

# Molekulare Analysen zur Knochenregeneration im Alter und bei Osteoporose

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität

Würzburg



vorgelegt von

**Peggy Benisch**

geboren in Zeitz

Würzburg, 2011

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Franz Jakob

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Würzburg, 04.03.2011

.....

Peggy Benisch

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary.....	2
3	Einleitung.....	3
3.1	Knochenhomöostase.....	3
3.1.1	Knochenumbau .....	4
3.1.1.1	Knochenabbau.....	4
3.1.1.2	Knochenaufbau.....	5
3.1.2	Quelle der Regeneration: Mesenchymale Stammzellen (MSC) .....	7
3.1.3	Steuerung des Knochenumbaus.....	8
3.1.3.1	WNT-Signalweg .....	8
3.1.3.2	BMP-Signalweg.....	9
3.1.3.3	Wachstumsfaktoren .....	10
3.1.3.4	Mechanotransduktion .....	12
3.1.3.5	Hormonelle Steuerung .....	13
3.2	Alterung.....	15
3.2.1	Alterung des Organismus .....	15
3.2.2	Zelluläre Seneszenz .....	15
3.2.3	Ursachen für Alterung .....	17
3.2.3.1	Telomere .....	17
3.2.3.2	DNA- Reparatur .....	17
3.2.3.3	Oxidativer Stress.....	18
3.2.3.4	Proliferationsstress und Mitogene.....	18
3.2.3.5	Epigenetik.....	19
3.2.3.6	Genetische Prädisposition.....	20
3.2.4	Immunseneszenz .....	20
3.2.5	Auswirkung der Alterung auf Knochenhomöostase.....	22
3.2.5.1	Auswirkungen der Alterung auf MSC .....	22
3.3	Osteoporose .....	24
3.3.1	Gestörte Knochenhomöostase bei Osteoporose .....	24
3.3.2	Ursachen für Osteoporose .....	24
3.3.2.1	Alterung.....	24
3.3.2.2	Veränderungen im Hormonspiegel .....	24
3.3.2.3	Verhalten .....	25
3.3.2.4	Genetik .....	25
3.3.3	MSC und Osteoporose.....	26
3.4	Ziel der Arbeit .....	26
4	Material und Methoden .....	27
4.1	Material .....	27
4.1.1	Geräte.....	27
4.1.2	Verbrauchsmaterial .....	28
4.1.3	Chemikalien/ Reagenzien .....	28
4.1.4	Kits .....	30
4.1.5	Primer .....	31
4.1.5.1	Primer für semi-quantitative PCR.....	31
4.1.5.2	Sequenzierungsprimer .....	33

4.1.6	Enzyme .....	33
4.1.7	Antikörper.....	33
4.1.7.1	Primärantikörper .....	33
4.1.7.2	Sekundärantikörper.....	34
4.1.8	Proteine .....	34
4.1.9	Kompetente Bakterien .....	34
4.1.10	Vektoren.....	35
4.1.11	Software und Internet-Seiten.....	35
4.1.1	Lösungen für Molekularbiologie und Proteinbiochemie.....	36
4.1.2	Bakteriennährmedien/-nährboden .....	39
4.1.3	Zellkulturmedien .....	39
4.2	Methoden.....	40
4.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	40
4.2.1.1	Isolation von zellulärer RNA .....	40
4.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	40
4.2.1.3	Reverse Transkription.....	40
4.2.1.4	Semi-quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	41
4.2.1.5	Agarosegelelektrophorese .....	42
4.2.1.6	Densitometrie.....	42
4.2.1.7	Agarosegel-Eluation.....	42
4.2.1.8	DNA-Sequenzierung .....	43
4.2.1.9	Methoden der Klonierung von DNA-Sequenzen .....	44
4.2.1.10	Klonierung für die Expression von SAA1 und SAA2.....	45
4.2.1.11	Präparation von Plasmid-DNA.....	46
4.2.2	Zellbiologische Methoden .....	47
4.2.2.1	Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC).....	47
4.2.2.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	47
4.2.2.3	Bestimmung der Zellzahl und Berechnung der Populationsverdopplung.....	48
4.2.2.4	In vitro-Alterung von hMSC.....	48
4.2.2.5	Kryokonservierung von hMSC-TERT .....	48
4.2.2.6	Osteogene Differenzierung von hMSC und hMSC-TERT .....	48
4.2.2.7	Applikation von rekombinantem, humanem SAA1 in der Zellkultur .....	49
4.2.2.8	Stabile Transfektion von hMSC-TERT .....	49
4.2.3	Protein-biochemische Methoden.....	49
4.2.3.1	Isolation von zellulärem Protein.....	49
4.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	49
4.2.3.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	50
4.2.3.4	Western-Blot .....	51
4.2.3.5	Messung der Seneszenz-assoziierten $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität .....	51
4.2.4	Cytochemische Färbungen .....	52
4.2.4.1	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidase-Färbung.....	52
4.2.4.2	Alizarin Rot S-Färbung .....	52
4.2.5	Immuncytochemische Färbungen .....	52
4.2.6	Mikroarray-Analysen .....	53
4.2.6.1	Microchip-Hybridisierung.....	53
4.2.6.2	Statistische Auswertung von Mikroarray-Daten .....	54
5	Ergebnisse.....	55
5.1	Mikroarray-Analysen .....	55
5.1.1	Aufarbeitung der Mikroarray-Daten .....	55
5.1.2	Mikroarray-Analysen von in-vivo-gealterten hMSC.....	56
5.1.2.1	Differentielle Genexpression in in-vivo-gealterten hMSC.....	56

5.1.2.2	Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat .....	57
5.1.2.3	Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur in-vivo-Alterung .....	58
5.1.3	Mikroarray-Analysen von seneszenten hMSC .....	60
5.1.3.1	Differentielle Genexpression in seneszenten hMSC .....	60
5.1.3.2	Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat .....	61
5.1.3.3	Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur Seneszenz .....	62
5.1.4	Mikroarray-Analysen von Osteoporotischen hMSC .....	65
5.1.4.1	Differentielle Genexpression in hMSC-OP .....	65
5.1.4.2	Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat .....	65
5.1.4.3	Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur Osteoporose .....	66
5.1.5	Vergleich in-vivo-Alterung, Seneszenz und Osteoporose .....	69
5.1.5.1	Vergleich in-vivo-Alterung und Seneszenz .....	70
5.1.5.2	Vergleich Osteoporose und in-vivo-Alterung .....	74
5.1.5.3	Vergleich Osteoporose mit Seneszenz .....	76
5.2	Kandidatengene der Seneszenz .....	77
5.2.1	Nachweis der Seneszenz in hMSC .....	77
5.2.2	Kandidatengensuche .....	81
5.2.3	A-SAA – Auswirkung auf die Funktion von hMSC .....	83
5.2.3.1	Einfluss von A-SAA auf die Seneszenz .....	83
5.2.3.2	Stimulation mit rhSAA1 während osteogener Differenzierung .....	84
5.2.3.3	Charakterisierung von stabil mit SAA1 bzw. SAA2 transfizierten hMSC-TERT .....	86
5.2.4	HELLS – Expressionsmuster während der in-vitro-Alterung von hMSC .....	89
5.3	Kandidatengene der Osteoporose .....	92
5.3.1	Kandidatengensuche .....	92
5.3.2	Sclerostin – prämatüre Expression in hMSC .....	95
6	Diskussion .....	97
6.1	Systembiologie versus statistische Aufarbeitung der Mikroarray-Daten .....	97
6.2	In-vivo-Alterung .....	98
6.2.1	In-vivo-Alterung verändert das Genexpressionsmuster in hMSC .....	98
6.2.1.1	Reproduzierbare Genexpressionsänderungen trotz Spendervariabilität .....	98
6.2.1.2	Eingeschränkte Funktion von in-vivo-gealterten hMSC .....	99
6.3	Seneszenz .....	100
6.3.1	In-vitro-Alterung von hMSC ist ein geeignetes Seneszenz-Modell .....	101
6.3.2	hMSC zeigen in Kultur bereits früh Anzeichen von Seneszenz .....	101
6.3.3	Seneszenz verändert das Genexpressionsmuster in hMSC .....	102
6.3.3.1	Reproduzierbare Genexpressionsänderungen .....	103
6.3.3.2	Eingeschränkte Funktion von seneszenten hMSC .....	103
6.3.4	Seneszenz versus Alterung .....	105
6.3.4.1	Wenige Überlappungen im differentiellen Genexpressionsmuster .....	105
6.3.4.2	Ähnliche Störungen trotz unterschiedlicher Genexpressionsmuster .....	106
6.4	Osteoporose .....	107
6.4.1	Das Transkriptom osteoporotischer hMSC ist verändert .....	107
6.4.1.1	Reproduzierbare Genexpressionsänderungen trotz Spendervariabilität .....	107
6.4.1.2	Die Änderungen im Genexpressionsmuster sind different von Spendern gleichen Alters ohne Osteoporose .....	108
6.4.2	hMSC-OP zeigen Anzeichen von Seneszenz .....	110
6.5	Mittels Mikroarray-Analysen ermittelte Kandidatengene .....	111
6.5.1	A-SAA – Mineralisierungsförderer und Marker für Stress .....	111
6.5.1.1	Erhöhte A-SAA-Expression: Seneszenz versus Krebs .....	111

6.5.1.2	A-SAA fördert die Mineralisierung .....	112
6.5.1.3	Stress stimuliert Expression von A-SAA und Metalloproteinasen.....	113
6.5.2	HELLS – Verlust der Genexpression als neuer Marker für Seneszenz .....	114
6.5.3	SOST – ein Marker für Osteoporose in hMSC.....	115
6.6	Zusammenfassung Diskussion.....	117
6.7	Ausblick.....	118
7	Literaturverzeichnis.....	120
8	Anhang.....	140
8.1	Zusatzmaterial .....	140
8.1.1	SAM-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression .....	140
8.1.1	GOstat-Analysen.....	156
8.1.1	Ranglisten .....	178
8.2	Abkürzungen.....	189
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	191
8.4	Tabellenverzeichnis .....	192
8.5	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
8.6	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge .....	193
8.7	Danksagung .....	195

## 1 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) stellen die Grundlage der Knochenformation dar, indem sie als multipotente Zellen in viele, für die Knochenhomöostase benötigte Zelltypen differenzieren können, wie z.B. Osteoblasten. Während der Alterung des Menschen kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau, resultierend in einer verringerten Knochenmasse. Noch ist unklar, ob MSC an dem verminderten Knochenaufbau direkt beteiligt sind, indem sie z.B. im Laufe der Zeit Funktionsstörungen akkumulieren oder in die Seneszenz eintreten, und somit nicht mehr als Stammzellpool für die Osteoblastendifferenzierung zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Genexpressionsmuster gealterter Zellen mittels Mikroarray-Analysen untersucht, um die Alters-bedingten Veränderungen detektieren zu können. Hierfür wurde ein *in-vitro*-Alterungsmodell von humanen MSC (hMSC) etabliert, um die seneszenten Zellen mit hMSC früher Kultivierungspassagen zu vergleichen. Auch Zellen aus Spendern hohen Alters wurden untersucht, um einen Vergleich zwischen *ex-vivo*- und *in-vitro*-gealterten hMSC anstellen zu können. Da Osteoporose eine polygenetische Erkrankung des gealterten Knochens darstellt, wurden auch mit hMSC aus Osteoporose-Patienten Genexpressionsanalysen durchgeführt.

Die Mikroarray-Analysen und anschließende systembiologische Auswertung zeigten, dass *in-vitro*-gealterte, senescente hMSC starke Veränderungen im Transkriptom aufweisen, die auf Defizite in der Proliferation, Differenzierungskapazität und Migration schließen lassen. Neben bekannten Markern für replikative Seneszenz konnten in hMSC auch neue detektiert werden, wie z.B. *HELLS*, *POU5F1* (*OCT4*) und *FGFR2*, deren Expression mit der Seneszenz abnimmt, oder *CDH1* und *PSG5*, deren Expression zunimmt. Gene für Akute-Phase-SAA wurden stark erhöht exprimiert vorgefunden. Bei der funktionellen Charakterisierung konnte jedoch gezeigt werden, dass *SAA1* und *SAA1* durch Stress induziert werden, der der Seneszenz vorausgeht, und dass sie die Mineralisierung bei der osteogenen Differenzierung von hMSC fördern. Akute-Phase-SAA könnten somit eine Verbindung zwischen Alterung bzw. Inflammation und extra-skelettaler Verkalkung darstellen, die im Alter häufig auftritt, z.B. in Form von Arteriosklerose.

*In-vivo*-gealterte hMSC wiesen ebenfalls Defizite im Expressionsmuster von Proliferations- und Migrations-relevanten Genen auf. Des Weiteren konnten nur wenige Gemeinsamkeiten zwischen *in-vivo*-gealterten hMSC und *in-vitro*-gealterten hMSC festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die *in-vivo*-Alterung nicht zwangsläufig zu seneszenten Stammzellen führt, da Alterung eines Organismus ein multizellulärer Prozess ist, der durch viele Faktoren beeinflusst wird, wie z.B. Akkumulation von Mutationen und Krebsabwehr. Auch osteoporotische hMSC wiesen Veränderungen im Genexpressionsmuster auf, die mit den Daten zur *in-vivo*-Alterung verglichen wurden, um die rein Alters-assoziierten Änderungen herausfiltern zu können. Die übrig gebliebenen Gene repräsentierten Veränderungen allein aufgrund der Krankheit. Osteoporose bewirkte somit distinkte Genexpressions-änderungen in hMSC, die auf Förderung der Osteoklastogenese und Defizite in Proliferation, Migration und Differenzierungskapazität schließen lassen. Es konnten vielversprechende Kandidatengene für osteoporotische hMSC gefunden werden. Die prämatüre Expression des WNT-Inhibitors *SOST* (Sclerostin) und die Überexpression des BMP-Signalweg-Inhibitors *MAB21L2* deuten auf eine Autoinhibition der Stammzellen hin, die letztlich die gestörte Knochenformation bei Alters-assoziiierter Osteoporose begründen könnte.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass intrinsische Defizite von Stammzellen an der Pathophysiologie von Alterung und Osteoporose beteiligt sind. Sie eröffnet tiefgreifende Einblicke in die systembiologischen Veränderungen in Stammzellen aufgrund von Alterung oder Osteoporose, und setzt somit einen soliden Grundstein für weiterführende Analysen.



## 2 Summary

---

Mesenchymal stem cells (MSC) represent the basis of bone formation, because as multipotent cells they can differentiate into many cell types important for bone homeostasis, e.g. osteoblasts. During aging an imbalance between bone formation and bone resorption occurs, which results in reduced bone mass. It is still unclear whether MSC biology is directly involved in reduced bone formation, e.g. by accumulating malfunctions in aged organisms or by entering replicative senescence. Thereby they would no longer function as a regenerative source for osteogenesis.

In this study, the gene expression pattern of aged human MSC (hMSC) was analyzed by microarray hybridizations to determine aging-associated changes in those cells. Therefore, a model for *in vitro* aging was established and the gene expression pattern of senescent hMSC was compared with the pattern of hMSC in early passages. Moreover, cells isolated from patients of old age were analyzed to perform a comparison between *ex-vivo* and *in vivo* aging. Human MSC of patients diagnosed with osteoporosis were also examined because osteoporosis is a polygenetic disease of aged bone.

Systems biology based interpretation of the microarray data revealed changes on the mRNA level in *in vitro* aged hMSC that indicate deficits in proliferation, differentiation capacity and migration. Additionally to known markers of replicative senescence in hMSC, new markers were detected, e.g. reduced expression of *HELLS*, *POU5F1* (OCT4), and *FGFR2*, as well as higher expression of *CDH1* and *PSG5*. Furthermore, genes for acute phase SAA proteins showed extremely high expression in senescent hMSC. Functional characterization of *SAA1* and *SAA2* revealed that the expression is rather a consequence of stress that precedes senescence than of replicative senescence itself. SAA also increases mineralization of osteogenic differentiated hMSC and could therefore be involved in age- or inflammation-associated extraskeletal calcification, e.g. arteriosclerosis.

*In vivo* aged hMSC also showed deficiency in proliferation and migration on mRNA level. Furthermore on the gene expression level, *in vivo* aged and *in vitro* aged hMSC shared only few similarities. Those findings suggest that *in vivo* aging does not necessarily result in senescent stem cells, because the aging of an organism is a multicellular process, which is influenced by many other factors, e.g. accumulation of mutations and tumor defense.

Osteoporotic hMSC also showed changes in their gene expression pattern. By comparing those data with the results of hMSC from age-matched patients, age-associated changes could be eliminated. All remaining genes with differential expression represented osteoporosis-related changes that indicated deficiencies in proliferation, migration and differentiation capacity. There were hints for enhancement of osteoclastogenesis by osteoporotic hMSC and promising candidates for osteoporosis with respect to inhibition of osteogenesis were detected. *SOST* (sclerostin) acts as an inhibitor for WNT signaling and *MAB21L2* as an inhibitor for BMP signaling. Both genes were expressed to a higher extent in osteoporotic hMSC, which indicates autoinhibition of the stem cells and could lead to the reduced bone formation in osteoporosis.

In summary, this study indicates that intrinsic alterations in stem cell biology are involved in the pathophysiology of aging and osteoporosis. It opens up profound insights into changes in systems biology of hMSC due to aging or osteoporosis which provide a broad basis for further analyses.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Knochenhomöostase

Knochengewebe ist eine spezialisierte Form des Bindegewebes. Es besteht hauptsächlich aus einer mineralisierten Matrix, die sich aus miteinander verknüpften Kollagenfasern und Hydroxylapatit (Kalziumphosphatsalz) zusammensetzt. Knochen bildet die Stütze des Körpers und stellt ein Reservoir für Kalzium und Phosphat, sowie einen Ort für die Hämatopoese dar. Die Röhrenknochen des Erwachsenen sind Lamellenknochen und setzen sich aus zwei Schichten zusammen: der äußeren, kompakten Schicht *Substantia compacta* und einer inneren Schicht, die aus schwammartig aufgebauten Knochenbälkchen und dem Knochenmark besteht, die *Substantia spongiosa*. Die Knochenbälkchen und das Innere des Knochens sind von einer dünnen Bindegewebsschicht umgeben, dem Endosteum. Den äußeren Knochen hüllt das dickere Periost ein. Die Untereinheiten der knöchernen Bestandteile des Lamellenknochens sind die Osteone, dicke Lamellen parallel zur Längsachse des Knochens, die sich aus konzentrischen Schichten um einen zentralen Kanal zusammensetzen (Abb. 1). Dieser Kanal, auch Havers-Kanal genannt, enthält Nervenzellen und Blutgefäße. Im Durchschnitt bestehen Osteone aus 6-7 Schichten. Diese sind ca. 4 mm lang und 200 mm breit.

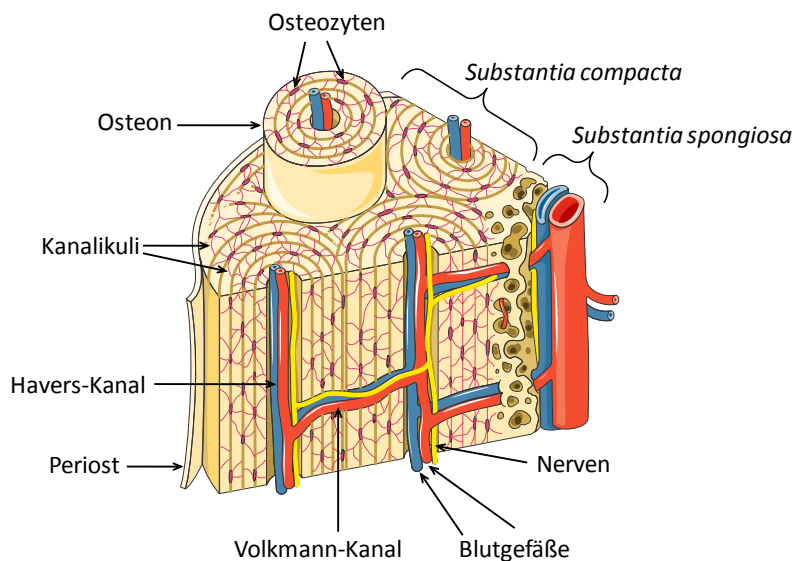


Abb. 1 Aufbau des Lamellenknochens nach (Bartl 2008) und (Robling and Stout 1999)

Die Osteone stehen untereinander und mit dem Endost, dem Knochenmark und dem Periost über weitere Kanäle (Volkmann-Kanäle) in Verbindung, durch die auch der Austausch von endokrinen Faktoren und Signalmolekülen erfolgt. Die Osteone stellen jene Einheit des Knochens dar, an der die knochenrelevanten Zellen den Knochenumbau durchführen. Zu den Knochenzellen gehören zum einen die Osteozyten, die sich in den konzentrischen Schichten der Osteone direkt in der Knochenmatrix befinden. Sie sind dort in Lakunen lokalisiert, und über Gap Junctions ihrer in Kanalikuli verlaufenden, dendritenartigen Ausläufer stehen sie untereinander in Kontakt. Die Kanalikuli sind auch mit den Kanälen des Osteoms verbunden, wodurch die Kommunikation der Zellen mit den restlichen Knochenzellen ermöglicht wird (Noble 2008). Die nicht proliferierenden Osteozyten entstehen aus Osteoblasten, die wiederum über Präosteoblasten aus Mesenchymalen Stammzellen (siehe 3.1.2) differenzieren. Die Osteoblasten bauen den Knochen durch Sezernierung von Matrixproteinen auf, die letztendlich mineralisieren. Die Matrix wiederum ist von sogenannten

„Lining-cells“ umgeben, ebenfalls terminal differenzierte Osteoblasten, die nicht am Aufbau der Matrix beteiligt sind und deren Funktion zum Teil noch unbekannt ist. Ein letzter wichtiger Zelltyp des Knochens sind die Osteoklasten, Zellen aus der hämatopoetischen Reihe, die mineralisierte Knochenmatrix abbauen können (Junqueira et al. 2002; Clarke 2008).

### 3.1.1 Knochenumbau

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das ein Leben lang kontinuierlich resorbiert und erneut geformt wird. Diese Umbauten des Knochens werden angeregt durch mechanische Beanspruchung, zur Regulation des extrazellulären Kalzium- und Phosphatlevels und als Antwort auf parakrine und autokrine Faktoren, sowie hormonelle Veränderungen. Abgesehen von der Kindheit – in der die Ossifikation erst abgeschlossen wird –, im Alter oder bei Defekten im Knochenmetabolismus ist das Verhältnis von Knochenabbau zu Knochenaufbau im Gleichgewicht, es liegt eine Homöostase vor. Neben den knochenbildenden Osteoblasten, den knochenresorbierenden Osteoklasten und den in der Matrix verankerten Osteozyten spielen weitere Zellen des Knochenmarks, wie z.B. T-Lymphozyten, B-Zellen und Erythrozyten, sowie neurale Zellen bei diesen Umbauvorgängen eine Rolle (Sims and Gooi 2008).

#### 3.1.1.1 Knochenabbau

Der Knochenabbau wird von Osteoklasten durchgeführt und dauert in einem Osteon von Beginn bis Ende ca. 2-3 Wochen (Harada and Rodan 2003). Osteoklasten bilden sich aus mononukleären, hämatopoetischen Stammzellen, indem sie zu multinukleären Zellen fusionieren. Nach einem Resorption fördernden Stimulus (siehe 3.1.3) werden die Stammzellen über chemische Lockstoffe, die von Osteoblasten, „Lining-cells“, Osteozyten oder der Knochenmatrix sezerniert werden, an den betroffenen Bereich des Knochens rekrutiert (Abb. 2). Zu den Chemoattraktanten zählen Osteocalcin/BGLAP (bone gamma-carboxyglutamate protein), AHSG (alpha-2-HS-glycoprotein), Sphingosin-1-Phosphat und Kollagen Typ 1-Fragmente (Malone et al. 1982; Pederson et al. 2008; Ishii et al. 2009). Die Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen wird über den von Osteoblasten sezernierten Faktor CSF1 (colony stimulating factor 1) angeregt (Sims and Gooi 2008).

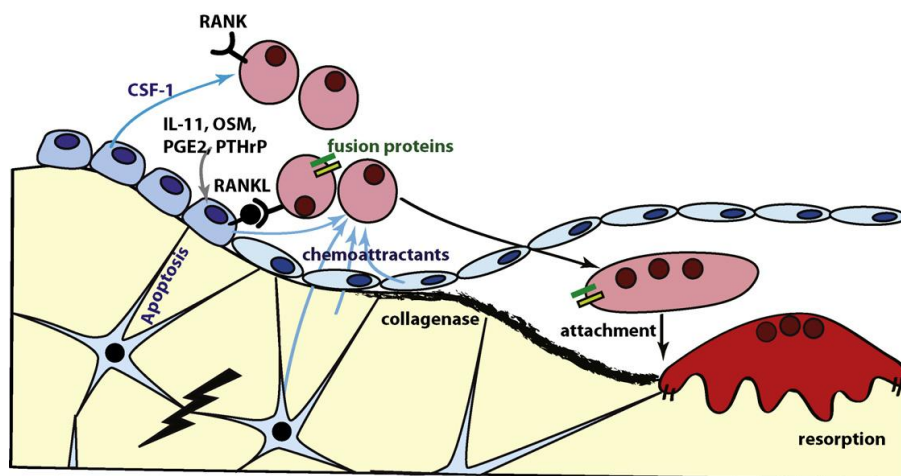


Abb. 2 Induktion der Osteoklastogenese. Zellen der Osteoblasten-Linie sind in Blautönen gehalten, wobei abgeflachte Zellen „Lining-cells“ und in der Knochenmatrix verankerte Zellen Osteozyten darstellen. Hämatopoetische Vorläuferzellen sind in Rosa dargestellt, und ausgereifte Osteoklasten in Rot. (Sims and Gooi 2008)

Die Fusion der hämatopoetischen Stammzellen wird ebenfalls von Osteoblasten gesteuert. Sezernierte Faktoren der Osteozyten und anderer umliegender Zellen – z.B. Immunzellen – führen zur Expression des membrangebundenen RANKL/TNFSF11 (tumor necrosis factor superfamily, member 11, ligand) auf Osteoblasten. Zu diesen Faktoren zählen z.B. Il11 (interleukin 11), Prostaglandin E2, PTHLH/PTHrP (parathyroid hormone-like hormone) und Oncostatin M (kodiert von *OMS*). RANKL ist ein Ligand für den membrangebundenen Rezeptor RANK/TNFRSF11A (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFκB activator) der Osteoklasten und der Schlüsselfaktor für die Einleitung der Fusion von Vorläuferzellen zu mehrkernigen Osteoklasten. Die RANK/RANKL-Interaktion induziert in den hämatopoetischen Vorläuferzellen die Expression von membranständigen Fusionsproteinen, wie z.B. ATP6V0D2 (ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2), DCSTAMP (DC-specific transmembrane protein) oder DAP12 (DNAX adaptor protein 12) (Horwood et al. 1998; Palmqvist et al. 2002; Sims and Gooi 2008).

Osteoblasten produzieren einen weiteren RANKL-Rezeptor, das lösliche OPG/ TNFRSF11B (osteoprotegerin/ tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b). Die Bindung von RANKL an OPG führt zu keiner Aktivierung eines Signalweges, sondern dient dazu, die Bindung von RANKL an RANK zu blockieren und damit die Bildung multinukleärer Osteoklasten zu verhindern. Durch Regulation des Verhältnisses von RANKL zu OPG können die Osteoblasten die Osteoklastogenese, und damit letztendlich die Knochenmasse präzise regulieren (Simonet et al. 1997).

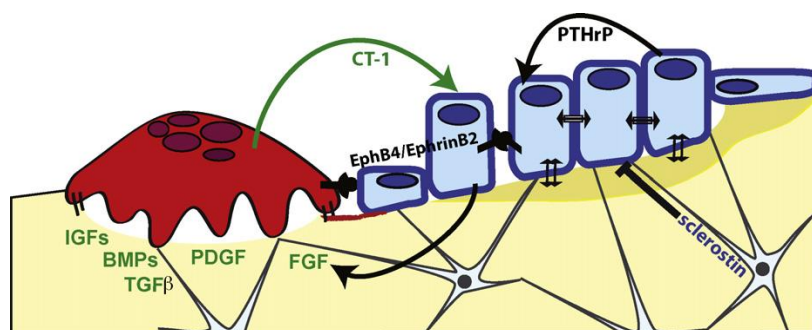
Der lokale Knochenumbau findet in sogenannten, temporären Knochenumbaukammern statt, die von „Lining-cells“ gebildet werden. Es wird angenommen, dass diese Zellen auf Grund der Resorption einleitenden Faktoren dazu angeregt werden, Kollagenase frei zu setzen. Dieses Enzym zerstört die nicht-mineralisierte Matrix (Osteoid), die der mineralisierten Matrix aufliegt. Anschließend lösen sich die „Lining-cells“ als geschlossene Schicht von der Matrix ab und bilden eine Kammer (Abb. 2) (Sims and Gooi 2008). Es wird angenommen, dass Vorläuferzellen von Osteoblasten und Osteoklasten über den Blutkreislauf durch Mikrogefäße in diese Knochenumbaukammern transportiert werden, damit der Knochenumbau stattfinden kann (Matsuo 2009).

Die Osteoklasten haften auf der Matrix mittels Integrinen, die mit Osteopontin (codiert vom Gen *OSP1*; secreted phosphoprotein 1) und IBSP (integrin-binding sialoprotein) interagieren. Beide Faktoren wurden im vorangegangenen Knochenaufbau-Zyklus von Osteoblasten in der Matrix hinterlassen (Ross and Teitelbaum 2005). Die Osteoklasten bewegen sich mittels Podosomen fort und sezernieren Salzsäure für die Zerstörung des Hydroxylapatids der Matrix und Hydrolasen für den Verdau von Kollagen und anderen Matrixproteinen. Die dabei anfallenden Abbauprodukte werden von den Osteoklasten phagozytiert. Wenn die Resorption beendet ist, werden die Zellen apoptotisch und lösen sich von der Matrix ab (Sims and Gooi 2008).

### 3.1.1.2 Knochenaufbau

Die anschließende Knochenbildung benötigt deutlich mehr Zeit als die Resorption: ca. 3 Monate (Harada and Rodan 2003). Eingeleitet wird sie von den Faktoren, die beim Verdau der Matrix durch Osteoklasten freigesetzt wurden. Diese Faktoren sind u.a. IGF1 (insulin-like growth factor 1), FGF2 (fibroblast growth factor 2), TGFB1 (transforming growth factor, beta 1), BMP2, 3, 4, 6 und 7 (bone morphogenetic protein), S1P (sphingosine 1-phosphate) und PDGF (platelet-derived growth factor). Sie dienen zur Rekrutierung von Mesenchymalen Stammzellen (siehe 3.1.2) und deren Differenzierung zu Osteoblasten (Ozaki et al. 2007; Ponte et al. 2007; Habisch et al. 2008; Pederson et al. 2008; Sims and Gooi 2008). Osteoklasten sezernierten u.a. den Faktor CT-1 (Cardiotropin 1). Dieser leitet die Differenzierung ein, indem er als Ligand für LIF-Rezeptoren oder GP130 auf Osteoblastenvorläufern wirkt (Abb. 3) (Sims and Gooi 2008).

Die Osteoblasten bilden neues Osteoid durch Sezernierung von COL1A1 (collagen, type I, alpha 1) und COL1A2, Osteopontin, IBSP, sowie des Kalzium-bindenden Proteins Osteocalcin (Blair et al. 2002; Ross and Teitelbaum 2005). Die Proteine COL1A1 und COL1A2 bilden in einem Verhältnis von 2:1 eine Tripelhelix, das Kollagen Typ 1, das sich zu Kollagenfibrillen zusammen lagert (Alberts 2008).



**Abb. 3** Kontrolle des Knochenbaus. In rot ist ein Osteoklast dargestellt, in blau sind Zellen der Osteoblasten-Linie gekennzeichnet, wobei die abgeflachten Zellen „Lining-cells“ darstellen. In Gelb ist die Knochenmatrix mit den darin enthaltenen Osteozyten gehalten, dunkleres Gelb stellt Osteoid dar. Die Osteoblasten stehen über Gap Junctions in Verbindung (Pfeile mit Kästen) und können Gebiete der Knochenresorption wahrnehmen (Doppelpfeile). Von Osteozyten sezerniertes Sclerostin kann die Knochenformation hemmen (siehe 3.1.3.1). (Sims and Gooi 2008)

Ein membrangebundener Faktor der Osteoklasten, EFNB2 (ephrin-B2) führt nach Bindung an den osteoblastären Rezeptor EPHB4 (EPH receptor B4) ebenfalls zu Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung (Abb. 3). Die Bindung von Ligand an den Rezeptor löst jedoch auch in Osteoklasten eine Reaktion aus, die die weitere Differenzierung dieser Zellen, und somit den Knochenabbau stoppt. Unter bestimmten Bedingungen – stimuliert durch den parakrinen Faktor PTHLH (siehe 3.1.3.5.1) – exprimieren Osteoblasten den Liganden EFNB2 selbst (Abb. 3). Eine Blockade der EFNB2-EPHB4-Interaktion in Osteoblasten führt *in-vitro* zu verminderter Mineralisierung (Zhao et al. 2006; Allan et al. 2008).

Auch die Kommunikation der Osteoblasten untereinander ist notwendig für die Knochenformation, daher stehen die Zellen während der Matrixbildung über Gap Junctions in Verbindung (Abb. 3) (Sims and Gooi 2008).

Wenn die Sezernierung von Osteoid allmählich nachlässt, bilden die Osteoblasten durch polarisierte Knospung Matrixvesikel aus, mit deren Hilfe die Mineralisierung stattfindet. Diese Vesikel enthalten u.a. CA (carbonic anhydrase), Lipide mit hoher Affinität zu Kalzium und an der Membran verankertes TNSALP (tissue non-specific alkaline phosphatase). Über spezialisierte Transporter in der Membran gelangen Kalzium- und Phosphat in die Vesikel und formen dort Hydroxylapatit, das anschließend wieder in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Kalziumbindende Proteine wie ISBP unterstützen diesen Transport (Orimo 2010). Für die Bildung von Hydroxylapatit ist das Verhältnis von Phosphat (Pi) zu Pyrophosphat (PPi) entscheidend. PPi blockiert die Bildung von Hydroxylapatit, kann aber durch TNSALP (kodiert von *ALPL*) unter Entstehung von Pi hydrolysiert werden (Terkeltaub 2001; Addison et al. 2007). *TNSALP*<sup>-/-</sup> Mäuse weisen eine skelettale Hypomineralisierung auf und untermauern die Bedeutung dieses Enzyms für die Aushärtung der Knochenmatrix (Narisawa et al. 1997). Die Expression von TNSALP wird durch CSF3/G-CSF (granulocyte colony stimulating factor 3), Retinsäure und Vitamin D3 gefördert (Orimo 2010).

Nachdem die Osteoblasten den Kochenaufbau beendet haben, können sie zu inaktiven „Lining-cells“ oder aber Osteozyten differenzieren.

Die während der Mineralisierung in die Matrix eingeschlossenen Osteozyten regulieren die Knochenformation ebenfalls aktiv, indem sie das Protein Sclerostin (kodiert von *SOST*) sezernieren, das über die Kanalikuli an die Knochenoberfläche gelangt. Über die Inhibition des WNT- und/oder des BMP-Signalweges (siehe 3.1.3 und 3.1.3.2) inhibiert Sclerostin die Proliferation von Präosteoblasten, sowie die Mineralisierung und fördert die Apoptose von Osteoblasten (ten Dijke et al. 2008; Galli et al. 2010). Auf diese Art wird durch die Osteozyten der Kochenaufbau gestoppt. Funktionseinschränkende Mutationen in *SOST* wurden in der Van Buchems Krankheit und bei Sklerosteose entdeckt. Beide Krankheiten sind durch hohe Knochendichte gekennzeichnet, die aufgrund des Fehlens von funktionellem Sclerostin auf einer erhöhten Anzahl an aktiven Osteoblasten beruht (Sims and Gooi 2008; ten Dijke et al. 2008). Sklerosteose ist die schwerwiegendere der beiden Krankheiten.

### 3.1.2 Quelle der Regeneration: Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Stammzellen des adulten Organismus dienen dem Zweck, kontinuierlich reife, funktionstüchtige Zellen für Gewebeumbau und Geweberegeneration zur Verfügung zu stellen, um die Funktion der Organe aufrecht zu erhalten.

MSC sind adulte, multipotente Stammzellen, die hauptsächlich aus dem Knochenmark, aber auch aus Nabelschnurblut, Bindegewebe, Fettgewebe, synovialen Flüssigkeiten, Plazenta und Zähnen isoliert werden können (Sethe et al. 2006). Je nach residierendem Gewebe, sind die Zellen mit ähnlichen, aber geringfügig veränderten Eigenschaften ausgestattet; ihre genomische Struktur kann variieren (Jakob et al. 2008; Valtieri and Sorrentino 2008). Wie bei allen Stammzellen wird angenommen, dass MSC die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Der eindeutige Beweis ist jedoch noch offen (Kuhn and Tuan 2010). Anders als pluripotente, embryonale Stammzellen können sie – auch abhängig von der Lokalisation im Körper – nur in eine begrenzte Anzahl an Zelltypen differenzieren: Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten, Myoblasten und neuronale Vorläuferzellen (Pittenger et al. 1999; Sethe et al. 2006; Valtieri and Sorrentino 2008). Die Differenzierung wird durch Wachstumsfaktoren, bestimmte Signalwege und Transkriptionsfaktoren reguliert, und kann zumindest für die osteogene, adipogene, chondrogene, myogene und neurale Richtung *in-vitro* nachgestellt werden (Chamberlain et al. 2007; Valtieri and Sorrentino 2008). Für die Differenzierung in die osteogene Richtung sind z.B. die Transkriptionsfaktoren RUNX2 (runt-related transcription factor 2), DLX5 (distal-less homeobox 5) und Osterix/SP7 (Sp7 transcription factor) entscheidend (Karsenty and Wagner 2002; Nakashima et al. 2002).

Wie Stammzellen den Weg der Differenzierung einschlagen, wird mehr und mehr auch mit dem Mechanismus der RNA-Interferenz (siehe 3.2.3.5) in Zusammenhang gebracht. Es häufen sich Hinweise darauf, dass verschiedene Stammzelltypen – darunter auch MSC – ihren Stammzellcharakter und ihre Plastizität mittels microRNA (miRNA) aufrechterhalten. Differenzierte MSC weisen ein anderes Muster an miRNAs auf als nicht-differenzierte Vorläuferzellen (Valtieri and Sorrentino 2008)

Adulte Stammzellen werden nach den neuesten Befunden als quieszente Zellen mit sehr geringer Proliferationsaktivität beschrieben, die in geringer Anzahl in sogenannten Stammzellnischen vorkommen. Stammzellnischen bestehen entweder aus Stammzellen von nur einem Typ (homogen) oder mehrerer, unterschiedlicher Zelltypen (heterogen), sowie somatischen Zellen. Adulte Stammzellen teilen sich entweder symmetrisch oder asymmetrisch, letzteres führt zu einer gemischten Zellpopulation, da nach der Zellteilung statt zweier Stammzellen nur eine Stammzelle und eine differenzierte Vorläuferzelle entstehen (Fuchs et al. 2004; Jakob et al. 2008). Die Nische der MSC wurde bisher noch nicht identifiziert, es ist nur bekannt, dass MSC zusammen mit Osteoblasten Bestandteile der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark darstellen (Kassem and Abdallah 2008). Zumindest in dieser heterogenen Nische scheinen MSC asymmetrische Teilung durchzuführen. Des Weiteren ist auch unklar, ob sich die MSC-Nischen aus verschiedenen Regionen in Aufbau und Zusammensetzung ähneln. Damit MSC *in-vivo* aus der Quieszenz zur Selbsterneuerung oder zur Differenzierung heraustreten können, sind nicht nur die oben erwähnten intrinsischen Faktoren, sondern auch Extrinsische nötig. Diese stammen u.a. von den somatischen Zellen der Nische und bestehen einerseits aus direkten Zell-Zell-Kontakten und andererseits aus der Sekretion von Wachstums- und anderen löslichen Faktoren, Zytokinen oder Matrixproteinen. Der Zustand der MSC wird jedoch auch von vielen anderen, im Knochenmark residierenden Zellarten beeinflusst, darunter auch von Osteoblasten (Kuhn and Tuan 2010).

Telomerase-Aktivität – ebenfalls ein Zeichen für Stemness – konnte in den meisten Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, bleibt aber dennoch umstritten. Eine Publikation postuliert, dass humane MSC positiv für STRO1<sup>bright</sup>VCAM+ aktive Telomerase aufweisen (Gronthos et al. 2003). Es wird jedoch angenommen, dass nur eine primitive Subpopulation an hMSC Telomerase *in-vivo* exprimiert. Nach Isolierung und Kultivierung von hMSC verlieren die Zellen Teile ihres Stammzellcharakters und die Telomeraseaktivität wird ausgeschaltet (Sethe et al. 2006; Bellantuono et al. 2009).

MSC können im Falle von Verletzungen und zur Geweberegeneration per Chemotaxis über große Distanzen an den Ort des Geschehens rekrutiert werden. Sie migrieren zu Blutgefäßen und zirkulieren in geringer Anzahl im Blutkreislauf. Dies konnte im Fall von Myokardinfarkten (Zhang et al. 2007) und zur Frakturheilung (Shirley et al. 2005) nachgewiesen werden. Für die Migration wurden bisher verschiedene Mediatoren beschrieben: BMP2 und 4, PDGF, S1P, CYR61 (cysteine-rich, angiogenic inducer, 61) und WISP3 (WNT1 inducible signaling pathway protein 3) (Jakob et al. 2008; Pederson et al. 2008). Die Überwindung der endothelialen Barriere wird u.a. mittels Metallopeptidasen (MMP) und deren Regulatoren mediiert; MMP1 und 14, sowie TIMP2 (TIMP metallopeptidase inhibitor 2) spielen eine entscheidende Rolle (Ries et al. 2007).

Charakteristisch für MSC *in-vitro* sind ihre Plastik-Adhärenz, ihre Fibroblasten-ähnliche Morphologie und die Eigenschaft, Kolonien (CFU, colony forming units) zu bilden, wenn sie vereinzelt ausgesät werden. Diese CFU bestehen einerseits aus schnell proliferierenden, spindelförmigen Zellen (RS-Zellen) und weniger schnell differenzierenden, größeren Zellen (Colter et al. 2001). Einige Oberflächenmarker für MSC, die einzeln jedoch nicht ausschließlich in MSC vorkommen, sind STRO1 (Stromal cell-derived factor-1alpha), CD146/MCAM (melanoma cell adhesion molecule), CD106/VCAM (vascular cell adhesion molecule 1), BMPR1A (bone morphogenetic protein receptor, type 1A) und CD73/NT5E (5'-nucleotidase, ecto). MSC sind auch gekennzeichnet durch das Fehlen von Endothelmarkern, wie z.B. CD35/CR1 (complement component (3b/4b) receptor 1) und hämatopoetischen Markern, wie z.B. CD45/PTPRC (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C) (Sethe et al. 2006; Sacchetti et al. 2007; Valtieri and Sorrentino 2008).

MSC stellen eine vielversprechende Ressource für Zelltherapieansätze dar, da sie multipotent und einfach zu kultivieren sind. Obwohl *in-vitro* ausführlich studiert, ist das Wissen über MSC *in-vivo* jedoch noch immer lückenhaft. Dennoch wurden erfolgreich Heilungsstudien am muskuloskeletären System mit applizierten MSC im Tierversuch (Bruder et al. 1998) durchgeführt und bereits vielfach auf den Menschen übertragen (Panetta et al. 2009). Die Multipotenz der Zellen konnte auch durch Transplantation in Myokardium, Gehirn oder sogar in Föten unter Beweis gestellt werden. Die Zellen differenzierten zu Muskelzellen, Nervenzellen bzw. einer Vielzahl von mesenchymalen Zellen im Falle der fötalen Applikation (Chamberlain et al. 2007). Für die Weiterführung und Weiterentwicklung von Zelltherapiemaßnahmen im Menschen stellt sich jedoch die Frage, ob das Alter der Zellen bzw. des spendenden Patienten einen negativen Einfluss auf den Erfolg der Transplantation und die Differenzierungskapazität nehmen kann.

### 3.1.3 Steuerung des Knochenbaus

#### 3.1.3.1 WNT-Signalweg

Für die Knochenformation ist das Signalisieren über den kanonischen WNT-Signalweg von entscheidender Bedeutung. WNT (wingless-type MMTV integration site family) sind eine Familie von sezernierten Glykoproteinen, die über Bindung an die Transmembranrezeptoren FZD (frizzled homolog) und anschließender Rekrutierung der transmembranen Corezeptoren LRP5 (low density lipoprotein receptor-related protein 5) oder LRP6 eine Signalkaskade auslösen. Über das Protein DVL (dishevelled) wird der Komplex aus GSK3 (glycogen synthase kinase 3), APC (adenomatous polyposis coli) und Axin in der Zelle aufgelöst, wodurch  $\beta$ -Catenin (von dem Gen *CTNNB1* kodiert) nicht mehr phosphoryliert, und dadurch auch nicht mehr in den Proteasomen degradiert wird. Das hypophosphorylierte  $\beta$ -Catenin wird in den Zellkern transloziert und löst dort unter Komplexbildung mit den Transkriptionsfaktoren TCF (T-cell specific transcription factor) und LEF (lymphoid-enhancer binding factor) die Transkription von Zielgenen – u.a. *ALPL* (Rawadi et al. 2003) – aus (Peters et al. 2008; ten Dijke et al. 2008). Die Bedeutung dieses Signalweges für den Knochen verdeutlicht die knochenspezifische Überexpression von WNT10A, die über Stimulation der Osteoblastogenese zu einer erhöhten Knochenmasse führt (Bennett et al. 2007). Störungen im WNT-Signalweg führen zu reduzierter Knochenmasse, wie beim Osteoporose-Pseudoglioma Syndrom des Menschen, eine

autosomal rezessive Krankheit, bedingt durch heterozygoten Funktionsverlust von LRP5 (Kato et al. 2002).

Der kanonische WNT-Signalweg wird über lösliche Inhibitoren reguliert. WNT als Ligand kann durch WIF1 (WNT inhibitory factor 1) und SFRP (secreted frizzled-related protein) abgefangen werden, wodurch die Bindung an FZD verhindert wird. Sezernierte DKK1 (dickkopf homolog 1) und DKK2 Proteine können an die Corezeptoren LRP5 und 6 binden, wodurch sie den WNT-Signalweg ebenfalls blockieren. Eine Komplexbildung aus DKK, LRP5 oder 6 und dem Transmembranproteinen KRM1 (kremen 1) oder KRM2 wurde ebenfalls als hemmend beschrieben (Piters et al. 2008). Knochenspezifische Überexpression von KRM2 führt im Mausmodell zu schwerer Osteoporose (Schulze et al. 2010). Durch Bindung und Blockierung von LRP5 und LRP6 stellt auch Sclerostin einen Inhibitor des WNT-Signalweges und damit der Knochenformation dar (Li et al. 2005b). Osteocalcin-Promoter getriebene, knochenspezifische Überexpression von *SOST* führte im Mausmodell zu einer reduzierten Knochendichte aufgrund reduzierter Osteoblastenaktivität (Winkler et al. 2003). Sclerostin wurde beschrieben als Inhibitor der Differenzierung von MSC zu Osteoblasten (ten Dijke et al. 2008) und als Störfaktor der Osteoblasten-Aktivität (Winkler et al. 2003). Tiere, die mit einem neutralisierenden Antikörper (Scl-Abl) gegen Sclerostin behandelt wurden, zeigten wiederum einen signifikanten Anstieg der Knochendichte (Veverka et al. 2009).

Es wird angenommen, dass nicht nur der kanonische WNT-Signalweg sondern auch nicht-kanonische WNT-Signalgebung bei der Knochenformation eine Rolle spielt. Dazu gehört zum einen der Kalzium-abhängige WNT-Signalweg, bei dem die Transkription von Zielgenen durch die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium über CAMK2 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase), PKC (protein kinase C) und Calcineurin (*CABIN1*; calcineurin binding protein 1) verläuft. In MSC können auf diesem Weg die Expression von RUNX2 und die gleichzeitige Hemmung der PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)-Expression angeregt werden. Dies führt zur osteogenen, statt adipogenen Differenzierung der Zellen (Takada et al. 2007). Der zweite  $\beta$ -Catenin-unabhängige WNT-Weg führt über DVL zur Coaktivierung der GTPasen RHO und RAC, wodurch der JNK-Signalweg eingeleitet wird. Es wurde gezeigt, dass nicht-kanonisches WNT5A über ERK und AKT die Apoptose von Präosteoblasten und Osteoblasten verhindert (Almeida et al. 2005).

### 3.1.3.2 BMP-Signalweg

BMP sind Mitglieder der TGF $\beta$  (transforming growth factor beta)-Familie und wichtige, autokrine Faktoren für die Osteoblastendifferenzierung und -funktion. Sie binden an die Transmembranrezeptoren BMPR1A, 1B oder 2, die daraufhin Dimere bilden und eine Signalkaskade einleiten (Canalis 2009). Diese Kaskade endet in der Aktivierung von Mitgliedern der SMAD-Familie oder führt zur Einleitung von MAPK-ERK-Signalwegen (Miyazono 1999). Über die Phosphorylierung der SMAD1, 5 und 8 werden diese Proteine in den Zellkern transloziert, bilden Komplexe mit SMAD4 und leiten die Transkription von Zielgenen ein. BMP regen die Expression von TNSALP für die Mineralisierung (Rawadi et al. 2003), aber auch RANKL und CSF1 an, wodurch die Osteoklastogenese eingeleitet wird. Sie fördern ebenfalls die Expression von Osteoprotegerin, wodurch die Osteoklastenbildung kontrolliert wird.

Die Regulation des BMP-Signalweges erfolgt über BMP-bindende, lösliche Antagonisten, deren Synthese über einen Rückkopplungsmechanismus von BMP selbst ausgelöst wird. Zwei dieser Antagonisten, Noggin (*NOG*) und Gremlin (*GREM*) führen bei knochenspezifischer Überexpression zu Osteopenie und hohem Frakturrisiko (Canalis 2009) u.a durch Inhibition der TNSALP-Aktivität (Rawadi et al. 2003). Sclerostin ist ebenfalls ein Antagonist des BMP-Signalweges mit ähnlichen Funktionen, wie Noggin. Es ist umstritten, ob Sclerostin die negativen Veränderungen im Knochenstoffwechsel tatsächlich über den BMP-Signalweg durchführt und nicht ausschließlich über WNT-Hemmung. Das Protein ist ein Antagonist zu BMP, jedoch wurden in einigen Zelltypen keinerlei Auswirkungen auf den BMP-Signalweg registriert. Es konnte gezeigt werden, dass Sclerostin auch eine große Affinität zu Noggin aufweist, und nach Komplexbildung die inhibierende Wirkung auf den BMP-Signalweg aufgehoben wird (Winkler et al. 2004). Einige Arbeitsgruppen vermuten einen



Zusammenhang zwischen BMP-Signalweg und WNT-Signalweg (ten Dijke et al. 2008), vermutlich über eine autokrine Schleife (Rawadi et al. 2003).

### 3.1.3.3 Wachstumsfaktoren

#### 3.1.3.3.1 FGF

FGF (fibroblast growth factors) kontrollieren die Proliferation und Differenzierung von vielen verschiedenen Zelltypen. Bisher sind 23 verschiedene Polypeptide dieser Familie bekannt, wobei FGF2 das am ausführlichsten Charakterisierte ist. FGF können in variierender Affinität und unterstützt durch den Co-Liganden Heparansulfatproteoglykan an 4 verschiedene Rezeptoren binden: FGFR1, 2, 3 oder 4, wobei von den ersten drei Rezeptoren Splicevarianten bekannt sind: IIIb und IIIc. Nach Bindung eines Liganden dimerisieren die membranständigen Rezeptortyrosinkinasen und die Signaltransduktion in der Zelle wird über Autophosphorylierung eingeleitet (Marie et al. 2002). In MSC und Osteoblasten werden nur FGFR1 und 2 exprimiert (Miraoui et al. 2009; Hamidouche et al.). Neueste Befunde zeigen, dass FGFR3 nicht nur eine Rolle bei der Chondrogenese zukommt, sondern ebenfalls in MSC exprimiert wird (Lavery et al. 2009). Ein Knock-down von FGFR2(IIIc) führt in Mäusen zu einer reduzierten Expression von RUNX2 und einer retardierten Ossifikation der Röhrenknochen (Eswarakumar et al. 2002). FGFR2 stellt somit einen bedeutenden Faktor für die Osteoblastenproliferation und der Osteogenese dar. Über FGF18 fördern FGFR1 und FGFR2 auch die Mineralisierung. MSC mit Knock-down in einem der beiden Rezeptoren weisen nach osteogener Differenzierung *in-vitro* geringere Expression von Osteoblastenmarkern auf als die Kontrollzellen (Hamidouche et al. 2010).

Die FGF-medierte Signaltransduktion interagiert mit vielen anderen Wachstumsfaktor-Kaskaden, wie z.B. TGF $\beta$  und IGF. Eine positive Interaktion mit dem BMP-Signalweg ist ebenfalls in Knochenzellen detektiert worden (Marie et al. 2002).

FGF23 stellt eine Besonderheit in der großen Familie der FGF dar, indem es als Hormon agiert, das in Knochen gebildet und zusammen mit dem Rezeptor Klotho den Phosphat- und Kalziumhaushalt des Körpers über die Phosphatrückresorption in der Niere und über den Vitamin D3-Metabolismus reguliert (siehe 3.1.3.5.2 und 3.2.3.6) (Druke and Prie 2007). Durch die Bindung des sekretorischen Proteins Klotho an FGFR1(IIIc) wird dieser in einen spezifischen Rezeptor für FGF23 umwandelt und die Signaltransduktion eingeleitet (Razzaque and Lanske, 2006; Razzaque et al., 2006).

#### 3.1.3.3.2 IGF

IGF1 und 2 (insulin-like growth factors) sind die häufigsten Wachstumsfaktoren im muskuloskelettalen System. Sie signalisieren über transmembrane Rezeptoren: IGF1 dient als Ligand für IGF1R, während IGF2 an die Rezeptoren IGF1R, IGF2R und IRA (insulin receptor alpha) binden kann (Gicquel and Le Bouc 2006). Lokal wird die Verfügbarkeit und Aktivität von IGF1 und 2 durch Bindung an 6 verschiedene IGFBP (insulin-like growth factor binding proteins) reguliert. Die Bindung dient dem Transport der Proteine und verhindert das Andocken an einen IGF-Rezeptor.

Die Inaktivierung von *IGF1*, *IGF2* oder *IGF1R* im Mausmodell führte zu reduzierter Chondrozytenproliferation und -differenzierung. IGF1 spielt jedoch auch im Knochen eine wichtige Rolle, indem es über COL1 die Osteoblastenfunktion und Knochenformation anregt. Des Weiteren stimuliert das Protein die RANKL-Expression, wodurch die Osteoklastogenese gefördert wird. Die IGF1-Expression in Osteoblasten wird durch PTH (parathyroid hormone) angeregt, dient aber in Rückkopplungsreaktionen auch als Regulator des PTH-Katabolismus (siehe 3.1.3.5.1) (Canalis 2009). IGF2 fördert zum einen ebenfalls die Osteoklastenbildung (Nakao et al. 2009), unterstützt jedoch zum anderen auch die osteogene Differenzierung von MSC über die Interaktion mit BMP9 (Chen et al. 2010).

Die Bindeproteine der IGF sind ebenfalls von Bedeutung für die Knochenformation. Überexpression von IGFBP2 und IGFBP5 inhibiert die Osteoblastenfunktion durch Hemmung des IGF1-Signalweges.

Mäuse mit knochenspezifischer Überexpression von IGFBP4 oder 5 weisen reduzierte Knochenformation und daraus resultierende Osteopenie auf (Canalis 2009).

#### 3.1.3.3.3 TGF $\beta$

---

Von TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) wurden bislang 3 verschiedene Proteine in Säugern detektiert: TGF $\beta$ 1, 2 und 3, die alle, wie BMP, zur TGF $\beta$ -Superfamilie gehören. TGF $\beta$  werden als inaktive Vorläufer von den Zellen synthetisiert. Nach Sezernierung binden sie an LTBP (latent transforming growth factor beta binding protein), Proteine, die in der extrazellulären Matrix – so auch in der Knochenmatrix – lokalisiert sind, und zur Lagerung von TGF $\beta$  dienen. Das noch immer inaktive TGF $\beta$  kann durch proteolytische Spaltung mittels Integrin, Plasmin oder Thrombin, oder durch Konformationsänderungen aktiviert werden (ten Dijke and Arthur 2007; Yan et al. 2009). TGF $\beta$  bindet als Homodimer an den membrangebundenen Rezeptor TGFBR1 wodurch dieser ein Dimer mit dem konstitutiv aktiven TGFBR2-Rezeptor bildet und dadurch die Signalkaskade in der Zelle einleitet (Yan et al. 2009).

Die Expression der beiden Rezeptoren, sowie aller drei TGF $\beta$ -Proteine konnte in Osteoblasten, als auch Osteoklasten nachgewiesen werden (Fox and Lovibond 2005). TGF $\beta$ 1 ist eines der häufigsten im Knochen vorkommenden und am besten untersuchten TGF $\beta$ -Proteine. TGF $\beta$ 1 fördert die Migration von MSC (Tang et al. 2009) und Präosteoblasten, sowie deren Proliferation und frühe osteogene Differenzierung. Späte Phasen der Osteoblastendifferenzierung und Knochenmatrixbildung werden jedoch gehemmt (Janssens et al. 2005).

TGF $\beta$  wirkt auch stimulierend auf die Fusion von haematopoetischen Stammzellen und Monozyten zu Osteozyten. Die gleichzeitige Stimulation der Osteoblastendifferenzierung und Osteoprotegrin-Expression trägt dazu bei, dass die Knochenresorption durch Osteoklastogenese nicht überhandnimmt und der Knochenumbau im Gleichgewicht bleibt (Fox and Lovibond 2005).

#### 3.1.3.3.4 PDGF

---

PDGF (platelet-derived growth factors) spielen nicht nur eine Rolle im vaskulären System und bei der Wundheilung, sondern werden auch von Makrophagen, Osteoblasten und Fibroblasten exprimiert und sezerniert. PDGF bestehen zum größten Teil aus Homodimeren, die von den vier verschiedenen PDGF-Ketten – PDGFA, B, C und D – gebildet werden. Sie wirken nach Bindung an die membranständigen Tyrosinkinaserzeptoren PDGFR als Mitogene, u.a. in Zellen der Osteoblastenlinie und in Osteoklasten (Graham et al. 2009a). Diese vermutlich autokrine Signaltransduktion trägt jedoch nicht dazu bei, die Differenzierung dieser Zellen zu fördern (Tanaka and Liang 1995; Canalis 2009). Bei der Frakturheilung wird PDGF in der initialen Phase aus dem Frakturhämatom freigesetzt und leitet auch hier die Heilung ein (Weiss et al. 2009).

Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass PDGFAA und BB die Bildung von COL1, und damit den Aufbau der Knochenmatrix fördern, die Differenzierung von MSC in die osteogene Richtung jedoch stören können, u.a. durch Inhibition von IGF1 (Tanaka and Liang 1995; Graham et al. 2009a).

#### 3.1.3.3.5 EGF

---

Zur Familie der EGF (epidermal growth factor) gehören 6 verschiedene Proteine, unter anderem EGF, TGFA (Transforming growth factor alpha) und HBEGF (heparin binding epidermal growth factor), die alle Liganden für den Rezeptor EGFR darstellen. Der Rezeptor wird erst nach Dimerisierung mit einem von 3 verwandten Rezeptoren – ERBB2, 3 oder 4 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog) – aktiviert. HBEGF bindet auch direkt an ERBB4 (Xian 2007). *In-vitro*-Supplementation mit einem dieser drei Wachstumsfaktoren führt in Osteoblasten und Präosteoblasten zur Stimulation der Proliferation und Inhibition der

Differenzierung (Chien et al. 2000). In MSC konnte hingegen durch EGF keine Störung der osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden, obwohl gleichzeitig die Proliferation und Migration dieser Zellen angeregt wurde. Eine Vernetzung mit dem PTH-Signalweg wurde in Osteoblasten nachgewiesen: PTH fördert die Expression von EGF, HBEGF und TGFA.

Auch für die Osteoklastogene ist der EGF-Signalweg von Bedeutung, denn er fördert die Proliferation und Migration der Zellen (Schneider et al. 2009).

Die Bedeutung der EGF-Signalgebung wird deutlich in  $EGFR^{-/-}$  Mäuse, die aufgrund von Funktionsstörungen verschiedener Organe nicht lebensfähig sind und kurz nach der Geburt sterben. Der Knochen dieser Tiere ist ebenfalls stark beeinträchtigt. Die Embryonen sind gekennzeichnet durch verzögerte enchondrale Ossifikation, sowie verlangsamte Rekrutierung der Osteoblasten und Osteoklasten (Wang et al. 2004).

#### 3.1.3.3.6 VEGF

Die proangiogene Familie der VEGF besteht aus VEGFA (vascular endothelial growth factor alpha), B, C, D, E, F und PLGF (placental growth factor). Sie wirken als Mitogene über die Rezeptortyrosinkinasen VEGFR1, 2 und 3, sowie die Corezeptoren Heparansulfatproteoglykan, NRP1 und 2 (neuropilin). VEGF-Signalwege sind entscheidend für die enchondrale Ossifikation während der Entwicklung und für die Angiogenese.

Der am ausführlichsten studierte Faktor VEGFA bindet an VEGFR1 von Osteoklasten und regt die Proliferation, Differenzierung und Migration an. Durch Knochenresorption wird wiederum die Angiogenese stimuliert, und neu gebildeter Knochen mit Blutgefäßen versorgt. VEGFA dient auch als Chemoattraktant für Osteoblasten und fördert ebenfalls deren Differenzierung und Proliferation, z.T. über den BMP-Signalweg. Die widersprüchlichen Funktionen des Proteins dienen dem Ausgleich zwischen Knochenresorption und Knochenaufbau (Dai and Rabie 2007).

#### 3.1.3.4 Mechanotransduktion

Klinische Untersuchungen an Astronauten nach längerem Aufenthalt unter Mikrogravitation und der Auswirkungen von Bewegung auf die Knochendichte postmenopausaler Frauen zeigten, dass fehlende Beanspruchung der Knochen zu einer progressiven Abnahme der Knochendichte führt (Galli et al. 2010). Die mechanosensitiven Zellen des Knochens, die als Antwort auf Beanspruchung Knochenumbauvorgänge einleiten, sind u. a. die in der Matrix eingeschlossenen Osteozyten. Zum einen führt alltägliche Beanspruchung zu Mikroschäden im Knochen, die von den Osteozyten registriert werden, zur Apoptose der Zellen führen und dadurch die Knochenresorption einleiten (Verborgt et al. 2002; Tatsumi et al. 2007). Zum anderen führt Knochenbeanspruchung zur Bewegung der Flüssigkeiten in den Kanaliculi, durch die die Osteozyten über dendritenartige Ausläufer miteinander in Kontakt stehen. Flüssigkeitsscherstress wird von Transmembranrezeptoren der Osteozyten – wie z.B. CD44 oder Integrinen – wahrgenommen und in das Zellinnere weitergeleitet. Dort wird die Expression von mechanosensitiven Genen angeregt. Die Produktion von COX2 (*PTGS2*), sowie die Sekretion von Prostaglandin E2 und NO (Stickstoffmonoxid) wird erhöht, wodurch der Anabolismus des Knochens aufrechterhalten wird (Klein-Nulend et al. 2005; Galli et al. 2010). Es wurde auch gezeigt, dass Mechanotransduktion zu einer verringerten Expression von Sclerostin führt (Robling et al. 2006).

Aber auch andere Zellen des Knochens reagieren auf mechanische Beanspruchung, wie z.B. MSC und Osteoblasten (Klein-Nulend et al. 2002).

### 3.1.3.5 Hormonelle Steuerung

#### 3.1.3.5.1 PTH und PTHLH

PTH (parathyroid hormone) und PTHLH (parathyroid like hormone) sind Hormone, die beide trotz geringer Sequenzhomologie (16%) an den Rezeptor PTH1R binden. Der transmembrane PTH1R wird in Osteoblasten exprimiert, und die Aktivierung des Rezeptors führt u. a. zur Einleitung der Transkription von MMP13, das den Knochenumbau fördert, sowie von EFN2. PTH ist ein Hormon der Nebenschilddrüsen und wirkt somit endokrin auf den Knochenmetabolismus. PTHLH hingegen wird von vielen verschiedenen Gewebearten produziert und sezerniert, wie z.B. Haut, Blutgefäßen, Knochen, Niere, etc. Es wirkt entweder autokrin oder parakrin auf die Zielzellen (Datta and Abou-Samra 2009). Die knochenanabole Wirkung von PTHLH und PTH kann unter anderem über deren Einfluss auf den WNT-Signalweg induziert werden. Es wurde gezeigt, dass beide Hormone die Expression von *SOST* in *PTH1R*-exprimierenden Osteozyten (Bellido 2006) unterdrücken.

Die Signalgebung durch PTH und PTHLH im Knochen wirkt sich abhängig von der Dauer der Einwirkung auf die mesenchymalen Zielzellen entweder anabol oder katabol aus. Intermittierende Gabe von PTH resultiert in erhöhter Knochenformation aufgrund der Erhöhung der Osteoblastenzahl (Datta and Abou-Samra 2009). Die endokrine Produktion von PTH wird durch Kalziummangel ausgelöst und steht im engen Zusammenhang mit dem Vitamin D3-Metabolismus (siehe 3.1.3.5.2). Sie dient zur Aufrechterhaltung des ausgewogenen Mineralhaushaltes des Körpers, und regt zu diesem Zweck die Mobilisierung von Kalzium und Phosphat u.a. aus dem Knochen an (Quarles 2008).

Kontinuierliche Gabe von PTH oder PTHLH führt jedoch zur Induktion der Knochenresorption durch Osteoklasten, deren Bildung wiederum von aktiven Osteoblasten durch Expression von RANKL angeregt wird. Gleichzeitig wird die Expression von Osteoprotegerin, TNSALP, COL1A und den Osteoblastenmarkern Osteopontin (*OSP1*) und Osteonectin (*SPARC*) gehemmt (Sims and Gooi 2008; Datta and Abou-Samra 2009).

Neueste Forschungsergebnisse deuten auch auf die Expression von PTH1R in Osteoklasten und damit auf eine direkte Kontrolle der Osteoklastogenese hin (Dempster et al. 2005).

#### 3.1.3.5.2 Vitamin D3

Vitamin D3 wird in der Haut durch UV-Bestrahlung aus 7-Dehydrocholesterin über Prävitamin D3 synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen. Bevor es aktiv im Körper wirken kann, muss es durch Monoxygenasen hydroxyliert werden. Zu diesem Zweck wird Vitamin D3, gebunden an DBP (vitamin D binding protein) über den Blutkreislauf zur Leber transportiert und dort durch 25-Hydroxylase (*CYP2R1*) zu 25-(OH)D<sub>3</sub> (25-Hydroxyvitamin D3) hydroxyliert. Das inaktive 25-(OH)D<sub>3</sub> wird erneut mittels DBP zur Niere transportiert und mit Hilfe des Enzyms 1- $\alpha$ -Hydroxylase (*CYP27B1*) in aktives 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,25-Dihydroxyvitamin D3) umgewandelt. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> regt die Kalzium-Resorption im Darm an und fördert dadurch indirekt die Mineralisierung des Knochens (Ebert et al. 2006a; St-Arnaud 2008).

Über den Vitamin D-Rezeptor VDR löst 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Expression von Zielgenen aus, u.a. von TNSALP (Orimo 2010) und 24-Hydroxylase (*CYP24A1*), die 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in weniger aktive Metabolite degradiert (Holick and DeLuca 1974). Die auf diesem Weg regulierte 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Produktion dient zur Aufrechterhaltung des Phosphat- und Kalziumspiegels des Organismus und ist gekoppelt an den PTH-Metabolismus. Als Antwort auf Hypokalzämie und Vitamin D3-Mangel erhöht die Nebenschilddrüse die Ausschüttung von PTH und aktiviert somit die renale 1- $\alpha$ -Hydroxylase. Dies führt zur Erhöhung des 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Spiegels, wodurch die Kalzium- und Phosphatresorption im Dünndarm, aber auch im Knochen durch Osteoklasten angeregt wird (Rizzoli et al. 1977; Fukumoto et al. 2008). Es kommt zudem zu einem Rückkopplungseffekt, indem 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wiederum die PTH-Ausschüttung in den Nebenschilddrüsen hemmt (Brown et al. 2006).

Vitamin D3 Mangel kann zur Osteomalazie oder Rachitis führen, entweder aufgrund von zu geringer Bestrahlung mit Sonnenlicht, entzündlichen Darmerkrankungen, oder aufgrund von genetischen Defekten (Lips 2006).

In Präosteoblasten führte die Stimulation mit  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  in frühen Passagen zu einer verminderten Transkription von *COL1* und *ALPL*, während die Expression dieser Gene in späteren Passagen anstieg. Es wird ein pleiotroper Effekt von  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  auf die Zellen vermutet, der abhängig davon ist, in welchem Stadium sich diese befinden bzw. wie viele Populationsverdopplungen die Zellen bereits durchlaufen haben (St-Arnaud 2008).

Der Vitamin D3-Metabolismus kann u.a. durch die Wirkung von FGF23 und Klotho reguliert werden, da sie die Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase unterdrücken (Razzaque and Lanske, 2006; Razzaque et al., 2006). Klotho- oder FGF23-Defizienz führt über erhöhte  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -Konzentration u.a. zu einem hohen Phosphat Spiegel und Alterungserscheinungen (siehe auch 3.2.3.6) (Kuro-o et al. 1997; Shimada et al. 2004; Drueke and Prie 2007).

### 3.1.3.5.3 Sexualhormone

Androgene und Östrogene sind Steroidhormone, die entscheidend zur Knochenentwicklung beitragen. Sie unterstützen die Knochenformation und hemmen die Knochenresorption. Wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen werden beide Steroide in beiden Geschlechtern synthetisiert. Androgene werden in Männern von den Testes, sowie zusätzlich – genau wie bei Frauen – in der Nebenniere produziert. Testosteron ist das wichtigste Androgen der Männer und wirkt entweder direkt, oder nach Umwandlung in die aktivere Form  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron durch eine  $5\alpha$ -Reduktase (*SRD5A*) auf den spezifischen Androgenrezeptor AR. Testosteron wird jedoch über die P450-Aromatase (*CYP19A1*) auch in Östradiol – das klassische weibliche Steroidhormon – umgewandelt und wirkt dann als Ligand für die Östrogenrezeptoren ESR1/ER $\alpha$  und ESR2/ER $\beta$ . Beide Enzyme werden auch bei beiden Geschlechtern im Knochen exprimiert und lassen darauf schließen, dass die Östradiol- und Testosteronbildung zumindest bei Männern direkt im Zielgewebe von statten geht. In Frauen werden große Mengen an P450-Aromatase in den Ovarien produziert und dort die Reaktion zur Bildung von Östrogenen aus Vorstufen und Androgenen katalysiert. Der Hauptteil des Östradiols wird von den Ovarien sezerniert und gelangt über den Blutkreislauf in die Zielgewebe (Venken et al. 2008).

ESR1, ESR2 und AR werden in Osteoblasten, Osteoklasten, MSC und Osteozyten exprimiert, wodurch anzunehmen ist, dass die Sexualhormone im Knochen direkt über ihre Rezeptoren wirken und dort die Expression entsprechender Zielgene anregen (Riggs et al. 2000; Vanderschueren et al. 2004). Unter anderem in MSC konnte ein weiterer Rezeptor für Östradiol identifiziert werden – GPER – der als membranständiger Rezeptor die Signalwirkung über Signaltransduktion schneller vermittelt als die Steroidhormonrezeptoren (Jenei-Lanzl et al.). Aktiver GPER aktiviert über verschiedene Signalmoleküle u. a. EGFR durch Phosphorylierung des zytoplasmatischen Proteinschwanzes des Rezeptors (Filardo 2002).

Die antiresorptive Wirkung von Östrogenen wird über die verringerte Expression von Zytokinen, wie z.B. IL1, TNF (tumor necrosis factor) und IL6, in benachbarten Osteoblasten, Monozyten und MSC eingeleitet (Riggs et al. 2000). Des Weiteren fördert Östradiol die Apoptose von Osteoklasten, sowie Expression von Osteoprotegerin, und verringert die Expression von RANKL in Osteoblasten. Androgene reduzieren Osteoklastogenese ebenfalls über erhöhte Osteoprotegerin-Synthese. Beide Sexualhormone haben auch positiven Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung, -funktion und -proliferation (Venken et al. 2008).

Da Sexualhormone den Knochenumbau hemmen, führt Defizienz in beiden Geschlechtern zu hohem Knochenumsatz, indem die Anzahl der Osteoklasten, paradoxerweise aber auch der Osteoblasten steigt (Riggs et al. 2002).

## 3.2 Alterung

### 3.2.1 Alterung des Organismus

Alterung ist ein komplexer, biologischer Prozess, der zu verminderter Funktion der Organe und letztendlich zum Organversagen führt. Während der Alterung des Körpers reduziert sich dessen Fähigkeit auf Stress zu reagieren bzw. Krankheiten/Infektionen abzuwehren. Alters-assoziierte Krankheiten, wie Arteriosklerose, Muskelschwund (Sarkopenie), Osteoporose oder degenerative Krankheiten des Zentralen Nervensystems häufen sich mit der Anzahl an Lebensjahren des Menschen (Mimeault and Batra 2009; Sahin and Depinho). Das Risiko zur Entstehung von Tumoren nimmt ebenfalls zu (Mimeault and Batra 2009).

Letztendlich kann Alterung als Rückgang der physiologischen Funktionen, die notwendig für den Erhalt und die Fortpflanzungsfähigkeit des Körpers sind, definiert werden (Kuro-o 2001). Dies lässt sich auf alle Organismen übertragen, von Einzellern bis zu Pflanzen, Mollusken und Eukaryoten (Nystrom 2003; Abele et al. 2009; Austad 2009; Watson and Riha).

### 3.2.2 Zelluläre Seneszenz

Um die Funktion der Organe zu erhalten, muss das Gewebe kontinuierlich mittels somatischer Stammzellen regeneriert werden (Ho et al. 2005). *In-vitro* konnte jedoch gezeigt werden, dass diese undifferenzierten, multipotenten Zellen und alle anderen Zellen des adulten Organismus eine limitierte Teilungsfähigkeit aufweisen. Diese Limitation wird replikative bzw. zelluläre Seneszenz genannt, oder unter dem Begriff Hayflick-Limit zusammengefasst. Zellen treten nach einer definierten Anzahl an Zellteilungen – in der Regel ca. 50 Populationsverdopplungen – in einen irreversiblen  $G_1$ -Arrest des Zellzyklus ein (Hayflick and Moorhead 1961; Hayflick 1965). Seneszente Zellen weisen morphologische Veränderungen auf. Sie sind meist abgeflacht, enthalten viele Granula, und in vielen Zellarten konnte eine erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden. Die Färbung der Zellen mittels X-Gal-Spaltung ist ein typischer Nachweis für Seneszenz (Dimri et al. 1995). Aufgrund der Alterung der Zellen geht deren Replikationsfähigkeit verloren, des Weiteren weisen sie Veränderungen in ihrer Funktion auf. Dennoch bleiben sie metabolisch aktiv – wenn auch eingeschränkt – und treten über lange Zeiträume hinweg nicht in die Apoptose ein (Cristofalo et al. 2004; Muller 2009). Seneszente Zellen konnten in *in-vivo* ebenfalls nachgewiesen werden (Campisi 2005). Für die Regeneration von Organen stehen Stammzellen somit nur innerhalb einer begrenzten Zeitspanne zur Verfügung, was letztendlich zur Alterung des gesamten Organismus führen kann. Ausschließlich pluripotente, embryonale Stammzellen und adulte Zellen, die zur Pluripotenz umprogrammiert wurden, weisen eine unbegrenzte Teilungsrate *in-vitro* auf (Amit et al. 2000; Hochedlinger and Jaenisch 2006).

Im Vergleich zu proliferierenden Zellen sind seneszente Zellen durch ein verändertes Expressionsmuster gekennzeichnet. Viele Gene sind zwar weiterhin durch Stimulation mit Mitogenen (z.B. PDGF) induzierbar (Paulsson et al. 1986); Gene zur Förderung der Proliferation werden jedoch reprimiert und antiproliferative Gene erhöht exprimiert. Die bisherigen Erkenntnisse beschreiben mehrere Wege, auf denen der irreversible Zellzyklus-Arrest auf Genexpressionsebene eingeleitet werden kann. Die zwei bekanntesten Wege werden im Folgenden näher beschrieben.

Der P16/RB-Signalweg verläuft über die Expression des Gens *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), die proportional zur Anzahl an Populationsverdopplungen der Zellen zunimmt. Das Gen codiert für den Tumorsuppressor P16, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. Dies führt zur Dephosphorylierung und somit Inaktivierung des Retinoblastoma-Proteins (RB) und letztendlich durch Hemmung von Transkriptionsfaktoren zum Proliferationsstopp (Abb. 4) (Bringold and Serrano 2000). Inaktivierung des P16/RB-Signalwegs führt zu Verlängerung der Lebensspanne von Zellen oder zur Immortalisation (Brenner et al. 1998). Nicht nur in Zelllinien, sondern auch in mehr als 30% von Tumoren konnte eine P16-Inaktivierung gefunden werden (Ruas and Peters 1998).

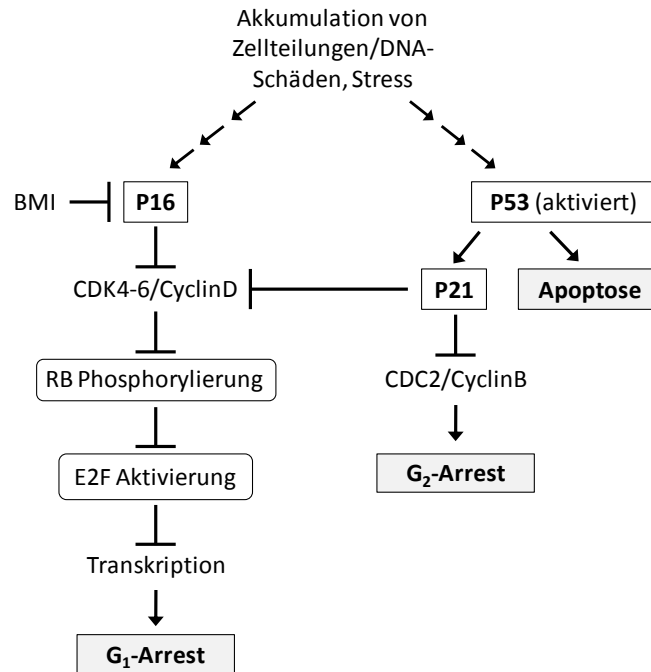


Abb. 4 Einleitung des Zellzyklusarrestes in G<sub>1</sub> bzw. G<sub>2</sub> durch P16/RB- bzw. P53/P21-Signalwege. Grafik zusammengestellt nach (Bringold and Serrano 2000; Taylor and Stark 2001; Ohtani et al. 2004).

P53 (*TP53, tumor protein p53*) wurde in der Hälfte aller bekannten Tumore in inaktiver Form vorgefunden. Im Laufe der Zellalterung – meist aufgrund der Anhäufung von DNA-Schäden – sammelt sich aktives p53 in der Zelle an. Dies kann letztendlich, abhängig vom Zelltyp, entweder zur Seneszenz oder zur Apoptose führen. In die Aktivierung von p53 sind komplexe, post-translationale Modifikationen involviert, inklusive Phosphorylierung und Acetylierung. Wenn p53 als Transkriptionsfaktor für P21 (*CDKN1A, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) wirkt, und dadurch dessen Expression erhöht, erfolgt der reversible oder irreversible Stopp des Zellzyklus in G<sub>1</sub> oder G<sub>2</sub> (Abb. 4) (Bringold and Serrano 2000).

Die Beteiligung der genannten Tumorsuppressorgene bei der Initiierung von Seneszenz unterstützt die Theorie, dass Seneszenz eine Gegenmaßnahme zur Entstehung von Tumorzellen darstellt (Campisi 2001). Tumorzellen sind durch unlimitierte Proliferation gekennzeichnet und entstehen durch Akkumulation von Mutationen. Diese treten in mitotisch aktiven Zellen bereitwilliger auf als in sich nicht teilenden Zellen (Busuttill et al. 2006). Die Reaktivierung der Telomerase wird in vielen Tumormodellen im Zusammenwirken mit dem Verlust der P16 und/oder p53 Aktivität als wichtiger Schritt der Tumorigenese gebracht (Newbold 2002).

Kontrovers ist die Tatsache, dass die Alterung von *Mammalia* oft mit der Entstehung von Tumoren einhergeht. Eine mögliche Erklärung stellt die Hypothese dar, dass die Mikroumgebung von Geweben durch Akkumulation von seneszenten Zellen im Alter gestört ist. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in seneszentem Zustand Faktoren sezernieren, die das umliegenden Gewebe zerstören oder dessen Proliferation stimulieren (Campisi 2000). Auf diese Art können Mutationen in nicht-seneszenten Nachbarzellen gefördert werden – auch in sich nicht teilenden Zellen (Busuttill et al. 2006) – wodurch das Risiko zur Entstehung von Tumoren erhöht wird.

### 3.2.3 Ursachen für Alterung

#### 3.2.3.1 Telomere

Telomere sind Nukleoproteinkomplexe aus repetitiven DNA-Sequenzen und spezifischen Bindungsproteinen an den Chromosomenenden (Blackburn 1991). Sie dienen zur Aufrechterhaltung der Chromosomenstabilität, indem sie als Schutzmechanismus gegen den Abbau von kodierenden DNA-Sequenzen während der Replikation fungieren (Hackett et al. 2001). Die DNA-Polymerasen können an den Chromosomenenden nicht mehr am Folgestrang ansetzen, wodurch die Telomere nach jeder Zellteilung verkürzt werden (Levy et al. 1992; Allsopp et al. 1995). Die Telomerase, bestehend aus einer Reversen Transkriptase (*TERT*) und einer RNA-Komponente (*TERC*), verhindert die Verkürzung der Telomere. Dabei dient die RNA-Komponente als Template für die *de-novo* Synthese der Telomer-Sequenz (Nakamura et al. 1997). Im Menschen ist Telomerase nach dem Embryonalstadium ausschließlich in Keimbahnzellen und in Stammzellen von stark regenerativen Geweben, wie z.B. hämatopoetische und neuronale Stammzellen, sowie Stammzellen der Haut und des Darms zu finden. (Forsyth et al. 2002; von Figura et al. 2009). Sobald jedoch die Differenzierung dieser Zellen einsetzt, wird die Telomerase-Aktivität unterdrückt (Sethe et al. 2006). In vielen Tumorzellen wurde sie wieder reaktiviert vorgefunden (Artandi and DePinho). In Nagetieren hingegen konnte die Telomerase in allen Geweben und somatischen Zellen nachgewiesen werden (Prowse and Greider 1995).

Die Chromosomenenden von Zellen ohne Telomerase-Funktion verkürzen sich bis zu einer kritischen Länge, ab der DNA-Checkpoints des Zellzyklus einsetzen und die weitere Replikation verhindern, ähnlich wie bei einem DNA-Doppelstrangbruch (siehe 3.2.3.2) (d'Adda di Fagagna et al. 2003). Dadurch kommt es zum P53-vermittelten irreversiblen G<sub>1</sub>-Arrest oder zur Apoptose, aber auch die Aktivierung des P16/RB-Signalweges konnte nachgewiesen werden (Lee et al. 1998; Jacobs and de Lange 2005; Choudhury et al. 2007). Telomerverkürzungen treten während der humanen Alterung des Menschen bisher in fast allen untersuchten Geweben auf (Djojotubroto et al. 2003; Jiang et al. 2007; von Figura et al. 2009). Dass diese Verkürzungen direkten Einfluss auf die Alterung nehmen, konnte an *Terc*<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden. In diesen Tieren führt der Verlust der Telomerasefunktion ab der dritten Generation zu reduzierter Stammzellfunktion und einer verkürzten Lebensspanne (Lee et al. 1998; Rudolph et al. 1999). Zellen mit einer transgenen *TERT*-Expression, weisen hingegen stabilisierte Telomerlängen und damit unlimitiertes, replikatives Potential auf, ohne jedoch zwangsläufig Tumoreigenschaften zu entwickeln, wie z.B. hMSC-TERT (Bodnar et al. 1998; Simonsen et al. 2002).

#### 3.2.3.2 DNA- Reparatur

Die Schädigung von DNA, vor allem durch Doppelstrangbrüche, kann zu Seneszenz, Zelltod oder zur Entwicklung von Tumoren führen (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007).

Diese Schäden treten entweder spontan auf oder werden durch die Umwelt beeinflusst. Es wird angenommen, dass radioaktive Strahlung, UV-Strahlung, virale Infektion oder Chemikalien nicht nur über Mutationen letztendlich zur Entstehung von Tumoren führen, sondern die betroffenen Zellen alternativ den entgegen gesetzten Weg einschlagen und in die Seneszenz eintreten (Gensler and Bernstein 1981). Der Eintritt in den Zellzyklusarrest wird über den P53/P21-Signalweg eingeleitet, in vielen Zellen jedoch ebenfalls über den P16/RB-Weg (Di Leonardo et al. 1994; Robles and Adami 1998; Beausejour et al. 2003). Meist führen DNA-Schäden zu einem reversiblen Zellzyklus-Stopp, um über Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur, Mismatch- oder Doppelstrangbruchreparatur, die bei der Replikation entstandenen Fehler oder DNA-Brüche auszubessern. Während der Alterung nimmt die Effektivität dieser Reparaturmechanismen jedoch ab. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der dafür verantwortlichen Reparaturenzyme im Laufe der Alterung sinkt, ebenso die Sensibilität auf DNA-Schäden zu reagieren (Goukassian et al. 2000; Intano et al. 2003; Cabelof et al. 2006; Gorbunova et al. 2007).



### 3.2.3.3 Oxidativer Stress

Akkumulation von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt zu oxidativem Stress, der in Zusammenhang mit Alterung, Carcinogenese und neurodegenerativer, sowie kardiovaskulärer Krankheiten gebracht wird (Harman 1956; Olinski et al. 2007; Gems and Doonan 2009). Diese freien Radikale sind ein Nebenprodukt des Sauerstoffmetabolismus der Zellen, der auf zwei Wegen von statten geht. Sie entstehen durch biochemische Umsetzung von O<sub>2</sub> als Substrat – z.B. bei Oxidase-katalysierten Reaktionen – oder bei der Zellatmung in den Mitochondrien, bei der Superoxid Anion frei gesetzt wird (Vanderkooi et al. 1991; Olinski et al. 2007). Es wurde die „Mitochondrial free radical theory of aging“ (MFRTA) aufgestellt, die besagt, dass Alterung allein oder hauptsächlich durch die ROS-Produktion der Mitochondrien vorangetrieben wird (Harman 1972). Um Schäden durch ROS zu vermeiden, werden die freien Radikale von antioxidativen Enzymen abgebaut. Dazu gehören Katalasen, Superoxiddismutasen (SOD), die Selenium-abhängigen Glutathionperoxidasen und Thioredoxinreduktasen (TRX) (Ebert et al. 2006b; Lu and Holmgren 2009). Oxidativer Stress entsteht wenn sich die Konzentration von ROS durch Überproduktion und/oder durch Störungen des antioxidativen Mechanismus erhöht. Dies führt letztendlich zu einem Anstieg an oxidativ modifizierten Makromolekülen, darunter auch DNA (Sohal et al. 2002).

