmen, um eine Beteiligung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs an der Differenzierung dieser Zellen zu bestätigen. Anschließend sollten in hMSCs mit und ohne RECK-Knockdown sowohl die Expression von β -Catenin anhand von qRT-PCR und Westernblot als auch die Transkription ausgewählter positiver Zielgene des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs anhand der qRT-PCR quantifiziert werden. Da RECK über keine eigene Signaltransduktionskaskade verfügt, war zudem der Einsatz einer Co-IP vorgesehen, um eine mögliche Bindung zwischen rekombinanten Varianten von RECK und DKK1, einem zelloberflächenaktiven Inhibitor des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, zu untersuchen.

Die gesammelten Resultate dieser Studien sollten Aufschluss über die Bedeutung von RECK in hMSCs geben. Diese Erkenntnisse könnten zum Verständnis beitragen, wie Wachstum, Beweglichkeit und Differenzierung dieser Zellen reguliert werden. Darüber hinaus wäre dieses Wissen eine mögliche Grundlage für die Entwicklung innovativer, auf hMSCs basierender Therapieansätze.

E Material und Methoden

E.1 Material

E.1.1 Zellen

Zelltyp	Hersteller, Hauptsitz
hMSC	Lonza, Basel, Schweiz

E.1.1.1 Charakteristika der hMSC-Spender

Lot #	Alter	Rasse	Geschlecht
8F3520	20	schwarz	männlich
7F3674	22	schwarz	weiblich

E.1.2 Agenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
DMEM High Glucose	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
DPBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FKS	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
L-Alanyl-L-Glutamin	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
MSCGM™	Lonza, Basel, Schweiz
Nutridoma-SP	Roche, Basel, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
RPMI-1640	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
StemMACS™ MSC Expansionsmedium	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Trypsin/EDTA für MSCs	Lonza, Basel, Schweiz

E.1.3 Chemikalien für Lösungen, Puffer und Spezialmedien

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
cOplete™ Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM [10x]	c.c.pro, Oberdorla, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA (Titrplex® III)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Essigsäure (Eisessig) (100%)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Ethanol p.A.	Honeywell International, Morristown, NJ, USA
GBX Entwickler- und Nachfülllösung	Carestream Health, Rochester, NY, USA
GBX Fixier- und Nachfülllösung	Carestream Health, Rochester, NY, USA
Glycerin	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O (PCR grade)	Roche, Basel, Schweiz
humanes rekombinantes Insulin [3,5 mg/mL]	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel
IBMX	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Indomethacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol p.A.	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
NaCl	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
NaHCO ₃ (7,5%)	c.c.pro, Oberdorla, Deutschland
NaOH	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NP-40 (Igepal [®] CA-630)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oil Red O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PhastGel [™] Blue R Tabletten	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
PhosSTOP [™] Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
Pierce [™] 16% Formaldehyde (w/v), Methanol-free	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PureCol [®] bovines Kollagen I [3 mg/mL]	Advanced BioMatrix, San Diego, CA, USA
SDS ultra pure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Tris-HCl	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

E.1.4 Lösungen, Puffer und Spezialmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Adipogenes Differenzierungsmedium	1 µM Dexamethason 200 µM Indomethacin 1 mM IBMX 10 µg/mL Insulin DMEM + 10% FKS
Adipogenes Erhaltungsmedium	100 µg/mL Insulin DMEM + 10% FKS
Blockierlösung (Westernblot)	10% (w/v) Milchpulver TBS-T
Einfriermedium für hMSCs	90% MSCGM [™] / StemMACS [™] 10% DMSO 5% (w/v) Albumin Fraktion V
Elutionspuffer (Adipogene Differenzierung)	50% Ethanol 10% SDS

Bezeichnung	Zusammensetzung
Elutionspuffer (Osteogene Differenzierung)	10 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,0) 10% (w/v) Cetylpyridiniumchlorid
Entwicklerlösung (Westernblot)	27,8% GBX Entwickler- und Nachfülllösung
Färbelösung (Adipogene Differenzierung)	60% Oil Red O-Lösung
Färbelösung (Osteogene Differenzierung)	40 mM Alizarin Red S (50°C; pH 4,1)
Färbelösung (Zymographie)	90% Färbelösung B 10% Färbelösung A
Färbelösung A (Zymographie)	60% Methanol 1 PhastGel™ Blue R Tablette pro 200 mL
Färbelösung B (Zymographie)	30% Methanol 10% Essigsäure
Fixierlösung (Westernblot)	27,8% GBX Fixier- und Nachfülllösung
Formaldehydlösung (4%)	25% Pierce™ 16% Formaldehyde (w/v) DPBS
Konservierungslösung (Zymographie)	5% Glycerin 20% Ethanol
Laufpuffer [10x] (Zymographie)	30,28 g/L Tris 144 g/L Glycin 10 g/L SDS
Migrationslösung (Chemotaxisassay)	20 µL DMEM [10x] 6 µL NaOH-Lösung [1M] 67 µL H ₂ O, PCR grade 7 µL NaHCO ₃ (7,5%) 100 µL DMEM
NaOH-Lösung [1M]	4% (w/v) NaOH
Oil Red O-Lösung	0,3% (w/v) Oil Red O Isopropanol
Osteogenes Differenzierungsmedium	100 nM Dexamethason 10 mM β-Glycerophosphat 50 µM L-Ascorbinsäure-2-phosphat MSCGM™
Probenpuffer [4x] (Zymographie)	250 mM Tris-HCl (pH 6,8) 40% Glycerin 8% (w/v) SDS 0,01% Bromphenolblau
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 0,5% Natriumdeoxycholat 1% NP-40 0,1% SDS 1 cOmplete™ Tablette pro 10 mL 1 PhosSTOP™ Tablette pro 10 mL
Strippuffer (Westernblot)	9,85 g/L Tris-HCl (pH 6,8) 7,14 mL/L β-Mercaptoethanol 20 g/L SDS

Bezeichnung	Zusammensetzung
TBS [10x]	24,2 g/L Tris 80 g/L NaCl
TBS-T / DPBS-T	10% TBS [10x] / DPBS 0,1% Tween [®] 20
Trypanblaulösung	0,5% (w/v) Trypanblau

E.1.5 Zellbiologische Techniken

E.1.5.1 Agenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Accutase [™]	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Cell Counting Kit-8	Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan
CyQUANT [®] Zellproliferationsassay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Diff-Quik [®] Färbeset	Medion Grifols Diagnostics, Düringen, Schweiz
humane EZM	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
humanes rekombinantes TNF- α	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
HuS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
murines rekombinantes Wnt3a	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA

E.1.6 Molekularbiologische Techniken

E.1.6.1 Agenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
BAR-Plasmid-DNA	Randall T. Moon, UW, WA, USA
Gaussia-Juice SMALL KIT	PJK, Kleinblittersdorf, Deutschland
LightCycler [®] FastStart DNA Master SYBR [®] Green I	Roche, Basel, Schweiz
Lipofectamine [®] 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
miRNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript SYBR [®] Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAshredder [®]	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect [®] Kit für Reverse Transkription	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT ² Profiler [™] PCR Array	Qiagen, Hilden, Deutschland
Human Cell Motility UltraPure [™]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	

E.1.6.2 siRNAs

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
β -catenin siRNA	Qiagen, Hilden, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
RECK siRNA 1	Qiagen, Hilden, Deutschland
RECK siRNA 2	Riboxx, Radebeul, Deutschland

E.1.6.2.1 Charakteristika der siRNAs

Zielgen	Zugriffsschlüssel	Sequenzen
Negativkontrolle		siRNA sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' siRNA antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'
β-Catenin	NM_001904.3	Zielsequenz 5'-AATGGTTGCCTTGCTCAACAA-3' siRNA sense 5'-UGGUUGCCUUGCUCACAACAATT-3' siRNA antisense 5'-UUGUUGAGCAAGGCAACCATT-3'
RECK	NM_021111.2	Zielsequenz 1 5'-GAAAATTATTGCGCCTCTATT -3' siRNA 1 sense 5'-AAAUUAUUGCGCCUCUAUUTT-3' siRNA 1 antisense 5'-AAUAGAGGCGCAAUAAUUUTC-3' Zielsequenz 2 5'-AATAGAGGCGCAATAATTT-3' siRNA 2 sense 5'-AAUAGAGGCGCAAUAAUUUCCCCC-3' siRNA 2 antisense 5'-GGGGGAAAUUAUUGCGCCUCUAUU-3'

E.1.6.3 mRNA-Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
hMENA	TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
hN-WASP	TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
Human alkaline Phosphatase	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human Catenin-β1	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human GAPDH	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human IGF-1α	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human MMP-2	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human MMP-9	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human MMP-14	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human PPARγ	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human RECK	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human TIMP-1	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human TIMP-2	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human TIMP-3	Search-LC, Heidelberg, Deutschland
Human VEGF	Search-LC, Heidelberg, Deutschland

E.1.6.3.1 Charakteristika der mRNA-Primer

Zielgen	Zugriffsschlüssel	Sequenzen
MENA	NM_001008493.1	Forward 5'-GCTGGTGGCTCAACTGGATTC-3' Reverse 5'-TGCACAAGAGACATCATCCAA-3'
N-WASP	NM_003941.3	Forward 5'-CCGTCGACAAAGGAAATCTGAG-3' Reverse 5'-GTTGTTGACTTGTGGACCATAAAAT-3'

E.1.6.4 miRNA-Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Hs_miR-124a_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_miR-126_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_miR-126*_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_miR-335_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Hs_let-7f_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland

E.1.6.5 snoRNA-Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Hs_SNORD44_11 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland

E.1.7 Proteinbiochemische Techniken

E.1.7.1 Agenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Amersham TM ECL TM Westernblot Detektionsreagenz	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
DL-DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dynabeads [®] Protein G Kit für Immunopräzipitation	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magic Mark TM XP Westernblot Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Novex [®] 10% Zymogramm (Gelatin) Protein Gel (10-, 15-Well)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Novex [®] Zymogramm Entwicklungspuffer [10x]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Novex [®] Zymogramm Renaturierungspuffer [10x]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE [®] LDS Probenpuffer [4x]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE [®] MOPS SDS Laufpuffer [20x]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE [®] Novex [®] 4-12% Bis-Tris Protein Gel (10-, 15-Well)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE [®] Transferpuffer [20x]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
rekombinantes humanes DKK1	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rekombinantes humanes RECK	Abnova, Taipeh, Taiwan
SignalFire™ Plus ECL Detektionsreagenz	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

E.1.7.2 Antikörper

E.1.7.2.1 Antikörper für Co-Immunopräzipitation

Zielprotein	Spezies	Menge [µg]	Hersteller, Hauptsitz
DKK1	Kaninchen	10	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

E.1.7.2.2 Primärantikörper für Westernblot

Zielprotein	Spezies	Verdünnung	Hersteller, Hauptsitz
β-Aktin	Kaninchen	1:1.000.000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
β-Catenin	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
IGF1	Kaninchen	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
MT1-MMP	Kaninchen	1:2.000	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
PPARγ	Kaninchen	1:1.000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RECK	Maus	1:500	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
TIMP-1	Maus	1:500	Abcam, Cambridge, Großbritannien
TIMP-2	Maus	1:500	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
TIMP-3	Kaninchen	1:500	Assay Biotechnology, Sunnyvale, CA, USA

E.1.7.2.3 Sekundärantikörper für Westernblot

Zielprotein	Verdünnung	Hersteller, Hauptsitz
Kaninchen IgG	1:2.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Maus IgG	1:2.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Maus IgG	1:4.000	Dako, Carpinteria, CA, USA

E.1.8 Geräte

E.1.8.1 Analytische Waagen

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
M-power AZ 1502 (0,01g - 1.500g)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Talent TE 124S (0,0001g - 120g)	Sartorius, Göttingen, Deutschland

E.1.8.2 Wasserbäder

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
W 350	Memmert, Schwabach, Deutschland
WNE 10	Memmert, Schwabach, Deutschland

E.1.8.3 Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Corning™ Costar™ Transwell™ System (24-Well, 8 µm Porengröße)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HERAcell® 240 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus® Function Line BB16 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HERAsafe® Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Maxisafe 2020 Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
µ-Slide Chemotaxis ^{3D}	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Nalgene® Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer improved-Zählkammer	LO - Laboroptik, Lancing, Großbritannien
Nunc™ CryoTubes™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc™ EasYFlasks™ 75 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc™ Multiwell-Platten (6-, 12-Well)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc™ Zellkulturschalen 56,7 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen für Gilson® Pipettoren, abgeschrägt (10-200 µL)	Greiner Holding, Kremsmünster, Österreich
Q-tips®	Pelz Gruppe, Wahlstedt, Deutschland
Sterivex™-GV 0,22 µm Filtereinheit	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

E.1.8.4 Mikroskope und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
37° Inkubationskammer (für IX70)	Solent Scientific, Segensworth, Großbritannien
AxioCam ICc3 CCD-Kamera	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Axiovert S100 Inverses Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
CAL 3300 Temperaturregler und Heizer (für IX70)	Solent Scientific, Segensworth, Großbritannien
CKX41 Inverses Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
E-420 DSLR-Kamera	Olympus, Tokio, Japan
Inkubator XL S mit CO ₂ -Regler und Heizgerät (für Axiovert S100)	PeCon, Erbach, Deutschland
IX70 Inverses Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
SCAN IM 120 x 100 motorisierte Mikroskopplattform (für IX70)	Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
SCAN IM 130 x 100 motorisierte Mikroskopplattform (für Axiovert S100)	Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
SensiCam QE CCD-Kamera	PCO, Kelheim, Deutschland
Tempcontrol 37-2 digital (für Axiovert S100)	PeCon, Erbach, Deutschland

E.1.8.5 Spektrometer und Platten

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Asys DigiScan Temp	Biochrom, Cambridge, Großbritannien
Corning™ Costar™ 96-Well Platten (schwarz, flacher Boden)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microtiter™ 96-Well Platten (transparent, flacher Boden)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NanoDrop™ 1000 Spektralfotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Safire2™ Spektralfluorometer	Tecan, Männedorf, Schweiz

E.1.8.6 Zentrifugen

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Heraeus™ Biofuge™ Pico	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus™ Megafuge™ 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
UNIVERSAL 32 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

E.1.8.7 Schüttler

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
PARAMIX3	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Stuart® Roller mixer SRT9	Bibby Scientific Limited, Stone, Großbritannien
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
VF2	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland

E.1.8.8 qRT-PCR

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
7900HT Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LightCycler® 1.5	Roche, Basel, Schweiz
LightCycler® Kapillaren (20 µL)	Roche, Basel, Schweiz

E.1.8.9 Westernblot und Zymographie

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Amersham™ ECL™ Hyperfilm™ (18 x 24 cm)	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Cellophanfolien 14 x 14 cm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DynaMag™-Spin Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EPS 301 /601	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Faltenfilter 595½ Ø240 mm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Geltrocknungsrahmen 14 x 14 cm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GS-800™ kalibriertes Densitometer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Immobilon™-P Membran, PVDF	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Kodak® BioMax®	Carestream Health, Rochester, NY, USA
Filmkassette 20,3 x 25,4 cm	

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Prot/Elec TM Pipettenspitzen (1-200 µL)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Toppits [®] Frischhaltefolie	Melitta, Minden, Deutschland
UNIHOOD TM 550	UniEquip, Planegg, Deutschland
Whatman [®] Filterpapier Nr. 1	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
XCell II TM Blotmodul	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
XCell SureLock TM Minizelle	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

E.1.8.10 Kühl- und Gefriertechnik

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Forma Scientific [®] 923 ULT Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GNP 3376 Gefrierschrank	Liebherr-International, Bulle, Schweiz
GSU 1223-26 Tischgefrierschrank	Liebherr-International, Bulle, Schweiz
KD40R423 Kühlschranks	Siemens, München, Deutschland
LSTR 13006 GWU Kühlschranks	National Lab, Mölln, Deutschland
MDF-C2156VAN ULT Gefriertruhe	Panasonic Healthcare, Tokio, Japan
MVE [®] KryoSystem 4000	Chart Industries, Garfield Heights, OH, USA
Scotsman [®] Flockeneisbereiter AF 100	Ali Group, Mailand, Italien

E.1.8.11 Sonstiges

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
HI 2210 Tisch pH Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
Laborabzug 7561 F	Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland
Leitfähigkeitsmessgerät P2-30	Siemens, München, Deutschland
PIPETMAN [®] Ultra Multichannel, 12x300	Gilson, Middleton, WI, USA
Reagenz-Reservoir 25ml, steril, weiß	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Tischautoklav LTA 400	ZIRBUS technology, Bad Grund, Deutschland
VE 20 Filtereinheit	AquaTOP-Wassertechnik, Neufahrn, Deutschland
Zellschaber mit 2-Positionen-Klinge	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

E.1.9 Software

Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Adobe [®] Acrobat [®] XI Pro	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Chemotaxis and Migration Tool 2.0	Ibidi, Martinsried, Deutschland
CorelDRAW [®] Graphics Suite X5	Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada
EndNote TM X7	Thomson Reuters, Toronto, ON, Kanada
GraphPad Prism [®] 6	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, MD, USA
Image-Pro [®] Plus 7.0 MDA	Roper Technologies, Sarasota, FL, USA
Manual Tracking plug-in für ImageJ	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Microsoft [®] Office Professional Plus 2013 (Excel, Word)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Quantity One [®] 1-D Analysesoftware	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
SPSS Statistics 20.0	IBM Corporation, Armonk, NY, USA
ZEN x64	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland

E.2 Methoden

E.2.1 Zellbiologische Techniken

E.2.1.1 Kultivierung von hMSCs

Die in dieser Arbeit verwendeten hMSCs wurden von Lonza gekauft. Die Zellen stammen aus dem Knochenmark von zwei gesunden und mit dem Entnahmeverfahren einverstandenen Spendern. Der Hersteller testete die hMSCs mit Hilfe des Verfahrens der Durchflusszytometrie positiv auf CD29, CD44, CD105 und CD166 sowie negativ auf CD14, CD34 und CD45. Des Weiteren wurden die hMSCs auf ihre Fähigkeit überprüft, in adipogene, osteogene und chondrogene Zelltypen auszudifferenzieren. Alle Arbeitsschritte mit hMSCs fanden unter sterilen Bedingungen in mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken statt. Vor Verwendung in den Werkbänken wurden sämtliche Materialien für mindestens 20 min mit UV-Licht bestrahlt oder mit 70% vergälltem Ethanol desinfiziert. Zur Vermeidung von unnötigem physiologischem Zellstress wurden zudem alle Medien und Zusätze für die Zellkultur vor ihrer Verwendung in einem W 350 Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Aufgrund ihrer für die Zelladhäsion von hMSCs optimierten Oberfläche dienten Nunc™ Zellkulturflaschen, -platten und -schalen als Kultivierungsgefäße. Nach Zugabe der Zellen wurden diese in einem Brutschrank (HERAcell® 240 oder Heraeus® Function Line BB16) mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C platziert. Für eine serumhaltige Kultivierung wurden sowohl MSCGM™ als auch das StemMACS™ MSC Expansionsmedium verwendet, die serumfreie Kultivierung erfolgte in RPMI-1640 mit 1% Nutridoma-SP, 1% L-Alanyl-L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Unabhängig vom verwendeten Kultivierungsmedium wurde alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Zellen mit frischen Nährstoffen zu versorgen und zelluläre Abfallstoffe zu entfernen. Die optionale Stimulierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in hMSCs erfolgte alle 3-4 Tage in Abwesenheit von Serum durch Zugabe von 100 ng/mL murinen rekombinanten Wnt3a. Da die Probenahme bei allen Experimenten mit dieser Behandlung erst unmittelbar vor dem Erreichen der vollständigen Zellkonfluenz durchgeführt wurde, hatten eventuell auftretende Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit durch Wnt3a keine Auswirkungen auf die Gesamtzellzahl. Zell-Zell Kontakte induzieren bei primären Zellen wie etwa hMSCs unerwünschte Veränderungen der zellulären Eigenschaften. Das Zellwachstum wurde daher regelmäßig mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops vom Typ CKX41 beobachtet. Nach dem Erreichen von etwa 95% Konfluenz wurden die Zellen in Form einer Suspension expandiert. Hierbei wurde zunächst das Kultivierungsmedium von den Zellen entfernt und diese mit 5 mL DPBS gewaschen, um einer Beeinträchtigung der nachfolgenden Trypsinierung durch Serumrückstände vorzubeugen.

Anschließend wurden die adhärenenten Zellen mit 2 mL einer speziell für hMSCs optimierten Trypsin/EDTA-Lösung während einer 5-minütigen Inkubation im Brutschrank vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach Aufnahme der Lösung in 4 mL serumhaltigem Medium wurden die Zellen zunächst sorgfältig resuspendiert und zu gleichen Teilen auf drei unbenutzte Zellkulturflaschen mit jeweils 8 mL frischem Kultivierungsmedium verteilt. Die resultierende Zelldichte nach diesem Passagierungsvorgang betrug etwa 7.900 Zellen/cm². Für die nachfolgenden Experimente wurden aus ökonomischen und biologischen Gründen ausschließlich hMSCs der Passagen 4-6 verwendet. Die Verdopplungszeit dieser Zellen betrug durchschnittlich 4 Tage.

E.2.1.2 Kryokonservierung von hMSCs

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in einem speziellen Einfriermedium für hMSCs kryokonserviert. Dieses, mit einer SterivexTM-GV 0,22 µm Filtereinheit sterilfiltrierte, Medium schützt die Zellen während des Einfriervorgangs vor der Bildung von Eiskristallen, welche die Zellmembran schädigen und beim erneuten Auftauen eine Zellyse verursachen würden. Allerdings ist die Zusammensetzung des Mediums toxisch für physiologisch aktive Zellen, weshalb nach der Aufnahme der hMSCs in diesem Medium alle Arbeitsschritte des Einfrierens und des späteren Auftauens möglichst zügig erfolgen müssen.

Eine Suspension der einzufrierenden hMSCs wurde zunächst in einer HeraeusTM MegafugeTM 1.0 R für 5 min mit 561 x g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Zellen im Einfriermedium resuspendiert und in NuncTM CryoTubesTM überführt. Dabei betrug die Zellkonzentration 1 x 10⁶/mL Medium. Die Cryotubes wurden nun in einer mit Isopropanol befüllten Nalgene[®] Mr. FrostyTM Box platziert, welche die Temperatur der Zellsuspension schonend mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 1°C/min reduziert. Dieser Vorgang wurde in einem Forma Scientific[®] 923 ULT Gefrierschrank mit einer Arbeitstemperatur von -80°C durchgeführt. Für die abschließende Langzeitlagerung der hMSCs wurden das MVE[®] KryoSystem 4000 mit flüssigem Stickstoff (-196°C) und die MDF-C2156VAN ULT Gefriertruhe (-150°C) eingesetzt.

Das Auftauen von kryokonservierten hMSCs erfolgte bei 37°C in einem W 350 Wasserbad. Zuvor wurden die Cryotubes von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellsuspensionen kurz geöffnet, um eventuell in das Gefäß eingedrungenen Stickstoff entweichen zu lassen. Dieser würde sich sonst beim Erwärmen des Gefäßes im Wasserbad explosionsartig ausdehnen und schwere Verletzungen verursachen. Nach dem Auftauen wurden die Zellen kurz resuspendiert und zu gleichen Teilen auf zwei unbenutzte Zellkulturflaschen mit jeweils 10 mL

frischen, serumhaltigen Kultivierungsmedium verteilt. Die resultierende Zelldichte betrug etwa 6.700 Zellen/cm². Um die zytotoxische Wirkung des Einfriermediums zeitlich begrenzt zu halten, wurde unmittelbar nach der Adhäsion der hMSCs, spätestens aber zu Beginn des folgenden Tages, das Medium entfernt und die Zellen mit 5 mL DPBS gewaschen. Vor einer weiteren Verwendung der hMSCs wurden diese für mindestens 3 Tage in serumhaltigem Medium kultiviert.

E.2.1.3 Differenzierung von hMSCs

E.2.1.3.1 Adipogene Differenzierung und Oil Red O Färbung

Das adipogene Differenzierungsmedium und das adipogene Erhaltungsmedium wurden anhand der Angaben von Pittenger *et al.* [6] im Labor hergestellt. Vor ihrer Verwendung in der Zellkultur wurden die Medien mit einer SterivexTM-GV 0,22 µm Filtereinheit sterilfiltriert, um Kontaminationen zu vermeiden. Die adipogene Differenzierung von hMSCs wurde nach Erreichen von mindestens 80% Konfluenz in 6-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 mL DPBS gewaschen. Es folgte eine 5-tägige Kultivierung in 1 mL adipogenem Differenzierungsmedium im Brutschrank. Nach dem Entfernen des Mediums und einem Waschschrift mit 1 mL DPBS wurde die Kultivierung in 1 mL adipogenem Erhaltungsmedium für 2 Tage fortgesetzt. Diese Abfolge wurde in der zweiten Woche beibehalten. Differenzierte hMSCs bildeten zum Ende der ersten Woche Lipidvakuolen in fortan steigender Anzahl und Größe aus, welche nach 14 Tagen für eine bessere Visualisierung mit dem Farbstoff Oil Red O gefärbt wurden.

Dazu erfolgte nach dem Entfernen des adipogenen Erhaltungsmediums ein Waschschrift mit 1 mL DPBS. Die Zellen wurden anschließend mit 1 mL Formaldehydlösung (4%, 2 min bei -20°C vorgekühlt) für 1 min fixiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 1 mL Ethanol (50%, -20°C) erfolgte eine 20-minütige Färbung mit 1 mL Färbelösung für adipogene Differenzierung. Abschließend wurden die Farbstoffreste sowohl mit 1 mL Ethanol (50%, -20°C) als auch mit 1 mL H₂O entfernt. Unter Verwendung eines inversen Lichtmikroskops vom Typ CKX41 und einer E-420 DSLR-Kamera entstanden Aufnahmen der nun rötlich erscheinenden Lipidvakuolen. Für eine spektrometrische Quantifizierung erfolgte danach die 15-minütige Lösung des in den Lipidvakuolen der Adipozyten gebundenen Oil Red O mit 2 mL Elutionspuffer für adipogene Differenzierung unter Verwendung eines Polymax 1040-Taumelschüttlers. Die Absorption von 200 µL des gelösten Farbstoffes wurde in einer 96-Well Platte (transparent, flacher Boden) mit einem Asys DigiScan Temp Photospektrometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

E.2.1.3.2 Osteogene Differenzierung und Alizarin Red S Färbung

Die Herstellung des osteogenen Differenzierungsmediums erfolgte gemäß dem Protokoll von Jaiswal *et al.* [197]. Um die Sterilität des Mediums zu gewährleisten, wurde dieses vor der Verwendung in der Zellkultur mit einer Sterivex™-GV 0,22 µm Filtereinheit filtriert. Die in 6-Well-Platten kultivierten hMSCs wurden bis zu einer Konfluenz von mindestens 80% herangezogen, bevor das Medium entfernt und die Zellen mit 1 mL DPBS gewaschen wurden. Die nachfolgende Kultivierung in 1 mL osteogenem Differenzierungsmedium umfasste 2 Wochen im Brutschrank, wobei alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel ohne Waschschrift durchgeführt wurde. Die differenzierten Zellen bildeten dabei zunehmend Kalziumeinlagerungen in ihrer EZM. Um diese morphologischen Veränderungen besser sichtbar zu machen, wurde nach 14 Tagen eine Färbung mit Alizarin Red S durchgeführt.

Nach Abnahme des osteogenen Differenzierungsmediums und dreimaligem Waschen mit 1 mL DPBS wurden die Zellen mit 2 mL 70% Ethanol für 1 Stunde fixiert. Die Inkubationstemperatur wurde dabei nach 30 min von -20°C auf 4°C und nach weiteren 20 min von 4°C auf Raumtemperatur erhöht. Nach einem Waschschrift mit 1 mL H₂O erfolgte die 10-minütige Färbung der hMSCs mit 2 mL Färbelösung für osteogene Differenzierung. Zur Entfernung der Farbstoffreste wurden die hMSCs dreimal mit 1 mL DPBS gewaschen. Die jetzt roten Kalziumeinlagerungen wurden mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops vom Typ CKX41 und einer E-420 DSLR-Kamera fotografiert. Vor dessen spektrometrischer Quantifizierung war die Extraktion von Alizarin Red S aus den Kalziumeinlagerungen der Osteozyten erforderlich. Dies geschah mit 1 mL Elutionspuffer für osteogene Differenzierung und einem Polymax 1040-Taumel-schüttler über einen Zeitraum von 45 min. Danach wurde die Absorption von 200 µL des 1:10 verdünnten Alizarineluats bei einer Wellenlänge von 550 nm in einer 96-Well Platte (transparent, flacher Boden) mit einem Asys DigiScan Temp Photospektrometer gemessen.

E.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

E.2.1.4.1 Neubauer improved-Zählkammer

Die Neubauer improved-Zählkammer dient der direkten Bestimmung der Zellzahl und umfasst eine aus optischem Spezialglas gefertigte Grundplatte mit Deckplättchen. Die Grundplatte weist innerhalb zweier beschrifteter Außenflächen drei Stege auf, welche durch eine H-förmige Ausfräsung voneinander getrennt sind. Der zweigeteilte Mittelsteg mit den beiden Zählgittern bildet den Kammerboden, während die 0,1 mm höher gelegenen Außenstege als Träger des Deckplättchens, welches die Zählkammer nach oben hin abschließt, fungieren. Ein Zählgitter besteht aus drei mal drei Großquadraten mit einer Kantenlänge von je 1 mm.