Die Akkumulation von oxidativem Schaden während der Alterung ist bewiesen; dass jedoch die Mitochondrien dazu beitragen, wurde widerlegt. Die MFRTA besagt, dass die Mitochondrien während der Zellalterung durch oxidativen Stress in ihrer Funktion eingeschränkt werden, und dies letztendlich zu einer weiteren Erhöhung der mitochondrialen ROS-Produktion führt. (Lapointe and Hekimi 2010). In Tiermodellen konnte jedoch gezeigt werden, dass der Verlust der Mitochondrien-Funktion nicht zwangsläufig zur Alterung führt. *Mclk1*<sup>+/-</sup> Mäuse erreichten sogar längere Lebensspannen als Wildtyp-Tiere, obwohl sie ein hohes Level an oxidativem Stress aufweisen (Lapointe and Hekimi 2008; Lapointe et al. 2009). Mausmodelle heterozygot für Knockdown von antioxidativen Enzymen der Mitochondrien – z.B. *Sod2* und *Trx2*– weisen ebenfalls keine frühzeitige Alterung auf (Jang and Remmen 2009).

### 3.2.3.4 Proliferationsstress und Mitogene

Mitogene Signale und die Signalkaskaden, die sie auslösen, können den Proliferationsdruck von Zellen soweit erhöhen, dass dies zu Stress und letztendlich ebenfalls zur Seneszenz führen kann. Die Mehrheit der mitogenen, extrazellulären Signale mündet in der Aktivierung der RAS-Signalkaskaden, die Proliferation, Überleben der Zellen, oxidativen Stress und cytoskelettale Veränderungen einleiten können (Malumbres and Pellicer 1998). RAS stellt das am häufigsten aktivierte Onkogen in Tumoren dar (Bringold and Serrano 2000). Ein wichtiger Signalweg, essentiell für die Proliferation, ist die MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Kaskade, die über die Aktivierung der Kinasen RAF-MAPK-ERK zur Transkription von Proliferations-fördernden Genen führt. Über RAS wird auch PI3K aktiviert (siehe 3.2.3) (Longo 2004). Es konnte gezeigt werden, dass RAS-Signalkaskaden Seneszenz über den P16/RB- oder den P53/P21-Signalweg einleiten (Serrano et al. 1997). In Hefen führte die Deletion des RAS-Orthologs zur Verlängerung der Lebensspanne, die Überexpression reduzierte hingegen das replikative Potential in *Saccharomyces cerevisiae* drastisch (Pichova et al. 1997). Dass RAS auch oxidativen Stress einleiten kann, zeigen Versuche an *Mammalia*-Zelllinien in denen RAS inhibiert wird, und diese Zellen daraufhin eine erhöhte Resistenz und Lebenserwartung nach Serumentzug aufweisen. Des Weiteren wird weniger Superoxid produziert, selbst bei Stimulation mit Wachstumsfaktoren (Rojas et al. 1996; Mills et al. 1998; Longo 2004).

Der RAS-Signalweg wird vor allem von aktivierten Rezeptortyrosinkinasen eingeleitet, zu denen zählen u.a. EGFR, FGFR1-4 sowie PDGFA-D. Über zwischengeschaltete Proteine und deren Aktivierung wird letztendlich RAS stimuliert (Eswarakumar et al. 2005; Ramos 2008). Diese Aktivierung der RAS/MAPK -Signalkaskade kann auch von G-gekoppelten Rezeptoren, Integrinen, sowie den intrazellulären Tyrosinkinasen SCR und FYN eingeleitet werden. (Ramos 2008).

### 3.2.3.5 Epigenetik

Epigenetische Effekte werden im Laufe des Lebens während der DNA-Replikation kontinuierlich auf Tochterzellen übertragen. Mechanismen der Epigenetik sind DNA-unabhängig und umfassen DNA-Methylierung durch Methyltransferasen (DNMTs), sowie Modifikationen der Histone wie Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung. Aber auch strukturelle Veränderungen des Chromatins und RNA-Interferenz (RNAi)-assoziierte Ereignisse tragen zur Regulation auf Transkription übergeordneter bzw. untergeordneter Ebene bei (Esteller 2006; Grolleau-Julius et al. 2009). Hypomethylierung von CpG-reicher, Promoter-assoziiierter DNA (CpG-Inseln) und Acetylierung von Histonen führen zur aktiven Transkription der betroffenen DNA-Abschnitte, während Hypermethylierung der DNA und Hypoacetylierung, sowie Methylierung der Histone die Transkription unterdrücken.

DNA-Methylierungsmuster werden zum großen Teil im Fötus festgelegt. Es gibt Hinweise, dass sich das epigenetische Muster im adulten Organismus aber nicht nur aufgrund von Umwelteinflüssen, sondern auch während der Alterung eines Organismus verändert (Fraga et al. 2005; Gravina and Vijg 2010). Es wurde berichtet, dass der Methylierungsgrad von DNA in vielen Geweben verschiedener Organismen, u. a. auch im Menschen, im Laufe des Alters abnimmt. Eine mögliche Ursache könnte die reduzierte Aktivität von DNMT1 darstellen (Lopatina et al. 2002). Aber auch Helikasen der SNF2-Superfamilie, wie z.B. ATRX (alpha Thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) und HELLS (helicase, lymphoid-specific) könnten involviert sein, da sie ebenfalls als Modulatoren der DNA-Methylierung fungieren (Sun and Arceci 2005). HELLS<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen neben frühzeitiger Alterung, inklusive Sarkopenie und Osteoporose, auch eine Abnahme des Methylierungsgrades (Sun et al. 2004). Das Expressionsmuster von HELLS ist umgekehrt zur Expression von CDKN2A während der *in-vitro* Alterung von Fibroblasten. Die P16-Expression wird in prä-seneszenten Zellen unterdrückt durch die direkte Interaktion von HELLS mit dem P16-Promoter und die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDAC1, HDAC2) (Zhou et al. 2009). Andere Arbeitsgruppen postulierten eine indirekte Wirkung von HELLS auf die P16-Expression, indem die Helikase die Expression des P16-Inhibitors BMI1 (BMI1 polycomb ring finger oncogene) steuert (Sun et al. 2004; Sun and Arceci 2005). Weitere Befunde weisen darauf hin, dass HELLS bei der Methylierung von Stemness-Genen, wie z.B. OCT4 (*POU5F1*, *POU class 5 homeobox 1*) über die Rekrutierung der DNA-Methyltransferase DNMT3B eine tragende Rolle spielt. Dies könnte einen möglichen Mechanismus für den Verlust des Stemness-Charakters von multipotenten Zellen darstellen (Xi et al. 2009).

Abnahme der DNA-Methylierung während der Alterung konnte aber nicht universell nachgewiesen werden. Je nachdem welches Mausmodell herangezogen, bzw. welches Gewebe oder Gen untersucht wurde, zeigte sich ein entweder verringerter, erhöhter oder gar nicht veränderter Methylierungsgrad (Yung and Julius 2008).

In Studien an Lymphozyten von eineiigen Zwillingen jungen Alters verglichen mit Zwillingspaaren mittleren Alters wurden auch Veränderungen des Acetylierungsgrades von Histonen H3 und H4 detektiert (Fraga et al. 2005). Tierversuche ergaben, dass die Gabe von HDAC1 (histone deacetylase 1)- und HDAC2-Inhibitoren die Lebensdauer verlängert (Chang and Min 2002; Zhao et al. 2005). HELLS interagiert ebenfalls mit HDAC1 und behindert auf diese Weise die Expression von P16. Durch Bindung an den CDKN2A-Promoter und Rekrutierung von HDAC1 werden die angrenzenden Histone deacetyliert. Der Eintritt in den Zustand der Seneszenz wird somit verzögert (Zhou et al. 2009).

Ein weiterer epigenetischer Mechanismus – RNA Interferenz – setzt auf Ebene der Transkription an. RNAi ist ein Mechanismus in vielen Eukaryoten, der darauf basiert, dass doppelsträngige RNA mittels zelleigener Proteinkomplexe (DICER und RISC) erkannt und zerstört wird. Dies dient einerseits als Schutz gegen Viren, die ihr Genom mittels doppelsträngiger RNA übertragen, aber auch zur Regulation der Translation, indem der Organismus small-interference (siRNA) oder mikroRNA (miRNA) selbst produziert, um komplementäre mRNA zu binden und zu zerstören. Auf diese Weise können Entwicklung und Genexpression posttranskriptional reguliert werden, und es gibt ebenfalls Anzeichen, dass auch die Alterung dadurch direkt beeinflusst wird (Zamore 2001; Grolleau-Julius et al. 2009). Die Lebensspanne von *C. elegans* kann z.B. durch Überexpression der spezifischen miRNA *lin-4* (*lineage 4*) verlängert werden (Boehm and Slack 2005).

### 3.2.3.6 Genetische Prädisposition

Mutationen, die dazu führen, dass oben genannte Mechanismen aktiviert bzw. gestört werden, können die Alterung begünstigen oder sogar beschleunigen.

Funktionseinschränkende Mutationen in DNA-Reparaturenzymen (siehe 3.2.3.2) stellen die Ursachen für viele Progerie-Syndrome dar. Das Werner Syndrom tritt im adulten Menschen aufgrund einer Mutation im *WRN*-Gen auf, das für eine RECQ-like Helikase codiert. *WRN* spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur, aber auch bei der Transkription (Yu et al. 1996; Bachrati and Hickson 2003). Das bei Kindern auftretende Hutchinson-Gilford Progerie-Syndrom wird durch eine Mutation im Gen *LMNA*, das für Lamin A codiert, hervorgerufen. Lamin A ist ein Protein der Kernhülle, wird aber auch im Zusammenhang mit Chromatinorganisation beschrieben (Eriksson et al. 2003; Andressoo and Hoeijmakers 2005). Fibroblasten von Patienten mit Hutchinson-Gilford zeigen *in-vitro* nach Bestrahlung keine bzw. kaum DNA-Reparatur (Epstein et al. 1973). Beide monogenetischen Krankheiten zeigen zeitlich gerafft alle typischen Merkmale der natürlichen Alterung, in klinischer und molekularer Hinsicht (Ding and Shen 2008).

Es wird angenommen, dass auch der Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus eine Rolle spielt und gesteigerte 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Aktivität die Alterung durch Erhöhung des Serumphosphatspiegels begünstigt. Da *FGF23* und *Klotho* die Expression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase unterdrücken und in Folge den Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus negativ regulieren, schützen sie vor verfrühter Alterung (Razzaque and Lanske, 2006; Razzaque et al., 2006). Dies konnte an Knockout-Modellen verdeutlicht werden. *Klotho*<sup>-/-</sup> und *FGF23*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeichnen sich durch einen sehr ähnlichen Phänotyp aus, der durch vorzeitige Alterung, vaskuläre Verkalkungen, erhöhten Phosphatspiegel und erhöhte 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration gekennzeichnet ist (Kuro-o et al. 1997; Shimada et al. 2004; Drueke and Prie 2007). Einige Arbeiten zeigen jedoch auch, dass zumindest *in-vitro* auf zellulärer Ebene, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Entstehung von Seneszenz verzögert. Humane MSC mit Langzeitstimulation von 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> traten später in den irreversiblen Proliferationsstopp ein als die Kontroll-Zellen (Klotz et al. submitted).

### 3.2.4 Immunseneszenz

Das Immunsystem ist ein evolutionär konserviertes Netzwerk an Schutzmechanismen und kann in Vertebraten in zwei Komponenten unterteilt werden: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene System setzt sich hauptsächlich aus Monozyten, Dendritischen Zellen und natürlichen Killer-Zellen zusammen. Das adaptive Immunsystem ist repräsentiert durch B- und T-Lymphozyten.

Mit der Alterung eines Organismus gehen auch negative Veränderungen des Immunsystems einher, die als Immunseneszenz bezeichnet werden. Immunseneszenz betrifft das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem und ist gekennzeichnet durch die funktionelle Abnahme von T- und B-Zellen, sowie Involution des Thymus und einem Zustand der chronischen Inflammation, der als „inflammaging“ bezeichnet wird (Weiskopf et al. 2009). Auf diese Weise wird die Immunkompetenz des Organismus herabgesetzt, wodurch sich wiederum die Anfälligkeit für Krankheiten und Infektion und damit auch die Sterberate im Alter erhöhen. Die Inzidenz von Autoimmunkrankheiten nimmt im Alter ebenfalls deutlich zu (Hasler and Zouali 2005; Ostan et al. 2008).

Im adaptiven Immunsystem häufen sich während der Alterung die schwerwiegendsten Veränderungen an, da es sich ein Leben lang an neue Pathogene anpassen muss. Diese Adaptierung verläuft über Antikörper, die erkannt werden und die Immunreaktion auslösen. Menschen der heutigen Zeit haben eine Lebenserwartung von 80-120 Jahren, wodurch das Immunsystem eine viel längere Zeit infektiösen Antigenen ausgesetzt wird als je zuvor in der menschlichen Evolution. Dies ist möglicherweise eine der Hauptursachen für die Entstehung der Immunseneszenz (Larbi et al. 2008; Ostan et al. 2008).

Eine weitere Ursache stellen die hämatopoetischen Stammzellen dar, deren Proliferationskapazität und Anzahl im Knochenmark mit dem Alter des Organismus abnimmt. Dadurch werden weniger B-Zellen produziert (Cancro 2005; Dykstra and de Haan 2008; Weiskopf et al. 2009).

Chemische Komponenten bzw. deren differentielle Expression im gealterten Organismus tragen ebenfalls zur Entstehung von Immunseneszenz bei. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von NFKB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells), ein Transkriptionsfaktor für proinflammatorische Gene, in älteren Personen ansteigt und zur Entstehung von „inflammaging“ beiträgt (Grolleau-Julius et al. 2009). Ein NFKB-responsives Gen stellt *IL6* dar, dessen Konzentration sich im Alter ebenfalls erhöht, und dessen Proteinprodukt u.a. den Promotor von *DNMT1* reguliert (siehe 3.2.3.5) (Hodge et al. 2001). Es wird angenommen, dass vor allem epigenetische Faktoren zur Immunseneszenz beitragen (Grolleau-Julius et al. 2009). Weitere Immunsystem-assoziierte Gene, die im Alter differentiell exprimiert werden, sind *IL2* und *INFG* (*Interferon gamma*) (Grolleau-Julius et al. 2009).

Inflammation ist ein Mechanismus mit dem der Körper auf das Eindringen von Pathogenen, Verletzungen oder Irritationen reagiert und letztendlich die Heilung des betroffenen Gewebes initiiert. Eingeleitet wird die Inflammation durch die Akute-Phase-Reaktion, die erste, unspezifische Antwort auf die negativen, exogenen Reize. Immunkompetente Zellen sezernieren Zytokine, wie z.B. IL6, IL2, INFG, TGFA, TGFB und EGF, die über den Blutkreislauf zur Leber gelangen. Dort werden als Reaktion auf diese Botenstoffe über 30 Akute-Phase-Proteine in großen Mengen produziert und sezerniert, um den Wundheilungsprozess und weitere inflammatorische Reaktionen einzuleiten (Baumann and Gauldie 1994). Zu diesen Proteinen gehören auch die Akute-Phase Serum Amyloide A (A-SAA), SAA1 und SAA2. Anders als das im Menschen konstitutiv exprimierte SAA4, steigt die Konzentration von A-SAA im Blutplasma nach einer Verletzung oder Infektion bis zu 1000fach an (Marhaug 1983; Steel and Whitehead 1994). Der Hauptanteil an A-SAA wird in der Leber produziert, aber auch in anderen Zellarten konnte die vermutlich gekoppelte Expression von *SAA1* und *SAA2* nachgewiesen werden. *In-vitro* wurde *SAA1*- und *SAA2*-Expression nicht nur in Hepatozyten, sondern auch in Epithelzellen als Reaktion auf die Stimulation mit TNF, IL1 und IL6 beobachtet (Hagihara et al. 2004; Thorn et al. 2004). Aber auch in Osteoblastenvorläuferzellen werden *SAA1* und *SAA2* bei osteogener Differenzierung höher exprimiert (Kovacevic et al. 2008).

SAA sind Apolipoproteine, die mit HDL (high density lipoprotein) assoziieren oder nach proteolytischer Prozessierung durch MMP1, 2, oder 3 in der extrazellulären Matrix hydrophobe Aggregate bilden. Diese Amyloid A Fibrillen führen zur Entstehung von Plaques und letztendlich zu Amyloidosen (Muller et al. 2000; Stix et al. 2001; van der Hilst et al. 2008). Erhöhte MMP-Produktion ist auch eine Konsequenz der Aktivierung des Rezeptors FPR2 (formyl peptide receptor 2) durch SAA (He et al. 2003). MMP fördern die Bildung von Amyloid-Fibrillen, die u.a. bei der Rheumatoiden Arthritis – einer chronisch entzündlichen Erkrankung – auftreten (Magnus et al. 1989; van der Hilst et al. 2008). Aber auch mit Alters-assoziierten Krankheiten, wie Arteriosklerose und Tumorentwicklung ist A-SAA in Verbindung gebracht worden (Mucchiano et al. 2001; Malle et al. 2009).

Einen weiteren Rezeptor für SAA1 stellt TLR2 (toll-like receptor 2) dar (He et al. 2009). Aktivierung von TLR wirkt sich allgemein auf das angeborene, aber auch auf das adaptive Immunsystem aus (Manicassamy and Pulendran 2009; Iwasaki and Medzhitov). Eine Bindung an TLR2 resultiert in WT-Mäusen in einer erhöhten Aktivität von MAP-Kinasen und ERK1/2, sowie NFKB und der Expression responsiver Gene (Cheng et al. 2008). Makrophagen erhöhen die Expression von CSF3 wenn TLR2 durch SAA aktiviert wird, und dies kann zu Neutrophilie führen (He et al. 2009).

SAA und Mechanismen der Inflammationsreaktion treten nicht nur bei akuten Entzündungsreaktionen auf, sondern sind Bestandteil des „inflammaging“ und tragen zur Alterung des Organismus bei (Dinarello 2006).

### 3.2.5 Auswirkung der Alterung auf Knochenhomöostase

Alter ist gekennzeichnet durch reduzierte Muskelmasse, erhöhten Körperfettanteil und reduzierte Knochenmasse, wobei 80% des Verlustes im trabekulären Knochen, dem Ort der höchsten metabolischen Aktivität, stattfindet (Duque 2008).

Beim Knochenverlust ist ein Unterschied zwischen den Geschlechtern zu beobachten, deutlich mehr Frauen leiden unter stark reduzierter Knochenmasse, die zusammen mit polygenetischen Faktoren öfter zu Osteoporose führen können als bei Männern (siehe 3.3.1) (Langsetmo et al. 2010). In Frauen führt der Östrogenmangel nach der Menopause zu erhöhter Osteoklastogenese und Präosteoblastenbildung, gleichzeitig wird die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten gefördert (Duque 2008). Männer erleiden keinen abrupten, sondern einen langsamen, graduellen Abfall des Androgenspiegels (Venken et al. 2008). Auch hier ist der Mangel an Östradiol, und nicht Testosteron, der entscheidende, knochenreduzierende Faktor. Es wird aber angenommen, dass sich die Knochenresorption bei Männern im Alter nicht erhöht, sondern der Knochenverlust auf mangelnde Knochenformation zurück zu führen ist (Meier et al. 2005).

Die Osteoklastogenese wird auch über Zytokine angeregt, wodurch mit der Alterung einhergehende chronische Inflammationskrankheiten, wie z.B. Osteoarthritis oder Rheumatoide Arthritis, und das „Inflammaging“ zur erhöhten Knochenresorption beitragen (Mundy 2007; Hardy and Cooper 2009).

Eine weitere Eigenschaft des alternden Knochens in Tier und Mensch ist die Akkumulation von Fett im trabekulären Teil des Knochens im Knochenmark und die damit einhergehende Verdrängung des Knochenmarks. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Adipozyten im Knochenmark mit dem Alter ansteigt (Duque 2008).

Alterung ist auch assoziiert mit der Verkalkung von weichem Gewebe, wie z.B. bei der Arteriosklerose, eine Krankheit bei der es in Blutgefäßen zur Bildung mineralisierter Ablagerungen kommt, ähnlich wie bei der Knochenmatrixmineralisierung (Anagnostis et al. 2009).

#### 3.2.5.1 Auswirkungen der Alterung auf MSC

Die Alterung von MSC wurde *in-vitro* intensiv studiert. Die Zellen treten in Kultur nach 20-40 Populationsverdopplungen in den Zustand der Seneszenz ein (Stenderup et al. 2003), gekennzeichnet durch Zunahme an Zellgröße, eine abgeflachten Morphologie, stärkere Ausprägung von dendritenartigen Ausläufern und positive  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung (Sethe et al. 2006). Humane MSC aus älteren Spendern treten früher in den Zustand der Seneszenz ein als hMSC aus jungen Spendern (Stenderup et al. 2003). Auch morphologisch gibt es Unterschiede zwischen hMSC aus Spendern verschiedenen Alters: hMSC isoliert aus jungen Spendern weisen zu Kulturbeginn eine spindelförmige Zellform auf, die in hMSC aus älteren Personen nicht oder kaum mehr auftritt. Mit der *in-vitro* Kultivierung nimmt die Anzahl an Zellen mit Spindelform ebenfalls ab (Baxter et al. 2004). Bei der Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zeigten sich bei hMSC aus Patienten variierenden Alters keine Unterschiede (Stenderup et al. 2003). Jedoch wird angenommen, dass  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung einen limitierten, und somit keinen geeigneten Marker für die *in-vivo*-Alterung darstellt (Severino et al. 2000).

Weitere Untersuchungen zu den Eigenschaften gealterter hMSC liefern widersprüchliche Ergebnisse. Es wurde postuliert, dass die Anzahl an CFU während der *in-vivo*-Alterung abnimmt (Baxter et al. 2004) oder aber sich nicht verändert (Stenderup et al. 2001). Auch wurde gezeigt, dass mit dem Alter die Größe der CFU abnimmt. Große Kolonien bestehen aus vielen spindelförmigen Zellen, während kleine Kolonien aus großen, abgeflachten (seneszenten) Zellen aufgebaut sind (Sethe et al. 2006).

Die Telomerlänge ist ebenfalls betroffen. Vergleiche zwischen MSC aus frühen Passagen und nach Kultivierung bis zur Seneszenz weisen deutliche Unterschiede in der Telomerlänge auf. Je kürzer die Telomere desto mehr Populationsverdopplungen haben die MSC durchlaufen. Dies korreliert mit der *in-vivo*-Situation: die Telomere von hMSC aus älteren Patienten sind nach identischer Kultivierungszeit kürzer als die Telomere von hMSC aus jungen Spendern (Bellantuono et al. 2009).

Widersprüche hingegen traten bei Untersuchungen zum osteogenen Differenzierungspotential auf: es wurden Hinweise gefunden, dass keine Unterschiede zwischen hMSC aus jungen Spendern verglichen mit hMSC aus älteren Spendern existieren (Stenderup et al. 2001). Die Mehrheit hingegen berichtet, dass das osteogene Differenzierungspotential proportional zum Alter der Spender abnimmt (Sethe et al. 2006). Diese Diskrepanzen könnten auf die Anwendung unterschiedlicher Methoden oder aber auch auf die Isolation der hMSC aus unterschiedlichem Gewebe zurückzuführen sein (Bellantuono et al. 2009).

Kein Einfluss des Alters der Spender konnte bei der Differenzierung von hMSC in die adipogene bzw. chondrogene Richtung festgestellt werden (Muraglia et al. 2000). Während der *in-vitro*-Kultivierung bis zur Seneszenz verlieren die Zellen jedoch die Fähigkeit, in Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren. Nur die adipogene Differenzierung wird nicht beeinflusst (Vacanti et al. 2005). *In-vivo* konnte dies bestätigt werden: alte hMSC präferieren die Differenzierung in die adipogene Richtung, wodurch sich der Fettanteil innerhalb des Knochens im Alter erhöht (Ross et al. 2000). Dieser „adipogene Umschalter“ wird auch als eine der Ursachen für die Entstehung der senilen Osteoporose aufgeführt (siehe 3.3) (Rosen et al. 2009).

Die differenzielle Genexpression in gealterten hMSC ist für ausgewählte Gene ebenfalls bekannt. TGF $\beta$  wird in gealterten hMSC geringer exprimiert, ebenso BMP2 und 4. Die Sekretion von IL6 als proinflammatorisches Protein steigt mit dem Alter des Spenders an (Sethe et al. 2006).

Die Akkumulation von ROS konnte bei der *in-vitro*- als auch der *in-vivo*-Alterung nachgewiesen werden (Young et al. 2001; Droge 2003); ebenso die Abnahme von Antioxidantien, wodurch die Zellen unter erhöhtem oxidativem Stress leiden (Sethe et al. 2006).

Die Alterung von Zellen wird auch durch extrinsische Faktoren stark beeinflusst. In *in-vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass bei Kultivierung von hMSC in Serum von gealterten Personen das osteogene Differenzierungspotential abnimmt, während sich das adipogene nicht verändert (Abdallah et al. 2006). In den Zellnischen der MSC könnten *in-vivo* ähnliche Wechselwirkungen ablaufen. Im Knochenmark wird das Wachstum der MSC z. T. durch hämatopoetische Zellen kontrolliert (Friedenstein et al. 1992). Eine Alterung dieser Immunzellvorläufer und damit einhergehender Funktionsverluste (Greenwood and Lansdorp 2003) könnte sich auch negativ auf die MSC auswirken. Auch Proteoglykane und Glycosaminoglykane können die Differenzierung von MSC – zumindest *in-vitro* – beeinflussen. Wenn die Synthese dieser Proteinkomplexe gestört wird, reduziert dies auch die MSC-Proliferation *in-vivo*. Eine Zunahme der Glykation – also das Anlagern von Kohlenhydratgruppen – an Kollagen wurde auch im alternden Organismus beobachtet und führt *in-vitro* zur Inhibition der Adhäsion von MSC an diese Kollagenfasern. Glykiertes BSA im Kultivierungsmedium inhibiert sogar die Proliferation und Differenzierung von MSC und erhöht die ROS-Akkumulation, sowie die Apoptoserate (Sethe et al. 2006).

Untersuchungen an hMSC aus gealterten Personen zeigten keine Abnahme der zellulären Antwort auf mechanischen Stress (Klein-Nulend et al. 2002).

Zusammengefasst beeinflusst die Alterung der MSC deren Proliferation und Differenzierungskapazität negativ. Dadurch stehen dem Organismus die nötigen Vorläuferzellen für die Knochenregeneration höchstwahrscheinlich nur noch begrenzt zur Verfügung (Fehrer and Lepperdinger 2005). Der Verlust von Selbstregeneration und Differenzierungskapazität der Stammzellen wirkt sich innerhalb des Organismus natürlich auch auf das umgebende Gewebe aus und trägt somit höchstwahrscheinlich zur Alterung des gesamten Organismus bei (Sethe et al. 2006; Bellantuono et al. 2009).

### 3.3 Osteoporose

#### 3.3.1 Gestörte Knochenhomöostase bei Osteoporose

Primäre Osteoporose ist eine polygenetische Erkrankung, die ab der 4. Lebensdekade gehäuft auftritt und durch eine starke Reduktion der Knochenmasse, vor allem trabekulär (Duque 2008), sowie verminderter Knochenfestigkeit und Knochendichte gekennzeichnet ist. Wie im gealterten Knochen kommt es zu erhöhter Knochenresorption und reduzierter Knochenformation. Östrogenmangel führt in beiden Geschlechtern zur Knochenresorption (Jilka 2003). Ca. 50% aller kaukasischen Frauen Ende 80 leiden an Osteoporose (Ralston 2005; Jakob et al. 2007). Zumindest bei Frauen ist die Grenze zwischen natürlichem, Alters-bedingtem Knochenverlust und Osteoporose offiziell festgelegt. Laut der Weltgesundheitsorganisation liegt eine Osteoporose vor, wenn die Knochenmineraldichte – gemessen mittels der Knochendichtemessung – um 2,5 Standardabweichungen unter dem statistischen Mittelwert gesunder, prämenopausaler Frauen liegt (Bartl 2008). Diese Frauen haben ein moderates bis starkes Risiko für Fragilitätsfrakturen, die ohne adäquate Krafteinwirkung zu Stande kommen (Langsetmo et al. 2010). Typischerweise betreffen diese Frakturen die Wirbelsäule, den Radius und den Femur.

Die größten Risikofaktoren der primären Osteoporose stellen neben dem Alter genetische Ursachen, Bewegungsmangel und bei Frauen die Menopause dar (Jakob et al. 2007).

Sekundäre Osteoporose ist nicht Alters-bedingt und tritt aufgrund unterschiedlichster Störungen auf, u.a. durch Hypogonadismus, hämatologische Erkrankungen, Metastasierung eines Tumors oder medikamentös (Bartl 2008). Zum Beispiel führt Langzeitgabe von Glucocorticoiden (de Gregorio et al. 2006) oder Protonenpumpenhemmern (Sipponen and Harkonen 2010) zum Knochenverlust.

Im Folgenden wird jedoch ausschließlich auf die senile bzw. primäre Osteoporose eingegangen.

#### 3.3.2 Ursachen für Osteoporose

##### 3.3.2.1 Alterung

Der gealterte Körper neigt zum Knochenverlust (siehe 3.2.5), hauptsächlich bedingt durch Veränderungen im Hormonspiegel (siehe 3.3.2.2). Fast alle monogenetischen Mausmodelle für frühzeitige Alterung – z.B.  $HELLS^{-/-}$ ,  $Klotho^{-/-}$ ,  $FGF23^{-/-}$  – weisen eine Osteoporose auf (Kuro-o 2001; Shimada et al. 2004; Sun et al. 2004), wobei diese genetischen Defizienzen den Knochenmetabolismus nicht zwangsläufig direkt beeinflussen müssen. Alterung steht auch indirekt mit der Knochenumbaurate in Zusammenhang. Z. B. kann die Haut von gealterten Menschen bei Sonneneinstrahlung weniger effizient Vitamin D3 produzieren (Bandeira et al. 2006). Des Weiteren ist die Kalziumabsorption in Dünndarm (Marks et al. 2007) und im Magen durch reduzierte Säureproduktion (Bhutto and Morley 2008) ebenfalls reduziert.

Die ganzheitliche Alterung des Organismus stellt somit einen der größten Risikofaktoren für die Entstehung von Osteoporose dar.

##### 3.3.2.2 Veränderungen im Hormonspiegel

Der mit dem Alter sinkende Östrogenspiegel leitet die erhöhte Knochenresorption ein. Bei Frauen geht die Östradiol-Synthese in den Ovarien abrupt zurück, so dass postmenopausal nur noch ein schwächeres Sexualhormon – das Östron – aus Androgenen in der Nebenniere produziert wird (Chahal and Drake 2007). Bei Männern fällt der Androgenspiegel langsamer und kontinuierlich ab, wodurch auch die Östradiol-Synthese sinkt. Die geschlechtsspezifische, unterschiedliche Expression von Östrogen führt dazu, dass – gemessen über die gesamte Lebensspanne – im Gegensatz zu Frauen (40%) nur 15% der Männer ein Risiko für Fragilitätsfrakturen entwickeln (Venken et al. 2008). Die

Behandlung von Osteoporose-Patienten mit Östrogen oder Raloxifen (selektiver Östrogenrezeptor-Modulator) erhöht die Knochendichte wieder, hat aber viele negative Nebeneffekte (Sweet et al. 2009)

Im Alter ist eine Abnahme von Vitamin D3 zu beobachten, bedingt u.a. durch reduzierte Vitamin D3-Produktion in der Haut und Abnahme der VDR-Expression im Magen. Dadurch kommt es zu einem Kalzium-Mangel, der wiederum die PTH-Synthese anregt. Über längere Zeit hohe PTH-Spiegel erhöhen die Knochenresorption (Lips 2006). Die Basistherapie bei Osteoporose-Patienten ist die gleichzeitige Kalzium- und Vitamin D3-Supplementation, wodurch das Risiko von Fragilitätsfrakturen in älteren Personen um bis zu 12% reduziert werden kann (Rahmani and Morin 2009).

### 3.3.2.3 Verhalten

Mechanische Belastung fördert den Knochenaufbau (siehe 3.1.3.4), daher kann Bewegungsmangel in der Jugend und im Alter zu reduzierter Knochendichte führen. Von einigen Arbeitsgruppen wurde postuliert, dass dies u.a. auch auf den altersbedingten Verlust der Mechanosensitivität zurückzuführen ist (siehe 3.3.3). Jedoch konnte die Knochendichte in postmenopausalen Frauen durch Einführung eines speziellen Bewegungsprogrammes wieder erhöht werden (Lirani-Galvao and Lazaretti-Castro). Neben Bewegungsmangel sind Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, geringe Kalziumaufnahme in der Kindheit und Adoleszenz, sowie geringe Bestrahlung mit Sonnenlicht weitere psychosoziale Faktoren, die Osteoporose begünstigen. Der Mechanismus, mit dem Tabakkonsum den Knochenmetabolismus beeinflusst, ist noch nicht genau bekannt, jedoch konnte eine Korrelation zwischen Höhe des Zigarettenkonsums und Abnahme der Knochendichte festgestellt werden. Übermäßiger Alkoholkonsum kann über Leberschäden, Hypogonadismus oder Nährstoffdefizite den Knochen indirekt negativ beeinflussen. Alkohol wirkt sich jedoch auch direkt aus, indem der exzessive Genuss die Knochenmineralisierung stört und die PTH-Synthese erhöht (Metcalf 2008)

### 3.3.2.4 Genetik

Osteoporose ist eine polygenetische Erkrankung, deren Entstehung nicht durch eine einzelne Genmutation oder einen einzigen Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) hervorgerufen werden kann. Dennoch sind die Varianzen in der Knochendichte zu 60-85% genetisch determiniert, und prämenopausale Frauen mit einer geringen Knochenmasse sind besonders gefährdet, in späteren Jahren eine Osteoporose zu entwickeln (Ralston 2005; Kawaguchi 2006). Es wurden mittlerweile einige Gene identifiziert, die mit geringer Knochendichte in Zusammenhang gebracht werden. Die Proteine dieser Gene sind oft Schlüsselfaktoren für die Hormonelle Steuerung der Knochenformation oder wichtiger Signalwege.

Viele SNP des *VDR*-Gens sind mit geringer Knochendichte assoziiert (Liu et al. 2006b), ebenso zwei SNP im Exon 4 des Gens für *Klotho* (Kawaguchi 2006), wodurch die Vitamin D3 Signalgebung beeinflusst wird.

Auch die Signalwirkung von Östrogen kann durch SNP verändert werden. Ein spezieller, homozygoter Polymorphismus im *ESR1*-Gen erhöht dessen mRNA-Produktion oder -Stabilität, wodurch letztendlich die Knochendichte erhöht und das Frakturrisiko reduziert wird.

Der WNT-Signalweg ist ebenfalls betroffen. Inaktivierende Mutationen in *LRP5* führen rezessiv zum Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom, während aktivierende Mutationen autosomal dominant die Knochendichte erhöhen (Ralston 2005). Auch WNT-Inhibitoren, wie Sclerostin, sind Kandidaten für die Osteoporose. Eine erhöhte Konzentration des Proteins wurde im Serum von Patienten mit immobilisationsbedingtem Knochenverlust nachgewiesen (Gaudio et al. 2010).

Die Verfettung des Knochenmarks ist ebenfalls ein Marker für gealterten Knochen und die Aktivierung des Adipogenese-fördernden Proteins *PPARG* wird mit reduzierter Knochendichte in Zusammenhang gebracht.



SNP in Wachstumsfaktoren wie *IGF1* und *TGFB1* sind auch bekannt. Ein SNP im Promotor von *COL1A1* beeinflusst die Bindung des Transkriptionsfaktors SP1 negativ (Ralston 2005).

Das RANKL/RANK/Osteoprotegerin-System ist ebenfalls betroffen, in den Genen aller 3 Proteine – *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B* und *TNFRSF11* – wurden SNP mit geringer Knochendichte assoziiert gefunden (Richards et al. 2009).

### 3.3.3 MSC und Osteoporose

Ebenso wie bei *in-vivo*-gealterten MSC gibt es auch bei MSC (MSC-OP) aus Patienten mit primärer Osteoporose widersprüchliche Ergebnisse zum Stammzellcharakter der Zellen. Stenderup et al. (2001) stellen keine Unterschiede in Proliferation oder osteogener Differenzierungskapazität von hMSC aus jungen, alten oder osteoporotischen Spendern fest. Diesen Daten widersprechend, postulieren Rodriguez et al. (1999) eine geringere Wachstumsrate und beeinträchtigte Differenzierung in die osteogene Richtung von MSC-OP verglichen mit Kontroll-MSC aus Patienten identischen Alters. Ein zugunsten der Osteoklastogenese verändertes Osteoprotegerin:RANKL-Verhältnis konnte nach osteogener Differenzierung vom MSC-OP ebenfalls detektiert werden (Dalle Carbonare et al. 2009).

Gegensätzliche Resultate erzielten auch Versuche zur Adipogenese. Zum einen wurden keine Unterschiede zwischen hMSC und hMSC-OP festgestellt (Justesen et al. 2002), zum anderen konnte eine erhöhte adipogene Differenzierungskapazität in hMSC-OP detektiert werden (Rodriguez et al. 2000). Letzteres ging einher mit erhöhter TGFB-Expression und verringerter COL1-Produktion.

Auch die Mechanosensitivität in hMSC aus Osteoporose-Patienten ist verändert, sie produzieren u.a. weniger Prostaglandin E2 (Sterck et al. 1998).

## 3.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, welche funktionellen Einschränkungen durch Alterung in MSC entstehen. Zu diesem Zweck wurde das Genexpressionsmuster mit Hilfe von Mikroarray-Analysen in *in-vitro*-gealterten und *in-vivo*-gealterten humanen MSC untersucht.

Im *in-vitro*-Alterungs-Modell wurden hMSC aus Patienten mittleren Alters isoliert und bis zur Seneszenz kultiviert. Die Gene mit differentieller Expression beim Vergleich von hMSC früher Passagen und seneszenten Passagen gaben Aufschluss über die Funktionsveränderungen in den Zellen aufgrund von Seneszenz. Es wurden ebenfalls Mikroarrays mit hMSC aus älteren Patienten durchgeführt, um einen Vergleich zwischen *ex-vivo*- und *in-vitro*-gealterten hMSC anzustellen und die Eignung der *in-vitro*-Alterung als Alterungsmodell bestimmen zu können.

Da Osteoporose eine Erkrankung des gealterten Knochens darstellt, wurden auch hier Genexpressionsanalysen durchgeführt. Der Vergleich mit den Ergebnissen aus der *in-vivo*-Alterung ergab jene Gene, die ausschließlich aufgrund der Osteoporose differentiell exprimiert sind.

Über monoklonale Systeme wurde die Funktion ausgewählter Gene und ihre Bedeutung für den Stammzellcharakter von hMSC analysiert, um Kandidatengene zu finden, die direkten Einfluss auf Alterung bzw. auf die Entstehung von Osteoporose ausüben.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

ABI PRISM 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Accu-jet Pipettierer	Brand, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
AxioCam MRC	Zeiss, Jena, Deutschland
Axioskop 2	Zeiss, Jena, Deutschland
Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank, Inkubator HERAcCell 240	Heraeus, Kleinostheim, Deutschland
Consort E835 Power Supply	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
DNA-Engine Opticon für Real Time PCR	BioRad, München, Deutschland
Elektrophoresekammern	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gene Pulser® II	BIO-RAD, München, Deutschland
GeneChip Scanner 3000	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK
Hochleistungs pH-mV-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Micro-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microplate-Reader, Tecan Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Mikropipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Wilovert, Heinse Ziller, Hund, Bonn, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland
Perfect Blue™ `Semi Dry'-Blotter Sedec™ M	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipetboy	BRAND, Wertheim, Deutschland
SDS-PAGE-Kammer (Protean II xi Cell)	BioRad, München, Deutschland
Sonifikator Sonoplus	BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus Lamin Air®, Burladingen, Deutschland
Thermocycler MJ Research	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Thermocycler peQSTAR	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler Primus	MWG-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland
Thermocycler Primus 25	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
UV-Transilluminator mit Video, Kamera Modul	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterial

NucleoSEQ Columns	Macherey-Nagel, Düren , Deutschland
PCR Softtubes 0,2ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Oprical Flat Cap Stripes	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
LP Strip Tubes, 8-Strip, weiß	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Elektroporationsküvetten, 2mm	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PVDF-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Blotting Papier, Typ: Whatman 3MM Chr	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner, Essen, Deutschland
Pipettenspitzen	Abimed, Langenfeld, Deutschland
25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber 24cm, 30cm	Biochrom, Berlin, Deutschland
6 well, 12 well, 96 well Platten	Greiner, Essen, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Essen, Deutschland
Sequenzierungscap	ABIMED Analysentechnik GmbH, Langenfeld, Germany
Kryoröhrchen	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Leb-Tek Chamber Slides (4-Well)	nunc, Rochester, NY, USA
Filter (0,2 mm, 0,45 mm)	Satorius Stedim biotech, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Röntgenfilm	Amersham, erhalten von GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

#### 4.1.3 Chemikalien/ Reagenzien

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agar	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Agarose	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Agarose	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Alizarin Rot S	Chroma-Gesellschaft Schmidt & Co., Stuttgart, Deutschland
Aluminiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumsulfatlösung (25%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Ammoniaklösung (25%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Azeton	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Borsäure	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) für Zellkultur	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
BSA für Restriktionsenzyme (100x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Cruz Protein-Marker™	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
dNTP Set	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
EDTA	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Ethanol	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Glycerin-Gelantine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol Gelantine	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Hefeextrakt	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Hi-Di-Formamide	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Horse Serum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
HPLC-H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
KCl	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
K-Hexacyanoferrat II	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
K-Hexacyanoferrat III	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Loading-Dye (6x)	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Methanol	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
M-MLV-Puffer (5 x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
N,N-Dimethyl-Formamid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
NaCl	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neomycin (G418-Sulfat)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

Oligo-(dT)-Primer	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
O-Nitrophenyl-Galaktopyranosid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Puffer S (10 x)	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PCR-Puffer Y (10 x)	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
peQGold 100bp DNA Leiter Plus	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
peQGold 1kbp DNA Leiter	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
peQGold Protein-Marker V	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Proteininhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzym-Puffer 1-4	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Roti®-Quant	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 40 (40 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green I (10000 x) nucleic acid gel stain	BioWhittaker Molecular Application, Rockland, ME, USA
T4-DNA-Ligase-Puffer (x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Tris	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Tris-Cl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TritonX-100	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Trypton	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Vectashield Hard mit DAPI	Vector Laboratories Inc., Linaris Biolog. Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland
Xylencyanoblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Zitronensäure	AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

#### 4.1.4 Kits

Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleo Spin® Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleo Spin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
peqGOLD Gel Extraction Kit	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pcDNA™3.1/V5-His TOPO® Expression Kits	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
GeneChip®3'IVT Express Kit	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK
GeneChip HG-U 133 Plus 2.0	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK

## 4.1.5 Primer

### 4.1.5.1 Primer für semi-quantitative PCR

Alle Primer für die semi-quantitative PCR wurden von der Firma biomers.net GmbH in Ulm, Deutschland bezogen.

**Tab. 1** Liste der verwendeten Primer für semi-quantitative PCR, inklusive Sequenzen, Länge des PCR-Produktes in bp, Annealing-Temperatur ( $T_A$ ) und  $MgCl_2$ -Konzentration in mM. Für mit einem \* gekennzeichnete Primer wurde in der PCR-Reaktion der PCR-Puffer Y verwendet, für alle anderen Reaktionen PCR-Puffer S.

Gen	Sequenz vorwärts [5' → 3']	Sequenz revers [5' → 3']	Amplikon -Länge [bp]	$T_A$ [°C]	$MgCl_2$ [nM]
ALPL	TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA	ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	490	51	1,5
BGLAP	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	293	58	1,5
BMI1	CTCTGGGAGTGACAAG	AAGAAGATTGGTGGTT	167	38	2,0
CA2	CATGCTTTCAACGTGGAGTT	GTGGTCAGTGAGCCTGGGTA	415	54	2,0
CCNB1	GATGGAGCTGATCCAAAC	CTCCTGCAACAACCTGAA	186	52	2,0
CD24	AGGGCAATGATGAATGAGAAT	CTGGGCGACAAAGTGAGA	163	58	2,0
CDH1	ACTGGACCATTAGTACAAC	GAACCGCTTCCTCATAG	610	54	2,0
CDKN2A	GGTGCGGGCGCTGCTGGA	AGCACCACCAGCGTGTCC	210	46	1,5
CENPM	GGTGAAGGCTTTAGGG	CAGGCTCTGCAAGAGTGA	376	54	2,0
CNTN3	AGCCCAAGCCTTCTACCGA	CATGCTCTGCACGCTCACA	330	56	2,5
COL10A1	CAGGCAACAGCATTAT	CATTTGACTCGGCATT	251	46	2,0
COL14A1	AGAATATGTCACTTACTCCTACTT GC	CAACCCCTGGAACACACTGC	304	50	2,5
COL4A4	CCCATGATGCCACTCT	GGAATAACCACGACAAA	564	47	2,0
COMP	AGCATGCAGACTGCGTCC	CTTCTGGGACCGGCAGT	310	60	2,0*
CTNNB1	AGAGTAGCTGCAGGGGTCCT	TCTTGTGGCTTGTCTCAGA	170	60	3,0
CTS2	TTTCTGTGGCTGGGTG	TCGATGGCAAGGTTGT	151	54	2,0
DHFR	GGTTGGTTCGCTAAACTG	AACACCTGGGTATTCTGG	496	50	1,5
DKK1	ATGATGGCTCTGGGCGCAG	TTAGTGTCTCTGACAAGTGTGA	800	60	2,5
DPP4	AAGAGGCGAAGTATTATCAGC	GTAAGTGGCCAGTTCAGTC	311	56	2,5
EEF1A1	AGGTGATTATCCTGAACCATCC	AAAGGTGGATAGTCTGACTGTTG	235	54	1,5
EGR2	ATGGGAGGAACATAGC	CAAGGCACCAAGGACA	244	50	2,5
ESR1	AAAGGTGGGATACGAAA	CAAGAGCAAGTTAGGAGC	477	48	2,0
FAS	CTTTCACTTCGGAGGATT	TCAGTCACTTGGGCATT	115	44	2,5
FGFR2	CTCCTCCATGAACTCCAAC	CTGGCTTATCCATTCTGTG	872	53	2,0
GPR116	ACTGACCAAATTACCGACAT	CAACTTGTTTATTGGCTTTA	469	53	2,5
HELLS	ATGCTGCCAGAACTAA	TGTAACAAGGCGATAA	354	46	2,0*
HMMR	AAGTGGCGTCTCCTCTATGA	CGATTTGAGTTGGCTATTTT	228	55	2,0
IBSP	GCCTGTGCTTTCTCAA	ACTTCTGCTTCGCTTT	467	46	2,5

IGFBP5	GAATCCTTTGCGGTCACAAT	GACCGCAGAAAGAAGCTGAC	210	55	1,5
MAB21L2	TGGGTGCTACAGTTCG	CAGGCAGGAGATGAGC	246	50	2,0
MAP4	TGTGGAAGCCTTAAACTC	TCAGTCCCATCATTATTTTC	164	48	2,0
MMP1	AAATCCCTTCTACCCG	AGCACATTCTGTCCCT	156	53	1,5
MMP3	CACTTCAGAACCTTTCCTGGCATC	GCTTCAGTGTGGCTGAGTG	406	55	1,5
NOG	GCCAGCACTATCTCCACA	CAGCAGCGTCTCGTTCA	119	50	2,5
NR3C2	TTCGGATTCTTCATTCTCAG	GCATCCTGAAGCCTCATCCC	585	58	2,5
NRCAM	GGCGTCTGAGCAGTATTTGA	CGATAGCCTTGTAGGTGTCC	444	59	3,0
OCT4	CCGCCGTATGAGTTCTGTG	GATGGTCGTTTGGCTGAATA	360	59	2,5
PCDH10	GACCGACCTGATGTTTCTTA	CTATCTCCCTGTTCACTGTCTC	270	56	2,5
PDGFA	GGGTCCATGCCACTAAG	CAGCGTTTCACCTCCAC	187	50	2,5
PSG1	TGAAGTCAGCCTTGGTTTGG	TTTCCCTCTATGGGCATCTC	240	54	2,5
PSG5	TACAAAAGGACAACTGATGGACC	CTGGGGAGGTCTGGACCAT	289	54	2,5
PTGS2	GCTGTCCCTTTACTTCATTC	TGGCATCTTGTGATAGTGTT	500	55	2,0
PTH1R	AGAGGAACAGATCTTCTGCT	GTAGTCCGGACAGGGCACA	301	60	2,5
RGS4	AGTCCCAAGGCCAAAAAGAT	ACGGGTTGACCAAATCAAGA	220	55	1,5
RPS6KA2	GACGCAGCTAAAGACG	AGAGCAAAGTAGGTGGC	179	45	2,0
RUNX3	CTGGTGATCCTATTCCATTCCC	CCACTTTGGGCCTTACAGACG	378	64	2,0
SAA1 <sup>a</sup>	AGCACCATGAAGCTTCTCA	TGTACCCTCTCCCGCTT	452	45	2,0
SAA1 <sup>b</sup>	ACATCGGCTCAGACAAAT	TTTCCACAAATTCACCT	352	45	2,0
SAA2 <sup>a</sup>	TCAGCTACAGCACAGATCAG	TCTCAGCTTCTCTGGACATA	418	54	2,0
SAA2 <sup>b</sup>	TCAGCTACAGCACAGATCAG	GATGCCTATTATATGCCAT	507	54	2,0
SECTM1	CCCTTGGGACCCTCCTGTTT	AGAAGGCGTTGGAGATGTTGC	141	60	2,5
SFRP4	CGAGGAGCTGGTGGACGTGAACT G	TCGAGGGATGGGTGATGAGGACT TGAA	420	56	1,5
SOST	CTCTGCCACTAACTTGCT	GGCGGATGTGATTTCTA	480	50	2,0
SOX11	GGAGGAGGTGAGAAAGGAAAT	GAAGTATAGAAACTCGCATCG	276	61	2,5
SPP1	ACGCCGACCAAGGAAAATC	GTCCATAAACCACACTATCACCTC G	443	51	1,5
TGFB1	TGGTGAAACCCACAACG	AAGGCGAAAGCCCTCAAT	320	54	2,5
TGFB2	CCAAAGGGTACAATGCCAACT	GGACACGCAGCAAGGAGAAG	134	56	2,0
TK1	TCCCTGACATCGTGGAGTT	TGCCGAGCCTCTTGGTAT	198	50	2,5
TNFRSF11	AAGGAGCTGTGCAAAGGAA	ACTTGGGATTTTGTGCTGG	382	60	2,5
TP53	CCTCCTCAGCATCTTATCCG	GCACAAACACGCACCTCAAA	260	56	1,5
VEGFA	TCTTCAAGCCATCCTGTGTG	TGTTGTGCTGTAGGAAGCTCA	165	59	2,5
WNT5B	ATTACTGTCTGTCCACCACG	TCCCGCCACCTTCATAG	149	56	2,0

#### 4.1.5.2 Sequenzierungsprimer

Tab. 2 Liste der verwendeten Primer für Sequenzierungs-PCR, inklusive Sequenzen. Primer für SAA sind komplementär sowohl für SAA1 als auch SAA2.

Gen/Vektor	Elongationsrichtung	Sequenz 5' → 3'
SAA1/SAA2	vorwärts	GTGCGGAGGACTCGCTGG
SAA1/SAA2	vorwärts	ACTTCCATGCTCGGGGGAAC
SAA1	vorwärts	AGCACCATGAAGCTTCTCA
SAA1	rückwärts	TGTACCCTCTCCCCGCTT
SAA2	vorwärts	TCAGCTACAGCACAGATCAG
SAA2	rückwärts	TCTCAGCTTCTCTGGACATA
pcDNA3.1(+)	rückwärts	TAGAAGGCACAGTCGAGG
pcDNA3.1(+)	vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGG

#### 4.1.6 Enzyme

BamHI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
DNase	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
EcoRV	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RNase	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SSP1	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

#### 4.1.7 Antikörper

##### 4.1.7.1 Primärantikörper

Alle Primärantikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland, bezogen.

Tab. 3 Liste der verwendeten Primärantikörper. Alle Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland, bezogen.

Antikörper	Bezeichnung	Details
anti-HELLS	Lsh (H-4)	mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>
anti-P16	p16 (C-20)	rabbit polyclonal IgG
anti-GAPDH	GAPDH (A-3)	mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>



#### 4.1.7.2 Sekundärantikörper

Tab. 4 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Antikörper	Bezeichnung	Konjugat, Host-Spezies	Firma
anti-rabbit	Northern Lights™ Anti-rabbit IgG	NL-557, donkey	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
anti-rabbit	Anti-rabbit IgG (whole molecule)	Peroxidase, goat	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
anti-mouse	Northern Lights™ Anti-rabbit IgG	NL-557, donkey	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
anti-mouse	Anti-mouse IgG (Fc Specific)	Peroxidase, goat	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

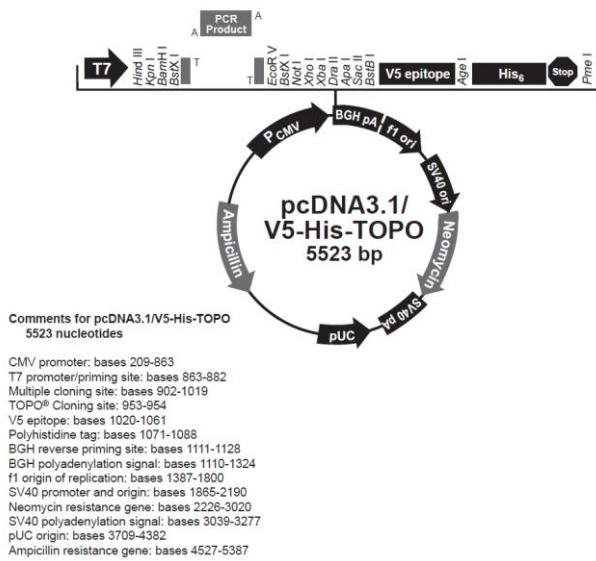
#### 4.1.8 Proteine

Recombinantes, humanes Apo-SAA1 (rhSAA1)	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
Mouse IgG <sub>1</sub>	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Rabbit IgG	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

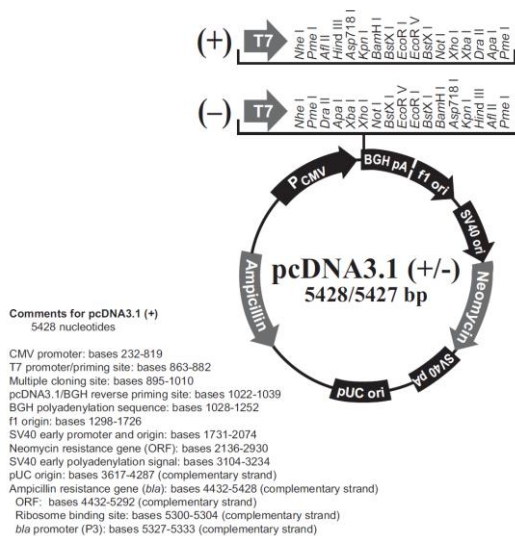
#### 4.1.9 Kompetente Bakterien

One Shot® Stbl3™ Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
NEB 5-alpha Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

### 4.1.10 Vektoren



**Abb. 5** Vektorkarte von pcDNA™ 3.1/ V5-His TOPO® aus dem pcDNA™ 3.1/ V5-His TOPO® Expression Kit von Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland



**Abb. 6** Vektorkarte pcDNA™ 3.1 (+) und (-) von Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der pcDNA™ 3.1 (+) verwendet.

### 4.1.11 Software und Internet-Seiten

ABI PRISM 310 Collection

ABI PRISM Sequencing Analysis v 3.4

AxioVision 4.4.1.0

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

Zeiss, Jena, Deutschland

BioCapt MW, Version 99	LTF, Wasserburg, Deutschland
BioEdit	Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA
BioProfil Bio I.D., Version 99	LTF, Wasserburg, Deutschland
DNA Engine Opticon <sup>®</sup> 2	BioRad, München, Deutschland
GeneChip Operating Software 1.2	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK
Significance Analysis of Mikroarrays	Tool erhalten von <a href="http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/">http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/</a>
Spotfire DecisionSite for Functional Genomics 9.1.1	TIBCO Software Inc., Göteborg, Schweden
GOstat Analysis	<a href="http://gostat.wehi.edu.au">http://gostat.wehi.edu.au</a>
NCBI Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
NCBI Blast	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE_TYPE=BlastHome">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE_TYPE=BlastHome</a>
GeneCards	<a href="http://www.genecards.org">http://www.genecards.org</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>
Affymetrix NetAffx Analysis Center	<a href="http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx">http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx</a>

#### 4.1.1 Lösungen für Molekularbiologie und Proteinbiochemie

##### 10 x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer), pH 8,3

0,89 M	Tris
0,89 M	Borsäure
0,2 M	EDTA (pH 8)
Add a 1 l	Aqua bidest.

##### DNA-Ladepuffer

5,4 M	Glycerol
0,5 M	EDTA (pH 8)
4,64 mM	Xylencyanoblau
3,73 mM	Bromphenolblau
Add a 50 ml	Aqua bidest.

##### DNA-Marker

0,05 µg/µl	peQGold 100bp/ 1kb DNA Leiter
0,6 x	Loading Dye
Add a 1 ml	Aqua bidest.

##### dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)

dATP	20 mM
dCTP	20 mM
dGTP	20 mM
dTTP	20 mM
Add a 100 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O

10 x MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)

220 mM	MOPS
50 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA
Add a 50 ml	HPLC-H <sub>2</sub> O

Denaturierungs-Mix

10 %	deionisiertes Formamid
7,4 %	Formaldehyd (pH > 4)
1,5 x	MOPS
1,4 x	DNA-Ladepuffer
Add a 10 ml	HPLC-H <sub>2</sub> O

10 x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH 7,6

1,37 M	NaCl
27 mM	KCl
0,1 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,76 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Add a 1 l	Aqua bidest.

10 x TBS (Tris-gepufferte Saline), pH 7,2 - 7,4

0,2 M	Tris-base
1,5 M	NaCl
Add a 1 l	Aqua bidest.

1 x TTBS (Tween Tris-gepufferte Saline ), pH 7,2 - 7,4

1 %	Tween-20
1 x	TBS
Add a 1 l	Aqua bidest.

Homogenisationspuffer

50 mM	Tris (pH 7,5)
1 mM	EDTA
Add a 50 ml	HPLC-H <sub>2</sub> O

2 x Laemmli-Puffer

100 mM	Tris-Cl (pH 6,9)
200 mM	Dithiothreitol
4 %	SDS
0,2 %	Bromphenolblau
20 %	Glycerol
2 %	β-Mercaptoethanol

1 x Laufpuffer

200 mM	Glycin
25 mM	Tris-Cl
0,1 %	SDS
Add a 1 l	Aqua bidest.

10 x Transferpuffer (4 °C)

0,25 M	Tris
2 M	Glycin
20 %	Methanol
Add a 1 l	Aqua bidest.

Blocklösung für Western-Blot

2,5 %	Magermilchpulver
2,5 %	BSA
2,5 %	Horse Serum
Add a 100 ml	1 x PBS/ 0,1 % Tween

Stripping Buffer

62,5 mM	Tris-HCL (pH 6,8)
100 mM	β-Mercaptoethanol
2 %	SDS

Zitrat-Azeton-Formaldehyd-Lösung

24,5 %	Citrate Solution (Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit No. 86C)
63,7 %	Aceton
3,02 %	Formaldehyd (37 %)

Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierlösung

2 %	Formaldehyd
0,2 %	Glutaraldehyd
Add a 50 ml	1 x PBS

0,2 M Zitronensäure/Na-Phosphat (pH 6,0)

36,85 %	0,1 M Zitronensäurelösung (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O)
63,15 %	0,2 M di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)

β-Galaktosidase-Färbelösung

1 mg/ml	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)
40 mM	Zitronensäure/Na-Phosphat (pH 6,0)
5 mM	K-Hexacyanoferrat II
5 mM	K-Hexacyanoferrat III
150 mM	NaCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
Add a x	ddH <sub>2</sub> O

SA-β-Gal-Lösung

50 mM	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (pH 5,1)
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
40 mM	β-Mercaptoethanol
5 mM	O-Nitrophenyl-Galaktopyranosid
Add a 200 µl	ddH <sub>2</sub> O

Alizarin Rot S-Lösung

1 %	Alizarin Rot S (Alizarin sulfosaures Natrium)
0,25 %	Ammoniaklösung (25 %)
Add a 100 ml	ddH <sub>2</sub> O

Kernechtrot-Lösung

0,5 g/l	Aluminiumsulfat
0,01 g/l	Kernechtrot
Add a 100 ml	Aqua bidest.

Trypanblau-Lösung

0,4 %	Trypanblau
0,9 %	NaCl
Add a 40 ml	Aqua bidest.

#### 4.1.2 Bakteriennährmedien/-nährboden

---

LB-Medium(pH 7,0)

5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Trypton
10 g/l	NaCl
50 µg/ml	Ampicillin oder Kanamycin (nach dem Autoklavieren)
Add a 800 ml	Aqua bidest.

LP-Platten

10 g/l	Agar
Add a 800 ml	LB-Medium

SOC-Medium (pH 7,0)

5 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Trypton
0,5 g/l	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,02 M	Glucose
Add a 1 l	Aqua bidest.

#### 4.1.3 Zellkulturmedien

---

Alle Nährlösungen und Reagenzien für die Arbeit mit eukaryotischen Zellen wurden von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland, bezogen, mit Ausnahme von Ascorbat (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland).

hMSC-Medium

500 ml	DMEM Ham`s F12
10 %	FCS (fetal calf serum)
1 x	Penicillin/Streptomycin (100x)
50 µg/ml	Ascorbat

hMSC-TERT-Medium

500 ml	DMEM with Earle`s Salt
10 %	FCS (fetal calf serum)
1 x	Penicillin/Streptomycin (100x)
1 %	L-Glutamin

### Osteogenes Differenzierungsmedium

500 ml	DMEM High Glucose (4,5g/l)
10 %	FCS (fetal calf serum)
1 x	Penicillin/Streptomycin (100x)
50 µg/ml	Ascorbat
10 mM	β-Glycerophosphat
100 nM	Dexamethason

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Isolation von zellulärer RNA

Unabhängig von Zelltyp oder Behandlung wurden Zellmonolayer aus 75 cm<sup>2</sup> oder 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mittels des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kits von Macherey-Nagel isoliert. Hierbei wurden die Zellen nach gründlichem Entfernen des Kulturmediums mit 700 µl RA1-Puffer und 7 µl β-Mercaptoethanol lysiert und einem Zellschaber vom Flaschenboden abgekratzt. Nach Überführung in ein steriles, RNase-freies 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die RNA-Isolation erfolgte nach den Protokollen des Herstellers. Die gereinigten Proben wurden nach Zugabe des gleichen Volumens an 70%igen Ethanol auf Silikagelmembran-Säulen pipettiert. Zur Eliminierung unerwünschter genomischer DNA wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt. Sonstige Schmutzstoffe wurden mittels entsprechender Waschpuffer entfernt, gefolgt von der Eluation in 40 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Um die Konzentration an RNA zu erhöhen, wurde der letzte Schritt wiederholt, indem der Durchfluss erneut auf die Säule aufgetragen wurde. Nach Bestimmung der Konzentration wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe eines Biophotometers konnte die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden in einer UV-durchlässigen Küvette 48 µl 1 mM TRIS-HCL (pH 7,5) bzw. HPLC-H<sub>2</sub>O mit 2 µl isolierter RNA bzw. DNA gemischt. Als Referenzwert diente 1 mM TRIS-HCL (pH 7,5) oder HPLC-H<sub>2</sub>O ohne Zugabe von Nukleinsäuren. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA, wobei ein OD<sub>260</sub> von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Absorptionsmessungen von Proteinen, sowie von organischen Substanzen (z.B. Phenol) wurden bei 280 nm bzw. 230 nm durchgeführt. Mittels der Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> und OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> konnte die Reinheit der Proben bestimmt werden. Reine RNA liegt bei einem OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von 2,0 vor; DNA sollte einen OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> > 1,8 aufweisen. In beiden Fällen ist eine Verunreinigung durch organische Substanzen ab einem OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> > 2,0 ausgeschlossen.

#### 4.2.1.3 Reverse Transkription

Reverse Transkription ist ein Vorgang, bei dem ausgehend von einem mRNA-Template mittels einer Reversen Transkriptase komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) generiert werden kann. Je 1 µg RNA wurde hierfür mit Oligo-(dT)-Primern (50 pmol/µl) versetzt und auf 18 µl mit HPLC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Denaturierung von sekundären RNA-Strukturen, sowie Bindung der Oligo-(dT)-Primer an Poly(A)-Sequenzen der mRNA wurden durch 5-minütige Denaturierung bei 70 °C mit anschließender

Inkubation auf Eis erreicht. Der Ansatz wurde mit einem Mix aus 1 x M-MLV Puffer, 0,8 mM dNTP, 8 U/μl M-MLV Reverse Transkriptase und HPLC-H<sub>2</sub>O auf 25 μl aufgefüllt. Die Elongation der cDNA – gestartet mittels der Oligo(dT)-Primer – erfolgte im Thermocycler bei 42 °C für 1 h und wurde abgestoppt durch eine finale, 10-minütige Inkubation bei 95 °C.

Alle cDNA-Proben wurden nach der Reversen Transkription mit 25 μl HPLC-H<sub>2</sub>O verdünnt.

Um eine genomische DNA-Kontamination ausschließen zu können, wurde bei jeder Reversen Transkription eine Negativ-Kontrolle ohne RNA pipettiert. Diese wurde mittels des Haushaltsgens *EEF1A1* bei der semi-quantitativen PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft.

#### 4.2.1.4 Semi-quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion dient zur Detektion und Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels spezifischer Primer und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase.

Der Standard-Ansatz für die PCR setzte sich folgendermaßen zusammen: 1 x PCR-Puffer S (inklusive 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) oder PCR-Puffer Y (inklusive 20 mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5 mM dNTP, 0,5 pmol/μl spezifischer sense-Primer, 0,5 pmol/μl spezifischer antisense-Primer, gegebenenfalls zusätzlichem MgCl<sub>2</sub> (siehe 4.1.5) und 0,03 U/μl hitzestabiler *Taq* DNA-Polymerase. Pro Ansatz wurden 40 ng cDNA eingesetzt. Die PCR-Reaktion besteht aus einer Kette von sich wiederholenden Temperaturgefällen, beginnend mit einem Denaturierungsschritt, um DNA-Doppelstränge von einander zu lösen. Es folgt die Herabsetzung auf eine Primer-spezifische Temperatur, um die Bindung der Primer an einzelsträngige DNA zu gewährleisten (Annealing). Zum Schluss ist ein Elongationsschritt notwendig, bei dem die *Taq* DNA-Polymerase mittels dNTP den jeweiligen cDNA-Strang in 5'→3'-Richtung kopiert. Die Standard-Bedingungen für die PCR-Reaktion sind in Tab. 5 ersichtlich.

Tab. 5 Bedingungen für semi-quantitative PCR im Thermocycler

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	94	240	1
Denaturierung	94	30	} Primer-spezifisch (siehe 4.1.5.1)
Annealing	Primer-spezifisch (siehe 4.1.5.1)	30	
Elongation	72	30-120	
Finale Elongation	72	600	1

Die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe des Amplikons variiert: bei einer Größe < 500 bp wurde der PCR-Ansatz 30 s inkubiert, pro zusätzlicher 500 bp wurde die Zeit auf 30 s erhöht.

Die Primerpaare (siehe 4.1.5.1) wurden so gewählt, dass sie an möglichst viele bzw. alle Isoformen des jeweiligen Gens binden. Des Weiteren wurde sichergestellt, dass sich die komplementären Sequenzen der Primerpaare vorzugsweise in mindestens 2 verschiedenen Exons befinden, um ungewollte Kontaminationen mit genomischer DNA nach der Agarosegelelektrophorese ausschließen zu können.

Als Negativ-Kontrolle diente bei jeder PCR ein Ansatz ohne cDNA, um mögliche DNA-Kontaminationen in den verwendeten Reagenzien zu überprüfen.



#### 4.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele dienen zur Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer bp-Länge durch Anlegen eines elektrischen Feldes.

Zu diesem Zweck wurden 1-2 %ige Agarosegele hergestellt, indem Agarose und 0,5 x TBE in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht wurden. Nachdem sich die Agarose vollständig gelöst hatte, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in DNA oder RNA und fluoresziert unter UV-Licht.

In Elektrophoreseschlitten mit entsprechenden Gelkämme polymerisierten die Agarosegele und wurden anschließend in Gelelektrophoresekammern – befüllt mit 0,5 x TBE – überführt.

##### 4.2.1.5.1 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese

Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese wurde durchgeführt zur Visualisierung von DNA-Fragmenten. Hierbei wurden identische Volumina an DNA-enthaltenden Ansätzen (z.B. PCR-Produkte, Restriktionsenzymverdau von Plasmiden) mit je 2 µl DNA-Ladepuffer vermischt und in die mittels der Gelkämme entstanden Taschen geladen. Als Größenmarker zur Bestimmung der bp-Länge dienten 100 bp bzw. 1 kb Ladder, die DNA-Fragmente in definierten Größen enthalten. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (80 - 120 V, 150 mA) wanderten die negativ geladen DNA-Sequenzen zur positiven Anode. Die daraus resultierenden Banden konnten in einem UV-Transilluminator mittels UV-Licht detektiert und mit einer angeschlossenen Kamera, sowie dem BioCapt, Version 99-Programm dokumentiert werden.

##### 4.2.1.5.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zur Detektion von RNA-Degradation wurden von jenen RNA-Proben, die für Mikroarray-Hybridisierungen verwendet wurden, denaturierende Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Im Vergleich zur nicht-denaturierenden Gelelektrophorese wurde das Protokoll hinsichtlich der Probenvorbereitung geändert. Je 0,5 -1 µg isolierte RNA wurde mit 5 µl Denaturierungs-Mix vermischt und bei 65 °C 10 min inkubiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Nicht degradierte RNA zeichnet sich durch definierte 28S- und 18S-Banden aus, wobei die 28S-Bande doppelt so intensiv fluoreszieren sollte wie die 18S-Bande. Im Falle von RNA-Degradation ist das 2:1 Verhältnis von 28S zu 18S nicht gegeben, des Weiteren sind Degradationsprodukte als Schmier bei geringer Größe sichtbar.

#### 4.2.1.6 Densitometrie

Densitometrische Auswertung von Agarosegelen und Western-Blots wurden in ausgewählten Experimenten durchgeführt, um Unterschiede zwischen einzelnen Banden quantifizieren zu können. Hierfür wurde das Programm BioProfil Bio I.D., Version 99 verwendet. PCR-Produkt-Banden der verschiedenen Amplikons wurden auf jene der *EEF1A1*-PCR-Banden normalisiert. Proteine wurden auf GAPDH normiert.

#### 4.2.1.7 Agarosegel-Eluation

Aufreinigung von DNA-Sequenzen wurde nach einem Restriktionsenzymverdau für die Klonierung, als auch für die Sequenzierung von PCR-Produkten verwendet. Hierbei wurden die DNA enthaltenen Proben auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und die Ethidiumbromid-Bande der gewünschten DNA-Sequenz nach Gelelektrophorese unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die

Aufreinigung erfolgte mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers. Der pH wurde vor der Übertragung auf HiBind®-Säulen mit 5 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,6) eingestellt. Nach verschiedenen Waschschritten erfolgte die Elution der DNA von der Säulenmatrix mit 30-50 µl DNA-Elutionspuffer.

#### 4.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung ist eine Methode, mit der man die Abfolge der Nukleotide in einem bestimmten DNA-Fragment identifizieren kann. Durch den zufälligen Einbau von ddNTP während der DNA-Synthese erfolgt ein sogenannter Kettenabbruch, wodurch unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, die an den 3'-Enden entweder ein ddATP, ddTTP, ddGTP bzw. ddCTP tragen. Jedes der vier ddNTP-Moleküle ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mittels eines Kapillargelsystems werden die Fragmente der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Je nach Farbstoff wird Licht in spezifischer Wellenlänge emittiert. Diese Daten können gemessen und mit entsprechender Software schließlich zu einer Sequenz zusammengesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Sequenzierungs-PCR das Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Ein PCR-Ansatz wurde hergestellt aus 1-2 µl PCR-/Geleluations-Produkt bzw. 150-300 ng Plasmid-DNA, 0,25 pmol sense oder antisense Primer, 0,5 x Big Dye sequencing v1.1 Buffer und 0,5 x Big Dye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix. Die PCR-Bedingungen sind in Tab. 6 ersichtlich.

Tab. 6 Bedingungen für Sequenzierungs-PCR im Thermocycler

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	94	240	1
Denaturierung	94	30	} 30
Annealing	50	60	
Elongation	60	180	
Finale Elongation	72	300	1

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels einer NucleoSEQ-Säule aufgereinigt, nachdem diese für mindestens 30 min in 600 µl HPLC-H<sub>2</sub>O hydriert wurde. Der 20 µl Ansatz wurde komplett aufgetragen und die Säule 5 min bei 7000 U/min zentrifugiert. Es folgte eine Fällung des Durchflusses in Ethanol mit 0,1 M Natrium-Acetat (pH 4,5). Nach 15 min Inkubation bei RT und 20 min Zentrifugation bei 13000 U/min wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet, bevor es in 20-30 µl TSR bzw. Hi-Di™ Formamid aufgenommen wurde. Das DNA-Gemisch wurde letztendlich in ein Sequenzierungscap überführt, für 4 min bei 94 °C denaturiert und nach Abkühlung auf Eis in den Sequenzierer ABI PRISM 310 Genetic Analyser gestellt. Mittels des Programms ABI PRISM 310 Collection konnten Einstellungen zu Injektionszeit und Ablaufzeit eingestellt, sowie die Sequenzierung gestartet werden. Nach dem Ende des Durchlaufs konnten die Sequenzen mit Hilfe der Programme Sequencing Analysis v 3.4 und BioEdit ausgewertet werden.

#### 4.2.1.9 Methoden der Klonierung von DNA-Sequenzen

##### 4.2.1.9.1 Restriktionsenzym-Verdau

Restriktionsenzyme (bzw. Restriktionsendonukleasen) sind Bakterien-Enzyme, die DNA-Sequenzen an definierten Stellen schneiden können. Hierfür ist eine je nach Enzym spezifische Nukleotidabfolge (Restriktionsschnittstelle) notwendig. Der Schnitt der Doppelhelix kann abhängig vom Enzym grade (blunt) oder versetzt (klebrig) sein; bei Letzterem entstehen Basen-Überhänge. Dieses Prinzip wird verwendet, um künstlich DNA-Sequenzen in Plasmide klonieren zu können. Im Falle von klebrigen Enden müssen zu diesem Zweck DNA-Sequenz, als auch Plasmid mit identischen Enzymen geschnitten werden.

Ein Standardansatz für einen einfachen Restriktionsenzymverdau eines Plasmids wurde folgendermaßen angesetzt: 30 µg Plasmid, 5-10 U Restriktionsenzym, gegebenenfalls 1 x BSA und 1 x entsprechender Restriktionsenzym-Puffer wurden mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 30 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde anschließend mindestens für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Mittels Elektrophorese wurden die DNA-Sequenzen der Länge nach aufgetrennt und es konnte eine Geleluatation des linearisierten Plasmides durchgeführt werden.

Restriktionsenzymverdaue konnten auch mit 2 Enzymen gleichzeitig durchgeführt werden, wenn diese ähnliche Pufferbedingungen benötigten.

Des Weiteren fand diese Methode Anwendung bei der Überprüfung der Transfektion. Hierfür wurden 5 µl einer Plasmidminipräparation in einem Endvolumen von 20 µl aufgenommen.

##### 4.2.1.9.2 Ligation

Die enzymatische Verknüpfung einer DNA-Sequenz und einem linearisiertem Plasmid erfolgt entweder mit Hilfe einer DNA-Ligase oder nach dem Prinzip des TA Cloning®.

Bei der Ligation mittels Ligase wurde in der vorliegenden Arbeit die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese benötigt ATP als Kofaktor, um die Bildung einer Esterbindung zwischen einer freien OH-Gruppe am 3'-Ende des einen DNA-Stranges und einer Phosphatgruppe am 5'-Ende des anderen DNA-Stranges zu katalysieren. Für einen Ligationsansatz wurden 500 ng der zu klonierenden DNA-Sequenz, 100 ng linearisiertes Plasmid aus einer Plasmidpräparation, 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer sowie 3 U T4-DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 10 µl gemischt. Dieser Ligationsansatz wurde je nach verwendetem Plasmid über Nacht bei 14°C oder 1 h bei RT inkubiert und anschließend zur Transformation von Bakterien verwendet.

TA Cloning® wird mit linearen Plasmiden durchgeführt, die am 3'-Ende je ein überhängendes dT, sowie eine covalent gebundene Topoisomerase besitzen, die eine spontane Ligation der Plasmid-Enden verhindert. Die zu klonierende Sequenz musste vor der Ligation mittels semi-quantitativer PCR unter Verwendung von *Taq*-Polymerase amplifiziert werden, wodurch dA-Überhänge am 5'-Ende entstanden. Diese Art der Ligation wird ohne vorhergehenden Restriktionsverdau und ohne DNA-Ligase durchgeführt. Allein die terminalen Hydroxylgruppen der zu klonierende DNA Sequenz mit dA-Überhängen löst die Phosphotyrosyl-Bindung zwischen Plasmid und Topoisomerase auf. Die Topoisomerase wird abgetrennt und die Ligation erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurde TA Cloning® nach Angaben der jeweiligen Kit- Herstellers verwendet.

##### 4.2.1.9.3 Transformation

Als Transformation wird die Aufnahme von DNA in kompetente Bakterien (meist *E.coli*) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Hitzeschocks angewandt, wobei durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42 °C die Membran der Bakterien porös gemacht wird, wodurch die DNA leichter eindringen kann. Zu diesem Zweck wurden 50 µl kompetente *E.coli* auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Ligationsansatz vorsichtig vermischt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurde

die Bakteriensuspension für 20-30 s einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium und die Inkubation bei 37 °C für 1,5 h im Schüttler. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) – je nach vorhandener Resistenz des Plasmids – ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 4.2.1.9.1 Übernachtkultur von Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmide in Bakterien wurden einzelne Kolonien von LB-Platten gepickt und in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttler konnte mittels einer Mini-Präparation das Plasmid isoliert werden.

Um größere Mengen an Plasmid zu gewinnen, wurden 200 ml-Übernachtskulturen angesetzt, wobei eine 4-6stündige Wachstumsphase der Bakterien in einer 2 ml-Vorkultur vorangegangen sein musste.

#### 4.2.1.10 Klonierung für die Expression von SAA1 und SAA2

Um eine Expression von SAA1 und SAA2 in eukaryotischen Zellen forcieren zu können, musste zu Beginn die kodierende Sequenz Gene (siehe Abb. 7 und Abb. 8) in entsprechende Vektoren kloniert werden. Hierfür wurden die Sequenzen mittels der Primerpaare SAA1 Exp. s und as, sowie SAA2 Exp. s und as (siehe 4.1.5) in semi-quantitativen PCR-Ansätzen aus cDNA von hMSC amplifiziert. Bei der Wahl der Primer wurde darauf geachtet, dass sie das Stopp- und das Start-Codon einschließen; Letzteres sollte zusätzlich eine „starke“ Kozak-Sequenz umgeben. Diese Sequenz ist nach der Translation entscheidend für die adäquate Bindung von Ribosomen an die mRNA, wodurch die Proteinbiosynthese eingeleitet werden kann.

```
AGCACCATGAAGCTTCTCACGGGCCTGGTTTTCTGCTCCTTGGTCCTGGGTGTCAGCAGCCGAAGCTT
CTTTTCGTTCTTGGCGAGGCTTTTGATGGGGCTCGGGACATGTGGAGAGCCTACTCTGACATGAGAG
AAGCCAATTACATCGGCTCAGACAAATACTTCCATGCTCGGGGAACTATGATGCTGCCAAAAGGGGA
CCTGGGGGTGCCTGGGCTGCAGAAGTGATCAGCGATGCCAGAGAGAATATCCAGAGATTCTTTGGCCA
TGGTGCGGAGGACTCGCTGGCTGATCAGGCTGCCAATGAATGGGGCAGGAGTGGCAAAGACCCCAATC
ACTTCCGACCTGCTGGCCTGCCTGAGAAATACTGAGCTTCTTCACTCTGCTCTCAGGAGATCTGG
CTGTGAGGCCCTCAGGGCAGGGATACAAAGCGGGGAGAGGGTACA
```

Abb. 7 Sequenz von SAA1, die für Klonierung in pcDNA™ 3.1/ V5-His TOPO® verwendet wurde. Start- und Stopp-Codon sind grau unterlegt.

```
CAGCTACAGCACAGATCAGCACCATGAAGCTTCTCACGGGCCTGGTTTTCTGCTCCTTGGTCCTGAGT
GTCAGCAGCCGAAGCTTCTTTTCGTTCTTGGCGAGGCTTTTGATGGGGCTCGGGACATGTGGAGAGC
CTACTCTGACATGAGAGAAGCCAATTACATCGGCTCAGACAAATACTTCCATGCTCGGGGAACTATG
ATGCTGCCAAAAGGGGACCTGGGGGTGCCTGGGCTGCAGAAGTGATCAGCAATGCCAGAGAGAATATC
CAGAGACTCACAGGCCGTGGTGCGGAGGACTCGCTGGCCGATCAGGCTGCCAATAAATGGGGCAGGAG
TGGCAGAGACCCCAATCACTTCCGACCTGCTGGCCTGCCTGAGAAATACTGAGCTTCTTCACTCT
GCTCTCAGGAGACCTGGCTATGAGGCCCTCGGGCAGGGATACAAAGTTAGTGAGGTCTATGTCCAGA
GAAGCTGAGA
```

Abb. 8 Sequenz von SAA2, die für Klonierung in pcDNA™ 3.1/ V5-His TOPO® verwendet wurde. Start- und Stopp-Codon sind grau unterlegt.

Mittels des pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> Expression Kits wurden die codierenden Sequenzen von SAA1 und SAA2 in das linearisierte Plasmid pcDNA<sup>TM</sup> 3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> nach der Methode des TA Cloning<sup>®</sup> ligiert.

Die Transformation erfolgte in TOP10F' *E.coli* mit anschließender Übernachtskultur und Präparation der Plasmid-DNA. Die Orientierung der DNA-Sequenzen von SAA1 und SAA2 im Vektor wurde mit einem BamHI-EcoRV-Verdau nachgewiesen. Anschließend wurde die vollständige SAA1- bzw. SAA2-Sequenz mit Hilfe entsprechender Primer in 5' → 3' als auch in 3' → 5' Richtung sequenziert.

Die in einer Maxi-Präparation gewonnene DNA von SAA1- und SAA2-pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> wurde einem SSP1-Verdau unterzogen und das mittels Agarosegel aufgereinigte, lineare Plasmid für die Transfektion von hMSC-TERT verwendet.

#### **4.2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA**

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden diese lysiert, und das Lysat mittels Silikasäulen und diverser Waschschriffe aufgereinigt.

##### **4.2.1.11.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Plasmid-Mini-Präparationen wurden mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kits von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde je 1 ml Bakteriensuspension aus einer 2 ml-Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet in einem RNase-haltigen Puffer A1 resuspendiert, um unerwünschte RNA zu verdauen. Anschließend erfolgte die Lyse der Bakterien in einem alkalischen, SDS-haltigen Puffer A2. Puffer A3 diente zur Neutralisierung des Lysats. SDS-Prezipitate und Zellreste wurden abzentrifugiert und der Überstand auf eine NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Säule überführt. Die Plasmid-DNA konnte durch Zentrifugation an die Silikamembran der Säulen binden; Salze und andere Verunreinigungen wurden in anschließenden Waschschriffen mit Ethanol-haltigem Puffer A4 eliminiert. Nach Trocknung der Säule, erfolgte die Eluation in 50µl Puffer AE.

##### **4.2.1.11.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

Um große Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten wurden Maxi-Präparationen mit dem NucleoBond<sup>®</sup>Xtra Maxi Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden 200 ml Bakteriensuspension pelletiert und in RNase-haltigem Puffer RES resuspendiert. Die Lyse erfolgte mittels des Puffer LYS, die Neutralisation wurde mit dem Puffer NEU durchgeführt. Das Gemisch wurde durch einen integrierten Filters von allen Zellbestandteilen gereinigt bevor es mittels der Silikamembran der NucleoBond<sup>®</sup>Xtra Säule filtriert wurde. Die Silikamembran dieser Säulen besteht aus hydrophilen Silikakügelchen, an die positiv geladene Methylaminoethanol-Gruppen gebunden sind. An diese Gruppen konnte die negativ geladene Plasmid-DNA während des Gravitations-betriebenen Durchflusses effektiv binden. Nach diversen Waschschriffen wurde die Plasmid-DNA eluiert und anschließend mittels Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut pelletiert und getrocknet. Durch 60minütige Inkubation der Plasmid-DNA in 100 – 150 µl DNase-freiem H<sub>2</sub>O bei RT konnte das Pellet gelöst werden.

## 4.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter einer Sterilbank mit sterilen Materialien und Chemikalien, sowie unter Verwendung von Latex-Handschuhen durchgeführt.

### 4.2.2.1 Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)

Die Isolation von hMSC fand unter Einverständniserklärung der Patienten, sowie der Befürwortung der Lokalen Ethik Kommission der Universität Würzburg statt. Im Falle von nicht-osteoporotischen hMSC wurde den Patienten in der Orthopädie des König-Ludwig-Hauses aufgrund von Altersbedingter Arthrose oder Dysplasie ein Hüftkopf entfernt und durch eine Prothese ersetzt. Aus der dabei anfallenden Spongiosa des Hüftkopfes oder der Beckenpfanne wurden die hMSC nach dem leicht abgeänderten Protokoll von (Noth et al. 2002) isoliert. Das Alter der nicht-osteoporotischen Patienten mittleren Alter betrug 54,23 ( $\pm$  8,86), alte Patienten waren durchschnittlich 77,29 ( $\pm$  5,15) Jahre alt.

Osteoporotische hMSC (hMSC-OP) wurden aus Hüftköpfen mit hüftnaher Niedrig-Energie-Fraktur isoliert, die wir aus der Klinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie Würzburg erhalten haben. Neben dem hüftnahen Bruch durch Fall aus dem Stand diente als zweiter Osteoporoseindikator der Nachweis von Wirbelkörperfrakturen mittels Röntgenbild-Untersuchungen. Des Weiteren waren die Osteoporose-Patienten durchschnittlich 81,64 ( $\pm$  7,94) Jahre alt. Spongiosa/Knochenmark des Beckenkammes, als auch Spongiosa, die zuvor aus Hüftköpfen mittels einer Pürette gekratzt werden musste, wurden in 50 ml-Röhrchen überführt und mit hMSC-Medium aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 min; der Überstand wurde abgenommen und die Röhrchen mit ca. 20 ml hMSC-Medium erneut befüllt. Durch kräftiges Schütteln wurden die hMSC aus den Trabekeln gelöst. Nach Absinken großer Knochenstücke wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt und die Zellen anschließend bei 5 min 1200 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 20 ml hMSC-Medium resuspendiert. Es folgte eine Zellzählung und die Aussaat von ca.  $1 \times 10^9$  Zellen pro 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen in je 25 ml hMSC-Medium. Nach 3-4 Tagen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 %iger Luftfeuchtigkeit wurden nicht-adhärente Zellen (Erythrozyten, Leukozyten, Plasmazyten etc.) entfernt und die adhärenente Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Es folgten Mediumwechsel aller 3-4 Tage bis sich hMSC-Kolonien gebildet und den Boden der 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen zu 60-80 % bedeckt hatten. Daraufhin konnte die Subkultivierung der hMSC in Passage 1 (P1) erfolgen.

### 4.2.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung aller beschriebenen Zellarten fand in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 %iger Luftfeuchtigkeit statt. Alle Kulturmedien enthielten 1 % Penicillin/Streptomycin, sowie 10 % Hitzeinaktiviertes FCS und wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Mediumwechsel erfolgten aller 3-4 Tage. Soweit nicht anders erwähnt, fand die Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen mit 15 ml von, der jeweiligen Zellart entsprechendem Expansionsmedium statt.

Nach Erreichen von 70-90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert bzw. subkultiviert. Zu diesem Zweck musste das entsprechende Medium gründlich abgenommen und mögliche FCS-Reste durch Waschen in 1 x PBS entfernt werden. Die Zell-Zell-, sowie Zell-Substrat-Kontakte wurden mittels 2-5 min Inkubation in 1-2 ml 1 x Trypsin/EDTA (0,5 g/l) im Brutschrank aufgelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit Kulturmedium inaktiviert und die Zellen vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. In Röhrchen überführt, wurden die Zellsuspensionen von hMSC und HEK293 anschließend bei 1200 U/min 5 min zentrifugiert, die Überstände entfernt und die Zellen in entsprechendem Kulturmedium aufgenommen. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen im Verhältnis 1:3 (hMSC)

in neue Kulturflaschen oder – nach Bestimmung der Zellzahl – je nach Experiment benötigte Zellkulturgefäße. Humane MSC-TERT wurden nach der Inaktivierung von Trypsin nicht abzentrifugiert, sondern die Zellsuspension direkt 1:4 auf neue Flaschen bzw. andere Zellkulturgefäße verteilt.

#### **4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Berechnung der Populationsverdopplung**

Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Kammer bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 30 µl der Zellsuspension nach 1 x Trypsin/EDTA Behandlung bzw. Resuspension mit 30 µl Trypanblau vermischt. 10 µl wurden auf eine Neubauer-Kammer aufgetragen und lebende Zellen (nicht blau gefärbt) wurden in 4 Quadranten gezählt.

Der Mittelwert der Zellzahl aller 4 Quadrate wurde mit dem Verdünnungsfaktor 2 und  $10^4$  multipliziert, um die Anzahl an Zellen pro ml Zellsuspension zu erhalten.

Die Populationsverdopplung (PD) wurde pro Passage folgendermaßen berechnet:  $PD = \ln 2(\text{Anzahl lebender Zellen nach Ernte} / \text{Anzahl lebender Zellen bei Aussaat})$ . Da die Anzahl lebender hMSC bei Aussaat in P0 nicht bestimmbar ist, wurde der PD erst ab Aussaat in P1 festgehalten. Ebenso wurde kein PD für die letzte Passage (Px) bestimmt. Der Kumulative PD beschreibt die Anzahl an Populationsverdopplungen im Verlauf der Zeit.

#### **4.2.2.4 *In vitro*-Alterung von hMSC**

Für die *in vitro*-Alterung wurden hMSC aus Patienten ohne Osteoporose-Anzeichen ab P1 subkultiviert bis sie die seneszente Passage (Px) erreichten, in der innerhalb von 3 Wochen keine 70-90 %ige Konfluenz erreicht wurde. In Px zeigten sich starke morphologische Veränderungen der Zellen; sie waren weitaus größer als in P1, abgeflacht und granulös. Es folgte der Abbruch der Kultivierung.

Von P0 bis Px wurden hMSC in 3 x 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen im Verhältnis 1:3, sowie Zellen für  $\beta$ -Galaktosidase- und immuncytologische Färbungen ausgesät. In jeder Passage wurden Zellen für RNA- und Proteinanalysen aus je einer der 3 Kulturflaschen isoliert.

#### **4.2.2.5 Kryokonservierung von hMSC-TERT**

Humane MSC-TERT wurden in 5-8 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen expandiert und nach 70-90 % Konfluenz trypsiniert. Je mindestens  $2 \times 10^8$  Zellen wurden mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 10 % DMSO in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am darauffolgenden Tag folgte die Überführung in -80 °C über Nacht, mit anschließender Konservierung in flüssigem Stickstoff.

#### **4.2.2.6 Osteogene Differenzierung von hMSC und hMSC-TERT**

Für die osteogene Differenzierung wurden  $1 \times 10^4$  hMSC bzw. hMSC-TERT Zellen pro cm<sup>2</sup> in 6-Well-Platten (für cytochemische Färbungen) und 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen (für RNA-Isolation) in entsprechendem Kulturmedium ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium durch osteogenes Differenzierungsmedium ersetzt; Medienwechsel fanden aller 3-4 Tage statt. Als Negativ-Kontrolle diente die Kultivierung in hMSC- bzw. hMSC-TERT-Medium.

Die Dauer der osteogene Differenzierung variierte zwischen 5 Tagen und 4 Wochen (siehe Ergebnisse).

#### 4.2.2.7 Applikation von rekombinatem, humanem SAA1 in der Zellkultur

Die Wirkung von Akute-Phase SAA auf die osteogene Differenzierung von hMSC und hMSC-TERT wurde durch Stimulation mit rekombinatem, humanem SAA1 (rhSAA1) untersucht. rhSAA1 ist ein Polypeptid aus 104 AS, dessen Sequenz – abgesehen von dem Austausch von zwei AS und dem Zusatz eines Methionins am N-Terminus – der Sequenz von SAA1 $\alpha$  ohne N-terminalem Signalpeptid entspricht.

Von hMSC in P1 (N = 4, Patienten: m, 47-70 Jahre alt) bzw. hMSC-TERT (N = 3) wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 4-Well Leb-Tek Chamber Slides (für cytochemische Färbungen) und 6-Well-Platten (für RNA-Isolation) in entsprechendem Kulturmedium ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium durch osteogenes Medium bzw. dem als Kontrolle dienendes Kulturmedium ersetzt. In je ein Well der osteogenen Differenzierung und der Kontrolle wurde kontinuierlich mit jedem Mediumwechsel 1 mM rhApo-SAA beigemischt. Nach 3 Wochen bzw. 10 Tagen wurde die osteogene Differenzierung von hMSC bzw. hMSC-TERT beendet.

#### 4.2.2.8 Stabile Transfektion von hMSC-TERT

Je  $1 \times 10^6$  hMSC-TERT Zellen wurden in hMSC-TERT-Medium ohne FCS mit je 10  $\mu\text{g}$  SAA1- bzw. SAA2-pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> Plasmid-DNA vermischt.

Die Elektroporation erfolgte in 2 mm Elektroporationsküvetten bei 200 V und 950  $\mu\text{F}$  in einem Gene Pulser<sup>®</sup> II. Anschließend wurden die Zellen in je zwei Wells einer 6-Well-Platte mit hMSC-TERT-Medium ausgesät. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen durch Gabe von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Neomycin selektiert. Die polyklonalen Zellklone wurden anschließend in einer starken Verdünnung (0,5 Zellen pro Well) in 96-Well-Platten ausgesät, um monoklonale Zellen herzustellen. Anschließend wurden die Zellen auf RNA-Ebene auf hohe SAA1- bzw. SAA1-Expression getestet. Für anschließende Experimente wurden je ein SAA1- und ein SAA2-hMSC-TERT-Klon mit der höchsten Expression ausgewählt; als Kontrolle dienten untransfizierte hMSC-TERT und mit pcDNA<sup>TM</sup>3.1 (+) transfizierte hMSC-TERT (pcDNA-hMSC-TERT).

### 4.2.3 Protein-biochemische Methoden

#### 4.2.3.1 Isolation von zellulärem Protein

Die Expression ausgewählter Gene wurde nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene untersucht. Hierfür wurden humane Zellen in 25 bzw. 75  $\text{cm}^2$  ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz  $1 \times$  mit kaltem  $1 \times$  PBS gewaschen. Alle folgenden Handhabungen wurden auf Eis durchgeführt, um Degradation der Proteine vorzubeugen. Der Zellmonolayer wurde in 300  $\mu\text{l}$  Homogenisationspuffer mit Proteininhibitor (1:25) mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Zellmembranen und -bestandteile wurden mittels 20 s Sonifizierung bei 80 % zerstört. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 10'000 rpm für 10 min konnte das Cytoplasma als Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurde Roti<sup>®</sup>-Quant in einer 1:5 Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O verwendet. Roti<sup>®</sup>-Quant enthält den Farbstoff Coomassie brilliant Blue-G250, der unter Bindung von Proteinen von dem kationischen in den anionischen Zustand wechselt, der bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann. Die Absorptionsänderung ist dabei proportional zur Proteinmenge. Da Coomassie brilliant Blue-G250 vorzugsweise an basische Aminosäuren bindet,



ist die Erstellung einer Standardkurve mittels BSA erforderlich. Hierfür wurden in Duplikaten 200, 500, 1000, 1500 und 2000 µg/ml BSA in UV-durchlässigen Küvetten mit 1 ml verdünnter Roti®-Quant Lösung gründlich vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Ebenfalls in Duplikaten wurden je 10 µl der zu untersuchenden Proteinproben nach dem Selben Prinzip vorbereitet. Die Messung erfolgte bei 595 nm in einem Luminometer, wobei automatisch die Standardkurve berechnet und die Absorptionenwerte der zu untersuchenden Proteine darauf bezogen wurden.

#### 4.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Page ist eine Methode, mit der man denaturierte Proteine ihrem Molekulargewicht nach auftrennen kann. Die Denaturierung von Proteingemischen erfolgt durch Zugabe von reduzierendem β-Mercaptoethanol der anionischen Detergenz SDS. Letzteres zerstört Wasserstoffbrücken, wodurch sich die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine auflösen. Des Weiteren bindet SDS an die Disulfidbrücken der Aminosäuren, wodurch die nun linearisierten Proteine eine negative Ladung erhalten, die annähernd proportional zum Molekulargewicht ist. Beide Reagenzien sind in dem hier verwendeten Laemmli-Puffer (Laemmli 1970) enthalten.

Polyacrylamidgelle werden durch Polymerisation von Acrylamid und quervernetzendem N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Anhängig von der Konzentration an Acrylamid kann die Porengröße und somit die Durchlässigkeit des Gels variiert werden. Die Polymerisation wird erst durch Zugabe von TEMED und APS initiiert.

Die SDS-PAGE wird mit zwei unterschiedlichen Gelen durchgeführt, um eine saubere Auftrennung der Proteine zu gewährleisten. Zu Beginn passieren die Proteine ein weitporiges 4 %iges Sammelgel (pH 6,8) und werden erst im 12-15 %igem Trenngel (pH 8,8) aufgetrennt. Die beiden Gele wurden gemäß Tab. 7 hergestellt, wobei TEMED und APS immer zuletzt beigemischt wurde.

Tab. 7 Zusammensetzung der Polyacrylamidgelle für SDS-PAGE

	Sammelgel	Trenngel	
		16 %	20%
Rotiphorese® Gel (40%) Acrylamid/ Bisacrylamid	5,2 %	16 %	20 %
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	0,375 M	0,375 M
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,125 M	-	-
20 % SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
10 % APS	0,05 %	0,05 %	0,05 %
TEMED	3,44 mM	3,44 mM	3,44 mM
ddH <sub>2</sub> O	Add a 10 ml	Add a 50 ml	Add a 50 ml

Die angegebenen Volumina waren ausreichend für ein Gel mit den Maßen 16 x 20 cm bzw. 2 Minigele je 7 x 10 cm.

In eine Gelapparatur wurden 2 Glasplatten – durch entsprechende Spacer voneinander getrennt –, so eingespannt, dass der Boden, sowie die beiden Seiten wasserdicht verschlossen wurden. Daraufhin wurde das Trenngel eingefüllt und anschließend mit Isopropanol bedeckt. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgekippt und das Sammelgel gegossen. Ein Kamm wurde eingefügt, um entsprechende Taschen zu formen. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel samt Glasplatten, Spacer und Klammern in eine Elektrophoresekammer überführt, und diese mit 1 x Laufpuffer befüllt.

Je 10-30 µg Protein wurden zuvor 1:3 mit Laemmli-Puffer verdünnt und bei 100 °C im Wasserbad 10 min denaturiert. Pro Gel wurden immer identische Mengen an Protein aufgetragen, um

Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Proben wurden zusammen mit 10 µl des Protein-Marker unter Zuhilfenahme einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Falle von großen Gelen bei 150 V für 15 min und nach Erreichen des Trenngeles bei 300 V für 1 h, wobei die negativ geladenen Proteine zur positiven Anode wanderten. Bei Verwendung von Minigelen wurde eine Spannung von 110 V für 15 min und anschließend 200 V für 30 min angelegt.

#### 4.2.3.4 Western-Blot

Western Blot ist eine Methode zum Übertragen von Proteinen auf eine Trägermembran, um anschließend über Immundetektion spezifische Proteine quantifizieren zu können.

Die Übertragung der Proteine aus der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran erfolgte über das „semi-dry“-Verfahren. Diese Methode bedient sich erneut des Elektrophorese-Prinzips, wobei jedoch das elektrische Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung aufgebaut wird, wodurch die negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel zur positiven Anode gezogen, und somit auf die darunter liegende Trägermembran übertragen werden. Zu diesem Zweck wurden Gel und Membran sandwichartig zwischen 2 Lagen Whatman-Papier und je eine Lage Schaumstoff eingeklemmt, die – angefeuchtet mit 1 x Transferpuffer – den Ionentransport zwischen den beiden Elektroden der Perfect Blue™ `Semi Dry'-Blotter Sedec™ M ermöglichen. In dem 1 x Transferpuffer enthaltenes Methanol dient dazu, das SDS von den Proteinen zu lösen, um eine effektive Bindung an die Trägermembran zu gewährleisten. Ein elektrisches Feld wurde mit 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gel aufgebaut.

Die Effizienz des Western Blots wurde mittels Ponceau S nachgewiesen, indem die Trägermembran 10 min darin inkubiert und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen wurde. Ponceau S färbt reversibel alle auf der Membran vorhandenen Proteinbanden rötlich an.

Unspezifische Bindungsstellen wurden daraufhin durch Inkubation der PVDF-Membran in Blocklösung für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln abgeblockt. Die Immundetektion erfolgte ebenfalls in Blocklösung mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Nach 3 x 5 min Waschen in 1 x TTBS auf dem Schüttler wurde der Sekundärantikörper (gekoppelt an HRP) in einer 1 : 2000 Verdünnung in 1 x TTBS mittels eines 0,2 mm Filters filtriert, und anschließend die Membran für 1 h bei RT auf dem Schüttler in dem Filtrat inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min folgte die Detektion der gebundenen Antikörper mittels der Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents I und II, die in dem Verhältnis 1:1 auf der Membran verteilt wurden. Das darin enthaltene Luminol wird durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP gespalten, wodurch es zu einer Lichtemission kommt, die mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

##### 4.2.3.4.1 Mehrfache Immundetektion von PVDF- Membranen

Die beim Western-Blot auf der PDVF-Membran gebundenen Antikörper können abgewaschen werden, um die Membran für weitere Immundetektionen zu verwenden. Zu diesem Zweck wurde nach der ECL-Behandlung die PVDF-Membran in 1 x TTBS gespült und in einer Glasschale mit 50 ml Stripping Buffer bedeckt. In einem Wasserbad wurde die Membran bei ca. 60°C für 30-90 min geschüttelt und anschließend erneut mit 1 x TTBS gespült. Die Membran konnte daraufhin wie in 4.2.3.4 beschrieben erneut mit der Blocklösung inkubiert und anschließend einer Immundetektion unterzogen werden werden.

#### 4.2.3.5 Messung der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase-Aktivität

Für Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Färbungen (SA-β-Gal-Färbung) wurden hMSC in 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> -Flaschen ausgesät und nach Erreichen von 70-90% Konfluenz in 200µl 1 x PBS/0,1 % Triton lysiert. Es folgte die Sonifizierung analog der Proteinbehandlung (4.2.3.1) und nach Zentrifugation bei 130000 U/min bei 4 °C für 15 min wurde der Überstand abgenommen und einer Proteinmessung

unterzogen (4.2.3.2). Es wurden pro Probe dreifache Ansätze mit je 10 µg Protein und 200 µl SA-β-Gal-Lösung in Wells einer 96-Well-Platte vermischt (Vacanti et al. 2005). Als Negativ-Kontrolle dienten 20 µl 1 x PBS in 200 µl SA-β-Gal-Lösung. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> und anschließende Messung im Microplate-Reader bei OD<sub>405</sub>.

#### **4.2.4 Cytochemische Färbungen**

Vor jeder Fixierung wurden die Zellen 1 x mit 1 x PBS gewaschen. Alle Cytochemischen Färbungen wurden mit einem Axioskop 2, einer AxioCam MRC und dem Programm AxioVision 4.4.1.0 aufgenommen.

##### **4.2.4.1 Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Färbung**

Für Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Färbungen (SA-β-Gal-Färbung) wurden 100'000 Zellen auf 9,6 cm<sup>2</sup>-Petrischalen mit 21 x 26 mm Deckgläsern in entsprechendem Kulturmedium ausgesät und bis zu 50-70 % Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen in Formaldehyd/ Glutaraldehyd für 5 min. Die Lösung wurde abgenommen und die Petrischalen nach Abdampfen des Fixierers bei 4 °C gelagert. Für die *in-vitro*-Alterung erfolgte die Färbung von Zellen aus P1 bis Px (seneszente Passage) von hMSC eines Spender immer am selben Tag; als Negativ-Kontrolle dienten fixierte hMSC-TERT. Die Zellen wurden 1 x mit 1 x PBS gewaschen und 16 h in 1 ml β-Galaktosidase-Färbelösung bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 x Waschen in dH<sub>2</sub>O folgte die Färbung der Zellkerne mit 1 ml Kernechtrot-Lösung für 2 min. Die mit Zellen behafteten Deckgläser wurden daraufhin kurz mit dH<sub>2</sub>O gespült und mit Glycerin-Gelatine auf Objektträgern fixiert. Positive Zellen wiesen eine Blaufärbung im Cytoplasma und einen rot gefärbten Kern auf.

##### **4.2.4.2 Alizarin Rot S-Färbung**

Für die Detektion von Calciumhydrogenphosphaten in der Extrazellulären Matrix von Präosteoblasten/Osteoblasten wurde eine Färbung mit alkalischem Alizarin Rot S durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 10 min in eiskaltem Methanol fixiert, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und 15 min in 1 ml 1 % Alizarin Rot S-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen so oft in ddH<sub>2</sub>O gespült bis sich das Wasser nicht mehr verfärbte.

#### **4.2.5 Immuncytochemische Färbungen**

Für immuncytochemische Färbungen wurden 100'000 - 200'000 Zellen in 6- oder 12-Well-Platten mit 21 x 26 mm bzw. 18 mm Ø Deckgläsern ausgesät und nach Erreichen von 60-80 % Konfluenz wurden sie mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen kurzzeitig bei 4 °C, längerfristig bei -20 °C gelagert. Alle folgenden Waschrinne mit 1 x PBS (pH 7,2) wurden für je 5 min bei RT auf dem Schüttler durchgeführt.

Nach 3 x Waschen wurde die Membran der Zellen mit 1 x PBS/0,05 % Tween-20 (pH 7,2) permeabilisiert. Es folgten zwei weitere Waschrinne mit anschließender Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels 1 x PBS/1 % BSA (pH 7,2) für 30 min bei RT auf dem Schüttler. Nach erneutem Waschen folgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem spezifisch gegen ein Protein gerichteten Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 1 x PBS/1 % BSA (pH 7,2). Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper gründlich von den Zellen gewaschen und der Sekundärantikörper (gekoppelt an ein Fluorochrom) in entsprechender Verdünnung in 1 x PBS/1 % BSA (pH 7,2) 1-2 h bei

RT abgedunkelt inkubiert. Nach 3 x Waschen wurden die Deckgläser mit den daran haftenden Zellen aus den Wells entnommen und mit Vectashield with DAPI (Kernfärbung) auf Objektträgern fixiert. Als Negativ-Kontrolle diente die Inkubation mit IgG-Proteinen in 1 x PBS/1 % BSA (pH 7,2) aus Tieren entsprechend des jeweiligen Primärantikörpers und identischer Konzentration zum Primärantikörper. Als weitere Spezifitätskontrolle wurden Zellen ausschließlich mit Sekundärantikörper inkubiert.

## 4.2.6 Mikroarray-Analysen

### 4.2.6.1 Microchip-Hybridisierung

Mittels Mikroarrays können mehrerer tausend Gene auf mRNA-Ebene gleichzeitig nachgewiesen werden. Mit dieser Methode lassen sich Unterschiede im Transkriptom, d.h. differentielle Genexpression zwischen verschiedenen Organismen oder Zelltypen aufdecken. Dafür muss mRNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und erneut in cRNA mit Biotinmarkierung transkribiert werden. Die biotinylierte cRNA wird schließlich fragmentiert und mit sogenannten Microchips hybridisiert. Auf Microchips sind tausende, synthetisch erstellte Oligonukleotide gebunden, die komplementär zu mRNA definierter Gene sind. Nach diversen Waschschritten folgt die Färbung der gebundenen, biotinylierten cRNA mit Streptavidin, an das ein Fluorochrom gekoppelt ist. Die Intensität der Fluoreszenzemission ist proportional zur Menge an gebundener cRNA und kann mittels eines Scanners und entsprechender Software ausgewertet werden.

Für die vorliegenden Transkriptom-Analysen wurde zelluläre RNA von hMSC mehrerer Patienten unterschiedlichen Alters und Gesundheitszustands isoliert (siehe Tab. 8).

Tab. 8 Für Microchip-Hybridisierung verwendete RNA-Proben

Bezeichnung	hMSC-K	hMSC-seneszent	hMSC-alt	hMSC-OP
Anzahl an RNA-Proben (N)	5	5	4	5
Passage der hMSC	P1 (x4), P2 (x1)	Px	P1	P1 (x4), P2 (x1)
Alter der Patienten in J.	$\bar{x} 57,5 \pm 9,56$	$\bar{x} 56,4 \pm 8,96$	$\bar{x} 81,75 \pm 4,86$	$\bar{x} 86,2 \pm 5,89$
Osteoporose	nein	nein	nein	ja
Geschlecht	w (x4), m (x1)	w (x3), m (x2)	w (x3), m (x1)	w

Die RNA-Proben wurden mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese vor der Verwendung hinsichtlich ihrer Qualität überprüft.

Alle folgenden Schritte wurden von PD Dr. L. Klein-Hitpass am Institut für Zellbiologie, Genchip Labor an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Die RNA-Proben der hMSC-K, hMSC-seneszent und hMSC-OP wurden mit den entsprechenden Kits nach dem Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Protokoll (Version 2) in biotinylierte cRNA umgeschrieben. Die Synthese und Markierung der 4 verschiedenen cRNA-Proben von hMSC-alt wurden mit dem Affymetrix GeneChip®3'IVT Express Kit durchgeführt. Alle Proben wurden auf je einem GeneChip HG-U 133 Plus 2.0 hybridisiert. Auf diesen Microchips sind Oligonukleotide für über 54'000 Probesets gebunden, die wiederum 47'400 Transkriptvarianten bzw. 38'500 Genen entsprechen. Hybridisierung, Waschen und Färben der Microchips wurde nach dem Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Protokoll (Version 2) durchgeführt. Die Hybridisierungssignale wurden mit dem GeneChip Scanner 3000 detektiert und mit der GeneChip Operating Software 1.2 analysiert.

Bei allen Hybridisierungen wurden Hybridisierungs-Kontrollen zur cRNA gegeben, um die Werte verschiedener Chips normalisieren zu können.

#### 4.2.6.2 Statistische Auswertung von Mikroarray-Daten

Die Normalisierung der Daten wurde von PD Dr. L. Klein-Hitpass vorgenommen, die Transkriptom-Vergleiche von hMSC-K mit hMSC-seneszent, hMSC-alt bzw. hMSC-OP wurden mit „Significance Analysis of Mikroarrays“ (SAM) nach (Tusher et al. 2001) berechnet. Nur jene Probesets – bzw. Genprodukte – die in mindestens einer der beiden hMSC-Gruppen der jeweiligen Vergleiche (hMSC-K versus hMSC-seneszent, hMSC-K versus hMSC-alt bzw. hMSC-K versus hMSC-OP) in mindestens 50% der RNA-Proben exprimiert waren (= „present“), wurden weiter analysiert. Differentielle Genexpression wurde durch folgende Kriterien definiert: Der Foldchange (FC), also die Stärke der Genexpressionsänderung zwischen zwei Vergleichsgruppen musste  $< 0,667$  für erniedrigte Expression und  $> 1,5$  für erhöhte Expression betragen, dies entspricht einer 1,5fachen Genexpressionsänderung im Vergleich zu hMSC-K. Zusätzlich wurden nur jene FC als aussagekräftig betrachtet, deren q-Wert  $< 10\%$  betrug. Dieser Wert bezeichnet die Falscherkennungsrate in Prozent, die sich wiederum aus den Daten von 500 Permutationen zusammen setzt.

Die Zuordnung in Gene-Ontologie (GO)-Gruppen erfolgte mittels Gostat mit der Benjamini und Hochberg Berechnung (Benjamini and Hochberg 1995). Als Referenzliste dienten all jene Probesets, die mindestens in einer der beiden Vergleichsgruppen in mindestens 50% der hMSC RNA-Proben als „present“ detektiert wurden. Nur jene GO-Gruppen galten als überrepräsentativ häufig vorkommend, die nach der Benjamini und Hochberg Berechnung einen  $p < 0,1$  aufwiesen und mindestens 4 Gene umfassten. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen wurden nur jene GO-Gruppen in der vorliegenden Arbeit aufgeführt, denen in der Referenzliste weniger als 200 Gene zuzuordnen waren.

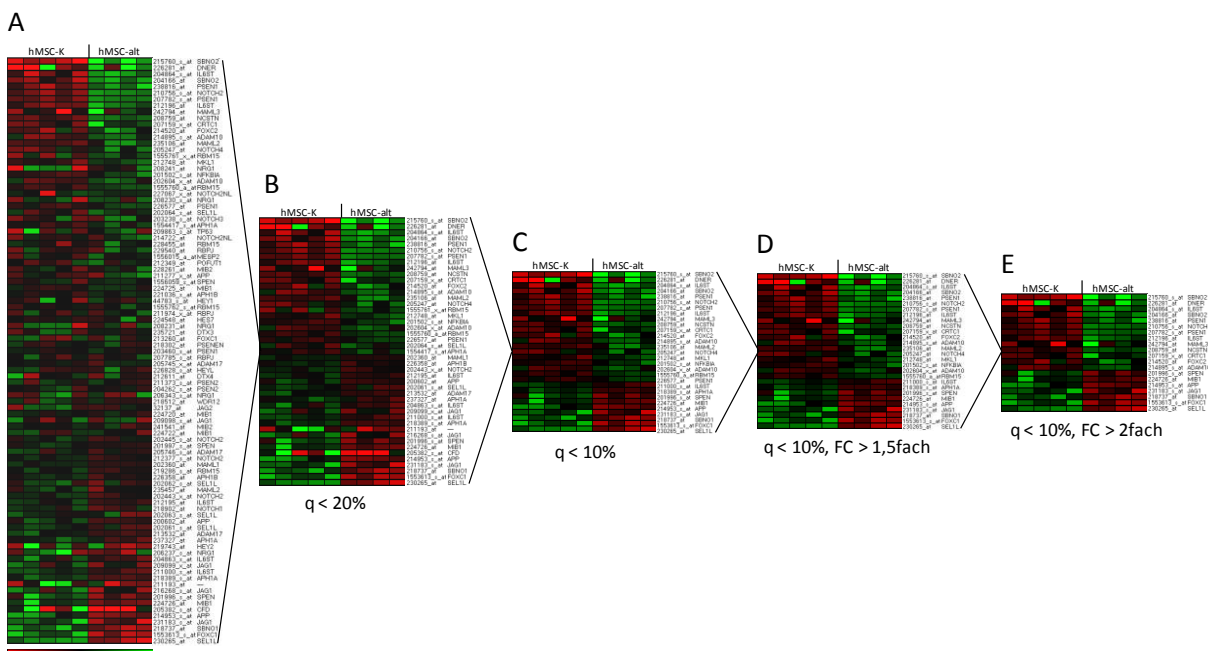
Die Generierung von Heatmaps wurde ebenfalls von PD Dr. L. Klein-Hitpass mit dem Programm Spotfire DecisionSite for Functional Genomics 9.1.1 durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Mikroarray-Analysen

#### 5.1.1 Aufarbeitung der Mikroarray-Daten

Von den möglichen 54'000 Genprodukten, die mittels der Microchips von Affymetrix hätten detektiert werden können, zeigten mindestens die Hälfte in allen hMSC ein positives Hybridisierungssignal. Bevor diese Datenmengen nach anschließendem Vergleich zweier hMSC-Gruppen mittels SAM (Bsp. hMSC-alt versus hMSC-K) systembiologisch ausgewertet werden konnten, musste die Verlässlichkeit der Daten beachtet werden.



**Abb. 9** Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von Probesets mit Relevanz im NOTCH-Signalweg in hMSC-K und hMSC-alt. Dargestellt sind die Hybridisierungssignale der 4 MSC-alt-, sowie der 5 hMSC-K-Populationen für alle NOTCH-relevanten Probesets (93), die in der SAM (hMSC-alt/hMSC-K) detektiert werden konnten ohne stringente Einschränkungen (A). Der „fold-change“ (FC) variierte dabei zwischen 0,111 (oben) und 4,545 (unten). Der q-Wert schwankte je nach Probeset zwischen 0% und maximal 60,31%. Im Anhang sind alle Probesets mit FC, q-Wert und Hybridisierungssignal ausführlich aufgelistet (Tab. 19). Nach Abzug aller Probesets mit  $q \geq 20\%$  blieben 45 Genprodukte übrig (B). Die Eingrenzung auf  $q < 10\%$  resultierte in 29 Probesets (C) und durch zusätzliche Beachtung des FC und Eingrenzung auf eine mindestens 1,5fache Genexpressionsänderung konnten 28 signifikante Probesets detektiert werden (D). Eine weitere Erhöhung des FC auf mindestens 2fache Genexpressionsänderung reduzierte die Anzahl auf signifikante 20 Genprodukte (E). Der hellste Rotton markiert ein 3fach höheres Hybridisierungssignal im Vergleich zum Mittelwert, der hellste Grünton ein 3fach geringeres Signal.

Die Stärke der Genexpressionsänderungen („fold change“, FC) variierte in den SAM-Datensätzen zwischen 0,0001- 56,7 wobei 1 keine Änderung,  $<1$  eine verringerte Genexpression und  $>1$  eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle bedeutete. Mit welcher Wahrscheinlichkeit der FC ein Zufallsergebnis darstellte, wurde mittels der Falscherkennungsrate  $q$  festgelegt, deren Wert je nach Genprodukt zwischen 0% und 60,5% variierte.

Das in Abb. 9 gezeigte Beispiel soll repräsentativ für die gesamte SAM stehen. Hierfür wurden unabhängig von FC und  $q$ -Wert alle Genprodukte aus der SAM hMSC-alt versus hMSC-K heraus-

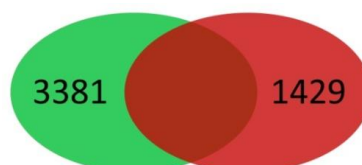
gesucht, die über die in den Probesets hinterlegten Informationsfelder mit der NOTCH-Signalgebung in Zusammenhang gebracht werden können. Die Hybridisierungssignale aller 4 hMSC-alt-Populationen und aller 5 hMSC-K-Populationen wurden entsprechend der Höhe des FC von gering nach hoch sortiert und aus diesen Werten eine Heatmap erstellt, wobei Grün eine geringes Hybridisierungssignal und Rot eine hohes Signal darstellt (Abb. 9A). Es ist deutlich zu sehen, dass ohne stringente Einschränkungen zwar viele Gene des NOTCH-Signalweges detektiert worden sind, aber die Schwankungen in der Höhe des Hybridisierungssignales innerhalb der hMSC-K- oder hMSC-alt-Gruppe sehr groß sind. Durch Einschränken des q-Wertes auf  $< 20\%$  wird das Genexpressionsmuster innerhalb der jeweiligen hMSC-Gruppe deutlich klarer (Abb. 9B). Die Erhöhung der Stringenz auf  $q < 10\%$  reduziert die Varianz zwischen den hMSC-Populationen nochmals, es bleiben nur 29 von ursprünglich 93 Genprodukten übrig (Abb. 9C). Die zusätzliche Erhöhung des FC auf mindestens 1,5fache Genexpressionsänderung reduziert die Anzahl der Probesets nur noch einmal auf 28 (Abb. 9D). Wenn der FC jedoch auf eine mindestens 2fache Änderung angehoben wurde, blieben nur mehr 20 Probesets übrig, die jedoch einen eindeutigen Unterschied zwischen hMSC-alt und hMSC-K ohne gravierende Spendervariabilitäten zeigen (Abb. 9E).

Das Beispiel demonstriert das Spannungsfeld zwischen stringenter technischer Analyse und bioinformatischen Suchstrategien. Es verdeutlicht, dass allein die Herabsetzung des q-Wertes auf 10% signifikante Ergebnisse liefert. Unter der Verwendung von  $q < 10\%$  traten abgesehen von der Anzahl an Probesets kaum Unterschiede zwischen den Heatmaps mit  $FC < 1,5$  und  $FC < 2$  auf. Beide Heatmaps zeigten kaum Spendervariabilitäten zwischen den hMSC-Populationen innerhalb einer Untersuchungsgruppe. Da im Folgenden vor allem auf die Systembiologie von hMSC eingegangen wurde, wurde die Stringenz so gewählt, dass die Grundinformation aussagekräftig und verlässlich blieb, und dennoch die Möglichkeit der Suche nach systembiologischen Zusammenhängen erlaubte. Für die Analysen der SAM-Datensätze wurden daher folgende Bedingungen gewählt: 1,5fache Genexpressionsänderung ( $FC < 0,667$  bzw.  $FC > 1,5$ ) bei  $q < 10\%$ . Nur bei der Suche nach Kandidatengen und der Erstellung von Ranglisten (siehe 5.2.2 und 5.3.1) wurde die Stringenz nochmals auf  $< 0,5$  bzw.  $FC > 2$  erhöht.

## 5.1.2 Mikroarray-Analysen von *in-vivo*-gealterten hMSC

### 5.1.2.1 Differentielle Genexpression in *in-vivo*-gealterten hMSC

Genexpressionsanalysen von hMSC aus alten Patienten ( $\bar{x}$  81,75 $\pm$ 4,86 Jahre, hMSC-alt) und hMSC aus Patienten mittleren Alters ( $\bar{x}$  57,6 $\pm$ 9,56 Jahre, hMSC-K) wurden mittels Mikroarray-Hybridisierungen durchgeführt, um den Einfluss der *in-vivo*-Alterung auf das Transkriptom dieser Stammzellen zu untersuchen. Die statistische Auswertung der Daten mit Hilfe von SAM zeigte Unterschiede in der Genexpressionsstärke zwischen hMSC-K und hMSC-alt auf. Die 54613 Probesets des GeneChips HG-U 133 Plus 2 stellen 54613 mögliche, detektierbare Genprodukte dar, von denen 27356 in hMSC-K und hMSC-alt detektierbar waren. Davon sind 1429 Genprodukte in hMSC-alt mindestens 1,5fach höher exprimiert als in hMSC-K, und 3381 Genprodukte mindestens 1,5fach geringer exprimiert (Abb. 10).



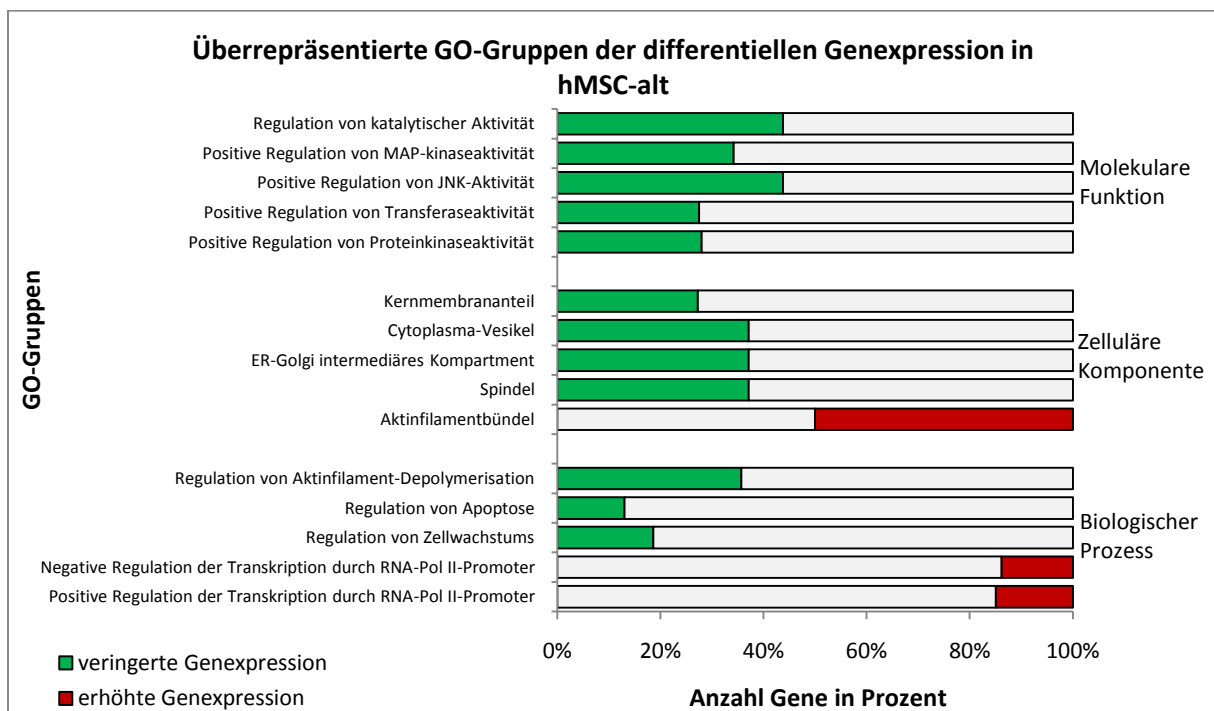
**Abb. 10** Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in hMSC-alt im Vergleich zu hMSC-K. Patienten höheren Alters waren  $\bar{x}$  81,75 $\pm$ 4,86 Jahre alt. Das Alter der Spender der Vergleichsgruppe betrug  $\bar{x}$  57,6 $\pm$ 9,56 Jahre. Angegeben ist die Anzahl der höher exprimierten Genprodukte (rot), bzw. der geringer exprimierten Genprodukte (grün) in hMSC-alt.

### 5.1.2.2 Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat

Die Funktion der differentiell in hMSC-alt exprimierten Gene wurde mit Hilfe des Onlinetools Gostat in den Hauptkategorien Biologischer Prozess, Molekulare Funktion und Zelluläre Komponente statistisch untersucht. Als Referenzliste dienten die 27356 Genprodukte, die in hMSC-alt und/oder hMSC-K exprimiert werden. Mittels Gostat wurden die Genprodukte bzw. Gene in Gen-Ontologie (GO)-Gruppen eingeordnet und statistische Berechnungen zeigten überrepräsentativ häufig vorkommende GO-Gruppen in den differentiell exprimierten Genen auf (Abb. 11).

Geringer in hMSC-alt exprimierte Gene sind in der Kategorie Molekulare Funktion überrepräsentiert häufig GO-Gruppen für enzymatische Reaktionen und Kinaseaktivitäten – im speziellen der JNK- und MAP-Signalwege – zuzuordnen. Höher exprimierte Gene sind nicht in GO-Gruppen der Molekularen Funktion einzuordnen, spielen jedoch eine Rolle bei der Aktinfilamentbildung, sowie bei der Regulation der Transkription über RNA-Pol II.

Gene, die mit der Kernmembran, der Spindel, sowie dem Vesikeltransport assoziierte werden, sind wiederum in hMSC-alt geringer exprimiert, ebenso Gene mit Funktion in der Regulation der Aktinfilament-Depolymerisation wie z.B. Gelsolin (*GSN*), Supervillin (*SVIL*) und *CAPG* (siehe Anhang Tab. 21, Tab. 22). Auch Gene des Zellwachstums und der Apoptose sind in der Kategorie Biologischer Prozess in hMSC aus älteren Spendern geringer exprimiert als in hMSC aus Patienten mittleren Alters.



**Abb. 11** Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-alt beim Vergleich mit hMSC-K. Die 1,5fach höher bzw. geringer exprimierte Genprodukte der Mikroarray-Ergebnisse zu hMSC-alt versus hMSC-K wurden mittels Gostat hinsichtlich ihrer Funktion untersucht. Als Referenzliste dienten dabei die 27356 Genprodukte, die in hMSC-alt und/oder hMSC-K exprimiert werden. Als 100% ist jeweils die Anzahl an Genen pro GO-Gruppe, die überhaupt in diesen hMSC exprimiert werden, dargestellt. Den jeweiligen Anteil daran, der überrepräsentativ häufig in den differentiell exprimierten Genen auftritt, ist farblich markiert: für erhöhte Genexpression in hMSC-alt: rote Balken, geringere Genexpression in hMSC-alt: grüne Balken.



### 5.1.2.3 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur *in-vivo*-Alterung

Die Mikroarray-Ergebnisse wurden mittels semi-quantitativer PCR und anschließender Densitometrie evaluiert. Zu diesem Zweck wurden 12 Gene ausgewählt, deren Probesets laut SAM in hMSC-alt bei einem q-Wert  $\leq 10\%$  mindestens 1,5fach höher bzw. geringer exprimiert wurden. Es war dabei nicht immer gegeben, dass alle Probesets eines Gens diese Bedingungen erfüllten. Für die Evaluierung wurden die 4 hMSC-alt-Populationen von 4 verschiedenen Spendern verwendet, die ebenfalls für die Mikroarray-Hybridisierungen herangezogen wurden. Als Kontrolle diente ein neuer Pool an hMSC aus 11 verschiedenen Patienten mittleren Alters ( $\bar{\phi} = 50,45 \pm 6,98$  Jahre), die nicht für die Hybridisierung verwendet wurden, wodurch es sich im Folgenden nicht um eine technische, sondern eine biologische Evaluierung der SAM-Ergebnisse handelt.

**Tab. 9 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur *in-vivo*-Alterung von hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie**

		Mikroarray-Analyse			Analyse der semi-quantitativen PCR			Übereinstimmung mit Mikroarray
Gen Symbol	Gen Name	Probeset-ID	FC (hMSC-alt/hMSC-K) SC-K)	q (%)	FC ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ )	STABW [%] von $\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$	STABW [%] von $\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}}$	
<i>COMP</i>	cartilage oligomeric	205713_s_at	5,35	6,11	1,73	33,78	22,37	+
<i>CTNNB1</i>	catenin, beta 1	201533_at	3,23	0,29	1,25	13,05	9,46	(+)
		1554411_at	3,70	0,60				
		223679_at	1,73	10,02				
<i>EGR2</i>	early growth response 2	205249_at	7,06	10,00	2,46	57,24	79,79	+
<i>MAP4</i>	microtubule-associated protein 4	212566_at	1,56	7,87	1,04	33,20	12,62	—
		200835_s_at	14,78	0,00				
		33850_at	0,92	49,04				
		212567_s_at	1,04	52,07				
		243_g_at	0,93	49,04				
<i>MAB21L2</i>	mab-21-like 2	210302_s_at	2,71	9,01	2,05	22,12	25,89	+
		210303_at	1,96	15,95				
<i>NOG</i>	noggin	231798_at	5,11	1,74	1,24	33,33	32,98	(+)
<i>PDGFA</i>	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	205463_s_at	2,53	0,60	1,50	27,43	21,58	+
		216867_s_at	5,60	0,00				
<i>CTS2</i>	cathepsin Z	210042_s_at	9,70	0,00	2,24	8,88	23,47	+
<i>TP53</i>	tumor protein p53	211300_s_at	0,18	0,36	1,62	45,60	31,75	—
		201746_at	0,44	9,01				
<i>TGFB1</i>	transforming growth	203085_s_at	0,24	0,98	1,31	11,27	15,77	—
<i>MMP3</i>	matrix metalloproteinase 3	205828_at	0,14	4,45	0,87	66,91	97,06	—
<i>RPS6KA2</i>	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 2	1557970_s_a	0,04	0,00	1,33	17,62	3,93	—
		204906_at	0,68	31,53				
		212912_at	0,84	57,71				

Gelistet sind alle exprimierten Probeset-IDs von 12 Genen, die beim Vergleich von hMSC-alt mit hMSC-K mittels SAM einen „fold change“ (FC)  $< 0,667$  bzw.  $> 1,5$  in mindestens einem Probeset aufwiesen (FC = hMSC-seneszent/hMSC-K). Der q-Wert betrug mindestens in einem Probeset  $\leq 10\%$ . Semi-quantitative PCR wurde mit den 4 für den Array verwendeten hMSC-alt ( $\bar{\phi} 81,75 \pm 4,86$  Jahre), sowie hMSC aus 11 weiteren Spendern mittleren Alters ( $\bar{\phi} = 50,45 \pm 6,98$  Jahre, hMSC-K) als Kontrolle durchgeführt. Nach densitometrischer Auswertung der einzelnen PCR-Ergebnisse und Normalisierung auf das Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) wurden von jedem Gen die relativen Expressionsstärken gemittelt ( $\bar{\phi}$ ) in den hMSC-alt ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}}$ ) und hMSC-K ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ ) Populationen. Die Standardabweichung (STABW) wurde in Prozent zu  $\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}}$  bzw.  $\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$  gesetzt, der FC aus den Mittelwerten berechnet (FC =  $\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ ) und mit dem FC der Mikroarray-Analyse (FC[hMSC-alt/hMSC-K]) verglichen und bewertet:

- +  $\text{FC}(\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}) > 1,5$  bzw.  $< 0,667$  entsprechend Mikroarray-Ergebnissen
- (+)  $\text{FC}(\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}) 1,5-1,2$  bzw.  $0,667-0,8$  entsprechend Mikroarray-Ergebnissen
- keine Übereinstimmung

Die Abb. 12 zeigt deutlich die unterschiedliche Expression der ausgewählten Gene in hMSC-K und hMSC-alt, wobei auffällig ist, dass die Standardabweichung in den hMSC-K in allen 11 PCR-Analysen deutlich geringer ist, verglichen mit hMSC-alt.

Nach Berechnung des „fold change“ ( $FC = \frac{\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}}}{\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}}$ ) zeigte sich, dass bei 4 der 11 Gene der  $FC > 1,5$  betrug (Tab. 9). Weitere 3 Gene wiesen einen  $FC \geq 1,2$  auf, und zeigen dadurch eine deutliche Tendenz zur erhöhten Expression in hMSC-alt, die der SAM entspricht. Nur bei den 4, laut SAM in hMSC-alt geringer exprimierten Genen konnte keine Übereinstimmung mit den PCR-Analysen gefunden werden. Allein *MMP3* zeigt eine leichte Tendenz zur verringerten Expression, die aufgrund der hohen Standardabweichung in hMSC-K als nicht zuverlässig angesehen wird. Damit lassen sich die Mikroarray-Ergebnisse zur *in-vitro*-Alterung von hMSC trotz der Verwendung eines neuen Pools an hMSC-K zu 58,33% bestätigen.

Die anhand der Standardabweichung ersichtliche interindividuelle Variabilität der Genexpression innerhalb einer Untersuchungsgruppe, z.B. hMSC-K, konnte auch in den Mikroarray-Hybridisierungen nachgewiesen werden, verdeutlicht an einer Heatmap (Abb. 13).

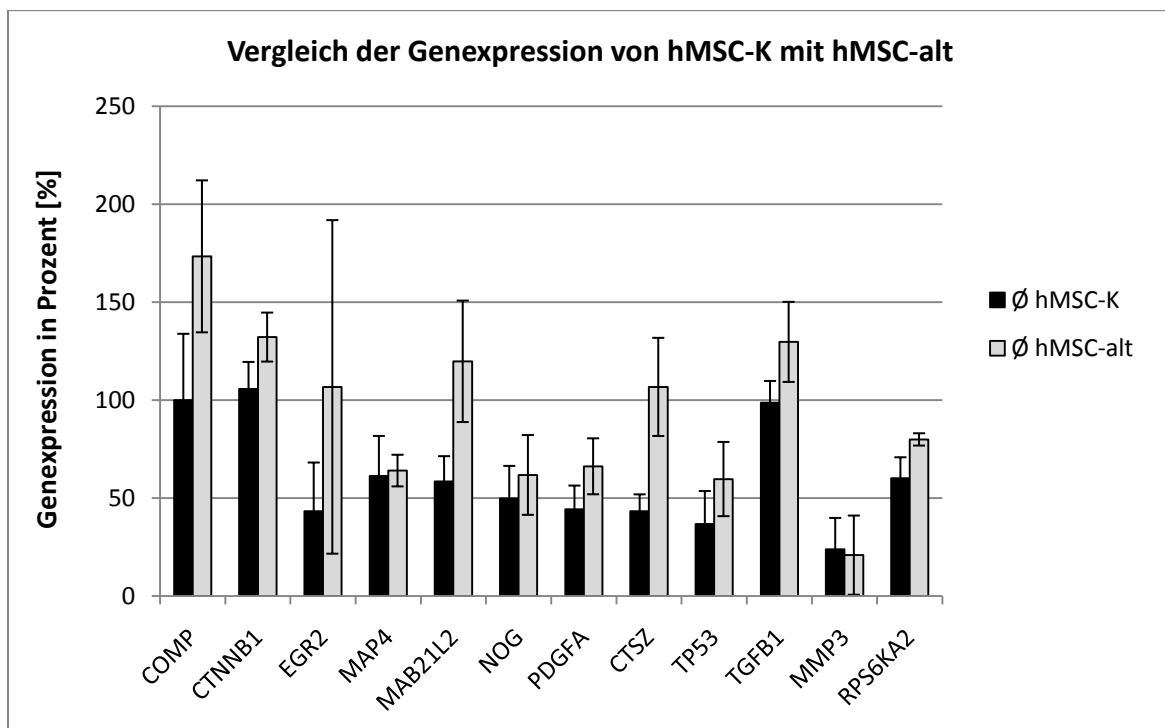


Abb. 12 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tab. 9 zur biologischen Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur *in-vivo*-Alterung von hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie. Angegeben sind die Mittelwerte der densitometrischen Berechnung zur relativen Genexpressionsstärke der einzelnen Gene in hMSC-alt ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-alt}}$ ) und hMSC-K ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ ) nach Normalisierung auf das Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

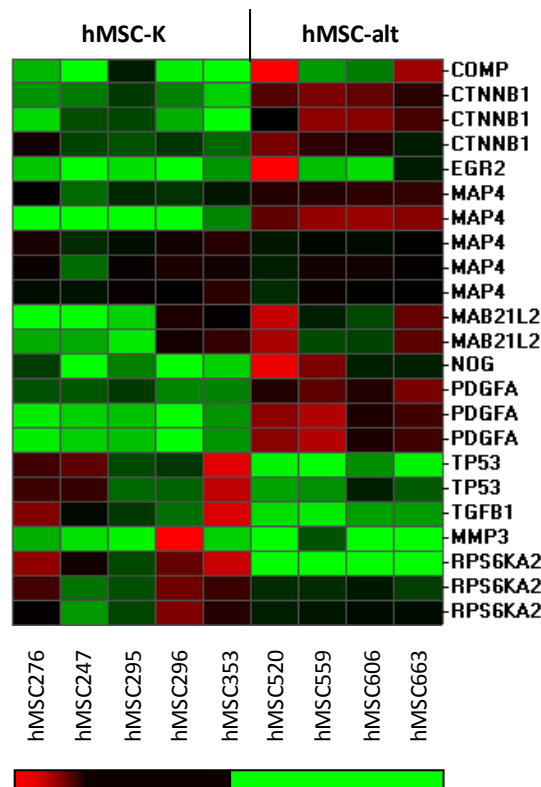


Abb. 13 Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von hMSC-K und hMSC-alt. Farblich dargestellt sind die Hybridisierungssignale der 4 MSC-alt-, sowie der 5 hMSC-K-Populationen für alle Probesets der für die semi-quantitative PCR ausgewählten Gene. Je Probeset wurde ein Mittelwert gebildet (schwarz); der hellste Rotton markiert ein 4fach höheres Hybridisierungssignal im Vergleich zum Mittelwert, der hellste Grünton ein 4fach geringeres Signal.

### 5.1.3 Mikroarray-Analysen von seneszenten hMSC

#### 5.1.3.1 Differentielle Genexpression in seneszenten hMSC

Genomanalysen von hMSC-seneszent und hMSC früher Passagen (hMSC-K) wurden mittels Microchip Hybridisierungen durchgeführt. RNA von hMSC von jeweils 5 Spendern mittleren Alters (hMSC-K:  $\bar{\varnothing}$  57,6 $\pm$ 9,56 Jahre, hMSC-seneszent:  $\bar{\varnothing}$  56,4 $\pm$ 8,96 Jahre) wurde isoliert und die Proben mit den GeneChips HG-U 133 Plus 2 hybridisiert. Die Auswertung der Daten ergab, dass 25716 Genprodukte in hMSC-seneszent und/oder hMSC-K exprimiert werden. Verglichen mit hMSC-K sind 1284 dieser Genprodukte in hMSC-seneszent mindestens 1,5fach höher exprimiert und 2477 Genprodukte mindestens 1,5fach geringer exprimiert (Abb. 14).



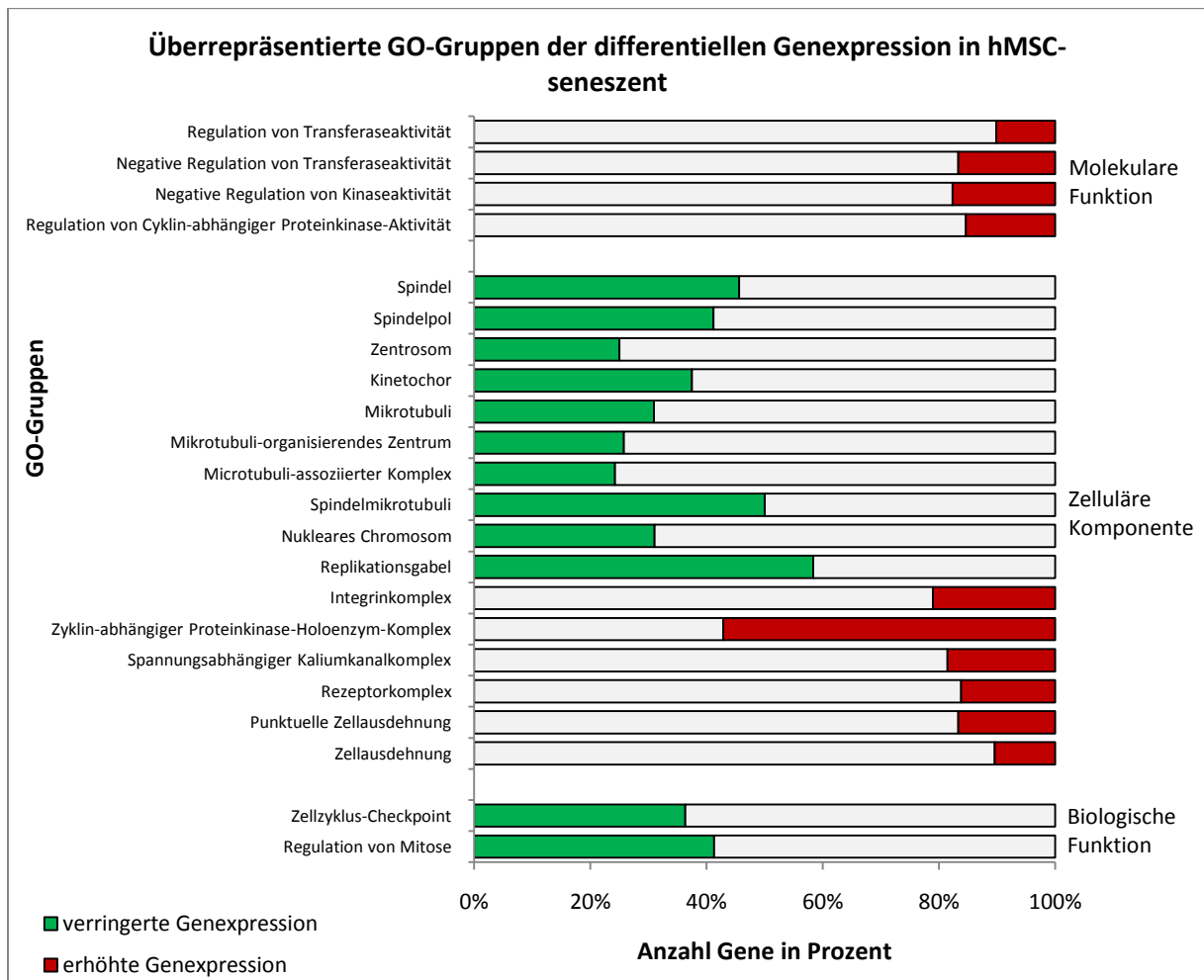
Abb. 14 Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in seneszenten hMSC nach Vergleich mit hMSC-K. Angegeben ist die Anzahl der höher exprimierten Genprodukte (rot), bzw. der geringer exprimierten Genprodukte (grün) in hMSC-seneszent.

### 5.1.3.2 Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat

Die in seneszenten Zellen 1,5fach höher bzw. 1,5fach geringer exprimierte Genprodukte wurden mittels Gostat hinsichtlich ihrer Funktion in den Hauptkategorien Biologischer Prozess, Molekulare Funktion und Zelluläre Komponente untersucht. Als Referenzliste dienten die 25716 Genprodukte, die in hMSC-seneszent und/oder hMSC-K exprimiert wurden.

In der Kategorie Biologischer Prozess wurden für höher exprimierte Gene in hMSC-seneszent keine überrepräsentativ häufigen GO-Gruppen detektiert. Geringer exprimierte Gene hingegen konnten der Mitose und der Regulation des Zellzyklus zugeordnet werden (Abb. 15). In der Kategorie Zelluläre Komponente sind Spindel-, Mikrotubuli und Replikations-assoziierte Gene geringer exprimiert und Gene für die Zellausdehnung, sowie Integrine und Rezeptoren (z.B. ITG-Rezeptoren, TGFBR2) höher exprimiert. Ausschließlich höher exprimierte Gene wurden der negativen Regulation von Kinase- und Transferaseaktivität in der Kategorie Molekulare Funktion zugeordnet.

Die in den jeweiligen GO-Gruppen detektierten Gene, sowie deren exakte Anzahl sind im Anhang aufgelistet (Tab. 23, Tab. 24).



**Abb. 15 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-seneszent beim Vergleich mit hMSC-K.** Die 1,5fach höher bzw. geringer exprimierte Genprodukte der Mikroarray-Ergebnisse zu hMSC-seneszent versus hMSC-K wurden mittels Gostat hinsichtlich ihrer Funktion untersucht. Als Referenzliste dienten dabei die 25716 Genprodukte, die in hMSC-seneszent und/oder hMSC-K exprimiert werden. Als 100% ist jeweils die Anzahl an Genen pro Gruppe, die überhaupt in hMSC exprimiert werden, dargestellt. Den jeweiligen Anteil daran, der überrepräsentativ häufig in den differentiell exprimierten Genen auftritt, ist farblich markiert: für erhöhte Genexpression in hMSC-seneszent: rote Balken, geringere Genexpression in hMSC-alt: grüne Balken.

### 5.1.3.3 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur Seneszenz

Die Allgemeingültigkeit der Mikroarray-Ergebnisse wurde mittels semi-quantitativer PCR an hMSC 5 weiterer Spender biologisch untersucht. Die RNA wurde aus P1 und Px (seneszente Passage) isoliert. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von 32 Genen untersucht, die in den Auswertungen der Mikroarray-Analysen mindestens 1,5fach erhöhte bzw. erniedrigte Expression aufwiesen. Nach densito-metrischer Auswertung der PCR und Normalisierung auf ein Haushaltsgen wurden die relativen Genexpressionsänderungen ( $FC = P_x/P_1$ ) ermittelt, soweit möglich.

Bei 26 Genen, und somit 81,25% aller untersuchten Gene, konnten die Mikroarray-Ergebnisse durch die PCR-Analysen bestätigt werden (Tab. 10). In Einzelfällen konnten jedoch keine PCR-Banden in einigen hMSC-Populationen detektiert werden (n.e.), in anderen Fällen konnte nur in einer der beiden Vergleichsgruppen eine Expression detektiert werden. Dies deutet auf induzierte bzw. exklusive Expression des entsprechenden Gens hin. *CENPM*, *TK1*, *RUNX3*, *ESR1*, *CD24* und *HMMR* zeigen in mindestens einer hMSC-Population eine exklusive Expression in P1 auf ( $\downarrow$ ), während *CA2*, *FGFR2* und *SOX11* sogar in 3-5 hMSC-Populationen exklusiv in P1 expimiert werden und keine Expression in Px aufweisen. *PSG1* und *GPR116* zeigen exklusive Expression in Px ( $\uparrow$ ) in 2 hMSC-Populationen, *NR3C2*, *CDH1* und *CDKN2A* sogar in 3-5 Populationen.

Gene, von denen einzelne Probesets einen q-Wert  $> 10\%$  aufwiesen, konnten ebenfalls bestätigt werden. Zum Teil wurden durch die PCR-Analyse und Densitometrie extreme Unterschiede in der Höhe der Genexpression zwischen den hMSC verschiedener Spender detektiert, z.B. für *IGFBP5* oder *HELLS*. Diese Spendervariabilitäten der untersuchten Gene lassen sich ebenfalls in den Mikroarray-Analysen beobachten, verdeutlicht an einer Heatmap (Abb. 16).

**Tab. 10** Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zu seneszenten hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie

		Mikroarray-Analyse			Analyse der semi-quantitativen PCR						
Gen	Gen Name	Probeset-ID	FC (hMSC- senes- zent/ hMSC-K)	q (%)	FC( $P_x/P_1$ ) der einzelnen hMSC-Populationen					$N_{\text{Spender}}$ mit FC ( $P_x/P_1$ ) >1,5 bzw. <0,667	Überei- stim- mung mit Array
Symbol					539	542	545	575	540		
<i>COL10A1</i>	collagen, type X, alpha 1	205941_s_at 217428_s_at	0,30 0,23	2,70 1,61	0,12	0,10	0,06	0,05	0,02	5	++
<i>COL14A1</i>	collagen, type XIV, alpha 1	212865_s_at	0,25	9,54	11,6	0,27	0,88	0,08	2,92	2	—
<i>CENPM</i>	centromere protein M	218741_at	0,04	0,00	0,13	$\downarrow$	$\downarrow$	0,68	0,17	4	+
<i>CCNB1</i>	cyclin B1	214710_s_at 228729_at	0,11 0,09	0,00 0,00	0,54	0,79	0,45	0,35	0,27	4	+
<i>DHFR</i>	dihydrofolate reductase	202532_s_at 202533_s_at 202534_x_at 48808_at	0,47 0,41 0,47 0,41	0,72 1,99 0,00 0,34	1,74	0,75	3,43	1,69	0,97	0	—
<i>PTGS2</i>	prostaglandin- endoperoxide synthase 2	1554997_a_at 204748_at	0,33 0,45	2,43 7,00	0,16	0,39	0,20	0,39	0,07	5	++
<i>HELLS</i>	helicase, lymphoid-specific	220085_at 223556_at 227350_at	0,19 0,31 0,28	0,50 1,02 0,00	0,22	0,30	0,58	2,14	1,04	3	+
<i>CA2</i>	carbonic anhydrase II	209301_at	0,02	1,61	$\downarrow$	0,41	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	5	+++
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor, beta 2	209908_s_at 209909_s_at 220407_s_at 228121_at	0,28 0,35 0,31 0,36	4,84 1,61 1,02 1,02	0,29	0,58	0,46	0,36	0,96	4	+
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1	209875_s_at	0,47	7,00	n.e.	0,95	0,51	0,22	0,98	2	+
<i>TK1</i>	thymidine kinase 1, soluble	1554408_a_at 202338_at	0,14 0,12	0,00 0,00	0,38	$\downarrow$	0,47	0,63	0,30	5	+
<i>RUNX3</i>	runt-related transcription factor 3	204197_s_at 204198_s_at	0,26 0,33	1,02 4,84	$\downarrow$	0,23	$\downarrow$	0,08	0,16	5	++

<i>FGFR2</i>	fibroblast growth factor receptor 2	203638_s_at 208228_s_at	0,09 0,36	0,00 1,61	0,06	↓	↓	↓	0,04	5	+++
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1	205225_at	0,42	0,50	1,08	↓	↓	0,42	0,26	4	++
<i>CD24</i>	CD24 molecule	208650_s_at	0,15	1,43	↓	0,35	0,30	0,13	0,72	4	+
		208651_x_at	0,32	4,16							
		209771_x_at	0,35	11,20							
		216379_x_at	0,31	1,99							
		266_s_at	0,19	2,43							
<i>HMMR</i>	hyaluronan-mediated motility receptor	207165_at 209709_s_at	0,03 0,09	0,00 0,00	0,41	↓	0,36	0,53	0,34	5	+
<i>SOX11</i>	SRY (sex determining region Y)-box 11	204913_s_at	0,09	0,00	↓	↓	↓	↓	↓	5	+++
		204914_s_at	0,09	0,00							
		204915_s_at	0,12	0,00							
<i>PSG1</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1	208257_x_at	13,73	4,84	↑	↑	6,85	2,93	3,68	5	+
		210195_s_at	3,77	5,75							
		210196_s_at	3,17	17,70							
<i>PSG5</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5	204830_x_at	5,89	0,89	n.e.	2,04	2,44	1,03	1,71	3	+
		239583_x_at	2,12	3,36							
<i>DPP4</i>	dipeptidyl-peptidase 4	203716_s_at	6,77	0,58	0,20	1,02	1,25	1,19	1,37	0	—
		203717_at	4,39	1,02							
		211478_s_at	7,55	0,19							
<i>CNTN3</i>	contactin 3	229831_at	6,13	1,43	6,47	1,71	2,64	0,73	3,37	4	+
<i>SFRP4</i>	secreted frizzled-related protein 4	204051_s_at	3,14	9,54	1,66	0,52	1,02	0,65	1,65	2	—
		204052_s_at	4,89	7,00							
<i>PCDH10</i>	protocadherin 10	228635_at	4,92	2,70	5,31	4,56	2,67	0,93	1,18	3	+
<i>IGFBP5</i>	insulin-like growth factor binding protein 5	1555997_s_at	5,69	1,99	33,4	1,89	2,40	2,15	3,93	5	+
		203424_s_at	8,69	1,02							
		203425_s_at	2,12	15,27							
		203426_s_at	2,94	4,84							
		211958_at	3,81	3,36							
<i>TNFRSF11</i>	tumor necrosis factor superfamily member 11	204932_at	2,07	1,25	2,62	1,83	1,28	0,79	0,91	2	+
		204933_s_at	2,63	0,89							
<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	207039_at	4,79	0,00	↑	↑	↑	↑	↑	5	+++
		209644_x_at	2,88	1,25							
<i>GPR116</i>	G protein-coupled receptor 116	212950_at	4,86	1,25	↑	n.e.	n.e.	↑	3,43	3	+++
		212951_at	3,59	3,36							
<i>NRCAM</i>	neuronal cell adhesion molecule	204105_s_at	4,79	2,70	1,12	0,62	0,30	1,18	0,85	0	—
<i>CDH1</i>	cadherin 1	201131_s_at	5,67	0,43	↑	n.e.	↑	↑	↑	4	+++
<i>SECTM1</i>	secreted and transmembrane 1	213716_s_at	2,11	9,54	7,06	0,46	1,12	1,03	1,97	2	—
<i>NR3C2</i>	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	205259_at	14,33	0,00	↑	1,56	n.e.	↑	↑	4	+++
<i>COL4A4</i>	collagen, type IV, alpha 4	214602_at	34,70	0,00	3,40	5,45	3,73	0,68	1,44	3	+
		229779_at	16,05	0,00							

Gelistet sind alle exprimierten Probset-IDs von 32 Genen, die beim Vergleich von hMSC-seneszent mit hMSC-K mittels SAM einen „fold change“ (FC) < 0,667 bzw. > 1,5 aufwiesen (FC = hMSC-seneszent/hMSC-K). Der q-Wert betrug < 20%. Semi-quantitative PCR wurde mit 5 weiteren hMSC-Populationen durchgeführt und die Ergebnisse – soweit möglich – densitometriert. Die Daten wurden auf das Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) normalisiert. Die relative Genexpression der einzelnen hMSC wurde berechnet (FC = hMSC senescente Passage (Px)/hMSC Passage 1 (P1)) und die Anzahl (N) der Spender, deren FC > 1,5 bzw. < 0,667 betrug, aufgezählt. Wenn in einer hMSC-Population weder in P1 noch in Px eine Genexpression detektierbar war, galt dieses Gen als nicht exprimiert (n.e.). Die densitometrische Auswertung war ebenfalls nicht möglich, wenn in einer der beiden Passagen einer hMSC-Population kein Amplikon eines Gens nachzuweisen war. Im Falle einer fehlenden Expression in P1 galt dann dieses Gen als exklusiv exprimiert in Px (↑), bei fehlender Expression in Px galt das Gen als exklusiv exprimiert in P1 (↓).

Die Ergebnisse der semi-quantitativen PCR wurden folgendermaßen bewertet (hMSC-Populationen mit n.e. wurden nicht in die Bewertung einbezogen):

- +++ wenn in mindestens der Hälfte der hMSC-Populationen exklusive Expression vorliegt (↓ oder ↑)
- ++ wenn in mindestens der Hälfte der hMSC-Populationen der  $FC(Px/P1) \geq$  bzw.  $\leq FC(hMSC-seneszent/hMSC-K)$  ist
- + wenn in mindestens der Hälfte der hMSC-Populationen der  $FC(Px/P1) > 1,5$  bzw.  $< 1,667$  ist
- wenn in mindestens der Hälfte der hMSC-Populationen keine Übereinstimmung mit der Mikroarray-Analyse vorliegt

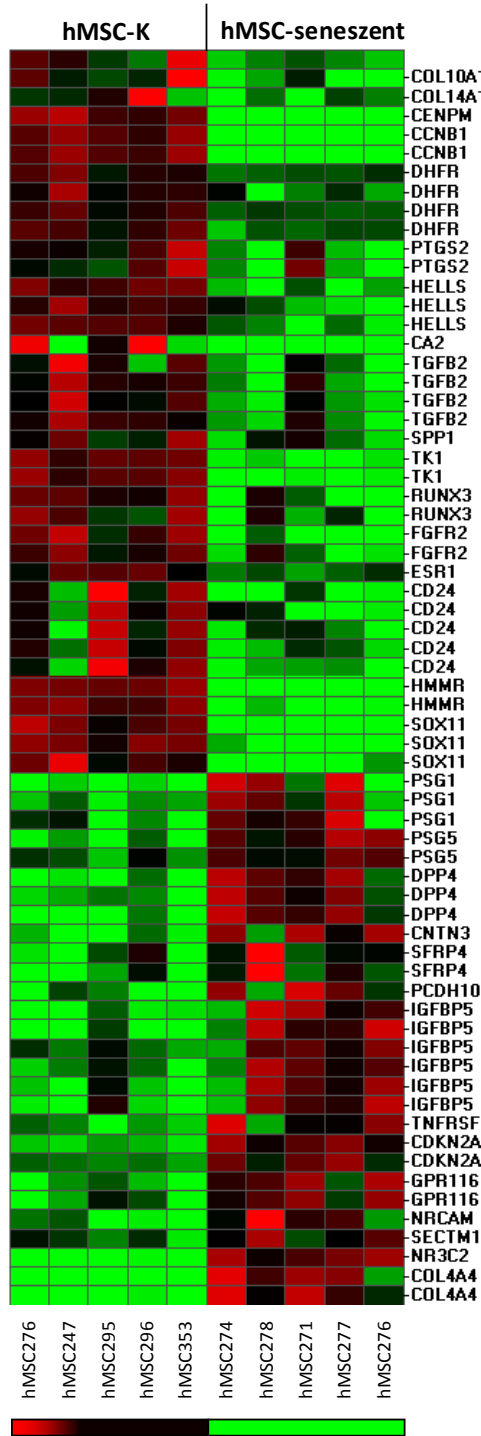


Abb. 16 Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von hMSC-K und hMSC-seneszent. Farblich dargestellt sind die Hybridisierungssignale der 5 MSC-seneszent-, sowie der 5 hMSC-K-Populationen für alle Probesets der für die semi-quantitative PCR ausgewählten Gene. Je Probeset wurde ein Mittelwert gebildet (schwarz); der hellste Rotton markiert ein 4fach höheres Hybridisierungssignal im Vergleich zum Mittelwert, der hellste Grünton ein 4fach geringeres Signal.

## 5.1.4 Mikroarray-Analysen von Osteoporotischen hMSC

### 5.1.4.1 Differentielle Genexpression in hMSC-OP

Humane hMSC wurden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Osteoporose untersucht, indem das Transkriptom von hMSC aus Osteoporose-Patienten mit dem Transkriptom von hMSC aus Spendern ohne Osteoporose verglichen wurde. Zu diesem Zweck wurden die Mikroarray-Hybridisierungen der 5 hMSC-K aus Spendern mittleren Alters ( $\bar{\varnothing} 57,6 \pm 9,56$  Jahre) mit Hilfe von SAM mit den Hybridisierungen von hMSC-OP von 5 Frauen ( $\bar{\varnothing} 86,2 \pm 5,89$  Jahre alt) mit Osteoporose-Merkmalen (Hüftbruch durch Fall aus dem Stand und Wirbelkörperfrakturen) verrechnet.

Die SAM-Berechnungen zeigten, dass 25158 Probesets bzw. Genprodukte in hMSC-K bzw. hMSC-OP exprimiert werden. Davon wiesen bei einem q-Wert  $< 10\%$  1574 Genprodukte einen FC  $> 1,5$  und 1135 Genprodukte einen FC  $< 0,667$  und damit eine 1,5fach erniedrigte Genexpression in hMSC-OP auf (Abb. 17).



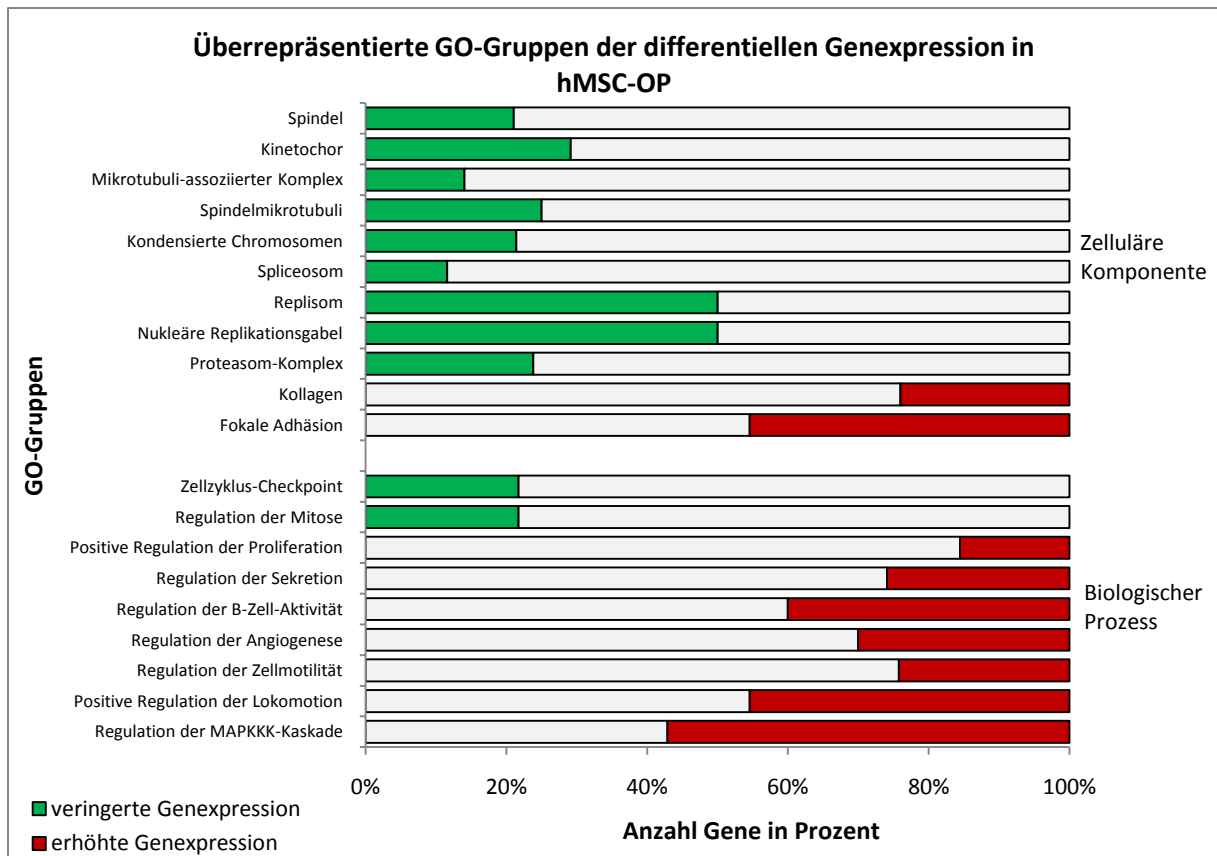
Abb. 17 Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten nach Vergleich mit hMSC-K. Angegeben ist die Anzahl der höher exprimierten Genprodukte (rot), bzw. der geringer exprimierten Genprodukte (grün) in hMSC-seneszent. B: Anzahl differentiell exprimierter Genprodukte in hMSC-OP nach Abzug der Alterungsgene aus den Mikroarray-Analysen zur *in-vivo*-Alterung von hMSC (hMSC-alt versus hMSC-K).

### 5.1.4.2 Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat

Die Funktion der differentiell exprimierten Gene in hMSC-OP wurde mittels einer Gostat-Analyse statistisch bestimmt.

Die 1574 Probesets der erhöhten Expression bzw. die 1135 Probesets der erniedrigten Genexpression wurden in dem Gostat-Online-Tool mit den 25158 Probesets, die in hMSC-K bzw. hMSC-OP überhaupt exprimiert werden, verglichen. In der Hauptkategorie Molekulare Funktion wurden keine GO-Gruppen überrepräsentiert häufig detektiert. Jedoch zeigte sich, dass Gene für die korrekte Funktion der Spindel, der Replikation und des Proteasoms bei Osteoporose in hMSC geringer exprimiert werden (Abb. 18). Auch Mikrotubuliaktivität und die Mitose sind negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu exprimieren hMSC-OP Kollagene und Gene für Fokale Adhäsionsproteine überrepräsentativ häufig höher. Auch Genprodukte mit Funktion in der Regulation der Lokomotion, Angiogenese und Sekretion sind höher exprimiert. Aufgrund der erhöhten Expression vieler Wachstumsfaktoren (*TGFB1*, *HBEGF*, *VEGFB*, *PDGFA*, siehe Anhang) ist die Proliferation von hMSC-OP entsprechend der Gostat-Analyse positiv reguliert.





**Abb. 18** Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-OP beim Vergleich mit hMSC-K. Dargestellt sind die mindestens 1,5fach höher bzw. geringer exprimierten Genprodukten der Mikroarray-Ergebnisse zu hMSC-OP versus hMSC-K. Als Referenzliste dienten dabei die 25158 Genprodukte, die in hMSC-OP und/oder hMSC-K exprimiert werden. Als 100% ist jeweils die Anzahl an Gene pro Gruppe, die überhaupt in der Referenzliste exprimiert werden, dargestellt. Den jeweiligen Anteil daran, der überrepräsentativ häufig in den differentiell exprimierten Genen auftritt, ist farblich markiert: für erhöhte Genexpression in hMSC-OP: rote Balken, geringere Genexpression in hMSC-OP: grüne Balken.

#### 5.1.4.3 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur Osteoporose

Die Mikroarray-Ergebnisse wurden mittels semi-quantitativer PCR und anschließender Densitometrie evaluiert. Zu diesem Zweck wurden 11 Gene herausgesucht, deren Probesets laut SAM in hMSC-OP versus hMSC-K mindestens 1,5fach höher bzw. geringer exprimiert waren. Der q-Wert betrug in mindestens einem Probeset pro Gen weniger als 10%.

Für die Evaluierung konnten nur 4 der 5 hMSC-OP-Population verwendet werden, die ebenfalls für die Mikroarray-Hybridisierungen herangezogen wurden. Als Kontrolle diente ein neuer Pool an hMSC aus 9 verschiedenen Patienten mittleren Alters ( $\bar{\phi} = 47 \pm 5,32$  Jahre), wodurch es sich im Folgenden nicht um eine technische, sondern eine biologische Evaluierung der SAM-Ergebnisse handelt.

Die Abb. 19. zeigt deutlich die unterschiedliche Expression der ausgewählten Gene in hMSC-OP und hMSC-K, wobei auffällig ist, dass die Standardabweichung in den hMSC-K oft deutlich geringer ist, verglichen mit hMSC-OP.

Nach Berechnung des „fold change“ ( $FC = \bar{\phi}_{hMSC-OP} / \bar{\phi}_{hMSC-K}$ ) zeigte sich, dass bei 5 der 11 Gene der  $FC > 1,5$  bzw.  $< 0,667$  war, dies entspricht einer 1,5fachen Genexpressionsänderung in hMSC-OP im Vergleich zu hMSC-K (Tab. 11). Weitere 2 Gene wiesen einen  $FC \geq 1,2$  bzw.  $< 0,8$  auf, und zeigen dadurch eine deutliche Tendenz zur erhöhten bzw. erniedrigten Expression in hMSC-OP, die der SAM entspricht. Bei den PCR-Analysen der restlichen 4 Gene, deren Probesets in der SAM nur einen FC von 1,55 – 2,5 bzw. 0,5 aufwiesen, wurde keine differentielle Expression detektiert bzw. war im Falle von HELLS die Standardabweichung zu groß, um den  $FC(\bar{\phi}_{hMSC-OP} / \bar{\phi}_{hMSC-K})$  von 0,82 als signifikant

anzusehen. Damit lassen sich die Mikroarray-Ergebnisse zu osteoporotischen hMSC trotz der Verwendung eines neuen Pools an hMSC-K zu 63,63% bestätigen.

Die anhand der Standardabweichung ersichtliche Variabilität der Genexpression innerhalb einer Untersuchungsgruppe, z.B. hMSC-K, konnte auch in den Mikroarray-Hybridisierungen nachgewiesen werden, verdeutlicht an einer Heatmap (Abb. 20).