Jedes Großquadrat ist seinerseits in Kleinquadrate (Kantenlänge 200-250 μm) aufgeteilt, die ausschließlich beim mittleren Großquadrat zudem in Kleinstquadrate (Kantenlänge 50 μm) unterteilt sind (Abb. 9).

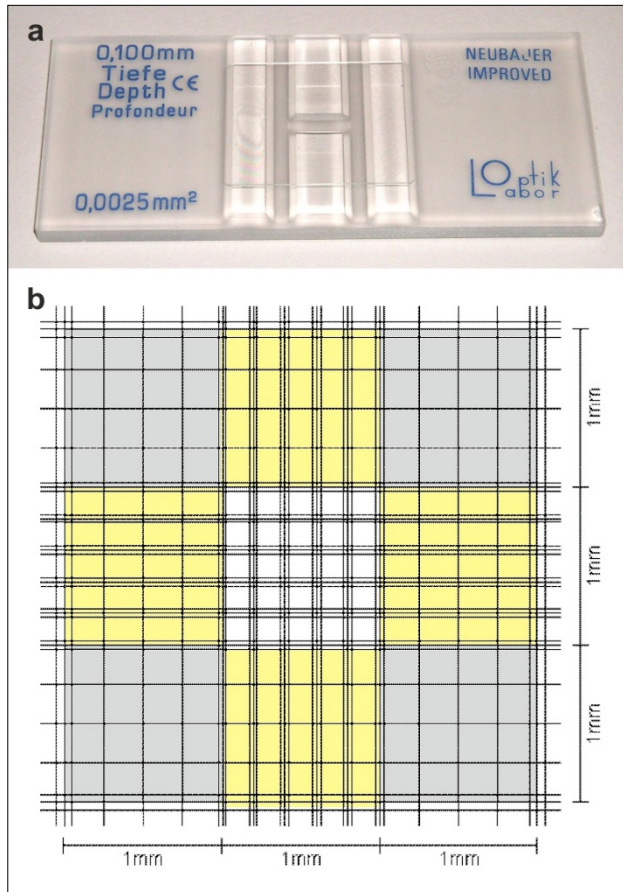


Abb. 9 Die Neubauer improved-Zählkammer. (a) Fotografische Aufnahme der Grundplatte mit Deckplättchen. (b) Schematische Darstellung eines Zählgitters mit Größenangaben. Die grau hervorgehobenen Bereiche repräsentieren die vier verwendeten Großquadrate. (Bildmaterial von www.wikipedia.org mit Modifikationen)

Je nach Größe und Morphologie der Zellen werden unterschiedliche Quadratgrößen für die Zellzahlbestimmung verwendet, wobei die Begrenzungslinien stets als Teil des jeweiligen Quadrats betrachtet werden. Die Verteilung der Zellen auf dem Zählgitter sollte für eine korrekte Auswertung homogen sein.

Zunächst wurden 5 μL der zu quantifizierenden Zellsuspension mit 5 μL Trypanblaulösung vermischt. Trypanblau bindet an intrazelluläre Proteine und wirkt zytotoxisch. Die in lebenden Zellen intakten Zellmembranen können die Aufnahme des Farbstoffs verhindern, was bei der Zählung eine Abgrenzung von toten, dann blau gefärbten, Zellen ermöglicht. Die mit Farbstoff gemischte Zellsuspension wurde seitlich zwischen Kammerboden und bereits aufliegendem Deckplättchen pipettiert. Durch Kapillarkräfte bewegten sich die Zellen auf das Zählgitter im Kammerinneren. Unter Verwendung eines inversen Lichtmikroskops vom Typ CKX41 wurden anschließend alle farblosen Zellen innerhalb von vier Großquadraten gezählt, wobei die Kleinquadrate lediglich der Orientierung dienen. Die Gesamtzahl lebender Zellen pro mL Flüssigkultur entspricht dem Mittelwert der Großquadrate mal 20.000. Für eine zu 100% konfluente

hMSC-Kultur wurde eine Zelldichte von etwa 25.000 Zellen/cm² ermittelt. Anhand dieses Wertes konnten nun Rückschlüsse auf die Zellzahl verschiedener Konfluenzen in Gefäßen mit bekannter Kultivierungsfläche gezogen werden.

E.2.1.4.2 CyQUANT® Zellproliferationsassay

Dieser Assay basiert auf der Interkalation des fluoreszierenden, lichtempfindlichen Farbstoffs CyQUANT® GR in die DNA von Zellen, wodurch diese durch ein Spektralfluorometer quantifiziert werden kann. Da die Menge an DNA mit der Zellzahl korreliert, kann letztere indirekt bestimmt werden. Um falsch positive Signale aus der Messung herausrechnen zu können, muss über einen Negativkontrollansatz ohne CyQUANT® GR der Grad der Autofluoreszenz ermittelt werden. Für die absolute Bestimmung der Zellzahl ist zudem das Mitführen von mindestens drei Ansätzen bekannter Zellzahl erforderlich. Dabei wird die ermittelte Fluoreszenz gegen die bekannten Zellzahlen aufgetragen und ergibt einen bis 50.000 Zellen linearen Standard, mit dessen Hilfe die Zellzahl in Proben mit bekannter Fluoreszenz ermittelt werden kann.

Die Kultivierung von hMSCs für den CyQUANT® Zellproliferationsassay erfolgte in 12-Well-Platten. Nach dem Entfernen des Kultivierungsmediums und dem Waschen der Zellen mit 500 µL DPBS wurden die Platten für 24 Stunden bei -80°C in einem Forma Scientific® 923 ULT Gefrierschrank inkubiert. Die bei dieser Temperatur gebildeten Eiskristalle zerstören die Zellmembranen und legen beim Auftauen die in den hMSCs vorliegende DNA frei. Nach dem Erwärmen der Platten auf Raumtemperatur wurden in jedes Well 250 µL einer Lösung aus 94,75% H₂O (PCR grade), 5% Zelllysepuffer [x20] und 0,25% CyQUANT® GR [x400] gefüllt und die Ansätze im Dunkeln für 5 min inkubiert. Nach dem Überführen von zweimal 100 µL eines jeden Überstands in eine 96-Well Platte (schwarz, flacher Boden) erfolgte die Analyse der Fluoreszenz mit Hilfe eines Safire2™ Spektralfluorometers bei Wellenlängen von 480 nm Exzitation und 520 nm Emission. Der um die Autofluoreszenz korrigierte Mittelwert der Doppelmessung ergab hierbei die Probenfluoreszenz.

E.2.1.4.3 WST-8 Zellvitalitätsassay

Das Cell Counting Kit-8 beinhaltet den WST-8 Zellvitalitätsassay. Über eine Redoxreaktion wird dabei blassgelbes WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium] Mononatriumsalz zum orangefarbenen, im Kultivierungsmedium löslichen Farbstoff Formazan reduziert. Dies geschieht durch die enzymatische Aktivität von Dehydrogenasen, welche sich in den Mitochondrien physiologisch aktiver Zellen befinden und den Elektronendonator NADH im Verlauf des Redoxprozesses zu NAD⁺ oxidieren. Die Menge

des gebildeten Farbstoffs korreliert dabei mit der Anzahl lebender (vitaler) Zellen mit funktionierender Atmungskette und erlaubt somit eine indirekte Bestimmung der Zellzahl via Photospektrometrie. Mit Hilfe eines Negativkontrollansatzes ohne hMSCs wird die Basalabsorption von Formazan in den Proben ermittelt, welche als falsch positives Signal bei den Messwerten nicht berücksichtigt wird. Die zellfreie Entstehung von Formazan kann dabei auf die Anwesenheit reduzierender Komponenten im Kulturmedium zurückgeführt werden. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl in Proben mit bekannter Absorption wird über die Erstellung einer Standardkurve ermöglicht. Dazu sind mindestens drei Ansätze nötig, deren Absorption gegen die bekannten Zellzahlen aufgetragen wird.

Vor dem Assay wurde das Medium von in 12-Well-Platten kultivierten hMSCs abgenommen und die Zellen mit 500 μ L DPBS gewaschen. Dann erfolgte eine serumfreie Inkubation in 250 μ L Kultivierungsmedium mit 10% WST-8-Lösung für 2 Stunden im Brutschrank. Anschließend wurden zweimal 100 μ L eines jeden Überstands in eine 96-Well Platte (transparent, flacher Boden) transferiert und die Absorption durch ein Safire2TM Spektralfluorometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Der um die Basalabsorption korrigierte Mittelwert der Doppelmessung ergab hierbei die Probenabsorption.

E.2.1.5 Bestimmung der zellulären Beweglichkeit

E.2.1.5.1 Scratch-Assay

Um das Migrationsverhalten der hMSCs unter Wundheilungsbedingungen zu untersuchen, wurde eine modifizierte Version des Scratch-Assays nach Lipton *et al.* [198] durchgeführt: Dazu erfolgte zunächst eine Kultivierung der Zellen in 6-Well-Platten bis zur vollständigen Konfluenz. Nach einem Waschschrift mit 500 μ L DPBS und der Zugabe von serumfreiem Kultivierungsmedium wurde die Zellschicht an mehreren Stellen mit einer abgeschrägten 200 μ L-Pipettenspitze für Gilson[®] Pipettoren linear unterbrochen. Diese Kratzer (scratches) sollten im Zusammenspiel mit den durch die zerstörten Zellen freigesetzten Zytokinen und Chemokinen eine migrationsinduzierende Verwundungssituation simulieren. Um hierbei eine exogene Störung zu vermeiden, wurde auf die Anwesenheit von Serum im Medium verzichtet. Die nachfolgenden Bewegungen der hMSCs in die Wundfurchen wurden durch ein inverses Lichtmikroskop vom Typ Axiovert S100 und einer damit verbundenen AxioCam ICc3 CCD-Kamera verfolgt. Für eine befeuchtete Atmosphäre mit 5% CO₂ und 37°C sorgte der Inkubator XL S mit CO₂-Regler und einer Tempcontrol 37-2 digitalgesteuerten Heizung, welcher die Anordnung umgab. Mit Hilfe der motorisierten Mikroskopplattform SCAN IM 130 x 100 und der Software ZEN x64 wurden nun im Abstand von 1 Stunde über einen Zeitraum von 3 Tagen

Aufnahmen unterschiedlicher Ansätze gemacht und diese anschließend in Bilddateien konvertiert. Die Auswertung letzterer erfolgte mit der Software ImageJ und einem darin enthaltenen, speziell auf die Messung der Zelldichte ausgelegten Algorithmus von Heggebo *et al.* [199] mit den nachfolgenden Spezifikationen:

```
run("8-bit");
run("Median...", "radius=3 stack");
run("Enhance Contrast...", "saturated=1 normalize equalize_**all**");
run("Subtract Background...", "rolling=20 light stack");
run("Enhance Contrast...", "saturated=1 normalize equalize_**all**");
run("Invert LUT");
run("Gaussian Blur...", "sigma=10 stack");
run("Enhance Contrast...", "saturated=1 normalize equalize_**all**");
```

Die in Fettdruck hervorgehobenen Befehle waren optional und machten eine zeitgleiche Bearbeitung mehrerer Aufnahmen möglich. Die digitale Invertierung der Bilder durch den Algorithmus ließ fortan zellfreie Flächen weiß und mit Zellen bedeckte Bereiche schwarz erscheinen, was eine quantitative Analyse ermöglichte. Wundheilung wurde dabei durch die relative Zunahme der mit Zellen bedeckten Fläche beziehungsweise des Bildschwarzwertes definiert.

E.2.1.5.2 μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay

Für die Analyse des Migrationsverhaltens auf Einzelzellebene wurde ein μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay verwendet. Durch das Anlegen eines chemotaktischen Gradienten aus speziellen Lockstoffen können in diesem Experiment gerichtete Bewegungen einzelner Zellen analysiert werden. Die Versuchsanordnung, der μ -Slide, beinhaltet drei Kammern. Diese wiederum bestehen jeweils aus zwei Reservoirs, welche durch einen beidseitig durchlässigen Observationskanal von 1 mm Durchmesser voneinander getrennt sind. Die genannten Kompartimente können direkt durch jeweils zwei mit Plastikstöpseln verschließbare Öffnungen befüllt werden (Abb. 10). Als vorbereitende Maßnahme wurden sowohl der μ -Slide als auch alle Komponenten der Migrationslösung mindestens 24 Stunden lang im Brutschrank vorinkubiert, um gasförmige Einschlüsse entweichen zu lassen. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde an einigen Stellen geändert, um die Methode für hMSCs nutzbar zu machen. Im Folgenden wird daher die neu etablierte Version mit den im Ergebnisteil unter Kapitel F.3.2.3.1 aufgeführten Abweichungen vom Originalprotokoll beschrieben.

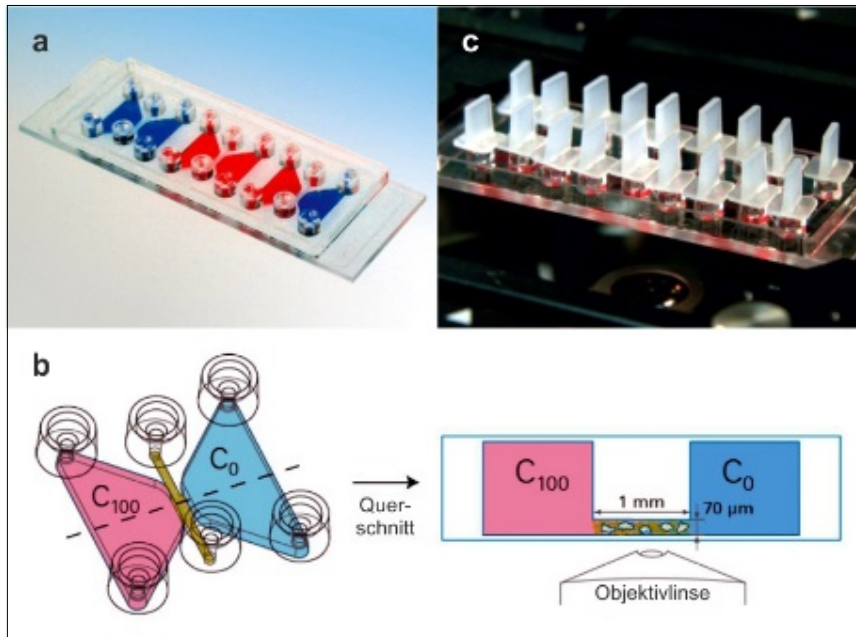


Abb. 10 Der μ -Slide Chemotaxis^{3D}. (a) Fotografische Aufnahme dreier mit Farbstoff befüllter Kammern. (b) Schematische Darstellung einer Kammer mit Größenangaben. C₁₀₀ und C₀ stehen für die im Experiment möglichen, prozentualen Höchstmengen eines biochemischen Lockstoffs. (c) Mit Plastikstöpseln verschlossene Kammer während des Assays. (Bildmaterial von www.ibidi.de mit Modifikationen)

Zunächst erfolgte eine Abnahme des Mediums nach vorangegangener Zentrifugation der Zellsuspension. Anschließend wurden die hMSCs in Migrationslösung resuspendiert und die Zellkonzentration auf $1,25 \times 10^6/\text{mL}$ eingestellt. Nach dem Verschließen der beiden Reservoirs einer Kammer wurden 7.500 hMSCs in den Observationskanal eingebracht. Dies geschah durch das Befüllen einer Öffnung mit 6 μL Zellsuspension und dem nachfolgenden Aufziehen von 6 μL Totvolumen aus der anderen Öffnung. Dieser Vorgang erforderte größte Vorsicht bei der Durchführung und die Verwendung einer abgeschrägten 200 μL -Pipettenspitze für Gilson[®] Pipettoren. Nur so kann in diesem Versuchsschritt die Bildung von Luftblasen in der Migrationslösung vermieden werden, welche sowohl die Adhäsion als auch die Migration der hMSCs sowie den Aufbau des chemotaktischen Gradienten gefährden würde. Nach dem beidseitigen Schließen des Observationskanals wurden die beiden Reservoirs nacheinander geöffnet, auf identische Weise mit jeweils 65 μL serumfreiem Kultivierungsmedium gefüllt und wieder verschlossen. Es folgte eine 3-tägige Inkubation des μ -Slides im Brutschrank. Zum Start des μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assays wurden 6,5 μL Medium aus einem der beiden Reservoirs durch 6,5 μL HuS, eine komplexe Mischung verschiedener biochemischer Lockstoffe, ersetzt. Dies führte zur Bildung eines Konzentrationsgradienten von 10% bis 0% HuS zwischen den beiden Reservoirs. Physiologisch aktive Zellen im Observationskanal orientierten sich in der Folge entlang des Gradienten zum serumhaltigen Reservoir. Diese gerichtete Migration wurde über

einen Zeitraum von 24 Stunden unter Verwendung eines inversen Lichtmikroskops vom Typ IX70 und einer daran angeschlossenen SensiCam QE CCD-Kamera beobachtet. Eine umgebende 37°C Inkubationskammer ermöglichte dabei in Kombination mit einem CAL 3300 Temperaturregler und Heizer ausreichende Kultivierungsbedingungen. Durch den Einsatz der motorisierten Mikroskopplattform SCAN IM 120 x 100, gesteuert über Image-Pro[®] Plus 7.0 MDA, konnten zudem vollautomatisch mehrere Ansätze parallel analysiert werden. Im Abstand von 20 min entstanden nun Aufnahmen der hMSCs, welche im Anschluss an die Lebendzellbeobachtung mit Hilfe der Software ImageJ zu Bildserien zusammengefasst wurden. Die Visualisierung der Migrationsstrecken erfolgte durch das Manual Tracking plug-in für ImageJ. Für die Quantifizierung der Migration hingegen wurde das Chemotaxis and Migration Tool 2.0 verwendet, beides gemäß den Richtlinien des Herstellers. Auf diese Weise konnte sowohl das chemotaktische als auch das migratorische Potential von 30 Zellen quantifiziert und charakterisiert werden.

Das chemotaktische Potential der Zellpopulation wurde anhand des Rayleigh-Tests, der Bewegungsrichtung und des FMI beurteilt. Der Rayleigh-Test wurde verwendet, um die Gleichmäßigkeit der kreisförmigen Zellverteilung statistisch zu ermitteln. Diese ist zu Beginn des Experiments gegeben, kann sich jedoch in dessen weiterem Verlauf verändern. Bei einem finalen Wert von weniger als 0,05 liegt eine ungleichmäßige Verteilung oder auch Schwerpunktbildung vor [200], was auf positive oder negative Chemotaxis schließen lässt. Die Bewegungsrichtung gibt an, ob sich die hMSCs, ausgehend vom jeweiligen Startpunkt, zum biochemischen Lockstoff hin (positiv) oder von diesem weg (negativ) bewegt haben. Die Geradlinigkeit von Zellbewegungen wurde durch den FMI gemessen, welcher durch das Verhältnis der euklidischen Distanz zur tatsächlichen Migrationsdistanz einer Zelle definiert ist. Die euklidische Distanz stellt dabei die kürzeste Strecke zwischen ihrer Start- und Endposition dar. In den Versuchen dieser Arbeit wurde der Gradient stets entlang der y-Achse angelegt, FMI (y)-Werte von 0 bis 1 zeigten somit positive Chemotaxis.

Um das migratorische Potential der Zellpopulation festzustellen, wurden das COM sowie die Migrationsdistanz und -geschwindigkeit ermittelt. Das COM repräsentiert die Endposition des Populationszentrums in Relation zu dessen Startposition. Es ist der Mittelwert der euklidischen Distanzen aller hMSCs, welche Teil der Population sind. Die Migrationsdistanz ist die von den Zellen zurückgelegte Gesamtstrecke, während die Migrationsgeschwindigkeit der hMSCs deren Migrationsdistanz im Verhältnis zur Laufzeit des Experiments beschreibt.

E.2.1.5.3 Transwellassay

Studien zum Invasionspotential einer Zellpopulation, also ihrer Fähigkeit, Barrieren aus EZM zu durchwandern, ermöglichte der Transwellassay. Die hMSCs folgen dabei, wie auch schon beim μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay, einem HuS-Gradienten. Anders als beim bereits vorgestellten Migrationsassay müssen die Zellen auf ihrem Weg jedoch eine rekonstituierte Basalmembran aus Kollagen IV, Laminin und Proteoglykanen passieren, um an ihr Ziel zu gelangen.

Für die Durchführung des Transwellassays wurde das CorningTM CostarTM TranswellTM System genutzt. Es besteht aus einer 24-Well-Platte und 12 Einsätzen, welche eine bodenständige Polycarbonatmembran mit 8 μ m großen Poren aufweisen. Auf diese Weise besteht während des Versuchs eine räumliche Trennung zwischen dem oberen Kompartiment in den Einsätzen und dem unteren Kompartiment der Wells. Die Membranen dienen dabei als Träger der geschlossenen Biomatrix, welche vor Beginn des Experiments aufgetragen wird (Abb. 11). Für diese Beschichtung wurden jeweils 10 μ g humane EZM in 200 μ L RPMI-1640 aufgenommen und in die Einsätze transferiert. Dann erfolgte die Trocknung der Membranoberflächen im sterilen Luftstrom einer Sicherheitswerkbank. Dies geschah über Nacht bei Raumtemperatur und eingeschalteter Arbeitsbeleuchtung. Die nun gleichmäßig verteilte humane EZM wurde mit der Zugabe von jeweils 200 μ L RPMI-1640 in die Einsätze für 2 Stunden rehydriert. Abschließend wurden in alle Einsätze 200 μ L einer Zellsuspension mit 25.000 Zellen/mL und in alle Wells 600 μ L serumfreies Kultivierungsmedium mit 10% HuS eingebracht. Für die optionale Stimulierung der Zellen erfolgte eine Zugabe von 10 ng/mL humanen rekombinanten TNF- α in alle Einsätze. Die Platzierung des Transwell-Systems für 2 Tage im Brutschrank ermöglichte dann die Transmigration der hMSCs.

Um im Anschluss daran eine Diff-Quik[®] Färbung dieser Zellen durchführen zu können, mussten zunächst alle im oberen Kompartiment verbliebenen Bestandteile mit Q-tips[®] entfernt werden. Hier war besonders schnelles und vorsichtiges Arbeiten angebracht, um sowohl ein Zellssterben der transmigrierten hMSCs als auch eine Beschädigung der Membran zu vermeiden. Die Unterseite eines jeden Einsatzes wurde nun sechsmal für 1 s in eine Triphenylmethan- (Diff-Quik[®] Fixierlösung; Fixierung der Zelle), eine Xanthen- (Diff-Quik[®] Lösung I; Färbung des Zytoplasmas) und eine Thiazinlösung (Diff-Quik[®] Lösung II; Färbung des Zellkerns) getaucht. Nach dem Entfernen der Lösungsreste mit destilliertem Wasser und dem Trocknen der Einsätze bei Raumtemperatur wurden die bläulich gefärbten hMSCs mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops vom Typ CKX41 gezählt. Der mit 100 multiplizierte Quotient aus deren Anzahl und der eingesetzten Gesamtzellzahl von 5.000 ergab dabei die prozentuale Invasionsrate.

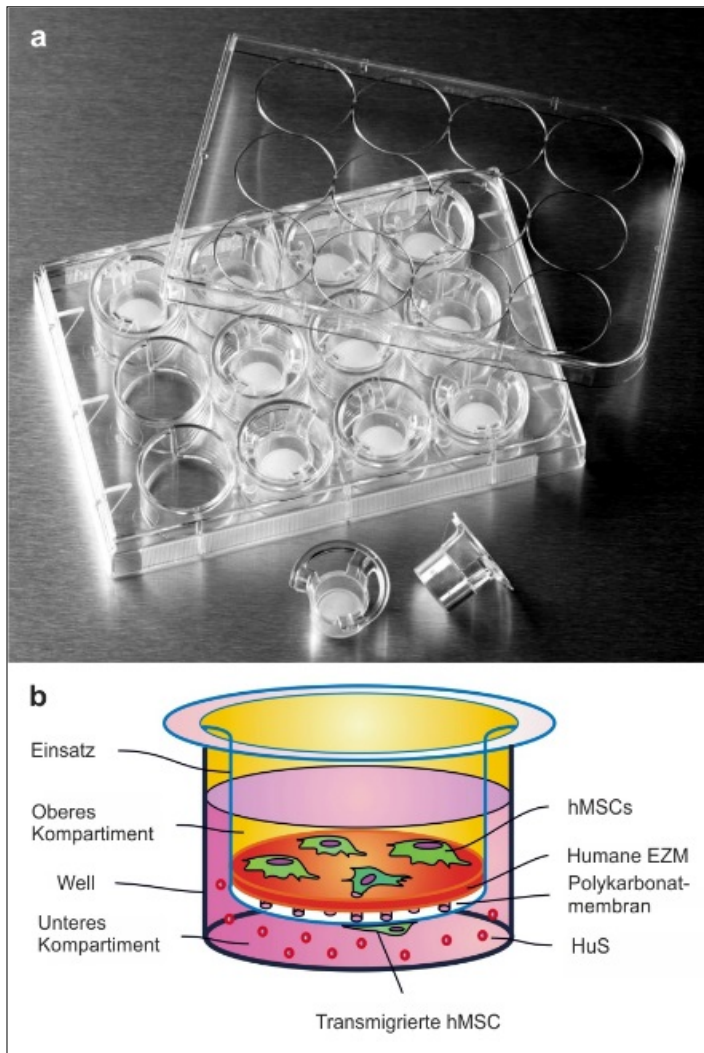


Abb. 11 Das Corning™ Costar™ Transwell™ System. (a) Fotografische Aufnahme der Bestandteile. (b) Schematische Darstellung eines Transwells mit zusätzlicher Biomatrix aus humaner EZM als Migrationsbarriere. (Bildmaterial von www.corning.com und Dr. rer. nat. Virginia Egea mit Modifikationen)

E.2.1.5.4 Adhäsionsassay

Die Bestimmung der relativen zellulären Adhäsionsfähigkeit auf künstlichen Oberflächen erfolgte durch einen Adhäsionsassay.

Aus einer Zellsuspension wurden zunächst 1×10^5 hMSCs/Well in eine 6-Well-Platte transferriert, woran sich eine mehrstündige Kultivierungsphase im Brutschrank anschloss. Durch den Übergang vom sphäroiden in den adhärenen Phänotyp war es den hMSCs dabei möglich, sich am Wellboden festzusetzen. Nicht adhärenente Zellen wurden vor der Auswertung durch die Abnahme des Kultivierungsmediums und einen Waschschrift mit 500 μ L DPBS entfernt. Im Abstand von 1 Stunde wurde nun die Zellzahl durch das Auszählen repräsentativer, mikroskopischer Blickfelder im inversen Lichtmikroskop vom Typ CKX41 ermittelt.

E.2.2 Molekularbiologische Techniken

E.2.2.1 Transfektion von hMSCs

Um siRNA oder Plasmid-DNA in hMSCs einzubringen, wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 verwendet. Die Transfektion der Zellen erfolgte unmittelbar nach ihrer Adhäsion, um der Bildung von EZM-Strukturen zuvorzukommen. Diese beeinträchtigen maßgeblich die Transfektionseffizienz. Daher wurden hMSCs bereits am Vortag ausgesät und über Nacht im Brutschrank serumhaltig kultiviert. Die Zellzahl wurde dabei so gewählt, dass vor der Transfektion eine Konfluenz von etwa 75% herrschte. Eine geringere Zelldichte beeinträchtigt durch die erhöhte Entfernung zu ihren Nachbarzellen die Physiologie der hMSCs, während eine höhere Zelldichte die für das Transfektionsreagenz zugängliche Zelloberfläche verkleinert. Vor dem Beginn der Transfektion wurde das Medium vom Vortag durch 750 µL frisches, serumhaltiges Kultivierungsmedium ersetzt. Die Transfektionslösung wurde aus zwei Komponenten hergestellt: 125 µL RPMI-1640 mit 2,5 µL Lipofectamine® 2000 und 125 µL RPMI-1640 mit 100 nM siRNA oder Plasmid-DNA. Beide Ansätze wurden zunächst separat für 5 min und dann zusammen für 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Mischung der beiden Lösungen setzte eine Mizellenbildung um die zu transfizierenden Nukleinsäuren ein, was weder zu kurz (zu wenig aufgenommene siRNA oder Plasmid-DNA) noch zu lang (zu große Mizellen lagern sich schwerer an der Oberfläche der hMSCs an) dauern durfte. Aufgrund ihrer Dichte musste die Transfektionslösung im Anschluss tropfenweise auf die komplette Wellfläche verteilt werden, um möglichst viele Zellen mit den schnell zum Wellboden sinkenden Mizellen zu bedecken. Es folgte eine 6-stündige Inkubation im Brutschrank. Dann wurde die Transfektionslösung entfernt, die hMSCs mit 500 µL DPBS gewaschen und in serumhaltigem oder serumfreiem Kultivierungsmedium weiter verwendet.

Alle Angaben beruhen auf der Verwendung von 6-Well-Platten. Für 12-Well-Platten und Zellkulturschalen 56,7 cm² wurden die Volumina dem Durchmesser der jeweiligen Kultivierungsfläche angepasst.