**Tab. 11 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zu osteoporotischen hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie**

		Mikroarray-Analyse			Analyse der semi-quantitativen PCR			
Gen Symbol	Gen Name	Probeset-ID	FC (hMSC-OP/hMSC-K)	q (%)	FC ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-OP}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ )	STABW [%] von $\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$	STABW [%] von $\bar{\phi}_{\text{hMSC-OP}}$	Übereinstimmung mit Array
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, beta 1	203085_s_at	2,04	3,90	0,99	22,25	17,37	—
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A	210512_s_at	1,55	20,86	1,01	16,79	5,25	—
		210513_s_at	2,16	3,90				
		211527_x_at	2,47	2,46				
		212171_x_at	2,07	6,30				
<i>WNT5B</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 5B	221029_s_at	1,61	10,25	0,89	27,22	4,15	—
		223537_s_at	2,22	3,21				
		230299_s_at	1,55	14,24				
<i>COL10A1</i>	collagen, type X, alpha 1	205941_s_at	5,25	0,00	1,23	17,55	19,14	(+)
		217428_s_at	4,00	0,62				
<i>PTH1R</i>	parathyroid hormone 1	205911_at	3,00	2,70	2,05	55,73	39,73	+
<i>MAB21L2</i>	mab-21-like 2	210302_s_at	6,94	0,00	3,13	56,77	32,23	+
		210303_at	14,43	0,00				
<i>IBSP</i>	integrin-binding sialoprotein	207370_at	4,82	0,90	2,22	59,53	53,01	+
		236028_at	5,72	0,00				
<i>SOST</i>	sclerostin	223869_at	7,30	2,18	2,95	87,48	8,99	+
<i>HELLS</i>	helicase, lymphoid-specific	220085_at	0,23	1,40	0,82	68,29	93,83	—
		223556_at	0,53	8,24				
		227350_at	0,32	4,93				
<i>CNTN3</i>	contactin 3	229831_at	0,13	1,60	0,50	65,07	67,45	+
<i>RGS4</i>	regulator of G-protein signaling 4	204337_at	0,28	5,70	0,70	28,58	50,82	(+)
		204338_s_a	0,20	4,38				
		204339_s_a	0,25	5,70				

Gelistet sind alle exprimierten Probest-IDs von 11 Genen, die beim Vergleich von hMSC-OP mit hMSC-K mittels SAM einen „fold change“ (FC) < 0,667 bzw. > 1,5 aufwiesen (FC = hMSC-OP/hMSC-K). Der q-Wert betrug mindestens in einem Probeset  $\leq 10\%$ . Semi-quantitative PCR wurde mit 4 für den Array verwendeten hMSC-OP ( $\bar{\phi}$  86,75 $\pm$ 6,78 Jahre), sowie hMSC aus 9 weiteren Spendern mittleren Alters ( $\bar{\phi}$  47 $\pm$ 5,32 Jahre, hMSC-K) als Kontrolle durchgeführt. Nach densitometrischer Auswertung der einzelnen PCR-Ergebnisse und Normalisierung auf das Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) wurden von jedem Gen die relativen Expressionsstärken gemittelt ( $\bar{\phi}$ ) in den hMSC-OP ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-OP}}$ ) und hMSC-K ( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ ) Populationen. Die Standardabweichung (STABW) wurde in Prozent zu  $\bar{\phi}_{\text{hMSC-OP}}$  bzw.  $\bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$  gesetzt, der FC aus den Mittelwerten berechnet (FC =  $\bar{\phi}_{\text{hMSC-OP}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ ) und mit dem FC der Mikroarray-Analyse (FC[hMSC-OP/hMSC-K]) verglichen und bewertet:

- + FC( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-OP}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ ) > 1,5 bzw. < 0,667 entsprechend Mikroarray-Ergebnissen
- (+) FC( $\bar{\phi}_{\text{hMSC-OP}} / \bar{\phi}_{\text{hMSC-K}}$ ): 1,5-1,2 bzw. 0,667-0,8 entsprechend Mikroarray-Ergebnissen
- keine Übereinstimmung

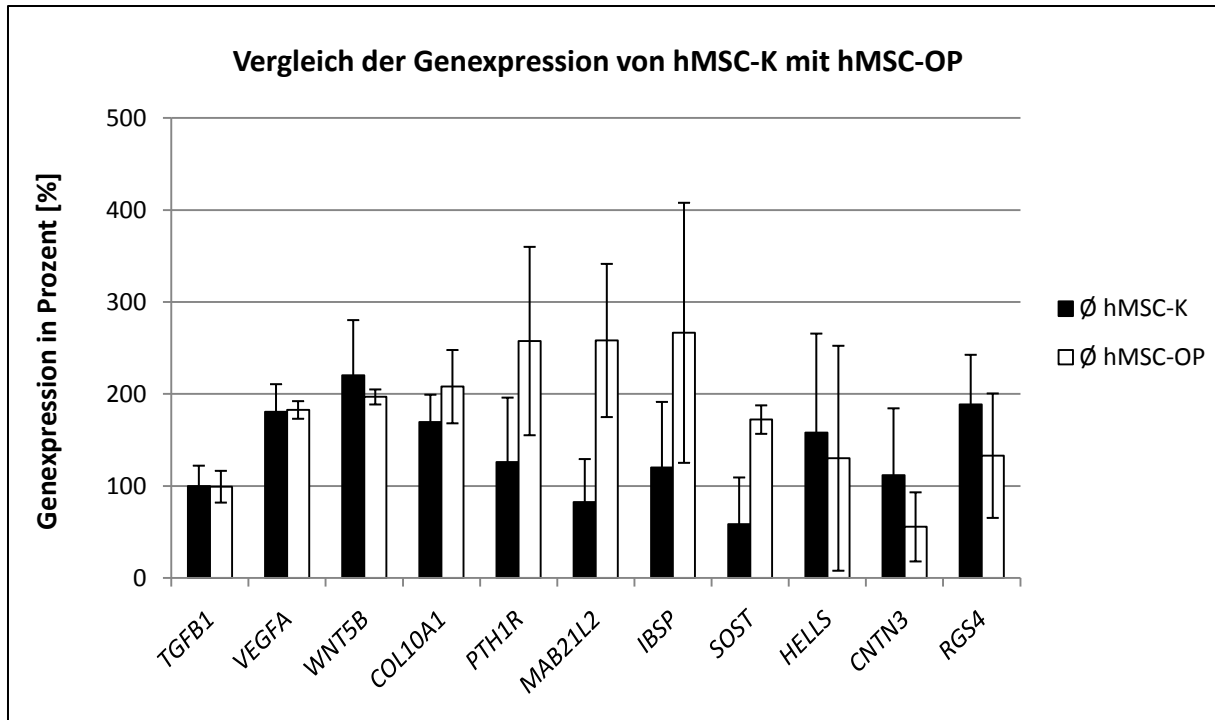


Abb. 19 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tab. 11 zur biologischen Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zu osteoporotischen hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie. Angegeben sind die Mittelwerte der densitometrischen Berechnung zur relativen Genexpressionsstärke der einzelnen Gene in hMSC-OP ( $\varnothing_{\text{hMSC-OP}}$ ) und hMSC-K ( $\varnothing_{\text{hMSC-K}}$ ) nach Normalisierung auf das Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

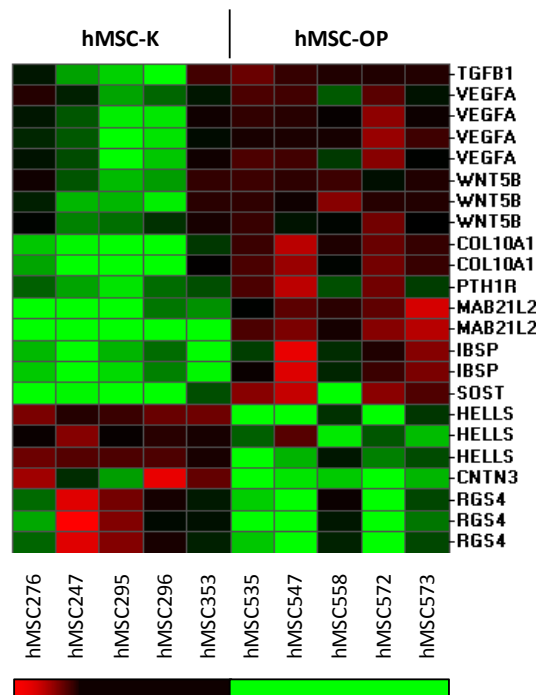
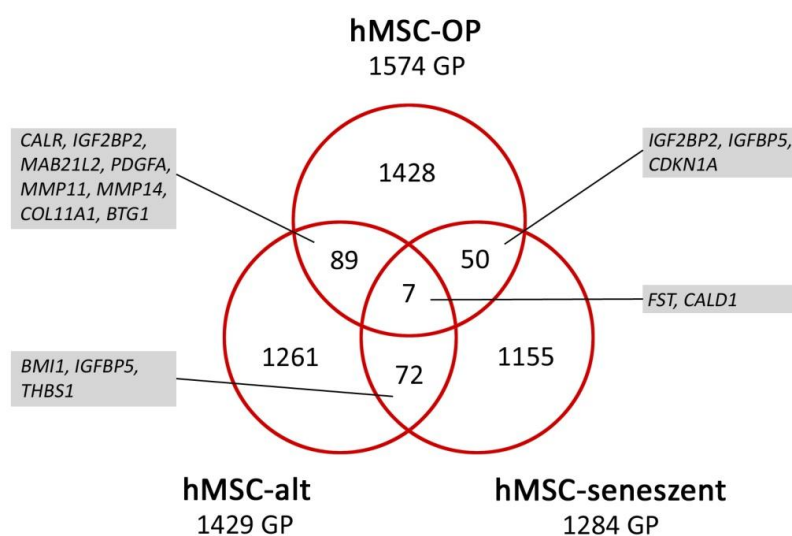


Abb. 20 Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von hMSC-K und hMSC-seneszent. Farblich dargestellt sind die Hybridisierungssignale der 5 hMSC-OP-, sowie der 5 hMSC-K-Populationen für alle Probesets der für die semi-quantitative PCR ausgewählten Gene. Je Probeset wurde ein Mittelwert gebildet (schwarz); der hellste Rotton markiert ein 4fach höheres Hybridisierungssignal im Vergleich zum Mittelwert, der hellste Grünton ein 4fach geringeres Signal.

### 5.1.5 Vergleich *in-vivo*-Alterung, Seneszenz und Osteoporose

Die drei verschiedenen SAM-Datensätze zu Seneszenz (siehe 5.1.3), *in-vivo*-Alterung (siehe 5.1.2) und Osteoporose (siehe 5.1.4) in hMSC wurden miteinander verglichen, um Gemeinsamkeiten zu detektieren. Da in den SAM-Berechnungen sowohl hMSC-alt, hMSC-seneszent als auch hMSC-OP immer mit den identischen hMSC-K verglichen wurden, sollten mögliche Überlappungen der Daten zuverlässige Angaben darstellen. Alle Genprodukte/Probesets mit 1,5facher Expressionsänderung wurden miteinander verglichen und als Venn-Diagramm für die erhöhte bzw. reduzierte Genexpression dargestellt (Abb. 21). Es zeigte sich, dass 42 Genprodukte (davon 6 unbekannt, siehe Anhang) in allen drei Datensätzen geringer und 7 Genprodukte (davon 3 unbekannt) höher exprimiert werden.

#### A Erhöhte Genexpression



#### B Verringerte Genexpression

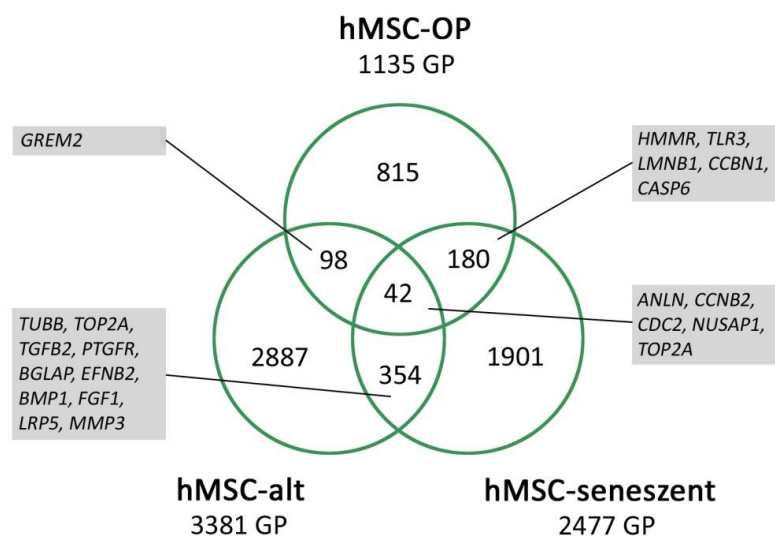


Abb. 21 Venn-Diagramme des Vergleichs der differentiell exprimierten Genprodukte der SAM-Analysen zu hMSC-alt, hMSC-seneszent und hMSC-OP. A: Vergleich der erhöhten Genexpression (FC > 1,5, q < 10%) aller drei SAM-Analysen, B: Vergleich der verringerten Genexpression (FC < 0,667, q < 10%) aller drei SAM-Analysen. Angegeben ist die jeweilige

Anzahl an Genprodukten/Probesets (GP) pro SAM. Die überlappenden Bereiche enthalten die Anzahl an gemeinsamen Genprodukten, eine Auswahl an betroffenen Genen ist angegeben. Bei dieser Analyse wurden Probesets und nicht Gene miteinander verglichen, wodurch in einigen Fällen verschiedene Probesets für ein- und dasselbe Gen in verschiedenen Überlappungen auftraten (*IGFBP5*, *IGF2BP2*, *TOP2A*) und es dadurch zu Doppelnennungen kam. Alle überlappenden Genprodukte/Probesets sind im Anhang nochmals ausführlich aufgelistet (Tab. 20).

Für die 42 geringer exprimierten Genprodukte konnten mittels Gostat-Analyse überrepräsentative GO-Gruppen gefunden werden (Tab. 12, erste Spalte), u.a. spielen diese Gene, die in hMSC-alt, hMSC-seneszent und hMSC-OP geringer exprimiert werden, eine Rolle beim Ablauf der Mitose, des Spindelapparats, der Mikrotubuliaktivität und der DNA-Reparatur. Der aufgrund von Seneszenz, Alter oder Osteoporose reduzierten Genexpression konnten auch Gene der ATPase-Aktivität und ATP-Bindung zugeordnet werden. Alle überrepräsentierten GO-Gruppen sind im Anhang nochmals ausführlich aufgelistet.

#### 5.1.5.1 Vergleich *in-vivo*-Alterung und Seneszenz

Ein Vergleich der SAM-Ergebnisse zur *in-vivo*-Alterung (Spender von hMSC-alt:  $\bar{x}$  81,75 $\pm$ 4,86 Jahre) mit den Ergebnissen zur *in-vitro*-Alterung (Spender von hMSC-seneszent:  $\bar{x}$  56,4 $\pm$ 8,96 Jahre) wurde angestellt, um zu überprüfen, ob sich hMSC während der Alterung des Organismus auf dem Weg zur Seneszenz befinden.

Es zeigte sich, dass insgesamt 396 Genprodukte in seneszenten als auch in *in-vivo*-gealterten hMSC geringer und nur 79 Genprodukte in beiden höher exprimiert werden (Abb. 21, siehe oben). Es wurden Gostat-Analysen von diesen Genprodukten, abzüglich jener 42 bzw. 7 Probesets, die in allen 3 Mikroarray-Datensätzen differentiell exprimiert werden (siehe oben), durchgeführt. Es zeigte sich, dass durch *in-vivo*- und *in-vitro*-Alterung geringer exprimierte Genprodukte überrepräsentativ häufig am Ablauf des Zellzyklus und der Zellteilung beteiligt sind (Tab. 12). Aber auch Genprodukte der Immunantwort und des Mikrotubuli-Cytoskeletts sind betroffen.

Des Weiteren wurde das Transkriptom von hMSC-alt und hMSC-seneszent unabhängig von statistischen Analysen auf Veränderungen hin untersucht, die auf mögliche Störungen in der Knochen-bildenden Funktion schließen lassen. Zu diesem Zweck wurden die Datensätze der beiden SAM nach differentiell exprimierten Genen durchsucht, die eine Rolle beim Knochenumbau, der Signalgebung durch Wachstumsfaktoren, der Migration, dem Zellzyklus, der Seneszenz oder im Immunsystem spielen (Tab. 13). Seneszente hMSC als auch hMSC älterer Personen weisen auf RNA-Ebene z.T. sogar ähnliche Defizite im Knochenumbau auf. Unter anderem sind Gene der hormonellen Signalgebung betroffen (*VDR*, *CYP2R1*, *ESR1*), aber auch Gene von Knochenmarkern wie Kollagene (*COL1A1*, *COL1A2*) und TNSALP (*ALPL*) werden geringer exprimiert. Des Weiteren sind viele Knochen-relevante Wachstumsfaktoren differentiell bzw. tendenziell geringer exprimiert, wobei auch hier einige Parallelen zwischen Seneszenz und Alter auftreten. Es konnte ebenso eine erhöhte Genexpression von Inhibitoren des BMP-Signalweges in hMSC-seneszent (*GREM2*) und hMSC-alt (*NOG*) detektiert werden, sowie eine reduzierte Expression von *LRP5*. Auch die Migration ist besonders in seneszenten hMSC negativ beeinflusst durch eine geringere Expression von Hyaluronsäuresynthasen (*HAS1*, *HAS2*) und dem Hyaluronsäure-Rezeptor *HMMR* (hyaluronan-mediated motility receptor). Der Zellzyklus ist in beiden untersuchten hMSC-Gruppen negativ beeinflusst, worauf die verminderte Expression von Cyclinen schließen lässt. Seneszente hMSC weisen jedoch zusätzlich deutlich mehr Seneszenz-Marker auf als *in-vivo*-gealterte hMSC. Das Immunsystem bzw. Inflammations-assoziierte Gene (z.B. *NFKB2*, *TNFSF4*, *TLR4*) werden gehäuft in hMSC-alt differentiell exprimiert.

**Tab. 12 Überrepräsentierte Gen Ontologie (GO)-Gruppen der differentiellen Genexpression, die sich in 2 bzw. 3 SAM-Analysen überlappen**

		hMSC-OP + hMSC-seneszent + hMSC-alt				hMSC-seneszent + hMSC-alt				hMSC-OP + hMSC-alt				hMSC-OP + hMSC-seneszent			
GO-Gruppe	GO-ID	Gen Symbol	Anzahl Gene	p-Wert	[%]	Gen Symbol	Anzahl Gene	p-Wert	[%]	Gen Symbol	Anzahl Gene	p-Wert	[%]	Gen Symbol	Anzahl Gene	p-Wert	[%]
<b>Biologischer Prozess</b>																	
Mitose	GO:0007067	<i>kntc1 nuf2 aurka ttk ccnb2 birc5 ruvb1 cdc2 nusap1</i>	9	6.41e-09	5,45	<i>ccnf hectd3 plk1 kif23 pttg1 tpx2 kif2c ncapd2 aurkb ube2c kif22 mad2l1 fbxo5 cit</i>	14	0.000254	8,48					<i>cep55 dlg7 spc25 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 ndc80 pbk cenpe fbxo5 mad2l1 zwint ncapg</i>	17	1.55e-10	10,56
Zellzyklus-Checkpoint	GO:0000075	<i>birc5 kntc1 ttk chek1</i>	4	0.000131	8,51												
Chromosomentrennung	GO:0007059													<i>dlg7 sgol2 zwint ndc80 ncapg cenpe</i>	6	9.22e-05	16,22
DNA-Replikation	GO:0006260													<i>dtl orc6l gins1 pold3 dut rfc3 top1 mcm3 fen1 mcm10 mcm4 gins2 pole2</i>	13	5.35e-07	8,39
Mikrotubulibasierender Prozess	GO:0007017	<i>kif15 kif14 aurka ttk nusap1</i>	5	0.000217	4,24									<i>kif23 ndc80 cenpe cks2 spag5 loc146909 kif20a zwint</i>	8	0.000824	7,27
DNA-Reparatur	GO:0006281	<i>top2a usp1 chek1 neil3</i>	4	0.0107	2,04									<i>fanci fen1 pold3 rfc3 pole2 rad54b Uhrf1</i>	7	0.062	3,66
Immunantwort	GO:0006955					<i>gpi oas2 ifi35 cd164 psmb9 tapbp tubb il1rapl2 samhd1 tgf2 oas3 oasl oas1</i>	13	0.0153	5,86								
Zellproliferation	GO:0008283									<i>gli3 mmp14 tnfsf4 gpc4 mafg mnt pdgfa</i>	7	0.0744	1,64				
Neurogenese	GO:0022008									<i>gli3 mmp14 efhd1 metrn</i>	4	0.0744	3,17				
<b>Zelluläre Komponente</b>																	
Chromosomen	GO:0005694	<i>zwilch top2a birc5 nuf2 mcm2 chek1</i>	6	0.000126	2,55	<i>tmpo asf1b kif2c ncapd2 aurkb top2a kif22 cenpm mad2l1 cenpa cenph</i>	11	0.0697	4,74					<i>orc6l zwilch cenpk rfc3 cbx5 oip5 spc25 mcm3 hells cdca8 fanci sgol2 pold3 ndc80 top1 cenpe zwint mad2l1</i>	18	8.71e-10	7,96
Mikrotubulicytoskelett	GO:0005630	<i>kif15 kntc1 aurka ttk ccnb2 top2a birc5 kif14 cdc2 nusap1</i>	10	9.49e-09	4,03	<i>plk1 kif23 tpx2 dnali1 kif2c tubb aurkb kif22 top2a brca2 fbxo5 akt1 tubgcp3</i>	13	0.0318	5,24					<i>ccnb1 ckap2 dlg7 kif23 racgap1 cenpe cep70 spag5 loc146909 kif20a ccdc5 fbxo5</i>	12	0.000175	4,98
Spindel	GO:0005819	<i>birc5 kntc1 aurka ttk cdc2</i>	5	2.91e-06	8,77	<i>aurkb kif23 akt1 fbxo5 tpx2 tubgcp3</i>	6	0.0318	10,53					<i>dlg7 kif23 fbxo5 racgap1 cenpe spag5</i>	6	0.000434	10,53
Mikrotubuliassoziierter Komplex	GO:0005875													<i>loc146909 kif20a kif23 cenpe</i>	4	0.029	6,06
Proteasomkomplex	GO:0000502									<i>psmd1 psmd2 shfm1 psmd11</i>	4	0.00133	9,52				
<b>Molekulare Funktion</b>																	
Mikrotubulimotoraktivität	GO:0003777													<i>loc146909 kif20a kif23 cenpe</i>	4	0.0877	9,76
ATP-Bindung	GO:0005524	<i>ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvb1 cdc2</i>	12	1.79e-05	1,37												
Ribonukleotidbindung	GO:0002553	<i>ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvb1 cdc2</i>	12	6.66e-05	1,11												
ATPaseaktivität	GO:0006887	<i>ddx17 top2a mcm2 mcm5</i>	4	0.0197	1,88												

Bei der GOstat-Analyse wurden je nach Vergleich unterschiedliche Referenzlisten verwendet. Probesets mit verringerter Expression in hMSC-alt, hMSC-seneszent und hMSC-OP (42) wurden mit den 28112 Probesets verglichen, die in mindestens einer der drei Gruppen überhaupt exprimiert werden. Genprodukte mit verringerter Expression in hMSC-alt und hMSC-seneszent (354) wurden verglichen mit den 27938 Probesets, die in mindesten einer der beiden Gruppen exprimiert werden; überlappende Genprodukte des Vergleichs hMSC-OP versus hMSC-alt (98 für verringerte Genexpression, 89 für erhöhte Genexpression) wurden mit 27581 Probesets verglichen. Bei hMSC-OP versus hMSC-seneszent (180) dienen als Referenzliste die 26058 exprimierten Probesets. Gene, die in den oben erwähnten Mikroarray-Evaluierungen mittels semiquantitativer PCR nicht signifikant bestätigt werden konnten, sind grau unterlegt. Bei dieser Analyse wurden Probesets und nicht Gene miteinander verglichen, wodurch in einigen Fällen verschiedene Probesets für ein-und dasselbe Gen in verschiedenen Überlappungen auftraten (*IGFBP5*, *IGF2BP2*, *TOP2A*) und es dadurch zu Doppelnennungen innerhalb der verschiedenen Spalten kam. [%]: gibt den prozentualen Anteil der Anzahl der Gene einer GO-Gruppe im Vergleich zur Gesamtanzahl der Gene dieser Gruppe wieder; p-Wert: Falsch-Positiv-Rate (Benjamini); rot: erhöhte Genexpression; grün: verringerte Genexpression. Alle detkierten GO-Gruppen sind im Anhang nochmals ausführlich aufgelistet (Tab. 27 - Tab. 31).

Tab. 13 Einteilung differentiell exprimierter Gene aus den SAM-Ergebnissen zu hMSC-OP, hMSC-alt und hMSC-seneszent in funktionelle Gruppen

Gen Symbol	Gen Name	hMSC-OP	hMSC-alt	hMSC-seneszent
<b>Knochenaufbau</b>				
<i>IBSP</i>	integrin-binding sialoprotein	↑	↓	
<i>TNFRSF11B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b			↑
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1			↓
<i>EFNB2</i>	ephrin-B2		↓	↓
<i>EPHB4</i>	EPH receptor B4			↓
<i>ALPL</i>	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney			↓
<i>RUNX2</i>	runt-related transcription factor 2		↓	
<i>VDR</i>	vitamin D receptor		↑	
<i>CYP2R1</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1			↓
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1			↓
<i>AR</i>	androgen receptor	↑		
<i>COL1A1</i>	collagen, type I, alpha 1	↑	↓	
<i>COL1A2</i>	collagen, type I, alpha 2			↓
<i>BGLAP</i>	bone gamma-carboxyglutamate protein		↑	↓
<b>Knochenresorption</b>				
<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	↑		↓
<i>CSF1</i>	colony stimulating factor 1	↑		
<i>TNFSF11</i>	tumor necrosis factor superfamily, member 11			↓
<i>PTH1R</i>	parathyroid hormone 1 receptor	↑		
<i>CA2</i>	carbonic anhydrase II			↓
<i>SPHK1</i>	sphingosine kinase 1	↑		↓
<i>IL6ST</i>	interleukin 6 signal transducer (Oncostatin M receptor)			↑
<b>BMP-Signalweg</b>				
<i>GREM2</i>	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog	↓	↓	
<i>GREM1</i>	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog			↑
<i>MAB21L2</i>	mab-21-like 2	↑	↑	
<i>NOG</i>	noggin		↑	
<i>SMAD3</i>	SMAD family member 3		↓	
<i>SMAD1</i>	SMAD family member 1		↑	
<b>WNT-Signalweg</b>				
<i>WISP1</i>	WNT1 inducible signaling pathway protein 1		↓	
<i>WISP3</i>	WNT1 inducible signaling pathway protein 3		↓	
<i>RACGAP1</i>	Rac GTPase activating protein 1	↓		↓
<i>WNT5B</i>	wingless-type MMTV integration site family member 5 b		↓	
<i>WNT2</i>	wingless-type MMTV integration site family member 2			↑
<i>WNT16</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 16		↓	
<i>LRP5</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 5	↑	↓	↓

<i>CTNNB1</i>	catenin, beta 1		↑	
<i>FZD7</i>	frizzled homolog 7		↑	
<i>FZD8</i>	frizzled homolog 8		↑	↓
<i>FZD4</i>	frizzled homolog 4			↑
<i>FZD6</i>	frizzled homolog 6			↑
<i>KREMEN1</i>	kringle containing transmembrane protein 1	↑		
<i>SOST</i>	sclerostin	↑		
<b>Zellzyklus</b>				
<i>CCNB2</i>	cyclin B2	↓	↓	↓
<i>CCNA2</i>	cyclin A2	↓	↓	↓
<i>CCNE2</i>	cyclin E2	↓	↓	↓
<i>CCNF</i>	cyclin F		↓	↓
<i>CCNL2</i>	cyclin L2		↓	↓
<i>CCND1</i>	cyclin D1			↑
<i>CCND2</i>	cyclin D2			↑
<i>CDK2</i>	cyclin-dependent kinase 2		↓	↓
<i>CDC2</i>	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	↓	↓	↓
<i>CDC25A</i>	cell division cycle 25 homolog A			↓
<i>CDC25B</i>	cell division cycle 25 homolog B			↓
<i>CDC25C</i>	cell division cycle 25 homolog C			↓
<i>BTG1</i>	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	↑	↑	
<b>Seneszenz</b>				
<i>HELLS</i>	helicase, lymphoid-specific			↓
<i>PSG1</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1			↑
<i>PSG2</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2			↑
<i>PSG3</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3		↓	↑
<i>PSG4</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4			↑
<i>PSG5</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5			↑
<i>PSG7</i>	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7			↑
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	↑		↑
<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A			↑
<i>BMI1</i>	BMI1 polycomb ring finger oncogene		↓	↓
<i>MCM3</i>	minichromosome maintenance complex component 3	↓		↓
<i>PTN</i>	pleiotrophin			↓
<i>SOD2</i>	superoxide dismutase 2, mitochondrial		↓	↑
<i>TXNRD1</i>	thioredoxin reductase 1			↑
<i>ARHGAP29</i>	Rho GTPase activating protein 29	↓		↑
<b>Wachstumsfaktoren</b>				
<i>PDGFA</i>	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	↑	↑	↓
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A		↓	↓
<i>VEGFB</i>	vascular endothelial growth factor B	↑	↓	
<i>IGF2BP2</i>	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	↑	↑	↑
<i>IGFBP5</i>	insulin-like growth factor binding protein 5	↑	↑	↑
<i>IGF2</i>	insulin-like growth factor 2	↑		↓
<i>IGF2R</i>	insulin-like growth factor 2 receptor		↑	
<i>FGF1</i>	fibroblast growth factor 1		↓	↓
<i>FGFR3</i>	fibroblast growth factor receptor 3		↑	
<i>FGFR2</i>	fibroblast growth factor receptor 2		↑	↓
<i>FGFR1</i>	fibroblast growth factor receptor 1	↑		
<i>HBEGF</i>	heparin-binding EGF-like growth factor	↑		↓
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	↑	↓	
<i>FST</i>	follicle-stimulating hormone	↑	↑	↑
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor, beta 2		↓	↓
<i>TGFBR1</i>	Transforming growth factor, beta receptor 1		↓	↓
<i>TGFBR2</i>	transforming growth factor, beta receptor II		↓	↑
<b>Migration</b>				
<i>ITGB5</i>	Integrin, beta 5	↑	↑	↑
<i>ITGA4</i>	integrin, alpha 4	↓	↓	↑
<i>PFN1</i>	profilin 1		↓	
<i>CYR61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	↑		
<i>MMP14</i>	matrix metalloproteinase 14	↑	↑	



<i>TIMP2</i>	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	↑		
<i>TLR4</i>	toll-like receptor 4	↓	↓	
<i>TLR3</i>	toll-like receptor 3	↓		↓
<i>HAS1</i>	hyaluronan synthase 1			↓
<i>HAS2</i>	hyaluronan synthase 2			↓
<i>HMMR</i>	hyaluronan-mediated motility receptor	↓		↓
<b>Epigenetik</b>				
<i>HDAC8</i>	histone deacetylase 8		↓	
<i>HDAC9</i>	histone deacetylase 9		↓	↑
<i>ATRX</i>	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked	↓	↓	
<i>DNMT1</i>	DNA methyltransferase 1			↓
<b>Immunsystem/Inflammation</b>				
<i>OASL</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like		↓	↓
<i>IL1RAP</i>	interleukin 1 receptor accessory protein	↓	↓	
<i>IL27RA</i>	interleukin 27 receptor, alpha	↑	↑	
<i>IL1RAPL2</i>	interleukin 1 receptor accessory protein-like 2		↓	↓
<i>IL1A</i>	interleukin 1, alpha		↓	↑
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1			↑
<i>TNFSF4</i>	tumor necrosis factor superfamily, member 4	↑	↑	
<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor superfamily, member 10		↓	↓
<i>IFI35</i>	interferon-induced protein 35		↓	↓
<i>SAA1 / SAA2</i>	serum amyloid A1 / serum amyloid A2			↑
<i>NFKB2</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	↑	↓	

Die Einteilung in die einzelnen Funktionellen Gruppen erfolgte mittels Literaturangaben. Angegeben sind jene Gene, die in mindestens einem Probeset differenzielle Expression aufwiesen. Verringerte Expression: grüner Pfeil, erhöhte Expression: roter Pfeil

#### 5.1.5.2 Vergleich Osteoporose und *in-vivo*-Alterung

Der Vergleich der differentiellen Genexpression in hMSC-OP mit hMSC-alt dient vor allem der Identifizierung von Unterschieden, da Gemeinsamkeiten auf einen *in-vivo*-Alterungseffekt schließen lassen. Das Alter der Spender von hMSC-OP und hMSC-K unterscheidet sich im Durchschnitt um 28,6 Jahre. Aus diesem Grund ist nicht auszuschließen, dass Genexpressionsunterschiede aufgrund des Altersunterschieds und nicht der Osteoporose auftreten. Der Altersunterschied zwischen den Patienten von hMSC-OP und hMSC-alt beträgt jedoch durchschnittlich nur 4,45 Jahre. Daher wurden die SAM-Ergebnisse zu hMSC-OP (siehe 5.1.4) und hMSC-alt (siehe 5.1.2) miteinander verglichen, wobei sich zeigte, dass simultan in beiden SAM insgesamt 96 Genprodukte höher und 140 geringer exprimiert werden (Abb. 21). Diese wurden – abzüglich der 7 bzw. 42 oben genannten Genprodukte – einer GOstat-Analyse unterzogen, die nur sehr wenige überrepräsentative GO-Gruppen ermitteln konnte (Tab. 12). Geringer in hMSC-OP und hMSC-alt sind Proteasom-Komponenten exprimiert, eine erhöhte Expression zeigten Gene für Zellproliferation und Neurogenese. Vergessen werden sollte nicht, dass die GOstat-Analysen zur überlappenden, differentiellen Genexpression aller 3 beschriebenen SAM (siehe 1. Spalte) auch Ergebnisse des Vergleichs hMSC-OP mit hMSC-alt darstellen, somit auch die Mitose, die Mikrotubuli, der Spindelapparat und Chromosomen betroffen sind. All diese GO-Gruppen sind auch bei den GOstat-Analysen zur SAM hMSC-OP versus hMSC-K aufgetreten (siehe 5.1.4.2, Abb. 18), wodurch die Vermutung entsteht, dass diese allein auf das Alter der hMSC-Spender zurück zu führen sind.

Überprüft wurde diese Annahme durch Abzug der Alters-bedingten 96 höher und 140 geringer exprimierten Probesets von den SAM-Ergebnissen zu hMSC-OP. Dadurch ändert sich die Anzahl der in Absatz 5.1.4.1 proklamierten (Abb. 17), differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC durch Osteoporose (Abb. 22).

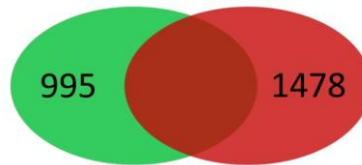


Abb. 22 Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten nach Vergleich mit hMSC-K und Abzug der Alters-bedingten Genexpressionsänderung. Angegeben ist die Anzahl der höher exprimierten Genprodukte (rot), bzw. der geringer exprimierten Genprodukte (grün) in hMSC-OP nach Abzug der 96 bzw. 140 Probesets, die in hMSC-OP als auch hMSC-alt höher, bzw. geringer exprimiert werden.

Erneut wurden GÖstat-Analysen durchgeführt mit der bereinigten, differentiellen Genexpression in hMSC-OP (Abb. 23). Es zeigt sich, dass im Vergleich zu 5.1.4.2 (Abb. 18) durch Abzug der Alters-assoziierten Genprodukte keine Spindel-, Mitose- oder Mikrotubuli-relevanten GO-Gruppen detektiert wurden. Weiterhin lassen sich allein durch die Osteoporose noch immer Kinetochor- und Replisom-, sowie Replikationsgabel-assoziierte Gene überrepräsentativ in den geringer exprimierten Genen finden. Auch ohne Alters-assoziiertes Gen sind in hMSC-OP Genprodukte der Angiogenese und der Zellmotilität höher exprimiert. Alle überrepräsentierten GO-Gruppen und der enthaltenen Gene sind im Anhang (Tab. 25, Tab. 26) nochmals ausführlich aufgelistet.

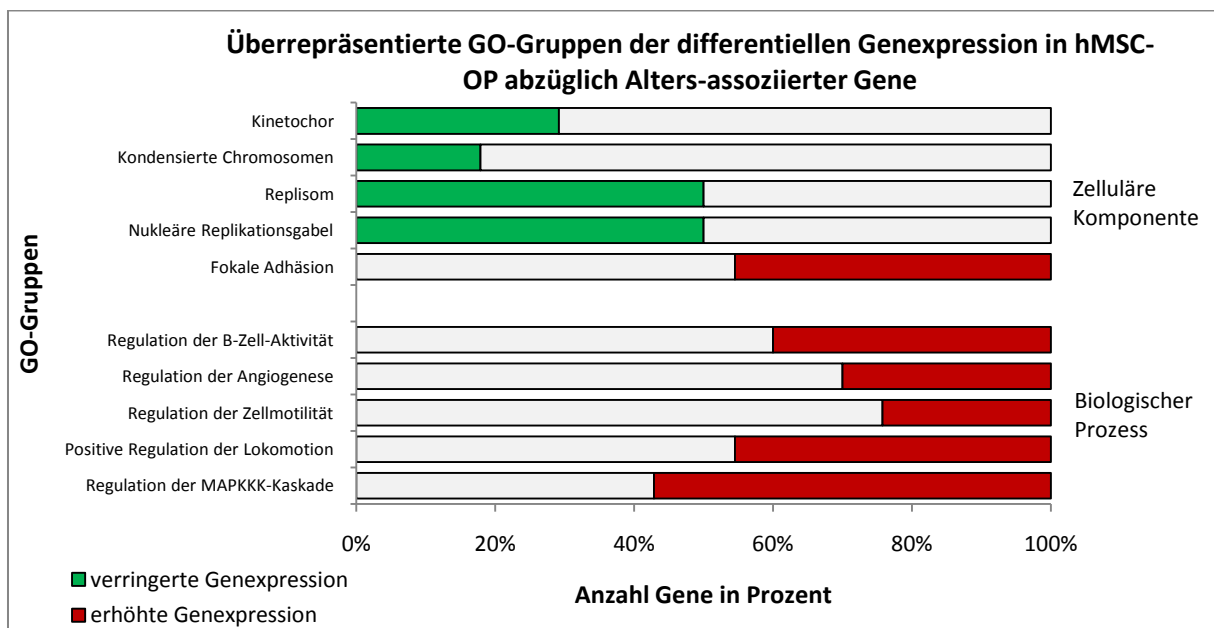


Abb. 23 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-OP beim Vergleich mit hMSC-K nach Abzug der Alters-assoziierten Gene, die in hMSC-alt ebenfalls differentiell exprimiert werden. Dargestellt sind die mindestens 1,5fach höher bzw. geringer exprimierten Genprodukten. Als Referenzliste dienen dabei die 25158 Genprodukte, die in hMSC-OP und/oder hMSC-K exprimiert werden. Als 100% ist jeweils die Anzahl an Genen pro Gruppe, die überhaupt in der Referenzliste exprimiert werden, dargestellt. Den jeweiligen Anteil daran, der überrepräsentativ häufig in den differentiell exprimierten Genen auftritt, ist farblich markiert: für erhöhte Genexpression in hMSC-OP: rote Balken, geringere Genexpression in hMSC-OP: grüne Balken.

Die nicht statistische Auflistung von Genen, die spezifischen Knochen- und Vitalitäts-Clustern zugeordnet werden können, verdeutlicht die Unterschiede zwischen der differentiellen Genexpression in hMSC-OP und hMSC-alt (Tab. 13). Es zeigte sich, dass einige, den Knochenaufbau betreffende Gene in hMSC-OP höher exprimiert werden, darunter der Androgenrezeptor (*AR*) und *IBSP*, sowie *COL1A1*. In hMSC-alt werden Knochen-assoziierte Gene geringer exprimiert (*RUNX2*,

*COL1A1*, *IBSP*, *EFNB2*). In hMSC-OP werden Gene, die in Zusammenhang mit Osteoklastogenese gebracht werden, höher exprimiert (*PTGS2*, *PTH1R*, *SPHK1*, *CSF1*). Die Seneszenz, der Zellzyklus und der BMP-Signalweg sind im Vergleich zu hMSC-alt nur geringfügig betroffen. Der BMP-Signalweg ist in hMSC-OP ebenfalls nur wenig betroffen. *GREM2* und *MAB21L2* werden in beiden hMSC-Populationen geringer bzw. höher exprimiert. Des Weiteren ist die Expression von WNT-Inhibitoren – *KREMEN1*, *SOST* – erhöht in hMSC-OP. Das Gen des WNT-Rezeptors *LRP5* ist ebenfalls in osteoporotischen hMSC höher exprimiert, in hMSC-alt aber geringer exprimiert. Der IGF-Signalweg ist ebenfalls betroffen, die Gene der IGF-Bindeproteine *IGFBP5* und *IGF2BP2* sind in beiden hMSC-Populationen höher exprimiert, während in hMSC-OP zusätzlich noch *IGF2*-Expression und in hMSC-alt *IGF2R*-Expression erhöht vorliegt. Der FGF-Signalweg ist in beiden Zellpopulationen unterschiedlich beeinflusst: *FGFR2* und *FGFR3* sind in hMSC-alt, und *FGFR1* ist in hMSC-OP höher exprimiert. In hMSC-alt ist besonders häufig die TGF $\beta$ -Signalgebung beeinflusst, *TGF $\beta$ 2* und zwei TGF $\beta$ -Rezeptoren sind geringer exprimiert. Differentielle Genexpression von Migrations-relevanten Genen liegt ebenfalls vor, in beiden hMSC-Populationen wird *TLR4* geringer exprimiert, des Weiteren ist die Expression von *MMP14*, *TIMP1* und dem Chemoattraktant *CYR61* in hMSC-OP erhöht, während *TLR3* und *HMMR* in diesen Zellen geringer exprimiert werden. Vergleich zu hMSC-OP weisen hMSC-alt geringere Expression von Chromosomenkondensation regulierenden Genen *HDAC8* und *HDAC9* auf. Gene, die für Cycline kodieren, sind ebenfalls in beiden hMSC-Populationen geringer exprimiert, während hMSC-OP zusätzlich den Zellzyklus-Inhibitor P21 (*CDKN1A*) höher exprimieren und hMSC-alt den P16-Inhibitor *BMI1* geringer exprimieren.

#### 5.1.5.3 Vergleich Osteoporose mit Seneszenz

In osteoporotischen hMSC-OP wurde nach Hinweisen auf Seneszenz gesucht durch den Vergleich des Genexpressionsmusters von hMSC-OP mit den SAM-Ergebnissen zu hMSC-seneszent.

Es zeigte sich, dass insgesamt 222 Genprodukte in hMSC-OP als auch hMSC-seneszent geringer und 57 Genprodukte in beiden höher exprimiert werden (Abb. 21). Von diesen Genprodukten wurden GOstat-Analysen durchgeführt, abzüglich jener 42 bzw. 7 Probesets, die in allen 3 Mikroarray-Datensätzen differentiell exprimiert werden (Tab. 12). Bei den höher exprimierten wurden kaum GO-Gruppen detektiert, jedoch zeigte sich, dass überrepräsentativ häufig Gene mit Proteinfunktion in Mitose, Chromosomentrennung, DNA-Replikation und DNA-Reparatur geringer in hMSC-seneszent und hMSC-OP exprimiert werden. Des Weiteren sind das Mikrotubuli-Cytoskelett und der Spindelaufbau betroffen. Alle überrepräsentierten GO-Gruppen und die darin enthaltenen Gene sind im Anhang (Tab. 31) nochmals ausführlich aufgelistet.

Der nicht-statistische Vergleich von Genen funktioneller Cluster, die differentiell in hMSC-OP und hMSC-alt exprimiert werden, verdeutlicht die Unterschiede zwischen *in-vitro*-Alterung und Osteoporose in hMSC (Tab. 13). Der Zellzyklus und die Seneszenz sind im Vergleich zu hMSC-seneszent in hMSC-OP kaum betroffen. Auffällig scheint jedoch die erhöhte Expression des Seneszenz-assoziierten Zellzyklusregulators P21 (*CDKN1A*) in hMSC-OP, der in hMSC-seneszent neben *CDKN2A* (P16) ebenfalls höher exprimiert wird. Seneszente hMSC exprimieren sehr viele PSG-Gene (pregnancy specific beta-1-glycoprotein) und Gene des oxidativen Stress (*SOD2*, *TXNRD1*) höher. *HELLS*, *BMI1*, Pleiotropin (*PTN*) und *MCM3* (minichromosome maintenance complex component 3) sind geringer exprimiert. Gene, deren Proteine mit dem Knochenumbau assoziiert werden, sind in hMSC-OP kaum differentiell reguliert. Der BMP-Signalweg ist in beiden hMSC-Populationen unterschiedlich betroffen, in hMSC-OP wird *GREM2* geringer exprimiert, in hMSC-seneszent *GREM1* höher. In beiden hMSC-seneszent sind *FZD*-Gene (frizzled homolog) höher exprimiert, und in hMSC-OP sind Gene für WNT-Hemmer höher exprimiert (*KREMEN1*, *SOST*). *LRP5* wird in hMSC-OP höher und in hMSC-seneszent geringer exprimiert. Während in hMSC-seneszent viele Wachstumsfaktoren geringer exprimiert werden (*IGF2*, *FGF1*, *HBEGF*, *PDGFA*, *VEGFA*), sind einige in hMSC-OP höher exprimiert (*IGF2*, *HBEGFA*, *PDGFA*, *VEGFB*). In beiden hMSC-Populationen wird *HMMR* geringer exprimiert und in hMSC-seneszent werden zusätzlich die Gene der Hyaluronsynthasen *HAS1* und *HAS2* reprimiert exprimiert.

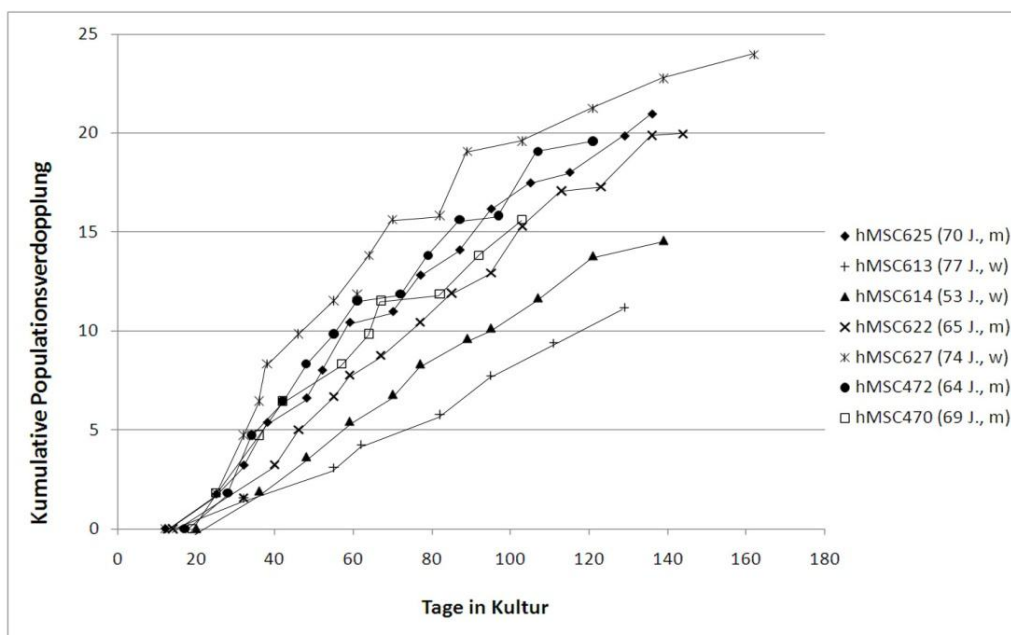
Die Knochenresorption fördernde Proteine zeigen in hMSC-seneszent eine erniedrigte Genexpression, wie z.B. RANKL (*TNFSF11*) und Prostaglandin-endoperoxid-Synthase 2 (*PTGS2*). Knochenaufbau-assoziierte Gene sind in hMSC-seneszent geringer exprimiert (*SPP1*, *ALPL*, *COL1A2*, *ESR1*, *EFNB2*) und in hMSC-OP höher exprimiert (*IBSP*, *AR*, *COL1A1*).

## 5.2 Kandidatengene der Seneszenz

### 5.2.1 Nachweis der Seneszenz in hMSC

Ob hMSC nach *in-vitro*-Alterung tatsächlich in die Seneszenz eingetreten waren, wurde mit verschiedenen Seneszenz-Markern auf RNA- und Proteinebene überprüft.

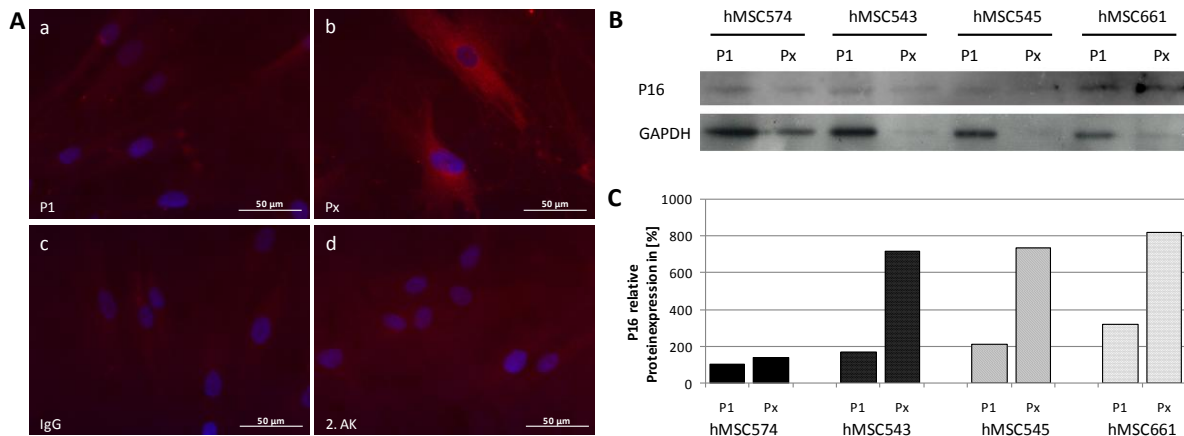
Die Wachstumskurve der Langzeitkultivierung von hMSC bis zum Proliferationsstopp zeigt individuelle Unterschiede in der Wachstumskinetik der verschiedenen hMSC-Populationen, aber eine deutliche Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit in den letzten Tagen der Kultivierung war in allen Fällen gegeben (Abb. 24). Insgesamt wurden die Zellen von P1 bis zur vorletzten Passage (Px-1) 103 bis 162 Tage lang kultiviert. Die kumulativen Populationsverdopplungen (PD) variierten in dieser Zeit zwischen ca. 11 und 24. Aufgrund der Kultivierungsmethode können keine Angaben zum PD vom Zeitpunkt der Zellaussaat bis zu P1 gemacht werden.



**Abb. 24** Wachstumskurve von hMSC in Kultur. Vor jeder Subkultivierung wurde die Zellzahl von P1 bis zur vorletzten Passage (Px-1) ermittelt und die Populationsverdopplung berechnet. Angegeben sind die kumulativen Populationsverdopplungen von hMSC aus 7 verschiedenen Spendern im Verlauf der Kultivierungszeit. Geschlecht und Alter der Spender sind angegeben.

Die Mikroarray-Analysen ergaben eine 2,88 – 4,79fach erhöhte Genexpression des Seneszenzmarkers P16 (*CDKN2A*) in hMSC-seneszent verglichen mit hMSC-K. Die Evaluierung mittels semi-quantitativer PCR zeigte, dass die Expression des Gens ausschließlich in der seneszenten Passage Px induziert wird und somit exklusiv ist, da in allen untersuchten 5 hMSC-Populationen keine Expression in P1 detektierbar war (Tab. 10).

Auch auf Proteinebene konnte P16 mittels Immuncytochemischer Färbung im Cytoplasma von hMSC-seneszent nachgewiesen werden, während P1 der hMSC-Population negativ für P16 war (Abb. 25A). Western-Blot Analysen von 4 verschiedenen hMSC-Populationen zeigten ähnliche P16-Konzentrationen in P1 und Px (Abb. 25B). Der Abgleich auf das Haushalts-Protein GAPDH mittels densitometrischer Auswertung veranschaulichte jedoch die erhöhte P16-Proteinexpression in den seneszenten Passagen von 3 hMSC-Populationen (Abb. 25C).



**Abb. 25** Nachweis des Seneszenz-Marker P16 in *in-vitro*-gealterten hMSC. **A:** Immuncytochemischer Nachweis von P16 in seneszenten hMSC. Der Nachweis erfolgte mit spezifischem anti-P16 Primärantikörper in hMSC P1 (a) und hMSC in der seneszenten Passage Px (b). Die Inkubationen mit Rabbit IgG (c) und Sekundärantikörper allein (d) in P1 dienen als Kontrollen für die Spezifität des anti-P16 Antikörpers. **B:** Western-Blot von Gesamtprotein von 4 verschiedenen hMSC-Populationen in P1 und der seneszenten Passage Px. Als Primärantikörper wurden anti-P16 und anti-GAPDH (Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase) für den Nachweis des Haushaltsproteins verwendet. **C:** Densitometrische Auswertung der Western-Blots, alle Werte wurden auf GAPDH normiert und in Prozent zu hMSC574 P1 gesetzt.

In 5 weiteren hMSC-Populationen wurde die *CDKN2A*-Expression im Verlauf der *in-vitro*-Alterung auf RNA-Ebene untersucht. Semi-quantitative PCR an allen Passagen der hMSC wurden mit spezifischen Primern durchgeführt. Es zeigte sich, dass *CDKN2A* in P1 aller 5 hMSC-Populationen nicht exprimiert wird, in Px hingegen schwach bis sehr stark. In hMSC von 2 Spendern nimmt die Expression mit Anzahl der Passagen graduell zu (Bsp.: Abb. 26A). In hMSC von 3 Spendern konnten jedoch auch schwache bis starke Expression des Gens in einigen mittleren Passagen gezeigt werden (Bsp.: Abb. 27A).

Als weiterer, möglicher Seneszenzmarker wurde *PSG5* als repräsentatives Gen der pregnancy specific beta-1-glycoprotein Familie in diesen hMSC-Populationen in jeder Passage auf RNA-Ebene untersucht. In 4 der 5 hMSC-Populationen stieg die *PSG5*-Expression von sehr gering in P1 bis zu sehr hoch in Px an, wobei jedoch bereits in frühen Passagen (ab P2 - P5) eine erhöhte Expression zu detektieren war (Abb. 26A, Abb. 27A).

Alle Densitometrie-Ergebnisse zu *PSG5*- und *CDKN2A*-Expression im Verlauf der *in-vitro*-Alterung sind zu finden unter 5.2.4.

Als weiterer Nachweis der Seneszenz wurden SA- $\beta$ -Gal-Färbungen von 10 hMSC-Populationen in P1 und Px bei pH 5 durchgeführt. In allen Fällen wiesen die Zellen in Px unabhängig vom Geschlecht und dem Alter der Patienten ( $\bar{\phi} = 65,7 \pm 11$ ) eine starke bis leicht erhöhte  $\beta$ -Gal-Aktivität, sowie extreme morphologische Veränderungen auf (Bsp.: Abb. 26C P1 und P11, Abb. 27C P1 und P14). Verglichen mit hMSC in P1 waren die seneszenten Zellen durch eine größere, breitere Form, sowie dendriteartige Ausläufer und Zelltrümmer gekennzeichnet. Jedoch waren bei hMSC von 2 Spendern bereits in P1 viele für SA- $\beta$ -Gal positive Zellen zu finden (Abb. 26C P1).

Von hMSC aus 5 Spendern wurden SA- $\beta$ -Gal-Färbungen in jeder Passage durchgeführt um die Aktivität des Enzyms im Verlauf der *in-vitro*-Alterung zu dokumentieren. Es zeigte sich, dass nicht

allein in der letzten Passage, sondern auch in mittleren Passagen eine deutliche SA- $\beta$ -Gal-Aktivität detektiert werden konnte. Auffällig dabei war, dass die blau gefärbten Zellen meist eine breitere Morphologie aufwiesen als die nicht gefärbten Zellen der betroffenen Passage. Ein Vergleich dieser positiven Passagen mit dem *CDKN2A*- oder *PSG5*-Expressionsmuster auf RNA-Ebene im Verlauf der *in-vitro*-Alterung lieferte kaum Übereinstimmungen (Abb. 26C, Abb. 27C).

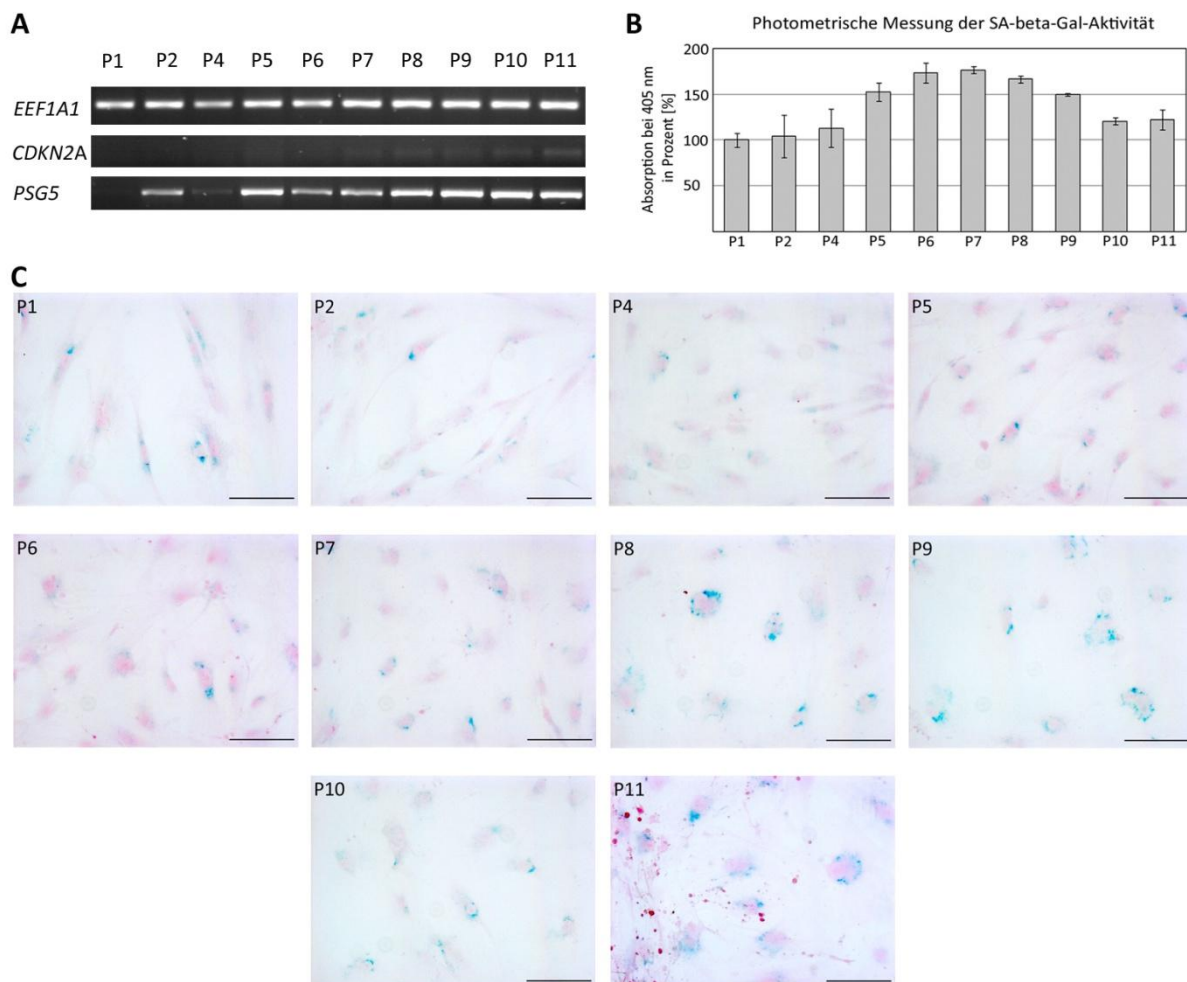


Abb. 26 Analyse der einzelnen Passagen von hMSC614 im Verlauf der *in-vitro*-Alterung mit Hilfe von Seneszenz-Markern. Passage (P) 11 ist die letzte und damit seneszente Passage, da die Zellen innerhalb von 3 Wochen keine Konfluenz erreicht hatten. Von Passage 3 konnten keine Analysen durchgeführt werden. A: Semi-quantitative PCR von *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *PSG5* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5) und dem Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1); B: Photometrische Bestimmung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität in jeder Passage bei 70-90%iger Konfluenz. Die Absorption bei 405 nm wurde in Prozent angegeben. C: SA- $\beta$ -Gal-Färbung von jeder Passage bei ca. 50%iger Konfluenz, das Cytoplasma der positiven Zellen ist blau gefärbt. Gegenfärbung: Kernechtrot. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

Um die SA- $\beta$ -Gal-Aktivität effektiver quantifizieren zu können, wurde ein zweiter Assay angewandt, der auf der photometrischen Messung des SA- $\beta$ -Gal-Substrats beruht. Hierfür wurden die Zellen bis zu 70-90% Konfluenz kultiviert, anschließend lysiert und mit dem Substrat bei pH 6 versehen. Am nächsten Tag erfolgte die Messung bei 405 nm und es zeigte sich bei allen 3 untersuchten hMSC-Populationen (nur zwei gezeigt) ein ähnliches Muster, dass jedoch individuell nicht mit der SA- $\beta$ -Gal-Färbung der jeweiligen hMSC-Population übereinstimmte (Abb. 26B, Abb. 27B). Im Falle der hMSC614-Population deutete die Messung auf eine maximale SA- $\beta$ -Gal-Aktivität in P7 hin, die Färbung bestätigte dies jedoch nicht, obwohl vereinzelt positive Zellen gezeigt werden konnten (Abb. 26B und C). In hMSC625 schien nach photometrischer Messung die Passage P7 die stärkste SA- $\beta$ -Gal-

Aktivität auszuweisen, die Färbung hingegen zeigte die höchste Ansammlung SA- $\beta$ -Gal-positiver Zellen in P5 und P14 (Abb. 27 B und C). Generell war zu beobachten, dass laut SA- $\beta$ -Gal-Aktivitäts-Messung kein Unterschied zwischen P1 und Px bestand. Ein Zusammenhang zwischen der Expression des Gens für P16 (*CDKN2A*) und dem Ergebnis der SA- $\beta$ -Gal-Aktivitäts-Messung konnte nicht festgestellt werden, wohingegen das Muster der SA- $\beta$ -Gal-Färbung Parallelen zur *CDKN2A*-Expression aufweist. Passagen mit hoher Expression von *CDKN2A* weisen auch mehr SA- $\beta$ -Gal-positive Zellen auf.

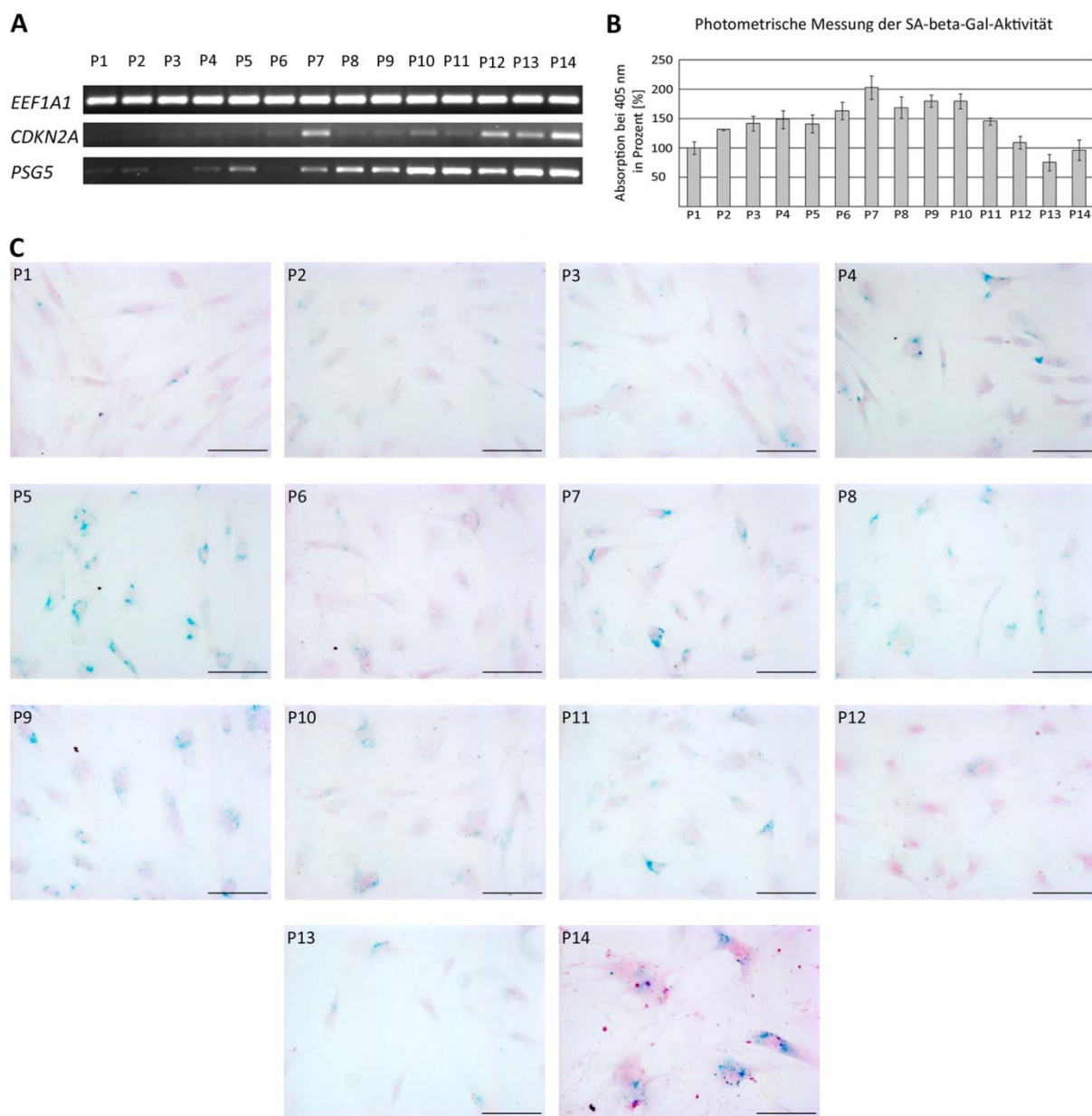


Abb. 27 Analyse der einzelnen Passagen von hMSC625 im Verlauf der *in-vitro*-Alterung mit Hilfe von Seneszenz-Markern. Passage (P) 14 ist die letzte und damit seneszente Passage, da die Zellen innerhalb von 3 Wochen keine Konfluenz erreicht hatten. A: Semi-quantitative PCR von *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *PSG5* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5) und dem Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1); B: Photometrische Bestimmung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität in jeder Passage bei 70-90%iger Konfluenz. Die Absorption bei 405 nm wurde in Prozent angegeben. C: SA- $\beta$ -Gal-Färbung von jeder Passage bei 50%iger Konfluenz, das Cytoplasma der positiven Zellen ist blau gefärbt. Gegenfärbung: Kernechtrot. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

### 5.2.2 Kandidatengensuche

Die Mikroarray-Ergebnisse des Vergleichs hMSC-seneszent mit hMSC-K dienten als Grundlage für die Identifizierung von Genen, die für den Eintritt in den Zustand der Seneszenz von hMSC relevant sein könnten. Um die Daten der SAM besser deuten und Kandidatengene heraus filtern zu können, wurde ein Punktesystem entwickelt um den einzelnen, differentiell exprimierten Genen eine Wertigkeit zuzuordnen. Zum einen wurde die Verlässlichkeit der Mikroarray-Ergebnisse geprüft, indem die Anzahl an Genprodukten pro Gen, die differentiell exprimiert werden, sowie die Höhe des FC bewertet wurden. Zum anderen diente eine Literaturrecherche dazu, Gene zu detektieren, deren Bedeutung für Alterung oder Knochen bereits beschrieben ist.

Für die Punktevergabe wurden zu Beginn all jene Genprodukte herausgestrichen, die keine beschriebenen Gene bzw. nur hypothetische Gene repräsentierten. Des Weiteren wurde die Stringenz für die differentielle Genexpression erhöht, um möglichst eindeutige Genexpressionsmuster aufdecken zu können. Nur jene Genprodukte, die einen q-value < 10%, sowie einen FC < 0,5 bzw. > 2 aufwiesen, galten für die Erstellung der Kandidatenliste als signifikant (mindestens 2fach) geringer bzw. höher exprimiert in hMSC-seneszent.

Im Falle von mehreren Genprodukten bzw. Probesets pro Gen wurden Punkte vergeben, je nachdem wie viele Probesets laut SAM differentiell exprimiert waren. 10 Punkte wurden vergeben, wenn 100% der Probesets eines Gens differentiell in dieselbe Richtung exprimiert waren; 7 Punkte für > 50% der Probesets, 1 Punkt für 50% und zusätzlich 3 Punkte, wenn ein Gen durch mindestens 3 positive Probesets repräsentiert wurde. Gene mit weniger als 50% differentiell exprimierten Probesets wurden aus der Liste getilgt.

Die Genexpressionsänderung („fold change“, FC) wurde ebenfalls mit Punkten versehen: je höher bzw. geringer der FC, desto höher die Punktzahl (Tab. 14).

Tab. 14 Punktevergabe für Höhe des Foldchange (FC) in SAM von hMSC-seneszent versus hMSC-K

Punkte	FC (hMSC-OP/ hMSC-K)	
	FC ab < 0,5	FC ab > 2
0	> 0,3333	< 3
2	> 0,2	< 5
5	> 0,1	< 10
10	> 0,05	< 20
20	< 0,05	> 20

Auch exklusive Expression in einer der beiden Vergleichsgruppen wurde bewertet. Exklusive Expression in hMSC-seneszent bedeutete, dass das betreffende Genprodukt mindestens in 4 der 5 hMSC-seneszent RNA-Proben, die mit Microchips hybridisiert wurden, eine Expression aufwies („present“), während in mindestens 4 von 5 hMSC-K keine Expression detektiert wurde („absent“). Jene Probesets, auf die diese Bedingungen zutrafen, erhielten zusätzlich 5 Punkte. Ebenso jene Probesets, deren Expression ausschließlich in hMSC-K induziert wurde.

Die Summe all dieser Punkte zusammen, diente als erstes Auswahlkriterium. 100 Gene mit der höchsten Summe für erhöhte Expression und 100 Gene mit der höchsten Summe für erniedrigte Expression wurden einer Literaturrecherche unterzogen hinsichtlich ihrer bisher bekannten Bedeutung für Knochenmetabolismus, Alterung und Osteoporose. Die Literaturrecherche wurde mit PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) durchgeführt und folgende Stichworte wurden in die Suchmaske eingegeben: für Knochenmetabolismus: „bone, osteoblast“; für Alterung: „aging, senescence“ und für Osteoporose: „osteoporosis“. 10 Punkte wurden für Gene vergeben, bei denen



mit Hilfe dieser Suchworte eine direkte Verbindung zu dem jeweiligen Kriterium hergestellt werden konnte, bzw. wenn das betreffende Gen in dieser Hinsicht bereits als differentiell exprimiert beschrieben wurde. 5 Punkte wurden vergeben, wenn die gesuchten Gene peripher mit dem jeweiligen Kriterium assoziiert werden konnten, 0 Punkte wenn keinerlei Verbindung hergestellt werden konnte.

Anhand der totalen Summe aus Literaturrecherche, FC-Punkten, Probeset-Punkten und Punkten für induzierte Expression ergab sich die Reihenfolge der Wertigkeit der differentiell exprimierten Gene. In Tab. 15 sind auszugsweise nur die am höchsten bewerteten 50 Gene zu finden, die vollständige Liste ist im Anhang aufgeführt (Anhang Tab. 33). Im Falle von mehreren Genprodukten bzw. Probesets pro Gen wurde nur jenes Probeset mit der stärksten differentiellen Genexpression (FC) ausgewählt, um das Gen in dieser Kandidatenliste zu repräsentieren.

Tab. 15 Rangliste der besten 50 Kandidatengene für die Seneszenz in hMSC

Gen Symbol	Gen Name	hMSC-seneszent/hMSC-K		Probeset-Punkte	exklusive Exp.	FC-Punkte	Literatur-Punkte			total
		FC	q (%)				Alterung	Knochen	Osteoporose	
SAA1/SAA2	serum amyloid A1 /serum amyloid A2	52,18	0,89	10		20	10	5	0	45
NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	14,33	0,00	10	5	10	10	10	0	45
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	8,69	1,02	10		5	10	10	10	45
EDN1	endothelin 1	6,48	1,61	10		5	10	10	10	45
TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFkB activator	3,77	4,16	10		2	10	10	10	42
CD36	CD36 molecule	7,14	7,00	7		5	5	10	10	37
PTPRZ1	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	5,78	1,02	10	5	5	5	10	0	35
OXR	oxytocin receptor	5,21	1,61	10		5	0	10	10	35
HDAC9	histone deacetylase 9	6,30	0,31	13		5	10	5	0	33
COL4A4	collagen, type IV, alpha 4	34,70	0,00	10		20	0	0	0	30
COL4A3	collagen, type IV, alpha 3	25,29	0,00	10		20	0	0	0	30
PSG7	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7	12,60	3,36	10		10	10	0	0	30
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin	5,67	0,43	10	5	5	5	5	0	30
PSG1	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1	13,73	4,84	7		10	10	0	0	27
CACNB4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	4,91	2,43	10	5	2	0	5	5	27
PRKG2	protein kinase, cGMP-dependent, type II	4,71	0,19	10	5	2	0	10	0	27
CCND2	cyclin D2	10,76	3,36	10		10	5	0	0	25
PSG6	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6	9,08	0,31	10		5	10	0	0	25
SERPIN2	serpin peptidase inhibitor, B, member 2	8,99	0,89	10		5	10	0	0	25
CYP26B1	cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	8,47	0,50	10		5	0	10	0	25
PSG4	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4	7,72	9,54	10		5	10	0	0	25
WNT2	wingless-type MMTV integration site family member 2	7,00	0,43	10	5	5	0	5	0	25
SLC39A8	solute carrier family 39, member 8	6,83	3,36	10		5	0	5	5	25
PSG9	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9	6,38	0,58	10		5	0	0	0	15
EPHA5	EPH receptor A5	6,31	1,43	10		5	0	10	0	25
HELLS	helicase, lymphoid-specific	0,19	0,50	13		5	10	10	10	48
CA2	carbonic anhydrase II	0,02	1,61	10		20	0	10	5	45
HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor	0,03	0,00	10		20	10	5	0	45

<i>FOXM1</i>	forkhead box M1	0,05	0,00	10	5	20	10	0	0	45
<i>HAS1</i>	hyaluronan synthase 1	0,05	1,25	10		20	10	5	0	45
<i>HGF</i>	hepatocyte growth factor	0,07	0,00	7	5	10	10	10	0	42
<i>CDC20</i>	cell division cycle 20 homolog	0,05	0,00	10	5	20	5	0	0	40
<i>LMNB1</i>	lamin B1	0,13	0,00	10	5	5	10	10	0	40
<i>DEPDC1</i>	DEP domain containing 1	0,03	0,00	13	5	20	0	0	0	38
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5	0,05	0,00	13	5	20	0	0	0	38
<i>SOX11</i>	SRY (sex determining region Y)-box 11	0,09	0,00	13	5	10	0	10	0	38
<i>PTN</i>	pleiotrophin	0,11	0,00	13		5	0	10	10	38
<i>SOX4</i>	SRY (sex determining region Y)-box 4	0,17	0,00	13		5	0	10	10	38
<i>SCRG1</i>	stimulator of chondrogenesis 1	0,05	0,21	10		20	0	5	0	35
<i>BUB1</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	0,05	0,00	10	5	10	10	0	0	35
<i>CDC48</i>	cell division cycle associated 8	0,06	0,00	10	5	10	10	0	0	35
<i>SCD</i>	stearoyl-CoA desaturase	0,07	1,02	10		10	10	5	0	35
<i>TACC3</i>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	0,09	0,00	10	5	10	0	10	0	35
<i>BUB1B</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	0,09	0,00	10	5	10	10	0	0	35
<i>CDC2</i>	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	0,05	0,00	13		20	0	0	0	33
<i>MKI67</i>	antigen identified by monoclonal ab Ki-67	0,09	0,00	13		10	10	0	0	33
<i>EXO1</i>	exonuclease 1	0,05	0,00	10	5	10	5	0	0	30
<i>FGFR2</i>	fibroblast growth factor receptor 2	0,09	0,00	10		10	0	10	0	30
<i>AURKB</i>	aurora kinase B	0,11	0,00	10	5	5	10	0	0	30
<i>TK1</i>	thymidine kinase 1, soluble	0,12	0,00	10	5	5	10	0	0	30

Es wurde ein Wertigkeitssystem entwickelt, um mögliche Kandidatengene der Seneszenz aus den Mikroarray-Ergebnissen von hMSC-seneszent versus hMSC-K zu ermitteln. Für alle Gene, deren Probesets einen q-Wert < 10% und eine Gen-expressionsänderung (FC) > 2 bzw. < 0,5 aufwiesen, wurden Punkte vergeben für die Anzahl an differentiell exprimierten Probesets, die eventuell vorhandene, exklusive Expression und die Höhe des FC. Eine Literaturrecherche hinsichtlich der Funktion der Gene in Knochenmetabolismus, Alterung/Seneszenz und Osteoporose wurde ebenfalls bewertet. Die totale Summe aus diesen Punkten diente als Richtwert der betreffenden Gene für deren mögliche Bedeutung in der Seneszenz von hMSC. Pro Gen ist jeweils nur jenes Probeset mit der höchsten differentiellen Genexpressionsänderung angegeben. Gene, die in semi-quantitativen PCR-Ansätzen (Tab. 10) nicht nachgewiesen werden konnten (z.B. *SFRP4*), wurden aus der Liste heraus genommen. Rote Markierung: mindestens zweifach erhöhte Genexpression in Px im Vergleich zu P1 (FC ≥ 2); grüne Markierung: mindestens zweifach erniedrigte Genexpression in Px im Vergleich zu P1 (FC ≤ 0,5).

### 5.2.3 A-SAA – Auswirkung auf die Funktion von hMSC

#### 5.2.3.1 Einfluss von A-SAA auf die Seneszenz

Wie in der Kandidatenliste ersichtlich, ist die Expression der Akute-Phase Serum Amyloide A (A-SAA) mRNA *SAA1* und *SAA2* bis zu 52-fach erhöht in seneszenten hMSC (Tab. 15). Dies ist die stärkste Genexpressionsänderung, die in den Mikroarray-Analysen zur Seneszenz von *in-vitro*-gealterten hMSC detektiert werden konnte.

Semi-quantitative PCR Analysen zur Genexpression von *SAA1* und *SAA2* wurden an hMSC P1 und Px (letzte, seneszente Passage) von 12 verschiedenen Spendern durchgeführt, um das Ergebnis der SAM zu evaluieren. Die Ergebnisse wurden densitometrisch quantifiziert, wobei jedoch bei 4 Spendern keinerlei Expression der beiden Gene in P1 detektiert werden konnte, somit eine densitometrische Auswertung nicht möglich war. In Tab. 16 sind daher die Densitometrie-Ergebnisse tabellarisch dargestellt. In 8 hMSC-Populationen war mindestens eine 1,5fach erhöhte Expression von *SAA1* in der seneszenten Passage Px im Vergleich zu P1 zu beobachten. In ebenfalls 8 Spendern, die sich z.Z. von den *SAA1* höher exprimierenden Zellen unterscheiden, wurde eine erhöhte Expression von *SAA2*

in Px im Vergleich zu P1 detektiert. In nur 2 hMSC-Populationen zeigte sich das Expressionsmuster von SAA1 und SAA2 genau gegensätzlich (hMSC 622 und hMSC 540). Beide Gene wiesen nur in drei Fällen eine geringere Expression in Px im Vergleich zu P1 auf. SAA1 konnte in 2 hMSC-Populationen, SAA2 in 4 hMSC-Populationen mehr als 10fach höher exprimiert bzw. exklusiv in Px exprimiert vorgefunden werden.

Tab. 16 Ergebnisse der densitometrischen Auswertung von semi-quantitativen PCR-Analysen zur Expression von SAA1 und SAA2 in hMSC in Px nach *in-vitro*-Alterung im Vergleich zu P1.

Genexpressionsänderung		
hMSC-Population	SAA1 (Px/P1)	SAA2 (Px/P1)
574	—	+
613	—	+
614	---	—
622	++	---
625	+	+
539	++	+
542	—	—
545	+++	+++
540	+	---
271	++	+++
274	+	+++
276	+++	+++

Die densitometrisch ermittelten Wert wurden auf das Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) normalisiert und die Genexpressionsänderung (Px/P1) bestimmt. Bei fehlender Expression in P1 konnte keine quantitative Auswertung durchgeführt werden, die Expression von SAA1 (serum amyloid A1) bzw. SAA2 (serum amyloid A2) wurde in diesem Fall als exklusiv in Px definiert. Eine Genexpressionsänderung zwischen 0,667 und 1,5 bedeute, dass kein Unterschied in der Höhe der Expression zwischen Px und P1 vorliegt. Eine Änderung von 0,667 bedeutet eine 1,5fach geringere Expression im Vergleich zu P1. Genexpressionsänderung in Px im Vergleich zu P1:

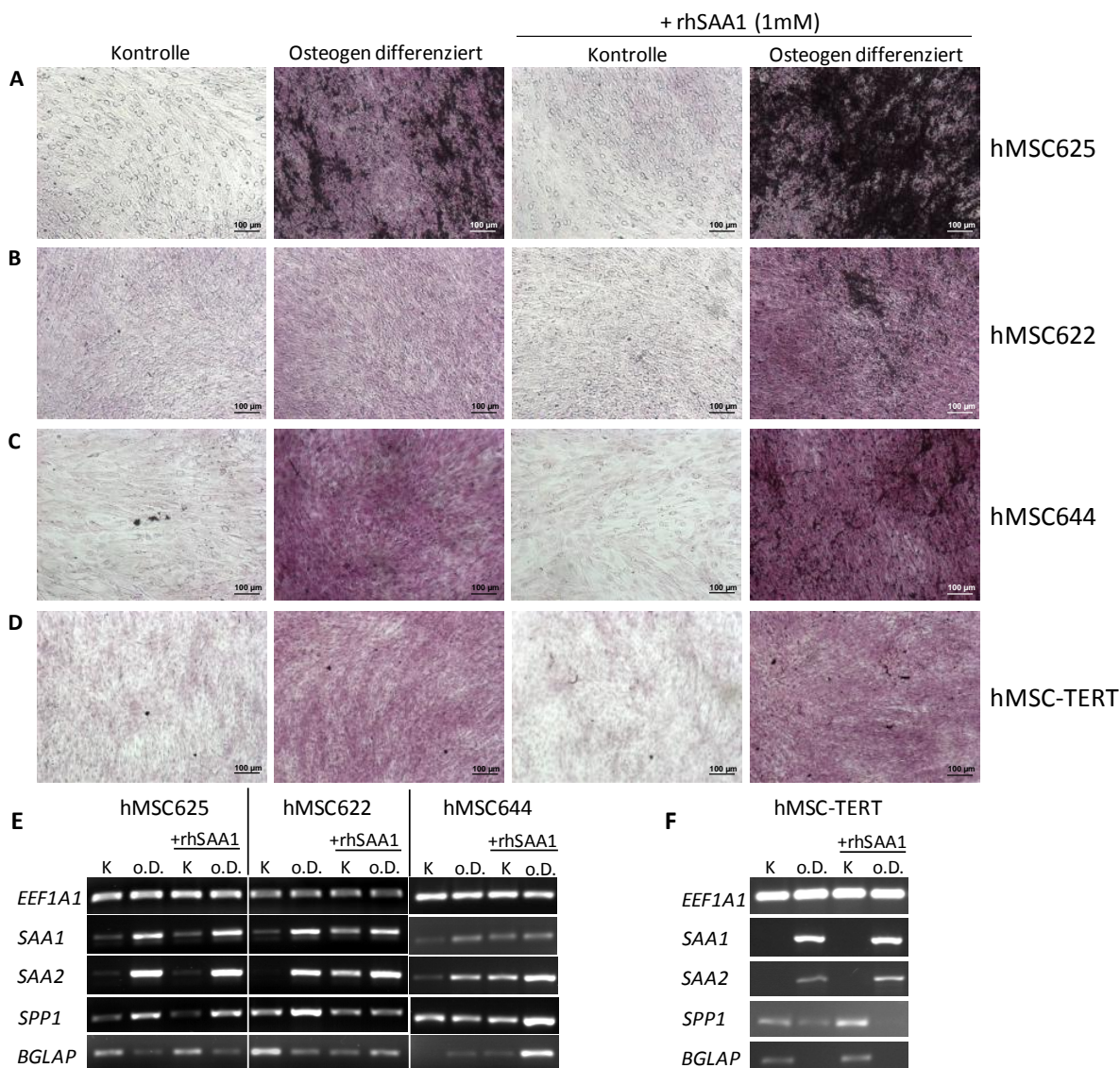
--	< 0,667fach
-	keine Genexpressionsänderung
+	> 1,5fach
++	> 5fach
+++	> 10fach oder exklusiv

### 5.2.3.2 Stimulation mit rhSAA1 während osteogener Differenzierung

Um die Bedeutung von A-SAA auf den Stammzellcharakter von hMSC zu untersuchen, wurden Zellen von 3 verschiedenen Spendern mit 1mM rekombinantem SAA1 (rhSAA1) osteogen differenziert.

Es zeigte sich, dass die mit rhSAA1 stimulierten hMSC deutlich mehr Kalziumhydrogenphosphat in ihre extrazelluläre Matrix eingelagert hatten als nicht stimulierte Zellen (Abb. 28A-C). Kein Einfluss von A-SAA wurde in den Differenzierungskontrollen mit Expansionsmedium detektiert. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von SAA1 und SAA2 generell in allen osteogenen Differenzierungen verstärkt (Abb. 28E). Ein geringer Unterschied in der A-SAA-Expression nach osteogener Differenzierung mit und ohne rhSAA1-Supplementation konnte nur an hMSC eines Spenders gezeigt werden (hMSC644). Diese Zellen zeigen zudem den geringsten Unterschied in der Mineralisierung zwischen behandelten und unbehandelten Differenzierungen, sowie eine erhöhte *SSP1*- und *BGLAP*-Expression nach osteogener Differenzierung mit rhSAA1 auf. Es konnte kein einheitliches Expressionsmuster der beiden osteogenen Differenzierungsmarker in den verschiedenen hMSC-

Populationen detektiert werden. Kontrollzellen, die 3 Wochen mit rhSAA1 behandelt wurden, zeigen bei hMSC622 und hMSC644 eine erhöhte *SAA1*- und *SAA2*-Expression.



**Abb. 28** Osteogene Differenzierung von hMSC und hMSC-TERT mit rekombinantem, humanem SAA1 (rhSAA1). Humane MSC aus 3 verschiedenen Spendern wurden 3 Wochen in osteogenem Differenzierungsmedium bzw. hMSC-Expansionsmedium (Kontrolle) mit und ohne 1mM rhSAA1 kultiviert. Anschließend wurde die Kalziumhydrogenphosphat-Einlagerung in die extrazelluläre Matrix mit Alizarin Rot S nachgewiesen (A-C) und die Genexpression von *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), *SAA1* (serum amyloid A1), *SAA2* (serum amyloid A2), *SPP1* (secreted phosphoprotein 1, Osteopontin) und *BGLAP* (bone gamma-carboxyglutamate protein, Osteocalcin) mittels semi-quantitativer PCR untersucht (E). Telomerase-immortalisierte hMSC-TERT wurden 10 Tage unter 1mM rhSAA1-Stimulation osteogen differenziert und der Differenzierungsgrad bzw. das Genexpressionsmuster ebenfalls mittels Alizarin Rot S (D) bzw. semi-quantitativer PCR untersucht (F). K = Kontrolle, o.D. = osteogen differenziert

Verstärkte Matrixbildung durch rhSAA1-Stimulation konnte ebenfalls in 10 Tage osteogen differenzierten hMSC-TERT gezeigt werden, wenn auch deutlich schwächer als in hMSC (Abb. 28D). Eine Differenzierung über einen längeren Zeitraum hinweg war nicht möglich, da die Kontrollzellen im Expansionsmedium nach mehr als 10 Tagen den Kontakt zum Untergrund verloren und sich als Zellrasen ablösten. Auf mRNA-Ebene wurde auch in den immortalisierten hMSC-TERT kein signifikanter Unterschied gefunden in der *A-SAA*-Expression zwischen Zellen mit und ohne rhSAA1-

Stimulation (Abb. 28F). Die Differenzierungsmarker *SSP1* und *BGLAP* sind in unbehandelten und behandelten, osteogen differenzierten Zellen ohne signifikante Unterschiede geringer exprimiert.

### 5.2.3.3 Charakterisierung von stabil mit *SAA1* bzw. *SAA2* transfizierten hMSC-TERT

Mittels Elektroporation wurden hMSC-TERT mit *SAA1*-pcDNA3.1(+) bzw. *SAA2*-pcDNA3.1(+) transfiziert und stabil *SAA1*- bzw. *SAA2*-exprimierende, monoklonale Zelllinien hergestellt (*SAA1*-hMSC-TERT bzw. *SAA2*-hMSC-TERT). Insgesamt wurde das Verfahren drei Mal wiederholt und von diesen verschiedenen Zelllinien jene mit der stärksten A-SAA-Expression auf mRNA-Ebene für die weitere Charakterisierung der Zellen ausgewählt. Als Kontrollzellen dienten bei allen folgenden Experimenten hMSC-TERT und hMSC-TERT, die allein mit dem Vektor pcDNA3.1(+) transfiziert wurden (pcDNA-hMSC-TERT).

Mittels semi-quantitativer PCR wurde festgestellt, dass die *SAA1*-hMSC-TERT-Klone ebenfalls *SAA2* exprimieren und die *SAA2*-hMSC-TERT ebenfalls *SAA1*, jedoch zusammen mit *SAA1* in weitaus höherem Maße (Abb. 29A). Ebenfalls ersichtlich wurde, dass nicht nur die Gesamtexpression von *SAA1* bzw. *SAA2* in den A-SAA-Klonen erhöht vorliegt, sondern auch die Expression des endogenen A-SAA durch das Einbringen von *SAA1*- bzw. *SAA2*-Inserts in die Zellen erhöht wurde. Nachgewiesen werden konnte diese Expression (endo) mittels spezifischer Primerpaare, die nicht in der Insert-Sequenz binden können und somit nur die zelleigene *SAA1*- bzw. *SAA2*-mRNA detektieren.

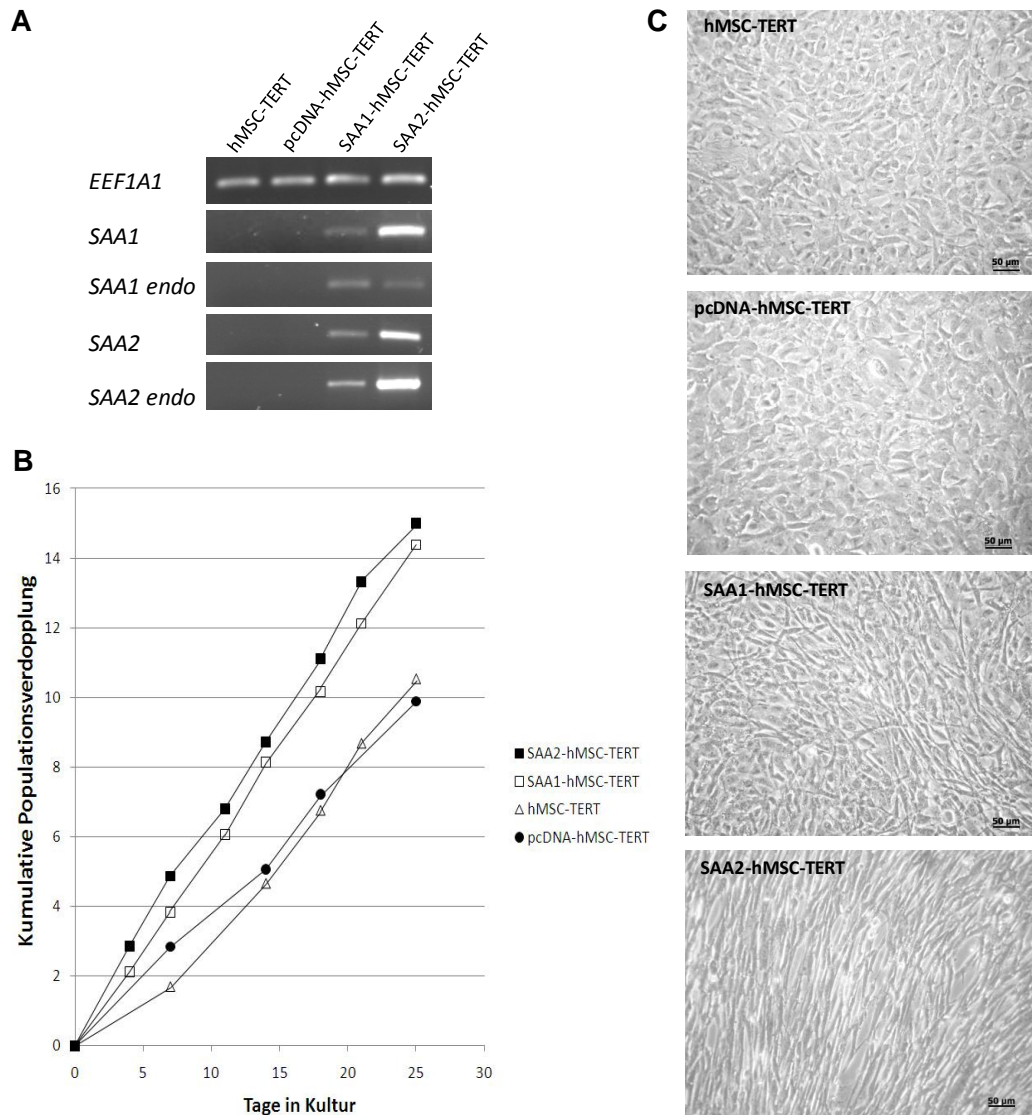
Die *SAA1*-hMSC-TERT bzw. *SAA2*-hMSC-TERT zeigten des Weiteren eine deutlich erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit im Vergleich zu nicht transfizierten hMSC-TERT und den Vektor-kontrollen pcDNA-hMSC-TERT (Abb. 29B)

Auch die Morphologie der Zellen ist stark verändert. Stabil mit *SAA1* als auch mit *SAA2* transfizierte Zellen sind deutlich länger und schmaler als hMSC-TERT oder pcDNA-hMSC-TERT. Die *SAA2*-hMSC-TERT Zellen weisen die stärksten morphologischen Veränderungen auf (Abb. 29C).

Mit *SAA1*-hMSC-TERT und *SAA2*-hMSC-TERT, sowie den Kontrollzellen wurden osteogene Differenzierungsansätze durchgeführt. Aufgrund der erhöhten Proliferationsbereitschaft der stabil transfizierten Zellen, lösten sich die Differenzierungskontrollen (nur Expansionsmedium) bereits nach 6 Tagen ab. Aus diesem Grund wurden die Zellen nur 5 Tage osteogen stimuliert. Trotz der kurzen Zeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *SAA1* bzw. *SAA2* in hMSC-TERT zur verstärkten Mineralisierung führt, wie die Alizarin Rot S-Färbung verdeutlicht (Abb. 30A). Die Kontrollzellen pcDNA-hMSC-TERT zeigen keine Mineralisierung nach 5 Tagen.

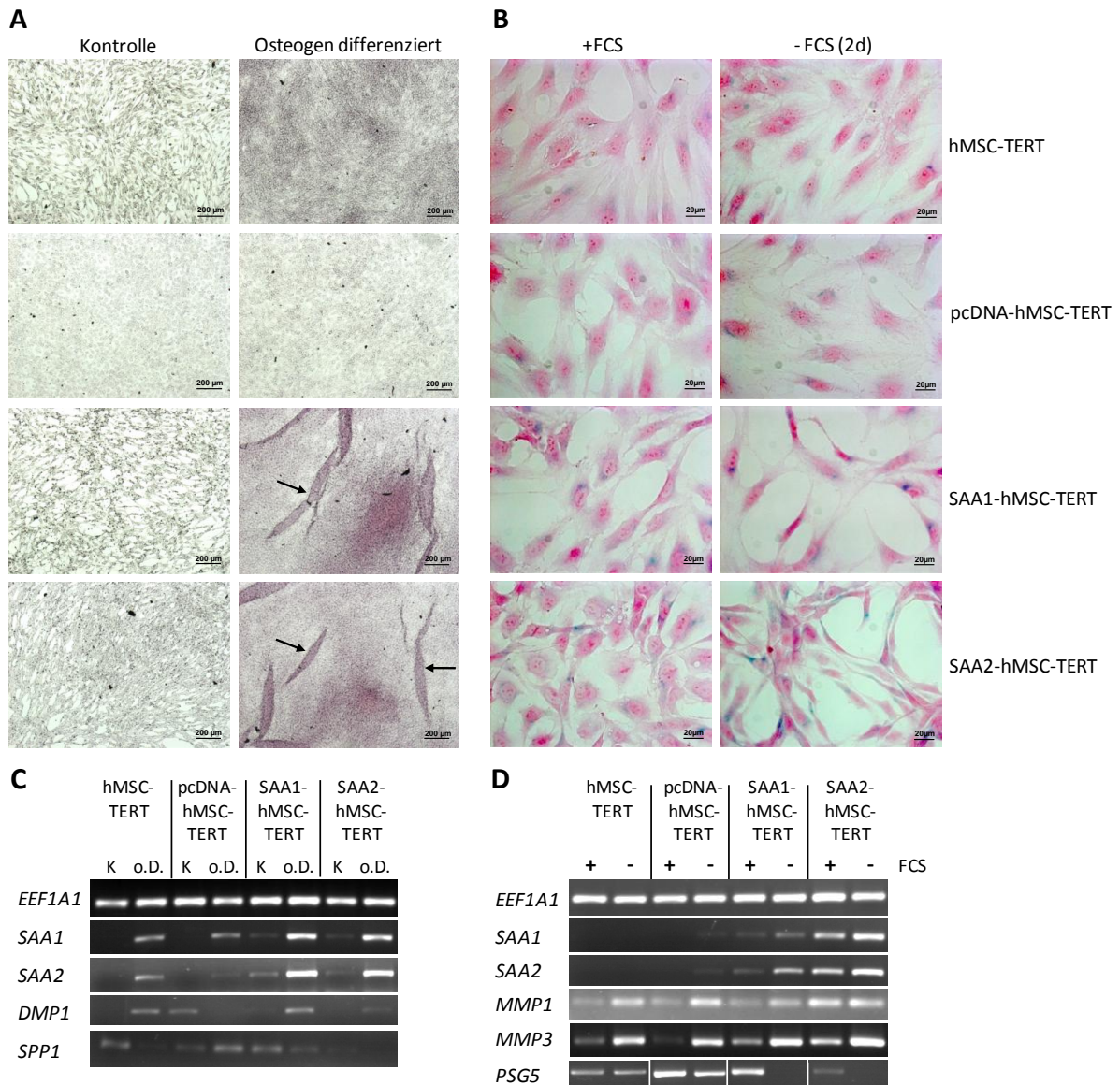
Auf RNA-Ebene ist die Expression von *SAA1* und *SAA2* nach der osteogenen Differenzierung in *SAA1*-hMSC-TERT und *SAA2*-hMSC-TERT am stärksten (Abb. 30C). Der Differenzierungsmarker *DMP1* ist durch osteogene Stimulation in allen Zellen, außer pcDNA-hMSC-TERT erhöht, während *SPP1* geringer exprimiert wird.

Des Weiteren wurde die Auswirkung von Stress auf die Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde RNA von den stabilen Zelllinien und den Kontrollzellen isoliert nachdem diese 2 Tage in hMSC-TERT-Expansionsmedium ohne FCS kultiviert wurden. Als Vergleich dienten Zellen, die nicht unter FCS-Entzug in Expansionsmedium kultiviert wurden. Die Auswirkungen wurden mittels SA- $\beta$ -Gal-Färbung untersucht. Es zeigte sich, dass bereits allein die Überexpression von *SAA1* bzw. *SAA2* in den stabilen hMSC-TERT zu einer erhöhten Anzahl an SA- $\beta$ -Gal-positiven Zellen führte (Abb. 30B). Nach 2tägigem Serumentzug wiesen sie zusätzlich eine nochmals veränderte Zellmorphologie auf. Die *SAA1*-hMSC-TERT als auch *SAA2*-hMSC-TERT erschienen länglicher und schmaler als unter Kultur mit 10% FCS. Humane MSC-TERT und pcDNA-hMSC-TERT dienten als Kontrollen und zeigten kaum SA- $\beta$ -Gal-Aktivität bzw. nur geringfügig erhöhte Enzymaktivität nach Serumentzug ohne eine Veränderung der Morphologie.



**Abb. 29** Auswirkung der Überexpression von *SAA1* bzw. *SAA2* auf hMSC-TERT. **A:** semi-quantitative PCR-Analyse von stabilen TERT-Klonen und unbehandelten Zellen mit Primern für *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), *SAA1* (serum amyloid A1, Primer: *SAA1*<sup>a</sup>) und *SAA2* (serum amyloid A2, Primer: *SAA2*<sup>b</sup>). Es wurden ebenfalls Primer verwendet, die nur die endogene Expression von *SAA1* (*SAA1 endo*) bzw. *SAA2* (*SAA2 endo*) detektieren und nicht an das klonierte Insert binden können: *SAA1*<sup>b</sup> bzw. *SAA2*<sup>b</sup>. **B:** Von stabil transfizierten *SAA1*-hMSC-TERT und *SAA2*-hMSC-TERT wurde die kumulative Populationsverdopplung (PD) über einen Zeitraum von 25 Tagen ermittelt und mit pcDNA-hMSC-TERT und hMSC-TERT verglichen. **C:** Dokumentation der morphologischen Veränderungen mittels Phasenkontrast-Mikroskopie wurden von *SAA1*-hMSC-TERT bzw. *SAA2*-hMSC-TERT im Vergleich zu Kontrollzellen durchgeführt.

Auf Genexpressionsebene wurde der Einfluss des FCS-Entzugs ebenfalls untersucht (Abb. 30D). Dabei zeigte sich nicht nur, dass sowohl *SAA1* als auch *SAA2* in *SAA1*-hMSC-TERT und *SAA2*-hMSC-TERT höher exprimiert wurden, sondern dass der FCS-Entzug die Expression der beiden Gene nochmals erhöhte. Das Expressionsmuster der Metalloproteinasen *MMP3* und *MMP1* wurde ebenfalls untersucht. Beide Gene wurden in den gestressten Zellen höher exprimiert. Die Expression von *PSG5* war ebenfalls verändert. Das Gen wurde in *SAA1*-hMSC-TERT und *SAA2*-hMSC-TERT nach Serum-entzug nicht mehr exprimiert.

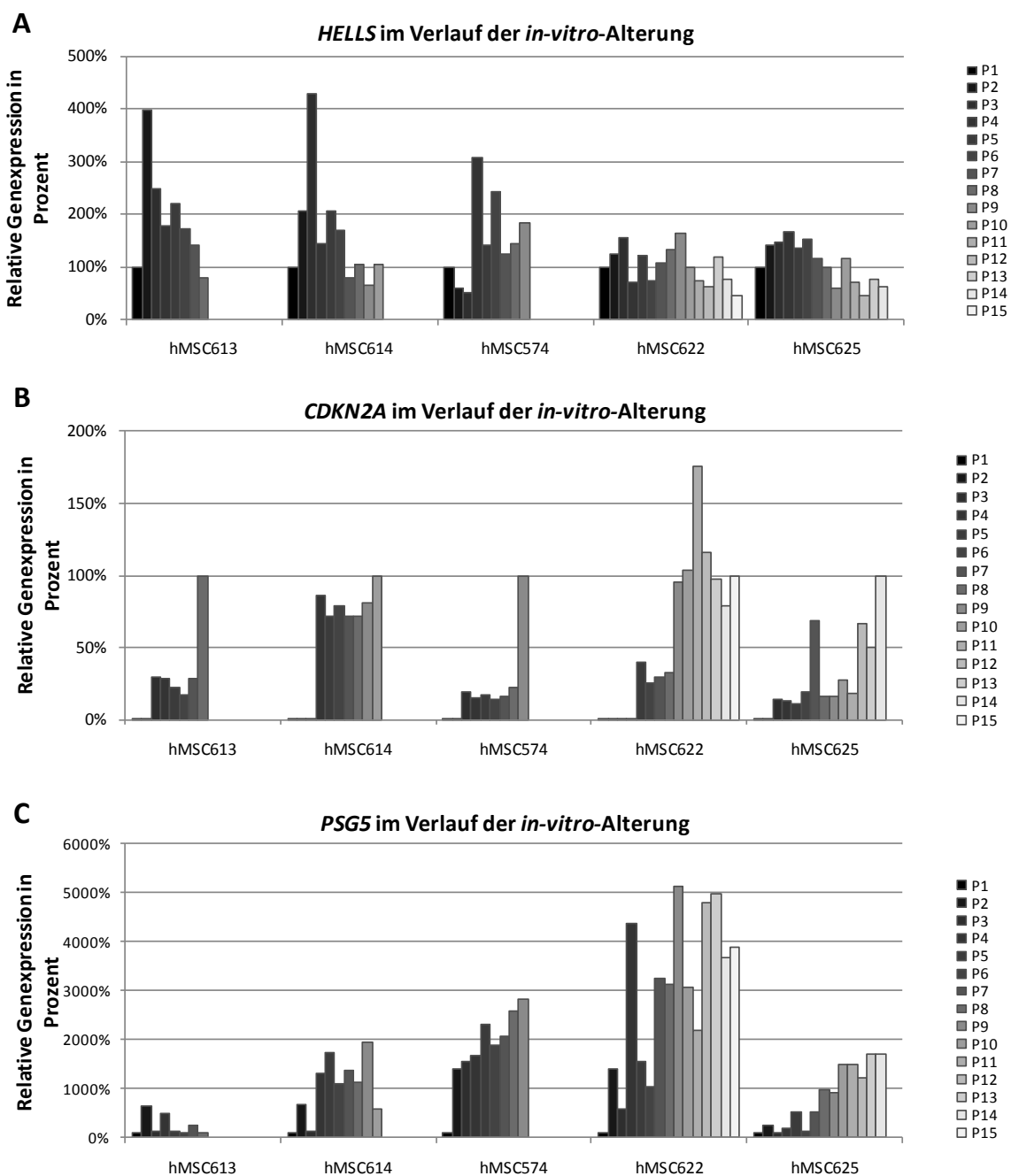


**Abb. 30** Osteogene Differenzierung und Serumentzug von hMSC stabil transfiziert mit SAA1 und SAA2. Osteogene Differenzierung der stabil transfizierten SAA1-hMSC-TERT bzw. SAA2-hMSC-TERT erfolgte über die Kultivierung für 5 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium bzw. Expansionsmedium (Kontrolle). Der Nachweis der Mineralisierung erfolgte mittels Alizarin Rot S-Färbung (A). Bereiche, in denen sich der Zellrasen abgelöst hatte, sind mit einem Pfeil markiert. Als Vergleichszellen dienten hMSC-TERT und nur mit Vektor transfizierte pcDNA-hMSC-TERT. B: SA-β-Gal-Färbung mit Kernechtrot als Gegenfärbung von Zellen in hMSC-TERT-Medium (+FCS) und nach 2tägiger Kultur in Serum-freiem Medium (-FCS). C: Semi-quantitative PCR der 5 Tage osteogen differenzierten Zellen mit Primern für *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), *SAA1* (serum amyloid A1), *SAA2* (serum amyloid A2), *DMP1* (dentin matrix acidic phosphoprotein 1) und *SPP1* (secreted phosphoprotein 1). K = Kontrolle, o.D. = osteogen differenziert; D: Semi-quantitative PCR von cDNA aus Zellen unter 2tägigem FCS-Entzug (-) verglichen mit Zellen in hMSC-TERT-Medium mit 10% FCS (+). Primer für *EEF1A1*, *SAA1*, *SAA2*, *MMP1* (matrix metalloproteinase 1), *MMP3* (matrix metalloproteinase 3), und *PSG5* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5) wurden verwendet.

### 5.2.4 HELLS – Expressionsmuster während der *in-vitro*-Alterung von hMSC

Die Mikroarray-Analysen zur Seneszenz zeigten, dass die Lymphoid-spezifische Helikase *HELLS* in seneszenten hMSC bis zu 5,26fach geringer exprimiert wird als in P1 (FC = 0,19) (Tab. 15). Die Evaluierung der Mikroarray-Daten mittels semi-quantitativer PCR konnte diese verringerte Expression in 3 von 5 hMSC-Chargen bestätigen (Tab. 10).

Um die Expression während des gesamten Verlaufs der *in-vitro*-Alterung zu untersuchen, wurde semiquantitative PCR von *HELLS* an cDNA aus jeder Passage von 5 weiteren hMSC-Populationen durchgeführt (Abb. 31A). Anschließende densitometrische Auswertung zeigte, dass *HELLS* in P1 nur geringfügig exprimiert wird, und daher kaum eine Genexpressionsänderung zwischen P1 und Px festzustellen ist. Die Expression steigt jedoch in P2-5 (abhängig von der jeweiligen hMSC-Population) an und nimmt im weiteren Verlauf der *in-vitro*-Alterung wieder ab. Dieses Expressionsmuster konnte trotz Spendervariabilität in allen 5 hMSC-Populationen beobachtet werden.





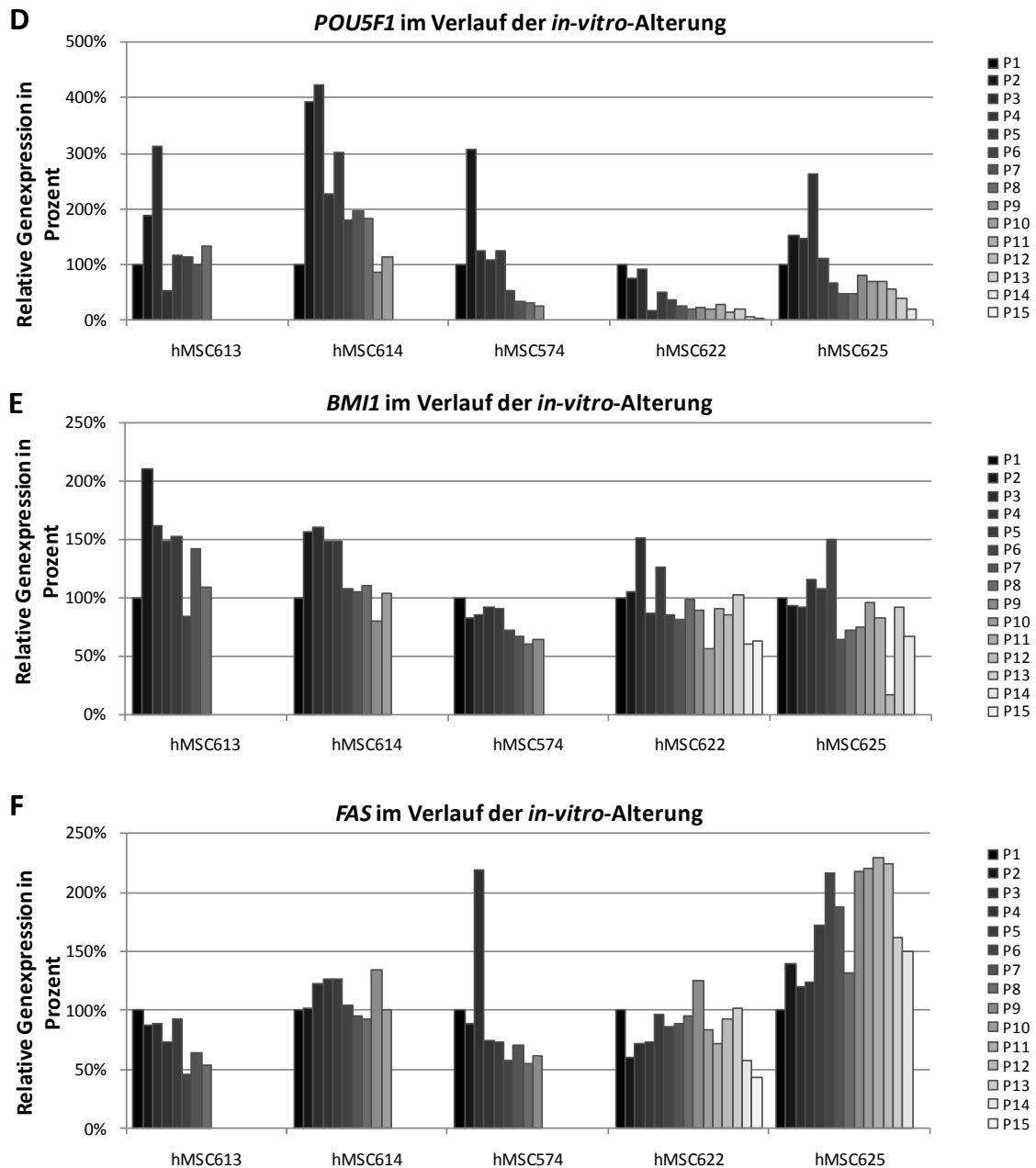


Abb. 31 Expressionsmuster ausgewählter Gene im Verlauf der *in-vitro*-Alterung von 5 hMSC-Populationen.

Densitometrische Auswertung von semi-quantitativen PCR-Ansätzen mit Primern für A: HELLS (lymphoid-specific helicase), B: CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), C: PSG5 (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5), D: POU5F1 (POU class 5 homeobox 1, OCT4), E: BMI1 (BMI1 polycomb ring finger oncogene) und F: FAS (Fas [TNF receptor superfamily, member 6]). Es wurden cDNA-Proben aus jeder Passage der 5 hMSC-Populationen verwendet, die letzte Passage bezeichnet jeweils die seneszente Passage. Die Daten wurden auf das Haushaltsgen EEF1A1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) normalisiert. Für die relative Genexpression HELLS, PSG5, BMI1, POU5F1 und FAS wurden die normalisierten Densitometriewerte für P1 auf 100% gesetzt und alle anderen Genexpressionswerte dazu ins Verhältnis gestellt. Da in frühen Passagen keine CDKN2A-Expression detektiert werden konnte, wurde für diese Passagen eine Expression von 0% festgelegt. Die Densitometrie-Werte für CDKN2A wurden für Px auf 100% gesetzt und alle anderen Genexpressionswerte dazu ins Verhältnis gestellt.

Um mögliche Zusammenhänge mit dem Genexpressionsmuster von Seneszenzmarkern feststellen zu können, wurden ebenfalls PCR-Analysen von *CDKN2A* (Abb. 31B) und *PSG5* (Abb. 31C) durchgeführt. Es zeigte sich, dass *CDKN2A* in frühen Passagen nicht exprimiert wird und in 3 von 5 hMSC-Populationen in Px abrupt ansteigt. Die *PSG5*-Expression steigt bereits sehr früh sehr stark, in 2

hMSC-Populationen sogar schon in P2 bzw. P3. Nur in einer hMSC-Population konnte eine Abnahme der *PSG5*-Expression ab P2 im Verlauf der *in-vitro*-Alterung beobachtet werden (hMSC613).

Weitere Gene, die in der Literatur in Zusammenhang mit HELLS gebracht werden bzw. deren Expression von HELLS reguliert wird, wurden ebenfalls untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *POU5F1* (OCT4) dem Verlauf der *HELLS*-Expression entspricht (Abb. 31D). Die Expression des p16-Inhibitors *BMI1* und des Rezeptors *FAS* nimmt nur geringfügig in späten Passagen ab, diese Abnahme konnte aber in allen 5 hMSC-Populationen gezeigt werden (Abb. 31E und F). Die *FAS*-Expression ist in 3 der 5 Spender in Px ca. 2fach geringer als in P1.

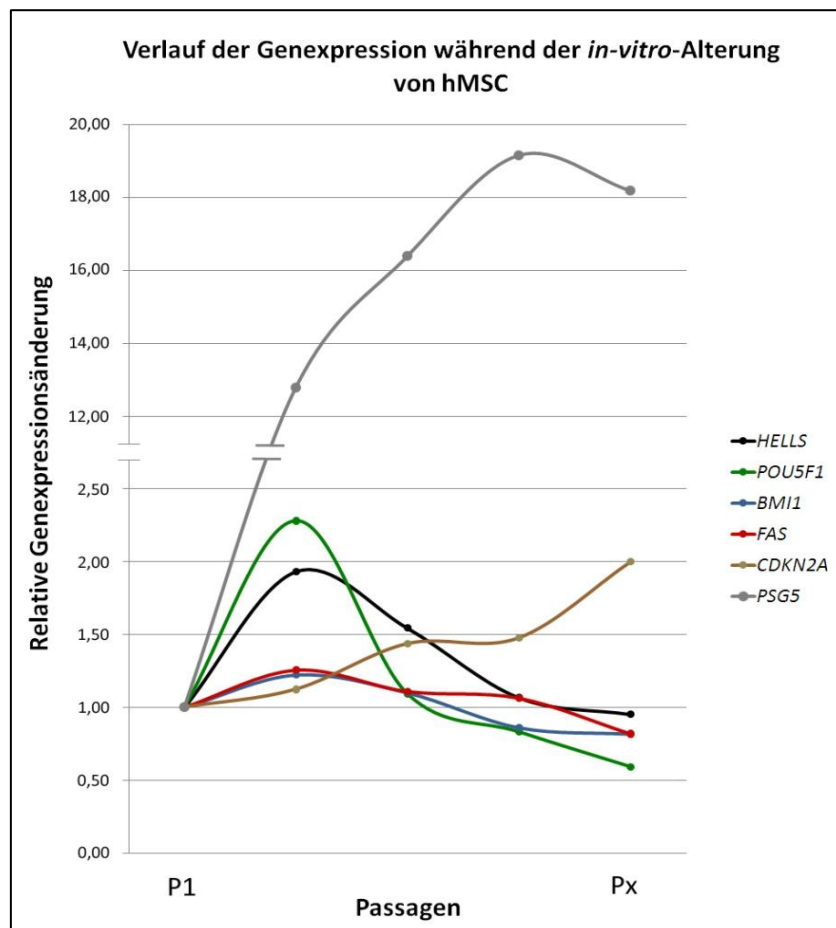


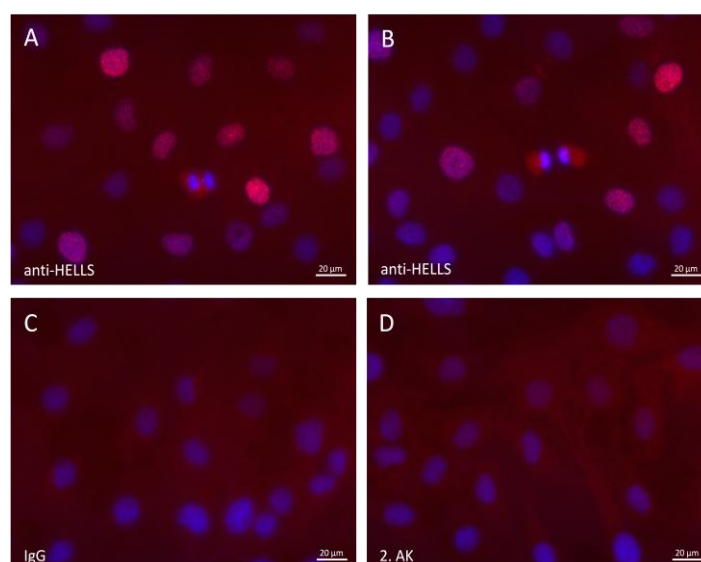
Abb. 32 Schematische Zusammenfassung der Daten zur Genexpression im Verlauf der *in-vitro*-Alterung. Die Passagenanzahlen der 5 hMSC-Populationen aus Abb. 31 wurden in je 5 Abschnitte eingeteilt und aus jedem Abschnitt der Densitometriewert einer Passage verwendet, um die relative Genexpressionsänderung im Verhältnis zu P1 zu ermitteln ( $FC = P_{\text{Abschnitt}}/P1$ ). Abschnitt 1 und Abschnitt 5 bezeichnen dabei P1 bzw. die seneszente Passage Px. Es wurden Mittelwerte aus den relativen Genexpressionsänderungen aller 5 hMSC-Populationen für die Gene *HELLS*, *PSG5*, *CDKN2A*, *BMI1*, *POU5F1* und *FAS* gebildet.

Die Abb. 32 zeigt die schematische Zusammenfassung der densitometrischen Daten zu *HELLS*, *CDKN2A*, *PSG5*, *POU5F1*, *BMI1* und *FAS* aller 5 hMSC-Populationen. Da alle hMSC-Populationen unterschiedlich viele Passagen bis zur Seneszenz durchliefen (8-15 Passagen), wurde jede einzelne Population in 5 Abschnitte eingeteilt. Abschnitt 1 und Abschnitt 5 bezeichnen dabei P1 bzw. Px, innerhalb der restlichen Abschnitte wurde die cDNA einer Passage blind gewählt, um eine Vergleichbarkeit der Daten von mehreren hMSC-Populationen zu ermöglichen. Anschließend wurde von jeder Population die relative Genexpression ermittelt ( $FC = P_{\text{Abschnitt}}/P1$ ) und die Mittelwerte zu jedem Abschnitt aus allen 5 hMSC-Populationen gebildet.

Da es sich um semi-quantitative Analysen handelt, kann die Höhe der Genexpression verschiedener Gene nicht miteinander verglichen werden. Allein der Verlauf der Genexpression ist in Abb. 32 aussagekräftig. Es wird nochmals verdeutlicht, dass die Expression von *PSG5* viel früher anstieg als die Expression des zweiten Seneszenzmarkers *CDKN2A*. Das Genexpressionsmuster von *HELLS* und *POU5F1* war nahezu identisch. *BMI1* und *FAS* zeigten kaum Genexpressionsänderungen im Verlauf der *in-vitro*-Alterung.

Da es sich um die Mittelwörter aller 5 hMSC-Populationen handelt, gehen individuelle Spendervariabilitäten verloren, wie besonders deutlich beim Expressionsmuster von *FAS* zu beobachten ist.

Um das Protein in mesenchymalen Stammzellen zu lokalisieren, wurde die immortalisierte Zelllinie hMSC-TERT heran gezogen. *HELLS* war fast ausschließlich in den Nuklei der Zellen zu finden, dort jedoch in unterschiedlicher Menge, wie die variierenden Fluoreszenz-Intensitäten in Abb. 33A und B zeigen. Des Weiteren war *HELLS* während der Zellteilung (Abb. 33A) aber auch noch kurz darauf (Abb. 33B) im Cytoplasma lokalisiert.



**Abb. 33** Immunocytochemischer Nachweis von *HELLS* in hMSC-TERT. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit spezifischem anti-*HELLS* Primärantikörper in hMSC-TERT (A, B). Die Inkubationen mit Rabbit IgG (C) und Sekundärantikörper allein (D) dienten als Kontrollen für die Spezifität des anti-*HELLS* Antikörpers.

## 5.3 Kandidatengene der Osteoporose

### 5.3.1 Kandidatengensuche

Der Vergleich des Transkriptom von hMSC-OP mit hMSC-K mittels Mikroarrays und die anschließende SAM dienten dem Zweck, Kandidatengene zu identifizieren, die in hMSC eine Rolle bei der Entstehung von Osteoporose spielen könnten. Um aus der Fülle an Daten geeignete Kandidaten filtern zu können, wurden diese mittels eines Punktesystems und der bekannten wissenschaftlichen Literatur nochmals bereinigt. Dabei wurde analog der Punktevergabe des Genexpressionsvergleichs von hMSC-seneszent mit hMSC-K vorgegangen (siehe 5.2.2).

Es wurde – wie oben beschrieben – die Stringenz der Genexpression angehoben, indem nur Genprodukte mit einem q-Wert < 10% und FC < 0,5 bzw. > 2 als differentiell exprimiert angesehen wurden.

Die Anzahl an differentiell exprimierten Probesets pro Gen, sowie die exklusive Expression in hMSC-K bzw. hMSC-OP wurde bewertet. Ebenso wurden Punkte für die Höhe des FC vergeben (Tab. 17).

Tab. 17 Punktevergabe für Höhe des Foldchange (FC) in SAM von hMSC-OP versus hMSC-K

Punkte	FC (hMSC-OP/ hMSC-K)	
	FC ab < 0,5	FC ab > 2
0	> 0,4	< 2,5
2	> 0,3333	< 3
5	> 0,2	< 5
10	> 0,1	< 10
20	< 0,1	> 10

Die Summe aus all diesen Punkten diene als erstes Auswahlkriterium. Die besten 100 Gene der höher, sowie der geringer exprimierten Gene in hMSC-OP wurden in einer Literaturrecherche hinsichtlich ihrer bisher bekannten Funktion untersucht. Je nachdem welche Bedeutung den jeweiligen Genen in diesen Kategorien zukam, wurden – wie oben beschrieben – Punkte verteilt (siehe 5.2.2). Zusammen mit der vorangegangenen Bewertung wurde die totale Summe berechnet.

In Tab. 18 sind auszugsweise nur die 25 Gene mit der höchsten totalen Summe für erniedrigte bzw. erhöhte Expression in hMSC-OP aufgeführt. Die vollständige Liste mit 200 Genen befindet sich im Anhang (Tab. 34). Im Falle von mehreren Probesets pro Gen sind nur jene mit dem niedrigsten bzw. höchsten FC in den Listen aufgeführt.

Da aufgrund des Altersunterschieds der Spender von hMSC-OP und hMSC-K nicht definiert werden kann, welche differentielle Genexpression aufgrund des Alters und welche aufgrund der Osteoporose hervorgerufen wird, wurden jene Gene, die auch in den Mikroarray-Analysen von hMSC-alt versus hMSC-K in die gleiche Richtung differentiell exprimiert wurden, markiert. Eine PCR-Evaluierung mit RNA-Proben von hMSC-alt und hMSC-OP wäre bei diesen Genen nötig, bevor sie als definitive Kandidaten der Osteoporose in Frage kommen würden.

Tab. 18 Rangliste der besten 50 Kandidatengene für osteoporotische hMSC

Gen Symbol	Gen Name	FC	q (%)	Probeset-Punkte	Exklusive Exp.	FC-Punkte	Literatur-Punkte			total	gleich in hMSC-alt
							Alterung	Knochen	Osteoporose		
<i>IGF2</i>	insulin-like growth factor 2	6,39	3,21	13		10	10	10	0	43	
<i>FOXC2</i>	forkhead box C2	2,89	0,62	10		2	10	10	10	42	
<i>MAB21L2</i>	mab-21-like 2	14,43	0,00	10		20	0	10	0	40	X
<i>SOST</i>	sclerosteosis	7,30	2,18	10		10	0	10	10	40	
<i>IBSP</i>	integrin-binding sialoprotein	5,72	0,00	10		10	0	10	10	40	
<i>CALR</i>	calreticulin	2,62	1,60	13		2	10	10	5	40	X
<i>ITGB2</i>	integrin, beta 2	2,94	0,62	10		2	5	10	10	37	
<i>NOTCH3</i>	Notch homolog 3	2,90	0,90	10		2	10	10	5	37	
<i>EGR2</i>	early growth response 2	5,97	0,62	10		10	0	10	5	35	
<i>ANGPTL4</i>	angiopoietin-like 4	3,69	7,26	10		5	0	10	10	35	
<i>PTH1R</i>	parathyroid hormone 1 receptor	3,00	2,70	10		2	0	10	10	32	
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	2,71	8,24	10		2	10	10	0	32	
<i>PML</i>	promyelocytic leukemia	2,70	1,40	10		2	10	10	0	32	
<i>SDC3</i>	syndecan 3	3,41	1,60	10	5	5	0	10	0	30	X

<i>BMP8B</i>	Bone morphogenetic protein 8b	<b>6,29</b>	3,54	10		10	0	5	0	<b>25</b>	
<i>COL10A1</i>	collagen, type X, alpha 1	<b>5,25</b>	0,00	10		10	0	5	0	<b>25</b>	
<i>FSTL3</i>	folliculin-like 3	<b>3,40</b>	1,60	10		5	0	10	0	<b>25</b>	
<i>NBL1</i>	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	<b>3,34</b>	0,62	10		5	0	10	0	<b>25</b>	
<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	<b>3,11</b>	2,46	10		5	10	0	0	<b>25</b>	
<i>PTGDS</i>	prostaglandin D2 synthase 21kDa	<b>2,91</b>	2,70	13		2	0	5	5	<b>25</b>	
<i>PKD1</i>	polycystic kidney disease 1	<b>3,80</b>	1,33	7		5	0	10	0	<b>22</b>	
<i>SNCAIP</i>	synuclein, alpha interacting protein	<b>2,88</b>	0,90	10		2	10	0	0	<b>22</b>	
<i>ENO2</i>	enolase 2	<b>2,83</b>	4,38	10		2	10	0	0	<b>22</b>	
<i>TRPM2</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2	<b>2,77</b>	4,93	10		2	0	10	0	<b>22</b>	
<i>ZNF208</i>	zinc finger protein 208	<b>6,33</b>	0,62	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>NOX4</i>	NADPH oxidase 4	<b>0,35</b>	4,38	10	5	2	10	10	0	<b>37</b>	
<i>PENK</i>	proenkephalin	<b>0,34</b>	5,70	10		2	10	10	0	<b>32</b>	
<i>SH3BP2</i>	SH3-domain binding protein 2	<b>0,31</b>	4,38	1	5	5	0	10	10	<b>31</b>	
<i>RGS4</i>	regulator of G-protein signaling 4	<b>0,20</b>	4,38	13		10	0	5	0	<b>28</b>	X
<i>SUZ12</i>	Suppressor of zeste 12 homolog	<b>0,28</b>	5,70	1	5	5	10	5	0	<b>26</b>	
<i>MEOX2</i>	mesenchyme homeobox 2	<b>0,24</b>	0,00	10		5	10	0	0	<b>25</b>	
<i>LXN</i>	latexin	<b>0,45</b>	4,38	10		0	5	10	0	<b>25</b>	
<i>TUBB2A</i>	tubulin, beta 2A	<b>0,48</b>	3,90	10		0	10	5	0	<b>25</b>	
<i>CDCA8</i>	cell division cycle associated 8	<b>0,48</b>	9,04	10	5	0	10	0	0	<b>25</b>	
<i>FOXM1</i>	forkhead box M1	<b>0,40</b>	6,30	10		2	10	0	0	<b>22</b>	
<i>KAL1</i>	Kallmann syndrome 1 sequence	<b>0,10</b>	9,04	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>SCN3A</i>	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	<b>0,10</b>	9,04	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>PKIB</i>	protein kinase inhibitor beta	<b>0,12</b>	1,33	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>MALL</i>	mal, T-cell differentiation protein-like	<b>0,13</b>	4,38	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>ZIC1</i>	Zic family member 1	<b>0,13</b>	4,38	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>CNTN3</i>	contactin 3	<b>0,13</b>	1,60	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>F2RL1</i>	coagulation factor II receptor-like 1	<b>0,18</b>	2,18	10		10	0	0	0	<b>20</b>	
<i>CHI3L1</i>	chitinase 3-like 1	<b>0,22</b>	4,38	10		5	0	5	0	<b>20</b>	X
<i>SHFM1</i>	split hand/foot malformation type 1	<b>0,45</b>	1,90	10		0	0	10	0	<b>20</b>	X
<i>MFAP5</i>	microfibrillar associated protein 5	<b>0,26</b>	4,93	13		5	0	0	0	<b>18</b>	
<i>P2RY6</i>	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	<b>0,34</b>	2,18	10		2	0	5	0	<b>17</b>	X
<i>HNRNPUL2</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	<b>0,35</b>	1,90	10	5	2	0	0	0	<b>17</b>	
<i>EMX2</i>	empty spiracles homeobox 2	<b>0,36</b>	4,38	10		2	0	5	0	<b>17</b>	
<i>PCDH5</i>	protocadherin beta 5	<b>0,37</b>	7,26	10	5	2	0	0	0	<b>17</b>	
<i>HOXB3</i>	homeobox B3	<b>0,38</b>	6,30	10		2	0	5	0	<b>17</b>	

Es wurde ein Wertigkeitssystem entwickelt, um mögliche Kandidatengene der Osteoporose aus den Mikroarray-Ergebnissen von hMSC-OP versus hMSC-K zu ermitteln. Für alle Gene, deren Probesets einen q-Wert < 10% und eine Genexpressionsänderung (FC) > 2 bzw. < 0,5 aufwiesen, wurden Punkte vergeben für die Anzahl an differentiell exprimierten Probesets, die eventuell vorhandene, exklusive Expression und die Höhe des FC. Eine Literaturrecherche hinsichtlich der Funktion der Gene in Knochenmetabolismus, Alterung/Seneszenz und Osteoporose wurde ebenfalls bewertet. Die totale Summe aus diesen Punkten dient als Richtwert der betreffenden Gene für deren mögliche Bedeutung für die Entstehung von Osteoporose. Pro Gen ist jeweils nur jenes Probeset mit der höchsten differentiellen Genexpressionsänderung angegeben. Gene, die in den Mikroarray-Daten zu hMSC-alt versus hMSC-K ebenfalls in die gleiche Richtung differentiell exprimiert waren, wurden mit x markiert. Gene, die in semi-quantitativen PCR-Ansätzen (Tab. 10) nicht nachgewiesen werden konnten (z.B. *Hells*), wurden aus der Liste heraus genommen. Rote Markierung: mindestens zweifach erhöhte Genexpression in hMSC-OP im Vergleich zu hMSC-K (FC ≥ 2); grüne Markierung: mindestens zweifach erniedrigte Genexpression in hMSC-OP im Vergleich zu hMSC-K (FC ≤ 0,5).

Das Gen *MAB21L2* ist ein Kandidat, der sowohl in hMSC-alt als auch hMSC-OP höher exprimiert wird, wie die Mikroarray-Hybridisierungen als auch semi-quantitative PCR-Analysen zeigten (Tab. 9, Tab. 11). Zur weiteren Überprüfung der Mikroarray-Daten wurden semi-quantitative PCR-Analysen mit einer höheren Anzahl an Populationen von hMSC-alt (N=8) und hMSC-OP (N=8) durchgeführt. Es zeigte sich erneut ein signifikanter Unterschied in der *MAB21L2*-Expression zwischen hMSC-K aus Spendern mittleren Alters und hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten hohen Alters mit einer relativen Genexpressionsänderung von 2,67 (Abb. 34). Eine 2,03fach höhere Expression von *MAB21L2* in hMSC-OP konnte auch im Vergleich zu hMSC-alt beobachtet werden. Der Unterschied zwischen hMSC-K und hMSC-alt ist weniger eindeutig mit einer Änderung von 1,32, dennoch ist ein Trend zu erkennen.

Tendenziell können die Mikroarray-Ergebnisse bestätigt werden: *MAB21L2*-Expression erhöht sich in hMSC aufgrund des Alters der Spender, ist jedoch in Osteoporose-Patienten nochmals weiter erhöht. Dieses Beispiel zeigt, dass ein von vorn herein absoluter Ausschluss der Alters-assoziierten Gene aus den Daten zu osteoporotischen hMSC demnach nicht ratsam wäre.

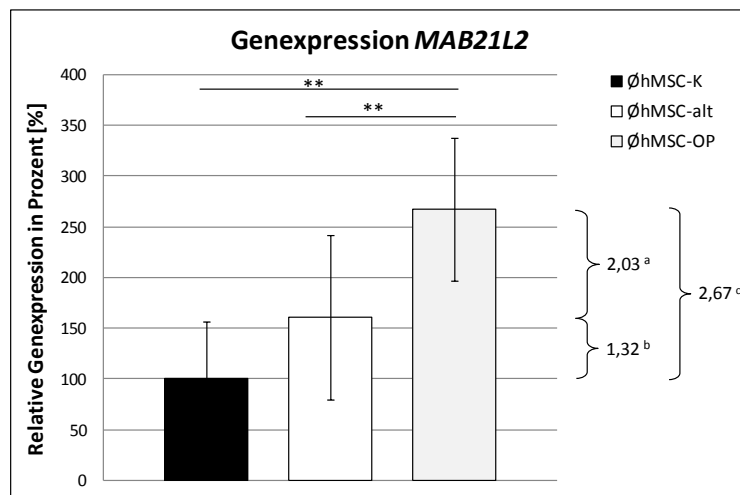


Abb. 34 Densitometrische Auswertung der semi-quantitativen PCR zur *MAB21L2*-Genexpression in hMSC aus Spendern mittleren Alters, älteren und Osteoporose-Patienten. Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Genexpressionsstärke von *MAB21L2* in hMSC-K (N=9, Spenderalter  $\bar{x}$  47,5±3,32 Jahre), hMSC-alt (N=9, Spenderalter  $\bar{x}$  76,67±5,87 Jahre) und hMSC-OP (N=8, Spenderalter  $\bar{x}$  83,88±5,87 Jahre) wurden nach Normalisierung auf das Haushaltsgen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) ermittelt. Angegeben sind die Standardabweichungen und die relativen Genexpressions-änderungen: <sup>a</sup> =  $\bar{x}_{\text{hMSC-OP}}/\bar{x}_{\text{hMSC-alt}}$ , <sup>b</sup> =  $\bar{x}_{\text{hMSC-alt}}/\bar{x}_{\text{hMSC-K}}$  und <sup>c</sup> =  $\bar{x}_{\text{hMSC-OP}}/\bar{x}_{\text{hMSC-K}}$ . Die Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test bestimmt: \*\* p < 0,001.

### 5.3.2 Sclerostin – prämaturne Expression in hMSC

In den Mikroarray-Analysen zeigte sich, dass *SOST* – das Gen des Proteins Sclerostin – in hMSC-OP aus Spendern mit Osteoporose (Alter  $\bar{x}$  = 86,2±5,89) 7,3-fach höher exprimiert wird als in den Kontrollzellen (hMSC-K, Alter der Spender:  $\bar{x}$  = 57,5±9,56) (Tab. 17). Da in diesem Fall die Spender der osteoporotischen hMSC im Durchschnitt 28,7 Jahre älter waren als die Spender der Kontrollzellen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *SOST* aufgrund des Alters und nicht aufgrund der Osteoporose ansteigt. Aus diesem Grund wurden weitere PCR-Analysen mit einer größeren Anzahl an hMSC-OP-Populationen (N=8) und hMSC-alt-Populationen (N=9) aus Spendern vergleichbaren Alters durchgeführt, wobei bei den Spendern der hMSC-alt keine Osteoporose bekannt war (Abb. 35). Es zeigt sich sehr deutlich, dass trotz Spendervariabilitäten *SOST* in hMSC-OP generell höher und in mehreren Zellpopulationen exprimiert wird als in hMSC-alt. Die hMSC aus Spendern mittleren Alters weisen bis auf 3 Populationen keine *SOST*-Expression auf.

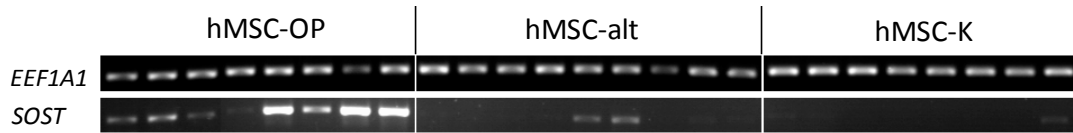


Abb. 35 Semi-quantitative PCR zur *SOST*-Expression in hMSC aus Spendern mittleren Alters, älteren und Osteoporose-Patienten. Komplementäre DNA-Proben von hMSC-K (Spenderalter  $\bar{\varnothing}$  43,25  $\pm$  4,59 Jahre), hMSC-alt (Spenderalter  $\bar{\varnothing}$  = 72,55 $\pm$ 4,90 Jahre) und hMSC-OP (N=8, Spenderalter  $\bar{\varnothing}$  = 82,63 $\pm$ 9,02 Jahre) wurden mit Primern zu *SOST* (Sclerostin) und *EEF1A1* analysiert.

Um zu testen, ob die erhöhte *SOST*-Expression Einfluss auf die Differenzierungskapazität der Zellen hat, wurden willkürlich 3 hMSC-Populationen (Alter der Spender:  $\bar{\varnothing}$  = 81,33 $\pm$ 5,69 Jahre) und 3 hMSC-alt-Populationen (Alter der Spender:  $\bar{\varnothing}$  = 78,3 $\pm$ 3,79 Jahre) aus Spendern vergleichbaren Alters ausgewählt. Die Zellen wurden 4 Wochen lang osteogen differenziert und die Mineralisierung mittels Alizarin Rot S Färbung nachgewiesen (Abb. 36B). Es zeigte sich, dass alle Population im osteogenen Differenzierungsmedium differenzierte, jedoch unterschiedlich stark. Starke Mineralisierung konnte in hMSC650 detektiert werden, während die beiden anderen hMSC-alt-Populationen nur schwach mineralisierten. Bei den hMSC-OP wiesen alle drei Populationen schwache bis leichte Mineralisierung auf. Nach PCR-Analysen stellt sich heraus, dass nur eine hMSC-OP-Population *SOST* stark exprimiert, eine nur schwach und die dritte keine *SOST*-Expression aufwies (Abb. 36A). In den hMSC-alt-Kontrollzellen wurde jedoch ebenfalls *SOST*-Expression in allen 3 hMSC-Population festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen *SOST*-Expression und Mineralisierungsgrad war nicht ersichtlich.

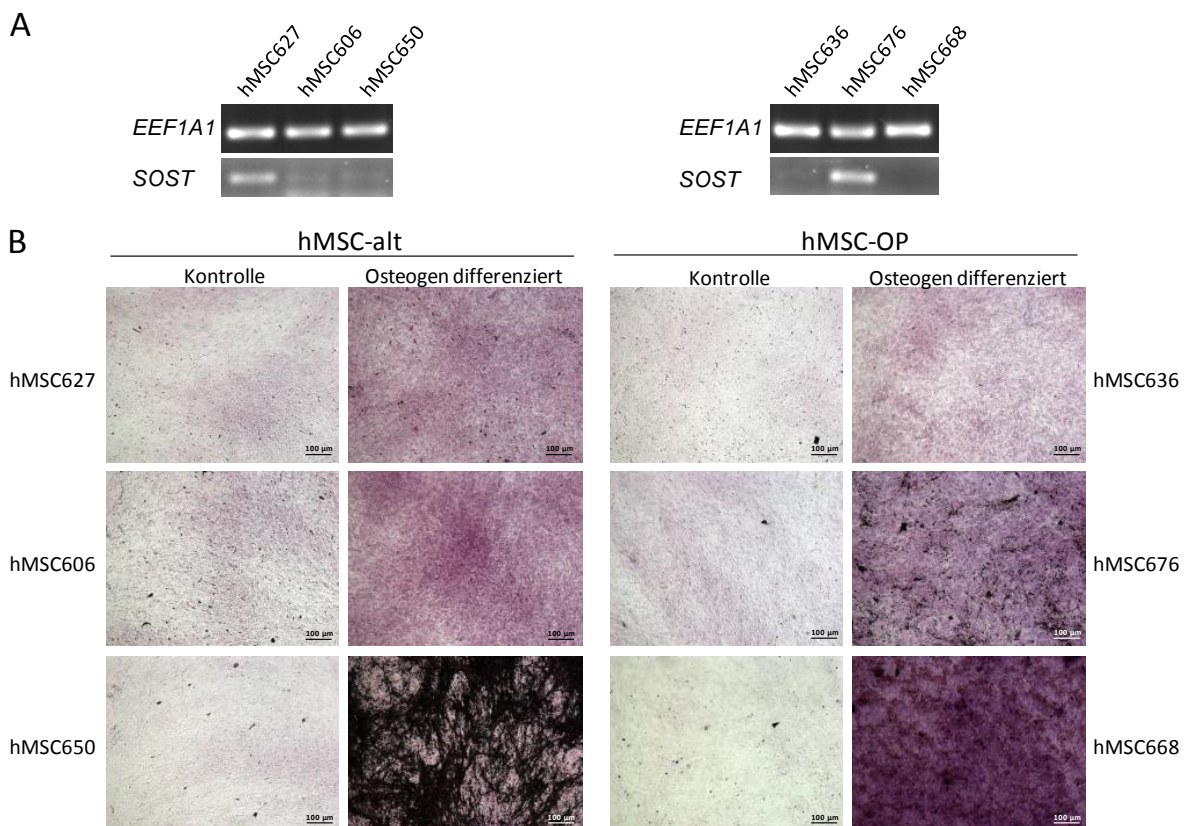


Abb. 36 Osteogene Differenzierung von hMSC-OP und hMSC-alt. 3 hMSC-Populationen (Alter der Spender:  $\bar{\varnothing}$  = 81,33 $\pm$ 5,69 Jahre) und 3 hMSC-alt-Populationen (Alter der Spender:  $\bar{\varnothing}$  = 78,3 $\pm$ 3,79 Jahre) in P1 wurden 4 Wochen in osteogenem Medium bzw. Expansionsmedium (Kontrolle) kultiviert. A: Semi-quantitative PCR-Analyse der hMSC in P1 mit Primern für *SOST* (Sclerostin) und *EEF1A1*. Alle PCR-Produkte liefen auf einem Agarosegel und wurden mit ein und derselben Belichtungszeit und -stärke aufgenommen. B: Alizarin Rot S-Färbung der differenzierten Zellen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Systembiologie versus statistische Aufarbeitung der Mikroarray-Daten

In der vorliegenden Arbeit musste ein Kompromiss zwischen der errechneten Signifikanz der Mikroarray-Daten und der Variabilität der individuellen Systembiologie geschlossen werden, da das Setzen einer hohen Stringenz den Verlust möglicher systembiologischer Zusammenhänge bedingte. Genprodukte, die statistisch eine zu hohe Streuung aufwiesen, wurden nicht in die anschließenden, systembiologischen Auswertungen der SAM-Ergebnisse einbezogen.

In Abb. 9 diente der NOTCH-Signalweg zur Veranschaulichung und soll im Folgenden repräsentativ für die gesamten Daten der SAM-Analysen stehen. Die Heatmap zeigt, dass durch Setzen von „cut-offs“ (1,5fache Genexpressionsänderung,  $q < 10\%$ ) 65 NOTCH-relevante Genprodukte verloren gingen. Nur die übrig gebliebenen, signifikanten 28 von insgesamt 93 Genprodukten wurden letztendlich in allen darauf folgenden, systembiologischen Untersuchungen verwendet.

Eine noch stringenter Betrachtung (2fache Genexpressionsänderung,  $q < 10\%$ ) resultierte sogar in nur 20 Probesets, die kaum mehr Varianzen in der Expressionsstärke aufwiesen und dadurch für sehr hohe Signifikanz sprachen.

Je höher die Stringenz gesetzt wurde, desto mehr systembiologische Information ging jedoch verloren. Bei einem  $q$ -Wert  $< 1\%$  und einer 1,5fachen Genexpressionsänderung würden z.B. nur noch 12 von den ursprünglichen 93 NOTCH-relevanten Genprodukten übrig bleiben (siehe Anhang Tab. 19). Übertragen auf die gesamte SAM hätten sich dadurch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse reduziert und eine systembiologische Auswertung schwierig gestaltet.

Auf der anderen Seite würde das Aufweichen der Stringenz dazu führen, dass die Signifikanz der Ergebnisse reduziert wird. In Abb. 9B wurde der  $q$ -Wert ohne Beachtung des FC auf  $< 20\%$  gesetzt, und es zeigten sich vor allem im mittleren Bereich der Heatmap noch deutliche Varianzen in der Stärke der Hybridisierungssignale innerhalb einer hMSC-Gruppe. Dieser mittlere Bereich enthielt vor allem Genprodukte mit FC nahe 1, also ohne signifikante Genexpressionsänderung (siehe Anhang Tab. 19).

In der vorliegenden Arbeit wurden nur differentiell exprimierte Genprodukte mit einer mindestens 1,5fachen Genexpressionsänderung ( $FC < 0,667$  bzw.  $FC > 1,5$ ) und einem  $q$ -Wert von  $< 10\%$  für die systembiologischen Analysen verwendet. Diese Stringenz wies am Beispiel von NOTCH-relevanten Genprodukten zwar einige, wenn auch geringe Varianzen zwischen den hMSC-Populationen auf, reduzierte die systembiologische Aussagekraft aber nicht so extrem wie stringenter Betrachtungsweisen. In Abb. 9 konnte gezeigt werden, dass die Genexpressionsänderung umso höher ist, je geringer der  $q$ -Wert gesetzt wird (Vergleich B und C), da ein hoher FC auf eindeutigere Änderungen schließen lässt und die Möglichkeit eines Zufallsergebnisses reduziert.

Die Evaluierungen der SAM-Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass Genexpressionsänderungen, die in den Mikroarray-Analysen  $q$ -Werte bis  $10\%$  aufwiesen auch mittels semi-quantitativer PCR bestätigt werden konnten (siehe Abschnitte 5.1.2.3, 5.1.3.3 und 5.1.4.3). All dies bekräftigt die Signifikanz des gewählten „cut-offs“.

Dass aufgrund der Stringenz systembiologische Informationen verloren gingen, ist jedoch nicht auszuschließen, sollte aber aufgrund der Wahl eines relativ geringen Mindestwertes an Genexpressionsänderung von 1,5fach gering ausfallen.



## 6.2 *In-vivo*-Alterung

### 6.2.1 *In-vivo*-Alterung verändert das Genexpressionsmuster in hMSC

Der Vergleich der Mikroarray-Daten von hMSC aus älteren Spendern (hMSC-alt,  $\bar{x}$  81,75 $\pm$ 4,86 Jahre, N=4) mit Kontrollzellen aus Spendern mittleren Alters (hMSC-K,  $\bar{x}$  57,6  $\pm$  9,56 Jahre, N=5) mit Hilfe von SAM erbrachte einen großen Unterschied im Genexpressionsmuster obwohl die Donoren durchschnittlich nur 25,15 Jahre Altersunterschied aufwiesen. Erstaunlich viele Genprodukte (3381) sind mindestens 1,5fach geringer in hMSC-alt exprimiert als in hMSC-K, und 1429 Genprodukte sind höher exprimiert nach *in-vivo*-Alterung der hMSC.

Die Analyse der *in-vivo*-Alterung von hMSC wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe durchgeführt (Wagner et al. 2009) und dabei wurden deutlich weniger differentiell exprimierte Probesets gefunden als in der vorliegenden Arbeit, obwohl der Altersunterschied zwischen den Spendern deutlich höher lag (21-25 Jahre versus 80-92 Jahre, jeweils N=4). Jedoch wurde eine andere Art der statistischen Auswertung der Mikroarray-Daten verwendet als SAM. In der vorliegenden Arbeit wurde die Signifikanz der differentiellen Genexpression festgesetzt mit  $FC > 1,5$  bzw.  $FC < 0,667$  und einem q-Wert  $< 10\%$ . Des Weiteren wurden alle Probesets, die mindestens in einer der beiden Vergleichsgruppen (hMSC-alt oder hMSC-K) zu 50% „present“ waren, einbezogen. Die Arbeitsgruppe um Wagner hat nur jene Probesets analysiert, die in mindestens 50% der Zellen beider Vergleichsgruppen ein Hybridisierungssignal zeigten. Auch der q-Wert wurde von dieser Arbeitsgruppe unabhängig vom FC auf stringendere 1% gesetzt.

Für die Kultivierung der hMSC aus Hüftköpfen wurde ebenfalls ein anderes Kulturmedium als in der vorliegenden Arbeit verwendet, wie in Wagner et al., 2008 beschrieben und in Abschnitt 6.3.3 näher erklärt. Des Weiteren wurde RNA aus P1 für die Hybridisierungen verwendet, Wagner et al. verwendeten 2009 RNA aus P2, die Zellen durchliefen somit zweimal eine Trypsinierung.

All diese Unterschiede lassen darauf schließen, dass Kultivierungsmethoden der Zellen, sowie Art und Weise der Auswertung der Mikroarray-Daten unterschiedliche Ergebnisse liefern kann. Die Kultivierungsdauer und die Häufigkeit von Trypsinbehandlungen und Neuaussaat könnten ebenfalls Einfluss auf das Genexpressionsmuster ausüben.

Die geringe Stringenz für die Auswertung der Mikroarraydaten in dieser Arbeit wurde gewählt, um möglichst viele funktionelle Cluster für die Systembiologische Analyse mittels Gostat detektieren zu können, und um zu vermeiden, dass wichtige Signalwege und funktionelle Cluster aufgrund zu hoher Stringenz nicht detektiert werden. Für die Kandidatengensuche (siehe unten) wurden stringendere Bedingungen angesetzt, um eindeutige Kandidatengene herausfiltern zu können, bei denen sich eine funktionelle Untersuchung lohnt.

#### 6.2.1.1 Reproduzierbare Genexpressionsänderungen trotz Spendervariabilität

Die Arraydaten wurden mittels semi-quantitativer PCR evaluiert, indem RNA von 4 hMSC-alt-Populationen verwendet wurde, die auch in den Mikroarray-Analysen Verwendung fanden. Da von den Kontrollzellen keine RNA mehr vorhanden war, wurde RNA aus hMSC von 11 anderen Spendern mittleren Alters verwendet. Diese Spender waren durchschnittlich nochmals 7 Jahre jünger als jene, deren hMSC für die Mikroarray-Hybridisierungen heran gezogen wurden. Es zeigte sich, dass die Genexpressionsänderung nur in 58,33% der 12 untersuchten Gene tendenziell den SAM-Ergebnissen entsprach (Tab. 9).

Alterung ist jedoch ein komplexer Prozess und unterliegt unterschiedlichsten Einflüssen. Die Ergebnisse der biologischen Evaluierung könnten aufgrund der Verwendung von nur 4 hMSC-alt-Populationen, oder aufgrund von unbekanntem Grunderkrankungen der Spender der hMSC-K variabel ausgefallen sein.

Die hohen Standardabweichungen könnten ebenfalls auf unbekannte Krankheiten der Patienten zurückzuführen sein (Abb. 12). Andere Arbeitsgruppen zeigten bereits hohe Spendervariabilität bei der Analyse von Genexpressionsmustern aus Zellen verschiedener Donoren (Wagner et al. 2009;

Wagner et al. 2010). Diese spenderabhängigen Unterschiede sind ebenfalls in der Heatmap zu den Mikroarraydaten auffällig (Abb. 13). Das Expressionsmuster der *MAP4*-Probesets ist sehr unterschiedlich, daher konnte das Gen auch nicht als differentiell exprimiert in der PCR-Analyse detektiert werden. Die erniedrigte *MMP3*-Expression in hMSC-alt konnte nicht nachgewiesen werden, da nur ein einzelner Spender der hMSC-K-Populationen (hMSC296) *MMP3* sehr hoch exprimiert. Die hohe Expression des Gens ist jedoch nicht universell, wie die PCR-Analysen letztendlich zeigten.

*TP53* ist laut der SAM-Ergebnisse geringer in hMSC-alt exprimiert. Die Heatmap zeigt jedoch, dass vor allem hMSC353 der hMSC-K-Gruppe sehr stark *TP53* exprimiert, während das Expressionslevel aller anderen hMSC-Populationen relativ einheitlich ist. Mittels semi-quantitativer PCR konnte nachgewiesen werden, dass *TP53* jedoch in hMSC aus älteren Personen höher exprimiert wird. Dies ist konform mit Literaturbefunden zu *in-vivo*-gealterten hMSC und dem einhergehenden, erhöhtem *TP53*-Proteinlevel (Stolzing and Scutt 2006). Es ist anzunehmen, dass auch die Patienten der Kontrollgruppe, die für Mikroarray-Analysen verwendet wurden, sehr hohe Spendervariabilitäten aufwiesen, besonders ersichtlich bei Genprodukten, die in hMSC-alt geringer exprimiert werden als in hMSC-K (Abb. 13).

Wagner et al. zeigten 2009, dass die Unterschiede zwischen Spendern hohen Alters (80-92 Jahre) sehr deutlich sind zu Spendern geringen Alters (21-25 Jahre). Die in dieser Arbeitsgruppe untersuchten 3 hMSC-Populationen mittleren Alters (50-55 Jahre) wiesen jedoch ebenfalls hohe Spendervariabilitäten auf. Es ist anzunehmen, dass diese Altersgruppe aufgrund des Eintritts in die Menopause zu individuellen Zeitpunkten zumindest bei Frauen das Genexpressionsmuster von hMSC stark beeinflussen kann, da ab diesen Zeitpunkt starke Veränderungen des Knochenmetabolismus stattfinden (Duque 2008; Sahin et al. 2011). Dies könnte einen Grund für die starke Heterogenität im Genexpressionsmuster in diesen hMSC-Populationen darstellen.

Erste Eindrücke vermittelte diese Analyse der *in-vitro*-Alterung mittels hMSC-Kontrollen aus Spendern mittleren Alters dennoch. Um eindeutiger Ergebnisse zu erzielen, müssten hMSC aus Spendern deutlich jüngeren Alters (< 20 Jahre) isoliert werden. Dies war aufgrund mangelnder Patientenverfügbarkeit für diese Arbeit jedoch nicht möglich.

#### 6.2.1.2 Eingeschränkte Funktion von *in-vivo*-gealterten hMSC

Die Einteilung der differentiell exprimierten Genprodukte in GO-Gruppen erbrachte, dass der Ablauf des MAPK- und JNK-Signalweges in hMSC aus älteren Spendern gestört ist (Abb. 11). Überrepräsentativ viele Gene, die für die positive Regulation dieser Signalwege beitragen (siehe Anhang Tab. 21), sind in hMSC-alt geringer exprimiert. Der MAP-Kinase-Signalweg, vor allem jener über MEKK2 (*MAP3K2*) aktiviert wiederum den JNK-Signalweg. Letzterer wird aber u.a. auch über den nicht-kanonischen WNT-Signalweg eingeleitet (Almeida et al. 2005) und die geringere Expression von *WNT5B* (Tab. 13) deutet auf eine Reduktion dieses WNT-Signalweges hin, da die autokrine Stimulation verloren geht (Hardy et al. 2008). Auch der canonische WNT-Weg scheint gestört, da LRP5 – der Corezeptor für WNT-Moleküle – im Alter auf mRNA-Ebene geringer exprimiert wird. Dies kann letztendlich zu geringerer Knochenformation führen, aufgrund von reduzierter Proliferation und Differenzierungskapazität der hMSC durch Störungen im WNT-Signalweg (Kato et al. 2002; Baksh and Tuan 2007). Die WNT1-induzierbaren Gene *WISP1* und *WISP3* (Brigstock 2003) sind ebenfalls geringer exprimiert, dagegen werden beta-Catenin (*CTNNB1*) und die Gene der Rezeptoren *FZD7* und *FZD6* im Alter höher exprimiert. Dies könnte einen möglichen „Rescue“-Versuch der Zellen darstellen, oder deutet auf eine Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges hin, nachdem der nicht-kanonische reduziert vorliegt.

Da die Aktivierung von MAPK-Signalkaskaden häufig als Antwort auf zellulären Stress oder DNA-Schädigung folgt, könnte eine reduzierte Genexpression der involvierten Proteine zu einer reduzierten Response auf diese Signale in gealterten hMSC führen (Fanger et al. 1997).

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass in *in-vivo*-gealterten hMSC ein starres Aktin-Cytoskelett vorliegt und somit eine reduzierte Fähigkeit zur Migration. Aktin-Filamente werden durch Polymeri-

sation von Aktin-Untereinheiten an einem Ende der Filamente gebildet. Gleichzeitig erfolgt die Depolymerisation am anderen Ende der Aktin-Filamente, wodurch das Aktin-Cytoskelett eine hohe Dynamik aufweist. Diese Dynamik scheint gestört, da nach GOstat-Analysen gezeigt werden konnte, dass Gene für die Bildung der Aktinfilamente überrepräsentativ häufig höher exprimiert werden, Gene für Proteine der Depolymerisation hingegen geringer exprimiert werden. Die Funktion des höher exprimierten Gens zu EPLIN (*LIMA1*) wird als essentiell für die Stabilisierung von Aktin-filamenten beschrieben (Han et al. 2007), während die geringer exprimierten Proteine Gelsolin (*GSN*), Supervillin (*SVIL*) und CAPG essentiell für die Migration sind (Anhang Tab. 21) (Cooper and Schafer 2000; De Corte et al. 2004; Crowley et al. 2009). Ein weniger dynamisches Aktin-Cytoskelett wurde für MSC aus gealterten Ratten im Vergleich zu jungen Ratten bereits beschrieben (Kasper et al. 2009).

Überrepräsentativ häufig konnten auch geringer exprimierte Gene der GO-Gruppe Spindel zugeordnet werden. Die gleichzeitig verringerte Expression von vielen Cyclinen (Tab. 13) deutet auf geringere mitotische Aktivität in *in-vivo*-gealterten hMSC hin (siehe auch 6.3.4) (Kong 2003).

Gene, die für Präosteoblasten spezifisch sind – *IBSP*, *RUNX2* und *COL1A1* (Komori 2010) – sind in gealterten hMSC geringer exprimiert. Da hMSC zumindest *in-vivo* in ihrer Nische asymmetrische Teilungen durchlaufen (Kassem and Abdallah 2008), könnte dies dafür sprechen, dass hMSC auch in Kultur Mischpopulationen bilden aus Stammzellen und teilweise differenzierten Zellen (Fuchs et al. 2004). In hMSC aus älteren Patienten ist diese Differenzierungskapazität z.T. gestört, wie die geringere Expression von Präosteoblasten-Markern im Vergleich zum Genexpressionsmuster der hMSC jüngerer Spender (hMSC-K) zeigt.

Nicht nur der WNT-Signalweg, sondern auch der BMP-Signalweg ist in hMSC-alt betroffen. Der noch wenig bekannte Antagonist zu BMP4 – MAB21L2 – ist auf mRNA-Ebene im Alter höher exprimiert, ebenso SMAD1. MAB21L2 wirkt als Transkriptionsrepressor über die Bindung von SMAD1, wodurch die Signalgebung von BMP4 über SMAD1 unterbunden wird (Baldessari et al. 2004). Das Gen eines weiteren Inhibitors des BMP-Signalweges – Noggin (*NOG*) – wird höher exprimiert, während *GREM1* geringer exprimiert wird. Die Signalgebung über BMPs aktiviert u.a. den MAPK-Signalweg (Miyazono 1999) und ist entscheidend für die Osteoblastendifferenzierung und -funktion, sowie die Regulation der Osteoklastogenese (Rawadi et al. 2003; Canalis 2009).

Die Expression von Wachstumsfaktoren ist ebenfalls betroffen, *VEGFA* und *VEGFB*, sowie *TGFB2* und die Rezeptoren *TGFBR1* und *TGFBR2* sind geringer exprimiert. Auch der FGF-Signalweg scheint betroffen zu sein, während zumindest *FGF1* geringer exprimiert im Alter vorliegt, wird die Expression von *FGFR3* induziert und von *FGFR2* erhöht. Diese erhöhte Expression der Rezeptoren könnte auf einen „Rescue“-Versuch der Zellen schließen lassen.

Zusammenfassend kann anhand der Genexpressionsänderungen aufgrund von *in-vivo*-Alterung angenommen werden, dass sich das osteogene Differenzierungspotential und die Proliferation in hMSC aus älteren Spendern negativ verändert haben. Differentielle Genexpression in vielen, für die Knochenformation entscheidenden Signalwegen führen zu dieser Schlussfolgerung. Auch die Migrationsfähigkeit ist in gealterten Stammzellen reduziert.

### 6.3 Seneszenz

Mesenchymale Stammzellen werden in der regenerativen Medizin immer häufiger für therapeutische Zwecke im Sinne von Transplantationen eingesetzt. Zu diesem Zweck müssen die Zellen jedoch zuvor in Kultur genommen und expandiert werden. *In-vitro*-Kultivierung kann die Zellen aber verändern und über einen längeren Zeitraum auch zur Seneszenz führen, wodurch der therapeutische Effekt zunichte gemacht werden würde. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen neben den bereits bekannten Seneszenz-Markern weitere Kandidatengene speziell für seneszente hMSC zu finden. Die Analyse der Genexpression hinsichtlich Markergenen für Seneszenz gilt als

eine der sichersten Methoden, Seneszenz in hMSC frühzeitig detektieren zu können (Wagner et al. 2010). Dies dient dem Zweck, hMSC in Zukunft vor ihrem therapeutischen Einsatz zuverlässig auf ihre Verwendbarkeit hin testen zu können.

### 6.3.1 *In-vitro*-Alterung von hMSC ist ein geeignetes Seneszenz-Modell

Um das Genexpressionsmuster von seneszenten hMSC mit nicht-seneszenten hMSC vergleichen zu können, wurden die Zellen bis zum Proliferationsstopp *in-vitro* kultiviert. Dabei nahm die Proliferationsrate kontinuierlich ab. Insgesamt durchliefen die Zellen in den Passagen P1 bis Px-1 (vorletzte, noch proliferierende Passage) 11-20 Populationsverdopplungen (Abb. 24). Die Populationsverdopplung zwischen Isolationszeitpunkt und P1 konnte nicht ermittelt werden, Wagner et al., 2008, setzten für diesen Zeitraum geschätzte 7-9 Populationsverdopplungen fest. In der seneszenten Passage Px proliferierten die Zellen kaum mehr. Wenn in Px also eine geschätzte Populationsverdopplung von 1 festgelegt wird, dann durchliefen die hMSC während der *in-vitro*-Alterung 19-30 Populationsverdopplungen. Dies stimmt überein mit den Expansionsexperimenten anderer Arbeitsgruppen (Stenderup et al. 2003; Wagner et al. 2008). Ein Unterschied in der Proliferationsgeschwindigkeit der hMSC aufgrund des Spenderalters konnte nicht festgestellt werden. Jedoch unterschieden sich die Spender nur maximal um 24 Jahre, eine zu geringe Spanne, um den Effekt des *in-vivo*-Alters zu untersuchen.

Dass die Zellen in Px wirklich seneszent waren, konnte nach einem Vergleich von Zellen in P1 anhand der vergrößerten, breiteren Form der Zellen, sowie positiver SA- $\beta$ -Gal-Färbung bewiesen werden (Abb. 26C, Abb. 27C) (Sethe et al. 2006; Wagner et al. 2008; Wagner et al. 2010). Ein weiterer, anerkannter Marker für Seneszenz ist die Expression von P16 (Bringold and Serrano 2000), die in seneszenten Zellen auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen und immunocytochemischer Färbung gezeigt werden konnte (Abb. 25).

Die anschließenden Mikroarray-Untersuchungen der hMSC-seneszent (siehe 6.3.3) zeigten zudem, dass 4 der 5 als universelle Seneszenz-Marker beschriebenen Gene auch in dieser Arbeit differentiell exprimiert vorliegen (Wagner et al. 2010): *CDKN2A* (P16) und *ARHGAP29* (oder *PARG1*) sind aufgrund der Seneszenz höher exprimiert, *PTN* und *MCM3* geringer (Tab. 13).

Alles in allem ist die *in-vitro*-Alterung von hMSC als Modell für Seneszenz geeignet. Die für Mikroarray-Analysen verwendeten Zellen befanden sich demnach definitiv in einem seneszenten Zustand, im Gegensatz zu den Kontrollzellen in P1.

### 6.3.2 hMSC zeigen in Kultur bereits früh Anzeichen von Seneszenz

Wie die Proliferationsuntersuchungen zeigten (Abb. 24), nahm die Geschwindigkeit und die Populationsverdopplung ca. ab der Hälfte der Expansionszeit ab. Dies spricht für eine Akkumulation von nicht mehr proliferierenden Zellen ab diesem Zeitpunkt.

Ob hMSC bereits früher als in Px Anzeichen von Seneszenz aufweisen, wurde auf mRNA-Ebene, sowie auf Protein-Ebene mittels SA- $\beta$ -Gal-Bestimmung untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Gen des Seneszenzmarkers P16 (Bringold and Serrano 2000) – *CDKN2A* – bereits in mittleren Passagen exprimiert wird, unter anderem sogar stark (Abb. 31: hMSC622, hMSC625). Keine Expression konnte in frühen Passagen detektiert werden, und in 2 von 5 hMSC-Populationen ist die *CDKN2A*-Expression in Px am höchsten.

Endoh et al. beschrieben 2009, dass die Expression von „pregnancy specific beta-1-glycoproteins“ – Plazenta-Proteine, die eigentlich erhöht im Blutserum von Schwangeren gefunden wurden – auch in seneszenten Fibroblasten ansteigt. Die mRNA von 8 der 10 untersuchten PSG lag erhöht in den seneszenten Fibroblasten vor, darunter auch *PSG5* und *PSG1*. In der vorliegenden Arbeit wurde die

Expression von *PSG5* während der *in-vitro*-Alterung von hMSC als zweiter Seneszenzmarker auf mRNA-Ebene untersucht. Es zeigte sich, dass in 3 von 5 hMSC-Populationen *PSG5* bereits sehr stark in P3 bzw. P4 exprimiert wird (Abb. 31). Die Expression nimmt mehr oder minder gleichmäßig, jedoch nur noch gering bis zu Px zu.

Die SA- $\beta$ -Gal-Färbungen (Abb. 26C, Abb. 27C) zeigen, dass die Zellen in der letzten Passage Px eine stark veränderte Morphologie aufweisen und SA- $\beta$ -Gal-positiv sind. Jedoch zeigt sich ebenfalls, dass auch Passagen im mittleren Abschnitt der Kultivierungszeit SA- $\beta$ -Gal-positive Zellen aufweisen und im Falle von hMSC614 sogar positive hMSC in P1 zu finden sind. Diesen SA- $\beta$ -Gal-positiven Passagen (Bsp. hMSC625 P5, Abb. 27C) folgen oft Passagen mit kaum positiven Zellen (Bsp. hMSC625 P6, Abb. 27C). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass im Laufe der Passagierung mehr und mehr seneszente Zellen akkumulieren und somit ein heterogener Zellrasen aus noch proliferierenden und nicht mehr proliferierenden Zellen entsteht. Darauf lassen auch die Daten von Wagner et al. 2008 schließen. Während der Passagierung scheinen die seneszenten Zellen verloren zu gehen, nur proliferierende Zellen adhären möglicherweise mit der Oberfläche der Kulturflaschen, wodurch in der folgenden Passage keine seneszenten Zellen mehr zu finden sind. Dass die hMSC614 (Spenderalter: 53 J.) in P1 bereits SA- $\beta$ -Gal-positive Zellen aufweisen – zumindest mehr als hMSC625 P1 (Spenderalter: 70 J.) – scheint unabhängig vom Spenderalter zu sein, da der Spender von hMSC614 17 Jahre jünger ist als der Donor von hMSC625. Auch wird SA- $\beta$ -Gal-Färbung für die Untersuchung der *in-vivo*-Alterung als ungeeignet befunden (Severino et al. 2000) und Stenderup et al. konnten 2003 keinen Unterschied in der SA- $\beta$ -Gal-Expression zwischen hMSC-Populationen aus Spendern variierenden Alters feststellen.

Die quantitative SA- $\beta$ -Gal-Methode nach Vacanti et al., 2005, lieferte zur SA- $\beta$ -Gal-Färbung widersprüchliche Befunde (Abb. 26B, Abb. 27B). Messung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität in 10  $\mu$ g Gesamtprotein-Lysat ergab, dass die SA- $\beta$ -Gal-Expression im Verlauf der *in-vitro*-Alterung einen Bogen vollführt, mit der höchsten Aktivität in mittleren Passagen und keinem Unterschied zwischen P1 und Px. Aufgrund der eindeutigen Befunde der oft als Nachweis von Seneszenz verwendeten SA- $\beta$ -Gal-Färbung (Dimri et al. 1995; Stenderup et al. 2003; Izadpanah et al. 2008; Wagner et al. 2008) werden die Ergebnisse des SA- $\beta$ -Gal-Assays nicht weiter in die Analyse einbezogen.

### 6.3.3 Seneszenz verändert das Genexpressionsmuster in hMSC

Das Genexpressionsmuster von seneszenten hMSC wurde auch von Wagner et al., 2008 untersucht, jedoch wurden die Zellen von dieser Arbeitsgruppe unter anderen Kulturbedingungen expandiert. Abgesehen vom Medium (DMEM-LG und 40% MCD210), unterschied sich die Kultivierung auch dahingehend, dass Wagner et al. Fibronektin-beschichtete Kulturflaschen verwendeten, sowie den Serumgehalt auf 2% FCS reduzierten und PDGF-bb, sowie EGF als Wachstumsfaktoren zugaben. Wachstumsfaktoren können in Zellen über die Einleitung diverser Signalkaskaden zu oxidativem Stress und Seneszenz führen. Vor allem die Einleitung des RAS-Signalweges – u.a. aktiviert durch die Rezeptoren für EGF und PDGF – ist für diese Entwicklung entscheidend (Serrano et al. 1997; Eswarakumar et al. 2005; Ramos 2008). Wagner et al. zeigten 2008 selbst, dass hMSC ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren deutlich länger kultiviert werden konnten, bis sie den Proliferationsstopp erreichten. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Serum-Entzug in hMSC unter Kultivierung mit osteogenen Stimuli Adipogenese induziert, im Gegensatz zu hMSC, die in 10% FCS osteogen differenziert wurden und erfolgreich mineralisierten (Ichikawa 2010). Die Konzentration an Serum – selbst xenogenem – ist somit entscheidend für den Erhalt der Funktion von hMSC in Kultur und könnte ebenfalls Einfluss auf die Expansion der Zellen ausüben.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Genexpressionsmuster seneszenter hMSC erneut untersucht, jedoch ohne Einfluss von zusätzlichen Mitogenen und unter Kultivierung mit 10% FCS. Des Weiteren wurden die Mikroarray-Analysen und SAM-Berechnungen mit jeweils 5 hMSC-Populationen durchgeführt; einer weitaus verlässlicheren Anzahl als Wagner et al. verwendeten (N=3).

### 6.3.3.1 Reproduzierbare Genexpressionsänderungen

Der Vergleich der Genexpressionsmuster von hMSC in P1 und hMSC in Px (hMSC-seneszent) erbrachte eine große Anzahl an Genprodukten, die mindestens 1,5fach höher bzw. niedriger in seneszenten hMSC exprimiert werden als in Zellen früher Passagen (Abb. 14). Es ist zu beobachten, dass deutlich mehr Genprodukte in hMSC-seneszent geringer exprimiert (2477) werden als höher (1284). Die Überprüfung der Mikroarray-Ergebnisse mittels semi-quantitativer PCR-Analyse zeigte, dass die differentielle Genexpression in 81,25% der untersuchten Gene bestätigt werden konnte. Dabei ist zu erwähnen, dass es sich bei den Mikroarray-Daten um andere hMSC-Populationen handelte als bei den PCR-Analysen, und das Ergebnis der Arrays demnach universell für seneszente hMSC gilt. Des Weiteren stammte die RNA für die Mikroarray-Hybridisierungen aus 9 verschiedenen Patienten. Nur von einer hMSC-Population (hMSC276) wurden Zellen in P1 als auch Px für die Analyse verwendet. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die *in-vitro*-Alterung von hMSC ein zuverlässiges, artifizielles Modellsystem für die Untersuchung der Seneszenz darstellt.

Die Heatmap der Mikroarray-Ergebnisse (Abb. 16) zeigt deutlich, dass jedoch Spendervariabilitäten zu beobachten sind, die auch in der PCR-Analyse auftreten (Tab. 10). Nur bei 11 von 32 untersuchten Genen konnte die differentielle Genexpression in allen 5 hMSC-Populationen detektiert werden. Oft jedoch erfüllten nur 3 von 5 hMSC-Populationen die Erwartungen aus den Mikroarraydaten.

Eine weitere Auffälligkeit stellt die exklusive Expression einiger Gene in P1 bzw. Px dar. Die Expression von *CDKN2A* oder *CDH1* (cadherin 1) z.B. wird ausschließlich in hMSC-seneszent (Px) induziert, während die Expression von *CA2* oder *FGFR2* in einigen hMSC-Populationen ausschließlich in P1 detektiert werden konnte. Diese Gene scheinen reprimiert zu werden. Ob aktiv oder aufgrund eingeschränkter Transkriptionsfähigkeit durch seneszenten Verlust der metabolischen Aktivität der Zellen (Cristofalo et al. 2004; Muller 2009), muss noch geklärt werden.

### 6.3.3.2 Eingeschränkte Funktion von seneszenten hMSC

Die mindestens 1,5fach differentiiell exprimierten Gene aufgrund von Seneszenz wurden einer GOstat-Analyse unterzogen und es zeigte sich, dass seneszente Zellen Defizite in der Proliferation und der Replikation aufweisen, da Gene für GO-Gruppen des Spindelaufbaus, der Mitose, der Mikrotubuli und der Replikationsgabel geringer exprimiert waren (Abb. 15). Diese Ergebnisse entsprechen jenen aus anderen Arbeitsgruppen (Izadpanah et al. 2008; Wagner et al. 2008).

Die nähere Betrachtung einzelner Gene zeigt (Tab. 13), dass vor allem die Expression von Genen der Cycline und CDC25-Proteine geringer in seneszenten Zellen vorliegt. Auch Gene, die bereits mit Seneszenz assoziiert wurden, sind differentiiell exprimiert. Insgesamt 6 Gene für PSG-Proteine, darunter *PSG5* sind höher exprimiert, ebenso weitere Seneszenzmarker (siehe auch 6.3.1), wie *CDKN1A*, das Gen für P21, einem Zellzyklusinhibitor (Kong 2003). Die PSG-Proteine können somit nicht nur in Fibroblasten (Endoh et al. 2009), sondern auch in hMSC zu den Markern für Seneszenz durch *in-vitro*-Alterung gezählt werden.

Des Weiteren konnten Hinweise für oxidativen Stress gefunden werden, durch erhöhte Expression von *SOD2* (superoxide dismutase 2, mitochondrial) und *TXNRD1* (thioredoxin reductase 1) (Ebert et al. 2006b; Lu and Holmgren 2009). Für einen Zustand von „inflammaging“ spricht die bis zu 50fach erhöhte Expression von *SAA1/SAA2*, den sogenannten Akute-Phase-Proteinen (siehe 6.5.1) (Dinarello 2006; Grolleau-Julius et al. 2009).