E.2.2.2 Luziferaseassay

Die Messung der Aktivität des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs, dessen Zielgene über TCF/LEF-abhängige Bindungsstellen im Promotor induziert oder blockiert werden, erfolgte unter Verwendung eines BAR-gestützten Luziferaseassays. Der modifizierte BAR weist eine Vielzahl von TCF/LEF-Bindestellen auf und steuert hier die Expression des Reportergens *Gaussia Luziferase* [201]. Dieses Lumineszenz-induzierende Protein wird nach der Expression

von den Zellen ins Kultivierungsmedium sezerniert und kann daher quantifiziert werden, ohne die Zellen lysieren zu müssen.

Nach der Transfektion von hMSCs (siehe Kapitel E.2.2.1) mit BAR-Plasmid-DNA wurden die Zellen für 3-4 Tage serumfrei im Brutschrank kultiviert. Währenddessen bildeten die hMSCs β -Catenin-abhängig *Gaussia* Luziferase und gaben diese ins Kultivierungsmedium ab. Die durch das Reporterprotein induzierte Lumineszenz konnte nun mit dem *Gaussia*-Juice SMALL KIT quantifiziert werden. Alle damit verbundenen Arbeitsschritte erfolgten aufgrund der Lichtempfindlichkeit von Coelenterazin im Dunkeln. Zunächst wurden jeweils 20 μ L des abgenommenen Überstands in den Wells einer 96-Well Platte (schwarz, flacher Boden) vorgelegt. Unmittelbar vor der Lumineszenzmessung im Safire2TM Spektralfluorometer wurde jeweils eine Lösung aus 2 μ L Coelenterazin und 100 μ L *Gaussia*-Juice mit einem PIPETMAN[®] Ultra Multichannel, 12x300 hinzupipettiert. Die Messung der bei der Reaktion freigesetzten Lichtquanten von 466 nm Wellenlänge musste ohne Verzögerung erfolgen, da die Luziferase in Gegenwart von Sauerstoff ihr Substrat Coelenterazin sehr schnell in Coelenteramid und Kohlenstoffdioxid umsetzt.

E.2.2.3 Isolierung von RNA aus hMSCs

E.2.2.3.1 mRNA-Isolierung

Für die Extraktion der gesamten zellulären RNA aus hMSCs wurden die Bestandteile des QIAshredder[®] und des RNeasy[®] Mini Kits verwendet.

Nach der Abnahme des Kultivierungsmediums aus den Wells einer 6-Well-Platte erfolgte ein Waschschriff mit 500 μ L DPBS. Um die Zellen zu lysieren und in Lösung zu bringen, wurden diese nach Zugabe von 350 μ L Lysepuffer (GITC-haltiger RLT-Puffer mit 1% β -Mercaptoethanol) mittels eines Zellschabers mit 2-Positionen-Klinge vom Wellboden entfernt. Die Bestandteile des Lysepuffers denaturieren in der Probe enthaltene Proteine wie RNAsen und schützen so die zelluläre RNA während des Zusammenbruchs der Zellmembranen vor enzymatischer Zersetzung. Das Zelllysate wurde dann für die Homogenisierung in ein QIAshredder[®]-Säulchen überführt und in einer HeraeusTM BiofugeTM Pico für 1 min mit 15.142 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Homogenat mit 350 μ L Ethanol (70%) gemischt und in ein RNeasy[®] Mini-Säulchen transferiert. Die darin enthaltene Silica-Gelmembran ist in der Lage, vor der folgenden 15-sekündigen Zentrifugation mit 8.960 x g bis zu 100 μ g RNA aus ethanolhaltigen Zelllysaten zu binden. Eine Reinigung der gebundenen RNA wurde mit Hilfe von ethanolhaltigen Pufferlösungen erzielt. Zuerst wurde das Säulchen mit 700 μ L RW1-Puffer versetzt und für 15 s mit 15.142 x g zentrifugiert. Die Hauptkomponente dieses Puffers ist ein

Guanidinsalz, welches unspezifisch an die Membran gebundene Kohlenwasserstoffe, Proteine und Fettsäuren entfernte. Danach folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 μL RPE-Puffer und Zentrifugationen für 15 s und 1 min bei jeweils 15.142 x g. Dadurch wurden Salzverbindungen entfernt, welche bei den zuvor erfolgten Arbeitsschritten auf die Membran gelangt sind. Um anschließend die Restflüssigkeit zu entfernen, wurde das Säulchen für 2 min mit 15.142 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von 20-30 μL H_2O (PCR grade), einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einer abschließenden Zentrifugation des Säulchens für 1 min mit 15.142 x g wurde die gereinigte mRNA aus der Membran eluiert. Die Quantifizierung der Konzentration erfolgte mit einem NanoDropTM 1000 Spektralfotometer, wobei die Proben stets durch Eis gekühlt wurden, um eine RNA-Degradation zu vermeiden.

E.2.2.3.2 miRNA- und snoRNA-Isolierung

Bei der Isolierung von miRNA und snoRNA kamen QIAshredder[®]- und miRNeasy[®]-Komponenten zum Einsatz.

Zunächst wurde das Kultivierungsmedium aus den Wells einer 6-Well-Platte entfernt und die hMSCs mit 500 μL DPBS gewaschen. Für die Zellyse wurden 700 μL QIAzol[®] Lysereagenz verwendet. Diese monophasische Phenollösung enthält das bereits erwähnte GITC und erfüllt damit eine vergleichbare Funktion wie der in Kapitel E.2.2.3.1 erwähnte Lysepuffer. Mit Hilfe eines Zellschabers mit 2-Positionen-Klinge wurden die hMSCs in Lösung gebracht und in ein QIAshredder[®]-Säulchen transferiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 1 min mit 15.142 x g in einer HeraeusTM BiofugeTM Pico wurde das Homogenat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die in der Probe enthaltenen Nukleoproteinkomplexe zu lösen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 140 μL UltraPureTM Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol und ein starkes Schütteln der Lösung für 15 s von Hand. Nach einer erneuten Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung in einer UNIVERSAL 32 R-Zentrifuge für 15 min bei 4°C mit 20.854 x g zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Phasen: eine rote, organische Phase mit Zelltrümmern und Proteinkomplexen, eine darüber liegende, weiße Interphase mit DNA und kleineren Proteinen und eine farblose, wässrige Phase mit RNAs. Letztere wurde nun vorsichtig abgenommen, ohne dabei Bestandteile der Interphase aufzunehmen, was eine Verunreinigung der Probe zur Folge hätte und im weiteren Verlauf die Ausbeute an miRNA und snoRNA reduzieren würde. Das anschließende, sorgfältige Vermischen der wässrigen Phase mit 525 μL Ethanol (100%) verbesserte die Bindungsbedingungen der RNAs an die Silica-Gelmembran des RNeasy[®] Mini-Säulchens. Die nun erfolgende Zentrifugation in einer HeraeusTM BiofugeTM Pico für 15 s mit 8.960 x g entfernte die chloroformhaltige Lösung von der gebundenen miRNA.

Nach Zugabe von 700 μL RWT-Puffer wurde das Säulchen für 15 s mit 15.142 x g zentrifugiert. Dieser Puffer entspricht hinsichtlich Zusammensetzung und Funktion dem für besonders kleine RNAs von bis zu 18 Nukleotiden Länge optimierten RW1-Puffer aus Kapitel E.2.2.3.1. Die folgenden zwei Waschschritte sowie die abschließende Elution und Quantifizierung entsprachen in ihrer Durchführung denen der mRNA-Isolierung (siehe Kapitel E.2.2.3.1).

E.2.2.4 Synthese von cDNA aus RNA

E.2.2.4.1 cDNA-Synthese aus mRNA

Für die Herstellung von cDNA wurden 12 μL Probenvolumen mit bis zu 1 μg mRNA sowie das QuantiTect[®] Kit für Reverse Transkription eingesetzt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde bei der Verwendung mehrerer Proben vor Beginn eine Verdünnung mit H₂O (PCR grade) durchgeführt, um identische Konzentrationen zu erhalten. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde die Probe stets durch Eis gekühlt, um das Risiko einer RNA-Degradation zu minimieren. Zunächst entfernten 2 μL gDNA Ausradierungspuffer [7x] während einer 2-minütigen Inkubation bei 42°C im Thermomixer comfort sämtliche noch in der Probe enthaltene DNA. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass nach Abschluss der Synthese die komplette Proben-DNA *in vitro* aus der isolierten mRNA entstanden war. Die eigentliche Synthese erfolgte für 30 min bei 42°C nach Zugabe von 4 μL Quantiscript RT Puffer [x5], 1 μL RT Primer Mix und 1 μL Quantiscript Reverse Transkriptase. Nach der reversen Transkription wird verbliebene mRNA durch RNase H-Aktivität abgebaut und es bleibt lediglich die synthetisierte cDNA in der Probe zurück. Um die enzymatische Aktivität zu stoppen, wurde der Ansatz für 3 min bei 95°C gekocht. Abschließend wurden 200 μL H₂O (PCR grade) zugegeben, um die Salzkonzentration in der Probe für die nachfolgende qRT-PCR (siehe Kapitel E.2.2.5.1) zu optimieren.

E.2.2.4.2 cDNA-Synthese aus miRNA und snoRNA

Mit dem miScript II RT Kit erfolgte die Synthese von cDNA aus bis zu 2 μg miRNA und snoRNA pro 12 μL Probenvolumen. Wie bei der cDNA-Synthese aus mRNA (siehe Kapitel E.2.2.4.1) wurde beim Einsatz mehrerer Proben vorverdünnt und, wann immer möglich, auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 4 μL miScript HiSpec Puffer [5x], 2 μL miScript Nucleics Mix [10x] und 2 μL miScript Reverse Transkriptase Mix erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C im Thermomixer comfort. Durch Verwendung dieses speziellen Puffers wurden nur miRNAs und snoRNAs in cDNA umgeschrieben, alle anderen Arten von RNA waren von der reversen Transkription ausgeschlossen. Um die Reaktion zu beenden, wurde die Probe für

5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde analog zum Protokoll der cDNA-Synthese aus mRNA (siehe Kapitel E.2.2.4.1) verfahren.

E.2.2.5 Analyse von cDNA mittels qRT-PCR

E.2.2.5.1 mRNA-stämmige cDNA (Rotor-LightCycler)

Um über die gewonnene cDNA indirekt die Menge spezifischer mRNA ermitteln zu können, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Außer der synthetisierten cDNA wurden in jedem Experiment eine Negativkontrolle sowie drei Verdünnungen einer Positivkontrolle mit bekannter Konzentration mitgeführt. Die Negativkontrolle bestand dabei lediglich aus dem für die Verdünnung verwendeten H₂O (PCR grade) und sollte dessen Reinheit bestätigen. Über die Positivkontrollen wurde im Rahmen der nachfolgenden Auswertung eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die exakte mRNA-Kopienzahl in den Proben ermittelt werden konnte. Eine Inkubation auf Eis sicherte die Qualität aller an der Reaktion beteiligten Komponenten. Jeder Ansatz, bestehend aus 7 µL Probe, 3 µL H₂O (PCR grade), 1 µL FastStart DNA Master SYBR[®] Green I und 1 µL mRNA-Primer, wurde in eine LightCycler[®] Kapillare pipettiert und in einer Heraeus[™] Biofuge[™] Pico für 2 min mit 1.434 x g zentrifugiert. Der FastStart DNA Master SYBR[®] Green I war dabei durchgängig von Alufolie umgeben, weil dieser neben dNTPs und der FastStart Taq DNA Polymerase den lichtempfindlichen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I enthält. Letzterer ermöglicht während der qRT-PCR eine indirekte Messung der Transkriptamplifikation durch ein zunehmendes Fluoreszenzsignal. Anschließend wurden die Kapillaren mit Plastikstöpseln verschlossen, in einen Rundläuferadapter transferiert und dieser in einem LightCycler[®] 1.5 platziert. Parameter wie Temperatur und Zyklenzahl des nun durchgeführten qRT-PCR-Programms entsprachen den jeweiligen Spezifikationen der Primerhersteller. Die spezifischen Primersequenzen der von TIB MOLBIOL hergestellten Primer befinden sich im Materialteil dieser Arbeit (siehe Kapitel E.1.6.3.1), Search-LC gibt diese grundsätzlich nicht bekannt.

E.2.2.5.2 miRNA- und snoRNA-stämmige cDNA (Rotor-LightCycler)

Mit Hilfe der qRT-PCR war auch eine indirekte Quantifizierung verschiedener miRNAs und snoRNAs durch Amplifikation ihrer cDNA möglich. Durch die Kombination von Polyadenylierung und speziell getaggten 5'-Enden der Primer bei der cDNA-Synthese aus miRNA und snoRNA (siehe Kapitel E.2.2.4.2) konnte hierbei ein falsch positives Signal durch eventuell in die Probe gelangte gDNA vermieden werden. Für diese Methode wurde das miScript SYBR[®] Green PCR Kit benötigt. Die verwendeten Kontrollen und Arbeitsschritte entsprachen dabei

dem Protokoll zur Analyse von mRNA-stämmiger cDNA (siehe Kapitel E.2.2.5.1). Die einzige Ausnahme bildete dabei die Zusammensetzung der Ansätze: Hier wurden 6 μL Probe, 10 μL QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [2x], 2 μL miScript Universalprimer [10x] und 2 μL miScript Primer Assay [10x] in eine LightCycler[®] Kapillare pipettiert. Parameter wie Temperatur und Zyklenzahl des nun durchgeführten qRT-PCR-Programms entsprachen den jeweiligen Spezifikationen des Primerherstellers. Die spezifischen Primersequenzen werden von Qiagen grundsätzlich nicht bekannt gegeben.

E.2.2.5.3 mRNA-stämmige cDNA (Multiwell-LightCycler)

Eine umfassende Analyse des mRNA-Expressionsprofils unterschiedlich behandelter hMSCs wurde durch den Einsatz eines RT² Profiler[™] PCR Arrays bewerkstelligt. Dieser deckt viele Gene eines funktionalen Bereichs der Zellbiologie ab, wie beispielsweise die für die Beweglichkeit menschlicher Zellen. Im Gegensatz zu dem in den Kapiteln E.2.2.5.1 und E.2.2.5.2 beschriebenen Rotor-LightCycler-System mit Primerlösungen wurde bei dieser Methode eine vorbehandelte 96-Well Platte samt Pipettierschema geliefert, in der sich bereits lyophilisierte Primer zahlreicher mRNAs, Negativ- und Positivkontrollen befinden. Mit einem PIPETMAN[®] Ultra Multichannel, 12x300 wurden nun in jedes Well 25 μL einer Lösung aus 1.350 μL RT² SYBR Green Mastermix [2x], 1.248 μL H₂O (PCR grade) und 102 μL Probe eingebracht. Für den Array wurden 2.400 μL verwendet, die restlichen 300 μL dienten der Absicherung für eventuell auftretende Volumenverluste beim Pipettieren. Während dieser Vorbereitung wurden alle Lösungen mit Eis gekühlt, wobei der RT² SYBR Green Mastermix [2x] analog zu Kapitel E.2.2.5.1 von Alufolie umgeben war. Die Platte wurde nun mit einer optischen Klebefolie versiegelt und in einer Centrifuge 5430 R für 1 min mit 1.000 x g zentrifugiert, um in den Ansätzen enthaltene Luftblasen zu entfernen. Eine Programmanpassung des 7900HT Fast Real-Time PCR Systems an die Herstellerangaben gewährleistete die optimale Funktionalität der Array-primere während der anschließenden qRT-PCR.

E.2.3 Proteinbiochemische Techniken

E.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Gewinnung von Gesamtprotein aus hMSCs mussten die Zellen nach Abnahme des Kultivierungsmediums zunächst mit 500 μL DPBS gewaschen werden, um in Lösung befindliche Proteine zu entfernen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 100 μL RIPA-Puffer pro Ansatz. Diese Lösung enthält starke Detergenzien sowie Protease- und Phosphataseinhibitoren, um unerwünschte Modifikationen der Proteine im Lysat zu unterbinden. Auf diese Weise konnten vor

allem Membranproteine effektiv isoliert werden, ohne dabei die strukturelle Integrität und damit ihre Funktion zu verlieren. Die Zellen wurden, ähnlich wie bereits in den Kapiteln E.2.2.3.1 und E.2.2.3.2 beschrieben, mittels eines Zellschabers mit 2-Positionen-Klinge in Lösung gebracht und dann über einen Zeitraum von 30 min alle 5 min durch die Impulse eines Vortex-Mischers (PARAMIX3 oder VF2) homogenisiert. Zwischenzeitlich wurde die Probe auf Eis inkubiert, um die Stabilität der Proteine zu erhalten. Abschließend trennte eine auf 4°C vorgekühlte UNIVERSAL 32 R-Zentrifuge für 10 min mit 20.854 x g die in der Probe enthaltenen Zelltrümmer vom proteinhaltigen Überstand, welcher dann weiter verwendet wurde.

E.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Unter Verwendung des PierceTM Coomassie Plus (Bradford) Assay Kits wurde die Gesamtproteinmenge in Kulturüberständen oder Zelllysaten ermittelt. Beim zugrunde liegenden Prinzip, der Bradford-Methode, führt die Proteinbindung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 im sauren Assay-Reagenz zu einem Farbumschlag von Braun zu Blau. Unter Verwendung von verschiedenen Verdünnungsstufen einer mitgelieferten Albuminstandardlösung [2 mg/mL] wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe jedem Absorptionswert eine bestimmte Proteinkonzentration zugeteilt werden konnte. Auch die zu analysierenden Proteinproben wurden unterschiedlich stark verdünnt, um eine exaktere Bestimmung ihrer Konzentration zu erzielen. Für die Messung im Asys DigiScan Temp Photospektrometer oder Safire2TM Spektralfluorometer bei 595 nm unter Verwendung einer 96-Well Platte (transparent, flacher Boden) wurden jeweils 100 µL Probenvolumen mit 100 µL Assay-Reagenz versetzt.

E.2.3.3 SDS-PAGE und Westernblot

Die Biosynthese bestimmter Proteine durch hMSCs konnte mit Hilfe der Westernblot-Technik unter Ausnutzung spezifischer Antikörperbindung sowohl qualitativ als auch semiquantitativ analysiert werden. Zunächst mussten die im Zelllysate oder Kulturüberstand vorliegenden Proteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt werden.

Dafür wurden 30 µL einer jeden Probe mit 10 µL NuPAGE[®] LDS Probenpuffer [4x] versetzt. Für die optionale Durchführung unter denaturierenden Bedingungen enthielt dieser Puffer zusätzlich 23% DL-DTT. Der Gesamtansatz wurde dann für 3 min im Thermomixer comfort auf 95°C erhitzt. DL-DTT bewirkt bei hohen Temperaturen eine Spaltung und nachfolgende Reduzierung der Disulfidbrücken von Proteinen, welche daraufhin ihre Sekundär- und Tertiärstruktur verlieren und sich so besser nach ihrer spezifischen Molekülmasse im Gel voneinander trennen lassen. Der im Verhältnis 1:5 mit H₂O (PCR grade) verdünnte Magic MarkTM XP

Western Protein Standard sowie eventuell mitgeführte Kontrollen wurden dabei wie die Proben behandelt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gel, welches sich in einer mit 700 mL NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer befüllten XCell SureLock™ Minizelle befand. Nach dem Transfer der vorbehandelten Ansätze in die schmalen Taschen des Trenngels durch spezielle Prot/Elec™ Pipettenspitzen wurde die Minizelle verschlossen. Das im Gel enthaltene SDS, ein anionisches Tensid, lagert sich an die Proteine an und versieht sie auf diese Weise mit einer stark negativen Gesamtladung. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung werden die Proteine dann durch das Gel zum positiven Pol gezogen. Die im Gel zunehmende Polyacrylamidkonzentration (4-12%) bildet einen Porengradienten, der wie ein Netz mit sukzessiv abnehmender Durchlässigkeit funktioniert. Damit akkumulieren die Proteine, abhängig von ihrer relativen Molekülmasse, an unterschiedlichen Stellen im Gel. Für den Start des Trennvorgangs wurde die Minizelle an ein EPS 301 oder EPS 601 angeschlossen und dieses auf 200 V und 40 mA mit einer Laufzeit von 100 min eingestellt. Um frei werdende Hitze auszugleichen und damit die strukturelle Integrität des Gels zu erhalten, wurde der Laufpuffer zuvor in einem LSTR 13006 GWU Kühlschrank auf 4°C abgekühlt.

Nach Abschluss der Auftrennung wurde das Gel aus seiner Kunststoffummantelung gelöst und eine mit Methanol vorbehandelte Immobilon™-P Membran aufgelegt. Durch die Behandlung mit Methanol wird die Oberfläche der hydrophoben PVDF-Membran hydriert, was ihre Zugänglichkeit beim folgenden Proteintransfer entscheidend verbessert. Von besonderer Wichtigkeit war zudem die Entfernung jeglicher Luftblasen zwischen Gel und Membran, da diese den Transfer der Proteine massiv eingeschränkt hätten. Beidseitig umschlossen von je einem Whatman® Filterpapier Nr. 1 und drei Blotkissen wurden Gel und Membran in ein XCell II™ Blotmodul eingebracht, welches seinerseits in der bereits verwendeten XCell SureLock™ Minizelle platziert wurde. Nach dem Befüllen mit auf 4°C vorgekühlten 700 mL NuPAGE® Transferpuffer wurde die Minizelle verschlossen und der Proteintransfer mit 30 V und 170 mA für 1 Stunde durchgeführt. Hierbei zog ein senkrecht zum Gel verlaufendes, elektrisches Feld die durch SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden wurden. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran vom Gel entfernt und auf einen Polymax 1040-Taumelschüttler überführt, der für alle nachfolgenden Arbeitsschritte des Westernblots bis zur Detektion verwendet wurde. Es folgten ein kurzer Waschschrift mit TBS-T und eine Inkubation für mindestens 1 Stunde in 50 mL Blockierlösung. Die in dieser Lösung enthaltenen Milchproteine besetzen freie Stellen auf der Membran und verhindern im weiteren Verlauf falsch positive Detektionen durch unspezifisch gebundene

Antikörper. Eine weitere Reduktion unspezifischer Antikörperreaktionen erzielte die Anwesenheit des nichtionischen Tensids Tween[®] 20. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und deren Reste zweimal für je 10 min mit TBS-T abgewaschen. Nun wurde die Membran zunächst mit einem in TBS-T verdünnten Primärantikörper versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Stuart[®] Roller mixer SRT9 inkubiert. Dieser Arbeitsschritt konnte alternativ auch für 3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Der Antikörper bindet dabei im Idealfall selektiv das zu untersuchende Protein sowie seine Fragmente. Als Nächstes wurde der ebenfalls in TBS-T verdünnte Sekundärantikörper für 30 min zugegeben. Dieser mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper bindet speziesspezifisch an den zuvor verwendeten Primärantikörper. Die Reste ungebundener Antikörper wurden nach der jeweiligen Inkubation mit je zwei 10-minütigen Waschschritten durch TBS-T entfernt. Die Membran wurde nun für 1 min mit 1 mL Amersham[™] ECL[™] Westernblot Detektionsreagenz oder dem leistungsstärkeren SignalFire[™] Plus ECL Detektionsreagenz behandelt, welche zusammen mit der Meerrettich-Peroxidase die Bildung von Luminol aus Phthalsäure katalysieren. Die bei dieser Reaktion durch Chemilumineszenz emittierten Lichtquanten von 425 nm Wellenlänge konnten dann mit Hilfe des Amersham[™] ECL[™] Hyperfilm[™] detektiert werden. Dazu wurde die Membran mit Toppits[®] Frischhaltefolie umgeben und in einer Kodak[®] BioMax[®] Filmkassette befestigt. Aufgrund der Sensitivität des Films gegenüber grünen und blauen Anteilen des sichtbaren Lichts fanden die anschließenden Arbeitsschritte im Dunklen unter Rotlicht statt. Der zuvor zugeschnittene Film wurde zunächst auf die Membran gelegt und die Kassette geschlossen. Die Dauer dieser Inkubation richtete sich nach der Art und voraussichtlichen Menge des zu analysierenden Proteins in der Probe. Die Visualisierung von Proteinbanden auf dem Film erfolgte durch dessen Kontakt mit einer Entwicklerlösung, während die Fixierlösung eine Lichtunempfindlichkeit erzielte. Beide Reagenzien wurden nach ihrer Verwendung mit Wasser abgewaschen.

Eine abschließende indirekte Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte durch den Einsatz eines GS-800[™] kalibrierten Densitometers und der Quantity One[®] 1-D Analysesoftware, basierend auf Ausdehnung und Schwarzwert der Proteinbanden.

E.2.3.4 Zymographie

Eine wichtige Methode zur semiquantitativen Erfassung von Proteasen ist die Zymographie, die auf dem Nachweis von Proteinen mit proteolytischer Aktivität in einem proteinhaltigen Substratgel basiert. Für den zymographischen Nachweis von Gelatine-spaltenden Proteasen wurden Fertiggele vom Typ Novex[®] 10% Zymogramm (Gelatin) Protein Gel mit 10% Tris-Glycin und

0,1% Gelatine verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt bei der Zymographie stets unter nicht-denaturierenden Bedingungen, um die enzymatische Aktivität zu erhalten und so einen anschließenden Nachweis von Gelatinasen, wie etwa MMP-2 und MMP-9, anhand des Abbaus der im Gel enthaltenen Gelatine zu ermöglichen.

Zunächst erfolgte eine Zugabe von 10 µL Probenpuffer [4x] zu 30 µL Probenvolumen. Das im Puffer enthaltene SDS führte zur reversiblen Auflösung der Proteinfaltung und erlaubte eine Auftrennung nach relativer Molekülmasse. Anschließend wurde das Gelatinegel in eine XCell SureLock™ Minizelle mit 700 mL vorgekühltem Laufpuffer eingebracht und die Geltaschen mit den zuvor behandelten Proben befüllt. Nach dem elektrophoretischen Trennvorgang, der bei 300 V und 40 mA für 70 min erfolgte, wurde das Gel aus der umgebenden Kunststoffhülle entnommen und für alle nachfolgenden Arbeitsschritte auf einem Polymax 1040-Taumelschüttler platziert. Es folgte eine zweimalige, 15-minütige Gelinkubation in jeweils 50 mL Novex® Zymogramm Renaturierungspuffer. Dieser bewirkt, dass das im Polyacrylamidgel enthaltene SDS ausgewaschen wird, so dass die im Gel befindlichen Proteine wieder ihre ursprüngliche Faltung einnehmen und gegebenenfalls proteolytische Aktivität entwickeln können. Dabei kommt es zur artifiziellen Aktivierung von zuvor in der Probe inaktiv vorliegenden Proenzymformen, was auch deren Nachweis ermöglicht. Das Gel wurde dann zweimal in jeweils 50 mL Novex® Zymogramm Entwicklungspuffer inkubiert: zunächst für 15 min bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 37°C in einer UNIHOOD™ 550. Der unter diesen Bedingungen begünstigte lokale Abbau von Gelatine konnte nachfolgend durch eine Coomassie-Färbung indirekt sichtbar gemacht werden. Nach 90-minütiger Inkubation mit 50 mL Färbelösung war intakte Gelatine dunkelblau gefärbt, während sich Stellen gelatinolytischer Aktivität transparent darstellten. Als Referenz wurde in jedem Gel eine Probe mit konditioniertem Medium von PMA-stimulierten HT1080-Zellen mitgeführt. Dieses enthält proMMP-9 (94 kDa), proMMP-2 (72 kDa) und MMP-2 (66 kDa) und erlaubt über einen Co-Migrationsvergleich Rückschlüsse auf die Präsenz dieser oder anderer Gelatinasen in den Proben. Um das gefärbte Gel für längere Zeit haltbar zu machen, wurde es nach 30 min in 50 mL Konservierungslösung zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet. Dies geschah über Nacht mit Hilfe eines Gel-trocknungsrahmens bei 37°C.

Die Quantifizierung der Gelatinasebanden im Zymogramm erfolgte nach dem Scan des Gels im kalibrierten GS-800™ Densitometer in invertierter Darstellung, da die Quantity One® 1-D Analysesoftware lediglich Schwarzwerte analysieren kann.

E.2.3.5 Co-Immunopräzipitation

Die Klärung der Frage, ob ein bestimmtes Protein mit einem anderen Protein interagiert und Komplexe ausbildet, erfolgte durch Co-IP unter Verwendung des Dynabeads® Protein G Kit für Immunopräzipitation. Dazu wurden die Bindungspartner gemeinsam in Lösung gebracht, nachfolgend mit Antikörpern gegen das eine Protein extrahiert (präzipitiert) und eine Komplexbildung durch Antikörper gegen das andere Protein im Westernblot nachgewiesen. Durch den Gebrauch zweier unterschiedlicher Antikörper wird geprüft, ob bis zur Detektion eine stabile Interaktion vorliegt. Dafür wurde ein auf die jeweiligen Proteine abgestimmtes Protokoll etabliert, von dem lediglich der Ablauf, nicht aber die Parameter übertragbar sind. Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf eine Co-IP von DKK1 und RECK.