Auch die Migration scheint in diesen Zellen gestört zu sein, wie die reduzierte Expression von Hyaluronsynthasen (*HAS1* und *HAS2*) und *HMMR* (hyaluronan-mediated motility receptor) andeuten. Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix ist notwendig für die Migration von Zellen, und Tzeloz et al. konnten 2009 bereits die Abnahme der *HAS1*- und *HMMR*-Expression in UV-bestrahltem, gealtertem Hautgewebe dokumentieren. *HMMR* ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, der als essentiell für die Migration in Endothelzellen und Fibroblasten beschrieben wurde (Savani et al. 2001; Tolg et al. 2006). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen erniedrigter *HMMR*-Expression und

erhöhter P53-Expression auf Proteinebene festgestellt werden (Sohr and Engeland 2008). Die geringe Expression des Gens in *in-vitro*-gealterten hMSC ist somit als Seneszenz-Anzeichen zu betrachten. Marker für osteogene Differenzierung und Knochenaufbau, wie z.B. *SPP1*, *ALPL* oder *BGLAP* sind geringer exprimiert in den seneszenten Zellen (Narisawa et al. 1997; Komori 2010). Die verringerte Expression des Gens des Östrogenrezeptors *ESR1* könnte auf verringerte Response auf Östradiol in seneszenten hMSC schließen lassen (Riggs et al. 2000; Vanderschueren et al. 2004). Interessanterweise wird das Gen der Vitamin D3 25-Hydroxylase – *CYP2R1* – in hMSC-seneszent geringer exprimiert als in hMSC-K. Dies bedeutet zum einen, dass das Enzym nicht nur in der Leber exprimiert wird und dort Vitamin D3 in 25-(OH)D<sub>3</sub> umwandelt, sondern auch in den Stammzellen des Knochens, zumindest in frühen Passagen. Bisher war die lokale Expression von *CYP2R1* nur in Osteoblasten nachgewiesen (Ichikawa et al. 1995), und hMSC konnte bisher nur die Expression und enzymatische Wirkung der 1- $\alpha$ -Hydroxylase (*CYP27B1*) zugeschrieben werden (Zhou et al. 2010).

Zum anderen scheint aufgrund der Seneszenz *CYP2R1* geringer exprimiert zu werden, wodurch die lokale Produktion von 25-(OH)D<sub>3</sub> möglicherweise reduziert vorliegt, somit weniger 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> enzymatisch katalysiert werden kann. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gilt jedoch als Proliferationshemmer, der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus arretieren lässt (Artaza et al. 2010), so wie es in seneszenten Zellen ebenfalls zu beobachten ist. Eine reduzierte 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Bildung in hMSC-seneszent, deren Proliferationsstopp und Eintritt in die Seneszenz nachgewiesen wurden, scheinen daher widersprüchliche Befunde darzustellen. Auf der anderen Seite konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Seneszenz von hMSC in Kultur nicht fördert (Klotz et al. submitted). Dies widerspricht zwar einigen anderen Literaturbefunden, würde aber die hier vorliegenden Mikroarray-Ergebnisse in so weit unterstützen, dass der Zellzyklusarrest auf einen Vitamin D3-unabhängigen Wegen in hMSC-seneszent eingeleitet wurde. Um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, muss jedoch noch auf Proteinebene nachgewiesen werden, ob eine geringere Expression von *CYP2R1* letztendlich tatsächlich zu einer verringerten Produktion von 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> führt.

Senescente hMSC scheinen keinen Einfluss auf die Osteoklastogenese auszuüben. Im Gegenteil sind *PTGS2* und *TNFSF11* sogar geringer exprimiert (Tab. 13). Sezernierte Botenstoffe wie Prostaglandine – synthetisiert von der Prostaglandin-endoperoxid Synthase 2 (*PTGS2*) – fördern die Transkription von *TNFSF11*, dem Gen für RANKL (Ryu et al. 2006; Sims and Gooi 2008; Graham et al. 2009b). Das membranständige RANKL auf Osteoblasten und MSC, als auch sezerniertes RANKL regen wiederum die Osteoklastogenese an (Horwood et al. 1998; Sims and Gooi 2008). Auch Oncostatin M und Il6 können die Expression von RANKL voran treiben. Beide Faktoren wirken über den Rezeptor IL6ST (interleukin 6 signal transducer) (O'Brien et al. 2000; Sims and Gooi 2008), der auf mRNA-Ebene in hMSC-seneszent höher exprimiert wird. Da die *TNFSF11*-Expression jedoch gering ist, könnte dies ein „Rescue“-Versuch der Zellen darstellen.

Hinweise auf einen reduzierten, zellulären Metabolismus als eines der Kennzeichen der replikativen Seneszenz liefert die verringerte Expression von Genen vieler Wachstumsfaktoren, u.a. *PDGFA*, *VEGFA*, *FGF1* und *TGFB2*. Der IGF-Signalweg scheint besonders negativ beeinflusst zu sein, *IGF2* wird geringer exprimiert, und das IGF-Bindeprotein *IGFBP5* höher, welches auf Proteinebene IGF bindet, so dass eine Ligandenwirkung auf die IGF-Rezeptoren nicht stattfinden kann und sich dies negativ auf die Knochenformation auswirkt (Canalis 2009). Auch *FGFR2*, ein entscheidender Rezeptor für die osteogene Differenzierung (Hamidouche et al. 2010), ist geringer exprimiert.

Alles in allem konnte bewiesen werden, dass die Art und Weise wie die Mikroarray-Daten zur Seneszenz ermittelt und ausgewertet wurden, korrekt war, denn wie in anderen Literaturquellen bereits gezeigt, sind auf Genexpressionsebene Defizite in der Proliferation zu beobachten. Bekannte Marker für Seneszenz sind ebenfalls auffällig in der vorliegenden Arbeit. Es konnten mit Hilfe dieser Arbeit viele neue Kandidatengene für Seneszenz in hMSC gefunden werden, wie z.B. die stark erhöhte Expression von *PSG5*, *CDH1*, *IGFBP5* oder *SAA1/SAA2* (siehe auch 6.5.1), sowie die reduzierte oder komplett reprimierte Expression von *IGF2*, *HELLS* (siehe auch 6.5.2), *HMMR* oder *FGFR2*.

Senescente hMSC weisen des Weiteren Defizite im osteogenen Differenzierungspotential, sowie der Migration auf. Der Metabolismus ist in diesen Zellen eingeschränkt aktiv und die Osteoklastogenese wird von seneszenten Zellen nicht voran getrieben.

### 6.3.4 Seneszenz versus Alterung

Replikative Seneszenz ist gekennzeichnet durch einen irreversiblen Proliferationsstopp von Zellen, mit Reduktion von Metabolismus und Zellfunktion, sowie den Verlust der Replikationsfähigkeit (Cristofalo et al. 2004; Muller 2009). Seneszenz stellt somit einen Mechanismus auf rein zellulärer Ebene dar.

Die Alterung ganzer Organismen hingegen beschreibt die Reduktion von Organfunktionen und die verringerte Befähigung des Körpers zur Reaktion auf Stress, sowie zur Abwehr von Infektionen und Krankheiten. Der gealterte Mensch ist durch die Anhäufung von Alters-assoziierten Krankheiten, wie Arteriosklerose, Osteoporose, Degeneration des Nervensystems und Krebs gekennzeichnet (Kuro-o 2001; Mimeault and Batra 2009; Sahin and Depinho 2010). Zellen aus gealterten Personen stehen somit unter dem Druck vermehrt Infektionen, Krankheitserreger oder oxidativen Stress abzuwehren. Des Weiteren häufen sich DNA-Schäden oder Mutationen im Alter an (Goukassian et al. 2000; Cabelof et al. 2006; Vijg and Dolle 2007), wodurch die betroffenen Zellen stetig zwischen der Entscheidung zur Tumorentwicklung, Apoptose oder dem Eintritt in den G<sub>1</sub>-Arrest schwanken (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). Zelluläre Degeneration und Funktionsverlust aber auch unkontrollierte Proliferation und Krebsentwicklung sind zwei mögliche Folgen der *in-vivo*-Alterung (Maslov and Vijg 2009).

Der Vergleich der Mikroarray-Daten von *in-vitro*- und *in-vivo*-Alterung sollte dazu dienen, Gene oder Gen-Cluster zu ermitteln, die Aufschluss darüber geben, ob sich hMSC aus älteren Personen bereits einem seneszenten Zustand angenähert haben. Dies soll neue Erkenntnisse darüber liefern, ob die Alterung eines Organismus und der damit zusammenhängende Knochenverlust auf reduzierter Verfügbarkeit multipotenter, funktioneller Stammzellen beruht.

#### 6.3.4.1 Wenige Überlappungen im differentiellen Genexpressionsmuster

Trotz der Wahl einer relativ geringen differentiellen Genexpressionsänderung (1,5fach) beim Vergleich der beiden SAM-Analysen zu hMC-alt und hMSC-seneszent, erzielte der Vergleich nur wenige Gemeinsamkeiten. Insgesamt sind nur 79 Genprodukte erhöht exprimiert und 396 Genprodukte geringer exprimiert in beiden Analysen (Abb. 21). Dies bedeutet, dass nur 5,04% aller in hMSC-alt höher exprimierten Genprodukte (1429) auch in hMSC-seneszent gefunden wurden. Bei der verringerten Genexpression handelt es sich um 11,71% aller in hMSC-alt geringer exprimierten Probesets. Diese geringen Gemeinsamkeiten bestätigen die Ergebnisse von Wagner et al., 2009. Auch diese Arbeitsgruppe hat kaum überlappende Gemeinsamkeiten zwischen *in-vitro*-Seneszenz und *in-vivo*-Alterung gefunden, obwohl generell auch weitaus weniger differentielle Genexpression in *in-vivo*-gealterten hMSC detektiert werden konnten als in der vorliegenden Arbeit trotz höherem Altersunterschied (siehe 6.2.1.1). Wagner et al. konnten jedoch zeigen dass es immerhin Tendenzen zur gleich gerichteten Veränderungen auf Genexpressionsebene gibt. Jene Genprodukte, die in den hMSC aus älteren Spendern nach gesetzten Auswahlkriterien differentiell exprimiert waren, zeigten in einer Heatmap ebenfalls ähnliche Genexpressionsänderungen im Verlauf der *in-vitro*-Alterung, wenngleich statistisch weniger signifikant (Wagner et al. 2009).

Dadurch dass in der vorliegenden Arbeit die Stringenzen relativ gering gesetzt wurden ( $FC > 1,5$  bzw.  $FC < 0,667$ ,  $q < 10\%$ ), konnten zwar relativ wenig, aber dennoch weitaus mehr Gene mit überlappenden Genexpression in hMSC-alt und hMSC-seneszent detektiert werden als bei Wagner et al., 2009.



Dennoch gilt, dass *in-vitro*-Alterung ein Modellsystem ist, und dadurch die Seneszenz, die möglicherweise *in-vivo* entsteht nur ansatzweise widerspiegeln kann. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten hMSC-seneszent waren mindestens 100 Tage in Kultur bis die RNA für Mikroarray-Analysen isoliert wurde. Die RNA von hMSC-alt aus älteren Spendern wurde bereits nach 3-5 Wochen Kultivierung isoliert, ebenso die RNA der Kontrollzellen. Während der *in-vitro*-Alterung verlieren die Zellen höchstwahrscheinlich ihre *in-vivo*-Signatur, wodurch ein Vergleich von hMSC-seneszent und hMSC-alt nur als Anhaltspunkt dienen kann, um Gene der Alterung zu detektieren.

Ungeachtet der Möglichkeit des Verlustes der *in-vivo*-Signatur können die vorliegenden Ergebnisse auch darauf schließen lassen, dass die *in-vivo*-gealterten hMSC nicht in den Zustand der Seneszenz eingetreten sind. Entweder weil die Personen, aus denen die hMSC-alt isoliert wurden mit ihrem durchschnittlichen Alter von 81,75 Jahren ( $\pm 4,86$ ) biologisch noch nicht alt genug waren, oder weil Alterung eines Organismus die Ansammlung von Genomdefekten und Mutationen darstellt, die letztendlich zu Proliferationsstopp oder aber zu ungehemmter Proliferation führen kann, zwei komplett gegensätzlichen Mechanismen (Maslov and Vijg 2009).

#### 6.3.4.2 Ähnliche Störungen trotz unterschiedlicher Genexpressionsmuster

Aufgrund der oben beschriebenen Unterschiede zwischen hMSC-alt und dem Modellsystem hMSC-seneszent sind Gemeinsamkeiten im differentiellen Genexpressionsmuster umso interessanter und aussagekräftiger.

Es zeigte sich mittels GOstat-Analysen, dass die Gruppe geringer exprimierten Genprodukten in beiden SAM-Ergebnissen überrepräsentativ viele Gene für den Spindelaufbau, die Mikrotubuli und der Mitose enthalten (Tab. 12), was auf eine Störung des Zellzyklus schließen lässt. Ebenfalls gemeinsam haben hMSC-seneszent und hMSC-alt die verringerte Expression vieler Cycline (Tab. 13). Seneszenzmarker, wie z.B. *PSG*, *CDKN2A* oder *HELLS* sind in hMSC-alt jedoch nicht differentiell exprimiert. Allein die verringerte Expression von *BMI1* als Inhibitor von P16 lässt zusammen mit den genannten Störungen des Zellzyklus auf verringerte Proliferation auch in hMSC aus älteren Personen schließen.

Die Migration ist in beiden Systemen betroffen, aber auf unterschiedliche Weise, denn *in-vitro*-gealterte hMSC weisen Defizite in der Hyaluronsäure-vermittelten Zellwanderung auf (siehe 6.3.3.2), während in hMSC-alt ein steifes Aktin-Cytoskelett zeigen (siehe 6.2.1.2). Des Weiteren konnte in beiden Zelltypen die verringerte Expression eines Toll-like Rezeptors – *TLR3* bzw. *TLR4* – detektiert werden (Tab. 13). Zumindest die Bedeutung von *TLR3* wurde in hMSC bereits untersucht, und ein neutralisierender Antikörper gegen den Rezeptor verminderte die Migrationsfähigkeit der Zellen in Kultur (Tomchuck et al. 2008). Auch die Aktivierung von *TLR4* wurde kürzlich als bedeutsam für die Zellwanderung beschrieben (Zhou et al. 2011).

Die Fähigkeit osteogen zu differenzieren bzw. die Bildung von Präosteoblasten könnte somit in beiden gealterten hMSC gestört sein, wenngleich hMSC-seneszent weit mehr Markergene für Osteoblasten geringer exprimieren als hMSC-alt (Tab. 13). *In-vivo*-gealterte hMSC weisen zudem besonders häufig differentielle Expression von Genen des WNT- und BMP-Signalweges auf, die beide essentiell für die Osteoblastogenese sind (siehe 6.2.1.2). Das Gen für *LRP5* ist in beiden Systemen geringer exprimiert. *LRP5* wird als einer der Schlüsselfaktoren für die Entstehung von Osteoporose beschrieben (Richards et al. 2009). Eine verringerte Expression lässt somit auf reduzierte Knochenformation schließen.

Des Weiteren ist die Genexpression von epigenetischen Modulatoren verändert. Humane hMSC aus älteren Patienten exprimieren die Histonacetylasen *HDAC8* und *9*, sowie *ATRX* – eine Helikase der SNF2-Superfamilie, die ähnlich wie *HELLS* in der DNA-Methylierung involviert ist – geringer (Sun and Arceci 2005; Haberland et al. 2009; Sugo et al. 2010). In seneszenten hMSC ist *DNMT1* geringer exprimiert, und dies könnte zusammen mit der verringerten Expression von *HELLS* in diesen Zellen zu dem bereits beobachteten Phänomen des verringerten Methylierungsgrades aufgrund des Alters führen, was in vielen gealterten Geweben beobachtet werden konnte (Lopatina et al. 2002; Fraga et al. 2005; Sun and Arceci 2005; Gravina and Vijg 2010).

Die ermittelten Daten lassen darauf schließen, dass *in-vitro*-gealterte hMSC durchaus Gemeinsamkeiten zu *in-vivo*-gealterten hMSC aufweisen, zumindest hinsichtlich der Funktion der differentiell exprimierten Gene. In beiden Systemen ist der Zellzyklus gestört und es gibt auch in hMSC-alt Hinweise auf Seneszenz. Die Migration ist ebenfalls negativ beeinflusst, wenngleich auf unterschiedliche Art und Weise. Des Weiteren konnten in beiden hMSC-Gruppen Störungen im Differenzierungspotential sowie Änderung von epigenetischen Modulatoren detektiert werden.

## 6.4 Osteoporose

Osteoporose ist durch eine erhöhte Resorption durch Osteoklasten und eine reduzierte Aktivität von Osteoblasten beschrieben (Jilka 2003; Pernow et al. 2006; Galic et al. 2010). (Boyle et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde das Genexpressionsmuster von hMSC aus Osteoporose-Patienten untersucht, um herauszufinden, ob die Defizite der Knochenformation bereits in den Stammzellen – den Vorläuferzellen der Osteoblasten – zu finden sind.

### 6.4.1 Das Transkriptom osteoporotischer hMSC ist verändert

Die Untersuchungen wurden mit Mikroarray-Analysen von hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten und den Kontrollzellen hMSC-K durchgeführt. Da sich die Spender dieser beiden hMSC-Gruppen jedoch um ca. 28,6 Jahre unterscheiden, konnte keine Aussage über die Veränderungen des Transkriptoms allein aufgrund des Alters getroffen werden. Ein Vergleich der Daten mit den SAM-Ergebnissen zu hMSC-alt (siehe 6.2.1), deren Spender sich nur in ca. 4,45 Jahren von den Spendern der hMSC-OP unterscheiden, diente dazu, nur die durch Osteoporose bedingten Veränderungen zu detektieren.

#### 6.4.1.1 Reproduzierbare Genexpressionsänderungen trotz Spendervariabilität

Die Mikroarray-Daten der hMSC-OP wurden nicht gleich direkt mit jenen der hMSC-alt mittels SAM verrechnet, unter der Annahme, dass sich im Alter auch andere Krankheiten häufen, die das Genexpressionsmuster und die Ergebnisse dieser SAM beeinflussen könnten. Gene, die z.B. bei Osteoarthritis – einer im Alter gehäuft auftretende Krankheit (Karkucak et al. 2010) – als auch bei Osteoporose in hMSC höher exprimiert wären, würden dann keine Genexpressionsänderung zeigen und somit aus der näheren Betrachtung herausfallen (Logar et al. 2007; Coleman et al. 2010). Daher wurde der Vergleich mit hMSC-K aus Spendern mittleren Alters gewählt, um dieses mögliche Phänomen zu umgehen. Ein Vergleich mit hMSC aus weitaus jüngeren Donoren (< 20 Jahre) wäre noch aussagekräftiger, konnte jedoch aufgrund der mangelnder Patientenverfügbarkeit nicht gewährleistet werden.

Allein der Vergleich von hMSC-OP und hMSC-K erbrachte, dass 1574 Genprodukte in hMSC-OP höher und 1135 Genprodukte in diesen Zellen geringer exprimiert werden. Dies sind weitaus weniger als beim Vergleich der nicht-osteoporotischen hMSC-alt mit hMSC-K (siehe 6.2.1).

Bei der Evaluierung der SAM-Ergebnisse mittels semi-quantitativer PCR konnten die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen zu 63,63% anhand von 11 untersuchten Genen bestätigt werden (Tab. 11). Für die Evaluierung wurde RNA von 4 der 5 hMSC-OP aus den Mikroarray-Hybridisierungen verwendet. Von der 5. hMSC-OP-Population (hMSC558) stand keine RNA mehr zur Verfügung. Als Kontrollgruppe dienten hMSC aus 9 verschiedenen Spendern, da auch hier keine RNA der in den Mikroarray-Analysen verwendeten hMSC-K-Populationen mehr vorhanden war. Die Heatmap zu den Mikroarray-Daten zeigt bereits, dass in der Gruppe hMSC-K Spendervariabilitäten für Probesets der Gene *TGFB1*,

*VEGFA* und *WNTB5* auftraten (Abb. 20). Eine differentielle Expression für diese Gene konnte in der Evaluierung nicht nachgewiesen werden, was auf eine starke Heterogenität im Genexpressionsmuster der hMSC-K-Populationen allgemein schließen lässt. Das Alter der Spender für die 9 hMSC-K-Populationen betrug durchschnittlich 47 Jahre. Wie in Abschnitt 6.2.1 bereits beschrieben, ist dieses Alter zumindest bei Frauen sehr heterogen hinsichtlich des Einsetzens der Menopause und des damit zusammenhängenden Östrogenmangels, der den Alters-assoziierten Knochenverlust einleitet (Duque 2008; Langsetmo et al. 2010; Sahin et al. 2011). Beginnender Knochenverlust bei Spendern der hMSC-K könnte somit die Ergebnisse des Vergleiches hMSC-OP mit hMSC-K verwischen, und daher die biologische Evaluierung aufgrund der Verwendung neuer hMSC-Populationen erschweren.

#### **6.4.1.2 Die Änderungen im Genexpressionsmuster sind different von Spendern gleichen Alters ohne Osteoporose**

##### **6.4.1.2.1 Wenig Gemeinsamkeiten zwischen *in-vivo*-gealterten hMSC und hMSC-OP**

Die oben beschriebenen SAM-Daten (6.4.1.1) wurden mit den Daten aus der SAM zu hMSC-alt (6.2.1) verglichen, und es zeigte sich, dass trotz ähnlichem Alter der Spender, nur wenige Überlappungen im differentiellen Genexpressionsmuster von hMSC-alt und hMSC-OP auftraten. Nur 96 Genprodukte sind in beiden hMSC-Gruppen höher exprimiert und 140 Genprodukte sind geringer exprimiert, und können somit als differentiell exprimiert aufgrund des Alters der Spender und nicht aufgrund der Osteoporose definiert werden (Abb. 21).

Zu den höher exprimierten Genen in beiden Gruppen zählt unter anderem *PDGFA*. Dieser Wachstumsfaktor wurde als hemmend für die Osteogenese beschrieben, aber fördert die Zellproliferation (Tanaka and Liang 1995; Graham et al. 2009a). GOstat-Analysen zeigten, dass weitere überlappend in hMSC-OP und hMSC-alt höher exprimierte Gene überrepräsentativ häufig der GO-Gruppe Zellproliferation zuzuordnen sind (Tab. 12). Eine Einleitung von oxidativem Stress über RAS-Signalkaskaden ist jedoch für PDGF ebenfalls beschrieben worden (Eswarakumar et al. 2005; Ramos 2008). Interessanterweise konnten überexprimierte Gene auch der GO-Gruppe Neurogenese zugeordnet werden und lassen auf die Differenzierung der hMSC-OP in die neurogene Richtung schließen. Das Potential zur Bildung von neuronalen Zellen wurde für hMSC bereits beschrieben (Blondheim et al. 2006). Es stellt sich jedoch die Frage, warum gealterte hMSC diese Richtung zu präferieren scheinen. In anderen Stammzellen wurde gezeigt, dass der Verlust der Selbstregeneration aufgrund von Alterung, oxidativem Stress oder DNA-Schäden zu einer prämaturnen Reifung führen kann, oft sogar in weniger offensichtliche Richtungen. Zum Beispiel können gealterte, hämatopoetische Stammzellen in die myeloide Richtung differenzieren und Stammzellen der Muskeln in die fibrogene Richtung (Choi and Artandi 2009). Dass hMSC-OP und hMSC-alt gemeinsam das Potential zur Bildung von Neuralzellen erhöhen, könnte somit eine prämaturne, ungerichtete Differenzierung darstellen.

Das Gen *MAB21L2* ist entsprechend Mikroarray-Daten nicht nur in hMSC-alt (max. FC = 2,71) (siehe auch 6.2.1.2), sondern auch in hMSC-OP höher exprimiert (max. FC = 14,43). Dieses Gen ist ein Beispiel dafür, dass nicht alle Gene, die in die gleiche Richtung in hMSC-alt und hMSC-OP differentiell exprimiert sind, dies zwangsläufig nur aufgrund des Alters tun. Die semi-quantitative Untersuchung der Expression von *MAB21L2* bestätigte, dass das Gen in hMSC-alt aus älteren Personen zwar höher exprimiert wird, jedoch in osteoporotischen hMSC nochmals höher exprimiert als in hMSC-alt vorgefunden werden kann (Abb. 34). Somit stellt die erhöhte Genexpression von *MAB21L2* vermutlich ein Phänomen dar, das mit reduzierter Knochenformation einher geht, die generell aufgrund des Alters zu beobachten ist, und in der Osteoporose nochmals stärker ausgeprägt ist (Bartl 2008; Duque 2008; Langsetmo et al. 2010). Da *MAB21L2* als Inhibitor des BMP-Signalweges fungiert (Baldessari et al. 2004), und dieser Signalweg essentiell für die Knochenformation ist, stellt das Protein ein neues Kandidatengen des Alters- und/oder Osteoporose-bedingten Knochenverlustes dar und sollte in Zukunft in der Zellkultur und an transgenen Tiermodellen näher untersucht werden.

Gene, die in hMSC-alt als auch hMSC-OP geringer exprimiert werden und gleichzeitig überrepräsentativ GO-Gruppen zugeordnet werden können, werden ebenfalls in hMSC-seneszenz geringer exprimiert und in Abschnitt 6.4.2 näher erklärt.

#### 6.4.1.2.2 Funktionelle Störungen in hMSC bei Osteoporose

Nach Abzug der differentiell exprimierten Genprodukte aufgrund des Patientenalters, ergaben sich 995 geringer exprimierte und 1478 höher exprimierte Genprodukte ausschließlich aufgrund von Osteoporose in hMSC-OP. Wie oben bereits erwähnt, sind dies deutlich weniger Genprodukte als in hMSC-alt aus Personen vergleichbaren Alters ohne Osteoporose differentiell exprimiert werden. Es stellt sich daher die Frage ob die polygenetische Krankheit Osteoporose auf eine abzuschätzende Anzahl von Genen reduziert werden kann, während die hMSC aus älteren Personen ohne Osteoporose eine viel breitere Streuung des Genexpressionsmusters aufgrund von unbekanntem Grund- oder Nebenerkrankungen aufweisen. Das in osteoporotischen hMSC auftretende Muster scheint eingrenzbar und distinkter zu sein. Eine Erhöhung der Stringenz bei der Betrachtung der SAM-Daten, wie z.B. bei der Rangliste für die Identifizierung von Osteoporosekandidaten (Tab. 18), würde diesen Pool an differentiell exprimierten Genen weiter eingrenzen und spezifizieren.

GOstat-Analysen an diesen verbliebenen Genprodukten zeigten nur wenig überrepräsentierte, wenngleich aussagekräftige GO-Gruppen auf. Geringer exprimierte Gene lassen sich für Funktionen bei der Chromosomenkondensation und dem Kinetochor finden (Abb. 23). Fehlerhafte oder nicht kondensierte Chromosomen führen zu fehlerhafter Bindung der Kinetochore an die Spindelmikrotubuli und letztendlich zur Missegregation der Chromosomen während der Mitose (Samoshkin et al. 2009). Gene für CENPE (centromere protein E, 312kDa), SMC2 (structural maintenance of chromosomes 2) und NSL1 (MIND kinetochore complex component, homolog) sind betroffen (Anhang Tab. 25) und werden als essentiell für die korrekte Chromosomentrennung beschrieben (Scharfenberger et al. 2003; Behlke-Steinert et al. 2009; Maia et al. 2010).

Die Stabilität der Replikationsgabel ist ebenfalls essentiell, um die Anhäufung und Weitergabe von DNA-Schäden zu vermeiden (Ruzankina et al. 2008), die sich vor allem bei der Alterung anhäufen und zu Seneszenz oder Tumoren führen können (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). In hMSC-OP sind Gene, deren Proteine Funktionen beim Aufbau der Replikationsgabel und dem Replisom erfüllen, geringer exprimiert.

In hMSC-OP gibt es Hinweise für gestörte Migration (Abb. 23). *TIMP2* (TIMP metallopeptidase inhibitor 2) ist höher exprimiert, wodurch für die Zellwanderung wichtige Metalloproteinasen gehemmt werden könnten (Lee et al. 2011). Des Weiteren sind *TLR3* und *TLR4* geringer exprimiert in den osteoporotischen Stammzellen (Tomchuck et al. 2008; Zhou et al. 2011). Ebenso die Hyaluronsäure-vermittelte Migration könnte aufgrund der geringen Expression von *HMMR* auf Defizite hinweisen (Savani et al. 2001; Tolg et al. 2006).

Chemoattraktantien bzw. deren Rezeptoren werden in osteoporotischen Stammzellen jedoch höher exprimiert, wie z.B. *CYR61* (cysteine-rich, angiogenic inducer, 61) und *S1PR1* (sphingosine-1-phosphate receptor 1, EDG1) (Tab. 13, Anhang Tab. 26) (Schutze et al. 2007; Pederson et al. 2008; Ishii et al. 2009). Die erhöhte Expression des Rezeptors *S1PR1* könnte auf eine autokrine Stimulation der Migration hindeuten. *CYR61* könnte sich – übertragen auf eine *in-vivo*-Situation – autokrin als auch parakrin auf Nachbarzellen auswirken, wie z.B. Osteoklasten oder Osteoklastenvorläufer. Es konnten weitere Osteoklastogenese-fördernde Faktoren differentiell exprimiert in hMSC-OP gefunden werden. *CSF1* wird auf mRNA-Ebene in hMSC-OP höher exprimiert, ebenso die Prostaglandin-synthetisierende Synthase *PTGS2*. Wenn die erhöhte Expression dieser Synthase letztendlich zu einer erhöhten Prostaglandin Synthese und Sekretion führen sollte, könnte dies zusammen mit der erhöhten Expression von *ANGPTL4* (angiopoietin-like 4) die Osteoklastogenese stimulieren (Anhang Tab. 26, Tab. 13) (Sims and Gooi 2008; Graham et al. 2009b; Knowles et al. 2010). Des Weiteren wird der Rezeptor *PTHR1* höher exprimiert. Es ist bekannt, dass kontinuierliche Gaben von PTH oder

PTHLH, somit also auch die kontinuierliche Aktivierung des Rezeptors zu erhöhter Knochenresorption führt (Sims and Gooi 2008; Datta and Abou-Samra 2009).

Gene, die mit Angiogenese assoziiert werden, sind in hMSC-OP ebenfalls höher exprimiert (*ANGPTL4*, *VEGFB*, *BTG1*). Es wurde bereits gezeigt, dass hMSC *in-vitro* in die endotheliale Richtung differenzieren können (Chung et al. 2009). Möglicherweise stellt diese Art der Differenzierung, wie die oben beschriebene Tendenz zur Neurogenese in alten hMSC (siehe 6.4.1.2.1), einen weiteren Beweis für die fehlgerichtete Differenzierungskapazität und den Verlust der Stemness in hMSC-OP aufgrund von Seneszenzanzeichen dar (Choi and Artandi 2009).

Des Weiteren sind viele Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren neben *PDGFA* höher exprimiert: *VEGFB*, *IGF2*, *IGF2R*, *FGFR1* und *HBEGF* (Tab. 13). Diese erhöhte, autokrine Stimulation könnte ebenfalls einen „Rescue“-Mechanismus der Zellen darstellen, um dem Proliferationsstopp zu entgehen. Da es Anzeichen von Seneszenz in hMSC-OP gibt (siehe 6.4.2) kann angenommen werden, dass die Wirkung der Mitogene auf refraktäre Zellen wirkungslos bleibt. Die erhöhte mitogene Stimulation von Nachbarzellen *in-vivo* wäre jedoch denkbar.

Marker der Knochenformation sind, entsprechend dem noch multipotenten Status der MSC kaum differentiell exprimiert. Jedoch spricht die erhöhte Expression des WNT-Signalweg-Inhibitors *SOST* für eine Störung der Osteogenese, da das Protein Sclerostin die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten und MSC hemmt, sowie die Apoptose von Osteoblasten fördert (siehe 6.5.3) (ten Dijke et al. 2008; Galli et al. 2010). *KREMEN1* ist ebenfalls höher exprimiert. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass zumindest der gleichzeitige Knock-out von *KREMEN1* und *KREMEN2* zu einem erhöhten Knochenvolumen und erhöhter Knochenformationsrate führt, während umgekehrt *KREMEN2*-transgene Tiere eine ausgeprägte Osteopenie und gestörte Knochenheilung aufweisen (unpublizierte Ergebnisse in Kooperation mit Dr. T. Schinke und Mitarb., Hamburg). Beide Proteine können somit ebenfalls die Knochenbildung negativ beeinflussen (Ellwanger et al. 2008). *LRP5*, das Gen des WNT-Rezeptors ist jedoch höher exprimiert, sollte aber seine Osteogenese-fördernde Wirkung verlieren, aufgrund der höher exprimierten Inhibitoren (Li et al. 2005b). *LRP5* wird als eines der vielversprechendsten Kandidaten der Osteoporose gehandelt, da loss-of-function-Mutationen zu Knochenverlust führen (Liu et al. 2006b; Richards et al. 2009).

Des Weiteren sind die Osteoblastenmarker *COL1A1* und *IBSP*, sowie der Androgen-Rezeptor *AR* höher exprimiert. In Mikroarray-Analysen einer anderen Arbeitsgruppe zu Osteoblasten aus Osteoporose-Patienten konnte *IBSP* ebenfalls geringer exprimiert vorgefunden werden (Trost et al. 2010). *COL1A1* hingegen wurde in der Literatur in osteoporotischen MSC geringer exprimiert beschrieben (Dalle Carbonare et al. 2009). Ein Transkriptions-hemmender Polymorphismus in *AR* wurde ebenfalls als Osteoporose-relevant beschrieben (Langdahl et al. 2003).

Die vorliegenden Ergebnisse zur osteogenen Differenzierungsfähigkeit und dem WNT-Signalweg in hMSC-OP sind z.T. kontrovers zu Literaturbefunden. Analysen auf mRNA- und Proteinebene, sowie funktionelle Untersuchungen des WNT-Signalweges in hMSC sollten in der Zukunft näher Aufschluss über die zugrunde liegenden Mechanismen in osteoporotischen hMSC hinsichtlich ihrer Knochenbildenden Kapazität liefern.

#### 6.4.2 hMSC-OP zeigen Anzeichen von Seneszenz

Der Vergleich der differentiellen Genexpressionsmuster in hMSC-OP und nicht-osteoporotischen, *in-vitro*-gealterten hMSC-seneszent erbrachte relativ viele Gemeinsamkeiten. 222 Genprodukte sind in beiden hMSC-Gruppen geringer exprimiert, 57 höher. Der Vergleich aller drei in dieser Arbeit durchgeführten SAM zeigte, dass davon 42 Genprodukte sowohl in hMSC-seneszent, als auch in hMSC-OP und hMSC-alt geringer exprimiert werden, und 7 Genprodukte in allen drei hMSC-Gruppen höher (Abb. 21). Diese Genprodukte stellen somit Seneszenz-assoziierte Gene dar, die vor allem auf Defizite in Mitose, Zellzyklus-Checkpoint, Mikrotubuli, Spindelaufbau und DNA-Reparatur schließen lassen (Tab. 12). Interessanterweise befinden sich unter den in allen drei hMSC-Gruppen bzw. in hMSC-seneszent und hMSC-OP überlappend differentiell exprimierten Genen, Kandidaten, die bei

Mikroarray-Untersuchungen an osteoporotischen Osteoblasten in der Literatur ebenfalls geringer exprimiert vorlagen: *HMMR*, *CCNB1*, *CCNB2*, *LMNB1*, *ANLN*, *CDC2* und *TOP2A* (Trost et al. 2010). *FST* (follistatin), ein Förderer der Knochenformation durch antagonisierende Wirkung zu Activin A ist eines der 7 Gene, die in hMSC-alt, hMSC-seneszent und hMSC-OP höher exprimiert werden (Eijken et al. 2007). Dieses Gen wurde auch in osteoporotischem Knochen differentiell exprimiert vorgefunden (Hopwood et al. 2009).

*IGFBP5* ist, wenngleich repräsentiert durch jeweils unterschiedliche Probesets, ebenfalls in hMSC-alt, hMSC-OP und hMSC-seneszent höher exprimiert. Die Überexpression von *IGFBP5* führte in Mäusen zu reduzierter Osteoblastenfunktion und geringerer Knochendichte (Canalis 2009).

Diese Übereinstimmungen mit Literaturbefunden untermauern erneut die Verlässlichkeit der in dieser Arbeit durchgeführten Mikroarray-Analysen und -Berechnungen, und tragen dazu bei, die Liste möglicher Kandidatengene für Osteoporose noch stärker einzugrenzen. Des Weiteren zeigt die überlappende Expression in hMSC-OP und hMSC-seneszent, dass es sich hierbei vermutlich um Gene handelt, die aufgrund der Seneszenz differentiell exprimiert werden. Osteoporotische MSC-OP weisen somit Seneszenz-Anzeichen auf, die die Funktion dieser Zellen einschränkt.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Mikroarray-Daten zum Genexpressionsmuster von hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten auf Defekte in Migration und Genom-Integrität, sowie Störungen im WNT-Signalweg und fehlgerichtete Differenzierung hin. Über das osteogene Differenzierungspotential der Zellen konnte mittels der Daten keine Aussage getroffen werden. Osteoporotische hMSC weisen jedoch Anzeichen von reduzierter Proliferation und Seneszenz auf und beeinflussen die Osteoklastogenese positiv, wodurch die Knochenresorption direkt über diese Stammzellen gefördert wird. Analysen an Knochengewebe oder Patientenserum erbrachten bereits viele Kandidatengene für die Osteoporose und in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von diesen eindeutigen Kandidaten bereits zwei in den knochenbildenden Stammzellen auffällig sind: *SOST* und *CSF1* (Wei et al. 2006; Richards et al. 2009). Weitere putative Kandidaten der Osteoporose sind ebenfalls in hMSC-OP differentiell exprimiert: *HMMR*, *FST*, *IGFBP5* u.a. (Canalis 2009; Hopwood et al. 2009; Trost et al. 2010).

Damit ist gezeigt, dass Defizite in der Knochenformation bei Osteoporose bereits in den Grundbausteinen der Knochenbildung zu finden sind.

## 6.5 Mittels Mikroarray-Analysen ermittelte Kandidatengene

### 6.5.1 A-SAA – Mineralisierungsförderer und Marker für Stress

#### 6.5.1.1 Erhöhte A-SAA-Expression: Seneszenz versus Krebs

Inflammation ist ein Begleiter der Gewebeheilung und der Regeneration, kann jedoch vorteilhafte als auch negative Effekte auf den Organismus ausüben. Die bei der proinflammatorischen Akute-Phase-Reaktion sezernierten Botenstoffe leiten Wundheilungsprozesse und weitere inflammatorische Reaktionen ein (Baumann and Gauldie 1994). Chronische Inflammation hingegen wirkt sich negativ auf den Organismus aus, kann zu Autoimmun- und chronischen Inflammationskrankheiten, wie z.B. Rheumatoide Arthritis, führen (Ostan et al. 2008; van der Hilst et al. 2008), aber auch Tumorentwicklung (Dinarello 2006), sowie die Alterung des Organismus (Weiskopf et al. 2009) voran treiben.

Mikroarray-Analysen zeigten, dass in seneszenten hMSC die Gene der Akute-Phase Serum Amyloide A Proteine (A-SAA) – *SAA1* und *SAA2* – bis zu 52fach höher exprimiert werden als in hMSC P1. Semi-quantitative PCR-Analysen konnten dies bestätigen, oft wurde sogar eine exklusive Expression in der

seneszenten Passage Px detektiert (Tab. 16). Jedoch ist die Expressionszunahme nicht so konsistent wie bei dem Seneszenz-Marker *CDKN2A* (Tab. 10), denn 3 von 12 hMSC-Populationen zeigen eine höhere A-SAA-Expression in P1 verglichen mit Px. Da die Stammzellen aus Hüftköpfen von Patienten entnommen wurden, die oft an Osteoarthrose litten, könnte die erhöhte Expression der A-SAA in frühen Kultivierungsphasen auf diese Erkrankung zurück zu führen sein. Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem SAA-Serumlevel in Trauma-Patienten und bei oxidativem Stress – ein möglicher Grund für die Entstehung von Seneszenz – ist ebenfalls beschrieben (Rael et al. 2009). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Überexpression von *SAA1* oder *SAA2* in immortalisierten hMSC-TERT zu erhöhter Aktivität von SA- $\beta$ -Gal – einem Seneszenzmarker – führt (Abb. 30), jedoch gleichzeitig die stark erhöhte Proliferation der Zellen bedingt (Abb. 29B). Eine Überexpression von A-SAA führt in diesen Zellen auch zu einer morphologischen Veränderung (Abb. 29 C). Sie weisen eine längliche, schmale Form auf, die besonders stark in, mit *SAA2* stabil transfizierten Zellen auftritt. Dieser Unterschied zwischen *SAA2*-hMSC-TERT und *SAA1*-hMSC-TERT könnte auf der Expression von A-SAA beruhen, die in *SAA2*-hMSC-TERT weitaus höher ist als in *SAA1*-hMSC-TERT (Abb. 29A).

Die erhöhte Proliferationsbereitschaft dieser immortalisierten Zellklone steht im Gegensatz zur abnehmenden Proliferationsgeschwindigkeit in primären hMSC während der *in-vitro*-Alterung.

A-SAA ist als Biomarker für bestimmte Krebsarten bereits beschrieben und wurde im Serum von Krebspatienten erhöht vorgefunden (Cho et al. 2010). Aber auch das Tumorgewebe selbst exprimiert mehr A-SAA, wie in einem Vergleich von Endometriumkarzinom mit gesunder Gebärmutter Schleimhaut gezeigt wurde (Cocco et al. 2010). Da hMSC-TERT durch die Überexpression von Telomerase eine Gemeinsamkeit zu vielen Tumorarten aufweisen (Artandi and DePinho 2010), könnte die zusätzliche Überexpression von A-SAA zu einer weiteren Annäherung der Zelllinie an einen Krebszellcharakter darstellen, wie die erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit dieser Zellen vermuten lässt.

Alles in allem wurden in der vorliegenden Arbeit zwei gegensätzliche Funktionen von A-SAA in mesenchymalen Stammzellen aufgezeigt. Zum einen deutet die erhöhte Expression von A-SAA auf Stress und letztendlich auf Seneszenz hin, wie in *in-vitro*-gealterten, primären hMSC gezeigt werden konnte. Zum anderen begünstigt A-SAA jedoch möglicherweise auch die Tumorentwicklung, wenn zumindest eine von vielen krebsfördernden Bedingungen – wie z.B. aktivierte Telomerase – bereits vorliegt. Die Einführung von A-SAA als neuer Seneszenz-Marker wäre somit zu überdenken.

#### 6.5.1.2 A-SAA fördert die Mineralisierung

Da in einigen anderen Arbeiten seneszente hMSC in ihrer Fähigkeit, osteogen zu differenzieren, als eingeschränkt beschrieben wurden (Vacanti et al. 2005), wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der erhöhten A-SAA-Expression für diese Funktion untersucht. Es konnte bereits bestätigt werden, dass bei der osteogenen Differenzierung die Expression von *SAA1* als auch *SAA2* ansteigt (Kovacevic et al. 2008). Durch Zugabe von rekombinantem hSAA1 konnte die Mineralisierung während der osteogenen Differenzierung verstärkt werden (Abb. 28A-C). Die Expression von osteogenen Markern war zwischen den verschiedenen hMSC-Populationen inkonsistent, da alle drei Populationen auch unterschiedlich stark mineralisierten. Eine verstärkte Mineralisierung durch rhSAA1-Stimulation in hMSC-TERT konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 28 D). Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass hMSC-TERT im Vergleich zu hMSC nur 10 statt 21 Tage differenziert werden konnten, um eine Ablösung vom Untergrund zu vermeiden. Eine Überexpression von A-SAA in hMSC-TERT bestätigt jedoch das in primären hMSC zu beobachtende Phänomen der verstärkten Mineralisierung (Abb. 30A).

Kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigen, dass TNFA und IL1 im osteogenen Differenzierungsmedium die Mineralisierung fördern, indem die ALP-Aktivität steigt und die COL1A1-Expression sinkt (Ding et al. 2009). Es ist ebenfalls bereits bekannt, dass TNFA die Mineralisierung über die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges in osteogen differenzierenden hMSC fördert (Hess et al. 2009). Da TNFA und IL1 als Stimulatoren der A-SAA-Expression beschrieben sind (Kovacevic et al. 2008), und NF $\kappa$ B wiederum durch A-SAA aktiviert wird, beweisen die vorliegenden Ergebnisse, dass A-SAA das fehlende

Bindeglied zwischen Zytokinen und NF $\kappa$ B, und der damit einher gehenden Steigerung der Mineralisierung darstellt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die erhöhte A-SAA-Expression in seneszenten hMSC keinen Einfluss auf deren reduziertes osteogenes Differenzierungspotential hat, das nach Vacanti et al. (2005) aufgrund von Seneszenz abnimmt. Im Gegenteil fördern SAA1 und SAA2 die Mineralisierung. Dies könnte in der *in-vivo*-Situation die pathologische Entstehung von Osteophyten erklären, deren Anzahl mit dem Alter der Patienten zunimmt (Watanabe and Terazawa 2006). Die durch Alterung erhöhte Expression dieser Akute-Phase-Proteine unterstützt auch die Hypothese, dass sie bei der Entstehung von extra-skelettalen Kalzifizierungen – wie z.B. Artherosklerose – beteiligt sein könnten (Hua et al. 2009), deren Risikofaktor ebenfalls das Alter darstellt. Als Nachweis dieser Hypothese könnte die stabile Transfektion von A-SAA in Endothelzellen dienen.

Da A-SAA die Mineralisierung fördert, müssen demnach andere Faktoren und Umstände zum reduzierten, osteogenen Differenzierungspotential von seneszenten hMSC beitragen.

### 6.5.1.3 Stress stimuliert Expression von A-SAA und Metalloproteinasen

In allen Fällen, ob bei *in-vitro*-Alterung von primären hMSC oder nach Serum-Entzug in hMSC-TERT, wurde ein paralleles Expressionsmuster von SAA1 und SAA2 festgestellt. Selbst hMSC mit Überexpression von SAA1 exprimierten auch SAA2 höher und *vice versa* (Abb. 29A). Es konnte sogar gezeigt werden, dass das Einbringen von SAA1 bzw. SAA2 mittels Vektoren auch die Transkription des endogenen A-SAA anregt. Dies bestätigt die Annahme, dass SAA1 und SAA2 gekoppelt exprimiert werden (Steel and Whitehead 1994). Die Stimulation mit rekombinantem rhSAA1 förderte in 2 von 3 hMSC-Populationen ebenfalls die SAA1- bzw. SAA2-Expression (Abb. 28E). Dies lässt vermuten, dass A-SAA-Proteine – ob rekombinant oder endogen produziert – die A-SAA-Transkription stimulieren.

Der zweitägige Serum-Entzug führt in den SAA-hMSC-TERT-Klonen zu einer noch stärkeren, morphologischen Veränderung, wie besonders deutlich an SAA2-hMSC-TERT zu beobachten ist (Abb. 29B). Da dieser Klon bereits von Beginn an mehr A-SAA exprimiert (Abb. 29A) und eine extrem veränderte Zellform aufweist, kann die Hypothese verfolgt werden, dass nicht der Serum-Entzug für die morphologische Veränderung verantwortlich ist, sondern die nochmals erhöhte SAA1- und SAA2-Expression in diesen Zellen (Abb. 30D). Ein Unterschied in der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität konnte aufgrund von Stress nicht beobachtet werden, generell weisen die A-SAA-hMSC-TERT-Zellen deutlich mehr SA- $\beta$ -Gal-positive Zellen auf als die Kontrollzellen, wie bereits oben beschrieben.

Durch den Serum-Entzug wird die Expression beider Akute-Phase-Gene in den hMSC-TERT nicht angeregt, und in den Kontrollzellen pcDNA-hMSC-TERT nur schwach. SAA1-hMSC-TERT und SAA2-hMSC-TERT weisen die stärkste Expressionsänderung auf. Durch diese Form von Stress steigt in den Klonen auch die Expression der Metalloproteinasen MMP1 und MMP3. Dieser Rückkopplungseffekt könnte zur Amyloidbildung auf den Zellen führen, indem die Proteinasen A-SAA degradieren und sich dadurch Amyloid-A-Plaques bilden (Stix et al. 2001). MMP1 kann ebenfalls Knorpeldegradation bedingen, und führt auf diesem Weg über A-SAA letztendlich zur Entwicklung von Osteoarthritis (Vallon et al. 2001).

Interessanterweise ist auch die Expression des, als Seneszenzmarker geführten Gens *PSG5* aufgrund von Serum-Entzug in den A-SAA-hMSC-TERT erhöht. PSG sind Proteine, die u.a. im embryonalen Teil der Plazenta gebildet werden und nach Fusion mit dem mütterlichen Plazenta-Epithelium an das Blutserum der Mutter abgegeben werden (Rawn and Cross 2008). Somit werden sie nicht nur in der Seneszenz (siehe 6.3.2), sondern auch in Stammzellen exprimiert. Das Expressionsmuster der *PSG* scheint einen Bogen zu vollführen, mit einer hohen Expression bei Stemness, einer abnehmenden Expression bei Stemnessverlust und einer erneut zunehmenden Expression aufgrund von Seneszenz. Somit beschreibt die hohe *PSG5*-Expression in den Kontrollzellen pcDNA-hMSC-TERT, dass die Zellen Stammzellcharakter aufweisen. Die A-SAA-hMSC-TERT-Klone zeigen bereits eine geringere *PSG5*-Expression, die nach Serum-Entzug, vermutlich aufgrund der dadurch nochmals erhöhten A-SAA-Expression in diesen Zellen, vollständig reprimiert wird. Die Überexpression von A-SAA in immortali-



sierten hMSC-TERT beeinflusst somit höchstwahrscheinlich den Stammzellcharakter der Zelllinie negativ.

Alles in allem, zeigt der Serum-Entzug, dass die A-SAA-Expression durch Stress angeregt werden kann, zumindest in Zellen, die bereits ein Grundexpressionslevel der Gene aufweisen. Je höher die A-SAA-Expression ist, desto größer ist auch das Risiko zur Entstehung von Amyloid A-Plaques aufgrund von erhöhter *MMP*-Expression, und desto größer der Verlust des Stammzellcharakters. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die erhöhte Expression von A-SAA während der *in-vitro*-Alterung aufgrund von Stress – möglicherweise oxidativem Stress – ausgelöst wird.

### 6.5.2 HELLS – Verlust der Genexpression als neuer Marker für Seneszenz

Modifikationen der DNA durch Methylierungs- oder Histonacetylierungsmechanismen sind verantwortlich für veränderte Replikationsmuster in Zellen. Epigenetische Muster werden jedoch nicht nur im Fötus festgelegt, sondern verändern sich auch im Laufe der Alterung eines Organismus (Fraga et al. 2005; Gravina and Vijg 2010). Helikasen der SNF-Superfamilie – wie z.B. ATRX oder HELLS – könnten dabei eine wesentliche Rolle spielen, da sie als Modulatoren der DNA-Methylierung fungieren (Sun and Arceci 2005).

Während der *in-vitro*-Alterung von hMSC zeigte die Lymphoid-spezifische Helikase HELLS eine deutliche Abnahme der Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 31). Jedoch beginnt diese Abnahme erst nach einer Erhöhung der Expression im 2. Abschnitt der Kultivierungszeit (P4-P6). Davor, in sehr frühen Passagen (P1-P3), ist die *HELLS*-Expression geringer.

Auch Gene, deren Expression durch HELLS aufgrund der Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen oder Histon-Deacetylasen reguliert wird – z.B. *POU5F1* (Xi et al. 2009) und *FAS* (Thaler et al. 2010) – folgen diesem Muster der anfänglich geringen Expression in frühen Passagen, besonders ersichtlich in der schematischen Darstellung nach Einteilung der Passagenzahlen in 5 Abschnitte (Abb. 32). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass hMSC nach Isolation aus dem Knochenmark eine gewisse Zeit – demnach sogar Wochen – brauchen, um sich der *in-vitro*-Kultur anzupassen. Die fehlende Expression von *CDKN2A* in den frühen Passagen beweist, dass keine Seneszenz in diesen Zellen vorliegt, trotz geringfügig geringerer Expression des P16-Inhibitors *BMI1*. Dennoch scheint die Stemness betroffen zu sein, zu beobachten an der reduzierten Expression von *POU5F1* (*OCT4*) in frühen Passagen.

Die in einigen hMSC-Populationen zu beobachtende, positive SA- $\beta$ -Gal-Färbung in P1 (Abb. 26C) könnte ebenfalls ein Anhaltspunkt für Kultivierungsstress in frühen Passagen sein.

Nach der höchsten Expression im zweiten von fünf Abschnitten der *in-vitro*-Alterung nimmt die *HELLS*-Expression relativ kontinuierlich ab, und dieses Expressionsmuster entspricht dem der *POU5F1*-Expression. Eine direkte Kontrolle des Stemness-Gens durch HELLS-Interaktion – wie in murinen, embryonalen Stammzellen bereits beschrieben (Xi et al. 2009) – ist somit auch für hMSC anzunehmen und müsste in weiteren Experimenten noch überprüft werden.

Des Weiteren wurde das Gen des Apoptose-Vermittlers *FAS* – einem Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie – untersucht. Die Bedeutung von *FAS* wurde bereits an murinen Prä-Osteoblasten (MC3T3-E1) analysiert, und eine erhöhte Expression wurde in Zusammenhang mit dem Verlust des Zell-Oberflächen-Kontaktes beschrieben, der zu Anoikis führt (Thaler et al. 2010). In diesen Zellen konnte mit der Abnahme der *FAS*-Expression eine erhöhte *HELLS*- und *DNMT1*-Expression detektiert werden. Dies lässt auf die Regulation von *FAS* über Methylierung des Promoters schließen.

Während der *in-vitro*-Alterung von hMSC zeigt *FAS* in der schematischen Zusammenfassung (Abb. 31) nur geringe Expressionsabnahme in Px. Jedoch führen Spendervariabilitäten zu diesem Ergebnis. Wenn die 5 untersuchten hMSC-Populationen einzeln betrachtet werden, zeigt sich, dass in 3 hMSC-Populationen *FAS* in Px mindestens 2-fach geringer exprimiert wird als in P1 oder einer anderen frühen Passage (hMSC 613, hMSC574, hMSC622). Es wurde bereits beschrieben, dass seneszente Zellen nicht in die Apoptose eintreten (Cristofalo et al. 2004; Muller 2009) und dieses Ergebnis weist darauf hin, dass auch hMSC während der *in-vitro*-Alterung mehr und mehr das Potential verlieren, in die Apoptose eintreten zu können. Abnahme der *FAS*-Expression wird jedoch auch im Zusammen-

hang mit Tumoren und der Metastasierung beschrieben, da ohne FAS bei Ablösung der Zellen von der Extrazellulären Matrix keine Anoikis mehr eintritt, können Tumorzellen im Körper wandern und neue Gewebe infiltrieren (Nguyen et al. 2009). Die Abnahme der FAS-Expression während der *in-vitro*-Alterung von hMSC könnte somit auch ein weiteres Beispiel darstellen, dass Zellen im Alter zwischen Tumorentwicklung und Seneszenz schwanken (Campisi 2001), und zusätzliche Faktoren dazu beitragen müssen, dass die Zellen am Ende in die Seneszenz eintreten.

Während die HELLS-Expression abnimmt, steigt die CDKN2A-Expression an, bis sie in Px das höchste Level erreicht. Die beiden Gene werden somit reziprok exprimiert. Ob HELLS den Promoter des Gens CDKN2A direkt reguliert (Zhou et al. 2009), bleibt zu überprüfen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kontrolle von P16 auf Proteinebene durch den P16-Inhibitor BMI1. Die BMI1-Expression nimmt jedoch nur sehr geringfügig während der *in-vitro*-Alterung ab, es konnte nur in 2 von 5 hMSC-Spendern eine fast 2fach verringerte Expression in Px verglichen mit der höchsten Expression der Passage P2-P4 festgestellt werden (hMSC613, hMSC622). Eine direkte Rolle bei der P16-Regulation – wie von Sun et al., 2004 beschrieben – kann daher nicht angenommen werden, müsste aber mittels Nachweis auf Protein-Ebene näher untersucht werden.

Als zweiter Seneszenz-Marker wurde PSG5 gewählt, die Expression steigt sehr schnell sehr stark an, auch während hohe HELLS-Expression vorliegt. Ein Zusammenhang zwischen beiden Genen scheint nicht vorzuliegen (siehe auch 6.3.2).

Immuncytochemische Untersuchungen zeigten, zumindest in hMSC-TERT, dass HELLS in den Zellkernen lokalisiert ist, dort jedoch in der Intensität zwischen einzelnen Zellen große Unterschiede zu erkennen sind (Abb. 33A, B). Die Helikase wurde bereits als eng mit dem perizentromeren Heterochromatin oder der nukleären Matrix assoziiert, beschrieben (Yan et al. 2003). Die Funktion des Proteins besteht vermutlich darin, das Heterochromatin durch Rekrutierung von DNMT1 und anderen DNA-Methyltransferasen aufrecht zu erhalten. Eine Co-Lokalisation mit DNMT1 und späten Replikations-Foki in der S-Phase des Zellzyklus, sowie eine ausschließliche Lokalisation im Zellkern wurden ebenfalls beschrieben. Die höchste HELLS-Expressionsrate wurde in Fibroblasten in der S-Phase detektiert (Yan et al. 2003). Da die hMSC-TERT für die immuncytologische Untersuchung in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus fixiert wurden, ist die unterschiedliche HELLS-Dichte in den Zellkernen zu erklären. Während der Mitose wurde HELLS auch im Cytoplasma der Zellen lokalisiert, vermutlich aufgrund der Auflösung des Zellkerns. Jedoch konnte HELLS auch nach der vollständigen Trennung von Zellen noch im Cytoplasma lokalisiert werden (Abb. 33B). Die vermutlich in der Telophase befindlichen Zellen scheinen HELLS nach Neubildung des Kerns erst noch in den Kern rekrutieren zu müssen.

Zusammengefasst ist die abnehmende HELLS-Expression ein Anzeichen von Seneszenz in hMSC, und geht mit reduzierter Expression von Stemnessmarkern und Apoptose-Vermittlern einher. Ob es hier Zusammenhänge mit der Knochenformation gibt, wie HELLS<sup>-/-</sup> Mäuse vermuten lassen (Sun et al. 2004), bleibt zu beweisen. Eigene laufende Arbeiten (in Kooperation mit der Gruppe von PD Dr. T. Schinke, Hamburg) versuchen dieser Frage mit einem Hells-transgenen Mausmodell unter Kontrolle eines Knochenspezifischen Promoters näher zu kommen.

### 6.5.3 SOST – ein Marker für Osteoporose in hMSC

Sclerostin als Inhibitor des WNT-, als auch des BMP-Signalweges (Krause et al. 2010) wurde bereits in Verbindung mit Osteoporose gebracht (Gaudio et al. 2010). Verschiedene SNP („single nucleotide polymorphism“) des SOST-Gens sind im Zusammenhang mit erhöhtem Frakturrisiko beschrieben worden (Richards et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits die Stammzellen, aus denen letztendlich die Knochen-bildenden Osteoblasten differenzieren eine differentielle Expression von SOST aufweisen. Das Gen wird in hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten höher exprimiert als in hMSC jüngerer Spender oder Spendern vergleichbaren Alters ohne Osteoporose-Anzeichen (Abb. 35). Auch

die Mikroarray-Analysen ergaben eine 7,3fach höhere Expression von *SOST* in hMSC-OP. Somit liegt bei Osteoporose bereits ein Defekt auf grundlegender Ebene des Knochenbaus vor. Bisher wurde angenommen, dass *SOST* ein Osteozyten-spezifisches Gen ist, dessen Expression aufgrund von fehlender mechanischer Belastung angeregt wird und dadurch die Knochenbildung negativ beeinflusst (Robling et al. 2006; Galli et al. 2010). Es stellt sich daher die Frage, ob hMSC-OP prämaturn gereift sind, somit also ihren Stammzellcharakter verloren haben, oder ob z.B. ein Defekt der Mechano-sensitivierung in den hMSC-OP grundgelegt ist.

Ten Dijke et al. fassten 2008 zusammen, dass die Expression von *SOST* in Osteozyten und somit erhöhte Sclerostinspiegel zu einer Hemmung der Proliferation von mesenchymalen Stammzellen führen. Eine endogen erhöhte *SOST*-Expression in hMSC aus Osteoporose-Patienten könnte somit zu einer Autoinhibition der Proliferation dieser Zellen führen. Damit würde sich *in-vivo* die Anzahl an hMSC in den Stammzellnischen nicht mehr erneuern, wodurch sich die Bildung von Osteoblasten ebenfalls reduziert und letztendlich die Knochendichte abnimmt. Ein direkter, negativer Einfluss von Sclerostin auf die Osteoblastendifferenzierung, sowie ein positiver Einfluss auf die Apoptose von Präosteoblasten und Osteoblasten sind ebenfalls bereits beschrieben (ten Dijke et al. 2008). All diese Mechanismen könnten das Ungleichgewicht zwischen Knochenbildung und Knochenabbau bei Osteoporose erklären.

Des Weiteren wurden jeweils 3 hMSC-Populationen aus Osteoporose-Patienten und Patienten ohne Osteoporose vergleichbaren Alters osteogen differenziert. Dabei zeigte sich jedoch, dass auch die hMSC aus Patienten ohne Osteoporose-Anzeichen (keine Wirbelbrüche, kein Schenkelhalsbruch) eine leichte bis starke *SOST*-Expression aufwiesen, während in einer hMSC-OP-Population keinerlei *SOST*-Expression detektierbar war (Abb. 36A). Ein Unterschied in der Mineralisierungsstärke konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Abb. 36B). Alle 6 hMSC-Populationen zeigten im Vergleich zur jeweiligen Differenzierungs-Kontrolle positive Alizarin Rot S-Färbung auf. Innerhalb einer Untersuchungsgruppe konnten jedoch auch sehr starke Schwankungen in der Mineralisationsstärke detektiert werden. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der *SOST*-Expression und der Mineralisierung scheint nicht gegeben, unabhängig davon, ob es sich um hMSC-OP oder hMSC-alt-Kontrollzellen handelte.

Diese Ergebnisse bestätigen nicht die von Rodriguez et al. 1999 beschriebene, reduzierte Differenzierungskapazität von hMSC-OP. Stenderup et al. konnten 2001 ebenfalls keinen Unterschied in der osteogenen Differenzierungsfähigkeit zwischen hMSC aus Osteoporose-Patienten und nicht-Osteoporose-Patienten vergleichbaren Alters feststellen. Für eine gefestigte Aussage müssten die Experimente jedoch nochmals wiederholt werden, um die Anzahl an untersuchten hMSC-Populationen zu erhöhen.

Die *SOST*-Expression in den Kontrollzellen lässt sich eventuell auf unbekannte Grunderkrankungen der jeweiligen Spender zurückführen. Des Weiteren ist Knochenverlust auch eine Erscheinung des ganz normalen Alterns (Duque 2008), und die Grenze zwischen Osteoporose und altersbedingtem Knochenverlust ist umstritten und verwischt (Diez 2002; Bartl 2008).

Zusammenfassend kann jedoch behauptet werden, dass *SOST* in hMSC aus Osteoporose-Patienten prämaturn exprimiert wird, somit einen Osteoporose-Marker darstellt. Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, welchen direkten Einfluss die erhöhte Genexpression auf die Entstehung von Osteoporose ausübt. Hierfür wären Mikroarray-Analysen von hMSC hilfreich, die mit Hilfe von lentiviraler Transduktion *SOST* überexprimieren. Eine SAM aus RNA dieser Zellen, sowie aus RNA von Leervektor-transduzierten hMSC-Kontrollzellen, könnte anschließend mit den Mikroarray-Ergebnissen zu hMSC-OP verglichen werden (siehe 5.1.5.2). In beiden Analysen differentiell exprimierte Gene, könnten Kandidaten darstellen, deren Expression direkt durch Sclerostin reguliert wird, wodurch das Osteoporose-bedingte Genexpressionsmuster weiter eingegrenzt werden könnte. Auch für die funktionelle Charakterisierung dieses Kandidatengens wird derzeit ein transgenes Mausmodell entwickelt, das *SOST* unter der Kontrolle eines frühen Osteoblasten-Promoters überexprimiert und damit eine prämaturne Sekretion in Mausmodellen simuliert.

## 6.6 Zusammenfassung Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in-vitro*-Alterungs-Modell etabliert, um Seneszenz in hMSC anhand der Genexpressionsänderungen zu untersuchen. Es zeigte sich, dass hMSC in sehr frühen Passagen noch unter Kultivierungsstress leiden, an den sich die Zellen anpassen müssen. Im Verlauf der Passagierung weisen die Zellen jedoch bereits früh Anzeichen von Seneszenz auf, da sich mehr und mehr seneszente Zellen im heterogenen Zellrasen ansammeln. Mittels Mikroarray-Analysen an hMSC der letzten, seneszenten Passage konnte festgestellt werden, dass diese Zellen neben einem gestörten Zellzyklus auch Defizite in der Migration und der osteogenen Differenzierungskapazität aufweisen. Des Weiteren wurden neue Seneszenz-Markergene detektiert, u.a. *PSG5*, *HELLS* und *POU5F1* (*OCT4*). Die Expression von Letzteren scheint von der Helikase *HELLS* direkt reguliert zu werden, da beide parallel während der *in-vitro*-Alterung in ihrer Expression abnehmen.

Diese und bereits bekannte Seneszenzmarker können in Zukunft dazu dienen, hMSC nach Kultivierung noch sicherer auf Seneszenz hin zu untersuchen, bevor sie therapeutische Verwendung finden.

Die in seneszenten Zellen deutlich höher exprimierten Gene der Akute-Phase-Proteine – *SAA1* und *SAA2* – scheinen weniger Seneszenz- als Stress-induzierte Markergene darzustellen. A-SAA-Expression führt bei der osteogenen Differenzierung von hMSC zu verstärkter Mineralisierung und könnte übertragen auf eine *in-vivo*-Situation eventuell zu unspezifischen Verkalkungen führen, wie sie bei Osteophyten, verkalkender Sehnenentzündung oder Arteriosklerose in älteren Patienten auftreten.

Die vorliegenden Analysen ergaben des Weiteren, dass *in-vitro*-gealterte hMSC weniger Gemeinsamkeiten mit *in-vivo*-gealterten hMSC im Genexpressionsmuster aufweisen als erwartet. Entweder waren die Patienten der *in-vivo*-gealterten hMSC biologisch noch nicht alt genug, um bereits replikative Seneszenz aufzuweisen, oder aber die *in-vivo*-Alterung führt nicht zwangsläufig zu seneszenten Zellen, da Alterung eines Organismus auf vielen miteinander verwobenen, und oft gegensätzlichen Ereignissen beruht, wie z.B. Proliferationsstopp oder unkontrollierte Proliferation im Falle von Tumorentwicklung. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass mit Verwendung von älteren Patienten, die vermutlich kaum Alters-assoziierte Krankheiten aufwiesen, eine ungünstige Vergleichsgruppe gewählt wurde. Alterung geht unter anderem mit der Akkumulation von Krankheiten, wie der Entstehung von Tumoren, Krankheiten des Nervensystems, Osteoporose und Arteriosklerose einher (Kuro-o 2001; Mimeault and Batra 2009; Sahin and Depinho 2010). Die Spender der *in-vivo*-gealterten hMSC litten höchstwahrscheinlich nur an Osteoarthritis, Osteoporose wurde bei ihnen sogar ausgeschlossen. Die typischen Alterungserscheinungen waren somit nicht gegeben. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Gruppe an Personen überhaupt das wirkliche Altern repräsentiert, da sie anscheinend Kompensationsmechanismen entwickelt haben, die sie vor Alters-assoziierten Krankheiten schützen oder die Entwicklung zumindest verzögern. Osteoporose-Patienten leiden jedoch oft gleichzeitig an Arteriosklerose (Tremolieres and Ribot 2010) und könnten somit die geeignetere Versuchsgruppe darstellen, um *in-vivo*-Alterung mit *in-vitro*-Alterung hinsichtlich Gemeinsamkeiten zu vergleichen.

Nichtsdestotrotz konnten einige Gemeinsamkeiten aufgedeckt werden, die auf Defizite in der Proliferation und Migration in *in-vivo*-gealterten hMSC schließen lassen.

In wie weit die Krankheit Osteoporose hMSC direkt beeinflusst, wurde ebenfalls untersucht und mit den Daten zur *in-vivo*-Alterung verglichen, um die rein Alters-assoziierten Genexpressionsänderungen herausfiltern zu können. Es zeigte sich, dass Osteoporose zu einem weit distinkterem, differentiellen Genexpressionsmuster führt als *in-vivo*-Alterung an sich. Nur wenige Gene sind aufgrund des Patientenalters auffällig, alle anderen aufgrund der Osteoporose. Dazu gehörten u.a. *CSF1*, *MAB21L2* und *SOST*. Letzteres ist das Gen für den Osteozyten-Marker Sclerostin, einem WNT-Signalweg-Inhibitor. Die prämaturne Expression von *SOST* und die Überexpression des BMP-Signalweg-Inhibitors *MAB21L2* in hMSC aus Osteoporose-Patienten deuten auf eine Autoinhibition der Stammzellen hinsichtlich Proliferation und osteogener Differenzierungskapazität hin. In hMSC-OP

wurden des Weiteren Defizite in Migration, Zellzyklus und DNA-Integrität aufgedeckt. Zudem weisen andere differentielle Genexpressionsmuster auf eine verstärkte Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten hin. Damit charakterisieren die Ergebnisse zwei herausragende Defekte für die Knochenregeneration bei Osteoporose, die für das Krankheitsbild plausible pathogenetische Mechanismen darstellen.

Gemeinsamkeiten zu *in-vitro*-gealterten hMSC deuten auf Anzeichen von Seneszenz in diesen Zellen hin. Der Knochenverlust bei Osteoporose ist somit nicht allein bedingt durch erhöhte Resorption durch Osteoklasten, und Funktionsverlust von Osteoblasten. Bereits in den Grundelementen der Knochenbildung – den MSC – können Störungen gefunden werden, die auf eine reduzierte Regenerationskapazität und eine gestörte Knochenformation schließen lassen.

Bei all diesen Untersuchungen sollte im Auge behalten werden, dass es sich in allen Fällen um *in-vitro*-Analysen handelte, aufgrund der Kurz- oder Langzeit-Kultivierung der Zellen vor den Genexpressionsanalysen. Die natürliche Umgebung *in-vivo* hat jedoch ebenfalls Einfluss auf die Zellen, wie z.B. das Milieu der heterogenen Stammzellnische und die von Nachbarzellen ausgeschütteten Botenstoffe. All diese Einflüsse können bei der Kultivierung der hMSC nicht nachgestellt werden. Dennoch geben die hier vorliegenden Daten erstmalige Einblicke in das durch Alter oder Krankheit veränderte Genexpressionsmuster von Stammzellen des Knochens, und können als Ausgangspunkt für weitere Analysen und Charakterisierungen herangezogen werden.

## 6.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit resultierte in einer großen Anzahl möglicher neuer Kandidatengene für Seneszenz und Osteoporose, die in Zukunft näher untersucht werden sollen.

HELLS wurde auf mRNA-Ebene als Kandidat für die Seneszenz in hMSC ausführlich bestätigt. RNAi-Experimente und Überexpression des Gens in hMSC mittels viraler Transduktion und anschließender *in-vitro*-Alterung könnten Aufschluss darüber geben, ob die Helikase direkt für den Eintritt der Zellen in die Seneszenz entscheidend ist. Um die Bedeutung von HELLs für die Knochenformation zu untersuchen, werden im Moment in Kooperation mit PD Dr. T. Schinke in Hamburg Mausmodelle mit knochenspezifischer Überexpression des Gens hergestellt. Unter Betrachtung der Ergebnisse von Sun et al. 2004 wäre aufgrund der Überexpression eine erhöhte Knochendichte und -stabilität zu vermuten, jedoch könnte auch die Entstehung von Tumoren gefördert werden, da HELLs die Zellproliferation voran treibt. Es sind Mikroarray-Analysen von Osteoblasten bzw. Osteoblastenvorläufern aus diesen Tieren geplant, die verglichen mit dem Wildtyp, Auskunft über die durch HELLs regulierten Gene geben sollen.

Hinsichtlich der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Alterung bleibt zu erwähnen, dass die verwendeten hMSC-Populationen aus verschiedenen Subpopulationen bestanden. Dies konnte anhand der vereinzelt in einigen Zellen auftretenden, positiven SA- $\beta$ -Gal-Färbung in frühen Passagen gezeigt werden. Für alle Mikroarray-Untersuchungen wurde demnach ein RNA-Gemisch aus Zellen in unterschiedlichen Stadien verwendet (abgesehen von hMSC-seneszent). Um noch genauere Aussagen über Alters-bedingte Genexpressionsänderungen treffen zu können, müssten daher vor der Verwendung der RNA alle hMSC mittels Seneszenz-Marker einer Fluoreszenz-assoziierten Zellsortierung unterzogen werden, um bereits senescente Zellen von noch proliferierenden Zellen trennen zu können. Anhand der bisher vorliegenden Ergebnisse zur Seneszenz, wären zu diesem Zweck Transmembranproteine, wie das Seneszenz-spezifisch exprimierte CDH1 geeignet, sowie FGFR2 oder HMMR, deren Expression aufgrund von Seneszenz reprimiert wird.

Für die Osteoporose ist in näherer Zukunft die weitere Analyse von Sclerostin geplant. In hMSC wird im Moment *SOST* mittels viraler Transduktion überexprimiert. Die RNA dieser hMSC aus fünf unabhängigen Ansätzen soll mittels Mikroarray-Hybridisierungen und dem Vergleich mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen untersucht werden und Aufschluss über das durch Sclerostin regulierte Genexpressionsmuster liefern. Mittels des Vergleichs dieser Daten und den in dieser Arbeit

gewonnenen Daten zu osteoporotischen hMSC könnte der Pool an Genen, die möglicherweise eine Bedeutung für die Entstehung von Osteoporose haben, weiter eingegrenzt werden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. T. Schinke, Hamburg, ist die Generierung von Mausmodellen, die murines Sost mittels des Col1a1-Promotors knochenspezifisch überexprimieren, in Arbeit. Es ist zu erwarten, dass diese Tiere eine reduzierte Knochenformation aufweisen werden. Es sind Frakturheilungsstudien in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Ignatius, Ulm, geplant, um die Probleme der verzögerten Frakturheilung beim Osteoporose-Patienten nachzustellen und zu untersuchen.

Auch MAB21L2 stellt einen vielversprechenden Kandidaten der Osteoporose dar. Für dieses Protein würden RNAi- und/oder Überexpressionsexperimente an hMSC mit anschließender Untersuchung des Transkriptoms ebenfalls in Frage kommen. Da es sich um einen BMP-Inhibitor handelt, könnte die Auswirkung des Proteins für die Osteogenese *in-vitro* an hMSC untersucht werden mittels Überexpression oder Gabe von rekombinantem MAB21L2.

Die vorliegenden Untersuchungen lieferten einen großen Pool an vielversprechenden Kandidatengen für Seneszenz bzw. Osteoporose, der generell als Grundlage für viele weitere Experimente dienen kann.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdallah BM, Haack-Sorensen M, Fink T, Kassem M (2006) Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females. *Bone* 39(1): 181-188.
- Abed E, Moreau R (2007) Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif* 40(6): 849-865.
- Abed E, Labelle D, Martineau C, Loghin A, Moreau R (2009) Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol Membr Biol* 26(3): 146-158.
- Abele D, Brey T, Philipp E (2009) Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans. *Exp Gerontol* 44(5): 307-315.
- Addison WN, Azari F, Sorensen ES, Kaartinen MT, McKee MD (2007) Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem* 282(21): 15872-15883.
- Agarwal MK, Mirshahi F, Mirshahi M, Bracq S, Chentoufi J et al. (1996) Evidence for receptor-mediated mineralocorticoid action in rat osteoblastic cells. *Am J Physiol* 270(4 Pt 1): C1088-1095.
- Alberts B (2008) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York 5.
- Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, Park A, Sigrist KS et al. (2008) NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest* 118(11): 3775-3789.
- Allan EH, Hausler KD, Wei T, Gooi JH, Quinn JM et al. (2008) EphrinB2 Regulation by Parathyroid Hormone (PTH) and PTHrP Revealed by Molecular Profiling in Differentiating Osteoblasts. *J Bone Miner Res*.
- Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA et al. (1995) Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220(1): 194-200.
- Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S (2005) Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem* 280(50): 41342-41351.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP et al. (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227(2): 271-278.
- Anagnostis P, Karagiannis A, Kakafika AI, Tziomalos K, Athyros VG et al. (2009) Atherosclerosis and osteoporosis: age-dependent degenerative processes or related entities? *Osteoporos Int* 20(2): 197-207.
- Andressoo JO, Hoeijmakers JH (2005) Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutat Res* 577(1-2): 179-194.
- Artandi SE, DePinho RA (2010) Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31(1): 9-18.
- Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, Norris KC (2010) 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119(1-2): 73-83.
- Austad SN (2009) Comparative biology of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64(2): 199-201.
- Bachrati CZ, Hickson ID (2003) RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* 374(Pt 3): 577-606.
- Bai S, Kopan R, Zou W, Hilton MJ, Ong CT et al. (2008) NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *J Biol Chem* 283(10): 6509-6518.
- Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, Pitel K, Niederlander NJ et al. (2008) Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol* 10(7): 825-836.

- Baksh D, Tuan RS (2007) Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 212(3): 817-826.
- Baldessari D, Badaloni A, Longhi R, Zappavigna V, Consalez GG (2004) MAB21L2, a vertebrate member of the Male-abnormal 21 family, modulates BMP signaling and interacts with SMAD1. *BMC Cell Biol* 5(1): 48.
- Balint E, Lapointe D, Drissi H, van der Meijden C, Young DW et al. (2003) Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 89(2): 401-426.
- Balla B, Kosa JP, Kiss J, Borsy A, Podani J et al. (2008) Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcif Tissue Int* 82(1): 12-26.
- Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C et al. (2006) Vitamin D deficiency: A global perspective. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(4): 640-646.
- Bartl R (2008) Osteoporose. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 3: 19.
- Baumann H, Gauldie J (1994) The acute phase response. *Immunol Today* 15(2): 74-80.
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ et al. (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22(5): 675-682.
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW et al. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22(16): 4212-4222.
- Behlke-Steinert S, Touat-Todeschini L, Skoufias DA, Margolis RL (2009) SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression. *Cell Cycle* 8(14): 2211-2218.
- Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M (2009) Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim Biophys Acta* 1792(4): 364-370.
- Bellido T (2006) Downregulation of SOST/sclerostin by PTH: a novel mechanism of hormonal control of bone formation mediated by Osteozytes. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6(4): 358-359.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Statistical Soc B* 57: 289-300.
- Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, Zeng Q, Gerin I et al. (2007) Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 22(12): 1924-1932.
- Bethel CR, Chaudhary J, Anway MD, Brown TR (2009) Gene expression changes are age-dependent and lobe-specific in the brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. *Prostate* 69(8): 838-850.
- Bhutto A, Morley JE (2008) The clinical significance of gastrointestinal changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11(5): 651-660.
- Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350(6319): 569-573.
- Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH (2002) Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 364(Pt 2): 329-341.
- Blondheim NR, Levy YS, Ben-Zur T, Burshtein A, Cherlow T et al. (2006) Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev* 15(2): 141-164.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279(5349): 349-352.
- Boehm M, Slack F (2005) A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science* 310(5756): 1954-1957.
- Bose N, Masellis AM (2005) Secretory products of breast cancer cells upregulate hyaluronan production in a human osteoblast cell line. *Clin Exp Metastasis* 22(8): 629-642.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937): 337-342.
- Brenner AJ, Stampfer MR, Aldaz CM (1998) Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 17(2): 199-205.
- Brigstock DR (2003) The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178(2): 169-175.



- Bringold F, Serrano M (2000) Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35(3): 317-329.
- Brown AJ, Ritter CS, Knutson JC, Strugnell SA (2006) The vitamin D prodrugs 1alpha(OH)D<sub>2</sub>, 1alpha(OH)D<sub>3</sub> and BCI-210 suppress PTH secretion by bovine parathyroid cells. *Nephrol Dial Transplant* 21(3): 644-650.
- Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N et al. (1998) Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 16(2): 155-162.
- Busuttill RA, Rubio M, Dolle ME, Campisi J, Vijg J (2006) Mutant frequencies and spectra depend on growth state and passage number in cells cultured from transgenic lacZ-plasmid reporter mice. *DNA Repair (Amst)* 5(1): 52-60.
- Cabelof DC, Raffoul JJ, Ge Y, Van Remmen H, Matherly LH et al. (2006) Age-related loss of the DNA repair response following exposure to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61(5): 427-434.
- Caffrey JL, Boluyt MO, Younes A, Barron BA, O'Neill L et al. (1994) Aging, cardiac proenkephalin mRNA and enkephalin peptides in the Fisher 344 rat. *J Mol Cell Cardiol* 26(6): 701-711.
- Campisi J (2000) Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 14(1): 183-188.
- Campisi J (2001) Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11(11): S27-31.
- Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120(4): 513-522.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 729-740.
- Canalis E (2009) Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem* 108(4): 769-777.
- Cancro MP (2005) B cells and aging: gauging the interplay of generative, selective, and homeostatic events. *Immunol Rev* 205: 48-59.
- Carey KA, Farnfield MM, Tarquinio SD, Cameron-Smith D (2007) Impaired expression of Notch signaling genes in aged human skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62(1): 9-17.
- Chahal HS, Drake WM (2007) The endocrine system and ageing. *J Pathol* 211(2): 173-180.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25(11): 2739-2749.
- Chang KT, Min KT (2002) Regulation of lifespan by histone deacetylase. *Ageing Res Rev* 1(3): 313-326.
- Chen KY (1997) Transcription factors and the down-regulation of G1/S boundary genes in human diploid fibroblasts during senescence. *Front Biosci* 2: d417-426.
- Chen L, Jiang W, Huang J, He BC, Zuo GW et al. (2010) Insulin-like growth factor 2 (IGF2) potentiates BMP9-induced osteogenic differentiation and bone formation. *J Bone Miner Res*.
- Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD (2008) Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol* 181(1): 22-26.
- Chien HH, Lin WL, Cho MI (2000) Down-regulation of osteoblastic cell differentiation by epidermal growth factor receptor. *Calcif Tissue Int* 67(2): 141-150.
- Cho WC, Yip TT, Cheng WW, Au JS (2010) Serum amyloid A is elevated in the serum of lung cancer patients with poor prognosis. *Br J Cancer* 102(12): 1731-1735.
- Choi J, Artandi S (2009) Stem cell aging and aberrant differentiation within the niche. *Cell Stem Cell* 5(1): 6-8.
- Choudhury AR, Ju Z, Djojotubroto MW, Schienke A, Lechel A et al. (2007) Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet* 39(1): 99-105.
- Chung N, Jee BK, Chae SW, Jeon YW, Lee KH et al. (2009) HOX gene analysis of endothelial cell differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep* 36(2): 227-235.
- Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-139.
- Cocco E, Bellone S, El-Sahwi K, Cargnelutti M, Buza N et al. (2010) Serum amyloid A: a novel biomarker for endometrial cancer. *Cancer* 116(4): 843-851.

- Coleman CM, Curtin C, Barry FP, O'Flatharta C, Murphy JM (2010) Mesenchymal stem cells and osteoarthritis: remedy or accomplice? *Hum Gene Ther* 21(10): 1239-1250.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7841-7845.
- Cooper JA, Schafer DA (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* 12(1): 97-103.
- Coppolino MG, Dedhar S (1998) Calreticulin. *Int J Biochem Cell Biol* 30(5): 553-558.
- Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M (2004) Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev* 125(10-11): 827-848.
- Crowley JL, Smith TC, Fang Z, Takizawa N, Luna EJ (2009) Supervillin reorganizes the actin cytoskeleton and increases invadopodial efficiency. *Mol Biol Cell* 20(3): 948-962.
- Csoka AB, English SB, Simkevich CP, Ginzinger DG, Butte AJ et al. (2004) Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging Cell* 3(4): 235-243.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426(6963): 194-198.
- Dai J, Rabie AB (2007) VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res* 86(10): 937-950.
- Daino K, Ugolin N, Altmeyer-Morel S, Guilly MN, Chevillard S (2009) Gene expression profiling of alpha-radiation-induced rat osteosarcomas: identification of dysregulated genes involved in radiation-induced tumorigenesis of bone. *Int J Cancer* 125(3): 612-620.
- Dalle Carbonare L, Valenti MT, Zanatta M, Donatelli L, Lo Cascio V (2009) Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis. *Arthritis Rheum* 60(11): 3356-3365.
- Date DA, Jacob CJ, Bekier ME, Stiff AC, Jackson MW et al. (2007) Borealin is repressed in response to p53/Rb signaling. *Cell Biol Int* 31(12): 1470-1481.
- Datta NS, Abou-Samra AB (2009) PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* 21(8): 1245-1254.
- De Corte V, Van Impe K, Bruyneel E, Boucherie C, Mareel M et al. (2004) Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *J Cell Sci* 117(Pt 22): 5283-5292.
- de Gregorio LH, Lacativa PG, Melazzi AC, Russo LA (2006) Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(4): 793-801.
- Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F et al. (2005) Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem* 95(1): 139-148.
- Di Giulio C, Verratti V, Artese L, Petruccelli G, Walski M et al. (2009) Aging and expression of heme oxygenase-1 and endothelin-1 in the rat carotid body after chronic hypoxia. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 5: 41-44.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8(21): 2540-2551.
- Diez F (2002) Guidelines for the diagnosis of osteoporosis by densitometric methods. *J Manipulative Physiol Ther* 25(6): 403-415.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-9367.
- Dinarello CA (2006) Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* 83(2): 447S-455S.
- Ding J, Ghali O, Lencel P, Broux O, Chauveau C et al. (2009) TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci* 84(15-16): 499-504.

- Ding SL, Shen CY (2008) Model of human aging: recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes. *Clin Interv Aging* 3(3): 431-444.
- Djojotubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL (2003) Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells* 15(2): 164-175.
- Droge W (2003) Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 543: 191-200.
- Druke TB, Prie D (2007) Klotho spins the thread of life--what does Klotho do to the receptors of fibroblast growth factor-23 (FGF23)? *Nephrol Dial Transplant* 22(6): 1524-1526.
- Duque G (2008) Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol* 20(4): 429-434.
- Durand M, Gallant MA, de Brum-Fernandes AJ (2008) Prostaglandin D2 receptors control osteoclastogenesis and the activity of human osteoclasts. *J Bone Miner Res* 23(7): 1097-1105.
- Dykstra B, de Haan G (2008) Hematopoietic stem cell aging and self-renewal. *Cell Tissue Res* 331(1): 91-101.
- Ebert R, Schutze N, Adamski J, Jakob F (2006a) Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 149-159.
- Ebert R, Ulmer M, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D et al. (2006b) Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells* 24(5): 1226-1235.
- Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derckx P et al. (2007) The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *Faseb J* 21(11): 2949-2960.
- Elabd C, Basillais A, Beaupied H, Breuil V, Wagner N et al. (2008) Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis. *Stem Cells* 26(9): 2399-2407.
- Ellwanger K, Saito H, Clement-Lacroix P, Maltry N, Niedermeyer J et al. (2008) Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol* 28(15): 4875-4882.
- Endoh M, Kobayashi Y, Yamakami Y, Yonekura R, Fujii M et al. (2009) Coordinate expression of the human pregnancy-specific glycoprotein gene family during induced and replicative senescence. *Biogerontology* 10(2): 213-221.
- Epperly MW, Shields D, Niu Y, Carlos T, Greenberger JS (2006) Bone marrow from CD18<sup>-/-</sup> (MAC-1<sup>-/-</sup>) homozygous deletion recombinant negative mice demonstrates increased longevity in long-term bone marrow culture and decreased contribution to irradiation pulmonary damage. *In Vivo* 20(4): 431-438.
- Epstein J, Williams JR, Little JB (1973) Deficient DNA repair in human progeroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(4): 977-981.
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J et al. (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423(6937): 293-298.
- Esteller M (2006) The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 27(6): 1121-1125.
- Estep PW, 3rd, Warner JB, Bulyk ML (2009) Short-term calorie restriction in male mice feminizes gene expression and alters key regulators of conserved aging regulatory pathways. *PLoS One* 4(4): e5242.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2): 139-149.
- Eswarakumar VP, Monsonigo-Ornan E, Pines M, Antonopoulou I, Morriss-Kay GM et al. (2002) The Il1c alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Development* 129(16): 3783-3793.
- Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* 7(1): 67-74.
- Fehrer C, Lepperding G (2005) Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol* 40(12): 926-930.

- Filardo EJ (2002) Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80(2): 231-238.
- Ford JH (2010) Saturated fatty acid metabolism is key link between cell division, cancer, and senescence in cellular and whole organism aging. *Age (Dordr)* 32(2): 231-237.
- Forsyth NR, Wright WE, Shay JW (2002) Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69(4-5): 188-197.
- Fox SW, Lovibond AC (2005) Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol* 243(1-2): 19-26.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(30): 10604-10609.
- Friedenstein AJ, Latzinik NV, Gorskaya Yu F, Luria EA, Moskvina IL (1992) Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone Miner* 18(3): 199-213.
- Fu VX, Dobosy JR, Desotelle JA, Almassi N, Ewald JA et al. (2008) Aging and cancer-related loss of insulin-like growth factor 2 imprinting in the mouse and human prostate. *Cancer Res* 68(16): 6797-6802.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116(6): 769-778.
- Fuchshofer R, Stephan DA, Russell P, Tamm ER (2009) Gene expression profiling of TGFbeta2- and/or BMP7-treated trabecular meshwork cells: Identification of Smad7 as a critical inhibitor of TGF-beta2 signaling. *Exp Eye Res* 88(6): 1020-1032.
- Fuhrman B, Volkova N, Aviram M (2002) Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 161(2): 307-316.
- Fukumoto S, Namba N, Ozono K, Yamauchi M, Sugimoto T et al. (2008) Causes and differential diagnosis of hypocalcemia--recommendation proposed by expert panel supported by ministry of health, labour and welfare, Japan. *Endocr J* 55(5): 787-794.
- Gabet Y, Baniwal SK, Leclerc N, Shi Y, Kohn-Gabet AE et al. (2010) Krox20/EGR2 deficiency accelerates cell growth and differentiation in the monocytic lineage and decreases bone mass. *Blood*.
- Galic E, Krpan D, Mirat J, Kusec V (2010) Diversity of bone cell activity as a histomorphometric feature of idiopathic osteoporosis in men. *Aging Male* 13(1): 18-24.
- Galli C, Passeri G, Macaluso GM (2010) Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res* 89(4): 331-343.
- Gao D, Inuzuka H, Korenjak M, Tseng A, Wu T et al. (2009) Cdh1 regulates cell cycle through modulating the caspin/Chk1 and the Rb/E2F1 pathways. *Mol Biol Cell* 20(14): 3305-3316.
- Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C, Torrisi V, Lindner B et al. (2010) Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 95(5): 2248-2253.
- Gazzerro E, Canalis E (2006) Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 7(1-2): 51-65.
- Gems D, Doonan R (2009) Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle* 8(11): 1681-1687.
- Gensler HL, Bernstein H (1981) DNA damage as the primary cause of aging. *Q Rev Biol* 56(3): 279-303.
- Ghosh AK, Kanda T, Steele R, Ray RB (2008) Knockdown of MBP-1 in human foreskin fibroblasts induces p53-p21 dependent senescence. *PLoS One* 3(10): e3384.
- Gicquel C, Le Bouc Y (2006) Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 65 Suppl 3: 28-33.
- Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C (2007) Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 35(22): 7466-7474.
- Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US et al. (2000) Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *Faseb J* 14(10): 1325-1334.

- Graham S, Leonidou A, Lester M, Heliotis M, Mantalaris A et al. (2009a) Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* 18(11): 1633-1654.
- Graham S, Gamie Z, Polyzois I, Narvani AA, Tzafetta K et al. (2009b) Prostaglandin EP2 and EP4 receptor agonists in bone formation and bone healing: In vivo and in vitro evidence. *Expert Opin Investig Drugs* 18(6): 746-766.
- Gravel S, Chapman JR, Magill C, Jackson SP (2008) DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev* 22(20): 2767-2772.
- Gravina S, Vijg J (2010) Epigenetic factors in aging and longevity. *Pflugers Arch* 459(2): 247-258.
- Greenwood MJ, Lansdorp PM (2003) Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology. *Arch Med Res* 34(6): 489-495.
- Grolleau-Julius A, Ray D, Yung RL (2009) The Role of Epigenetics in Aging and Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE et al. (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1827-1835.
- Gulhan I, Kebapcilar L, Alacacioglu A, Bilgili S, Kume T et al. (2009) Postmenopausal women with osteoporosis may be associated with high endothelin-1. *Gynecol Endocrinol* 25(10): 674-678.
- Haberland M, Mokalled MH, Montgomery RL, Olson EN (2009) Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8. *Genes Dev* 23(14): 1625-1630.
- Habisch HJ, Fiedler J, Ludolph AC, Storch A, Brenner RE (2008) Altered migration and adhesion potential of pro-neurally converted human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy* 10(8): 824-833.
- Hackett JA, Feldser DM, Greider CW (2001) Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106(3): 275-286.
- Hagihara K, Nishikawa T, Isobe T, Song J, Sugamata Y et al. (2004) IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem Biophys Res Commun* 314(2): 363-369.
- Hamidouche Z, Fromigue O, Nuber U, Vaudin P, Pages JC et al. (2010) Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 224(2): 509-515.
- Han MY, Kosako H, Watanabe T, Hattori S (2007) Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase regulates actin organization and cell motility by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN. *Mol Cell Biol* 27(23): 8190-8204.
- Harada S, Rodan GA (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423(6937): 349-355.
- Hardy KM, Garriock RJ, Yatskievych TA, D'Agostino SL, Antin PB et al. (2008) Non-canonical Wnt signaling through Wnt5a/b and a novel Wnt11 gene, Wnt11b, regulates cell migration during avian gastrulation. *Dev Biol* 320(2): 391-401.
- Hardy R, Cooper MS (2009) Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol* 201(3): 309-320.
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3): 298-300.
- Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20(4): 145-147.
- Harvey JA, Anderson HC, Borek D, Morris D, Lukert BP (1989) Osteoporosis associated with mastocytosis confined to bone: report of two cases. *Bone* 10(4): 237-241.
- Hasler P, Zouali M (2005) Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol* 233(2): 102-108.
- Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- He R, Sang H, Ye RD (2003) Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood* 101(4): 1572-1581.

- He RL, Zhou J, Hanson CZ, Chen J, Cheng N et al. (2009) Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* 113(2): 429-437.
- Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, Brenner RE, Wirth T (2009) TNF $\alpha$  promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone* 45(2): 367-376.
- Hill TP, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C (2006) Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning. *Development* 133(7): 1219-1229.
- Ho AD, Wagner W, Mahlknecht U (2005) Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO Rep* 6 Spec No: S35-38.
- Hochedlinger K, Jaenisch R (2006) Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441(7097): 1061-1067.
- Hodge DR, Xiao W, Clausen PA, Heidecker G, Szyf M et al. (2001) Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 276(43): 39508-39511.
- Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, van der Kemp AW et al. (2003) Renal Ca<sup>2+</sup> wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* 112(12): 1906-1914.
- Holick MF, DeLuca HF (1974) Vitamin D metabolism. *Annu Rev Med* 25: 349-367.
- Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, Fazzalari NL (2007) Mikroarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling. *Arthritis Res Ther* 9(5): R100.
- Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, Fazzalari NL (2009) Gene expression profile of the bone microenvironment in human fragility fracture bone. *Bone* 44(1): 87-101.
- Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT (1998) Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 139(11): 4743-4746.
- Hua S, Song C, Geczy CL, Freedman SB, Witting PK (2009) A role for acute-phase serum amyloid A and high-density lipoprotein in oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Redox Rep* 14(5): 187-196.
- Ichikawa F, Sato K, Nanjo M, Nishii Y, Shinki T et al. (1995) Mouse primary osteoblasts express vitamin D3 25-hydroxylase mRNA and convert 1 alpha-hydroxyvitamin D3 into 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 16(1): 129-135.
- Ichikawa J (2010) Serum-free medium with osteogenic supplements induces adipogenesis in rat bone marrow stromal cells. *Cell Biol Int* 34(6): 615-620.
- Intano GW, Cho EJ, McMahan CA, Walter CA (2003) Age-related base excision repair activity in mouse brain and liver nuclear extracts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58(3): 205-211.
- Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y et al. (2009) Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 458(7237): 524-528.
- Ito Y, Ide T, Mitsui Y (1998) Expressional changes in alternative splicing affecting genes during cell passage of human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 105(1-2): 105-114.
- Iwasaki A, Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327(5963): 291-295.
- Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B et al. (2008) Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68(11): 4229-4238.
- Jacobs JJ, de Lange T (2005) p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway. *Cell Cycle* 4(10): 1364-1368.
- Jakob F, Limbert C, Schilling T, Benisch P, Seefried L et al. (2008) Biology of Mesenchymal Stem Cells. *Current Rheumatology Reviews* 4(3): 148-154.
- Jakob F, Seefried L, Ebert R, Eulert J, Wolf E et al. (2007) Frakturheilung bei Osteoporose. *Osteologie* 16(7): 71-84.

- Janderova-Rossmeislova L, Novakova Z, Vlasakova J, Philimonenko V, Hozak P et al. (2007) PML protein association with specific nucleolar structures differs in normal, tumor and senescent human cells. *J Struct Biol* 159(1): 56-70.
- Jang YC, Remmen VH (2009) The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp Gerontol* 44(4): 256-260.
- Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W (2005) Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* 26(6): 743-774.
- Jenei-Lanzl Z, Straub RH, Dienstknecht T, Huber M, Hager M et al. (2010) Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum* 62(4): 1088-1096.
- Jiang H, Ju Z, Rudolph KL (2007) Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatr* 40(5): 314-324.
- Jilka RL (2003) Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 41(3): 182-185.
- Jones WM, Chao AT, Zavortink M, Saint R, Bejsovec A (2010) Cytokinesis proteins Tum and Pav have a nuclear role in Wnt regulation. *J Cell Sci* 123(Pt 13): 2179-2189.
- Jung JW, Lee S, Seo MS, Park SB, Kurtz A et al. (2010) Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3. *Cell Mol Life Sci* 67(7): 1165-1176.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (2002) *Histologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 5. Auflage.
- Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M (2002) Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 71(1): 36-44.
- Karkucak M, Kiris A, Capkin E, Durmus I, Ozden G et al. (2010) Age-related diseases; degenerative aortic valve disease and osteoarthritis. *Bratisl Lek Listy* 111(7): 381-383.
- Karsenty G, Wagner EF (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2(4): 389-406.
- Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J et al. (2009) Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells* 27(6): 1288-1297.
- Kassem M, Abdallah BM (2008) Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res* 331(1): 157-163.
- Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH et al. (2002) Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157(2): 303-314.
- Kato T, Sato N, Hayama S, Yamabuki T, Ito T et al. (2007) Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. *Cancer Res* 67(18): 8544-8553.
- Kawaguchi H (2006) Molecular backgrounds of age-related osteoporosis from mouse genetics approaches. *Rev Endocr Metab Disord* 7(1-2): 17-22.
- Kim KS, Seu YB, Baek SH, Kim MJ, Kim KJ et al. (2007) Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 18(11): 4543-4552.
- Kim SH, Cho KW, Choi HS, Park SJ, Rhee Y et al. (2009) The forkhead transcription factor Foxc2 stimulates osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 386(3): 532-536.
- Kinkel MD, Yagi R, McBurney D, Nugent A, Horton WE, Jr. (2004) Age-related expression patterns of Bag-1 and Bcl-2 in growth plate and articular chondrocytes. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 279(2): 720-728.
- Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG (2005) Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)* 53(10): 576-580.
- Klein-Nulend J, Sterck JG, Semeins CM, Lips P, Joldersma M et al. (2002) Donor age and mechanosensitivity of human bone cells. *Osteoporos Int* 13(2): 137-146.

- Klemann C, Schade J, Pabst R, Leitner S, Stiller J et al. (2009) CD26/dipeptidyl peptidase 4-deficiency alters thymic emigration patterns and leukocyte subsets in F344-rats age-dependently. *Clin Exp Immunol* 155(2): 357-365.
- Klotz B, Mentrup B, Merz C, Regensburger M, Ebert R et al. (submitted) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Treatment Delays Cellular Aging in Human Mesenchymal Stem Cells.
- Knowles HJ, Cleton-Jansen AM, Korsching E, Athanasou NA (2010) Hypoxia-inducible factor regulates osteoclast-mediated bone resorption: role of angiopoietin-like 4. *Faseb J*.
- Komori T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339(1): 189-195.
- Kong N (2003) Cell cycle inhibitors for the treatment of cancer. *Drugs Fut* 28(9): 881.
- Kovacevic A, Hammer A, Stadelmeyer E, Windischhofer W, Sundl M et al. (2008) Expression of serum amyloid A transcripts in human bone tissues, differentiated osteoblast-like stem cells and human osteosarcoma cell lines. *J Cell Biochem* 103(3): 994-1004.
- Krause C, Korchynskyi O, de Rooij K, Weidauer SE, de Gorter DJ et al. (2010) Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem* 285(53): 41614-41626.
- Krug AW, Allenhofer L, Monticone R, Spinetti G, Gekle M et al. (2010) Elevated mineralocorticoid receptor activity in aged rat vascular smooth muscle cells promotes a proinflammatory phenotype via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase and epidermal growth factor receptor-dependent pathways. *Hypertension* 55(6): 1476-1483.
- Krygowska-Wajs A, Lenda T, Adamek D, Moskala M, Kuter K et al. (2008) Increased synphilin-1 expression in human elderly brains with substantia nigra Marinesco bodies. *Pharmacol Rep* 60(6): 914-924.
- Kubo H, Shimizu M, Taya Y, Kawamoto T, Michida M et al. (2009) Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells* 14(3): 407-424.
- Kuhn NZ, Tuan RS (2010) Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 222(2): 268-277.
- Kuro-o M (2001) Disease model: human aging. *Trends Mol Med* 7(4): 179-181.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T et al. (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390(6655): 45-51.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lamas JR, Rodriguez-Rodriguez L, Vigo AG, Alvarez-Lafuente R, Lopez-Romero P et al. (2010) Large-scale gene expression in bone marrow mesenchymal stem cells: a putative role for COL10A1 in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*.
- Langdahl BL, Stenkjaer L, Carstens M, Tofteng CL, Eriksen EF (2003) A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 73(3): 237-243.
- Langsetmo L, Morin S, Kovacs CS, Kreiger N, Josse R et al. (2010) Determining whether women with osteopenic bone mineral density have low, moderate, or high clinical fracture risk. *Menopause*.
- Lapointe J, Hekimi S (2008) Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mcl1+/- mice. *J Biol Chem* 283(38): 26217-26227.
- Lapointe J, Hekimi S (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67(1): 1-8.
- Lapointe J, Stepanyan Z, Bigras E, Hekimi S (2009) Reversal of the mitochondrial phenotype and slow development of oxidative biomarkers of aging in long-lived Mcl1+/- mice. *J Biol Chem* 284(30): 20364-20374.
- Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A et al. (2008) Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda)* 23: 64-74.



- Laue K, Janicke M, Plaster N, Sonntag C, Hammerschmidt M (2008) Restriction of retinoic acid activity by Cyp26b1 is required for proper timing and patterning of osteogenesis during zebrafish development. *Development* 135(22): 3775-3787.
- Lavery K, Hawley S, Swain P, Rooney R, Falb D et al. (2009) New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *Bone* 45(1): 27-41.
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, 2nd, Greider CW et al. (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392(6676): 569-574.
- Lee J, Banu SK, Subbarao T, Starzinski-Powitz A, Arosh JA (2011) Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits invasion of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells through suppression of metalloproteinases. *Mol Cell Endocrinol* 332(1-2): 306-313.
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225(4): 951-960.
- Li GR, Sun H, Deng X, Lau CP (2005a) Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells* 23(3): 371-382.
- Li SK, Smith DK, Leung WY, Cheung AM, Lam EW et al. (2008) FoxM1c counteracts oxidative stress-induced senescence and stimulates Bmi-1 expression. *J Biol Chem* 283(24): 16545-16553.
- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P et al. (2005b) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 280(20): 19883-19887.
- Liang Y, Van Zant G (2008) Aging stem cells, latexin, and longevity. *Exp Cell Res* 314(9): 1962-1972.
- Lips P (2006) Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92(1): 4-8.
- Lirani-Galvao AP, Lazaretti-Castro M (2010) Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(2): 171-178.
- Liu CJ, Kong W, Ilalov K, Yu S, Xu K et al. (2006a) ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *Faseb J* 20(7): 988-990.
- Liu L, Ling J, Wei X, Wu L, Xiao Y (2009) Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *J Endod* 35(10): 1368-1376.
- Liu YJ, Shen H, Xiao P, Xiong DH, Li LH et al. (2006b) Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. *J Bone Miner Res* 21(10): 1511-1535.
- Logar DB, Komadina R, Prezelj J, Ostanek B, Trost Z et al. (2007) Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 25(4): 219-225.
- Longo VD (2004) Ras: the other pro-aging pathway. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004(39): pe36.
- Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S et al. (2002) Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem* 84(2): 324-334.
- Lu J, Holmgren A (2009) Selenoproteins. *J Biol Chem* 284(2): 723-727.
- MacLean HE, Kronenberg HM (2004) Expression of Stra13 during mouse endochondral bone development. *Gene Expr Patterns* 4(6): 633-636.
- Magnus JH, Husby G, Kolset SO (1989) Presence of glycosaminoglycans in purified AA type amyloid fibrils associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 48(3): 215-219.
- Maia AF, Feijao T, Vromans MJ, Sunkel CE, Lens SM (2010) Aurora B kinase cooperates with CENP-E to promote timely anaphase onset. *Chromosoma* 119(4): 405-413.
- Mak W, Shao X, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H (2009) Biphasic glucocorticoid-dependent regulation of Wnt expression and its inhibitors in mature osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 85(6): 538-545.
- Malhas AN, Lee CF, Vaux DJ (2009) Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1. *J Cell Biol* 184(1): 45-55.
- Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A (2009) Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 66(1): 9-26.
- Malone JD, Teitelbaum SL, Griffin GL, Senior RM, Kahn AJ (1982) Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* 92(1): 227-230.

- Malumbres M, Pellicer A (1998) RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3: d887-912.
- Manicassamy S, Pulendran B (2009) Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol* 21(4): 185-193.
- Marhaug G (1983) Three assays for the characterization and quantitation of human serum amyloid A. *Scand J Immunol* 18(4): 329-338.
- Marie PJ, Debiais F, Hay E (2002) Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. *Histol Histopathol* 17(3): 877-885.
- Marks HD, Fleet JC, Peleg S (2007) Transgenic expression of the human Vitamin D receptor (hVDR) in the duodenum of VDR-null mice attenuates the age-dependent decline in calcium absorption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3-5): 513-516.
- Martin TJ, Quinn JM, Gillespie MT, Ng KW, Karsdal MA et al. (2006) Mechanisms involved in skeletal anabolic therapies. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 458-470.
- Maslov AY, Vijg J (2009) Genome instability, cancer and aging. *Biochim Biophys Acta* 1790(10): 963-969.
- Mason DX, Jackson TJ, Lin AW (2004) Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene* 23(57): 9238-9246.
- Matsuo K (2009) Cross-talk among bone cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18(4): 292-297.
- Mazziotti G, Amato G, Sorvillo F, Piscopo M, Rizzo MR et al. (2006) Increased serum osteoprotegerin values in long-lived subjects: different effects of inflammation and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 154(3): 373-377.
- McCarran DJ, Yang D, Chen H, Carroll S, Ravid K (2009) Upregulation of Nox4 in the aging vasculature and its association with smooth muscle cell polyploidy. *Cell Cycle* 8(6): 902-908.
- McMahon MS, Ueki Y (2009) SH3BP2 is a critical regulator of macrophage and osteoclast response to M-CSF and RANKL stimulation. *Hss J* 5(1): 49-50.
- Meier C, Liu PY, Handelsman DJ, Seibel MJ (2005) Endocrine regulation of bone turnover in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63(6): 603-616.
- Metcalf D (2008) The pathophysiology of osteoporotic hip fracture. *Mcgill J Med* 11(1): 51-57.
- Mills EM, Takeda K, Yu ZX, Ferrans V, Katagiri Y et al. (1998) Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 273(35): 22165-22168.
- Mimeault M, Batra SK (2009) Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res Rev* 8(2): 94-112.
- Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K et al. (2009) Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. *J Biol Chem* 284(8): 4897-4904.
- Miura Y, Miura M, Gronthos S, Allen MR, Cao C et al. (2005) Defective osteogenesis of the stromal stem cells predisposes CD18-null mice to osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 14022-14027.
- Miyazono K (1999) Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* 25(1): 91-93.
- Moretton A, Ward A, Nantais J, Hudson JW (2009) Gene expression patterns in heterozygous Plk4 murine embryonic fibroblasts. *BMC Genomics* 10: 319.
- Mucchiano GI, Haggqvist B, Sletten K, Westermarck P (2001) Apolipoprotein A-1-derived amyloid in atherosclerotic plaques of the human aorta. *J Pathol* 193(2): 270-275.
- Muller D, Roessner A, Rocken C (2000) Distribution pattern of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, and 9, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and alpha 2-macroglobulin in cases of generalized AA- and AL amyloidosis. *Virchows Arch* 437(5): 521-527.
- Muller M (2009) Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 11(1): 59-98.
- Mundy GR (2007) Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev* 65(12 Pt 2): S147-151.

- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 ( Pt 7): 1161-1166.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH et al. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277(5328): 955-959.
- Nakanishi R, Shimizu M, Mori M, Akiyama H, Okudaira S et al. (2006) Secreted frizzled-related protein 4 is a negative regulator of peak BMD in SAMP6 mice. *J Bone Miner Res* 21(11): 1713-1721.
- Nakao K, Aoyama M, Fukuoka H, Fujita M, Miyazawa K et al. (2009) IGF2 modulates the microenvironment for osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 378(3): 462-466.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM et al. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1): 17-29.
- Narisawa S, Frohlander N, Millan JL (1997) Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 208(3): 432-446.
- Newbold RF (2002) The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis* 17(6): 539-550.
- Ng CC, Arakawa H, Fukuda S, Kondoh H, Nakamura Y (2003) p53RFP, a p53-inducible RING-finger protein, regulates the stability of p21WAF1. *Oncogene* 22(28): 4449-4458.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9(4): 274-284.
- Nicke B, Bastien J, Khanna SJ, Warne PH, Cowling V et al. (2005) Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in Ras oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell* 20(5): 673-685.
- Niisato K, Fujikawa A, Komai S, Shintani T, Watanabe E et al. (2005) Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation and impairment of spatial learning through the Rho-associated kinase pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. *J Neurosci* 25(5): 1081-1088.
- Nissen-Meyer LS, Jemtland R, Gautvik VT, Pedersen ME, Paro R et al. (2007) Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. *J Cell Sci* 120(Pt 16): 2785-2795.
- Noble BS (2008) The Osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473(2): 106-111.
- Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG et al. (2002) Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20(5): 1060-1069.
- Nystrom T (2003) The free-radical hypothesis of aging goes prokaryotic. *Cell Mol Life Sci* 60(7): 1333-1341.
- O'Brien CA, Lin SC, Bellido T, Manolagas SC (2000) Expression levels of gp130 in bone marrow stromal cells determine the magnitude of osteoclastogenic signals generated by IL-6-type cytokines. *J Cell Biochem* 79(4): 532-541.
- Ochi K, Derfoul A, Tuan RS (2006) A predominantly articular cartilage-associated gene, SCRG1, is induced by glucocorticoid and stimulates chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 14(1): 30-38.
- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E (2004) The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* 51(3-4): 146-153.
- Olinski R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M et al. (2007) Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol* 54(1): 11-26.
- Olkku A, Mahonen A (2009) Calreticulin mediated glucocorticoid receptor export is involved in beta-catenin translocation and Wnt signalling inhibition in human osteoblastic cells. *Bone* 44(4): 555-565.
- Orimo H (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77(1): 4-12.
- Ostan R, Bucci L, Capri M, Salvioli S, Scurti M et al. (2008) Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation* 15(4-6): 224-240.

- Ozaki Y, Nishimura M, Sekiya K, Suehiro F, Kanawa M et al. (2007) Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16(1): 119-129.
- Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH (2002) IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 169(6): 3353-3362.
- Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT (2009) Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med* 51(1): 25-41.
- Paulsson Y, Bywater M, Pfeifer-Ohlsson S, Ohlsson R, Nilsson S et al. (1986) Growth factors induce early pre-replicative changes in senescent human fibroblasts. *Embo J* 5(9): 2157-2162.
- Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ (2008) Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(52): 20764-20769.
- Pereira RM, Delany AM, Durant D, Canalis E (2002) Cortisol regulates the expression of Notch in osteoblasts. *J Cell Biochem* 85(2): 252-258.
- Pernow Y, Granberg B, Saaf M, Weidenhielm L (2006) Osteoblast dysfunction in male idiopathic osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 78(2): 90-97.
- Pichova A, Vondrakova D, Breitenbach M (1997) Mutants in the *Saccharomyces cerevisiae* RAS2 gene influence life span, cytoskeleton, and regulation of mitosis. *Can J Microbiol* 43(8): 774-781.
- Piters E, Boudin E, Van Hul W (2008) Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys* 473(2): 112-116.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.
- Pizzatti L, Binato R, Cofre J, Gomes BE, Dobbin J et al. (2010) SUZ12 is a candidate target of the non-canonical WNT pathway in the progression of chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 49(2): 107-118.
- Pochampally RR, Ylostalo J, Penforis P, Matz RR, Smith JR et al. (2007) Histamine receptor H1 and dermatopontin: new downstream targets of the vitamin D receptor. *J Bone Miner Res* 22(9): 1338-1349.
- Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B et al. (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.
- Prowse KR, Greider CW (1995) Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 4818-4822.
- Quarles LD (2008) Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest* 118(12): 3820-3828.
- Rael LT, Bar-Or R, Salottolo K, Mains CW, Slone DS et al. (2009) Injury severity and serum amyloid A correlate with plasma oxidation-reduction potential in multi-trauma patients: a retrospective analysis. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 17(1): 57.
- Rahmani P, Morin S (2009) Prevention of osteoporosis-related fractures among postmenopausal women and older men. *Cmaj* 181(11): 815-820.
- Ralston SH (2005) Genetic determinants of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 17(4): 475-479.
- Ramos JW (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 40(12): 2707-2719.
- Raouf A, Seth A (2002) Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone* 30(3): 463-471.
- Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18(10): 1842-1853.
- Rawn SM, Cross JC (2008) The evolution, regulation, and function of placenta-specific genes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 159-181.

- Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K et al. (2009) Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med* 151(8): 528-537.
- Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M et al. (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.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (2000) Primary osteoporosis in men: role of sex steroid deficiency. *Mayo Clin Proc* 75 Suppl: S46-50.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23(3): 279-302.
- Rizzoli R, Fleisch H, Bonjour JP (1977) Effect of thyroparathyroidectomy of calcium metabolism in rats: role of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Am J Physiol* 233(3): E160-164.
- Robles SJ, Adami GR (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16(9): 1113-1123.
- Robling AG, Stout SD (1999) Morphology of the drifting osteon. *Cells Tissues Organs* 164(4): 192-204.
- Robling AG, Bellido T, Turner CH (2006) Mechanical stimulation in vivo reduces Osteocyte expression of sclerostin. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6(4): 354.
- Rodriguez JP, Montecinos L, Rios S, Reyes P, Martinez J (2000) Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem* 79(4): 557-565.
- Rojas M, Yao S, Lin YZ (1996) Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. *J Biol Chem* 271(44): 27456-27461.
- Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM (2009) Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19(2): 109-124.
- Rosen H, Krichevsky A, Polakiewicz RD, Benzakine S, Bar-Shavit Z (1995) Developmental regulation of proenkephalin gene expression in osteoblasts. *Mol Endocrinol* 9(11): 1621-1631.
- Ross FP, Teitelbaum SL (2005)  $\alpha$ v $\beta$ 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 208: 88-105.
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC et al. (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289(5481): 950-953.
- Ruas M, Peters G (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378(2): F115-177.
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ et al. (1999) Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 96(5): 701-712.
- Ruzankina Y, Asare A, Brown EJ (2008) Replicative stress, stem cells and aging. *Mech Ageing Dev* 129(7-8): 460-466.
- Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y et al. (2006) Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *Embo J* 25(24): 5840-5851.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S et al. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131(2): 324-336.
- Sahin E, Depinho RA (2010) Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 464(7288): 520-528.
- Sahin NH, Bal MD, Boga NM, Gokdemirel S, Taspinar A (2011) Women's perception of the menopause and hormone treatment: barriers against hormone therapy. *Climacteric* 13(6): 152-156.
- Samoshkin A, Arnautov A, Jansen LE, Ouspenski I, Dye L et al. (2009) Human condensin function is essential for centromeric chromatin assembly and proper sister kinetochore orientation. *PLoS One* 4(8): e6831.

- Sanada F, Taniyama Y, Azuma J, Iekushi K, Dosaka N et al. (2009) Hepatocyte growth factor, but not vascular endothelial growth factor, attenuates angiotensin II-induced endothelial progenitor cell senescence. *Hypertension* 53(1): 77-82.
- Sandhu C, Donovan J, Bhattacharya N, Stampfer M, Worland P et al. (2000) Reduction of Cdc25A contributes to cyclin E1-Cdk2 inhibition at senescence in human mammary epithelial cells. *Oncogene* 19(47): 5314-5323.
- Saulnier N, Lattanzi W, Puglisi MA, Pani G, Barba M et al. (2009) Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 13 Suppl 1: 71-78.
- Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z et al. (2001) Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem* 276(39): 36770-36778.
- Scharfenberger M, Ortiz J, Grau N, Janke C, Schiebel E et al. (2003) Nsl1p is essential for the establishment of bipolarity and the localization of the Dam-Duo complex. *Embo J* 22(24): 6584-6597.
- Schinke T, Gebauer M, Schilling AF, Lamprianou S, Priemel M et al. (2008) The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone* 42(3): 524-534.
- Schneider MR, Sibilia M, Erben RG (2009) The EGFR network in bone biology and pathology. *Trends Endocrinol Metab* 20(10): 517-524.
- Schulze J, Seitz S, Saito H, Schneebauer M, Marshall RP et al. (2010) Negative regulation of bone formation by the transmembrane Wnt antagonist Kremen-2. *PLoS One* 5(4): e10309.
- Schutze N, Schenk R, Fiedler J, Mattes T, Jakob F et al. (2007) CYR61/CCN1 and WISP3/CCN6 are chemoattractive ligands for human multipotent mesenchymal stroma cells. *BMC Cell Biol* 8: 45.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88(5): 593-602.
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A (2006) Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5(1): 91-116.
- Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ (2000) Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* 257(1): 162-171.
- Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y et al. (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113(4): 561-568.
- Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G (2005) Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res* 23(5): 1013-1021.
- Silver J, Bushinsky D (2004) Harnessing the parathyroids to create stronger bones. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13(4): 471-476.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2): 309-319.
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K et al. (2002) Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20(6): 592-596.
- Sims NA, Gooi JH (2008) Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 19(5): 444-451.
- Sipponen P, Harkonen M (2010) Hypochlorhydric stomach: a risk condition for calcium malabsorption and osteoporosis? *Scand J Gastroenterol* 45(2): 133-138.
- Sliwiska MA, Mosieniak G, Wolanin K, Babik A, Piwocka K et al. (2009) Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev* 130(1-2): 24-32.
- Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Canalis E (2010) Connective tissue growth factor (CTGF) transactivates nuclear factor of activated T-cells (NFAT) in cells of the osteoblastic lineage. *J Cell Biochem* 110(2): 477-483.

- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002) Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 33(5): 575-586.
- Sohr S, Engeland K (2008) RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* 7(21): 3448-3460.
- St-Arnaud R (2008) The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 473(2): 225-230.
- Standal T, Abildgaard N, Fagerli UM, Stordal B, Hjertner O et al. (2007) HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma. *Blood* 109(7): 3024-3030.
- Steel DM, Whitehead AS (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15(2): 81-88.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33(6): 919-926.
- Stenderup K, Justesen J, Eriksen EF, Rattan SI, Kassem M (2001) Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 16(6): 1120-1129.
- Sterck JG, Klein-Nulend J, Lips P, Burger EH (1998) Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress in vitro. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1): E1113-1120.
- Stix B, Kahne T, Sletten K, Raynes J, Roessner A et al. (2001) Proteolysis of AA amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases-1, -2, and -3. *Am J Pathol* 159(2): 561-570.
- Stolzing A, Scutt A (2006) Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell* 5(3): 213-224.
- Sugo N, Oshiro H, Takemura M, Kobayashi T, Kohno Y et al. (2010) Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. *Eur J Neurosci* 31(9): 1521-1532.
- Sun LQ, Arceci RJ (2005) Altered epigenetic patterning leading to replicative senescence and reduced longevity. A role of a novel SNF2 factor, PASG. *Cell Cycle* 4(1): 3-5.
- Sun LQ, Lee DW, Zhang Q, Xiao W, Raabe EH et al. (2004) Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev* 18(9): 1035-1046.
- Suzuki K, Haraguchi R, Ogata T, Barbieri O, Alegria O et al. (2008) Abnormal urethra formation in mouse models of split-hand/split-foot malformation type 1 and type 4. *Eur J Hum Genet* 16(1): 36-44.
- Sweet MG, Sweet JM, Jeremiah MP, Galazka SS (2009) Diagnosis and treatment of osteoporosis. *Am Fam Physician* 79(3): 193-200.
- Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H et al. (2010) Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394(4): 1093-1097.
- Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S (2007) Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 182-195.
- Tamma R, Colaianni G, Zhu LL, DiBenedetto A, Greco G et al. (2009) Oxytocin is an anabolic bone hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(17): 7149-7154.
- Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T et al. (2008) Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem* 144(3): 399-408.
- Tanaka H, Liang CT (1995) Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. *J Cell Physiol* 164(2): 367-375.
- Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C et al. (2009) TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 15(7): 757-765.
- Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T et al. (2007) Targeted ablation of Osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 5(6): 464-475.

- Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20(15): 1803-1815.
- ten Dijke P, Arthur HM (2007) Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 857-869.
- ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Lowik CW, van Bezooijen RL (2008) Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1: 31-35.
- Teplyuk NM, Galindo M, Teplyuk VI, Pratap J, Young DW et al. (2008) Runx2 regulates G protein-coupled signaling pathways to control growth of osteoblast progenitors. *J Biol Chem* 283(41): 27585-27597.
- Terkeltaub RA (2001) Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(1): C1-C11.
- Thaler R, Karlic H, Spitzer S, Klaushofer K, Varga F (2010) Extra-cellular matrix suppresses expression of the apoptosis mediator Fas by epigenetic DNA methylation. *Apoptosis* 15(6): 728-737.
- Thorn CF, Lu ZY, Whitehead AS (2004) Regulation of the human acute phase serum amyloid A genes by tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines. *Scand J Immunol* 59(2): 152-158.
- Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko KA, Kooshesh F, Walton P et al. (2006) Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol* 175(6): 1017-1028.
- Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES et al. (2008) Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 26(1): 99-107.
- Tremollieres F, Ribot C (2010) Bone mineral density and prediction of non-osteoporotic disease. *Maturitas* 65(4): 348-351.
- Trost Z, Trebse R, Prezelj J, Komadina R, Logar DB et al. (2010) A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone* 46(1): 72-80.
- Tsuchida K, Matsuzaki T, Yamakawa N, Liu Z, Sugino H (2001) Intracellular and extracellular control of activin function by novel regulatory molecules. *Mol Cell Endocrinol* 180(1-2): 25-31.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5116-5121.
- Tzellos TG, Klagas I, Vahtsevanos K, Triaridis S, Printza A et al. (2009) Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Exp Dermatol* 18(12): 1028-1035.
- Uckan D, Kilic E, Sharafi P, Kazik M, Kaya F et al. (2009) Adipocyte differentiation defect in mesenchymal stromal cells of patients with malignant infantile osteopetrosis. *Cytotherapy* 11(4): 392-402.
- Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM et al. (2005) Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 205(2): 194-201.
- Vallon R, Freuler F, Desta-Tsedu N, Robeva A, Dawson J et al. (2001) Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 166(4): 2801-2807.
- Valtieri M, Sorrentino A (2008) The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 217(2): 296-300.
- van der Hilst JC, Yamada T, Op den Camp HJ, van der Meer JW, Drenth JP et al. (2008) Increased susceptibility of serum amyloid A 1.1 to degradation by MMP-1: potential explanation for higher risk of type AA amyloidosis. *Rheumatology (Oxford)* 47(11): 1651-1654.
- Vanderkooi JM, Erecinska M, Silver IA (1991) Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am J Physiol* 260(6 Pt 1): C1131-1150.
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R et al. (2004) Androgens and bone. *Endocr Rev* 25(3): 389-425.
- Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X et al. (2004) Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119(4): 555-566.



- Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D (2008) Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int* 19(11): 1517-1525.
- Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB (2002) Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in Osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* 17(5): 907-914.
- Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K (2004) Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10428-10433.
- Veverka V, Henry AJ, Slocombe PM, Ventom A, Mulloy B et al. (2009) Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation. *J Biol Chem* 284(16): 10890-10900.
- Vijg J, Dolle ME (2007) Genome instability: cancer or aging? *Mech Ageing Dev* 128(7-8): 466-468.
- von Figura G, Hartmann D, Song Z, Rudolph KL (2009) Role of telomere dysfunction in aging and its detection by biomarkers. *J Mol Med* 87(12): 1165-1171.
- Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Jousen S, Ma N et al. (2010) How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging (Albany NY)* 2(4): 224-230.
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S et al. (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3(5): e2213.
- Wagner W, Bork S, Horn P, Kronic D, Walenda T et al. (2009) Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One* 4(6): e5846.
- Wang E, Gundersen D (1984) Increased organization of cytoskeleton accompanying the aging of human fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 154(1): 191-202.
- Wang K, Yamamoto H, Chin JR, Werb Z, Vu TH (2004) Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment. *J Biol Chem* 279(51): 53848-53856.
- Watanabe S, Terazawa K (2006) Age estimation from the degree of osteophyte formation of vertebral columns in Japanese. *Leg Med (Tokyo)* 8(3): 156-160.
- Watson JM, Riha K (2010) Telomeres, Aging, and Plants: From Weeds to Methuselah - A Mini-Review. *Gerontology*.
- Wei S, Dai XM, Stanley ER (2006) Transgenic expression of CSF-1 in CSF-1 receptor-expressing cells leads to macrophage activation, osteoporosis, and early death. *J Leukoc Biol* 80(6): 1445-1453.
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009) The aging of the immune system. *Transpl Int* 22(11): 1041-1050.
- Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P (2009) The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 129(7): 989-997.
- Winkler DG, Yu C, Geoghegan JC, Ojala EW, Skonier JE et al. (2004) Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem* 279(35): 36293-36298.
- Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T et al. (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo J* 22(23): 6267-6276.
- Xi S, Geiman TM, Briones V, Guang Tao Y, Xu H et al. (2009) Lsh participates in DNA methylation and silencing of stem cell genes. *Stem Cells* 27(11): 2691-2702.
- Xian CJ (2007) Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocr Rev* 28(3): 284-296.
- Xiao Z, Zhang S, Cao L, Qiu N, David V et al. (2010) Conditional disruption of Pkd1 in osteoblasts results in osteopenia due to direct impairment of bone formation. *J Biol Chem* 285(2): 1177-1187.
- Yamada Y, Ando F, Shimokata H (2006) Association of polymorphisms in forkhead box C2 and perilipin genes with bone mineral density in community-dwelling Japanese individuals. *Int J Mol Med* 18(1): 119-127.
- Yamaguchi M (2010) Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol Cell Biochem* 338(1-2): 241-254.

- Yamashita J, Datta NS, Chun YH, Yang DY, Carey AA et al. (2008) Role of Bcl2 in osteoclastogenesis and PTH anabolic actions in bone. *J Bone Miner Res* 23(5): 621-632.
- Yan Q, Cho E, Lockett S, Muegge K (2003) Association of Lsh, a regulator of DNA methylation, with pericentromeric heterochromatin is dependent on intact heterochromatin. *Mol Cell Biol* 23(23): 8416-8428.
- Yan X, Liu Z, Chen Y (2009) Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41(4): 263-272.
- Yang H, Youm YH, Dixit VD (2009) Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J Immunol* 183(5): 3040-3052.
- Yang S, Zhang Y, Ries W, Key L (2004) Expression of Nox4 in osteoclasts. *J Cell Biochem* 92(2): 238-248.
- Yang S, Liu T, Li S, Zhang X, Ding Q et al. (2008) Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. *Neuroscience* 154(3): 1107-1120.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA et al. (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. *Anat Rec* 264(1): 51-62.
- Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F et al. (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272(5259): 258-262.
- Yung RL, Julius A (2008) Epigenetics, aging, and autoimmunity. *Autoimmunity* 41(4): 329-335.
- Zambuzzi WF, Yano CL, Cavagis AD, Peppelenbosch MP, Granjeiro JM et al. (2009) Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Mol Cell Biochem* 322(1-2): 143-150.
- Zamore PD (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 8(9): 746-750.
- Zeng J, Wang L, Li Q, Li W, Bjorkholm M et al. (2009) FoxM1 is up-regulated in gastric cancer and its inhibition leads to cellular senescence, partially dependent on p27 kip1. *J Pathol* 218(4): 419-427.
- Zhang G, Nakamura Y, Wang X, Hu Q, Suggs LJ et al. (2007) Controlled release of stromal cell-derived factor-1 alpha in situ increases c-kit+ cell homing to the infarcted heart. *Tissue Eng* 13(8): 2063-2071.
- Zhang Y, Dong XL, Leung PC, Wong MS (2009) Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet. *Bone* 44(1): 46-52.
- Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T et al. (2006) Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4(2): 111-121.
- Zhao M, Ko SY, Liu JH, Chen D, Zhang J et al. (2009) Inhibition of microtubule assembly in osteoblasts stimulates bone morphogenetic protein 2 expression and bone formation through transcription factor Gli2. *Mol Cell Biol* 29(5): 1291-1305.
- Zhao Y, Sun H, Lu J, Li X, Chen X et al. (2005) Lifespan extension and elevated hsp gene expression in *Drosophila* caused by histone deacetylase inhibitors. *J Exp Biol* 208(Pt 4): 697-705.
- Zhou B, Zhou H, Ling S, Guo D, Yan Y et al. (2011) Activation of PAR2 or/and TLR4 promotes SW620 cell proliferation and migration via phosphorylation of ERK1/2. *Oncol Rep* 25(2): 503-511.
- Zhou R, Han L, Li G, Tong T (2009) Senescence delay and repression of p16INK4a by Lsh via recruitment of histone deacetylases in human diploid fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 37(15): 5183-5196.
- Zhou S, LeBoff MS, Glowacki J (2010) Vitamin D metabolism and action in human bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 151(1): 14-22.

## 8 Anhang

### 8.1 Zusatzmaterial

#### 8.1.1 SAM-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression

Tab. 19 Differentiell exprimierte Genprodukte mit Relevanz im NOTCH-Signalweg aus der SAM zu hMSC-alt inklusive Hybridisierungssignale

Gen Symbol	Gen Name	Probeset-ID	FC	q (%)	Hybridisierungssignale hMSC-alt-Populationen				Hybridisierungssignale hMSC-K-Populationen				
					520	559	606	663	276	247	295	296	353
SBNO2	strawberry notch homolog 2	215760_s_at	0,111	0,0	49	119	24	109	763	482	533	641	979
DNER	delta/notch-like EGF repeat containing	226281_at	0,252	6,8	128	603	95	211	1535	2194	100	776	542
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	204864_s_at	0,257	0,2	220	169	208	305	560	1389	774	470	1193
SBNO2	strawberry notch homolog 2	204166_at	0,268	0,2	239	193	316	213	877	1066	517	704	1315
PSEN1	presenilin 1	238816_at	0,287	0,2	190	128	187	95	345	528	747	406	588
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	210756_s_at	0,303	0,0	1974	2172	2227	2525	5591	7367	9548	5689	8541
PSEN1	presenilin 1	207782_s_at	0,337	0,0	584	667	723	701	1825	1764	2350	1642	2335
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	212196_at	0,350	0,2	1805	2573	2800	3574	5377	7954	9560	7626	7830
MAML3	mastermind-like 3	242794_at	0,419	6,8	11	143	71	96	219	98	121	412	110
NCSTN	nicastrin	208759_at	0,421	0,2	1270	1311	1628	1437	3351	3791	2671	3055	3902
CRTC1	CREB regulated transcription coactivator 1	207159_x_at	0,453	1,7	87	247	268	212	525	506	363	301	549
FOXC2	forkhead box C2	214520_at	0,463	3,4	200	102	141	246	332	347	600	188	399
ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	214895_s_at	0,479	2,0	1259	1093	1044	1689	1520	3668	3432	2361	2280
MAML2	mastermind-like 2	235106_at	0,506	1,3	705	325	303	509	922	849	812	890	1077
NOTCH4	Notch homolog 4	205247_at	0,527	3,8	186	100	201	119	356	391	279	171	237
RBM15	RNA binding motif protein 15	1555761_x_at	0,554	12,7	296	257	383	287	823	337	799	253	544
MKL1	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1	212748_at	0,580	3,4	730	805	646	540	1128	1002	950	1096	1685
NRG1	neuregulin 1	208241_at	0,600	52,1	618	490	588	272	1721	227	282	276	1594
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	201502_s_at	0,604	3,4	4810	3634	3762	2397	5208	5398	5979	6976	6669
ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	202604_x_at	0,605	6,8	1529	1205	1418	2277	1642	3398	3017	2636	2592
RBM15	RNA binding motif protein 15	1555760_a_at	0,608	1,7	1229	1140	1002	1041	1612	2005	1852	1503	2104
NOTCH2 NL	Notch homolog 2 N-terminal like	227067_x_at	0,633	33,6	2675	3045	3012	2929	3046	3359	1117 5	2994	2440
NRG1	neuregulin 1	208230_s_at	0,643	29,0	409	416	784	350	1035	444	505	358	1470
PSEN1	presenilin 1	226577_at	0,680	6,8	1781	1322	1211	1284	2043	1614	2223	2450	1954
SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like	202064_s_at	0,682	15,9	456	591	825	657	596	1167	885	728	1261
NOTCH3	Notch homolog 3	203238_s_at	0,706	24,5	2809	1053	974	1967	3407	2309	2047	1097	3192
APH1A	anterior pharynx defective 1 homolog A	1554417_s_at	0,715	11,1	675	478	827	579	810	727	1006	850	1079
TP63	tumor protein p63	209863_s_at	0,742	50,6	291	223	166	508	782	92	442	223	461
NOTCH2 NL	Notch homolog 2 N-terminal like	214722_at	0,755	24,5	2521 3	1611 8	1199 9	9903	3118 8	1541 7	2019 4	2104 2	16790
RBM15	RNA binding motif protein 15	228455_at	0,766	31,5	240	104	182	199	163	184	215	410	212
RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	229540_at	0,771	29,0	396	144	234	171	448	175	318	282	311
MESP2	mesoderm posterior 2 homolog	1556015_a_at	0,773	29,0	222	389	358	332	575	276	380	353	520
POFUT1	protein O-fucosyltransferase 1	212349_at	0,774	29,0	507	1067	751	829	874	1322	999	1273	628
MIB2	mindbomb homolog 2	228261_at	0,776	31,5	445	334	425	228	559	367	316	393	669
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	211277_x_at	0,780	22,2	1099	450	387	288	850	535	571	791	816
SPEN	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	1556059_s_at	0,803	33,6	855	796	787	955	1151	1009	799	778	1548

Anhang

MIB1	mindbomb homolog 1	224725_at	0,807	22,2	2229	2254	2326	3014	2453	3110	3455	3282	2916
APH1B	anterior pharynx defective 1 homolog B (C. elegans)	221036_s_at	0,829	26,8	1007	1178	956	1051	1113	1333	1225	1131	1518
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	44783_s_at	0,863	57,7	123	177	218	132	177	213	64	163	322
RBM15	RNA binding motif protein 15	1555762_s_at	0,889	41,3	1947	1604	1096	1520	2126	1576	1796	1647	1528
RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	211974_x_at	0,890	49,0	2173 0	1377 1	1567 5	9726	2226 7	1028 8	1638 4	2282 3	13775
HES7	hairy and enhancer of split 7	224548_at	0,894	41,3	255	226	101	249	219	246	234	198	264
NRG1	neuregulin 1	208231_at	0,903	56,9	263	173	391	147	342	136	124	126	621
DTX3	deltex homolog 3 (Drosophila)	235721_at	0,927	60,6	924	931	1163	940	1563	1091	602	640	1440
FOXC1	forkhead box C1	213260_at	0,958	58,4	6430	3002	5637	4264	3286	2809	7124	8665	3340
PSENE1	presenilin enhancer 2 homolog	218302_at	0,969	56,9	1880	1395	2525	2392	1595	2391	2671	1892	2020
PSEN1	presenilin 1	203460_s_at	0,990	59,7	2901	3455	4020	3804	3216	3284	4070	3743	3595
RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	207785_s_at	0,997	60,1	1766 8	1310 6	1377 3	8759	1313 3	8086	1393 6	1941 3	12252
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17	205745_x_at	1,012	60,3	3423	2097	2075	2134	2397	2254	2509	2215	2648
HEYL	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	226828_s_at	1,013	60,1	209	92	198	240	141	125	231	213	201
DTX4	deltex homolog 4 (Drosophila)	212611_at	1,018	50,6	237	87	154	159	57	329	139	146	112
PSEN2	presenilin 2	211373_s_at	1,024	54,7	340	441	510	550	325	691	336	403	492
PSEN2	presenilin 2	204262_s_at	1,045	50,6	515	557	485	629	525	560	424	359	747
NRG1	neuregulin 1	206343_s_at	1,078	56,9	1687	3543	3553	953	3174	2825	1277	930	3082
WDR12	WD repeat domain 12	218512_at	1,097	45,3	2208	3098	2957	3039	2124	3973	1670	2091	3023
JAG2	jagged 2	32137_at	1,098	41,3	310	304	212	244	467	154	169	134	293
MIB1	mindbomb homolog 1	224720_at	1,106	45,3	4919	3709	4713	5508	3755	4010	4994	4051	4494
JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)	209098_s_at	1,184	47,1	1211	556	508	1587	411	857	1510	856	444
MIB2	Mindbomb homolog 2	241541_at	1,187	38,8	382	272	515	418	310	350	343	365	302
MIB1	mindbomb homolog 1	224722_at	1,192	41,3	792	995	980	1709	712	670	1249	1267	797
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	202445_s_at	1,206	33,6	1239	1153	845	869	1042	804	931	666	814
SPEN	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	201997_s_at	1,213	26,8	2950	2898	3031	3113	2930	2465	2023	2210	2730
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17	205746_s_at	1,238	29,0	879	597	706	743	454	489	850	547	614
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	212377_s_at	1,242	24,5	2839 6	2522 8	2290 0	2142 0	2062 1	1763 3	2245 6	1903 5	18866
MAML1	mastermind-like 1 (Drosophila)	202360_at	1,279	15,9	3621	3570	3611	3470	2521	3235	2727	2754	2707
RBM15	RNA binding motif protein 15	219286_s_at	1,280	22,2	3761	3972	3230	3228	2990	2270	3167	3071	2363
APH1B	anterior pharynx defective 1 homolog B (C. elegans)	226358_at	1,290	19,8	1250	917	988	910	922	763	721	824	711
SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like	202062_s_at	1,361	26,8	2467	1089	1800	1590	1634	1046	1115	842	1745
MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	235457_at	1,362	26,8	1012 6	5567	5226	5277	6576	4507	3778	5304	3883
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	202443_x_at	1,371	15,9	3641 7	3265 3	2645 8	2589 8	2224 2	2192 1	2660 9	1973 1	20212
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	212195_at	1,375	14,3	3231 1	3023 6	2833 0	3337 8	2037 8	2111 6	2715 7	2570 6	18622
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	218902_at	1,386	22,2	1367	1163	1014	686	697	773	748	984	612
SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like	202063_s_at	1,394	33,6	272	175	515	486	188	246	262	304	300
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	200602_at	1,459	12,7	1743 6	1654 9	1572 3	1447 9	1429 4	8243	9913	1323 0	9312
SEL1L	sel-1 suppressor of lin-12-like	202061_s_at	1,462	15,9	1062 6	7276	1299 1	1268 2	7804	6209	6736	7927	8586
ADAM17	ADAM metalloproteinase domain 17	213532_at	1,469	11,1	2961	2867	3312	2926	1818	1488	2433	2304	2225
APH1A	anterior pharynx defective 1 homolog A (C. elegans)	237327_at	1,494	14,3	133	198	172	237	153	137	130	86	114
HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	219743_at	1,510	29,0	55	212	305	228	262	16	166	60	158
NRG1	neuregulin 1	206237_s_at	1,513	26,8	1732	1487	2711	635	1674	782	545	291	2130
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	204863_s_at	1,606	11,1	2094	2498	2331	3227	1583	908	1744	2352	1312
JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)	209099_x_at	1,643	15,9	1739 0	8627	8722	1727 2	5180	6783	1307 3	8740	5790
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	211000_s_at	1,688	5,2	1905	1794	2442	2574	1154	1086	1345	1522	1345
APH1A	anterior pharynx defective 1 homolog A (C. elegans)	218389_s_at	1,690	3,8	4889	4896	5192	4483	3430	2199	2944	3150	2670
---	---	211193_at	1,763	17,7	54	224	131	122	174	77	10	23	92

JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)	216268_s_at	2,002	11,1	1579 6	6528	6729	1478 3	3447	4857	1005 4	5520	3497
SPEN	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	201996_s_at	2,249	4,5	3122	1780	2868	2009	1825	496	982	1195	939
MIB1	mindbomb homolog 1	224726_at	2,292	2,8	6307	4900	6087	6368	2893	1098	3104	3058	2754
CFD	complement factor D (adipsin)	205382_s_at	2,592	10,0	1005	1247	1066	234	248	21	957	474	12
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	214953_s_at	2,709	0,8	2746 1	2454 1	2254	1864 3	5547	5645	7701	1306 2	11039
JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)	231183_s_at	3,212	1,3	1540	907	794	2135	414	382	582	497	217
SBNO1	strawberry notch homolog 1	218737_at	3,402	0,4	930	1221	1742	1359	282	476	417	237	518
FOXC1	forkhead box C1	1553613_s_at	4,066	0,2	1482 3	8519	1536 7	1302 7	2001	3141	4426	4345	1994
SEL1L	Sel-1 suppressor of lin-12-like	230265_at	4,545	0,0	3150	3279	5004	6183	1304	929	945	830	838

Angegeben sind die Genexpressionsänderungen (FC) beim Vergleich von hMSC-alt zu hMSC-K und die Falsch-Positiv-Rate (q) in Prozent. Die Hybridisierungssignale wurden zuvor normalisiert von PD Dr. L. Klein-Hitpass. Die Sequenz eines Probesets konnte noch keinem Gen zugeordnet werden (---).

Tab. 20 Überlappend, differentiell exprimierte Genprodukte aus den SAM von hMSC-alt, hMSC-seneszent und hMSC-OP

Gen Symbol	Gen Name	Probeset-ID	hMSC-seneszent		hMSC-alt		hMSC-OP	
			FC	q (%)	FC	q (%)	FC	q (%)
---	---	1555929_s_at	0,185	2,4	0,850	49,0	0,178	3,9
---	---	1556416_s_at	0,582	8,0	0,330	0,4	0,179	0,0
---	---	214078_at	0,133	0,6	1,620	17,7	0,206	1,4
---	---	236277_at	0,121	0,0	1,063	54,7	0,247	1,4
---	---	1555854_at	1,271	56,1	0,187	1,5	0,280	9,0
---	---	235846_at	0,449	0,3	1,128	41,3	0,285	0,0
---	---	238563_at	1,262	43,8	0,185	0,4	0,308	4,4
---	---	1560661_x_at	0,568	7,0	0,590	9,0	0,336	3,9
---	---	241693_at	0,938	48,6	0,498	5,2	0,363	2,7
---	---	241696_at	0,423	1,2	1,413	19,8	0,386	5,7
---	---	221973_at	0,615	7,0	1,268	36,2	0,397	4,9
---	---	237216_at	0,490	9,5	0,457	4,5	0,401	9,0
---	---	224047_at	1,757	9,5	0,412	3,8	0,405	9,0
---	---	215387_x_at	0,588	9,5	0,823	47,1	0,412	6,3
---	---	240141_at	0,647	17,7	0,387	2,8	0,416	6,3
---	---	1556682_s_at	0,408	4,2	0,262	0,4	0,434	9,0
---	---	227995_at	0,143	0,0	1,158	38,8	0,436	9,0
---	---	243108_at	0,884	38,3	0,499	3,8	0,437	7,3
---	---	224107_at	0,407	3,4	0,581	10,0	0,444	5,7
---	---	242277_at	2,819	0,6	0,298	0,4	0,463	4,9
---	---	235609_at	0,273	0,2	1,041	57,7	0,480	8,2
---	---	228481_at	0,502	8,0	1,521	38,8	0,483	8,2
---	---	239170_at	1,559	26,5	0,486	2,3	0,485	7,3
---	---	242890_at	0,197	0,4	0,840	31,5	0,488	4,9
---	---	210717_at	0,904	35,6	0,270	0,8	0,488	8,2
---	---	239449_at	0,828	32,6	0,567	5,2	0,502	4,4
---	---	239515_at	0,477	4,2	0,845	31,5	0,504	4,9
---	---	234074_at	0,839	38,3	0,528	5,2	0,514	8,2
---	---	240544_at	0,946	46,3	0,498	5,2	0,528	8,2
---	---	230461_s_at	0,506	2,7	0,169	0,0	0,530	10,3
---	---	235207_at	0,617	5,8	0,835	36,2	0,543	5,7
---	---	242480_at	0,559	9,5	0,496	5,2	0,564	17,3
---	---	1556216_s_at	0,617	4,2	0,924	47,1	0,572	8,2
---	---	1558750_a_at	0,139	0,2	0,854	29,0	0,583	3,9
---	---	1557275_a_at	2,151	7,0	2,767	1,7	0,588	17,3
---	---	230733_at	0,586	1,2	0,603	6,1	0,592	6,3
---	---	232796_at	0,405	7,0	0,465	5,2	0,605	19,0
---	---	231034_s_at	0,515	5,8	0,340	0,2	0,606	12,8
---	---	239979_at	0,209	1,0	0,589	9,0	0,630	17,3
---	---	1556322_a_at	0,636	8,0	0,496	6,8	0,648	15,8
---	---	238875_at	0,334	2,4	0,203	0,4	0,651	28,4

## Anhang

---	---	229490_s_at	0,079	0,0	0,136	0,0	0,662	20,9
---	---	243315_at	0,385	2,4	0,493	4,5	0,667	20,9
---	---	233014_at	0,424	4,8	0,492	5,2	0,704	26,2
---	---	231274_s_at	0,517	3,4	0,193	0,0	0,715	19,0
---	---	236778_at	0,574	5,8	0,264	0,3	0,724	24,3
---	---	236882_at	0,439	2,7	0,543	9,0	0,763	26,2
---	---	231042_s_at	2,006	4,2	1,907	6,1	0,792	34,3
---	---	235589_s_at	0,600	3,4	0,254	0,0	0,799	28,4
---	---	230790_x_at	1,734	7,0	1,824	6,8	0,801	36,5
---	---	227897_at	0,648	9,5	0,315	0,2	0,802	34,3
---	---	242245_at	1,743	1,6	1,755	2,3	0,846	32,3
---	---	228030_at	0,347	0,0	0,157	0,0	0,852	36,5
---	---	240263_at	0,378	7,0	0,389	6,8	0,856	49,0
---	---	230088_at	0,482	7,0	0,523	6,1	0,881	43,9
---	---	239808_at	0,425	2,7	0,524	6,8	0,885	42,2
---	---	1556543_at	0,663	7,0	0,628	7,9	0,919	38,5
---	---	238932_at	0,549	7,0	0,567	9,0	0,962	58,6
---	---	242769_at	0,552	8,0	0,253	0,5	0,975	49,0
---	---	224037_at	2,722	0,5	1,841	6,8	—	—
---	---	244372_at	0,321	4,2	0,189	0,4	1,006	42,2
---	---	238363_at	0,457	9,5	0,350	3,4	1,064	61,3
---	---	232347_x_at	0,593	4,8	0,630	5,2	1,065	62,0
---	---	1563797_at	0,663	8,0	0,551	3,4	1,080	58,6
---	---	1569362_at	0,494	4,2	0,567	9,0	1,081	60,2
---	---	230074_s_at	0,649	8,0	0,360	1,3	1,090	49,0
---	---	212608_s_at	1,750	2,4	1,911	1,7	1,099	56,7
---	---	240397_x_at	0,166	1,0	0,467	5,2	1,112	50,6
---	---	239140_at	1,610	8,0	2,072	6,8	1,116	57,7
---	---	242717_at	0,651	5,8	0,576	3,8	1,190	36,5
---	---	228222_at	0,626	7,0	0,453	0,5	1,223	47,4
---	---	239329_at	1,611	5,8	1,677	6,8	1,239	42,2
---	---	225725_at	1,868	1,0	1,873	5,2	1,358	14,2
---	---	230130_at	0,381	1,6	0,365	1,1	1,478	28,4
---	---	233757_x_at	0,909	38,3	1,646	7,9	1,539	8,2
---	---	213705_at	1,433	13,2	2,694	0,6	1,570	9,0
---	---	228582_x_at	3,412	0,4	2,004	5,2	1,645	11,7
---	---	214001_x_at	1,376	8,0	3,575	0,0	1,646	7,3
---	---	228850_s_at	0,432	1,6	1,929	6,1	1,685	5,7
---	---	241724_x_at	1,555	9,5	1,974	4,5	1,722	8,2
---	---	213813_x_at	2,590	7,0	2,732	1,5	1,751	11,7
---	---	228639_at	1,659	5,8	1,511	12,7	1,804	3,5
---	---	237438_at	1,744	1,6	1,453	12,7	1,872	3,5
---	---	214848_at	1,874	23,2	2,132	3,4	1,898	7,3
---	---	242206_at	0,305	7,0	2,409	6,1	1,914	9,0
---	---	215182_x_at	0,987	54,1	1,949	3,4	1,921	9,0
---	---	225767_at	0,464	0,6	1,835	7,9	1,981	9,0
---	---	217363_x_at	1,807	8,0	1,057	56,9	2,009	3,9
---	---	1563283_at	1,468	41,2	2,195	9,0	2,139	2,2
---	---	1563302_at	1,926	3,4	0,713	15,9	2,180	3,2
---	---	1555970_at	0,576	5,8	2,036	3,8	2,199	4,4
---	---	236229_at	0,955	48,6	1,751	9,0	2,200	1,4
---	---	230862_at	2,263	3,4	—	—	2,806	0,9
---	---	1559066_at	2,404	1,4	0,831	45,3	2,880	2,2
---	---	1556520_at	1,766	7,0	1,914	6,8	3,070	2,5
---	---	244787_at	4,823	0,5	2,099	6,8	—	—
---	---	237386_at	2,102	4,2	2,572	4,5	—	—
ABHD3	abhydrolase domain containing 3	213017_at	0,233	0,0	0,716	29,0	0,441	7,3
ABI2	abl-interactor 2	207268_x_at	0,628	2,7	0,628	6,1	1,376	20,9
ABI2	abl-interactor 2	211793_s_at	0,616	1,6	0,550	1,1	1,425	14,2
ACADS	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	202366_at	0,654	5,8	0,623	4,5	1,108	50,6
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	200710_at	0,504	0,9	0,516	1,1	0,977	56,7
ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	222592_s_at	0,448	7,0	0,435	5,2	0,578	19,0
ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	202604_x_at	1,527	17,7	0,605	6,8	0,527	6,3
ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12	215613_at	0,565	5,8	0,741	24,5	0,515	9,0
AGRN	agrin	212285_s_at	0,510	2,0	0,424	1,3	1,640	12,8
AGRN	agrin	217419_x_at	0,516	3,4	0,380	1,0	1,853	3,5
AHSA2	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)	226665_at	0,543	4,8	0,594	5,2	0,713	19,0
AIG1	androgen-induced 1	232810_at	0,521	2,7	0,550	5,2	1,239	42,2

AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1	1562102_at	0,857	54,1	0,129	0,7	0,213	4,4
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	207163_s_at	0,602	2,7	0,425	0,2	1,275	20,9
ALDH1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	215798_at	1,523	8,0	1,743	6,8	—	—
AMOTL2	angiomotin like 2	203002_at	1,236	43,8	1,724	9,0	1,516	6,3
ANKRD10	Ankyrin repeat domain 10	227260_at	0,609	4,8	0,323	0,2	0,687	19,0
ANKRD11	ankyrin repeat domain 11	234701_at	0,513	3,4	5,988	0,0	0,461	4,4
ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36B	220940_at	0,564	8,0	2,002	12,7	0,480	7,3
ANLN	anillin, actin binding protein	1552619_a_at	0,061	0,0	0,424	2,8	0,432	7,3
ANP32E	acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member E	208103_s_at	0,644	9,5	0,873	43,5	0,464	3,9
APBB1IP	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein	219994_at	2,616	1,4	0,285	1,0	2,268	1,9
APOBEC3C	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C	209584_x_at	0,585	1,0	0,442	0,0	1,433	9,0
ARF3	ADP-ribosylation factor 3	211622_s_at	0,639	9,5	0,337	0,5	0,975	62,0
ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1	203174_s_at	0,330	0,7	0,474	1,3	0,724	19,0
ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	1552627_a_at	1,913	1,4	1,691	7,9	1,272	43,9
ARHGDI1	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	1555812_a_at	0,421	9,5	0,387	4,5	0,860	45,7
ARHGGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	235412_at	0,364	2,7	0,456	6,1	1,530	36,5
ARL6IP1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1	211935_at	0,585	0,5	0,758	17,7	0,578	4,4
ARL6IP6	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 6	225711_at	0,612	2,0	1,056	50,6	0,598	6,3
ARSB	arylsulfatase B	232197_x_at	1,876	4,2	3,079	1,7	0,491	6,3
ASAP1	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1	236533_at	1,166	43,8	2,131	3,8	2,024	4,9
ASF1B	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (S. cerevisiae)	218115_at	0,215	0,5	0,514	6,1	1,019	62,0
ASPH	aspartate beta-hydroxylase	209135_at	2,194	2,7	1,872	5,2	1,330	20,9
ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated	219918_s_at	0,111	0,0	0,726	14,3	0,458	4,4
ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	218782_s_at	0,503	2,0	0,858	33,6	0,560	6,3
ATG4C /// CTR9	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae) /// Ctr9, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog	228190_at	0,796	20,4	0,639	6,1	0,626	9,0
ATOH8	Atonal homolog 8 (Drosophila)	1558705_at	1,725	9,5	—	—	2,568	6,3
ATP6V0E1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1	214149_s_at	1,773	5,8	5,184	0,0	1,246	32,3
ATP8B3	ATPase, class I, type 8B, member 3	1554704_at	0,550	7,0	0,974	54,7	0,567	8,2
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked	211022_s_at	1,506	11,2	0,425	1,7	0,510	9,0
ATXN3	ataxin 3	216657_at	0,526	5,8	0,594	9,0	0,538	10,3
AURKA	aurora kinase A	208079_s_at	0,201	0,0	0,537	6,1	0,467	4,9
AURKA	aurora kinase A	204092_s_at	0,239	0,0	0,555	5,2	0,519	6,3
AURKB	aurora kinase B	209464_at	0,107	0,0	0,482	1,7	0,799	26,2
B3GNTL1	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-like 1	213589_s_at	0,159	0,0	0,520	2,0	0,565	9,0
BAALC	brain and acute leukemia, cytoplasmic	222780_s_at	0,220	1,4	0,469	6,8	0,916	58,6
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	205345_at	0,190	1,2	0,506	5,2	0,844	40,4
BAT1	HLA-B associated transcript 1	200041_s_at	0,584	5,8	0,299	0,2	1,223	34,3
BAT2D1	BAT2 domain containing 1	214052_x_at	1,882	7,0	2,089	6,8	0,593	14,2
BBX	bobby sox homolog (Drosophila)	213016_at	0,984	58,8	0,469	1,1	0,583	9,0
BCL2L1	BCL2-like 1	215037_s_at	1,722	8,0	0,331	0,4	1,877	4,9
BGLAP	bone gamma-carboxylglutamate (gla) protein	206956_at	0,595	3,4	0,568	7,9	1,112	59,5
BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40	201169_s_at	0,396	4,8	0,190	0,3	1,785	8,2
BIN1	bridging integrator 1	210202_s_at	0,465	3,4	0,411	0,8	1,433	19,0
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5	202094_at	0,071	0,0	0,593	6,8	0,459	6,3
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5	202095_s_at	0,049	0,0	0,634	9,0	0,500	4,4
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5	210334_x_at	0,133	0,4	0,596	7,9	0,653	15,8
BLVRA	biliverdin reductase A	203773_x_at	0,574	0,7	1,362	14,3	0,652	9,0
BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene	202265_at	1,520	1,6	1,641	3,8	0,710	8,2
BMP1	bone morphogenetic protein 1	205574_x_at	0,623	7,0	0,348	0,3	1,183	36,5
BNC2	basonuclin 2	229942_at	0,545	4,8	0,617	11,1	0,538	9,0
BRCA2	breast cancer 2, early onset	208368_s_at	0,259	1,2	0,403	2,8	0,687	28,4
BTBD7	BTB (POZ) domain containing 7	224943_at	0,968	54,1	0,468	0,7	0,631	9,0
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	200921_s_at	0,763	23,2	2,393	6,1	3,173	0,0
BTN3A2	butyrophilin, subfamily 3, member A2	212613_at	0,421	1,6	0,558	6,1	0,744	26,2
BTN3A2	butyrophilin, subfamily 3, member A2	209846_s_at	0,496	0,9	0,491	2,0	0,777	26,2
BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	215509_s_at	0,054	0,0	0,097	0,0	0,736	22,6
C11orf82	chromosome 11 open reading frame 82	228281_at	0,158	0,3	0,773	24,5	0,378	2,5
C12orf48	chromosome 12 open reading frame 48	220060_s_at	0,544	1,6	0,566	3,8	0,664	15,8
C12orf69	chromosome 12 open reading frame 69	237484_at	2,179	4,8	1,066	49,0	3,062	3,2
C14orf106	chromosome 14 open reading frame 106	206500_s_at	0,480	0,9	0,954	47,1	0,546	8,2
C14orf106	Chromosome 14 open reading frame 106	241816_at	0,599	4,8	0,604	6,8	0,828	38,5
C18orf54	Chromosome 18 open reading frame 54	241733_at	0,338	0,0	0,553	4,5	0,860	36,5
C1orf112	chromosome 1 open reading frame 112	220840_s_at	0,489	2,0	0,735	24,5	0,496	7,3
C1orf135	chromosome 1 open reading frame 135	220011_at	0,550	8,0	0,505	6,8	0,777	38,5
C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198	223063_at	1,875	1,6	1,853	3,8	1,645	6,3

## Anhang

C1orf96	chromosome 1 open reading frame 96	1553697_at	0,350	0,3	0,360	2,8	0,961	55,6
C20orf11	chromosome 20 open reading frame 11	218448_at	0,905	32,6	1,596	5,2	1,553	8,2
C20orf43	chromosome 20 open reading frame 43	234926_s_at	1,193	32,6	0,550	1,1	0,601	4,4
C20orf43	chromosome 20 open reading frame 43	233842_x_at	1,350	8,0	0,629	2,8	0,620	3,9
C20orf69 ///B2016 ///PCMTD 2	chromosome 20 open reading frame 69 /// protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	232953_at	0,630	8,0	0,257	0,3	0,884	38,5
C4orf46	chromosome 4 open reading frame 46	238015_at	0,535	1,4	0,528	3,8	0,437	5,7
C4orf46	chromosome 4 open reading frame 46	235088_at	0,486	0,6	0,581	6,1	0,654	15,8
C5orf41	chromosome 5 open reading frame 41	238476_at	1,935	2,4	1,843	2,3	0,958	50,6
C6orf173	chromosome 6 open reading frame 173	226936_at	0,270	0,0	0,757	22,2	0,619	9,0
C6orf26 /// MSH5	chromosome 6 open reading frame 26 /// mutS homolog 5	210410_s_at	0,143	0,0	0,509	0,8	0,872	38,5
C9orf45	chromosome 9 open reading frame 45	223522_at	1,559	2,7	1,091	47,1	1,757	1,4
C9orf95	chromosome 9 open reading frame 95	1562761_at	0,413	4,8	0,450	0,4	2,647	3,9
CALD1	caldesmon 1	214880_x_at	1,617	4,2	1,845	7,9	2,098	3,9
CALR	calreticulin	212953_x_at	—	—	2,261	4,5	2,159	3,2
CAPS	calcyphosine	226424_at	0,829	29,6	1,866	5,2	2,367	4,9
CASC5	cancer susceptibility candidate 5	228323_at	0,088	0,0	0,878	38,8	0,571	7,3
CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	209790_s_at	0,614	1,2	0,779	22,2	0,455	1,9
CBL	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence	229010_at	0,628	23,2	0,460	6,8	0,333	4,9
CBX5	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)	209715_at	0,513	1,4	1,091	53,5	0,548	6,3
CCDC13	coiled-coil domain containing 13	1554023_s_at	1,517	7,0	0,944	56,9	1,617	7,3
CCNA2	cyclin A2	213226_at	0,268	0,0	0,908	36,2	0,500	4,4
CCNA2	cyclin A2	203418_at	0,152	0,0	0,481	6,1	0,782	40,4
CCNB1	cyclin B1	214710_s_at	0,111	0,0	0,681	14,3	0,448	4,4
CCNB1	cyclin B1	228729_at	0,088	0,0	0,868	38,8	0,478	4,9
CCNB2	cyclin B2	202705_at	0,050	0,0	0,612	9,0	0,509	6,3
CCNE2	cyclin E2	205034_at	0,108	0,0	0,767	33,6	0,410	5,7
CCNE2	cyclin E2	211814_s_at	0,224	3,4	0,250	1,1	0,588	26,2
CCNF	cyclin F	204826_at	0,123	0,0	0,550	4,5	0,635	12,8
CCNL2	cyclin L2	221427_s_at	0,664	4,8	0,530	1,3	1,124	51,9
CD164	CD164 molecule, sialomucin	208653_s_at	0,653	8,0	0,429	0,7	0,772	28,4
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	203213_at	0,050	0,0	0,611	6,8	0,439	4,4
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	210559_s_at	0,077	0,0	0,613	6,8	0,624	12,8
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	203214_x_at	0,112	0,0	0,584	5,2	0,647	14,2
CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	203967_at	0,146	0,0	0,854	38,8	0,457	6,3
CDC7	cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae)	204510_at	0,253	0,7	1,071	52,1	0,548	7,3
CDCA2	cell division cycle associated 2	226661_at	0,664	15,3	0,453	1,3	0,574	9,0
CDCA8	cell division cycle associated 8	221520_s_at	0,065	0,0	0,576	10,0	0,482	9,0
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	211804_s_at	0,524	2,7	0,373	0,6	0,825	38,5
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	202284_s_at	1,717	1,4	0,977	50,6	2,204	0,6
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	1555758_a_at	0,155	0,0	0,646	9,0	0,579	10,3
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	209714_s_at	0,135	0,0	0,643	9,0	0,669	14,2
CENPA	centromere protein A	204962_s_at	0,135	0,0	0,775	22,2	0,575	8,2
CENPA	centromere protein A	210821_x_at	0,239	0,0	0,571	4,5	0,613	14,2
CENPE	centromere protein E, 312kDa	205046_at	0,199	1,0	1,051	60,1	0,580	9,0
CENPH	centromere protein H	231772_x_at	0,287	0,0	0,650	6,8	0,816	24,3
CENPI	centromere protein I	214804_at	0,432	1,0	0,495	2,8	0,709	22,6
CENPK	centromere protein K	222848_at	0,205	0,0	0,664	11,1	0,365	1,2
CENPM	centromere protein M	218741_at	0,037	0,0	0,564	9,0	0,470	10,3
CEP55	centrosomal protein 55kDa	218542_at	0,080	0,0	0,595	10,0	0,411	4,9
CEP70	centrosomal protein 70kDa	219036_at	0,424	0,0	0,929	49,0	0,654	5,7
CEP70	centrosomal protein 70kDa	1554489_a_at	0,387	0,3	0,483	0,6	0,662	15,8
CEPT1	choline/ethanolamine phosphotransferase 1	1561884_at	0,930	43,8	0,514	3,4	0,488	8,2
CES1	carboxylesterase 1	209616_s_at	0,258	4,2	3,472	5,2	1,936	5,7
CHAF1B	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	204775_at	0,664	4,8	0,538	3,8	0,802	28,4
CHD2	Chromodomain helicase DNA binding protein 2	226830_x_at	1,751	9,5	1,875	6,8	1,132	55,6
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	205393_s_at	0,269	0,0	0,512	1,1	0,608	7,3
CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	209395_at	1,190	54,1	0,146	0,7	0,222	4,4
CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	209396_s_at	1,444	57,9	0,090	0,4	0,228	4,9
CHMP4B	chromatin modifying protein 4B	225119_at	1,861	9,5	2,056	3,4	1,139	51,9
CIT	citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	212801_at	0,307	0,0	0,395	0,7	0,712	20,9
CIZ1	CDKN1A interacting zinc finger protein 1	213977_s_at	0,563	4,8	0,177	0,0	1,163	47,4
CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	218252_at	0,475	0,2	0,767	19,8	0,562	6,3
CKAP4	cytoskeleton-associated protein 4	200999_s_at	0,633	4,2	1,141	43,5	0,552	3,5
CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	201897_s_at	0,412	0,0	0,654	6,1	0,668	8,2
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	204170_s_at	0,246	0,0	0,851	31,5	0,406	1,2



CLEC11A	C-type lectin domain family 11, member A	205131_x_at	0,563	2,0	0,494	1,5	1,543	10,3
CLEC11A	C-type lectin domain family 11, member A	210783_x_at	0,616	8,0	0,533	2,3	1,730	4,4
CLIP4	CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4	226425_at	1,633	8,0	1,904	6,1	0,663	17,3
CLK4	CDC-like kinase 4	1568836_at	0,413	5,8	0,232	0,8	0,752	36,5
CLN8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	219341_at	2,451	7,0	2,075	9,0	—	—
CLSTN1	calsyntenin 1	201561_s_at	0,589	2,4	0,624	3,4	1,138	47,4
CMPK2	cytidine monophosphate kinase 2, mitochondrial	226702_at	0,184	3,4	0,318	6,1	0,286	9,0
CNTNAP3	contactin associated protein-like 3	223796_at	0,401	1,6	1,012	55,8	0,410	9,0
CNTNAP3B	contactin associated protein-like 3B	244065_at	0,344	2,4	0,775	26,8	0,236	2,2
CNTROB	centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein	228633_s_at	0,615	9,5	0,589	5,2	0,990	62,0
COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	229271_x_at	1,818	9,5	2,083	9,0	1,816	14,2
COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	37892_at	1,316	41,2	2,002	6,1	1,820	9,0
COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	204320_at	1,363	38,3	1,999	5,2	1,935	8,2
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	212865_s_at	0,251	9,5	2,408	17,7	0,212	7,3
COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	213290_at	0,492	1,4	0,572	3,8	1,428	15,8
COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	209156_s_at	0,468	0,3	0,343	0,0	1,820	1,2
COLEC12	collectin sub-family member 12	221019_s_at	0,134	0,0	0,381	2,3	0,664	28,4
COMMD5								
///LOC100287297 ///	COMM domain containing 5 /// hypothetical protein	232640_at	1,809	9,5	0,396	2,8	2,155	3,5
LOC100289699	LOC100289699							
9699								
COPS2	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 2	209838_at	1,723	0,3	1,602	5,2	0,891	36,5
COX5B	Cytochrome c oxidase subunit Vb	213736_at	2,122	3,4	2,025	4,5	—	—
CPNE1	copine I	206918_s_at	0,646	4,2	0,422	0,2	1,103	53,2
CPSF3L	cleavage and polyadenylation specific factor 3-like	233625_x_at	0,625	4,2	0,632	6,8	1,325	19,0
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1	217484_at	—	—	2,030	7,9	2,770	1,6
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	202552_s_at	1,515	8,0	1,668	9,0	0,986	57,7
CRIP2	cysteine-rich protein 2	208978_at	0,297	1,4	0,298	1,0	0,744	42,2
CSPP1	centrosome and spindle pole associated protein 1	242041_at	0,430	2,4	0,520	9,0	0,900	30,2
CUX1	cut-like homeobox 1	214743_at	1,677	1,6	1,939	6,1	1,401	11,7
CYP27C1	cytochrome P450, family 27, subfamily C, polypeptide 1	1568868_at	0,595	8,0	1,402	17,7	0,404	6,3
DARS	aspartyl-tRNA synthetase	201624_at	0,533	4,2	1,906	6,1	1,875	3,5
DAXX	death-domain associated protein	216038_x_at	0,561	2,7	0,617	6,1	0,727	20,9
DAZAP1	DAZ associated protein 1	226620_x_at	0,487	0,0	1,094	50,6	0,602	4,9
DCAF15	DDB1 and CUL4 associated factor 15	221851_at	0,360	2,4	0,175	0,2	1,527	12,8
DCAF6	DDB1 and CUL4 associated factor 6	217908_s_at	1,661	1,0	1,540	6,8	0,892	38,5
DCLK1	Doublecortin-like kinase 1	229800_at	0,548	7,0	2,018	9,0	0,495	7,3
DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11	208149_x_at	0,391	1,6	0,517	1,3	1,199	45,7
DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	213998_s_at	0,339	5,8	0,357	7,9	0,267	4,9
DDX54	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54	225428_s_at	0,620	4,8	0,564	3,8	1,437	19,0
DENR	density-regulated protein	238982_at	0,456	5,8	1,045	52,1	0,402	7,3
DEPDC1	DEP domain containing 1	232278_s_at	0,033	0,0	0,332	0,7	0,529	12,8
DEPDC1	DEP domain containing 1	235545_at	0,090	0,0	0,708	12,7	0,598	9,0
DHFR	dihydrofolate reductase	202534_x_at	0,473	0,0	1,452	36,2	0,466	4,4
DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	232596_at	0,559	7,0	0,304	0,4	0,285	2,5
DIO2	deiodinase, iodothyronine, type II	231240_at	0,506	4,2	0,229	0,2	1,026	60,2
DKFZp686L14188	hypothetical gene supported by BX538329	231412_at	0,650	9,5	1,960	7,9	1,789	3,5
DLEU2 ///	deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding) ///							
DLEU2L	deleted in lymphocytic leukemia 2-like	215629_s_at	0,397	1,4	0,894	45,3	0,620	9,0
DLG3	discs, large homolog 3 (Drosophila)	207732_s_at	0,584	4,2	0,364	2,8	0,928	49,0
DLGAP5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	203764_at	0,070	0,0	0,811	26,8	0,433	4,9
DMPK	dystrophia myotonica-protein kinase	37996_s_at	1,867	8,0	0,425	0,5	1,969	1,4
DMWD	dystrophia myotonica, WD repeat containing	213231_at	0,653	5,8	0,507	6,1	2,085	1,6
DNALI1	dynein, axonemal, light intermediate chain 1	205186_at	0,347	0,4	0,665	5,2	1,048	60,9
DNLZ	DNL-type zinc finger	228272_at	0,525	2,4	0,782	19,8	0,571	3,9
DOT1L	DOT1-like, histone H3 methyltransferase (S. cerevisiae)	226201_at	1,609	9,5	1,097	43,5	2,468	4,4
DTL	denticleless homolog (Drosophila)	218585_s_at	0,057	0,0	0,679	17,7	0,439	4,4
DTL	denticleless homolog (Drosophila)	222680_s_at	0,169	0,0	0,345	0,8	0,581	11,7
DUT	deoxyuridine triphosphatase	208955_at	0,593	1,2	0,889	38,8	0,555	4,4
DUT	deoxyuridine triphosphatase	209932_s_at	0,608	1,4	0,860	31,5	0,561	2,5
E2F1	E2F transcription factor 1	2028_s_at	0,590	3,4	0,379	0,8	1,120	50,6
E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	221586_s_at	0,291	1,6	1,934	6,8	2,307	3,2
EDEM3	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	220342_x_at	1,616	8,0	0,518	1,1	0,612	7,3
EDNRA	endothelin receptor type A	204463_s_at	0,854	48,6	0,399	3,4	0,420	8,2
EFHD1	EF-hand domain family, member D1	209343_at	1,571	54,1	2,502	9,0	2,028	8,2
EFNB2	ephrin-B2	202669_s_at	0,449	5,8	0,574	6,1	1,163	58,6
EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	213753_x_at	1,595	9,5	1,839	15,9	1,776	8,2