Zunächst erfolgte eine 3-stündige Koinkubation von jeweils 200 ng der beiden rekombinant hergestellten, humanen Varianten von DKK1 und RECK im Thermomixer comfort bei 4°C mit 1.000 rpm. Diese Bedingungen sollten eine mögliche Heterodimerisierung der beteiligten Proteine begünstigen. Parallel wurden 200 µL einer Lösung aus DPBS-T und 10 µg Anti-DKK1-Antikörpern hergestellt. Die Zugabe von 1,25 mg Dynabeads® und eine anschließende 10-minütige Inkubation bei 1.000 rpm koppelte die Antikörper an die beads. Durch einen DynaMag™-Spin Magnet konnten die magnetischen beads dann aus der Antikörperlösung entfernt und mit 200 µL DPBS-T gewaschen werden. Nach der Aufnahme in 40 µL DKK1/RECK-Lösung wurden die beads für 3 Stunden bei 4°C mit 1.000 rpm inkubiert. An RECK gebundenes DKK1 sollte dabei mit Hilfe der Anti-DKK1-Antikörper aus der Lösung gezogen werden. Dem Entfernen der Lösung folgte ein dreimaliges Waschen der beads mit jeweils 200 µL DPBS-T auf Eis. Ein zusätzlicher Waschschriff erfolgte durch die Zugabe von 100 µL Waschpuffer in Kombination mit einem Reaktionsgefäßwechsel. Diese beiden Maßnahmen stellten die Abwesenheit ungebundener Proteine sicher und verhinderten somit falsch positive Signale bei der Detektion. Um die Proteine von den beads zu lösen, wurden diese in 20 µL Elutionspuffer resuspendiert und für 2 min bei 1.000 rpm inkubiert. Nach der Trennung der beads vom Eluat konnte letzteres abgenommen und durch einen Westernblot (siehe Kapitel E.2.3.3) weiter analysiert werden. Dies geschah auch mit der Positiv- (rekombinantes RECK) und den Negativkontrollen (ohne Anti-DKK1-Antikörper oder ohne einen der beiden Bindungspartner) sowie den Überständen mit ungebundenen Proteinen.

E.2.4 Durchführung und statistische Datenanalyse

Die statistischen Daten stammen jeweils aus einem repräsentativen von insgesamt mindestens drei identisch durchgeführten Experimenten ($n \geq 3$) und wurden mit der Software SPSS

Statistics 20.0 ausgewertet. Für die Beurteilung der Varianzhomogenität wurde dabei der Levene-Test verwendet. Vergleiche zwischen zwei Gruppen erfolgten mit einem Zweistichproben-t-Test, der, falls nötig, mit einer Welch-Korrektur kombiniert wurde. Bei drei oder mehr Gruppen wurde, je nach Homogenität der Varianz, entweder eine einfaktorielle ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-hoc-Test oder ein Brown-Forsythe-Test mit nachfolgendem Games-Howell Post-hoc-Test durchgeführt. Für die Datenanalyse des Scratch-Assays wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni Post-hoc-Test verwendet. Ein zweiseitiger Wahrscheinlichkeitswert von weniger als 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

F Ergebnisse

F.1 Knockdown von RECK in hMSCs

Zu Beginn der Arbeiten war unklar, in welchem Umfang hMSCs RECK exprimieren. Analysen mittels qRT-PCR und Westernblot zeigten eine konstitutive, signifikante Transkription und Biosynthese von RECK in Kontrollzellen (Abb. 12a, b).

Nachfolgend sollte der Einfluss dieser endogenen RECK-Expression auf wichtige physiologische Eigenschaften von hMSCs wie Wachstum, Beweglichkeit und Differenzierung untersucht werden. Hierzu war vorgesehen, die Translation von RECK mit Hilfe der RNAi gezielt zu blockieren. Der Entwurf zweier verschiedener siRNA Oligonukleotide S1 und S2, die spezifisch gegen humane RECK-mRNA gerichtet sind, erfolgte gemäß der Richtlinien von Reynolds *et al.* [202]. Sowohl S1 als auch S2 führten nach der Transfektion zu einer erheblichen Reduktion von RECK-mRNA zwischen Tag 1 und Tag 10 im Vergleich zu Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert waren (Abb. 12a). Als Folge nahm im Zeitraum von 3-14 Tagen nach der Transfektion auch die Proteinmenge von RECK drastisch ab (Abb. 12b).

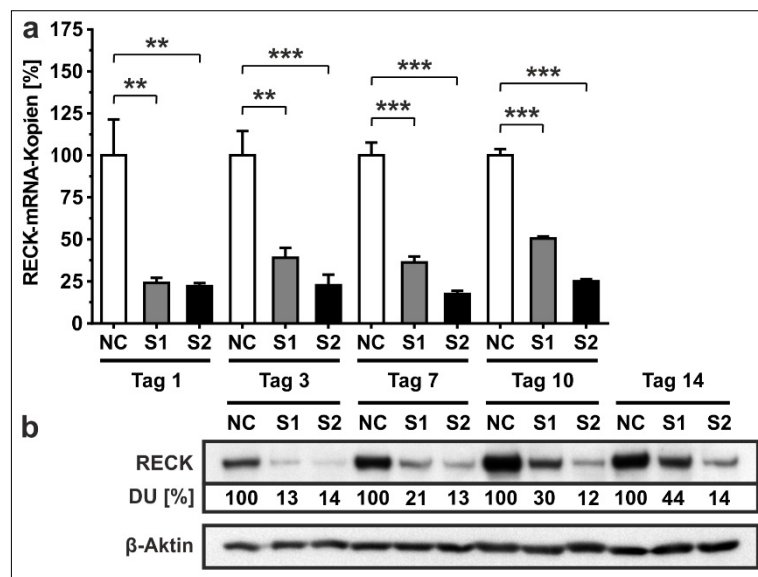


Abb. 12 Knockdown von RECK in hMSCs. Die Zellen wurden zunächst mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (S1, S2) transfiziert. **(a)** Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von RECK erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf GAPDH-mRNA normalisiert. **(b)** Der Proteinnachweis von RECK erfolgte in Zelllysaten per Westernblot, wobei β -Aktin als Ladungskontrolle fungierte. Die Resultate der Densitometrie sind in densitometric units (DU) angegeben, alle Werte von NC-Zellen betragen dabei 100%. Alle vorliegenden Daten zeigen entweder **(b)** Einzelwerte oder **(a)** den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. $**P < 0,01$; $***P < 0,001$

Auffällig war, dass S2 eine im gesamten Zeitraum wesentlich effizientere Reduktion der Biosynthese von RECK erzielte als S1. Während die Expression von RECK in S2-transfizierten

hMSCs konstant auf 17-25% Transkription und 12-14% Translation reduziert wurde, erhöhte sich in S1-transfizierten hMSCs die Transkription von 24 auf 50% und die Translation von 13 auf 44%. Der effizientere Hemmeffekt von S2 ist wahrscheinlich auf die speziellen Modifikationen dieses Oligonukleotids zurückzuführen, etwa dem Vorhandensein eines RNAi-cap[®], welches aus fünf GC-bp besteht (Abb. 13).

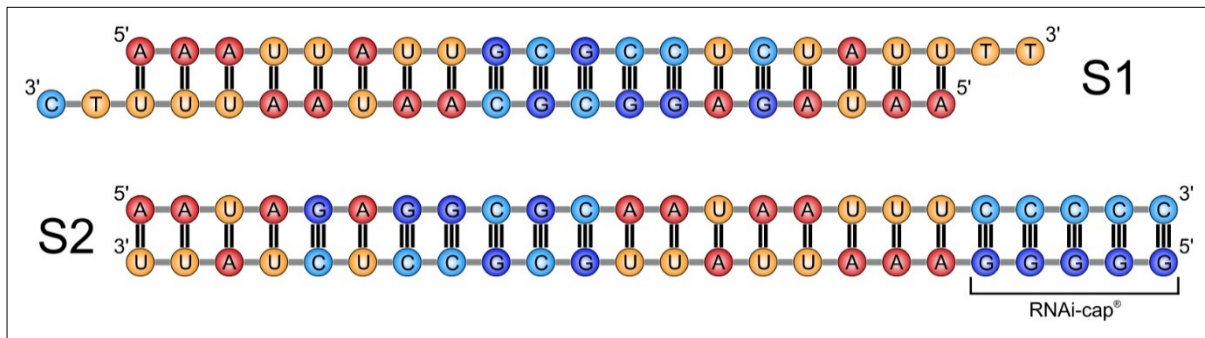


Abb. 13 Schematische Darstellung der beiden RECK-spezifischen siRNAs S1 und S2. Im Gegensatz zu S1 besitzt S2 ein RNAi-cap[®] und weist keine 3'-Nucleotide-Überhänge am Ende des Sense-Stranges und dem Beginn des Antisense-Stranges auf.

Diese GC-Basenklammer am 3'-Ende des Sense-Stranges erhöht nachweislich die Stabilität der Nucleinsäure [203] und gewährleistet zudem weniger unspezifische Bindungen [204]. Aufgrund der erzielten Resultate wurde in allen nachfolgenden RECK-Knockdown-Experimenten dieser Arbeit die siRNA S2 verwendet.

F.2 Einfluss von RECK auf das Wachstum von hMSCs

Zunächst wurde untersucht, ob die konstitutive Expression von RECK in hMSCs Einfluss auf wachstumsassoziierte Zellfunktionen hat. Dafür wurden die Zellteilungsrate und die metabolische Aktivität von RECK-exprimierenden und RECK-defizienten Zellen analysiert.

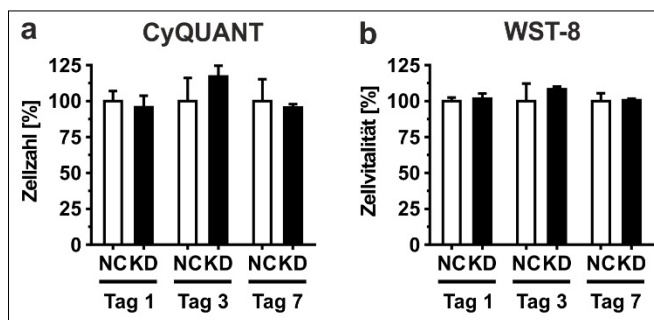


Abb. 14 Einfluss von RECK auf das Wachstum von hMSCs. Die Zellen wurden zunächst mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) transfiziert. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte durch den CyQUANT[®] Zellproliferationsassay (a), die Analyse der Zellvitalität hingegen mit Hilfe des WST-8 Zellvitalitätsassays (b).

Die relativen Werte beziehen sich auf die NC-Population, welche mit 100% angegeben ist. Alle vorliegenden Daten zeigen den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen.

Dies geschah unter Verwendung eines Zellproliferationsassays und durch Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität mit Hilfe eines Zellvitalitätsassays. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten übereinstimmend, dass sich in 7-tägiger Abwesenheit von endogen gebildetem RECK keine signifikanten Änderungen der Zellproliferation (Abb. 14a) und der Zellvitalität (Abb. 14b) in hMSCs nachweisen lassen. Dabei liegen die Unterschiede aller ermittelten Wertepaare bei maximal 17%. Folglich hat RECK keinen erkennbaren Einfluss auf das Wachstum dieser Zellen.

F.3 Einfluss von RECK auf die Beweglichkeit von hMSCs

F.3.1 Effekte von RECK auf die Invasion und MMP-/TIMP-Expression

F.3.1.1 Invasionspotential

Während RECK als Inhibitor der Invasion von Tumorzellen gut untersucht ist, konnte über seine Rolle in nicht-malignen Zellen bisher nur sehr wenig in Erfahrung gebracht werden. Um dies näher zu untersuchen, wurden hMSCs mit und ohne RECK-Knockdown hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Invasion, also der gerichteten Migration durch eine Barriere aus EZM, analysiert. Dies erfolgte unter Verwendung eines Transwellassays mit EZM-beschichteten Inserts und HuS als Lockstoff. Für die Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der Invasion von stimulierenden Agenzien wurden die Zellen fakultativ mit TNF- α versetzt. Die Auswertung der Resultate ergab, dass RECK-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine leicht erhöhte Invasionsrate aufweisen. Die Zunahmen in Ab- (+15%) und Anwesenheit (+12%) von TNF- α fallen jedoch nicht signifikant aus (Abb. 15). Daraus ist zu schließen, dass die konstitutive RECK-Expression in hMSCs unter den getesteten Bedingungen keinen wesentlichen Einfluss auf das Invasionsverhalten der Zellen hat.

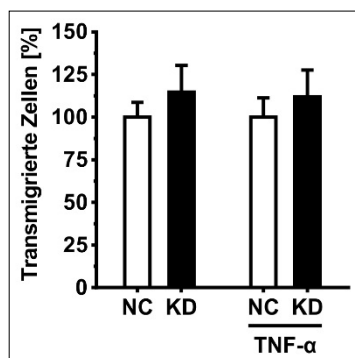


Abb. 15 Invasionspotential von hMSCs in einem Transwellassay.

Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst für 24 Stunden kultiviert. Die Inkubation von hMSCs auf der mit humaner EZM beschichteten Polykarbonatmembran erfolgte dann über einen Zeitraum von 2 Tagen. Teilweise wurden im oberen Kompartiment 2 ng TNF- α als stimulierendes Agens verwendet. Im darunter liegenden Kompartiment dienten stets 10% HuS als Lockstoff. Die Quantifizierung der relativen Anzahl transmigrierter hMSCs erfolgte nach Zellfärbung durch Phasenkontrastmikroskopie und bezieht sich auf die NC-Population, welche

mit 100% angegeben ist. Alle vorliegenden Daten zeigen den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen.

F.3.1.2 Expression von MMPs und TIMPs

In Tumorzellen reguliert RECK die Biosynthese oder Aktivität bestimmter MMPs und hemmt so deren Migrationsverhalten. Da in hMSCs hierüber wenig bekannt ist, wurde die Transkription und Translation ausgewählter MMPs und TIMPs in RECK-exprimierenden und RECK-defizienten hMSCs auf mRNA- und Proteinebene über einen Zeitraum von 7 Tagen analysiert. Dabei lag die Biosyntheserate von MMP-9 unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

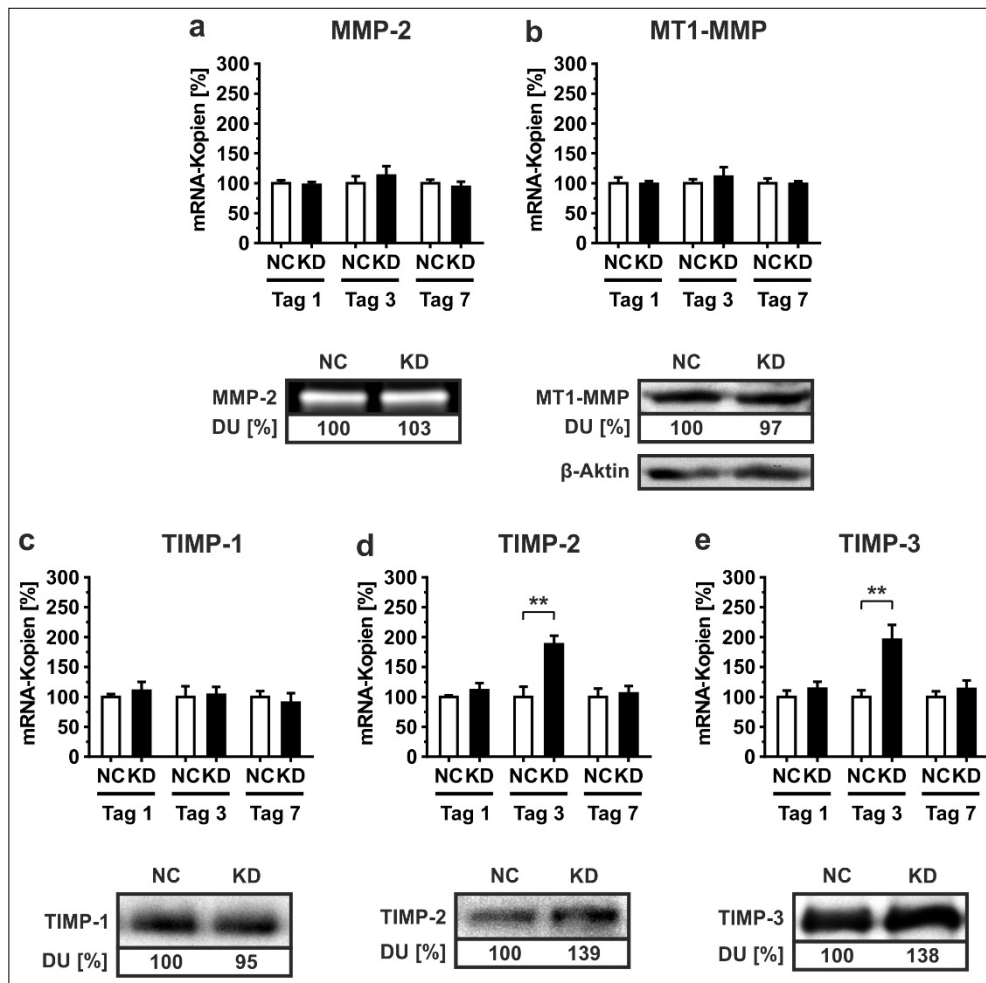


Abb. 16 MMP- und TIMP-Expression in hMSCs. Die Zellen wurden zunächst mit unspezifischer Kontroll- (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichtete siRNA (KD) transfiziert. Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von MMP-2 (a), MT1-MMP (b), TIMP-1 (c), TIMP-2 (d) und TIMP-3 (e) erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf GAPDH-mRNA normalisiert. Der Proteinnachweis von MMP-2 (a), TIMP-1 (c), TIMP-2 (d) und TIMP-3 (e) erfolgte in Kulturüberständen gleichen Gesamtproteingehalts nach 7 Tagen Kultivierung mittels Zymographie (MMP-2) oder Westernblot (TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3). Der Nachweis von MT1-MMP (b) wurde am Tag 7 in Zelllysaten per Westernblot durchgeführt, wobei β -Aktin als Ladungskontrolle fungierte. Die Resultate der Densitometrie sind in densitometric units (DU) angegeben, alle Werte von NC-Zellen betragen dabei 100%. Alle vorliegenden Daten zeigen bei Zymographie und Westernblot Einzelwerte, bei der qRT-PCR hingegen den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. ****** $P < 0,01$

Hinsichtlich der Transkription und Translation von MMP-2, MT1-MMP und TIMP-1 wiesen RECK-defiziente hMSCs im Vergleich zu hMSCs mit basaler RECK-Expression keine signifikanten Veränderungen auf (Abb. 16a-c). Dahingegen wiesen RECK-defiziente Zellen eine verstärkte Transkription und Translation von TIMP-2 und TIMP-3 gegenüber Zellen mit basaler RECK-Expression auf: Die mRNA-Level von TIMP-2 (+88%) und TIMP-3 (+96%) nahmen nach 3 Tagen signifikant zu, was nach 7 Tagen zu einer Erhöhung der Proteinlevel von TIMP-2 (+39%) und TIMP-3 (+38%) führte (Abb. 16d, e). Diese Ergebnisse zeigen, dass die endogene Expression von RECK die Biosynthese von TIMP-2 und TIMP-3 in hMSCs blockiert, ohne die Expression von MMP-2, MMP-9, MT1-MMP und TIMP-1 zu beeinflussen.

F.3.2 Effekte von RECK auf die hMSC-Migration

F.3.2.1 Wundheilungspotential

hMSCs bewegen sich nicht nur durch Migrationsbarrieren hindurch sondern auch an ihnen entlang, wofür unterschiedliche Signalwege und Schlüsselproteine erforderlich sind. Im sogenannten Scratch- oder Wundheilungsassay wird das Vermögen konfluenten Zellschichten untersucht, nach Anlegen einer Furche („Verletzung“) diese durch Migration und Proliferation wieder zu schließen. Hierbei bewegen sich die Zellen vom Rand der Wundfurche in den zellfreien Raum, um die Integrität des Zellverbunds wiederherzustellen.

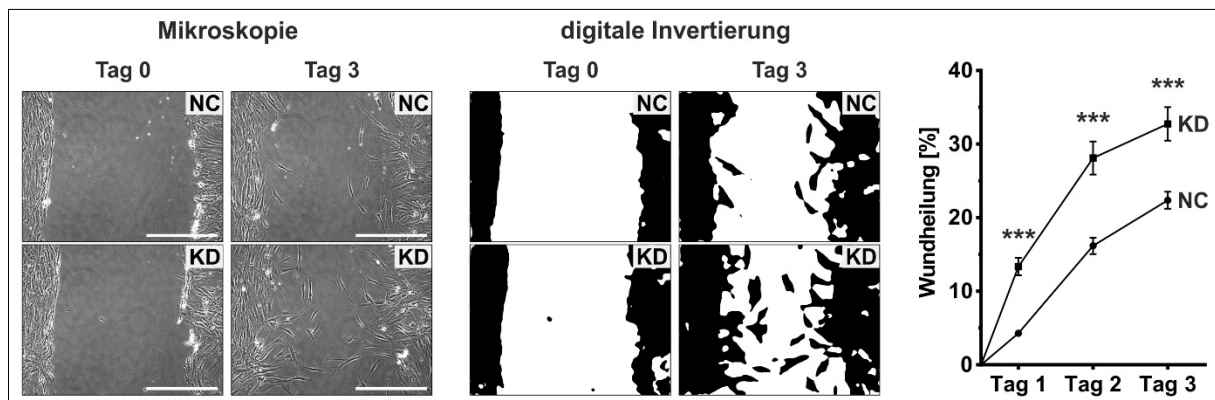


Abb. 17 Wundheilung durch hMSCs in einem Scratch-Assay. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst für 7 Tage kultiviert. Dem Anlegen einer Furche in den konfluenten Zellschichten folgte die fotografische Dokumentation zellbedeckter Flächen zu Versuchsbeginn (Tag 0) sowie am Tag 1, 2 und 3 über ein Phasenkontrastmikroskop. Im Anschluss an die digitale Invertierung der entstandenen Bilddateien wurden von hMSCs bedeckte sowie unbedeckte Flächen densitometrisch quantifiziert und als Wundheilungsrate grafisch dargestellt. Die Maßstabsleisten entsprechen jeweils einer Distanz von 500 μm . Alle vorliegenden Daten zeigen bei Mikroskopie und digitaler Invertierung Einzelaufnahmen, bei der Wundheilung hingegen den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. *** $P < 0,001$

Sie orientieren sich dabei nicht nur am Vorhandensein von Zell-Zell-Kontakten, sondern auch an Faktoren, die aus zerstörten Zellen freigesetzt wurden. Die mit hMSCs erzielten Resultate zeigten, dass RECK-Knockdown-Zellen die Wundfurchen deutlich schneller schließen konnten als Kontrollzellen. Der signifikante Unterschied der beiden Wundheilungsraten betrug im analysierten 3-Tages-Zeitraum 9-12% (Abb. 17). Dies lässt darauf schließen, dass die endogene RECK-Expression das chemotaktische Migrationsverhalten von hMSCs unter Wundheilungsbedingungen negativ beeinflusst.

F.3.2.2 Adhäsionspotential

Für die Migration von hMSCs sind nicht nur die bereits in Kapitel F.3.1.2 untersuchten MMPs und TIMPs entscheidend. In Abwesenheit von Migrationsbarrieren kommt vor allem der Adhäsionsfähigkeit der Zellen eine große Bedeutung zu. Ohne einen optimalen Kontakt mit den sie umgebenden Strukturen fehlt es den hMSCs an Übertragungsmöglichkeiten für ihre Bewegungsenergie, was eine schnelle und zielgenaue Fortbewegung beeinträchtigt. Daher wurde der Einfluss einer endogenen Expression von RECK auf die Fähigkeit dieser Zellen untersucht, an einer für hMSCs optimierten Kultivierungsoberfläche aus Plastik zu adhären. Es zeigte sich, dass RECK-defiziente Zellen ein signifikant höheres Adhäsionspotential aufwiesen als Zellen mit basaler RECK-Expression. Bis zum Erreichen der Konfluenz fiel die Adhäsion über einen Zeitraum von 3 Stunden 22-27% effizienter aus (Abb. 18). Es ist somit anzunehmen, dass RECK unter den getesteten Bedingungen eine inhibierende Wirkung auf das Adhäsionspotential von hMSCs hat.

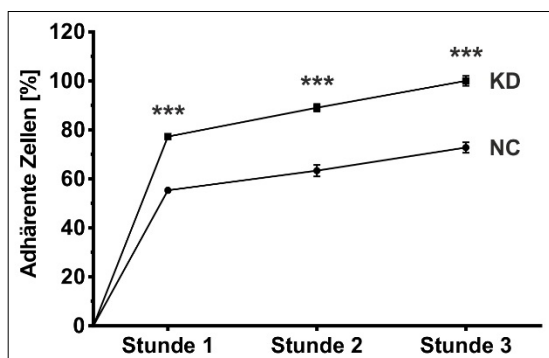


Abb. 18 Adhäsionspotential von hMSCs in einem Adhäsionsassay. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst für 3 Tage kultiviert. Nach ihrer Trypsinierung und dem Transfer auf eine Nunc™ Zellkulturplatte erfolgte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten das Entfernen nicht-adhärenter hMSCs durch das Waschen der Kultivierungsoberflächen mit DPBS. Für eine nachfolgende Quantifizierung adhärenter hMSCs durch Phasenkontrastmikroskopie wurden repräsentative Beobachtungsfelder ausgezählt. Die relative Zellzahl bezieht sich dabei auf die KD-Population nach 3 Stunden, welche die höchstmögliche Konfluenz im Versuchsansatz aufweist und folglich mit 100% angegeben ist. Alle vorliegenden Daten zeigen den Mittelwert ± SD dreier unabhängiger Messungen. *** $P < 0,001$

rener hMSCs durch Phasenkontrastmikroskopie wurden repräsentative Beobachtungsfelder ausgezählt. Die relative Zellzahl bezieht sich dabei auf die KD-Population nach 3 Stunden, welche die höchstmögliche Konfluenz im Versuchsansatz aufweist und folglich mit 100% angegeben ist. Alle vorliegenden Daten zeigen den Mittelwert ± SD dreier unabhängiger Messungen. *** $P < 0,001$

F.3.2.3 Chemotaktisches und migratorisches Potential

F.3.2.3.1 Etablierung des μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assays

Für die Verwendung von hMSCs in einem μ -Slide Chemotaxis^{3D} zum Zweck einer Migrationsanalyse war es notwendig, das vom Hersteller ausgegebene Versuchsprotokoll an die vorliegenden Bedingungen anzupassen.

Zunächst wurde auf Kollagen I in der Migrationslösung verzichtet, da eine Migrationsbarriere nicht erforderlich war. Zudem wäre es den Zellen bei Einschluss in ein Biopolymer nicht möglich, an den Boden des Observationskanals zu adhären. Auf den daraus resultierenden permanent sphäroiden Zustand würden hMSCs mit Apoptose reagieren, wodurch eine korrekte Durchführung des Assays verhindert worden wäre. Da sich die Migrationslösung allerdings ohne den Einsatz einer Biomatrix nicht verfestigt, werden im Observationskanal befindliche Zellen durch mechanische Einwirkung von außen sehr leicht in die beiden Reservoirs getragen. Um dies zu vermeiden, musste der μ -Slide bis zur Adhäsion der hMSCs beim Befüllen, Verschießen und der nachfolgenden Inkubation mit äußerster Vorsicht behandelt werden.

Um adhären, subkonfluente hMSCs für eine Verwendung im μ -Slide vorsichtig abzulösen und zu vereinzeln, wurden vier verschiedene Methoden getestet: Bei Verwendung von AccutaseTM oder EDTA [1-5 mM] in DPBSTM war die Ausbeute geeigneter Einzelzellen zu gering. Das Ablösen der hMSCs anhand eines Zellschabers mit 2-Positionen-Klinge (siehe Kapitel E.2.2.3.1 und E.2.2.3.2) setzte die Zellen wohl einem zu hohen mechanischen Stress aus, so dass sich diese nicht am Boden des Observationskanals festsetzten. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Ausbeute und nachfolgender Adhäsion der hMSCs im Assay wurden mit einer Trypsin/EDTA-Lösung erzielt, welche bereits bei der Zellexpansion zur Anwendung kam (siehe Kapitel E.2.1.1).

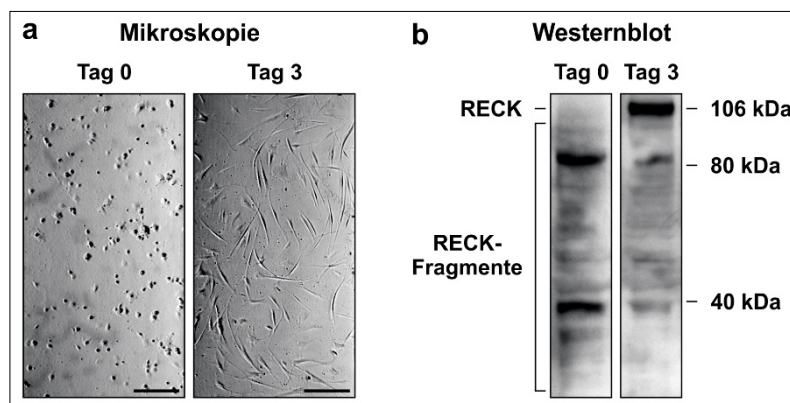


Abb. 19 Auswirkung der Trypsinierung von hMSCs auf die RECK-Expression. Unmittelbar nach Trypsinierung (Tag 0) und 3 Tage danach wurden die Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht (a) und RECK in Zellysaten per Westernblot detektiert (b). Die Maßstabsleisten entsprechen jeweils einer Distanz von 250 μ m. Alle relativen Molekülmassen sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

Da es sich bei RECK um ein Zelloberflächenprotein handelt, wurde überprüft, ob das Protein durch die enzymatische Aktivität von Trypsin möglicherweise gespalten wird. Tatsächlich zeigte eine Westernblot-Analyse der Zellextrakte trypsiniertes hMSCs einen Abbau von RECK in den Suspensionszellen. Allerdings waren die Zellen 3 Tage später adhären und verfügten wieder über normale Mengen an zellassoziertem RECK, offenbar durch erneute Biosynthese (Abb. 19). Aus diesem Grund wurde der μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay grundsätzlich erst nach einer mindestens 3-tägigen Kultivierung der hMSCs im Observationskanal gestartet.

F.3.2.3.2 Migrationsanalyse

Die zuvor im Scratch-Assay (siehe Kapitel F.3.2.1) festgestellte negative Wirkung von RECK auf die hMSC-Migration sollte nun im μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay überprüft werden. Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist, dass sie detaillierte Daten zum chemotaktischen und migratorischen Potential auf Einzelzellebene liefert. Die Untersuchung der Spontanmigration von hMSCs in Abwesenheit von biochemischen Lockstoffen erbrachte eine zufällig ausgerichtete Fortbewegung der Zellen im Hinblick auf ihre Bewegungsrichtung (Tab. 1; Abb. 20a, b). Dies wurde durch eine mathematische Auswertung unter Verwendung des Rayleigh-Tests bestätigt (Tab. 1). Innerhalb eines chemotaktischen Gradienten hingegen zeigten hMSCs eine gerichtete Bewegung, welche in RECK-Knockdown-Zellen unter Berücksichtigung der Migrationsdistanzen signifikant höher war als in Kontrollzellen. Dies äußerte sich in einem niedrigeren Wert im Rayleigh-Test (Tab. 1) sowie einer direkteren Bewegung (Tab. 1; Abb. 20a, b) und einem erhöhten FMI (Tab. 1). Darüber hinaus wiesen RECK-Knockdown-hMSCs ein vergleichsweise hohes migratorisches Potential auf, was sich durch Zunahmen der Parameter COM (Tab. 1; Abb. 20a) sowie Migrationsdistanz (Tab. 1; Abb. 20a, b) und -geschwindigkeit (Tab. 1) zeigte. Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine endogene Expression von RECK durch die Einschränkung des chemotaktischen und migratorischen Potentials von hMSCs gerichtete Bewegungsabläufe dieser Zellen negativ moduliert.

Tab. 1 Chemotaktische und migratorische Parameter des in Abb. 10 beschriebenen μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assays. Die Begriffsdefinitionen befinden sich im Methodenteil unter E.2.1.5.2.

hMSCs	chemotaktisches Potential			migratorisches Potential		
	Rayleigh-Test (P)	Bewegungsrichtung (hin/weg)	FMI (x/y)	COM (x/y) [μ m]	Migrationsdistanz [μ m]	Migrationsgeschwindigkeit [μ m/h]
NC	0,52	15 / 15	-0,057 / -0,026	-10,82 / -6,30	159,65	6,65
NC + HuS	1E-5	25 / 5	-0,023 / 0,154	-6,09 / 46,15	300,32	12,51
KD + HuS	1E-8	27 / 3	-0,038 / 0,314	-14,13 / 120,80	366,91	15,29

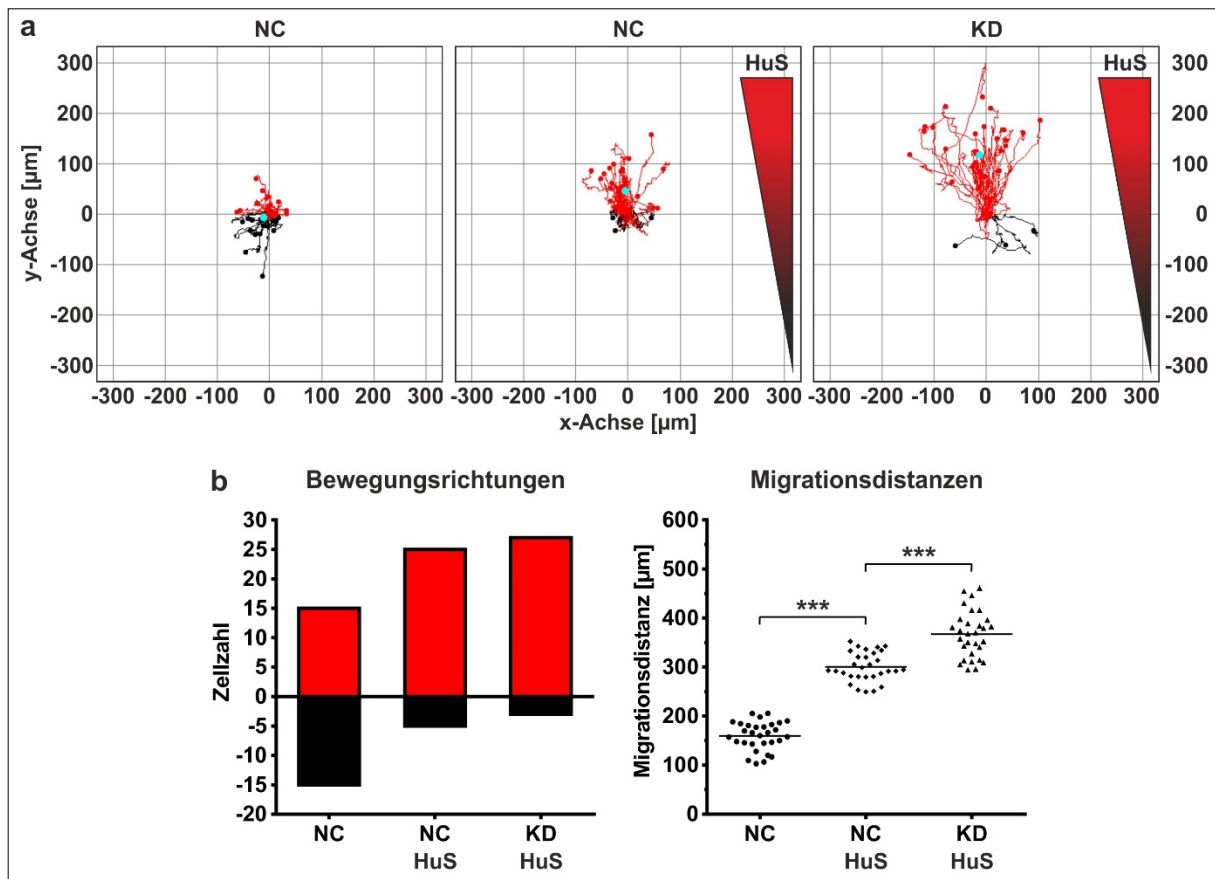


Abb. 20 Migrationsanalyse von hMSCs in einem μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst für 4 Tage kultiviert und dann in einen μ -Slide transferiert. Nach 4-tägiger Inkubation erfolgte in An- und Abwesenheit von HuS als Lockstoff eine Lebendzellbeobachtung durch Phasenkontrastmikroskopie. Anhand von 72 Aufnahmen wurden über den Zeitraum von 24 Stunden die Wanderstrecken der hMSCs ermittelt (Manual Tracking) und quantifiziert (Chemotaxis and Migration Tool 2.0). **(a)** Migrationsplots unterschiedlich behandelter Zellen. **(b)** Repräsentative graphische Darstellung eines chemotaktischen Parameters (Bewegungsrichtung) und eines migratorischen (Migrationsdistanz) Parameters. Die Bewegungen zum HuS hin (rot) oder vom HuS weg (schwarz) sowie das COM (cyan) sind farblich hervorgehoben. Alle vorliegenden Daten zeigen **(a, b)** Einzel- und **(b)** Mittelwerte von unabhängigen Messungen an jeweils 30 unterschiedlichen Einzelzellen. *** $P < 0,001$

F.3.2.4 Transkription zellbeweglichkeitsassoziierter RNAs

F.3.2.4.1 Biosynthese ausgewählter mRNAs

Die Zellbeweglichkeit wird durch die Expression zahlreicher Gene gesteuert. Für eine umfassende Analyse der Transkription von insgesamt 87 dafür relevanter mRNAs wurden Proben von RECK-exprimierenden und RECK-defizienten hMSCs in einem Human Cell Motility PCR Array untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie ergaben signifikante Unterschiede in den Expressionsprofilen von RECK-defizienten Zellen gegenüber Zellen mit basaler RECK-Expression, wobei die Mehrzahl der betroffenen Gene (71) unter RECK-Mangel eine Herunterregulation erfuhr (Abb. 21a). Vier dieser Gene, *IGF1*, *MENA*, *N-WASP* und *VEGFA*, werden offenbar

besonders stark von RECK beeinflusst. Anhand einer qRT-PCR konnte eine relative Abnahme der Transkriptionsraten von MENA (-25%), IGF1 (-35%) und VEGFA (-30%) in RECK-defizienten hMSCs bestätigt werden (Abb. 21b-d), allerdings erwies sich ausschließlich die von IGF1 als statistisch signifikant (Abb. 21c). N-WASP zeigte dagegen durch seine nicht signifikante relative Transkriptionsabnahme von 8% eine vom Array abweichende Tendenz (Abb. 21e).

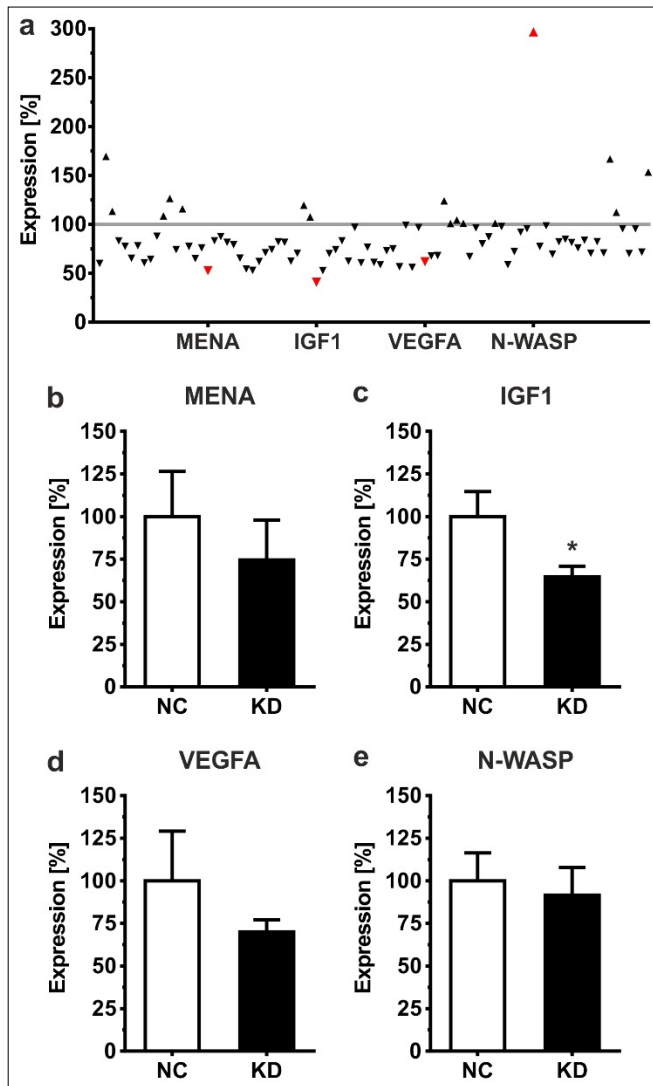


Abb. 21 Biosynthese zellbeweglichkeits-assoziiierter mRNAs in hMSCs. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst für 4 Tage kultiviert. **(a)** Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von 87 Migrationsgenen erfolgte durch einen RT² ProfilerTM PCR Array. Gene, die in KD-hMSCs hochreguliert sind (▲) befinden sich oberhalb, herunterregulierte Gene (▼) hingegen unterhalb der 100%-Trennlinie, welche die jeweiligen Werte von NC-Zellen repräsentiert. MENA, IGF1, VEGFA und N-WASP sind rot hervorgehoben. Die relativen mRNA-Expressionen von MENA **(b)**, IGF1 **(c)**, VEGFA **(d)** und N-WASP **(e)** wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Die Normalisierung aller Werte erfolgte auf **(a)** das geometrische Mittel der mRNAs von β -Aktin, B2M, GAPDH, HPRT1 und RPLP0 sowie **(b-e)** GAPDH-mRNA. Alle vorliegenden Daten zeigen entweder **(a)** Einzelwerte oder **(b-e)** den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. * $P < 0,05$

In nachfolgenden Westernblots konnte IGF1 aufgrund seiner äußerst schwachen Expression weder in Zelllysaten unstimulierter, noch mit Wnt3a behandelter hMSCs detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt den Schluss zu, dass RECK einen positiven Einfluss auf die Transkription von IGF1 hat, der sich jedoch nicht auf dessen Translation niederschlägt. Andere im Array untersuchte mRNAs wurden aufgrund der geringen Effekte nicht weiter analysiert.

F.3.2.4.2 Biosynthese ausgewählter miRNAs

Die mRNA eines zellbeweglichkeitsassoziierten Gens kann auch durch spezifische miRNA-Bindung an der Translation gehindert werden. Sollte die Expression einer oder mehrerer dieser miRNAs in hMSCs abhängig von RECK sein, wäre die Möglichkeit einer indirekten Migrationsregulation gegeben. Dazu erfolgte eine Quantifizierung von let-7f, miR-124, miR-126-3p, miR-126-5p und miR-335 in hMSCs mit und ohne RECK-Knockdown. Im Vergleich zu den Kontrollzellen nahmen in RECK-Knockdown-Zellen die miRNA-Expressionen um bis zu 15% ab, ohne allerdings jeweils signifikant auszufallen (Abb. 22). Die Biosyntheserate von miR-124 lag hingegen unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Diese erzielten Resultate legen somit nahe, dass die basale Biosynthese der analysierten miRNAs in hMSCs offenbar nicht unter dem Einfluss von RECK steht.

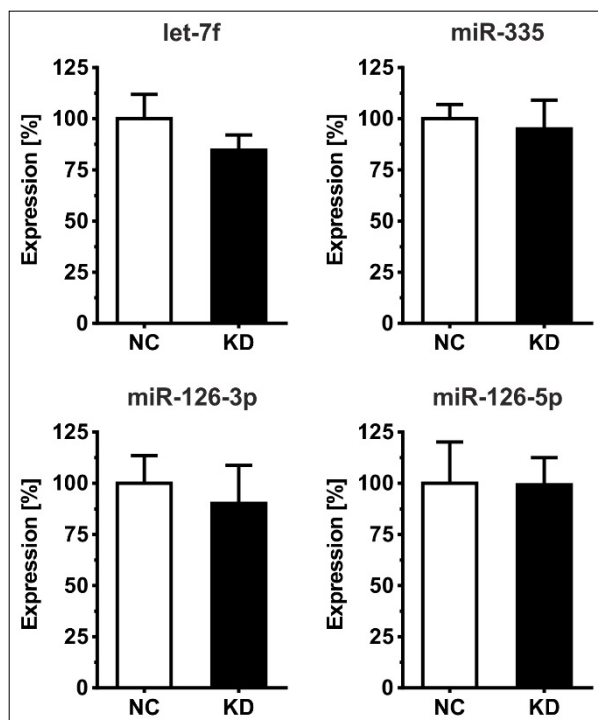


Abb. 22 Biosynthese zellbeweglichkeitsassoziiertes miRNAs in hMSCs. Die Zellen wurden nach der Transfektion zunächst mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) für 3 Tage kultiviert. Die Bestimmung der relativen miRNA-Expression von let-7f, miR-335, miR-126-3p und miR-126-5p erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf SNORD44 normalisiert. Alle vorliegenden Daten zeigen den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen.

F.4 Rolle von RECK bei der Differenzierung von hMSCs

F.4.1 Abhängigkeit der Differenzierung von der RECK-Expression

Neben Wachstum und Migration repräsentiert die Differenzierung eine wichtige physiologische Eigenschaft von hMSCs. Daher wurde untersucht, ob endogenes RECK die Fähigkeit dieser Zellen, in Fett- und Knochenzellen zu differenzieren, beeinflusst. Adipogen ausdifferenzierte hMSCs weisen eine hohe Expression adipogener Differenzierungsmarker wie PPAR γ auf. Zudem enthalten Adipozyten Lipidvakuolen, welche durch den Zellfarbstoff Oil Red O

quantifiziert werden können. Osteogen ausdifferenzierte hMSCs bilden große Mengen osteogener Differenzierungsmarker wie ALP. Ferner zeichnen sich Osteozyten durch Kalziumeinlagerungen in ihre EZM aus, deren Menge nach einer Färbung mit Alizarin Red S bestimmt werden kann. Vergleichende Analysen in RECK-exprimierenden und RECK-defizienten hMSCs zeigten, dass ein RECK-Mangel während der Inkubation in adipogenem Differenzierungsmedium eine um 68% verstärkte Transkription von PPAR γ zur Folge hatte, während bei osteogener Differenzierung 27% weniger ALP-mRNA vorhanden war (Abb. 23a). Zu diesem Resultat passen die Daten der mikroskopischen Analyse gefärbter Zellschichten von adipogen und osteogen differenzierten hMSCs: Während in Adipozyten mit reduzierter Biosynthese von RECK nach der Oil Red O-Färbung mehr Lipidvakuolen sichtbar waren, zeigten Osteozyten mit eingeschränkter RECK-Expression nach der Alizarin Red S-Färbung weniger Kalziumeinlagerungen in ihre EZM (Abb. 23b). Eine nachfolgende Quantifizierung der aus den gefärbten Zellen chemisch eluierten Farbstoffe bestätigte ebenfalls die Ergebnisse der Mikroskopie: In Abwesenheit von RECK nahmen Adipozyten 18% mehr Oil Red O und Osteozyten 19% weniger Alizarin Red S auf (Abb. 23c). Diese durchgängig signifikanten Resultate zeigen, dass RECK im Zusammenspiel mit den jeweiligen Differenzierungsstimuli die Adipogenese von hMSCs hemmt und die Osteogenese dieser Zellen fördert.

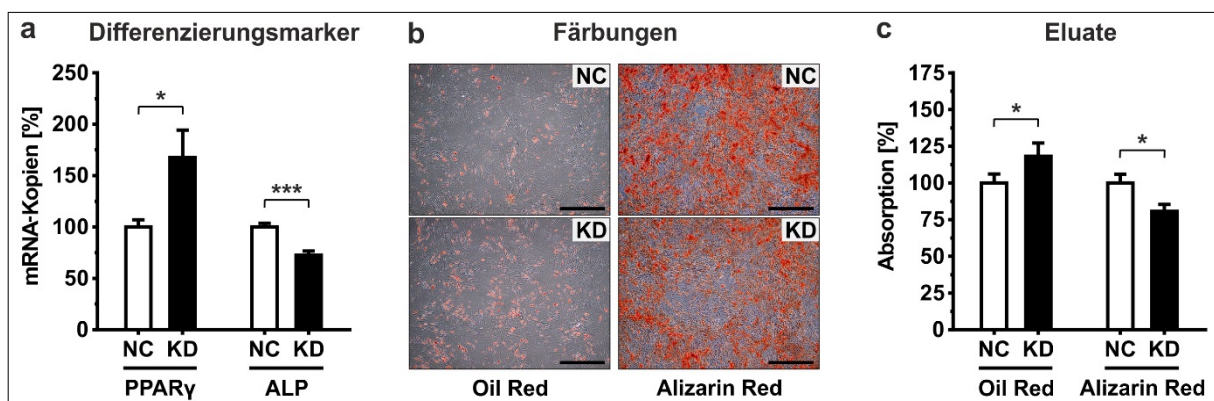


Abb. 23 Abhängigkeit der Differenzierung von der RECK-Expression. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst in adipogenem oder osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. **(a)** Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von PPAR γ und ALP erfolgte nach 10 Tagen mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf GAPDH-mRNA normalisiert. Die Zellfärbung von Adipozyten mit Oil Red O sowie Osteozyten mit Alizarin Red S erfolgte nach 14 Tagen und wird hier durch repräsentative Aufnahmen gefärbter Zellschichten **(b)** und Absorptionswerte der daraus eluierten Farbstoffe **(c)** dargestellt. Die Maßstabsleisten entsprechen jeweils einer Distanz von 1 mm. Die vorliegenden Daten zeigen entweder **(b)** Einzelaufnahmen oder **(a, c)** den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

F.4.2 Abhängigkeit der RECK-Expression von der Differenzierung

Bei einer Differenzierung erfahren Zellen grundlegende physiologische Veränderungen. Daher wurde der Einfluss adipogener und osteogener Differenzierung auf die Biosynthese von endogenem RECK analysiert. Die Ergebnisse zeigten auf mRNA- und Proteinebene übereinstimmend, dass die RECK-Expression von adipogen differenzierten hMSCs im Vergleich zu undifferenzierten Zellen reduziert vorlag, während bei osteogener Differenzierung der hMSCs vergleichsweise mehr RECK exprimiert wurde. Besonders deutlich traten die geschilderten Effekte nach 3 Tagen Differenzierung auf. Hier fiel die Transkription von RECK in Adipozyten 31% niedriger und in Osteozyten 32% höher aus als in undifferenzierten Zellen (Abb. 24a). Außerdem nahm die Translation von RECK in adipogen differenzierten hMSCs um 52% ab und in osteogen differenzierten hMSCs um 36% zu (Abb. 24b). Die Auswirkungen der Differenzierung auf die Translation schwächten sich zwar bis zum Tag 14 ab, die signifikanten Transkriptionsunterschiede blieben jedoch relativ konstant. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Adipogenese von hMSCs einen hemmenden und die Osteogenese dieser Zellen einen fördernden Einfluss auf die RECK-Expression ausübt.

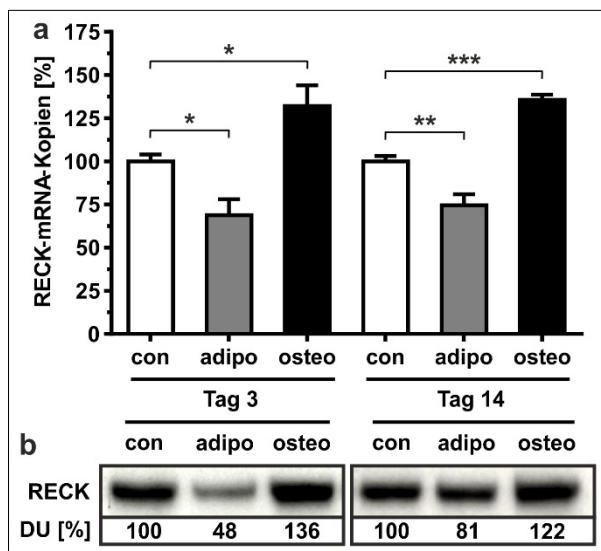


Abb. 24 Abhängigkeit der RECK-Expression von der Differenzierung. Die Zellen wurden zunächst in Abwesenheit (con) oder Anwesenheit von adipogenem (adipo) und osteogenem (osteo) Differenzierungsmedium kultiviert. **(a)** Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von RECK erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf GAPDH-mRNA normalisiert. **(b)** Der Proteinnachweis von RECK wurde in Zelllysaten gleichen Gesamtproteingehalts per Westernblot durchgeführt. Die Resultate der Densitometrie sind in densitometric units (DU) angegeben, alle Werte von undifferenzierten Zellen betragen dabei 100%. Die

vorliegenden Daten zeigen entweder **(b)** Einzelwerte oder **(a)** den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

F.4.3 RECK und der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg

F.4.3.1 Auswirkung von β -Catenin auf die Transkription von PPAR γ

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem in hMSCs beobachteten Einfluss von RECK auf die adipogene Differenzierung (siehe Kapitel F.4.1) und dem kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg herzustellen, sollte zunächst die bereits bekannte Hemmung der Biosynthese von PPAR γ durch den Transkriptionsfaktor β -Catenin bestätigt werden. Dazu

wurde die β -Catenin-Expression mittels RNAi gezielt blockiert. Die Knockdown-Effizienz von β -Catenin lag nach 4 Tagen auf mRNA-Ebene bei 29% und auf Proteinebene bei 31% Expression (Abb. 25a, c). Dabei zeigte sich, dass β -Catenin-Knockdown-Zellen eine höhere Transkription (+58%) und Translation (+50%) von PPAR γ aufwiesen als Kontrollzellen (Abb. 25b, c). Diese signifikanten Resultate bestätigen, dass PPAR γ ein negatives Zielgen der β -Catenin-abhängigen Signaltransduktion in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten hMSCs darstellt.

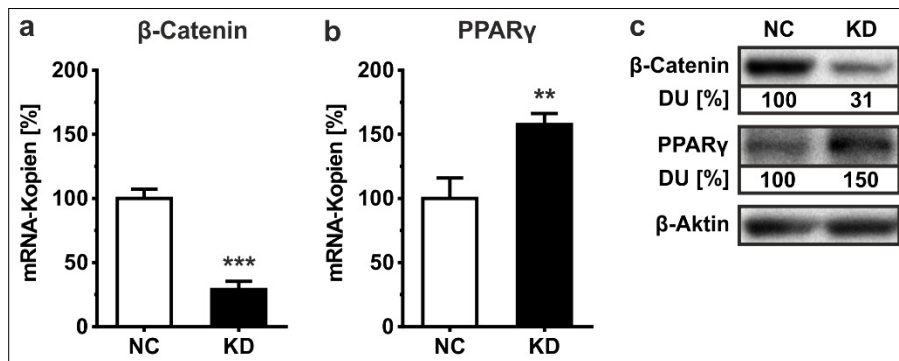


Abb. 25 Auswirkung von β -Catenin auf die Transkription von PPAR γ . Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen β -Catenin-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst für 4 Tage kultiviert. Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von β -Catenin (a) und PPAR γ (b) erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf GAPDH-mRNA normalisiert. (c) Der Proteinnachweis von β -Catenin und PPAR γ erfolgte in Zelllysaten per Westernblot, wobei β -Aktin als Ladungskontrolle fungierte. Die Resultate der Densitometrie sind in densitometric units (DU) angegeben, alle Werte von NC-Zellen betragen dabei 100%. Alle vorliegenden Daten zeigen entweder (c) Einzelwerte oder (a, b) den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

F.4.3.2 Auswirkung von RECK auf Expression und Aktivität von β -Catenin

Wie im vorausgehenden Kapitel gezeigt, hemmt die Aktivität von β -Catenin die adipogene Differenzierung von hMSCs. Da sich die RECK-Expression auf ähnliche Weise auf die Adipogenese dieser Zellen auswirkt (siehe Kapitel F.4.1), wäre es denkbar, dass endogenes RECK die Aktivität des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs reguliert. Bei der Überprüfung dieser Hypothese zeigte sich, dass RECK-defiziente Zellen eine bis zu 37% geringere Proteinmenge von β -Catenin aufwiesen als Zellen mit basaler RECK-Expression (Abb. 26a). Ferner wurden hMSCs mit einem speziellen Reportersystem transfiziert, das nach Stimulierung der Zellen mit Wnt3a über die Aktivierung β -Catenin-abhängiger TCF/LEF-Bindestellen im Plasmid zur Freisetzung quantifizierbarer *Gaussia*-Luziferase führt. So gelang der Nachweis, dass die β -Catenin-abhängige Promotoraktivität in RECK-defizienten hMSCs um signifikante 36% geringer war als in hMSCs mit basaler RECK-Expression (Abb. 26b). Diese Beobachtung wurde durch ebenfalls signifikant reduzierte Transkriptionsraten der positiven Wnt/ β -Catenin-Zielgene *DKK1*, *AXIN2* und *RUNX2* bestätigt. Gegenüber Zellen mit basaler RECK-Expression

nahm in RECK-defizienten Zellen die mRNA-Menge von DKK1 um 32%, von AXIN2 um 22% und von RUNX2 um 28% ab (Abb. 26c). Die Ergebnisse legen nahe, dass RECK als positiver Regulator des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungiert.

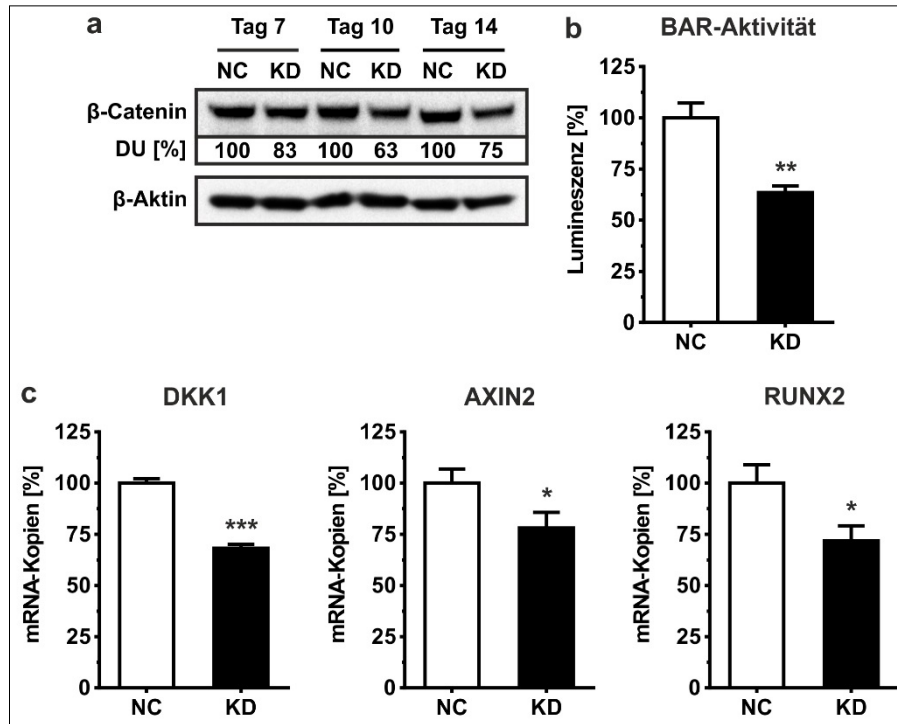


Abb. 26 Auswirkung von RECK auf Expression und Aktivität von β -Catenin. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) zunächst in (a) Ab- oder (b, c) Anwesenheit von murinem, rekombinanten Wnt3a kultiviert. (a) Der Proteinnachweis von β -Catenin erfolgte in Zelllysaten per Westernblot, wobei β -Aktin als Ladungskontrolle fungierte. Die Resultate der Densitometrie sind in densitometric units (DU) angegeben, alle Werte von NC-Zellen betragen dabei 100%. (b) Nach der zusätzlichen Transfektion mit dem BAR-Plasmid wurde am Tag 14 die *Gaussia* Luziferase-induzierte Lumineszenz in den Kulturüberständen quantifiziert. (c) Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von DKK1, AXIN2 und RUNX2 erfolgte nach 10 Tagen mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf GAPDH-mRNA normalisiert. Alle vorliegenden Daten zeigen entweder (a) Einzelwerte oder (b, c) den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

F.4.3.3 Mechanismen der RECK-abhängigen Stabilisierung von β -Catenin

F.4.3.3.1 Transkription von β -Catenin

Da in hMSCs die Proteinmenge von β -Catenin mit dem Expressionslevel von RECK korreliert (siehe Kapitel F.4.3.2), sollte nun analysiert werden, ob endogenes RECK einen direkten Einfluss auf die Transkription von β -Catenin hat. Ein Vergleich der mRNA-Level von β -Catenin ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen Zellen mit und ohne RECK-Knockdown, wobei der größte Unterschied aller ermittelten Wertepaare bei maximal 11% liegt. (Abb. 27). Somit kann eine Transkriptionssteuerung von β -Catenin durch RECK als Mechanismus der RECK-abhängigen Stabilisierung von β -Catenin ausgeschlossen werden.

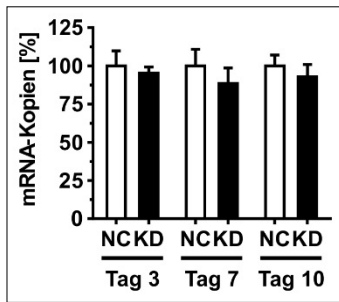


Abb. 27 Transkription von β -Catenin in hMSCs. Die Zellen wurden zunächst mit unspezifischer Kontroll-siRNA (NC) oder gegen RECK-mRNA gerichteter siRNA (KD) transfiziert. Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression von β -Catenin erfolgte mittels qRT-PCR. Alle Werte wurden auf GAPDH-mRNA normalisiert. Alle vorliegenden Daten zeigen den Mittelwert \pm SD dreier unabhängiger Messungen.

F.4.3.3.2 Interaktion mit DKK1

Für eine Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und die dafür notwendige Stabilisierung von zytoplasmatischem β -Catenin ist zuerst eine Interaktion von Wnt-Liganden mit Heterodimeren aus FZDs und LRPs erforderlich. Letztere werden durch die Bindung von inhibitorischen Proteinen wie DKK1 an der Bildung dieser trimolekularen Komplexe gehindert. Da eigene Vergleichsanalysen erbrachten, dass RECK eine Sequenzhomologie mit den Bindestellen dieser LRPs aufweist, wäre eine Interaktion zwischen RECK und DKK1 theoretisch möglich. Durch eine so verursachte kompetitive Hemmung des Inhibitors wären mehr LRPs für die Initialisierung der Signalkaskade verfügbar, was zu einer größeren Menge von β -Catenin im Zellinneren führen und damit die in Kapitel F.4.3.2 beschriebenen RECK-Effekte erklären würde. Um eine solche Interaktion zu bestätigen, wurde mit Hilfe einer Co-IP und rekombinant hergestelltem DKK1 sowie RECK untersucht, ob die beiden Proteine eine Bindung miteinander eingehen. Dabei wurden auch notwendige Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt, welche die gewünschte Funktionalität des Experimentes bestätigten. Allerdings konnte trotz mehrfacher Wiederholung der Ansätze unter variierenden Proteinkonzentrationen sowie unterschiedlicher Inkubationszeit und -temperatur kein Nachweis erbracht werden, dass zwischen RECK und DKK1 eine stabile Interaktion oder Komplexbildung stattfindet (Abb. 28).

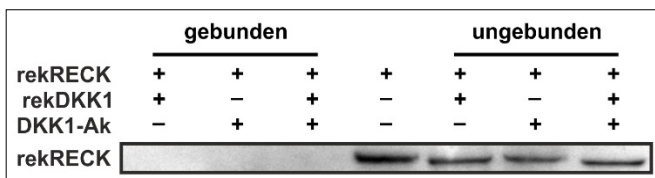


Abb. 28 Analyse der Interaktion zwischen RECK und DKK1 durch eine Co-IP. An Dynabeads[®] gekoppelte Anti-DKK1-Antikörper (DKK1-Ak) sowie je 200 ng rekombinantes DKK-1

und RECK (rekDKK1, rekRECK) wurden in unterschiedlichen Kombinationen für 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Die An- (+) und Abwesenheit (-) einzelner Komponenten ist oberhalb der Aufnahme vermerkt, alle unvollständigen Ansätze bildeten Negativkontrollen. Abschließend erfolgte ein Nachweis von RECK in den Eluaten der möglicherweise an Dynabeads[®] gebundenen Proteine und als weitere Kontrolle in den Überständen ungebundener Proteine per Westernblot. Dabei fungierten 50 ng rekRECK als Positivkontrolle.

G Diskussion

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit basierten fast alle in der Fachliteratur erhältlichen Daten zu RECK auf Studien an Tumorzellen oder Patienten mit neoplastischen Erkrankungen. Ziel der eigenen Untersuchungen war es daher, die Bedeutung von RECK in physiologisch normalen Zellen zu analysieren, um die so gewonnenen Erkenntnisse mit den bekannten pathophysiologischen Eigenschaften von RECK vergleichen zu können. Für die Studien wurden exemplarisch hMSCs ausgewählt, da diese Zellen nicht nur über Wachstumspotential verfügen und beweglich sind, sondern auch die Fähigkeit zur Differenzierung besitzen.

G.1 Abhängigkeit der RECK-Expression vom Zelltyp

In den aus dem Knochenmark stammenden hMSCs konnte die bereits von Bret *et al.* beschriebene [205], konstitutive Expression von RECK sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Auch in hMSCs, die aus Fettgewebe isoliert wurden, war zumindest eine Detektion der RECK-mRNA möglich [206]. Bereits im Rahmen der Erstbeschreibung von RECK wurde dokumentiert, dass dieses Glykoprotein in verschiedenen physiologisch normalen Zellen und Geweben vorhanden ist. In einer Vielzahl von Tumorzellen hingegen ist die RECK-Expression bereits auf Transkriptionsebene deutlich reduziert oder gar vollständig blockiert [86]. Auch bei nicht-neoplastischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale [207], Chorioamnionitis [208], Periodontitis [209], Psoriasis vulgaris [210], rheumatoider Arthritis [211], Sarkoidose der Lunge [212] und systemischem Lupus erythematoses [213] konnte RECK in den betroffenen Zellen nur auf vergleichsweise schwachem Niveau nachgewiesen werden. Obwohl in einigen Fällen, wie etwa bei Arthrose [214], Kokainmissbrauch [215] und Vorhofflimmern [216], auch über erhöhte Level an RECK in Patientenproben berichtet wurde, scheint dessen ausgeprägte Expression insgesamt eher ein Merkmal physiologisch gesunder Zellen zu sein.

G.2 Auswirkungen von RECK auf das Zellwachstum

G.2.1 Zellproliferation

Bei der mit Hilfe des CyQUANT[®] Zellproliferationsassays durchgeführten Analyse der Zellteilungsrate ergab sich keinerlei Einfluss von RECK auf die Proliferation von hMSCs. Dieses Resultat entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die an Tumorzellen aus Gallengang [110], Gehirn [217], Gebärmutterhals, Lunge und Skelettmuskel [86] gewonnen wurden. In Tumoren der Knochen [218] und des Magens [148] sowie in physiologisch gesundem Nierenepithel [105] hemmte RECK die Proliferation der Zellen. Dies scheint ebenfalls für

Tumorzellen aus Bindegewebe, Brust und Darm zu gelten [219,104], wobei es für diese Zelltypen auch Hinweise auf RECK-unabhängige Zellteilungsraten gibt [86,106]. Im Endothel der Nabelvene [220] und Knorpeln aus arthrotischen Gelenken [214] wirkt sich die RECK-Expression hingegen förderlich auf die Proliferation aus. Offenbar beeinflusst das Vorhandensein von RECK die Zellteilungsrate in unterschiedlicher Weise und abhängig vom jeweiligen Zelltyp.

G.2.2 Zellvitalität

Im WST-8 Zellvitalitätsassay stellte sich auch die metabolische Aktivität der hMSCs als RECK-unabhängig heraus. Vergleichbare Beobachtungen wurden bei Tumorzellen aus Bauchspeicheldrüse [221], Lunge [222] und Zahnschmelz [223] gemacht. Die Zellvitalität in Tumoren der Brust [103], des Darms [145], der Harnblase [144], der Lungenbläschen [224], des Magens [148], der Nebennieren [101] und der Speiseröhre [225] steht allerdings unter negativem Einfluss von RECK. Dies gilt ebenfalls für physiologisch gesunde Zellen aus der glatten Blutgefäßmuskulatur [226] und dem Nierenepithel [105]. Widersprüchliche Erkenntnisse liegen zu Knochen- und Prostatakrebszellen vor, deren metabolische Aktivität entweder von RECK gehemmt wurde [227,228] oder unverändert blieb [229,230]. Insgesamt betrachtet erfüllt RECK in Bezug auf die Zellvitalität eine neutrale bis überwiegend inhibitorische Funktion.

G.3 Steuerung der Zellbeweglichkeit durch RECK

G.3.1 Invasion

Die Studien in Transwellassays zeigten, dass die Expression von RECK in hMSCs keinen Einfluss auf deren Fähigkeit hatte, in gerichteter Weise Barrieren aus humaner EZM durch extrazelluläre Proteolyse zu durchwandern. Im Gegensatz dazu weisen sowohl Tumorzelllinien aus 13 unterschiedlichen Organen [86,91,231,110,144,232,100,229,233,138,234,230,223] als auch physiologisch gesunde Brustepithel- [235], Endothel- [218] und CD34-positive Knochenmarkzellen [129] in Abwesenheit von RECK eine verstärkte Invasivität auf. Dafür mitverantwortlich ist der Umstand, dass RECK in diesen Zellen als MMP-Inhibitor fungiert und sein Fehlen die extrazelluläre Aktivität von MMP-9 [86], MMP-2 und MT1-MMP [94] erhöht, was zu einer effizienteren Proteolyse der EZM führt. hMSCs verfügen zwar ebenfalls über MMP-2 und MT1-MMP, die zu deren invasiven Eigenschaften beitragen [65,81], bilden aber keine MMP-9 [236], was sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bestätigt wurde. Da in diesen Zellen nach eigenen Erkenntnissen auch keine RECK-abhängige Regulation der Biosynthese von MMP-2 und MT1-MMP erfolgt, ist davon auszugehen, dass RECK in hMSCs keinen hemmenden Einfluss auf die Aktivität oder Expression der genannten MMPs ausüben kann und

somit auch keinen Effekt auf die Invasion der Zellen hat. Eigene Untersuchungen zu TIMPs, den von hMSCs exprimierten natürlichen MMP-Inhibitoren [81,84], zeigten, dass die Abwesenheit von RECK die Biosynthese von TIMP-2 und TIMP-3 in diesen Zellen fördert, während die Bildung von TIMP-1 unverändert bleibt. TIMP-2 kann MMP-Aktivität begünstigen oder auch hemmen. Ersteres erfolgt durch Aktivierung von proMMP-2 auf der Zelloberfläche. Unter äquimolaren Verhältnissen fungiert TIMP-2 nämlich als Brückenprotein zwischen proMMP-2 und MT1-MMP, so dass nach Ausbildung dieses trimolekularen Komplexes ein weiteres MT1-MMP-Molekül hinzutreten kann, das proMMP-2 durch Abspalten des Propeptides aktiviert und von der Zelloberfläche freisetzt [237]. Andererseits fungiert TIMP-2 als MMP-Inhibitor, wenn es gegenüber MT1-MMP und proMMP-2 im Überschuss vorhanden ist und infolgedessen die Aktivität der zuvor gebildeten MMP-2 durch direkte Interaktion mit dessen katalytischem Zentrum blockiert [238]. In den RECK-defizienten hMSCs würde die moderat erhöhte Biosynthese von TIMP-2 vermutlich zu einer verstärkten Aktivierung von proMMP-2 führen, welche wiederum die Invasivität der Zellen erhöhen könnte. Gleichzeitig jedoch bilden die RECK-Knockdown-Zellen auch vermehrt TIMP-3, dessen Bindung an MT1-MMP [85] dem trimolekularen Komplex einen Bindungspartner entziehen und auf diese Weise der Aktivierung von proMMP-2 entgegenwirken könnte. Somit käme es im vorliegenden Fall zu einer Neutralisierung der am proMMP-2-Aktivierungsprozess beteiligten Proteasen und Inhibitoren. Damit bliebe die Proteolyse der EZM und somit die Invasivität der Zellen in der Summe unverändert, was die eigenen Beobachtungen zur Rolle von RECK bei der Invasion von hMSCs mit erklären könnte.

Da TIMP-2 als positiver Regulator der RECK-Expression identifiziert wurde [232], könnte dessen erhöhte Biosynthese einen kompensatorischen Mechanismus der Zellen darstellen, der einem vollständigen RNAi-vermittelten Abschalten der RECK-Biosynthese entgegenwirkt.

G.3.2 Migration

Proteolyse ist nicht nur im Rahmen der dreidimensionalen Invasion für die zelluläre Fortbewegung durch die EZM von entscheidender Bedeutung, sondern auch für die Zellmigration auf Matrixoberflächen. Dabei nutzen die Zellen bereits vorhandene oder auch eigens sezernierte Biopolymere, um sich auf diesen anzuheften. Für eine gerichtete Fortbewegung erfolgt dann eine lokal begrenzte Abschwächung dieser Interaktion mit der EZM, etwa durch einen partiellen MMP-vermittelten Abbau bestimmter Matrixkomponenten. So erlaubt die sequentielle Abfolge von subzellulärer Proteolyse und erneuter Adhäsion die Migration der Zelle. RECK erfüllt dabei wie bei der Invasion durch Inhibierung bestimmter MMPs eine modulatorische

Funktion, indem es beispielsweise die Integrität von Fibronectin schützt [239] oder die Aktivität von β 1-Integrin fördert [220]. In ähnlicher Weise verstärkt RECK vermutlich bei verschiedenen Zelllinien deren Adhäsion an Hyaluron [129] und Kollagen I [218] sowie an basalmembranartige Matrices wie Matrigel[®] [143]. In einigen anderen Zelltypen, deren RECK-Expression sowohl die Bildung von MMPs als auch die Migrationsfähigkeit hemmt, ist der kombinierte Einfluss von Proteolyse und Adhäsion auf die Zellbeweglichkeit ebenfalls sehr wahrscheinlich. Dies gilt für maligne Tumorzellen aus Bauchspeicheldrüse [221], Brust [91], Lunge [224], Nebenniere [136], Prostata [228] und Zahnschmelz [223] ebenso wie für Knorpelzellen aus arthrotischen Gelenken [214] und physiologisch gesunde Endothelzellen [232].

In eigenen Untersuchungen konnte unter Verwendung des Wundheilungsassays nachgewiesen werden, dass hMSCs in Abwesenheit von RECK die Wundfurchen durch verstärkte Migration schneller schlossen. Allerdings scheint der zugrunde liegende, RECK-abhängige Mechanismus hier weitgehend unabhängig von MMP-2, MMP-9 und MT1-MMP zu sein, da das Fehlen von RECK in diesen Zellen weder eine erhöhte Expression dieser Proteasen noch eine verstärkte Invasionsfähigkeit nach sich zog. Möglicherweise sind andere, bislang unbekannt durch RECK regulierte Proteasen an diesem Effekt beteiligt. Wie in Glioblastomzellen könnte RECK die Migration von hMSCs jedoch auch abschwächen, indem es Einfluss auf Komponenten des Zytoskeletts nimmt. Dabei verstärkt RECK die Polymerisierung von actin stress fibers, während die Formation von Lamellipodien unterbunden und die Verteilung von aktiviertem FAK innerhalb der Zellen verändert wird [217]. Gegen diese Hypothese spricht allerdings die eigene Beobachtung, dass hMSCs in Abwesenheit von RECK schneller an Plastikoberflächen adhären. Jedenfalls scheinen die bisher bekannten, durch RECK modulierten Mechanismen der Proteolyse und Adhäsion bei der verstärkten Migration von hMSCs auf Matrixoberflächen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Mit Hilfe des μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assays war es möglich, bei hMSCs die Chemotaxis als dritte wichtige Komponente der Zellbeweglichkeit zu analysieren. Hierbei konnte bestätigt werden, dass sich die Zellen durch das Fehlen von RECK schneller fortbewegen und damit ein gesteigertes migratorisches Potential besitzen. Darüber hinaus zeigten die Studien im μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Assay, dass die Abwesenheit von RECK ein gesteigertes chemotaktisches Potential induziert, was sich in einer stärker zielgerichteten Migration der Zellen innerhalb eines HuS-Gradienten äußerte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass RECK in hMSCs über bislang unbekannt Mechanismen als negativer Modulator der Migration fungiert.

Um die Hintergründe dieser Regulation aufzuklären, wurde der Zusammenhang zwischen der Biosynthese von RECK und der Transkription von vier Genen untersucht, die in anderen

Zelltypen eine große Bedeutung für die Migration aufweisen: *IGF1* [240], *MENA* [241], *N-WASP* [242] und *VEGFA* [243]. Außerdem wurde überprüft, ob endogenes RECK die Expression der fünf miRNAs let-7f [244], miR-124 [245], miR-126-3p [246], miR-126-5p [247] und miR-335 [248] beeinflusst, die bekanntermaßen mRNAs von Genen regulieren, die eine wichtige Funktion bei der Migration besitzen. Keine der beiden Analysen erbrachte jedoch verwertbare Hinweise auf eine direkte oder indirekte RECK-vermittelte Transkriptionsregulation durch die genannten mRNAs oder miRNAs. Die hemmende Wirkung von RECK auf die Chemotaxis dieser Zellen könnte jedoch auch das Resultat seiner Interaktion mit chemotaktischen Liganden oder deren Rezeptoren an der Zelloberfläche sein. IL-8, ein Vertreter der CXCL-Chemokine, wird beispielsweise sowohl von den Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 [249] als auch von RECK gebunden [106], was RECK zu einem kompetitiven Inhibitor der Aktivitäten beider Rezeptoren macht. Durch einen bisher ungeklärten, aber möglicherweise ähnlichen Mechanismus ist RECK außerdem in der Lage, die Aktivierung des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR zu blockieren und dadurch die Signaltransduktion in die Zelle zu unterbinden [102]. Da sowohl eine Expression von CXCR1 und CXCR2 [62] als auch von EGFR [65] in hMSCs aus dem Knochenmark bereits nachgewiesen wurde, wären diese Mechanismen eine plausible Erklärung für den hemmenden Effekt von RECK auf das chemotaktische Verhalten dieser Zellen. In diesem Zusammenhang könnte die schnellere Adhäsion RECK-defizienter Zellen auch auf einen kompensatorischen Mechanismus hinweisen, wobei die zuvor von RECK inhibierten Signaltransduktionskaskaden zur verstärkten Bildung adhäsionsfördernder Strukturen des Zytoskeletts wie actin stress fibers oder Komponenten der EZM wie Fibronectin beitragen würden. Letztendlich beeinträchtigt RECK jedoch die Migrationsfähigkeit von hMSCs, da die hemmende Wirkung dieses Glykoproteins auf die Adhäsion dessen negativen Einfluss auf die Chemotaxis offenbar nicht vollständig kompensieren kann. In Tumorzellen aus Harnblase [144], Knochen [227], Leber [250] und Magen [138], in denen sich die Abwesenheit von RECK ebenfalls förderlich auf die Migration auswirkt, wurde keine Analyse proteolytischer Faktoren durchgeführt. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Chemotaxis eine ebenso wichtige Rolle für die zelluläre Fortbewegung spielt wie in hMSCs.

G.4 RECK als molekularer Schalter der Differenzierung

G.4.1 Auswirkungen von RECK auf Osteogenese und Adipogenese

RECK ist ein positiver Modulator der osteogenen Differenzierung in hMSCs, was sich anhand der Zellfärbung mit Alizarin Red S und einer Quantifizierung des osteogenen Differenzierungsmarkers ALP nachweisen ließ. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu den Ergebnissen einer

Studie an MSCs, die aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen wurden. In Abwesenheit von RECK konnten dabei erhöhte Proteinmengen der osteogenen Differenzierungsmarker Osteokalzin und Osterix gemessen werden. Allerdings wurden die Maus-MSCs zuvor mit TNF- α behandelt und nicht wie die hMSCs durch einen Differenzierungsstimulus osteogen ausdifferenziert [251], was zusammen mit den speziesbedingten Unterschieden die gegensätzlichen Effekte von RECK in murinen und humanen MSCs erklären könnte. Außerdem wurde in der Studie an Maus-MSCs keine mikroskopische Analyse der Zellmorphologie oder ein Nachweis von Kalziumeinlagerungen in der EZM durchgeführt, so dass in diesen Experimenten nicht mit Sicherheit von einer stattfindenden Osteogenese ausgegangen werden kann. Eine weitere Studie zeigte, dass sich der positive Effekt der RECK-Expression nicht nur auf die Reifung von Osteozyten, sondern auch auf deren funktionalen Verbund im Knochengewebe erstreckt. Hier wurde beobachtet, dass RECK die Aktivität humaner Osteoklasten *in vitro* hemmt und protektive Auswirkungen auf das Knochenvolumen von Mäusen *in vivo* hat [218].

Im Gegensatz zur Osteogenese ist RECK ein Inhibitor der Adipogenese in hMSCs, was sowohl durch die Zellfärbung mit Oil Red O als auch durch eine Expressionsanalyse des adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ gezeigt wurde. Da es bislang keine Daten über den Einfluss von RECK auf die Adipogenese gab, liefern die im Rahmen dieser Arbeit hierzu erzielten Resultate erstmals Erkenntnisse zu einer weiteren wichtigen Funktion dieses Glykoproteins [252].

G.4.2 Auswirkungen von Osteogenese und Adipogenese auf RECK

Im Verlauf der Osteogenese wird die Biosynthese von RECK in hMSCs hochreguliert. Dies stimmt mit Beobachtungen an Preosteoblasten aus dem Knochengewebe von Mäusen überein, deren osteogene Reifung binnen 14 Tagen ebenfalls eine erhöhte Translation von RECK nach sich zieht [253]. Umgekehrt führt die mechanische Entlastung des Mausfemurs und eine daraus folgende Dedifferenzierung seiner Osteoblasten innerhalb dieses Zeitraums zu einer Abnahme von RECK im Gewebe [254]. Auch in humanen Knochenhautzellen wirkt sich die osteogene Differenzierung auf die RECK-mRNA förderlich aus, was in der Folge über 3 Wochen zu gesteigerten Proteinmengen von RECK in den Zellen führt [255]. Somit belegen eigene Resultate wie auch die anderer Arbeitsgruppen eine positive Korrelation zwischen zellulärer RECK-Expression und osteogener Reifung.

In umgekehrter Analogie dazu war in den eigenen Studien eine Hemmung der RECK-Expression bei adipogener Differenzierung von hMSCs zu beobachten. Dieses Resultat liefert erstmals Hinweise auf eine Beteiligung von RECK bei der Regulation der Reifung von hMSCs zu

Adipozyten [252] und lässt den Schluss zu, dass Osteogenese und Adipogenese gegensätzliche Auswirkungen auf die RECK-Expression in diesen Zellen haben.

Somit spielt möglicherweise RECK selbst eine Schlüsselrolle bei der reziproken, differentiellen Regulation beider Reifungsprozesse in hMSCs, etwa im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife bei der Osteogenese und einer negativen Rückkopplungsschleife bei der Adipogenese. Es wäre denkbar, dass RECK als eine Art molekularer Schalter für die beiden Differenzierungswege fungiert.

G.5 Positive Effekte von RECK auf den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist im Hinblick auf die Adipogenese und Osteogenese von besonderer Bedeutung. Da Adipozyten und Osteozyten aus jeweils ein und derselben mesenchymalen Vorläuferzelle entstehen, kann diese im Rahmen der asymmetrischen Zellteilung lediglich in einen der beiden Zelltypen ausdifferenzieren. Dieser Vorgang wird über den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg kontrolliert, der bekanntermaßen gegensätzliche Auswirkungen auf die adipogene und osteogene Differenzierung von Zellen ausübt: Während eine Aktivierung dieses Signalwegs die Adipogenese hemmt, erkennbar an einer verringerten PPAR γ -Expression in den Zellen [256], wird die Osteogenese begünstigt, welche von einer erhöhten ALP-Expression begleitet ist [257]. Dieser Mechanismus konnte in den eigenen Studien insofern bestätigt werden, als das Abschalten der zellulären β -Catenin-Expression mittels RNAi die Transkription von PPAR γ und somit die Adipogenese in hMSCs förderte. Interessanterweise belegen die Resultate weiterer Experimente in diesem Zusammenhang, dass es bei Abwesenheit von RECK zur Abnahme von β -Catenin und der β -Catenin-abhängigen Promotoraktivität kommt, was in der Folge zu reduzierten Transkriptionsraten der positiven Wnt/ β -Catenin-Zielgene *DKK1* [258], *AXIN2* [259] und *RUNX2* [260] führt. Eine Studie an Zebrafischen scheint diesen Mechanismus *in vivo* zu bestätigen. Hier zeigte sich, dass eine Cysteinoknotenmutation im RECK-Protein eine geringere TCF-abhängige Promotoraktivität nach sich zieht. Dies führt zu einer vergleichsweise schwächeren Expression des positiven Wnt/ β -Catenin-Zielgens *glut1* und einer stärkeren Expression des negativen Wnt/ β -Catenin-Zielgens *plvap* [261].

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass RECK ein Induktor des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist, wobei letzterer in hMSCs nachweislich die Adipogenese und Osteogenese steuert [262].

Zur Klärung der Frage, über welchen molekularen Mechanismus RECK die Aktivität des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs unterstützt, wurden im Rahmen der vorliegenden

Arbeit verschiedene Hypothesen überprüft. Die in RECK-Knockdown-Zellen unveränderte, basale β -Catenin-Transkription spricht für einen posttranskriptionalen Effekt von RECK auf β -Catenin. Möglicherweise fördert RECK die Stabilität von β -Catenin im Zytoplasma und/oder dessen nachfolgende Translokation in den Zellkern, was zu einer erhöhten Transkriptionsrate β -Catenin-abhängiger Gene führt. Bei eigenen Sequenzanalysen wurden Homologien zwischen LRP5/6 und RECK entdeckt. Diese führten zu der Vermutung, dass die inhibitorische Wirkung von DKK1 auf den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg über dessen Interaktion mit LRP5/6 durch eine kompetitive Bindung mit RECK abgeschwächt werden könnte. Allerdings ließ sich die Annahme einer Interaktion von RECK mit DKK1 durch Co-IP-Experimente nicht bestätigen. Die Rolle von RECK als positiver Modulator des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ließe sich auch durch eine mögliche Wnt-Rezeptorfunktion dieses Glykoproteins erklären. Dafür spricht die Tatsache, dass in der Aminosäuresequenz von RECK so genannte FZD-CRDs identifiziert wurden, welche die Bindung von Wnt-Liganden an FZD-Rezeptoren ermöglichen [263]. Gpr124, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, wurde als möglicher Korezeptor für RECK in Zebrafischen beschrieben. Dabei ist eine autonome Rezeptorfunktion des Heterodimers, bei der RECK Wnt7a sowie Wnt7b bindet und Gpr124 mit DVL interagiert, ebenso denkbar wie die Ausbildung eines Multiproteinkomplexes aus RECK, Gpr124, FZD und LRP5/6 [264]. Ob Gpr124 somit auch in hMSCs das gesuchte Bindeglied zwischen RECK an der Zelloberfläche und β -Catenin im Zellinneren sein könnte, müssen nachfolgende Untersuchungen klären.

G.6 Zusammenfassung zur Rolle von RECK in hMSCs

Die Resultate dieser Arbeit belegen erstmals, dass RECK in hMSCs als negativer Modulator der Migration, als molekularer Schalter zwischen der adipogenen und osteogenen Differenzierung sowie als positiver Modulator des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fungiert (Abb. 29).

G.7 Therapeutische Relevanz von RECK

Seit der Entdeckung von RECK wurde dessen biologische Funktion fast ausschließlich in Tumorzelllinien untersucht. Daher überrascht es nicht, dass die therapeutische Bedeutung von RECK bislang primär auf dem Fachgebiet der Onkologie diskutiert wird. Dort etablierte sich RECK als eine Art ubiquitärer Marker für die Malignität neoplastischer Gewebeumbildungen [108-111,92,112-118]. Allerdings ist RECK durch seine vielfältigen Funktionen auch in einer Reihe anderer Erkrankungen des menschlichen Körpers involviert [207-216] und lässt

dieses Glykoprotein so auch für mögliche nicht-onkologische Therapien durchaus attraktiv erscheinen.

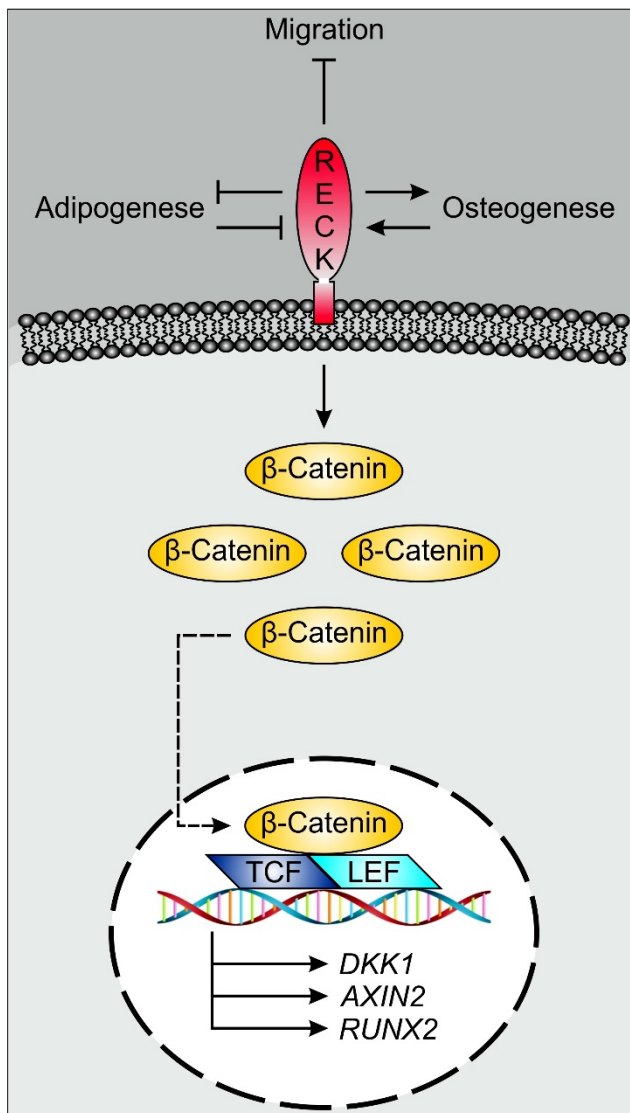


Abb. 29 Rolle von RECK in hMSCs. Fördernde (↑) und hemmende (T) Einflüsse auf die Regulation zellulärer Prozesse sowie auf die Expression von Proteinen und die Transkription von Zielgenen sind ebenso wie die nukleäre Translokation (---) durch Pfeilverbindungen gekennzeichnet. (Bildmaterial der DNA-Doppelhelix von www.veriware.org mit Modifikationen)

Insbesondere in Bezug auf Osteoporose könnte RECK ein lohnendes Ziel therapeutischer Anwendungen darstellen. Möglicherweise wäre RECK diesbezüglich in der Lage, die Regeneration von beschädigten Knochenstrukturen durch Unterstützung der Osteogenese zu beschleunigen [252] oder dem von Osteoklasten induzierten, MMP-vermittelten Abbau von Gewebe entgegenzuwirken [218]. Falls sich außerdem die Rolle von RECK als autonomer Wnt-Rezeptor tatsächlich bestätigen sollte, könnte diese Funktion in Patienten mit *LRP5*-Mutationen dazu beitragen, die Aktivität des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalwegs aufrecht zu erhalten und damit ebenfalls Knochenschwund vorzubeugen [265].

Um im Rahmen klinischer Anwendungen die RECK-Expression in osteoporotischen Knochenbereichen zu verstärken, sind theoretisch mehrere Ansätze denkbar. Beispielsweise könnte die Biosynthese des Glykoproteins indirekt mit Hilfe des HDAC1-Inhibitors Trichostatin A [266],

des DNMT3b-Inhibitors 5'-Azazytidin [131] oder des mTOR-Inhibitors Rapamyzin [129] unterstützt werden. Allerdings beeinflussen diese Wirkstoffe nicht ausschließlich RECK, was unerwünschte Auswirkungen auf die Osteogenese und somit den Therapieerfolg haben könnte. Alternativ hätte eine plasmidvermittelte Überexpression von RECK [218] den Vorteil der selektiven Beeinflussung RECK-abhängiger Signalwege. Die Schwierigkeit dieser Herangehensweise liegt darin, eine im lebenden Organismus ausreichend hohe Menge des Plasmids ausschließlich in diejenigen Zellen einzuschleusen, deren osteogenes Differenzierungspotential von einer verstärkten RECK-Expression profitieren würde. Diese Problematik könnte mit einem hMSC-basierten zelltherapeutischen Ansatz umgangen werden. Denkbar wäre etwa die Verwendung von hMSCs, die nach *in vitro*-Manipulation RECK überexprimieren und daher nach lokaler Applikation ins betroffene Gewebe durch Differenzierung in Osteoblasten der Osteoporose entgegenwirken. Allerdings sind noch weitreichende experimentelle und klinische Studien erforderlich, um die Wirksamkeit und Sicherheit derartiger Zelltherapiekonzepte zuverlässig einschätzen zu können.

H Literaturverzeichnis

1. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5):641-650. doi:10.1002/jor.1100090504
2. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A, International Society for Cellular T (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7 (5):393-395. doi:10.1080/14653240500319234
3. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6 (2):230-247
4. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* 4 (5):267-274
5. Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF (1982) Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Experimental hematology* 10 (2):217-227
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411):143-147
7. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
8. Niehage C, Steenblock C, Pursche T, Bornhauser M, Corbeil D, Hoflack B (2011) The cell surface proteome of human mesenchymal stromal cells. *PloS one* 6 (5):e20399. doi:10.1371/journal.pone.0020399
9. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis and rheumatism* 46 (12):3349-3360. doi:10.1002/art.10696
10. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhring HJ (2003) Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88 (2):126-133
11. Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W (2007) Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106:262-271. doi:10.1196/annals.1392.000

12. Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Buhring HJ (2007) Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 75 (4):279-291. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00139.x
13. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109 (4):1743-1751. doi:10.1182/blood-2005-11-010504
14. Qian H, Le Blanc K, Sigvardsson M (2012) Primary mesenchymal stem and progenitor cells from bone marrow lack expression of CD44 protein. *J Biol Chem* 287 (31):25795-25807. doi:10.1074/jbc.M112.339622
15. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schutz B, Ehinger M, Ditzel N, Kassem M, Scheduling S (2011) CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* 117 (19):5067-5077. doi:10.1182/blood-2010-08-304287
16. Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, Lajtha LG (1977) Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine / [publiee pour l'AAICIG]* 27 (9-10):344-349
17. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 (5417):1168-1170
18. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279 (5356):1528-1530
19. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (19):10711-10716
20. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 (6893):41-49. doi:10.1038/nature00870
21. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews Immunology* 8 (9):726-736. doi:10.1038/nri2395
22. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 (6880):542-545. doi:10.1038/nature730
23. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 119 (Pt 11):2204-2213. doi:10.1242/jcs.02932

24. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13 (12):4279-4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105
25. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC, Jr. (2001) Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical record* 264 (1):51-62
26. Jaeger K, Islam S, Zajac P, Linnarsson S, Neuman T (2012) RNA-seq analysis reveals different dynamics of differentiation of human dermis- and adipose-derived stromal stem cells. *PloS one* 7 (6):e38833. doi:10.1371/journal.pone.0038833
27. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR (2007) In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng* 13 (3):619-627. doi:10.1089/ten.2006.0102
28. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2 (2):141-150. doi:10.1016/j.stem.2007.11.014
29. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L (2008) Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111 (3):1327-1333. doi:10.1182/blood-2007-02-074997
30. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L (2009) MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113 (26):6576-6583. doi:10.1182/blood-2009-02-203943
31. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* 15 (1):42-49. doi:10.1038/nm.1905
32. Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T, Standiford TJ, Toews GB, Pinsky DJ, Peters-Golden M, Lama VN (2008) Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)* 181 (6):4389-4396
33. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, Mullen Y (2009) Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental hematology* 37 (5):604-615. doi:10.1016/j.exphem.2009.01.005
34. Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S (2012) Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 10 (5):544-555. doi:10.1016/j.stem.2012.03.007

35. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R (2007) Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Archives of Iranian medicine* 10 (4):459-466. doi:07104/AIM.008
36. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M (2007) Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 15 (2):226-231. doi:10.1016/j.joca.2006.08.008
37. Tadokoro M, Kanai R, Taketani T, Uchio Y, Yamaguchi S, Ohgushi H (2009) New bone formation by allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in a patient with perinatal hypophosphatasia. *The Journal of pediatrics* 154 (6):924-930. doi:10.1016/j.jpeds.2008.12.021
38. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY (2010) A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* 28 (6):1099-1106. doi:10.1002/stem.430
39. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Ghersin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R, Lardo A (2012) Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *Jama* 308 (22):2369-2379. doi:10.1001/jama.2012.25321
40. Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, Hou Y, Zeng X, Gilkeson GS, Sun L (2010) Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Annals of the rheumatic diseases* 69 (8):1423-1429. doi:10.1136/ard.2009.123463
41. Wang D, Zhang H, Cao M, Tang Y, Liang J, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Sun L (2011) Efficacy of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in patients with drug-resistant polymyositis and dermatomyositis. *Annals of the rheumatic diseases* 70 (7):1285-1288. doi:10.1136/ard.2010.141804
42. Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, Du MQ, Luan SL, Altmann DR, Thompson AJ, Compston A, Scott MA, Miller DH, Chandran S (2012) Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *The Lancet Neurology* 11 (2):150-156. doi:10.1016/S1474-4422(11)70305-2
43. Forbes GM, Sturm MJ, Leong RW, Sparrow MP, Segarajasingam D, Cummins AG, Phillips M, Herrmann RP (2014) A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 12 (1):64-71. doi:10.1016/j.cgh.2013.06.021

44. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, Stepensky P, Bloom AI, Shimoni A, Mankuta D, Varda-Bloom N, Rheingold L, Yeshurun M, Bielorai B, Toren A, Zuckerman T, Nagler A, Or R (2013) Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *American journal of blood research* 3 (3):225-238
45. Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E, Gille J, Henschler R (2006) Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108 (12):3938-3944. doi:10.1182/blood-2006-05-025098
46. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449 (7162):557-563. doi:10.1038/nature06188
47. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68 (11):4331-4339. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0943
48. Jeong JO, Han JW, Kim JM, Cho HJ, Park C, Lee N, Kim DW, Yoon YS (2011) Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. *Circulation research* 108 (11):1340-1347. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.239848
49. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC (2010) In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28 (4):788-798. doi:10.1002/stem.312
50. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of cell science* 113 (Pt 7) (7):1161-1166
51. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126 (4):677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
52. Blaser H, Reichman-Fried M, Castanon I, Dumstrei K, Marlow FL, Kawakami K, Solnica-Krezel L, Heisenberg CP, Raz E (2006) Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Developmental cell* 11 (5):613-627. doi:10.1016/j.devcel.2006.09.023
53. Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R, Sixt M (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453 (7191):51-55. doi:10.1038/nature06887
54. Rhee S, Jiang H, Ho CH, Grinnell F (2007) Microtubule function in fibroblast spreading is modulated according to the tension state of cell-matrix interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (13):5425-5430. doi:10.1073/pnas.0608030104

55. Kulesa PM, Fraser SE (2000) In ovo time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to the branchial arches. *Development* 127 (6):1161-1172
56. Vitorino P, Meyer T (2008) Modular control of endothelial sheet migration. *Genes & development* 22 (23):3268-3281. doi:10.1101/gad.1725808
57. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bocker EB, Friedl P (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160 (2):267-277. doi:10.1083/jcb.200209006
58. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (13):8932-8937. doi:10.1073/pnas.132252399
59. Friedl P, Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188 (1):11-19. doi:10.1083/jcb.200909003
60. Councilman WT (1898) Acute Interstitial Nephritis. *J Exp Med* 3 (4-5):393-420
61. Knerlich-Lukoschus F, Held-Feindt J (2015) Chemokine-ligands/receptors: multiplayers in traumatic spinal cord injury. *Mediators of inflammation* 2015:486758. doi:10.1155/2015/486758
62. Smith H, Whittall C, Weksler B, Middleton J (2012) Chemokines stimulate bidirectional migration of human mesenchymal stem cells across bone marrow endothelial cells. *Stem cells and development* 21 (3):476-486. doi:10.1089/scd.2011.0025
63. Hemeda H, Jakob M, Ludwig AK, Giebel B, Lang S, Brandau S (2010) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 19 (5):693-706. doi:10.1089/scd.2009.0365
64. Gao H, Priebe W, Glod J, Banerjee D (2009) Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium. *Stem Cells* 27 (4):857-865. doi:10.1002/stem.23
65. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, Charbord P, Domenech J (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25 (7):1737-1745. doi:10.1634/stemcells.2007-0054

66. Reinisch A, Etchart N, Thomas D, Hofmann NA, Fruehwirth M, Sinha S, Chan CK, Senarath-Yapa K, Seo EY, Wearda T, Hartwig UF, Beham-Schmid C, Trajanoski S, Lin Q, Wagner W, Dullin C, Alves F, Andreeff M, Weissman IL, Longaker MT, Schallmoser K, Majeti R, Strunk D (2015) Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. *Blood* 125 (2):249-260. doi:10.1182/blood-2014-04-572255
67. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD (2003) Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science* 10 (2):228-241. doi:68710
68. Zhang K, Chen J (2012) The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell adhesion & migration* 6 (1):20-29. doi:10.4161/cam.18702
69. Charo IF, Nannizzi L, Smith JW, Cheresch DA (1990) The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin. *J Cell Biol* 111 (6 Pt 1):2795-2800
70. Agrez MV, Bates RC, Boyd AW, Burns GF (1991) Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: implications for wound healing. *Cell regulation* 2 (12):1035-1044
71. Kramer RH, Cheng YF, Clyman R (1990) Human microvascular endothelial cells use beta 1 and beta 3 integrin receptor complexes to attach to laminin. *J Cell Biol* 111 (3):1233-1243
72. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D (1990) Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12):4473-4475
73. Sriramarao P, Mendler M, Bourdon MA (1993) Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *Journal of cell science* 105 (Pt 4):1001-1012
74. Lawler J, Weinstein R, Hynes RO (1988) Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol* 107 (6 Pt 1):2351-2361
75. Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1985) A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (17):5766-5770
76. Cheresch DA (1987) Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (18):6471-6475
77. Steele JG, McFarland C, Dalton BA, Johnson G, Evans MD, Howlett CR, Underwood PA (1993) Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 5 (3):245-257

78. Anselme K, Noel B, Hardouin P (1999) Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with same surface topography. *Journal of materials science Materials in medicine* 10 (12):815-819
79. Brkic M, Balusu S, Libert C, Vandenbroucke RE (2015) Friends or Foes: Matrix Metalloproteinases and Their Multifaceted Roles in Neurodegenerative Diseases. *Mediators of inflammation* 2015:620581. doi:10.1155/2015/620581
80. Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389 (6646):77-81. doi:10.1038/37995
81. Tondreau T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejeneffe M, Martiat P, Bron D, Lagneaux L (2009) In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy* 11 (5):559-569. doi:10.1080/14653240903051541
82. Pei D, Weiss SJ (1996) Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 271 (15):9135-9140
83. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263 (14):6579-6587
84. De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, Van Riet 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 (4):440-449
85. Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 271 (29):17119-17123
86. Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22):13221-13226
87. Omura A, Matsuzaki T, Mio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, Noda M (2009) RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem* 284 (6):3461-3469. doi:10.1074/jbc.M806212200

88. Eisenberg I, Hochner H, Sadeh M, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S (2002) Establishment of the genomic structure and identification of thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human RECK gene. *Cytogenetic and genome research* 97 (1-2):58-61. doi:64042
89. Sasahara RM, Takahashi C, Noda M (1999) Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 264 (3):668-675. doi:10.1006/bbrc.1999.1552
90. Peng X, Wu W, Zhu B, Sun Z, Ji L, Ruan Y, Zhou M, Zhou L, Gu J (2014) Activation of farnesoid X receptor induces RECK expression in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 443 (1):211-216. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.082
91. Lee KJ, Lee KY, Lee YM (2010) Downregulation of a tumor suppressor RECK by hypoxia through recruitment of HDAC1 and HIF-1alpha to reverse HRE site in the promoter. *Biochim Biophys Acta* 1803 (5):608-616. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.004
92. Trombetta-Lima M, Winnischofer SM, Demasi MA, Astorino Filho R, Carreira AC, Wei B, de Assis-Ribas T, Konig MS, Bowman-Colin C, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Stetler-Stevenson W, Sogayar MC (2015) Isolation and characterization of novel RECK tumor suppressor gene splice variants. *Oncotarget* 6 (32):33120-33133. doi:10.18632/oncotarget.5305
93. Takagi S, Simizu S, Osada H (2009) RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. *Cancer Res* 69 (4):1502-1508. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2635
94. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M (2001) The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107 (6):789-800
95. Leigh NR, Schupp MO, Li K, Padmanabhan V, Gastonguay A, Wang L, Chun CZ, Wilkinson GA, Ramchandran R (2013) Mmp17b is essential for proper neural crest cell migration in vivo. *PloS one* 8 (10):e76484. doi:10.1371/journal.pone.0076484
96. Chang CK, Hung WC, Chang HC (2008) The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine* 12 (6B):2781-2789. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00215.x
97. Simizu S, Takagi S, Tamura Y, Osada H (2005) RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. *Cancer Res* 65 (16):7455-7461. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4446
98. Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EP, Omura A, Miki T, Takahashi R, Matsumoto N, Ludwig A, Noda M, Takahashi C (2007) RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nature neuroscience* 10 (7):838-845. doi:10.1038/nn1922

99. Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M, Takahashi C (2007) The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem* 282 (16):12341-12352. doi:10.1074/jbc.M610948200
100. Yoshida D, Nomura R, Teramoto A (2008) Regulation of cell invasion and signalling pathways in the pituitary adenoma cell line, HP-75, by reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK). *Journal of neuro-oncology* 89 (2):141-150. doi:10.1007/s11060-008-9606-5
101. Chen Y, Tsai YH, Tseng SH (2013) RECK regulated endoplasmic reticulum stress response and enhanced cisplatin-induced cell death in neuroblastoma cells. *Surgery* 154 (5):968-979. doi:10.1016/j.surg.2013.05.026
102. Kitajima S, Miki T, Takegami Y, Kido Y, Noda M, Hara E, Shamma A, Takahashi C (2011) Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene* 30 (6):737-750. doi:10.1038/onc.2010.448
103. Hong KJ, Hsu MC, Hou MF, Hung WC (2011) The tumor suppressor RECK interferes with HER-2/Neu dimerization and attenuates its oncogenic signaling. *FEBS letters* 585 (4):591-595. doi:10.1016/j.febslet.2011.01.021
104. Hong KJ, Hsu MC, Hung WC (2015) RECK impedes DNA repair by inhibiting the erbB/JAB1/Rad51 signaling axis and enhances chemosensitivity of breast cancer cells. *American journal of cancer research* 5 (8):2422-2430
105. Lee YM, Lee SH, Lee KB, Nguyen MP, Lee MY, Park GH, Kwon MJ (2013) Silencing of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs stimulates hyperplastic phenotypes through activation of epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-2alpha. *PloS one* 8 (12):e84520. doi:10.1371/journal.pone.0084520
106. Walsh LA, Roy DM, Reingold M, Giri D, Snyder A, Turcan S, Badwe CR, Lyman J, Bromberg J, King TA, Chan TA (2015) RECK controls breast cancer metastasis by modulating a convergent, STAT3-dependent neoangiogenic switch. *Oncogene* 34 (17):2189-2203. doi:10.1038/onc.2014.175
107. Prendergast A, Linbo TH, Swarts T, Ungos JM, McGraw HF, Krispin S, Weinstein BM, Raible DW (2012) The metalloproteinase inhibitor Reck is essential for zebrafish DRG development. *Development* 139 (6):1141-1152. doi:10.1242/dev.072439
108. Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, Wada M, Noda M, Imamura M (2003) RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (5):1779-1784

109. Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, Ikeda N, Fujii H, Koyama F, Mukogawa T, Matsumoto H, Kondo S, Takahashi C, Noda M, Nakajima Y (2004) The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (16):5572-5579. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0656
110. Namwat N, Puetkasichonpasutha J, Loilome W, Yongvanit P, Techasen A, Puapairoj A, Sripa B, Tassaneeyakul W, Khuntikeo N, Wongkham S (2011) Downregulation of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) is associated with enhanced expression of matrix metalloproteinases and cholangiocarcinoma metastases. *Journal of gastroenterology* 46 (5):664-675. doi:10.1007/s00535-010-0345-y
111. Wang L, Wang Q, Li HL, Han LY (2013) Expression of MiR200a, miR93, metastasis-related gene RECK and MMP2/MMP9 in human cervical carcinoma - relationship with prognosis. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 14 (3):2113-2118
112. Xu J, Wu S, Shi X (2010) Expression of matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in osteosarcoma. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 28 (12):1621-1625. doi:10.1002/jor.21178
113. Furumoto K, Arii S, Mori A, Furuyama H, Gorrin Rivas MJ, Nakao T, Isobe N, Murata T, Takahashi C, Noda M, Imamura M (2001) RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. *Hepatology (Baltimore, Md)* 33 (1):189-195. doi:10.1053/jhep.2001.21048
114. Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M, Wada H, Tanaka F (2004) Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 40 (10):1617-1623. doi:10.1016/j.ejca.2004.02.028
115. Mao X, Liu L, Zhang B, Zhang D (2013) Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs gene expression and its clinical significance in peripheral T-cell lymphoma. *Oncology letters* 5 (6):1867-1871. doi:10.3892/ol.2013.1306
116. Long NK, Kato K, Yamashita T, Makita H, Toida M, Hatakeyama D, Hara A, Mori H, Shibata T (2008) Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology* 44 (11):1052-1058. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.02.004
117. Deng YF, Zhou DN, Ye CS, Zeng L, Yin P (2012) Aberrant expression levels of MTA1 and RECK in nasopharyngeal carcinoma: association with metastasis, recurrence, and prognosis. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 121 (7):457-465. doi:10.1177/000348941212100706
118. Zhou X, Huang S, Jiang L, Zhang S, Li W, Chen Z, Zhang D (2014) Expression of RECK and MMP-2 in salivary adenoid cystic carcinoma: Correlation with tumor progression and patient prognosis. *Oncology letters* 7 (5):1549-1555. doi:10.3892/ol.2014.1906

119. Chung TT, Yeh CB, Li YC, Su SC, Chien MH, Yang SF, Hsieh YH (2012) Effect of RECK gene polymorphisms on hepatocellular carcinoma susceptibility and clinicopathologic features. *PloS one* 7 (3):e33517. doi:10.1371/journal.pone.0033517
120. Yu Y, Hu Y, Li K, Chen Z, Zhang H, Zhang L (2015) RECK Gene Polymorphism is Associated with Susceptibility and Prognosis of Wilms' Tumor in Chinese Children. *Med Sci Monit* 21:1928-1933. doi:10.12659/MSM.893606
121. Chen X, Jiang F, Shi N, Zhou H, Zhang L, Chen Y, Zheng Y, Yan TG (2014) RECK gene polymorphisms influence NSCLC susceptibility, but not the chemotherapy response status in Chinese cohort. *Cell biochemistry and biophysics* 69 (3):567-571. doi:10.1007/s12013-014-9832-8
122. Lei H, Hemminki K, Altieri A, Johansson R, Enquist K, Hallmans G, Lenner P, Forsti A (2007) Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: few associations with breast cancer susceptibility and progression. *Breast cancer research and treatment* 103 (1):61-69. doi:10.1007/s10549-006-9345-2
123. Ahn MY, Kang DO, Na YJ, Yoon S, Choi WS, Kang KW, Chung HY, Jung JH, Min do S, Kim HS (2012) Histone deacetylase inhibitor, apicidin, inhibits human ovarian cancer cell migration via class II histone deacetylase 4 silencing. *Cancer letters* 325 (2):189-199. doi:10.1016/j.canlet.2012.06.017
124. Chang HC, Liu LT, Hung WC (2004) Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. *Cell Signal* 16 (6):675-679. doi:10.1016/j.cellsig.2003.11.001
125. Pan Y, Wang L, Kang SG, Lu Y, Yang Z, Huynh T, Chen C, Zhou R, Guo M, Zhao Y (2015) Gd-Metallofullerenol Nanomaterial Suppresses Pancreatic Cancer Metastasis by Inhibiting the Interaction of Histone Deacetylase 1 and Metastasis-Associated Protein 1. *ACS Nano* 9 (7):6826-6836. doi:10.1021/nn506782f
126. Yeh HH, Tseng YF, Hsu YC, Lan SH, Wu SY, Raghavaraju G, Cheng DE, Lee YR, Chang TY, Chow NH, Hung WC, Liu HS (2015) Ras induces experimental lung metastasis through up-regulation of RbAp46 to suppress RECK promoter activity. *BMC cancer* 15:172. doi:10.1186/s12885-015-1155-7
127. Echizenya M, Kondo S, Takahashi R, Oh J, Kawashima S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M (2005) The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors. *Oncogene* 24 (38):5850-5857. doi:10.1038/sj.onc.1208733
128. Fejzo MS, Ginther C, Dering J, Anderson L, Venkatesan N, Konecny G, Karlan B, Slamon DJ (2011) Knockdown of ovarian cancer amplification target ADRM1 leads to down-regulation of GIPC1 and upregulation of RECK. *Genes, chromosomes & cancer* 50 (6):434-441. doi:10.1002/gcc.20868
129. Vagima Y, Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, Tesio M, Kalinkovich A, Golan K, Dar A, Kollet O, Petit I, Perl O, Rosenthal E, Resnick I, Hardan I, Gellman YN, Naor D, Nagler A, Lapidot T (2009) MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. *The Journal of clinical investigation* 119 (3):492-503. doi:10.1172/JCI36541

130. Wang H, Wu J, Meng X, Ying X, Zuo Y, Liu R, Pan Z, Kang T, Huang W (2011) MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis* 32 (7):1033-1042. doi:10.1093/carcin/bgr081
131. Chang HC, Cho CY, Hung WC (2006) Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. *Cancer Res* 66 (17):8413-8420. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0685
132. Kim NY, Lee JE, Chang HJ, Lim CS, Nam DH, Min BH, Park GH, Oh JS (2008) Gamma-irradiation enhances RECK protein levels in Panc-1 pancreatic cancer cells. *Molecules and cells* 25 (1):105-111
133. Mori T, Moriuchi R, Okazaki E, Yamada K, Katamine S (2007) Tgat oncoprotein functions as a inhibitor of RECK by association of the unique C-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun* 355 (4):937-943. doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.051
134. Park S, Lee C, Sabharwal P, Zhang M, Meyers CL, Sockanathan S (2013) GDE2 promotes neurogenesis by glycosylphosphatidylinositol-anchor cleavage of RECK. *Science* 339 (6117):324-328. doi:10.1126/science.1231921
135. Jung HM, Phillips BL, Patel RS, Cohen DM, Jakymiw A, Kong WW, Cheng JQ, Chan EK (2012) Keratinization-associated miR-7 and miR-21 regulate tumor suppressor reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) in oral cancer. *J Biol Chem* 287 (35):29261-29272. doi:10.1074/jbc.M112.366518
136. Xin C, Buhe B, Hongting L, Chuanmin Y, Xiwei H, Hong Z, Lulu H, Qian D, Renjie W (2013) MicroRNA-15a promotes neuroblastoma migration by targeting reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) and regulating matrix metalloproteinase-9 expression. *The FEBS journal* 280 (3):855-866. doi:10.1111/febs.12074
137. Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H, Noda M (2010) Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. *Oncogene* 29 (18):2638-2648. doi:10.1038/onc.2010.23
138. Zhao H, Wang Y, Yang L, Jiang R, Li W (2014) MiR-25 promotes gastric cancer cells growth and motility by targeting RECK. *Molecular and cellular biochemistry* 385 (1-2):207-213. doi:10.1007/s11010-013-1829-x
139. Lin HY, Chiang CH, Hung WC (2013) STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells. *British journal of cancer* 109 (3):731-738. doi:10.1038/bjc.2013.349
140. Lei L, Huang Y, Gong W (2014) Inhibition of miR-92b suppresses nonsmall cell lung cancer cells growth and motility by targeting RECK. *Molecular and cellular biochemistry* 387 (1-2):171-176. doi:10.1007/s11010-013-1882-5
141. Zhang J, Kong X, Li J, Luo Q, Li X, Shen L, Chen L, Fang L (2014) miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. *Oncology reports* 31 (3):1357-1363. doi:10.3892/or.2013.2934

142. Shi L, Wan Y, Sun G, Gu X, Qian C, Yan W, Zhang S, Pan T, Wang Z, You Y (2012) Functional differences of miR-125b on the invasion of primary glioblastoma CD133-negative cells and CD133-positive cells. *Neuromolecular medicine* 14 (4):303-316. doi:10.1007/s12017-012-8188-8
143. Li Y, Xu D, Bao C, Zhang Y, Chen D, Zhao F, Ding J, Liang L, Wang Q, Liu L, Li J, Yao M, Huang S, He X (2015) MicroRNA-135b, a HSF1 target, promotes tumor invasion and metastasis by regulating RECK and EVI5 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6 (4):2421-2433. doi:10.18632/oncotarget.2965
144. Hirata H, Ueno K, Shahryari V, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R (2012) Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer. *PLoS one* 7 (11):e51056. doi:10.1371/journal.pone.0051056
145. Pan Y, Liang H, Chen W, Zhang H, Wang N, Wang F, Zhang S, Liu Y, Zhao C, Yan X, Zhang J, Zhang CY, Gu H, Zen K, Chen X (2015) microRNA-200b and microRNA-200c promote colorectal cancer cell proliferation via targeting the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs. *RNA Biol* 12 (3):276-289. doi:10.1080/15476286.2015.1017208
146. Kim CW, Kumar S, Son DJ, Jang IH, Griendling KK, Jo H (2014) Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-microRNA-712 or anti-microRNA-205 in angiotensin II-infused mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34 (7):1412-1421. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303134
147. Qin J, Luo M (2014) MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK. *FEBS letters* 588 (1):99-104. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.014
148. Li N, Tang B, Zhu ED, Li BS, Zhuang Y, Yu S, Lu DS, Zou QM, Xiao B, Mao XH (2012) Increased miR-222 in H. pylori-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK. *FEBS letters* 586 (6):722-728. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.025
149. Xie J, Tan ZH, Tang X, Mo MS, Liu YP, Gan RL, Li Y, Zhang L, Li GQ (2014) MiR-374b-5p suppresses RECK expression and promotes gastric cancer cell invasion and metastasis. *World journal of gastroenterology: WJG* 20 (46):17439-17447. doi:10.3748/wjg.v20.i46.17439
150. Chen X, Shi C, Wang C, Liu W, Chu Y, Xiang Z, Hu K, Dong P, Han X (2017) The role of miR-497-5p in myofibroblast differentiation of LR-MSCs and pulmonary fibrogenesis. *Scientific reports* 7:40958. doi:10.1038/srep40958
151. Shen B, Yu S, Zhang Y, Yuan Y, Li X, Zhong J, Feng J (2016) miR-590-5p regulates gastric cancer cell growth and chemosensitivity through RECK and the AKT/ERK pathway. *OncoTargets and therapy* 9:6009-6019. doi:10.2147/OTT.S110923
152. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* 28 (17):5369-5380. doi:10.1128/MCB.00479-08

153. Bavia L, Mosimann AL, Aoki MN, Duarte Dos Santos CN (2016) A glance at subgenomic flavivirus RNAs and microRNAs in flavivirus infections. *Virology journal* 13 (1):84. doi:10.1186/s12985-016-0541-3
154. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23 (20):4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
155. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432 (7014):235-240. doi:10.1038/nature03120
156. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17 (24):3011-3016. doi:10.1101/gad.1158803
157. Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA (2013) Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic acids research* 41 (13):6568-6576. doi:10.1093/nar/gkt361
158. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293 (5531):834-838. doi:10.1126/science.1062961
159. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular cell* 39 (2):292-299. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.015
160. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, Tomari Y (2010) ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature structural & molecular biology* 17 (1):17-23. doi:10.1038/nsmb.1733
161. Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC genomics* 10:413. doi:10.1186/1471-2164-10-413
162. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115 (7):787-798
163. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 15 (2):185-197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007
164. Wu H, Ye C, Ramirez D, Manjunath N (2009) Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. *PloS one* 4 (10):e7566. doi:10.1371/journal.pone.0007566
165. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19 (1):92-105. doi:10.1101/gr.082701.108

166. Kim NH, Kim HS, Kim NG, Lee I, Choi HS, Li XY, Kang SE, Cha SY, Ryu JK, Na JM, Park C, Kim K, Lee S, Gumbiner BM, Yook JI, Weiss SJ (2011) p53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling. *Science signaling* 4 (197):ra71. doi:10.1126/scisignal.2001744
167. Anderegg A, Lin HP, Chen JA, Caronia-Brown G, Cherepanova N, Yun B, Joksimovic M, Rock J, Harfe BD, Johnson R, Awatramani R (2013) An Lmx1b-miR135a2 regulatory circuit modulates Wnt1/Wnt signaling and determines the size of the midbrain dopaminergic progenitor pool. *PLoS genetics* 9 (12):e1003973. doi:10.1371/journal.pgen.1003973
168. Li M, Hu X, Zhu J, Zhu C, Zhu S, Liu X, Xu J, Han S, Yu Z (2014) Overexpression of miR-19b impairs cardiac development in zebrafish by targeting *ctnnb1*. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 33 (6):1988-2002. doi:10.1159/000362975
169. Wang Y, Huang C, Reddy Chintagari N, Bhaskaran M, Weng T, Guo Y, Xiao X, Liu L (2013) miR-375 regulates rat alveolar epithelial cell trans-differentiation by inhibiting Wnt/beta-catenin pathway. *Nucleic acids research* 41 (6):3833-3844. doi:10.1093/nar/gks1460
170. Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31 (1):99-109
171. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987) The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50 (4):649-657
172. Tanaka K, Kitagawa Y, Kadowaki T (2002) *Drosophila* segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of *wingless* in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277 (15):12816-12823. doi:10.1074/jbc.M200187200
173. Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, Takao T, Takada S (2006) Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental cell* 11 (6):791-801. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.003
174. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272 (5264):1023-1026
175. Willert K, Shibamoto S, Nusse R (1999) Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes & development* 13 (14):1768-1773
176. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108 (6):837-847
177. Latres E, Chiaur DS, Pagano M (1999) The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 18 (4):849-854. doi:10.1038/sj.onc.1202653

178. Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, Biechele TL, Gingras AC, Zheng N, Maccoss MJ, Angers S, Moon RT (2007) Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 316 (5827):1043-1046. doi:10.1126/science/1141515
179. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal* 16 (13):3797-3804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797
180. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O, Clevers H (1998) The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395 (6702):608-612. doi:10.1038/26989
181. Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ (1999) A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes & development* 13 (17):2218-2230
182. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407 (6803):530-535. doi:10.1038/35035117
183. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438 (7069):873-877. doi:10.1038/nature04185
184. Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J (2003) Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Molecular cell* 12 (5):1251-1260
185. Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A (1999) DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol Cell Biol* 19 (6):4414-4422
186. Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW (2000) Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts. *Molecular cell* 5 (3):523-532
187. Daniels DL, Weis WI (2005) Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology* 12 (4):364-371. doi:10.1038/nsmb912
188. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, Murone M, Zullig S, Basler K (2002) Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109 (1):47-60
189. Yu H, Ye X, Guo N, Nathans J (2012) Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes. *Development* 139 (23):4383-4394. doi:10.1242/dev.083352

190. Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM (1999) The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397 (6721):707-710. doi:10.1038/17820
191. Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, De Robertis EM (1997) Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88 (6):747-756
192. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J (1999) A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398 (6726):431-436. doi:10.1038/18899
193. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411 (6835):321-325. doi:10.1038/35077108
194. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 280 (20):19883-19887. doi:10.1074/jbc.M413274200
195. Kakugawa S, Langton PF, Zebisch M, Howell SA, Chang TH, Liu Y, Feizi T, Bineva G, O'Reilly N, Snijders AP, Jones EY, Vincent JP (2015) Notum deacylates Wnt proteins to suppress signalling activity. *Nature* 519 (7542):187-192. doi:10.1038/nature14259
196. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280 (5363):596-599
197. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64 (2):295-312
198. Lipton A, Klinger I, Paul D, Holley RW (1971) Migration of mouse 3T3 fibroblasts in response to a serum factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (11):2799-2801
199. Heggebo J, Haasters F, Polzer H, Schwarz C, Saller MM, Mutschler W, Schieker M, Prall WC (2014) Aged human mesenchymal stem cells: the duration of bone morphogenetic protein-2 stimulation determines induction or inhibition of osteogenic differentiation. *Orthopedic reviews* 6 (2):5242. doi:10.4081/or.2014.5242
200. Rayleigh L (1919) XXXI. On the problem of random vibrations, and of random flights in one, two, or three dimensions. *Philosophical Magazine Series 6* 37 (220):321-347. doi:10.1080/14786440408635894
201. Biechele TL, Adams AM, Moon RT (2009) Transcription-based reporters of Wnt/beta-catenin signaling. *Cold Spring Harbor protocols* 2009 (6):pdb prot5223. doi:10.1101/pdb.prot5223
202. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology* 22 (3):326-330. doi:10.1038/nbt936

203. Naumann K, Wehner R, Schwarze A, Petzold C, Schmitz M, Rohayem J (2013) Activation of dendritic cells by the novel Toll-like receptor 3 agonist RGC100. *Clinical & developmental immunology* 2013:283649. doi:10.1155/2013/283649
204. Nolte A, Ott K, Rohayem J, Walker T, Schlensak C, Wendel HP (2013) Modification of small interfering RNAs to prevent off-target effects by the sense strand. *New biotechnology* 30 (2):159-165. doi:10.1016/j.nbt.2012.10.001
205. Bret C, Hose D, Reme T, Kassambara A, Seckinger A, Meissner T, Schved JF, Kanouni T, Goldschmidt H, Klein B (2011) Gene expression profile of ADAMs and ADAMTSS metalloproteinases in normal and malignant plasma cells and in the bone marrow environment. *Experimental hematology* 39 (5):546-557 e548. doi:10.1016/j.exphem.2011.02.002
206. Senst C, Nazari-Shafti T, Kruger S, Honer Zu Bentrup K, Dupin CL, Chaffin AE, Srivastav SK, Worner PM, Abdel-Mageed AB, Alt EU, Izadpanah R (2013) Prospective dual role of mesenchymal stem cells in breast tumor microenvironment. *Breast cancer research and treatment* 137 (1):69-79. doi:10.1007/s10549-012-2321-0
207. Paulissen G, Rocks N, Quesada-Calvo F, Gosset P, Foidart JM, Noel A, Louis R, Cataldo DD (2006) Expression of ADAMs and their inhibitors in sputum from patients with asthma. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 12 (7-8):171-179. doi:10.2119/2006-00028.Paulissen
208. Benzon Z, Prusac IK, Zekic S, Vulic M (2014) Immunohistochemical expression of RECK protein in placental membranes of the preterm delivery with and without chorioamnionitis. *Histology and histopathology* 29 (5):629-633. doi:10.14670/HH-29.10.629
209. Liu N, Cao Y, Zhu G (2017) Expression of matrix metalloproteinases-2, -9 and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in gingiva in periodontal health and disease. *Archives of oral biology* 75:62-67. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.12.009
210. Zibert JR, Lovendorf MB, Litman T, Olsen J, Kaczkowski B, Skov L (2010) MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *Journal of dermatological science* 58 (3):177-185. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.03.004
211. van Lent PL, Span PN, Sloetjes AW, Radstake TR, van Lieshout AW, Heuvel JJ, Sweep CG, van den Berg WB (2005) Expression and localisation of the new metalloproteinase inhibitor RECK (reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) in inflamed synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 64 (3):368-374. doi:10.1136/ard.2004.027870
212. Navratilova Z, Novosadova E, Hagemann-Jensen M, Kullberg S, Kolek V, Grunewald J, Petrek M (2016) Expression Profile of Six RNA-Binding Proteins in Pulmonary Sarcoidosis. *PloS one* 11 (8):e0161669. doi:10.1371/journal.pone.0161669
213. Hou C, Zhang Y (2008) Expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: links to disease activity, damage accrual and matrix metalloproteinase 9 secretion. *The Journal of international medical research* 36 (4):704-713. doi:10.1177/147323000803600412

214. Kimura T, Okada A, Yatabe T, Okubo M, Toyama Y, Noda M, Okada Y (2010) RECK is up-regulated and involved in chondrocyte cloning in human osteoarthritic cartilage. *The American journal of pathology* 176 (6):2858-2867. doi:10.2353/ajpath.2010.091003
215. Mash DC, French-Mullen J, Adi N, Qin Y, Buck A, Pablo J (2007) Gene expression in human hippocampus from cocaine abusers identifies genes which regulate extracellular matrix remodeling. *PloS one* 2 (11):e1187. doi:10.1371/journal.pone.0001187
216. Polyakova V, Miyagawa S, Szalay Z, Risteli J, Kostin S (2008) Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation. *Journal of cellular and molecular medicine* 12 (1):189-208. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00219.x
217. Silveira Correa TC, Massaro RR, Brohem CA, Taboga SR, Lamers ML, Santos MF, Maria-Engler SS (2010) RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. *J Cell Biochem* 110 (1):52-61. doi:10.1002/jcb.22472
218. Clark JC, Akiyama T, Thomas DM, Labrinidis A, Evdokiou A, Galloway SJ, Kim HS, Dass CR, Choong PF (2011) RECK in osteosarcoma: a novel role in tumour vasculature and inhibition of tumorigenesis in an orthotopic model. *Cancer* 117 (15):3517-3528. doi:10.1002/cncr.25757
219. Yoshida Y, Ninomiya K, Hamada H, Noda M (2012) Involvement of the SKP2-p27(KIP1) pathway in suppression of cancer cell proliferation by RECK. *Oncogene* 31 (37):4128-4138. doi:10.1038/onc.2011.570
220. Miki T, Shamma A, Kitajima S, Takegami Y, Noda M, Nakashima Y, Watanabe K, Takahashi C (2010) The beta1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. *Molecular cancer research: MCR* 8 (5):665-676. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0351
221. Tian QS, Li DC (2010) Lentivirus-mediated reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs gene transfer suppresses pancreatic cancer invasion in vitro. *Saudi medical journal* 31 (7):752-758
222. Qi Q, Lu N, Li C, Zhao J, Liu W, You Q, Guo Q (2015) Involvement of RECK in gambogic acid induced anti-invasive effect in A549 human lung carcinoma cells. *Molecular carcinogenesis* 54 Suppl 1:E13-25. doi:10.1002/mc.22138
223. Liang QX, Liang YC, Xu ZY, Chen WL, Xie HL, Zhang B (2014) RECK overexpression reduces invasive ability in ameloblastoma cells. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 43 (8):613-618. doi:10.1111/jop.12179
224. Yuki K, Yoshida Y, Inagaki R, Hiai H, Noda M (2014) E-cadherin-downregulation and RECK-upregulation are coupled in the non-malignant epithelial cell line MCF10A but not in multiple carcinoma-derived cell lines. *Scientific reports* 4:4568. doi:10.1038/srep04568
225. Xia H, Chen S, Chen K, Huang H, Ma H (2014) MiR-96 promotes proliferation and chemo- or radioresistance by down-regulating RECK in esophageal cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 68 (8):951-958. doi:10.1016/j.biopha.2014.10.023

226. Liu J, Chi D, Lu H, Zhang T, Yamakawa T (2015) Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motif is involved in intimal hyperplasia in carotid arteries: a new insight in the prevention of restenosis after vascular angioplasty. *Ann Vasc Surg* 29 (6):1293-1299. doi:10.1016/j.avsg.2015.01.032
227. Zhou Z, Wang Z, Wei H, Wu S, Wang X, Xiao J (2016) Promotion of tumour proliferation, migration and invasion by miR-92b in targeting RECK in osteosarcoma. *Clinical science (London, England: 1979)* 130 (11):921-930. doi:10.1042/CS20150509
228. Hirata H, Ueno K, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R (2013) MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer. *PloS one* 8 (1):e55502. doi:10.1371/journal.pone.0055502
229. Kang HG, Kim HS, Kim KJ, Oh JH, Lee MR, Seol SM, Han I (2007) RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 25 (5):696-702. doi:10.1002/jor.20323
230. Rabien A, Ergun B, Erbersdobler A, Jung K, Stephan C (2012) RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. *The Prostate* 72 (9):948-954. doi:10.1002/pros.21498
231. Cho CY, Wang JH, Chang HC, Chang CK, Hung WC (2007) Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells. *Journal of cellular physiology* 213 (1):65-69. doi:10.1002/jcp.21089
232. Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M, Stetler-Stevenson WG (2004) Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res* 64 (24):9062-9069. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1981
233. Liu C, Yu J, Yu S, Lavker RM, Cai L, Liu W, Yang K, He X, Chen S (2010) MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 53 (1):98-107. doi:10.1016/j.jhep.2010.02.021
234. Liu LT, Peng JP, Chang HC, Hung WC (2003) RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Oncogene* 22 (51):8263-8270. doi:10.1038/sj.onc.1207157
235. Chiang CH, Hou MF, Hung WC (2013) Up-regulation of miR-182 by beta-catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK. *Biochim Biophys Acta* 1830 (4):3067-3076. doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.009
236. 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. doi:10.1182/blood-2006-10-051060

237. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270 (10):5331-5338
238. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264 (29):17374-17378
239. Morioka Y, Monypenny J, Matsuzaki T, Shi S, Alexander DB, Kitayama H, Noda M (2009) The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. *Oncogene* 28 (11):1454-1464. doi:10.1038/onc.2008.486
240. Jones JI, Prevette T, Gockerman A, Clemmons DR (1996) Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (6):2482-2487
241. Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fassler R, Wehland J, Gertler FB (2000) Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101 (7):717-728
242. Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391 (6662):93-96. doi:10.1038/34208
243. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *The American journal of pathology* 149 (1):293-305
244. Liang S, He L, Zhao X, Miao Y, Gu Y, Guo C, Xue Z, Dou W, Hu F, Wu K, Nie Y, Fan D (2011) MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer. *PloS one* 6 (4):e18409. doi:10.1371/journal.pone.0018409
245. Fang J, Zhang T, Liu Y, Li Y, Zhou S, Song D, Zhao Y, Feng R, Zhang X, Li L, Wen J (2014) PAX6 downregulates miR-124 expression to promote cell migration during embryonic stem cell differentiation. *Stem cells and development* 23 (19):2297-2310. doi:10.1089/scd.2013.0410
246. Meng S, Cao JT, Zhang B, Zhou Q, Shen CX, Wang CQ (2012) Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene Spred-1. *Journal of molecular and cellular cardiology* 53 (1):64-72. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.04.003
247. Musiyenko A, Bitko V, Barik S (2008) Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells. *J Mol Med (Berl)* 86 (3):313-322. doi:10.1007/s00109-007-0296-9

248. Tome M, Lopez-Romero P, Albo C, Sepulveda JC, Fernandez-Gutierrez B, Dopazo A, Bernad A, Gonzalez MA (2011) miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation* 18 (6):985-995. doi:10.1038/cdd.2010.167
249. Moser B, Schumacher C, von Tscherner V, Clark-Lewis I, Baggiolini M (1991) Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J Biol Chem* 266 (16):10666-10671
250. Zhou L, Yang ZX, Song WJ, Li QJ, Yang F, Wang DS, Zhang N, Dou KF (2013) MicroRNA-21 regulates the migration and invasion of a stem-like population in hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* 43 (2):661-669. doi:10.3892/ijo.2013.1965
251. Zhao W, Dong Y, Wu C, Ma Y, Jin Y, Ji Y (2015) MiR-21 overexpression improves osteoporosis by targeting RECK. *Molecular and cellular biochemistry* 405 (1-2):125-133. doi:10.1007/s11010-015-2404-4
252. Mahl C, Egea V, Megens RT, Pitsch T, Santovito D, Weber C, Ries C (2016) RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) regulates migration, differentiation and Wnt/beta-catenin signaling in human mesenchymal stem cells. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 73 (7):1489-1501. doi:10.1007/s00018-015-2054-4
253. Zambuzzi WF, Yano CL, Cavagis AD, Peppelenbosch MP, Granjeiro JM, Ferreira CV (2009) Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Molecular and cellular biochemistry* 322 (1-2):143-150. doi:10.1007/s11010-008-9951-x
254. Visigalli D, Strangio A, Palmieri D, Manduca P (2010) Hind limb unloading of mice modulates gene expression at the protein and mRNA level in mesenchymal bone cells. *BMC musculoskeletal disorders* 11:147. doi:10.1186/1471-2474-11-147
255. Alexander D, Ardjomandi N, Munz A, Friedrich B, Reinert S (2011) ECM remodelling components regulated during jaw periosteal cell osteogenesis. *Cell biology international* 35 (10):973-980. doi:10.1042/CBI20100836
256. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289 (5481):950-953
257. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107 (4):513-523

258. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T (2004) DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23 (52):8520-8526. doi:10.1038/sj.onc.1207892
259. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F (2002) Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22 (4):1172-1183
260. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2005) Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280 (39):33132-33140. doi:10.1074/jbc.M500608200
261. Ulrich F, Carretero-Ortega J, Menendez J, Narvaez C, Sun B, Lancaster E, Pershad V, Trzaska S, Veliz E, Kamei M, Prendergast A, Kidd KR, Shaw KM, Castranova DA, Pham VN, Lo BD, Martin BL, Raible DW, Weinstein BM, Torres-Vazquez J (2016) Reck enables cerebrovascular development by promoting canonical Wnt signaling. *Development* 143 (1):147-159. doi:10.1242/dev.123059
262. D'Alimonte I, Lannutti A, Pipino C, Di Tomo P, Pierdomenico L, Cianci E, Antonucci I, Marchisio M, Romano M, Stuppia L, Caciagli F, Pandolfi A, Ciccarelli R (2013) Wnt signaling behaves as a "master regulator" in the osteogenic and adipogenic commitment of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Stem cell reviews* 9 (5):642-654. doi:10.1007/s12015-013-9436-5
263. Pei J, Grishin NV (2012) Cysteine-rich domains related to Frizzled receptors and Hedgehog-interacting proteins. *Protein science: a publication of the Protein Society* 21 (8):1172-1184. doi:10.1002/pro.2105
264. Vanhollebeke B, Stone OA, Bostaille N, Cho C, Zhou Y, Maquet E, Gauquier A, Cabochette P, Fukuhara S, Mochizuki N, Nathans J, Stainier DY (2015) Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124- and Reck-dependent Wnt/beta-catenin pathway during brain angiogenesis. *Elife* 4. doi:10.7554/eLife.06489
265. Qiu W, Andersen TE, Bollerslev J, Mandrup S, Abdallah BM, Kassem M (2007) Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22 (11):1720-1731. doi:10.1359/jbmr.070721
266. Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC (2003) Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res* 63 (12):3069-3072

I Danksagung

Meine Wertschätzung gilt allen, die an mich geglaubt haben, auch wenn dies sicherlich nicht immer einfach war. Ihr fortdauerndes Interesse an meiner Arbeit gab mir die Kraft, nach vorne zu schauen und meinen Weg weiterzugehen. Insbesondere danke ich den nachfolgenden Personen, die auf unterschiedliche Weise am erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beteiligt waren:

- Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum, Direktorin des ehemaligen Instituts für Klinische Chemie und Biochemie, sowie Prof. Dr. med. Christian Weber, Direktor des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, die mir einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellten und somit die Durchführung der Promotion ermöglichten.
- Prof. Dr. rer. nat. Christian Ries, der mir die Chance gab, im familiären und gleichzeitig professionellen Umfeld seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Er inspirierte mich zur Arbeit am RECK-Projekt, unterstützte mich mit seiner Fachkompetenz bei der Interpretation der oftmals mehrdeutigen Resultate und half mir durch seine moderne Menschenführung, die kurz- und langfristigen Ziele meiner Arbeit nicht aus dem Blick zu verlieren. Seine Geduld mit meiner oftmals pedantischen Herangehensweise an bestehende Herausforderungen war bewundernswert.
- Dr. rer. nat. Virginia Egea, die mir während der ersten Schritte im neuen Arbeitsumfeld umsichtig zur Seite stand und mich vor allem in der Anfangszeit bei experimentellen Tätigkeiten im Labor betreute. Ihre Expertise mit hMSCs erleichterte mir immer wieder die Handhabung dieser sensitiven Zellen. Sie bewies mir außerdem, dass sich ein genialer, zielstrebigster Geist durchaus mit einem lebensfrohen, aufgeschlossenen Charakter vereinbaren lässt: Mit keinem anderen Kollegen konnte ich so herzlich über YouTube-Videos lachen. Ihrer sprachlichen Kreativität ist es zu verdanken, dass ich den Mitarbeitern im Institut als „Nackito“ dauerhaft in Erinnerung bleiben werde.
- Dr. rer. nat. Tanja Popp, die mir ein Vorbild an Pflichtbewusstsein und Ehrlichkeit war. Mit ihrer direkten Art zeigte sie mir alternative Sichtweisen auf und war nie um einen wertvollen Ratschlag verlegen, von der Ausarbeitung eines Seminarvortrags bis hin zur Zubereitung des Nachmittagskaffees. Sie bestärkte mich in meiner Überzeugung, dass harte Arbeit das Fundament für nachhaltigen Erfolg bildet und man sich für die richtigen Menschen nicht verstellen muss.

- Donato Santovito, M.D., Ph.D., der mir als Statistik-Guru der Arbeitsgruppe ein ums andere Mal bei den Signifikanzberechnungen meiner Resultate zur Hand ging. Egal ob es sich um eine komplizierte wissenschaftliche Fragestellung, aktuelle Fußballergebnisse oder persönliche Angelegenheiten handelte, er hatte immer ein offenes Ohr für mich. Ohne ihn wären die regelmäßigen Penne all'arrabbiata zu bester italienischer Mittagszeit oder das gelegentliche Gläschen Montepulciano d'Abruzzo zu Feierabend bei Weitem nicht dasselbe gewesen, von der „Italo Disco“ ganz zu schweigen.
- Dr. rer. nat. Janina Roth, die mich über die organisatorischen Abläufe im Rahmen unserer Promotionen auf dem Laufenden hielt. Des Weiteren weckte das „Mud Chick“ meine Begeisterung für Langstreckenläufe. Oftmals auch gemeinsam bewältigte Lauf-events wie BraveheartBattle, LimesRun, Tough Mudder oder München Marathon boten mir einen willkommenen Ausgleich zu den überwiegend geistigen Anstrengungen des Laboralltags.
- Thomas Pitsch, der mir des Öfteren mit seinem Spezialwissen in Proteinbiochemie dabei geholfen hat, meine SDS-PAGEs, Westernblots und Zymographien zu optimieren. Zudem war er sich als „gute Seele des Labors“ nie zu schade, Komplikationen in Bestell- oder Liefervorgängen zu korrigieren, verschiedenste Gebrauchsgegenstände zu reparieren und Ordnung zu schaffen, wo immer es notwendig war. Dieses Engagement ermöglichte mir eine fokussiertere Arbeit an meinem Projekt und ebnete so den Weg zu publizierbaren Daten. Wie selbstverständlich übernahm er auch den Großteil der Organisation gemeinsamer Feierlichkeiten und unterhielt uns bei diesen oftmals mit seinem musikalischen Talent.
- Allen wissenschaftlichen Mitarbeitern des ehemaligen Instituts für Klinische Chemie und Biochemie sowie des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, die bei komplexen Experimenten stets ihre Kooperationsbereitschaft gezeigt haben. Außerdem möchte ich die mit ihnen verbundenen schönen Erinnerungen an Doktorandenseminare, Winter Schools in Tiers, Fußballspiele, Doktorfeiern und Feuerzangenbowlen auf unserem altherwürdigem Laborgang sowie gemeinsame Besuche von Wiesn und Nockherberg nicht missen.

- Meinen Eltern Marianne und Helmut Mahl, die mir in so ziemlich allen Lebenslagen den Rücken frei hielten, damit ich mich voll auf die Promotion konzentrieren konnte. Ob es nun ein schmackhaftes Abendessen, die liebevolle Pflege im Krankheitsfall oder Lösungsvorschläge für ein zwischenmenschliches Problem waren, auf meine Mutter konnte ich immer zählen. Es ist für mich auch schwer vorstellbar, dass die erzielten Leistungen ohne den finanziellen Rückhalt meines Vaters möglich gewesen wären. Ihren unschätzbaren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit werde ich niemals vergessen.
- Meiner Schwester Annika Schott sowie meinen Freunden Mareike Forthmann und Matthias Konrad, die mich bei Spieleabenden und DSA-Sessions zeitweise die Gedanken an fehlgeschlagene Experimente vergessen ließen und niemals ihr Lächeln verloren, wenn ich mir mal wieder in ihrer Gegenwart den Frust von der Seele redete.
- Meiner Freundin Christine Pichler, die mich auf die ausgeschriebene Doktorandenstelle aufmerksam gemacht hatte und mich durch viele Höhen und Tiefen dieser Promotion begleitete. Ihr Zuspruch half mir in schwierigen Momenten, durchzuhalten und in meine Stärken zu vertrauen.
- Meinen Sensei Hildegard Pfaff, Volker Daiminger und Elvira Daiminger sowie allen anderen Karateka, die mir in der Sportschule/Akademie MiChi die Möglichkeit gaben, das Gleichgewicht zwischen Körper, Seele und Geist zu halten.
- Den „AAAs“, die mir seit vielen Jahren kameradschaftlich verbunden sind und mit denen ich denkwürdige Ausflüge in den bayerischen Wald erleben durfte. Sie erinnerten mich daran, dass es im Leben um etwas mehr als nur um die Erfüllung von Pflichten geht.