EMD	emerin	209477_at	1,046	56,6	2,145	1,3	1,708	3,9
EMILIN1	elastin microfibril interfacier 1	204163_at	0,505	1,0	0,647	7,9	1,292	26,2
EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4	223069_s_at	0,605	1,0	0,364	0,2	0,960	51,9
EPHA3	EPH receptor A3	206070_s_at	0,574	9,5	1,528	14,3	0,246	7,3
EPHA4	EPH receptor A4	229374_at	1,653	9,5	0,686	11,1	1,851	4,4
EPM2AIP1	EPM2A (laforin) interacting protein 1	227847_at	1,018	58,8	0,575	3,4	0,615	8,2
EPOR	erythropoietin receptor	209963_s_at	0,507	5,8	0,582	9,0	1,197	43,9
EPOR	erythropoietin receptor	209962_at	0,338	4,2	0,302	1,0	2,543	2,2
ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	209701_at	1,742	2,4	1,845	6,1	1,338	38,5
ERCC6L	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like	219650_at	0,149	0,3	0,987	57,7	0,549	8,2
ERMN	ermin, ERM-like protein	231911_at	0,400	9,5	0,323	7,9	0,516	28,4
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	201329_s_at	1,078	54,1	0,343	1,0	0,434	7,3
EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	203358_s_at	0,254	0,0	0,989	56,9	0,591	9,0
F2RL1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	213506_at	0,102	0,3	1,395	41,3	0,177	2,2
FAM102B	family with sequence similarity 102, member B	226568_at	0,455	0,4	1,279	26,8	0,624	9,0
FAM105B	family with sequence similarity 105, member B	240834_at	0,605	9,5	0,809	41,3	0,269	2,7
FAM149B1	family with sequence similarity 149, member B1	213896_x_at	0,573	1,0	0,651	4,5	0,711	15,8
FAM158A	family with sequence similarity 158, member A	219203_at	0,548	2,7	0,637	7,9	0,849	38,5
FAM54A	family with sequence similarity 54, member A	228069_at	0,281	0,0	0,739	24,5	0,448	5,7
FAM83D	family with sequence similarity 83, member D	225687_at	0,124	0,0	0,627	12,7	0,461	9,0
FAM84B	family with sequence similarity 84, member B	225864_at	1,050	38,3	2,649	6,1	2,107	3,9
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G	203564_at	0,426	0,0	0,492	0,5	0,705	14,2
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I	213007_at	0,368	0,0	0,861	33,6	0,361	4,4
FAR2	fatty acyl CoA reductase 2	220615_s_at	0,668	26,5	0,436	6,1	0,423	9,0
FARP1	FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein 1	201911_s_at	0,648	5,8	0,518	1,3	1,119	51,9
FBXO17 /// SARS2	F-box protein 17 /// seryl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	220233_at	—	—	3,255	1,7	4,360	0,6
FBXO5	F-box protein 5	218875_s_at	0,280	0,0	0,978	49,0	0,405	2,2
FBXO5	F-box protein 5	234863_x_at	0,341	0,0	0,528	1,7	0,608	10,3
FBXO9	F-box protein 9	1566509_s_at	1,560	2,4	1,608	7,9	0,733	17,3
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	204767_s_at	0,361	0,5	1,038	59,1	0,493	8,2
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	204768_s_at	0,425	0,3	0,557	6,1	0,827	36,5
FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1	204819_at	0,585	1,6	0,574	1,5	1,024	62,0
FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	205117_at	0,643	9,5	0,591	6,1	0,891	45,7
FGFR1OP2	FGFR1 oncogene partner 2	243619_at	0,537	2,7	1,083	49,0	0,540	6,3
FHL1	four and a half LIM domains 1	201539_s_at	1,557	58,8	0,332	0,8	0,467	5,7
FHL1	four and a half LIM domains 1	210298_x_at	1,643	58,3	0,453	3,8	0,473	7,3
FHL1	four and a half LIM domains 1	214505_s_at	1,272	54,1	0,378	1,5	0,487	8,2
FKBP7	FK506 binding protein 7	223667_at	0,564	4,8	0,306	0,2	0,918	47,4
FOXM1	forkhead box M1	202580_x_at	0,045	0,0	0,577	11,1	0,397	6,3
FRAS1	Fraser syndrome 1	226145_s_at	—	—	2,678	2,8	3,073	1,4
FRMD5	FERM domain containing 5	230831_at	0,646	29,6	0,378	6,1	0,459	9,0
FRMPD4	FERM and PDZ domain containing 4	239290_at	4,441	0,0	1,631	33,6	1,982	5,7
FST	follistatin	226847_at	1,859	9,5	2,055	6,8	2,011	3,9
FURIN	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)	201945_at	0,581	4,8	0,509	3,8	1,591	26,2
FUS	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	200959_at	0,575	2,7	1,387	36,2	0,527	7,3
FUS /// NR1H3	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma) /// nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	1565717_s_at	0,762	32,6	0,455	2,8	0,522	9,0
FUZ	fuzzy homolog (Drosophila)	221187_s_at	0,582	2,7	0,618	9,0	1,256	36,5
FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	218084_x_at	0,503	4,2	0,525	4,5	1,529	10,3
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	202275_at	0,605	9,5	0,426	2,3	1,345	32,3
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	209304_x_at	1,386	20,4	2,614	9,0	2,649	0,6
GALE	UDP-galactose-4-epimerase	202528_at	0,521	1,6	0,523	2,0	0,889	45,7
GALNT2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	217788_s_at	1,016	58,8	0,556	0,7	0,558	4,4
GALNT6	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GalNAc-T6)	219956_at	0,549	9,5	0,257	0,3	0,602	19,0
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	211934_x_at	0,563	0,7	0,470	0,7	1,280	28,4
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	202922_at	2,798	1,6	1,878	3,8	1,137	55,6
GDAP2	ganglioside induced differentiation associated protein 2	1554154_at	0,620	15,3	0,513	6,1	0,452	6,3
GDF5	growth differentiation factor 5	206614_at	1,469	43,8	0,317	0,8	0,540	3,9
GEMIN6	gem (nuclear organelle) associated protein 6	219539_at	0,609	2,7	0,844	38,8	0,588	9,0
GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	205100_at	0,522	1,6	0,499	0,5	0,659	7,3
GGH	gamma-glutamyl hydrolase	203560_at	0,431	0,5	0,783	19,8	0,603	3,9
GGT7	gamma-glutamyltransferase 7	226469_s_at	1,108	55,5	2,413	9,0	2,062	4,9
GINS1	GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)	206102_at	0,176	0,0	0,793	29,0	0,404	3,9
GINS2	GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog)	221521_s_at	0,138	0,5	0,650	22,2	0,441	9,0
GINS3	GINS complex subunit 3 (Psf3 homolog)	45633_at	0,442	2,4	1,100	50,6	0,427	4,9

GIYD1 /// GIYD2	GIY-YIG domain containing 1 /// GIY-YIG domain containing 2	218317_x_at	0,649	3,4	0,643	6,1	0,912	49,0
GLI3	GLI family zinc finger 3	205201_at	0,788	26,5	1,665	9,0	1,692	4,4
GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1	204221_x_at	0,603	8,0	0,827	26,8	0,361	3,9
GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1	204222_s_at	0,659	5,8	0,980	53,5	0,593	8,2
GLS	glutaminase	221510_s_at	2,115	1,2	2,393	1,5	1,465	9,0
GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase	204875_s_at	0,456	1,2	0,424	1,3	1,290	36,5
GPC4	glypican 4	204984_at	1,681	15,3	2,761	0,8	1,850	7,3
GPC4	glypican 4	204983_s_at	1,429	32,6	2,376	3,8	2,182	2,7
GPI	glucose phosphate isomerase	208308_s_at	0,577	5,8	0,557	6,8	1,240	38,5
GPR172A	G protein-coupled receptor 172A	222155_s_at	0,646	5,8	0,574	3,8	1,765	8,2
GPR39	G protein-coupled receptor 39	229105_at	2,027	4,2	0,569	6,8	0,424	5,7
GPR85	G protein-coupled receptor 85	219898_at	0,872	58,8	2,178	6,1	2,276	3,9
GPSM2	G-protein signaling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)	205240_at	0,204	0,0	0,373	0,5	0,516	8,2
GPSM2	G-protein signaling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)	230002_at	0,241	0,4	0,251	0,4	0,648	24,3
GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	201348_at	0,474	2,4	0,300	0,4	0,849	34,3
GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	214091_s_at	0,598	8,0	0,328	0,4	1,173	47,4
GREM2	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog	220794_at	1,357	35,6	0,372	1,7	0,375	6,3
GRIA3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	1569290_s_at	2,917	0,4	1,091	60,1	1,659	6,3
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	200696_s_at	1,387	8,0	1,613	6,1	1,900	0,6
GTPBP2	GTP binding protein 2	223789_s_at	0,502	8,0	0,092	0,0	1,086	55,6
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	215942_s_at	0,096	0,0	0,562	6,1	0,710	20,9
H2AFV	H2A histone family, member V	212206_s_at	0,949	46,3	0,648	7,9	0,562	4,4
HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	205524_s_at	1,033	52,6	0,519	6,1	0,414	7,3
HAUS1	HAUS augmin-like complex, subunit 1	225297_at	0,553	1,4	0,738	12,7	0,666	9,0
HDGF	hepatoma-derived growth factor	200896_x_at	0,598	1,6	0,637	6,8	0,948	51,9
HECTD1	HECT domain containing 1	241955_at	2,273	0,5	3,356	0,0	1,165	42,2
HECTD3	HECT domain containing 3	218632_at	0,478	1,0	0,406	0,4	1,312	17,3
HELLS	helicase, lymphoid-specific	220085_at	0,186	0,5	0,706	15,9	0,231	1,4
HELLS	helicase, lymphoid-specific	227350_at	0,275	0,0	0,965	36,2	0,324	4,9
HELLS	helicase, lymphoid-specific	223556_at	0,308	1,0	0,965	50,6	0,529	8,2
HHLA3	HERV-H LTR-associating 3	220387_s_at	0,660	8,0	0,437	0,4	1,622	9,0
HJURP	Holliday junction recognition protein	218726_at	0,144	0,0	0,501	3,8	0,848	34,3
HMG20B	high-mobility group 20B	210719_s_at	0,643	4,2	0,594	3,4	1,550	4,9
HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	207165_at	0,032	0,0	0,795	22,2	0,450	3,9
HNMT	histamine N-methyltransferase	228772_at	0,447	4,2	1,232	33,6	0,406	7,3
HNRNPA2 B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	205292_s_at	0,607	0,2	1,104	54,7	0,624	8,2
HNRNPA3 ///HNRNP A3P1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 /// heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 pseudogene 1	206809_s_at	0,598	4,8	0,567	9,0	0,433	4,4
HNRNPA3 ///HNRNP A3P1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 /// heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 pseudogene 1	211931_s_at	0,621	2,7	1,158	52,1	0,583	8,2
HNRNPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	200073_s_at	0,619	0,4	1,253	38,8	0,517	3,9
HNRNPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	200072_s_at	0,637	2,7	0,841	33,6	0,493	4,4
HNRNPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	208765_s_at	0,521	0,6	0,597	4,5	0,421	2,5
HNRNPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	216855_s_at	0,608	5,8	0,100	0,0	1,097	61,7
HOMER3	homer homolog 3 (Drosophila)	215489_x_at	0,656	8,0	0,612	6,8	0,958	58,6
HOXA11AS	HOXA11 antisense RNA (non-protein coding)	230666_at	0,735	20,4	1,622	7,9	1,816	7,3
HOXB2	homeobox B2	205453_at	0,475	4,2	0,496	1,5	0,717	20,9
HOXB3	homeobox B3	228904_at	0,423	5,8	0,767	33,6	0,376	6,3
HPCAL1	hippocalcin-like 1	205462_s_at	0,398	1,0	0,333	0,3	1,770	3,5
HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	214767_s_at	3,083	5,8	0,244	0,4	2,426	1,6
HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	226304_at	3,112	8,0	0,432	5,2	3,865	0,0
HTRA2	HtrA serine peptidase 2	211152_s_at	0,642	8,0	0,503	2,3	1,037	60,5
ICA1L	islet cell autoantigen 1,69kDa-like	223881_at	1,652	8,0	0,752	26,8	1,996	8,2
ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	209291_at	0,375	7,0	2,152	7,9	0,487	6,3
ID4	Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	209292_at	0,319	7,0	2,156	6,1	0,518	9,0
IER5L	immediate early response 5-like	226559_at	0,833	20,4	1,581	6,1	1,874	4,4
IFI35	interferon-induced protein 35	209417_s_at	0,532	5,8	0,449	3,4	0,595	15,8
IFI44	Interferon-induced protein 44	214059_at	0,278	0,9	0,510	7,9	0,518	14,2
IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	218847_at	0,873	41,2	3,076	0,7	2,570	0,9
IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	223963_s_at	1,750	9,5	0,807	45,3	3,641	0,6
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	203424_s_at	8,688	1,0	6,826	1,5	—	—
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	203426_s_at	2,936	4,8	0,926	55,8	2,404	2,7
IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	205227_at	0,862	29,6	0,632	7,9	0,524	6,3

IL1RAPL2	interleukin 1 receptor accessory protein-like 2	221112_at	0,369	1,6	0,421	0,4	1,010	34,3
IL27RA	interleukin 27 receptor, alpha	222062_at	—	—	2,037	9,0	2,221	3,9
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	211000_s_at	1,823	4,8	1,688	5,2	0,875	34,3
IPO9	importin 9	244703_x_at	0,933	50,7	0,580	7,9	0,367	5,7
IRF9	interferon regulatory factor 9	203882_at	0,568	2,7	0,427	1,5	0,677	19,0
ITCH	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	209744_x_at	1,200	38,3	2,230	0,6	1,523	8,2
ITFG1	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	1556151_at	2,215	2,0	1,971	3,4	1,222	36,5
ITGA10	integrin, alpha 10	206766_at	0,501	2,0	0,994	52,1	0,518	7,3
ITGA4	integrin, alpha 4	205884_at	2,708	2,7	0,485	6,1	0,411	9,0
ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	201389_at	0,369	0,3	0,385	0,5	1,220	40,4
ITGB5	Integrin, beta 5	214021_x_at	1,344	15,3	3,255	0,2	2,756	0,0
ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	211323_s_at	0,442	1,6	0,564	4,5	0,986	54,5
ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	201189_s_at	0,620	8,0	0,552	6,1	0,847	38,5
ITPR1PL2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 2	227954_at	2,117	1,2	2,127	2,3	1,224	47,4
JAK1	Janus kinase 1	1552611_a_at	1,677	1,6	3,903	0,0	1,229	38,5
JAK2	Janus kinase 2	205842_s_at	0,667	13,2	0,515	3,4	0,555	9,0
JMY	junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor	226352_at	1,553	9,5	1,834	9,0	1,266	30,2
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	205206_at	0,051	1,6	0,499	50,6	0,100	9,0
KCNAB1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	210471_s_at	1,171	58,8	0,330	3,8	0,249	4,4
KCNAB1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	210078_s_at	1,305	52,6	0,378	5,2	0,283	4,9
KDM4C	lysine (K)-specific demethylase 4C	1556493_a_at	0,485	8,0	0,439	3,8	1,010	40,4
KIAA0101	KIAA0101	202503_s_at	0,099	0,0	0,711	15,9	0,511	6,3
KIAA0101	KIAA0101	211713_x_at	0,325	0,3	0,579	7,9	0,605	15,8
KIAA0415	KIAA0415	209913_x_at	1,551	9,5	1,574	12,7	1,779	9,0
KIAA1033	KIAA1033	215936_s_at	0,959	48,6	0,379	0,0	0,502	3,9
KIAA1033	KIAA1033	212794_s_at	1,062	56,1	0,582	2,0	0,586	4,4
KIAA1524	KIAA1524	231855_at	0,413	1,0	0,649	14,3	0,570	9,0
KIF14	kinesin family member 14	206364_at	0,128	0,0	0,514	3,4	0,470	4,9
KIF15	kinesin family member 15	219306_at	0,185	0,0	0,502	4,5	0,497	4,4
KIF18B	kinesin family member 18B	222039_at	0,094	0,0	0,760	19,8	0,517	4,4
KIF20A	kinesin family member 20A	218755_at	0,065	0,0	0,754	19,8	0,509	5,7
KIF22	kinesin family member 22	202183_s_at	0,428	0,0	0,639	6,8	0,577	10,3
KIF23	kinesin family member 23	204709_s_at	0,239	0,0	0,807	26,8	0,483	8,2
KIF23	Kinesin family member 23	244427_at	0,299	1,6	0,537	7,9	0,608	15,8
KIF2C	kinesin family member 2C	209408_at	0,223	0,0	0,562	6,1	0,608	11,7
KIF2C	kinesin family member 2C	211519_s_at	0,288	0,0	0,410	0,7	0,948	51,9
KLHL24	kelch-like 24 (Drosophila)	221986_s_at	1,587	7,0	0,911	43,5	1,582	8,2
KNTC1	kinetochore associated 1	206316_s_at	0,465	0,0	0,476	0,8	0,581	4,9
KPNA2	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	201088_at	0,643	2,7	1,067	60,3	0,559	9,0
KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	212103_at	0,868	23,2	2,442	0,1	1,631	2,5
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	214352_s_at	0,930	50,7	0,235	0,0	0,563	7,3
KRTAP8-1	keratin associated protein 8-1	1564974_at	1,649	5,8	0,439	0,8	2,531	4,4
KY	kyphoscoliosis peptidase	244572_at	1,101	56,6	0,540	6,1	0,312	1,1
KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	204385_at	0,430	2,4	0,276	0,4	0,979	36,5
KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	217388_s_at	0,173	1,0	0,414	7,9	1,132	58,6
KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	210663_s_at	0,248	4,2	0,434	9,0	1,467	57,7
LASS6	LAG1 homolog, ceramide synthase 6	235463_s_at	1,742	8,0	1,297	31,5	1,626	4,9
LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase	204428_s_at	0,352	0,3	0,610	6,8	1,564	19,0
LDB2	LIM domain binding 2	206481_s_at	1,373	41,2	0,361	3,4	0,306	4,4
LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	200923_at	0,511	8,0	0,505	5,2	1,571	11,7
LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8	210732_s_at	0,644	9,5	0,620	6,8	1,298	28,4
LHFPL2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2	212658_at	0,884	46,3	0,510	9,0	0,393	4,9
LHPP	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	218523_at	0,547	2,4	0,567	3,8	1,637	5,7
LMCD1	LIM and cysteine-rich domains 1	218574_s_at	1,573	4,2	1,102	55,8	1,617	4,9
LMCD1	LIM and cysteine-rich domains 1	242767_at	4,741	1,2	2,098	26,8	2,782	3,9
LMF2	lipase maturation factor 2	31837_at	0,645	4,2	0,578	2,8	1,537	5,7
LMNB1	lamin B1	203276_at	0,127	0,0	2,173	10,0	0,521	6,3
LOC100128434	Hypothetical protein LOC100128434	1561292_at	0,592	9,5	0,506	6,1	0,707	20,9
LOC100190939	hypothetical LOC100190939	228913_at	1,802	8,0	1,882	4,5	0,843	36,5
LOC100287917	hypothetical protein LOC100287917	226933_s_at	0,459	4,8	1,926	11,1	0,530	7,3
LOC100289169 /// NPIPL3	hypothetical protein LOC100289169 /// similar to acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2 /// nuclear pore complex interacting protein-like 3	215921_at	0,297	1,2	0,268	1,5	1,392	20,9

## Anhang

LOC100289612	arsenic transactivated protein 1	243840_at	0,411	1,2	0,700	15,9	0,491	8,2
LOC100290661	hypothetical protein LOC100290661	1563077_at	1,714	5,8	1,007	54,7	2,326	3,5
LOC149773	Hypothetical protein LOC149773	1559433_at	0,474	0,5	1,033	56,9	0,527	4,4
LOC25845	hypothetical LOC25845	225458_at	0,664	9,5	0,553	3,4	1,054	54,5
LOC283663	hypothetical LOC283663	230245_s_at	0,481	5,8	0,627	7,9	0,945	34,3
LOC338653	hypothetical protein LOC338653	1562960_at	2,082	1,6	2,149	2,3	—	—
LOC400236	hypothetical LOC400236	227887_at	1,814	4,2	1,582	11,1	1,684	7,3
LOC440434	hypothetical protein FLJ11822	214107_x_at	0,580	1,6	0,383	0,2	0,653	14,2
LOC643167 /// RBM39	similar to RNA binding motif protein 39 /// RNA binding motif protein 39	226404_at	0,454	0,0	2,662	2,8	1,701	3,5
LOC728730	Hypothetical LOC728730	242835_s_at	1,529	11,2	2,397	2,3	1,767	9,0
LOH12CR2	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 2	236311_at	1,608	5,8	1,911	6,1	1,917	17,3
LPXN	leupaxin	216250_s_at	1,496	48,6	0,434	1,7	0,450	4,4
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5	209468_at	0,513	2,4	0,545	4,5	1,929	8,2
LRRC16A	leucine rich repeat containing 16A	230793_at	0,949	48,6	0,516	2,8	0,523	8,2
LRRC8C	leucine rich repeat containing 8 family, member C	1558517_s_at	0,523	0,5	0,639	4,5	0,913	47,4
LSM14B	LSM14B, SCD6 homolog B (S. cerevisiae)	219653_at	1,214	43,8	3,003	0,3	2,466	1,2
LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	219922_s_at	0,607	4,2	0,616	5,2	1,165	38,5
LTBP4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	204442_x_at	0,521	4,2	0,625	4,5	1,838	12,8
LXN	latexin	218729_at	0,219	0,0	0,735	31,5	0,446	4,4
LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	202145_at	0,406	1,4	0,196	0,0	1,473	30,2
MAB21L2	mab-21-like 2 (C. elegans)	210302_s_at	0,435	23,2	2,711	9,0	6,936	0,0
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	203362_s_at	0,230	0,0	0,894	43,5	0,599	9,0
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	1554768_a_at	0,225	0,0	0,602	7,9	0,619	14,2
MAFG	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G	204970_s_at	1,028	55,5	3,568	0,4	1,965	2,5
MAGED2	melanoma antigen family D, 2	208682_s_at	0,656	2,0	0,602	1,7	0,986	57,7
MAGI1	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	232859_s_at	2,823	0,0	2,917	0,3	1,546	32,3
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	227510_x_at	4,592	0,0	0,737	14,3	2,301	7,3
MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2	202424_at	0,543	4,2	0,577	5,2	2,140	1,4
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	207667_s_at	1,710	9,5	1,065	50,6	2,410	0,9
MAP2K7	mitogen-activated protein kinase kinase 7	226023_at	—	—	1,687	7,9	1,879	3,2
MAP2K7	mitogen-activated protein kinase kinase 7	209951_s_at	2,185	1,6	1,464	19,8	4,062	0,0
MAT2B	methionine adenosyltransferase II, beta	217993_s_at	0,642	9,5	1,181	33,6	0,567	9,0
MBNL1	muscleblind-like (Drosophila)	1558111_at	0,667	15,3	0,566	6,8	0,481	5,7
MCM10	minichromosome maintenance complex component 10	220651_s_at	0,056	0,0	0,730	31,5	0,429	9,0
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	202107_s_at	0,322	0,4	0,485	6,8	0,487	9,0
MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	201555_at	0,517	1,0	0,791	31,5	0,554	8,2
MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	212142_at	0,489	2,0	0,314	0,6	0,539	11,7
MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	222036_s_at	0,643	4,8	0,918	43,5	0,556	9,0
MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	201755_at	0,193	0,6	0,446	6,1	0,471	11,7
MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	216237_s_at	0,349	0,0	0,467	6,8	0,511	9,0
MCM8	minichromosome maintenance complex component 8	224320_s_at	0,454	1,6	0,377	1,0	0,485	6,3
MDC1	mediator of DNA-damage checkpoint 1	203061_s_at	0,411	1,0	0,193	0,2	1,044	61,8
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	209035_at	0,307	0,0	0,391	1,3	1,270	45,7
MED13L	Mediator complex subunit 13-like	216109_at	0,500	8,0	0,436	4,5	0,330	4,4
MED16	mediator complex subunit 16	221545_x_at	0,603	8,0	0,604	7,9	1,198	36,5
MED27	mediator complex subunit 27	221598_s_at	0,629	4,8	0,998	60,1	0,470	8,2
MEF2A	myocyte enhancer factor 2A	208328_s_at	1,754	3,4	3,728	0,0	1,075	62,0
MEN1	multiple endocrine neoplasia I	202645_s_at	0,594	2,7	0,559	2,0	1,214	30,2
MEOX2	mesenchyme homeobox 2	206201_s_at	0,167	0,0	1,133	50,6	0,240	0,0
METRN	meteorin, glial cell differentiation regulator	232269_x_at	0,798	26,5	1,733	6,1	3,187	0,0
METTL3	methyltransferase like 3	242111_at	0,630	2,0	0,609	5,2	1,188	53,2
MEX3D	mex-3 homolog D (C. elegans)	91816_f_at	0,671	2,4	2,832	0,7	2,150	0,6
MFAP3L	microfibrillar-associated protein 3-like	205442_at	2,439	4,2	2,477	2,3	1,306	43,9
MFHAS1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	225478_at	0,610	0,3	0,631	1,7	0,808	24,3
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	212022_s_at	0,092	0,0	0,400	1,7	0,518	10,3
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	212021_s_at	0,218	0,0	0,429	1,1	0,602	12,8
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	212020_s_at	0,445	0,9	0,443	1,1	0,753	28,4
MLEC	malectin	200616_s_at	0,618	1,4	1,705	4,5	0,520	2,7

MLEC	malectin	200617_at	0,546	1,2	0,399	0,2	0,897	45,7
MMP11	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	203878_s_at	—	—	1,967	6,1	2,502	5,7
MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	202828_s_at	1,121	58,8	2,202	2,8	1,926	8,2
MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	160020_at	1,230	54,1	1,995	7,9	2,163	1,4
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	205828_at	0,135	9,5	0,140	4,5	0,510	56,7
MNT	MAX binding protein	204206_at	1,035	54,1	1,739	9,0	1,558	9,0
MON1B	MON1 homolog B (yeast)	233557_s_at	1,534	8,0	0,853	41,3	1,570	8,2
MPHOSPH9	M-phase phosphoprotein 9	221965_at	0,593	1,2	0,649	9,0	0,849	32,3
MPI	mannose phosphate isomerase	202472_at	0,586	4,2	0,566	6,1	1,051	59,1
MRC2	mannose receptor, C type 2	209280_at	0,620	2,7	0,503	0,8	2,153	1,4
MRPL33	mitochondrial ribosomal protein L33	203781_at	1,248	23,2	1,930	2,3	1,783	1,6
MRPS5	mitochondrial ribosomal protein S5	224877_s_at	—	—	1,994	3,4	1,961	3,5
MRT04	mRNA turnover 4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	235783_at	1,863	9,5	2,821	4,5	—	—
MTSS1	metastasis suppressor 1	210360_s_at	2,156	5,8	0,784	45,3	2,225	4,4
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	202086_at	0,210	5,8	0,349	7,9	0,504	17,3
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	204994_at	0,306	2,4	0,467	9,0	0,546	19,0
MYADM	myeloid-associated differentiation marker	224920_x_at	1,094	55,5	1,800	9,0	1,899	4,4
MYL12A	myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric	201319_at	2,017	2,4	2,220	0,4	1,174	38,5
MYO1C	myosin IC	32811_at	1,366	15,3	2,511	0,6	1,542	8,2
NAALADL1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1	207895_at	0,582	4,8	0,609	4,5	1,292	26,2
NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	201970_s_at	0,431	0,0	0,640	6,8	0,630	17,3
NAT14	N-acetyltransferase 14 (GCN5-related, putative)	223284_at	0,316	1,4	0,660	7,9	1,508	11,7
NAV1	neuron navigator 1	224771_at	0,642	4,2	2,082	2,0	0,579	5,7
NCAPD2	non-SMC condensin I complex, subunit D2	201774_s_at	0,487	1,6	0,543	3,8	0,558	10,3
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	218662_s_at	0,178	0,0	0,970	49,0	0,358	1,4
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	218663_at	0,063	0,0	0,739	17,7	0,451	7,3
NCKAP1	NCK-associated protein 1	217465_at	2,076	2,0	0,338	0,0	0,313	1,2
NDC80	NDC80 homolog, kinetochore complex component	204162_at	0,058	0,0	0,855	29,0	0,516	5,7
NDE1	nudE nuclear distribution gene E homolog 1 ( <i>A. nidulans</i> )	222625_s_at	0,552	1,4	0,442	0,7	1,353	26,2
NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1	214657_s_at	1,483	23,2	0,414	6,1	0,245	1,6
NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1	224566_at	1,343	26,5	0,580	6,1	0,440	3,9
NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 ( <i>E. coli</i> )	219502_at	0,207	0,0	0,635	6,8	0,586	5,7
NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	211080_s_at	0,143	0,0	0,460	3,4	0,643	19,0
NEK9	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 9	214738_s_at	0,658	7,0	0,103	0,0	0,917	40,4
NEXN	nexilin (F actin binding protein)	1552309_a_at	1,802	5,8	2,078	2,3	0,825	34,3
NF1	neurofibromin 1	204325_s_at	1,138	58,8	0,460	0,5	0,638	9,0
NFIX	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	227400_at	1,307	54,8	2,275	3,4	2,858	1,3
NFYA	nuclear transcription factor Y, alpha	204107_at	0,631	7,0	0,459	0,8	1,329	20,9
NID1	nidogen 1	202008_s_at	0,650	8,0	0,489	1,7	1,495	22,6
NIPAL3	NIPA-like domain containing 3	225875_s_at	1,503	8,0	1,462	12,7	1,562	9,0
NIPSNAP1	nipsnap homolog 1 ( <i>C. elegans</i> )	201708_s_at	0,623	2,7	0,471	0,2	1,299	19,0
NME4	non-metastatic cells 4, protein expressed in	212739_s_at	0,623	4,2	0,621	6,8	1,760	2,7
NOL12 /// TRIOBP	nucleolar protein 12 /// TRIO and F-actin binding protein	219324_at	0,608	4,2	0,801	31,5	0,603	9,0
NONO	non-POU domain containing, octamer-binding	210470_x_at	0,658	9,5	0,368	0,5	0,991	62,0
NOTCH2	Notch homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )	210756_s_at	0,593	3,4	0,303	0,0	0,918	47,4
NRXN2	neurexin 2	209982_s_at	0,690	17,7	2,236	7,9	3,656	0,0
NSD1	nuclear receptor binding SET domain protein 1	243612_at	0,783	32,6	0,535	7,9	0,405	3,9
NSUN3	NOL1/NOP2/Sun domain family, member 3	219458_s_at	0,765	15,3	0,617	3,4	0,627	8,2
NUDT1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1	204766_s_at	0,541	1,4	0,609	6,1	0,887	43,9
NUDT21	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21	202697_at	0,621	2,7	0,640	4,5	1,043	61,3
NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog	223381_at	0,079	0,0	0,580	7,9	0,437	3,9
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	219978_s_at	0,091	0,0	0,476	2,3	0,533	11,7
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	218039_at	0,094	0,0	0,589	5,2	0,536	4,4
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	205552_s_at	0,164	7,0	0,226	9,0	0,439	26,2
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	228607_at	0,444	0,9	0,516	4,5	0,488	10,3
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	206553_at	0,335	0,7	0,221	1,0	0,593	15,8
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	204972_at	0,183	1,4	0,315	5,2	0,736	32,3
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	218400_at	0,186	0,4	0,216	0,8	0,540	22,6
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	205660_at	0,248	1,2	0,348	3,8	0,660	30,2
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	210797_s_at	0,235	1,6	0,316	4,5	0,685	40,4
OGFRL1	opioid growth factor receptor-like 1	238469_at	1,903	7,0	0,456	1,5	0,501	6,3
OIP5	Opa interacting protein 5	213599_at	0,176	0,0	1,190	55,8	0,531	9,0
OR2A20P /// OR2A5 ///	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 20 pseudogene /// olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 5 /// olfactory receptor, family 2, subfamily A,	222290_at	0,741	26,5	0,562	7,9	0,404	6,3

OR2A9P	member 9 pseudogene									
ORAI2	Orai calcium release-activated calcium modulator 2	231406_at	0,825	23,2	1,989	1,0	1,636	2,5		
ORC6L	origin recognition complex, subunit 6 like (yeast)	219105_x_at	0,346	0,0	0,797	31,5	0,532	7,3		
OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A	209485_s_at	1,687	8,0	2,596	2,8	0,501	10,3		
OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A	208158_s_at	2,066	1,4	2,268	2,8	0,517	6,3		
P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	204088_at	0,534	1,6	0,645	4,5	1,181	43,9		
P2RY6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	208373_s_at	1,600	23,2	0,554	7,9	0,342	2,2		
P4HB	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	1564494_s_at	0,649	9,5	0,361	0,6	1,585	11,7		
PADI2	peptidyl arginine deiminase, type II	1554384_at	0,393	9,5	0,374	6,1	1,226	45,7		
PANX1	pannexin 1	204715_at	0,943	43,8	1,900	7,9	1,683	7,3		
PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	224701_at	0,390	2,7	0,436	5,2	0,541	15,8		
PARVB	parvin, beta	216253_s_at	0,421	5,8	0,241	0,6	2,268	2,2		
PATL1	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)	225468_at	0,635	8,0	0,356	0,4	0,744	28,4		
PATL1	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)	235235_s_at	0,623	2,7	0,244	0,0	0,944	43,9		
PBK	PDZ binding kinase	219148_at	0,060	0,0	0,806	29,0	0,469	7,3		
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1	212148_at	1,588	26,5	0,390	6,1	0,368	7,3		
PCDH7	protocadherin 7	210273_at	1,968	9,5	0,450	1,1	2,356	9,0		
PCDHB5	protocadherin beta 5	223629_at	0,352	2,0	1,720	12,7	0,374	7,3		
PCF11	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog	227622_at	0,322	0,0	0,605	7,9	0,838	38,5		
PCGF2	polycomb group ring finger 2	203792_x_at	0,649	7,0	0,502	2,3	2,540	0,0		
PCNX	pecanex homolog (Drosophila)	213159_at	0,564	2,0	0,621	5,2	0,881	40,4		
PCTK1	PCTAIRE protein kinase 1	207239_s_at	0,647	8,0	0,331	0,2	1,848	2,2		
PCTK1	PCTAIRE protein kinase 1	208824_x_at	0,642	9,5	0,371	0,5	1,862	3,2		
PCK3	PCTAIRE protein kinase 3	214797_s_at	0,408	2,0	0,299	0,6	4,803	1,4		
PDE7A	Phosphodiesterase 7A	230500_at	0,411	1,0	0,319	1,7	0,945	28,4		
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	205463_s_at	0,529	3,4	2,531	0,6	1,871	3,9		
PDS5B	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B	204742_s_at	0,640	5,8	1,067	49,0	0,619	9,0		
PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	33760_at	0,871	20,4	0,642	2,8	0,655	6,3		
PEX26	peroxisomal biogenesis factor 26	219180_s_at	1,615	5,8	2,323	0,7	1,426	9,0		
PFDN1	prefoldin subunit 1	201507_at	0,950	50,7	0,627	6,1	0,594	6,3		
PGD	phosphogluconate dehydrogenase	201118_at	0,608	4,8	0,488	0,8	1,074	60,5		
PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	204049_s_at	2,305	1,0	0,584	9,0	0,391	2,7		
PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	244774_at	9,303	0,9	1,924	7,9	1,821	59,1		
PHB	prohibitin	200658_s_at	0,859	32,6	0,640	7,9	0,613	7,3		
PHF17	PHD finger protein 17	225820_at	2,113	1,6	3,323	1,5	1,400	28,4		
PHF19	PHD finger protein 19	227212_s_at	0,569	1,6	0,623	6,8	1,228	36,5		
PHKB	phosphorylase kinase, beta	242248_at	0,447	5,8	0,506	7,9	1,157	50,6		
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	217999_s_at	0,581	8,0	0,446	0,8	1,108	59,8		
PIGY	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y	224661_at	0,614	9,5	0,972	56,9	0,496	7,3		
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	212239_at	3,797	0,3	2,235	3,8	1,060	59,1		
PILRB	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta	220954_s_at	0,481	7,0	0,526	2,8	1,235	56,7		
PINK1	PTEN induced putative kinase 1	209018_s_at	1,646	7,0	0,566	2,3	1,637	5,7		
PLCD4	phospholipase C, delta 4	224505_s_at	0,399	4,2	0,527	9,0	0,456	9,0		
PLCXD1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1	218951_s_at	0,369	1,0	0,541	5,2	1,330	38,5		
PLEKHA2	pleckstrin homology domain containing, family A, member 2	238013_at	0,623	8,0	0,324	0,4	1,241	42,2		
PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	202240_at	0,157	0,0	0,248	0,2	0,666	20,9		
PLK4	polo-like kinase 4 (Drosophila)	204887_s_at	0,103	0,0	0,506	4,5	0,483	6,3		
PLK4	polo-like kinase 4 (Drosophila)	211088_s_at	0,127	0,0	0,241	0,5	0,689	30,2		
PLTP	phospholipid transfer protein	202075_s_at	0,619	9,5	0,326	0,2	2,394	1,9		
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	204285_s_at	0,390	2,7	0,431	2,3	0,514	10,3		
PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	217875_s_at	0,417	0,4	3,485	1,3	2,593	0,0		
POLD3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	212836_at	0,535	0,9	0,897	45,3	0,653	8,2		
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	205909_at	0,374	0,0	0,911	38,8	0,346	2,2		
PPP2R1A	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha isoform	200695_at	1,507	4,8	0,354	0,0	1,562	6,3		
PPP4C	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	208932_at	0,921	41,2	0,399	0,2	0,573	4,4		
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain	228964_at	1,275	38,3	0,414	1,7	0,509	9,0		
PRDX2	peroxiredoxin 2	211658_at	0,770	32,6	0,401	1,5	0,451	5,7		
PREX1	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1	224909_s_at	0,251	1,2	0,292	1,0	2,391	2,5		
PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	228230_at	0,320	0,3	0,404	0,7	1,151	61,3		
PRKCD	protein kinase C, delta	202545_at	0,522	4,2	0,569	5,2	1,472	14,2		
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	210543_s_at	0,788	13,2	0,567	2,3	0,551	4,4		
PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	204279_at	0,534	2,0	0,588	3,8	0,829	30,2		
PSMC2	proteasome 26S subunit, ATPase, 2	201067_at	1,294	23,2	0,507	1,5	0,456	1,6		
PSMD1	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 1	201198_s_at	1,086	52,6	0,642	7,9	0,534	4,9		

PSMD11	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 11	208777_s_at	0,832	23,2	0,593	3,8	0,570	4,9
PSPC1	paraspeckle component 1	222611_s_at	0,942	54,1	0,365	0,7	0,503	8,2
PTCD1	pentatricopeptide repeat domain 1	222796_at	2,145	5,8	1,812	6,8	—	—
PTCD3	Pentatricopeptide repeat domain 3	228512_at	0,756	9,5	1,797	3,4	1,701	8,2
PTGFR	prostaglandin F receptor (FP)	1555097_a_at	0,415	7,0	0,259	0,8	0,850	47,4
PTGR1	Prostaglandin reductase 1	242775_at	0,607	7,0	0,735	22,2	0,419	1,9
PTMA	prothymosin, alpha	211921_x_at	0,389	0,0	1,640	6,8	0,630	9,0
PTPN18	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18	203555_at	0,560	4,2	0,618	5,2	1,316	17,3
PTPRM	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	1555578_at	2,136	2,0	2,922	1,7	1,384	58,6
PTTG1	pituitary tumor-transforming 1	203554_x_at	0,151	0,0	0,545	3,8	0,649	10,3
PXK	PX domain containing serine/threonine kinase	1552275_s_at	0,610	5,8	0,624	9,0	0,736	24,3
QKI	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	241938_at	0,541	4,8	0,502	4,5	0,975	58,6
RABL2A /// RABL2B	RAB, member of RAS oncogene family-like 2A /// RAB, member of RAS oncogene family-like 2B	220500_s_at	0,607	8,0	0,521	5,2	1,467	19,0
RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	222077_s_at	0,301	0,0	0,738	15,9	0,473	2,7
RAD51AP1	RAD51 associated protein 1	204146_at	0,187	0,0	0,704	17,7	0,384	1,4
RAD51L3	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	209965_s_at	0,445	0,5	0,603	4,5	0,929	47,4
RAD52	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	205647_at	0,515	2,7	0,689	14,3	0,510	4,9
RAD54B	RAD54 homolog B (S. cerevisiae)	219494_at	0,420	1,2	0,747	22,2	0,548	7,3
RARA	retinoic acid receptor, alpha	203749_s_at	0,787	17,7	1,611	9,0	2,694	0,6
RAVER1	ribonucleoprotein, PTB-binding 1	223425_at	0,539	9,5	0,331	1,7	2,009	3,5
RBM15B	RNA binding motif protein 15B	202689_at	0,874	32,6	1,569	6,8	1,707	4,4
RBM25	RNA binding motif protein 25	1557081_at	0,642	5,8	1,656	11,1	0,472	2,2
RBMXL1	RNA binding motif protein, X-linked-like 1	227748_at	0,881	38,3	0,621	6,8	0,535	5,7
RCC1 /// SNHG3- RCC1	regulator of chromosome condensation 1 /// SNHG3-RCC1 readthrough transcript	206499_s_at	1,080	54,8	1,706	9,0	2,504	1,4
RCL1	RNA terminal phosphate cyclase-like 1	222666_s_at	0,577	4,8	0,573	3,4	1,087	61,9
RCN3	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	219102_at	0,653	2,0	0,466	0,5	1,365	19,0
RFC3	replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	204127_at	0,402	0,0	0,760	24,5	0,438	2,7
RFXANK	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein	202758_s_at	0,570	1,0	0,531	1,7	0,734	17,3
RGNEF	Rho-guanine nucleotide exchange factor	1560348_at	2,002	2,7	0,520	3,8	1,708	6,3
RGS4	regulator of G-protein signaling 4	204338_s_at	2,472	8,0	0,230	1,5	0,195	4,4
RNF126	ring finger protein 126	205748_s_at	0,665	9,5	0,352	0,4	1,678	10,3
RNF144A	ring finger protein 144A	204040_at	0,277	0,9	0,521	6,8	0,620	15,8
RNF145	ring finger protein 145	238949_at	0,953	52,6	2,777	0,5	2,252	1,6
RNPEPL1	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1	218301_at	0,877	35,6	1,837	2,8	1,687	3,5
RP6- 213H19.1	serine/threonine protein kinase MST4	224407_s_at	0,185	0,2	0,247	0,2	1,165	56,7
RPL29	ribosomal protein L29	216570_x_at	0,890	32,6	1,791	4,5	2,170	6,3
RPL32P3	ribosomal protein L32 pseudogene 3	235314_at	0,453	0,0	0,613	5,2	0,862	36,5
RPL37A	Ribosomal protein L37a	214041_x_at	1,645	2,7	2,105	2,3	1,152	47,4
RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked	216342_x_at	1,118	48,6	1,590	9,0	1,589	4,9
RPS6KB1	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	204171_at	0,636	9,5	0,807	29,0	0,554	4,9
RPS9	ribosomal protein S9	214317_x_at	0,428	1,2	0,945	55,8	0,477	6,3
RPUSD3	RNA pseudouridylate synthase domain containing 3	225743_at	0,665	4,2	0,541	2,8	1,095	60,7
RRBP1	ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)	201203_s_at	0,616	3,4	0,353	0,2	1,633	6,3
RRM2	ribonucleotide reductase M2	201890_at	0,071	0,0	0,712	26,8	0,383	4,9
RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	242625_at	0,142	3,4	0,219	6,8	0,507	28,4
RTK	rhotekin	225150_s_at	0,658	9,5	0,385	1,1	1,404	22,6
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	219684_at	0,291	4,8	0,390	9,0	0,602	28,4
RUVBL1	RuvB-like 1 (E. coli)	201614_s_at	0,563	1,4	0,579	6,1	0,535	4,9
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	204502_at	0,469	9,5	0,368	3,8	0,518	15,8
SC65	synaptonemal complex protein SC65	204078_at	0,624	1,0	1,593	4,5	1,748	2,5
SCARA3	scavenger receptor class A, member 3	223843_at	0,393	2,7	0,601	12,7	0,505	7,3
SCARA3	scavenger receptor class A, member 3	219416_at	0,655	9,5	0,345	0,4	0,724	17,3
SCARA3	scavenger receptor class A, member 3	223842_s_at	0,393	1,0	0,320	0,2	0,773	26,2
SCLT1	sodium channel and clathrin linker 1	236487_at	0,631	0,7	1,208	29,0	0,651	9,0
SDC1	syndecan 1	201287_s_at	0,354	4,2	0,338	2,8	0,972	60,7
SDC3	syndecan 3	202898_at	—	—	2,715	5,2	3,407	1,6
SELENBP1	selenium binding protein 1	214433_s_at	0,488	2,0	0,423	0,8	0,738	22,6
SEMA4B	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, 4B	234725_s_at	0,418	2,4	0,626	7,9	1,170	40,4
SENP7	SUMO1/sentrin specific peptidase 7	220735_s_at	0,662	4,2	0,408	1,3	0,962	50,6
SEPN1	selenoprotein N, 1	224659_at	0,471	2,4	0,402	1,3	1,483	12,8
SEPT13	Septin 13	1569974_x_at	1,573	4,2	1,738	6,1	1,128	53,2
SEPT9	septin 9	207425_s_at	0,782	43,8	2,403	6,8	5,114	0,0
SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	210076_x_at	2,382	1,4	1,320	29,0	2,034	8,2
SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1	208863_s_at	0,552	2,7	0,702	19,8	0,415	3,2



SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1	201742_x_at	0,672	20,4	0,321	0,6	0,473	8,2
SFRS3	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	232392_at	0,404	0,9	0,422	1,3	0,768	28,4
SFRS7	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	201129_at	0,658	9,5	0,836	41,3	0,562	9,0
SFXN3	sideroflexin 3	220974_x_at	0,653	5,8	0,625	5,2	0,918	49,0
SGOL2	shugoshin-like 2 (S. pombe)	230165_at	0,184	0,0	0,752	17,7	0,501	4,4
SGOL2	shugoshin-like 2 (S. pombe)	235425_at	0,166	0,0	1,616	15,9	0,607	9,0
SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	219493_at	0,088	0,0	0,687	12,7	0,461	4,9
SHFM1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1	202276_at	0,710	11,2	0,564	2,8	0,447	1,9
SLC17A9	solute carrier family 17, member 9	232922_s_at	0,508	1,4	0,304	0,2	1,259	28,4
SLC17A9	solute carrier family 17, member 9	233328_x_at	0,421	4,2	0,363	2,8	1,467	17,3
SLC1A3	solute carrier family 1, member 3	1569054_at	0,314	2,0	0,136	0,2	1,496	36,5
SLC24A3	solute carrier family, member 3	219090_at	0,312	8,0	1,039	53,5	0,247	9,0
SLC25A14	solute carrier family 25, member 14	211855_s_at	0,977	54,1	0,596	7,9	0,606	9,0
SLC25A40	solute carrier family 25, member 40	227012_at	0,440	0,2	0,815	24,5	0,541	4,4
SLC29A1	solute carrier family 29, member 1	201801_s_at	0,432	5,8	0,327	2,0	1,886	8,2
SLC5A3	solute carrier family 5, member 3	212944_at	0,500	7,0	1,162	36,2	0,456	9,0
SLC5A3	solute carrier family 5, member 3	213167_s_at	0,480	5,8	0,161	0,2	0,575	15,8
SLC5A5	solute carrier family 5, member 5	211123_at	2,330	2,7	1,818	19,8	2,718	1,6
SLC9A5	solute carrier family 9, member 5	220650_s_at	2,120	3,4	1,479	22,2	2,267	1,4
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	204240_s_at	0,907	38,3	0,574	2,0	0,556	6,3
SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	201663_s_at	0,212	0,0	0,479	1,7	0,563	10,3
SMO	smoothed homolog (Drosophila)	218629_at	0,493	1,6	0,581	2,8	1,438	12,8
SMTN	smoothelin	207390_s_at	0,551	9,5	0,439	3,4	2,197	1,9
SMYD3	SET and MYND domain containing 3	218788_s_at	2,434	3,4	1,017	55,8	2,649	1,2
SNAI1	snail homolog 1 (Drosophila)	219480_at	0,404	2,4	0,510	6,1	1,426	34,3
SNRPA	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	201770_at	0,450	0,0	0,618	5,2	1,364	14,2
SNTB1	syntrophin, beta 1	208608_s_at	0,476	7,0	0,387	2,8	2,360	3,2
SOLH	small optic lobes homolog (Drosophila)	204275_at	0,535	2,4	0,393	0,7	2,159	0,9
SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2	204288_s_at	0,542	4,8	0,618	9,0	1,290	30,2
SORD	sorbitol dehydrogenase	201562_s_at	0,656	2,4	0,611	3,4	1,348	24,3
SOX12	SRY (sex determining region Y)-box 12	204432_at	1,315	29,6	2,105	3,8	3,806	0,0
SPAG5	sperm associated antigen 5	203145_at	0,161	0,0	0,809	26,8	0,548	7,3
SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog	209891_at	0,051	0,0	0,735	22,2	0,515	9,0
SPIN4	spindlin family, member 4	228654_at	0,547	2,7	0,932	50,6	0,554	4,4
SPSB2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2	223580_at	1,566	8,0	1,559	14,3	1,584	8,2
SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	1555875_at	1,989	4,2	0,561	11,1	2,308	1,6
SSBP4	single stranded DNA binding protein 4	229269_x_at	0,936	43,8	1,537	9,0	1,555	4,9
SSX2IP	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	203017_s_at	0,435	0,4	0,856	38,8	0,573	9,0
SSX2IP	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	203015_s_at	0,631	4,2	0,500	2,8	1,347	55,6
ST3GAL2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	205346_at	0,571	2,7	0,414	1,0	1,109	62,0
STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1	213330_s_at	0,658	3,4	0,349	0,2	0,818	26,2
STRA13	stimulated by retinoic acid 13 homolog (mouse)	209478_at	0,542	1,4	0,877	38,8	0,461	2,2
STRN3	striatin, calmodulin binding protein 3	215505_s_at	2,028	8,0	6,218	0,2	—	—
SUZ12P	Suppressor of zeste 12 homolog pseudogene	236386_at	0,602	8,0	0,269	0,8	0,568	9,0
TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	218308_at	0,091	0,0	0,532	3,4	0,797	28,4
TAF4B	TAF4b RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 105kDa	235020_at	1,078	54,1	1,977	3,4	1,743	9,0
TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	208829_at	0,584	2,4	0,414	0,4	1,193	45,7
TBL1X	transducin (beta)-like 1X-linked	201868_s_at	0,444	2,7	0,400	2,0	1,341	26,2
TBRG1	transforming growth factor beta regulator 1	226318_at	0,649	7,0	0,635	7,9	0,711	17,3
TBRG1	transforming growth factor beta regulator 1	242701_at	0,464	2,7	0,547	6,1	1,425	50,6
TCF19	transcription factor 19	223274_at	0,247	0,0	0,585	7,9	0,601	11,7
TCF4	transcription factor 4	212385_at	0,804	26,5	0,612	6,1	0,511	4,4
TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	219715_s_at	0,642	4,2	0,403	0,2	0,792	22,6
TEAD2	TEA domain family member 2	226408_at	0,458	0,2	0,601	4,5	1,533	8,2
TEAD2	TEA domain family member 2	238323_at	0,321	3,4	0,199	0,2	1,797	6,3
TEF	thyrotrophic embryonic factor	225840_at	1,534	17,7	1,804	6,8	1,987	4,9
TFG	TRK-fused gene	221871_s_at	1,601	5,8	0,375	0,5	0,490	5,7
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	220407_s_at	0,312	1,0	0,498	7,9	0,820	50,6
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	209908_s_at	0,285	4,8	0,073	0,2	1,106	53,2
THBS1	Thrombospondin 1	235086_at	1,871	5,8	2,437	4,5	0,808	43,9
THBS1	thrombospondin 1	201110_s_at	1,534	4,2	2,416	0,8	1,440	9,0
TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	1554890_a_at	0,506	3,4	0,313	0,4	0,507	7,3
TIMM17B	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B	203342_at	0,630	5,8	0,619	6,8	1,270	26,2
TK1	thymidine kinase 1, soluble	202338_at	0,124	0,0	0,566	4,5	0,639	10,3
TK1	thymidine kinase 1, soluble	1554408_a_at	0,145	0,0	0,448	1,1	0,835	32,3
TLR3	toll-like receptor 3	206271_at	0,481	7,0	1,099	43,5	0,510	9,0
TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	224321_at	2,504	5,8	5,282	0,0	2,200	1,4

TMEM143	transmembrane protein 143	222905_s_at	0,627	4,8	0,516	1,5	0,933	47,4
TMEM173	transmembrane protein 173	224929_at	1,070	58,8	0,361	0,2	0,633	9,0
TMEM223	transmembrane protein 223	220934_s_at	0,694	9,5	3,071	0,4	1,748	4,9
TMEM30A	transmembrane protein 30A	222391_at	1,581	2,4	2,016	1,5	0,958	54,5
TMEM41B	transmembrane protein 41B	212622_at	1,573	5,8	1,730	9,0	1,268	42,2
TMEM47	transmembrane protein 47	209656_s_at	1,810	1,4	1,659	9,0	1,204	36,5
TMEM49	transmembrane protein 49	1569003_at	0,471	3,4	0,316	0,6	1,198	42,2
TMPO	thymopoietin	209754_s_at	0,252	0,0	0,214	0,0	0,820	38,5
TMPO	thymopoietin	209753_s_at	0,378	0,2	0,481	2,3	0,919	54,5
TMSB15B	thymosin beta 15B	214051_at	0,262	0,0	0,982	57,7	0,522	7,3
TMTC1	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1	226931_at	0,651	9,5	0,383	2,0	1,383	28,4
TNFRSF19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	224090_s_at	0,363	7,0	0,325	4,5	1,402	49,0
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	202688_at	0,325	1,6	0,366	1,5	0,513	10,3
TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	207426_s_at	0,963	46,3	2,467	9,0	1,672	7,3
TOP1	topoisomerase (DNA) I	208900_s_at	0,617	4,2	2,189	0,8	0,463	4,9
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	201291_s_at	0,076	0,0	0,633	7,9	0,372	2,7
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	201292_at	0,068	0,0	0,650	7,9	0,642	11,7
TPCN2	two pore segment channel 2	235194_at	0,995	54,1	0,383	2,0	0,437	5,7
TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	210052_s_at	0,256	0,0	0,351	0,7	0,620	12,8
TRA2B	transformer 2 beta homolog (Drosophila)	210180_s_at	1,333	35,6	0,604	7,9	0,596	9,0
TRAM1L1	translocation associated membrane protein 1-like 1	244334_at	0,638	9,5	1,232	38,8	0,573	6,3
TRERF1	transcriptional regulating factor 1	238520_at	0,528	4,2	0,682	17,7	0,502	6,3
TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	218145_at	0,566	43,8	2,245	9,0	2,158	7,3
TRIM2	tripartite motif-containing 2	215945_s_at	1,452	5,8	0,663	6,8	0,446	6,3
TRIM21	tripartite motif-containing 21	204804_at	0,648	1,0	0,499	0,8	0,601	5,7
TRIM28	tripartite motif-containing 28	200990_at	0,548	4,2	0,323	0,2	1,759	3,9
TRIM69	tripartite motif-containing 69	1568592_at	0,608	9,5	0,578	6,8	0,699	20,9
TRNP1	TMF1-regulated nuclear protein 1	227862_at	3,149	0,6	1,991	5,2	1,222	38,5
TRO	trophinin	205028_at	0,308	0,7	0,484	3,8	0,775	22,6
TROAP	trophinin associated protein (tastin)	204649_at	0,087	0,0	0,597	9,0	0,674	19,0
TTC26	tetratricopeptide repeat domain 26	233999_s_at	0,593	5,8	0,528	5,2	0,686	20,9
TTK	TTK protein kinase	204822_at	0,066	0,0	0,544	3,8	0,548	6,3
TUBB	tubulin, beta	211714_x_at	0,617	3,4	0,627	6,8	1,046	60,9
TUBB	tubulin, beta	212320_at	0,597	2,7	0,594	3,4	1,100	53,2
TUBB	tubulin, beta	209026_x_at	0,577	2,0	0,587	4,5	1,236	38,5
TUBGCP3	tubulin, gamma complex associated protein 3	215739_s_at	0,640	2,4	0,450	0,3	1,158	47,4
TUG1	taurine upregulated 1 (non-protein coding)	228397_at	0,608	9,5	1,257	31,5	0,314	1,2
TWF1	Twinfilin, actin-binding protein, homolog 1 (Drosophila)	214008_at	1,503	23,2	0,284	1,3	0,169	0,0
TYMS	thymidylate synthetase	1554696_s_at	0,169	0,0	0,527	2,3	0,959	53,2
UBA7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	203281_s_at	0,473	0,2	0,536	1,5	0,994	54,5
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	202954_at	0,110	0,0	0,604	9,0	0,748	24,3
UBE2O	ubiquitin-conjugating enzyme E2O	218141_at	0,849	32,6	1,934	5,2	2,372	1,4
UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	223229_at	0,212	0,0	0,546	6,1	0,669	17,3
UBE2W	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	218521_s_at	1,776	2,4	2,310	0,8	1,010	62,0
UBE2W	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	222656_at	1,539	7,0	1,826	6,8	1,151	43,9
UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	225655_at	0,101	0,0	0,803	33,6	0,389	4,4
UHRF1BP1	UHRF1 binding protein 1-like	1554291_at	0,954	46,3	1,615	7,9	1,952	9,0
ULK1	unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	209333_at	0,634	4,2	0,625	7,9	1,516	11,7
UNC5B	unc-5 homolog B (C. elegans)	226899_at	0,350	1,2	2,249	7,9	1,799	6,3
USP1	ubiquitin specific peptidase 1	202412_s_at	0,518	0,7	0,625	5,2	0,471	3,9
USP1	ubiquitin specific peptidase 1	202413_s_at	0,597	0,5	1,120	43,5	0,622	4,4
USP21	ubiquitin specific peptidase 21	218367_x_at	0,614	4,8	0,488	1,0	1,117	53,2
USP21	ubiquitin specific peptidase 21	234735_s_at	0,613	8,0	0,593	7,9	1,711	4,4
USP53	ubiquitin specific peptidase 53	216775_at	3,877	4,2	1,412	36,2	2,608	8,2
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	210513_s_at	0,476	9,5	0,398	4,5	2,159	3,9
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	211527_x_at	0,354	2,4	0,324	2,0	2,470	2,5
VPS13D	vacuolar protein sorting 13 homolog D (S. cerevisiae)	212326_at	1,139	43,8	0,583	6,8	0,423	7,3
VPS36	vacuolar protein sorting 36 homolog (S. cerevisiae)	222478_at	0,663	4,8	0,983	55,8	0,511	1,9
VRK1	vaccinia related kinase 1	203856_at	0,432	0,6	0,857	41,3	0,573	8,2
WBSCR22	Williams Beuren syndrome chromosome region 22	207628_s_at	0,913	38,3	0,624	3,8	0,627	5,7
WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	216228_s_at	0,645	5,8	0,768	19,8	0,558	8,2
WDR76	WD repeat domain 76	205519_at	0,404	0,5	0,562	3,8	0,687	17,3
WDR89	WD repeat domain 89	244038_at	0,651	7,0	0,502	1,7	0,827	36,5
WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	222777_s_at	0,515	0,3	0,848	33,6	0,574	3,9
WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	209052_s_at	0,399	0,3	0,232	0,0	0,943	56,7
XAF1	XIAP associated factor 1	228617_at	0,292	0,0	1,019	60,1	0,556	9,0
XAF1	XIAP associated factor 1	206133_at	0,494	2,7	0,818	31,5	0,558	8,2
YARS	tyrosyl-tRNA synthetase	238760_at	0,411	5,8	0,455	3,4	0,749	32,3

ZAK	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	225662_at	1,528	1,6	2,345	0,8	1,875	1,4
ZBTB7A	zinc finger and BTB domain containing 7A	226554_at	1,165	38,3	1,958	2,3	2,094	0,6
ZDHC20	zinc finger, DHHC-type containing 20	225365_at	1,173	43,8	0,489	2,8	0,447	4,9
ZDHC21	zinc finger, DHHC-type containing 21	241946_at	0,964	46,3	0,427	0,8	0,478	7,3
ZFHX4	zinc finger homeobox 4	241700_at	0,604	3,4	0,706	12,7	0,380	1,4
ZFPM2	zinc finger protein, multitype 2	219778_at	1,592	26,5	0,577	6,8	0,380	2,2
ZNF232	zinc finger protein 232	219123_at	0,606	1,6	0,657	4,5	0,903	43,9
ZNF367	zinc finger protein 367	229551_x_at	0,160	0,0	0,670	19,8	0,349	2,2
ZNF641	zinc finger protein 641	226509_at	0,485	7,0	0,887	45,3	0,542	5,7
ZNF642	zinc finger protein 642	1569107_s_at	0,659	8,0	1,254	33,6	0,522	4,4
ZNF680	zinc finger protein 680	229533_x_at	0,425	0,3	1,515	15,9	0,612	4,4
ZNF691	zinc finger protein 691	232780_s_at	0,332	1,4	0,436	2,0	0,718	19,0
ZNF776	zinc finger protein 776	228652_at	1,683	8,0	1,678	7,9	0,863	42,2
ZNF785	zinc finger protein 785	1554770_x_at	0,715	13,2	2,330	0,6	2,117	4,9
ZNF800	zinc finger protein 800	227101_at	1,635	7,0	1,657	9,0	1,177	38,5
ZNF814	zinc finger protein 814	60794_f_at	0,825	26,5	0,544	2,8	0,492	4,4
ZNF93	zinc finger protein 93	215758_x_at	0,640	7,0	0,553	5,2	1,104	60,2
ZSWIM1	zinc finger, SWIM-type containing 1	223607_x_at	1,632	11,2	1,886	5,2	2,044	4,4
ZWILCH	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)	218349_s_at	0,416	0,0	0,219	0,0	0,423	1,6
ZWILCH	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)	222606_at	0,443	0,0	0,797	26,8	0,530	3,9
ZWINT	ZW10 interactor	204026_s_at	0,340	0,2	0,788	31,5	0,383	4,4

Angegeben sind die Genexpressionsänderungen (FC) jeweils im Vergleich zu hMSC-K und die Falsch-Positiv-Rate (q) in Prozent. Rot unterlegte Werte bedeuten eine erhöhte Expression des Genprodukts ( $FC > 1,5$ ), grün bedeutet eine erniedrigte Expression ( $FC < 0,667$ ) bei einem q-Wert  $< 10\%$ . Schwarz bezeichnet keine signifikante Genexpressionsänderung. Einige Probesets zeigen keine Expression (—). Die Sequenz mehrerer Probesets konnte noch keinem Gen zugeordnet werden (---).

### 8.1.1 GOstat-Analysen

Die folgenden Daten stellen die Ergebnisse der in dieser Arbeit gezeigten GOstat-Analysen ausführlich dar mit allen GO-Gruppen ab mindestens 4 differentiell exprimierten Genen in den Kategorien Biologischer Prozess, Zelluläre Komponente und Molekulare Funktion. Nicht in allen Analysen konnte den jeweiligen Kategorien überrepräsentativ häufig Gene zugeordnet werden. Für jede Untersuchung wurden unterschiedliche Referenzlisten (Referenz) verwendet.

Tab. 21 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (3381) in hMSC-alt (Referenz: 27356 Probesets, die in hMSC-alt und/oder hMSC-K exprimiert wurden)

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
regulation of growth	ppp2r1a tgfb1 tmem97 tp53 pml shc1 rb1 smad3 cda wisp1 htatip ghrl tgfb2 igfbp4 tnks2 foxc2 vegfb pak2 ndrg3 socs4 akt1 itch socs6	23	123	0.00259
regulation of cell growth	ppp2r1a tgfb1 tmem97 tp53 pml shc1 rb1 smad3 cda wisp1 htatip tgfb2 igfbp4 vegfb pak2 ndrg3 socs4 itch socs6	19	102	0.0107
regulation of apoptosis	pmaip1 ppp2r1a cfl1 gdf5 prnp tp53 api5 ghrl tnfaip3 tgfb2 dapk3 bcl2l1 tnfrsf10d casp8 adora1 hipk3 mx1 akt1 tia1 adamts4 ccl2 tgfb1 hspb1 pml pea15 fastk smad3 traf7 tgm2 dedd kras nod1 ripk3 foxc2 calr tnfrsf19 sycp3 txndc5 brca2 rela pik3r2 tiaf1 rp6-213h19.1	43	330	0.0241
regulation of programmed cell death	pmaip1 ppp2r1a cfl1 gdf5 prnp tp53 api5 ghrl tnfaip3 tgfb2 dapk3 bcl2l1 tnfrsf10d casp8 adora1 hipk3 mx1 akt1 tia1 adamts4 ccl2 tgfb1 hspb1 pml pea15 fastk smad3 traf7 tgm2 dedd kras nod1 ripk3 foxc2 calr tnfrsf19 sycp3 txndc5 brca2 rela pik3r2 tiaf1 rp6-213h19.1	43	331	0.0241
positive regulation of biological process	shc1 rb1 htr2a map3k7 cant1 adora1 mia3 ecm1 mx1 akt1 adamts4 tmed4 e2f1 pdpn egr1 smad3 traf7 ppp2r1a tgm2 dedd kras capns1 sp1 ddr2 tnfrsf19 tgfb1 tfdp1 brca2 rela nsd1 pmaip1 ppp2r1a tp53 tbrg4 crip2 fntb ilk mc4r htatip arid1a ghrl tgfb2 dapk3 cbl trim28 fosl1 nrp1 foxo3 casp8 tgfb2 map3k7ip2 tia1 tgfb1 pml rbm14 fastk tfg nod1 fkbp1a vegfb foxc2 ripk3 pcdb1 irak1 jarid1a ripk1	66	597	0.0663

actin filament capping	svil gsn rdx sptbn1 capg	5	12	0.0663
barbed-end actin filament capping	svil gsn rdx sptbn1 capg	5	12	0.0663
positive regulation of cellular process	pmaip1 ppp2r1a tp53 shc1 tbrg4 rb1 cript2 fntb ilk htatip arid1a htr2a tgfb2 dapk3 cbl fosl1 trim28 nrp1 cant1 foxo3 casp8 tgfb2 adora1 mia3 ecm1 mx1 map3k7ip2 tia1 adamtsl4 tgfb1 pml tmed4 rbm14 e2f1 egr1 pdpn fastk smad3 tfg ppp2r4 traf7 tgm2 dedd kras nod1 fkbp1a capns1 foxc2 ripk3 sp1 vegfb ddr2 tnfrsf19 pcdd1 irak1 jarid1a tgfb1 brca2 tfdp1 nsd1 rela ripk1	62	558	0.0709
negative regulation of actin filament depolymerization	svil gsn rdx sptbn1 capg	5	13	0.0809
regulation of actin filament depolymerization	svil gsn rdx sptbn1 capg	5	14	0.0984
<b>Zelluläre Komponente</b>				
cytoplasm	bsg rdx cope cog1 atp6ap1 kpn1a ufm1 nrp1 htr2a plcd1 psmc2 exosc5 nadk pik3cb furin scarb2 stk11 drg2 utrn mpi trpv2 pde11a psmf1 ptgis pkn2 sec61a2 trak2 man1b1 spsb1 vps26b ptpn11 nmt1 nfkbia por ltb4d4 b3gat3 plekhf2 ikbkg flj21986 rela arhgef1 scd5 pex14 rabep1 rc3h2 dctn4 bach1 ulk1 ccdc6 clcc1 ccdc88a ankhd1 clic4 cdc42 atg4b glt25d1 adar socs6 mir16 pkm2 gpi dffa wbp11 eif4g2 arfp2 polg rasa2 prkcd plekh2 ripk3 hsp90ab1 eif2b3 prune poldip2 pik3r2 fgd6 dbn1 march6 nsf1c uqcc col6a2 txndc11 lypla3 oprs1 lrp5 sypl1 mfn1 nme1 idh3g cybb nfkb2 nxf1 fgd1 tom1 surf4 birc7 sgsh psme3 ccnd3 slc35b4 elp3 clcn3 sec61a1 itpr1 srp68 zfr hps1 capns1 atg4c cog7 edc3 sept2 sepw1 c1orf166 hbb daxx elmo2 ech1 ppp2r1a ccdc91 smad5 hipk1 hmg20b add1 acadvl ghrl dbt fmo2 zfp3612 col4a2 ppm2c plk1 psmb8 cugbp1 zyx clip3 mpp5 ide mex3c sumo3 prrc1 hmgcl pip4k2b hrb mlstd1 glul srpk1 fkbp1a epb41l3 aldha1 mbnl2 akt3 gns txndc5 lypla1 fbxo5 uhmk1 lars fxr1 parp3 eif3k ikbke dcakd trpc4ap gpa1 g6pd hgs dctn1 slc25a39 c19orf24 gle1 nipsnap1 eprs trip10 cox15 mfn2 tars2 zdhhc8 ncapd2 nme4 tln1 ak5 papola trib2 tapbp galnt6 atxn7 rhoa ptges2 pfn1 tp53 prnp aurka atg7 fntb wnk1 kpn4 ush1g trim27 btbd2 ubr1 cbl cabyr actr8 foxo3 epb41l2 tmem143 znfx1 syvn1 ppp4c trim21 calu map3k2 eml4 tgfb1 tbccl gdi1 coro1b gsn p4hb sfxn3 nod1 rangap1 cugbp2 akr1b1 rab11b g3bp1 ndrg3 prmt5 ifi44 ddit4l cenpm ruvbl1 cdc42ep1 ogdh rp6-213h19.1 ripk1 tabbp psmb9 epb41l4b banf1 mgat4b slc25a11 chpf ncstn mccc2 arpc4 rtp4 arhgap1 cant1 tubgcp5 pgrmc1 stx16 mcrcs1 svil hipk3 xpnpep3 scyl2 ap1m1 galc fn1 smad3 pfdn1 ipo8 hsf1 tgm2 zfhx3 ranbp9 rps23 rhob selenbp1 nsdhl klc1 cercam hspd1 ipo9 yif1a agps gosr2 cfl1 api5 aldha2 adam17 ssh1 cyb5r3 oas2 dtl trappc1 mgat1 pak2 pard6a tubb sgcb rtn2 wdr48 sh3gl1 map3k7ip2 lancl1 kiaa1189 cyb5b yipf3 ddef1 tmem168 timm17b epm2aip1 sort1 vamp2 gdi2 atm tmmod3 trap1 fasn srpr crabp2 acy1 pld1 stx5 tmem49 ears2 gga2 kif2a kcnab1 shank2 tyr mrps15 man2b1 ctbp1 wwox calcoc1 fez1 gab1 troap apex2 camkk2 ndufs2 traf7 arf1 galnt2 pafah1b1 smtn kpn5 st8sia1 atxn2 pak4 gps1 capg nat13 gna13 sptbn1 sec23b crk rcn3 nucb1 tk1 tbrg4 calca tank ankfy1 bloc1s1 htatip c1qtnf1 ythdf3 rrm1 myl9 epn1 ccbl1 ntlh1 ppia c12orf48 st3gal2 sec24c casp8 scotin fnip1 fbxl20 mapre3 lgals8 cdc37 stip1 plekhm2 baalc hfe exoc5 atg16l1 pcdd1 gftp2 sgk3 irf9 fkbp7 shc1 cyp1b1 irf3 stat2 uqrc1 copz1 uso1 men1 agpat3 c14orf159 galnt5 gfm2 top2a nrt2 fut8 lamp1 ghdc abcd3 tacc3 eml3 fbwx11 arfgap1 smg1 adam10 ap1s3 tubgcp3 cept1 nudt21 b3gnt2 emilin1 znf175 akap10 ppp1ca ap1g1 pttg1 copa pnpla6 dag1 psap snap29 pex19 paaf1 git1 plcg1 mapk14 actr1a oxa1l psme2 scara3 ndrg4 ptpn14 flot1 rps6ka5 slc25a22 rars2 steap3 apbb1ip sqle mrpl49 abhd10 fam126a napa cab39 plcd4 nfs1 wfs1 cit mapre1 gcn11l1 usp5 pik3cd ppap2b psmd11 arfp1 nr3c1 padi2 gm2a mphosph9 nr1h2 ghitm aco2 vps18 dhx9 oas1 adsl nfatc2ip ddx3x c4orf18 vps39 dbnl tnks1bp1 clint1 slc25a28 prex1 kdelr1 ptpn21 cct2 dpm2 ubxd8 cenpj kiaa0284 pkn1 ap2m1 pld3 gbf1 rnf123 phb psmd1 shb tnks2 chst12 rbm8a capn1 glg1 bcl2l1 psme4 ptpn9 nolc1 frs2 nrsn2 mx2 srp54 birc5 siah1 itch arfrp1 nusap1 acsl5 atp2a2 ak1 ywhae hsd3b7 dnaja3 cda atp6v1b2 comt rpl10 akr1b10 fzf1 c19orf6 blmh herc5 homer3 ephx1 rnf144a gcs1 gga3 tnfaip3 rab3d phlpp twf1 tpr oasl ak2 atp7a dgka bcat1 appl2 col8a1 mx1 akt1 fkbp14 klhd3 gstm1 hspb1 papd1 cdc42ep3 e2f1 p1ce1 gucy1b3 trio farsa asna1 dab2 dedd ociad1 coasy calr alg3 ubr4 cpne3 brca2 chaf1b mgea5 kiaa0101 pdk4 pmaip1 rab2a ap3b1 aldha18a1 chek1 acbd3 ilk tollip ugcg1 dapk3 ap2b1 mkln1 parvb pdlim7 trim23 golgb1 prksh sec22b atpaf1 sypl2 parp14 tubgcp4 marcks bard1 lman1 kntc1 pea15 shfm1 eif4a2 tfg htra2 bcs1l acads tor3a thtpa dhcr7 dner xpo7 mlf2 trim25 kif2c hsf2 txnip gstm2 rnaseh1 galnt4 pex5	622	3935	0.013
receptor complex	itga3 chrna5 itgb8 tgfb2 itga2 itga7 osmr smad3 irak1 tollip tgfb1 itgb2 itga11 itga5 srpr	15	41	0.013
spindle	kntc1 mapre1 tpx2 aurka spin1 rb1 tubgcp3 pafah1b1 kif23 ttk tubgcp5 aurkb dctn1 birc5 fbxo5 tubgcp4 akt1 cdc2	18	57	0.0336

membrane	<p>bsg pigq rdx cope cog1 atp6ap1 slc8a1 pld1 mrc2 kpna1 stx5 tmem49 nrpb1 htr2a gga2 zdhhc21 knab1 loc284297 shank2 tyr furin scarb2 folr1 utrnrn atp2b4 sdc1 trpv2 bcl2l11 ptgis fez1 slc4a2 aqp12a sec61a2 trak2 dgcr2 ticam2 ndufs2 traf7 arf1 man1b1 vps26b galnt2 pafah1b1 kpna5 st8sia1 por b3gat3 gpr176 gna13 slc16a7 arhgef1 scd5 sptbn1 pex14 ednra sec23b gp1ba rc3h2 nmur2 crk adam15 lrcc32 nucb1 ulk1 cacna2d1 ankfy1 epor clcc1 ccdc88a hiatl2 epn1 clstn1 atp1b1 cdc42 clic4 slc1a3 st3gal2 tmem16k ttyh3 npr2 sec24c scotin tjp1 tspan17 itfg3 mir16 plekhm2 aspscr1 arl6ip2 pip5k1c arfip2 baalc polg prkcd plekhh2 hfe vegfb atg16l1 smo hla-g march6 en1 itga3 col6a2 txndc11 tmem87b shc1 cyp1b1 oprs1 lrp5 ucrcr1 gpr172a laptm4b copz1 sypl1 diras1 uso1 tnfrsf10d mfn1 tmem115 agpat3 slc2a5 galnt5 cybb fut8 lamp1 surf4 nxf1 dnajb12 tom1 fkbp11 ghdc abcd3 emp3 creld1 ppapdc3 c16orf58 slc35b4 slc7a6 clcn3 tmem194 adam10 sec61a1 phkb cdh10 itpr1 caprin1 ap1s3 cept1 b3gnt2 kras akap10 fcgrt hps1 capns1 ap1g1 tm9sf3 grina flot2 cog7 atp6v1f slc9a3r1 copa pnpla6 itga7 dag1 tgfbr1 lgals3bp psap snap29 c1orf166 gjc1 pex19 ccdc91 ppp2r1a smad5 pscd3 gpr68 add1 acadvl clptm1 ranbp2 fmo2 rdh5 oxa1l gpr125 slc11a2 mst150 zyx mpp5 sbf1 osmr pdgfc scara3 rhbddd2 flot1 btn3a1 slc25a22 yif1b spread1 steap3 apbb1ip pip4k2b c5orf4 sqle hrb slc39a9 mlstd1 mospd3 cdcp1 fzd1 p2rx4 epb41l3 akt3 fam126a dpp4 napa plcd4 irak1 c18orf45 tmco3 c1orf75 wfs1 aaas mbtps2 itga2 nat14 icam1 kcnk2 ppap2b mospd1 tmem158 arfip1 ly6e gm2a scamp2 il17rc kctd20 mphosph9 gpaa1 ghitm hgs mia3 vps18 slc25a39 gfra1 gle1 nipsnap1 ccl2 trip10 cox15 mfn2 tmed4 pdpn zdhhc8 tmem173 c4orf18 p2ry6 c20orf30 rab23 vps39 tln1 slc4a4 ptpra clint1 rab8b rasa3 chrna5 ddr2 tm9sf4 tnfrsf19 tmem9b slc25a28 prex1 kdelr1 galnt6 tabpp pcnx dpm2 c2orf37 rhoa ptges2 mamdc2 ap2m1 pld3 c1orf160 prnp cldn11 phb cd44 rab7l1 kpna4 mboat5 trim27 shb aplp2 cbl tnks2 chst12 capn1 glg1 bcl2l1 ehd2 ca12 tgfbr2 epb41l2 frs2 tmem143 nrsn2 syvn1 pilrb srp54 vn1r1 acsl5 atp2a2 atp11c gpr137 hsd3b7 p4hb il1rapl2 btn3a2 ugt2a1 sfxn3 atp6v1b2 rangap1 zdhhc20 comt rab11b g3bp1 gcom1 fer1l3 c19orf6 reep3 tyro3 ogdh cdc42ep1 ruvbl1 c14orf101 inpp5a c1galt1c1 tabpp tmpo tmem97 epb41l4b homer3 slc29a1 ephx1 rnf144a mgat4b gcs1 notch4 slc25a11 ncstn chpf gga3 rab3d itgb2 g6pc3 trim59 phlpp itga5 tpr ak2 slc20a2 atp7a c11orf24 tor1aip1 rtp4 arhgap1 cant1 nav3 dgka adora1 pgrmc1 stx16 appl2 clcn7 svil slc9a3r2 akt1 sema4b scyl2 praf2 heg1 tmem127 ap1m1 insr mr1 cdc42ep3 plce1 asna1 c20orf59 ipo8 gpc6 dab2 tgm2 slc41a3 alg3 calr lhfp12 lppr2 selenbp1 rhob ubr4 cybrd1 naalad1 nsdhl nrm nup160 cercam c17orf80 hspd1 ipo9 yif1a agps glrb edem2 pdk4 jak2 tpcn1 gosr2 rab2a aldh18a1 ap3b1 aldh3a2 nckap1 atp11b csnk2a1 aktip acbd3 adam17 ilk tmc7 tollip mc4r dscr3 nup98 ssh1 cyb5r3 ap2b1 rftn2 parvb chi3l1 oas2 mgat1 trim23 pak2 kctd10 golgb1 pard6a sgcb eng rtn2 sec22b adam9 sh3gl1 kcnj2 sypl2 itga11 marcks map3k7ip2 cmtm4 apba3 atp6v0e2 lancl1 lman1 kiaa1189 cyb5b scamp1 yipf3 emp1 kiaa0241 bcs1l htra2 plk3 tmem30a dner dhcr7 ddef1 tmem168 timm17b xpo7 ulbp2 sort1 itgb8 cd164 irs4 vamp2 fksq24 gdi2 srpr galnt4 pex5</p>	493	3101	0.0431
ER-Golgi intermediate compartment	lman1 nucb1 rab2a kdelr1 golgb1 fn1 stx5 tmem49 p4hb sec22b yif1a ugagl1 surf4	13	35	0.0431
vesicle	<p>bsg uqcc cope rab2a ap3b1 ulk1 ncstn rab3d ccdc88a copz1 sypl1 atp7a tyr furin clic4 sec24c nrsn2 sec22b sypl2 trpv2 flot1 calu scyl2 tgfb1 ywhae ap1m1 yipf3 zdhhc8 clcn3 hrb p4hb dab2 adam10 traf7 ap1s3 clint1 atp6v1b2 tmem168 hps1 ap1g1 sort1 hsp90ab1 rab11b plekhf2 copa capg vamp2 sgk3 gna13 brca2 atm fasn sec23b</p>	53	247	0.0612
cytoskeleton	<p>rdx mapre1 epb41l4b rb1 parp3 kif22 twf1 kif2a lmna arpc4 utrnrn tubgcp5 vps18 svil top2a dctn1 akt1 coro1c fgd1 cdc2 fez1 trip10 hspb1 cdc42ep3 eml3 dbnl krtap8-1 tubgcp3 tln1 nudt21 smtn pafah1b1 atg4c ranbp9 slc9a3r1 trib2 ubr4 capg dag1 ptpn21 klc1 rhoa cenpj kiaa0284 pfn1 brca2 sptbn1 elmo2 jak2 dctn4 ppp2r1a cfl1 tpx2 dnali1 aurka add1 ccdc6 actr1a ush1g ssh1 cbl myl9 parvb pdlim7 cabyr plk1 clic4 kif15 actr8 zyx atg4b casp8 tubb sgcb epb41l2 dync2h1 ppp4c birc5 ptpn14 tubgcp4 marcks mapre3 nusap1 eml4 cald1 knkc1 pea15 apbb1ip spin1 tbccl gsn coro1b kif14 plekh2 epb41l3 kif23 kif2c ttk ccnb2 aurkb fbxo5 tmod3 cdc42ep1 fgd6 dbn1</p>	105	557	0.0612
cytoplasmic vesicle	<p>bsg uqcc cope rab2a ap3b1 ulk1 ncstn rab3d ccdc88a copz1 sypl1 atp7a tyr furin clic4 sec24c nrsn2 sec22b sypl2 trpv2 flot1 calu scyl2 tgfb1 ywhae ap1m1 yipf3 zdhhc8 hrb dab2 adam10 p4hb traf7 ap1s3 clint1 atp6v1b2 tmem168 hps1 ap1g1 sort1 hsp90ab1 rab11b plekhf2 copa capg vamp2 sgk3 gna13 brca2 atm fasn sec23b</p>	52	243	0.0612
nuclear membrane	aaas atp11b hrb kpna1 oprs1 ipo8 kpna4 ranbp2 trim27 cept1 nup98 pafah1b1 tpr dhcr7 kpna5 rangap1 xpo7 tor1aip1 nav3 fer1l3 scotin nrm nup160 ipo9 gle1 nxf1	26	102	0.0612
nuclear membrane part	aaas atp11b hrb kpna1 oprs1 ipo8 kpna4 ranbp2 nup98 tpr dhcr7 kpna5 rangap1 xpo7 tor1aip1 nav3 nrm nup160 ipo9 gle1 nxf1	21	77	0.0612

Golgi apparatus	cope mapre1 cog1 pld1 rnf144a mgat4b chpf ncstn ppap2b tmem49 stx5 gga3 gga2 copz2 arfip1 atp7a tyr furin uso1 cant1 mposph9 stx16 galnt5 fut8 fgd1 wwox scyl2 trip10 ap1m1 slc35b4 plce1 clcn3 arfgap1 c4orf18 adam10 ap1s3 arf1 b3gnt2 galnt2 clint1 st8sia1 ap1g1 cog7 b3gat3 pak4 copa galnt6 tapbp ptges2 yif1a gbf1 sec23b gosr2 ccdc91 rab2a nuclb1 prnp ap3b1 acbd3 clcc1 ccdc88a tnks2 chst12 trappc1 glg1 mgat1 trim23 cli3 st3gal2 golgb1 sec24c scara3 sec22b arfrp1 calu prrc1 lman1 stip1 sort1 napa fgd6 galnt4 rp6-213h19.1 nsfl1c	84	437	0.0717
protein complex	apobec3f cog1 atp6ap1 h2afy2 aaas usp5 itga2 rb1 kpna1 kcnk2 pik3cd stx5 eif3k kif22 ube2l3 psmc2 exosc5 gga2 kif2a nfy cenph psmd11 pik3cb gm2a kctd20 gpaal1 mrps15 dctn1 gle1 cenpa csnk2b zer1 psmf1 smarcb1 ncapd2 ndufs2 traf7 vps26b pafah1b1 kpna5 chrna5 mcm2 ikbkp gps1 tapbp capg cct2 dpm2 hp1bp3 cenpj ap2m1 rela zwilch dctn4 cacna2d1 ercc3 kpna4 psmd1 htatip anapc2 arid1a rrm1 myl9 atp1b1 cul7 psme4 kif15 tgfb2 atg4b dync2h1 smarca1 tead2 polr3c tspan17 pggt1b birc5 ppp2r2d rbm14 eif4g2 polg gtf3c1 atp6v1b2 hfe rangap1 fzf1 eif2b3 pik3r2 hla-g ruvbl1 en1 itga3 psmb9 anapc5 gga3 itgb2 itga5 tpr arpc4 abt1 men1 tubgcp5 appl2 stx16 top2a nfkb2 nxf1 prkar1b psme3 ccnd3 ap1m1 mr1 e2f1 elp3 gucy1b3 med16 fbwx11 pfdn1 smad3 ipo8 ppp2r4 ap1s3 fcgrt ap1g1 ranbp9 flot2 atg4c rps23 atp6v1f dag1 itga7 klc1 tgfb1 nup160 hspd1 tfdp1 brca2 hbb ipo9 gjc1 mad2l1 chaf1b paaf1 ppp2r1a smad5 dnali1 tollip ranbp2 dscri3 znf148 actr1a dbt lamc2 nup98 ap2b1 cyb5r3 ppm2c hectd3 nrp1 psmb8 kctd10 wipi2 psme2 tubb sgcb cul4b osmr polr3g med24 prkcs sumo3 tubgcp4 flot1 itga11 bard1 atp6v0e2 pea15 h2afy ints12 shfm1 hrb eif4a2 bcs1l polr2e kif14 timm17b xpo7 ulbp2 itgb8 kif23 kif2c irak1 jarid1a gtf3c5 tmod3 srpr baz2a	196	1155	0.0985
<b>Molekulare Funktion</b>				
regulation of kinase activity	ppp2r1a herc5 shc1 ptplad1 rb1 chek1 cdkn3 anapc2 ghrl htr2a ccdc88a map3k7ip1 pik3cb map3k7 cdc42 pak2 dgka hipk3 frs2 pilrb map3k2 ccnt2 birc7 ccnd3 spred1 gab1 cdc37 plce1 camkk2 dbnl traf7 trib2 gps1 irak1 pkn1 daxx cks1b rbl2 ccne2 pkia	40	147	0.000626
regulation of transferase activity	ppp2r1a herc5 shc1 ptplad1 rb1 chek1 cdkn3 anapc2 ghrl htr2a ccdc88a map3k7ip1 pik3cb map3k7 cdc42 pak2 dgka hipk3 frs2 pilrb map3k2 ccnt2 birc7 ccnd3 spred1 gab1 cdc37 plce1 camkk2 dbnl traf7 trib2 gps1 irak1 pkn1 daxx cks1b rbl2 ccne2 pkia	40	151	0.000626
regulation of catalytic activity	herc5 shc1 rb1 ncstn sgsm3 htr2a map3k7ip1 atp7a pik3cb map3k7 arhgap1 gm2a dgka hipk3 fgd1 zer1 birc7 ccnd3 gab1 plce1 camkk2 smad3 arfgap1 traf7 dbnl ppp2r4 trib2 slc9a3r1 gps1 pkn1 daxx ednra nmur2 ccne2 pkia pmaip1 ppp2r1a tp53 calca ptplad1 git1 chek1 cdkn3 anapc2 ghrl ccdc88a cdc42 pak2 frs2 birc5 pilrb ccnt2 map3k2 spred1 cdc37 hrb gdi1 tbc1d17 ddef1 tbc1d10b irak1 gdi2 fbxo5 fgd6 cks1b rbl2	66	290	0.000626
regulation of protein kinase activity	ppp2r1a herc5 shc1 ptplad1 rb1 chek1 cdkn3 ghrl anapc2 htr2a ccdc88a map3k7ip1 pik3cb map3k7 pak2 dgka frs2 hipk3 pilrb map3k2 ccnt2 birc7 ccnd3 spred1 gab1 cdc37 plce1 camkk2 dbnl traf7 trib2 gps1 irak1 pkn1 daxx cks1b ccne2 pkia	38	143	0.000626
regulation of a molecular function	herc5 shc1 rb1 ncstn sgsm3 htr2a map3k7ip1 atp7a pik3cb map3k7 arhgap1 gm2a dgka hipk3 fgd1 zer1 birc7 ccnd3 gab1 plce1 camkk2 smad3 arfgap1 traf7 dbnl ppp2r4 nfkb1a trib2 slc9a3r1 gps1 pkn1 daxx rela pex14 ednra nmur2 ccne2 pkia pmaip1 ppp2r1a tp53 ptplad1 calca git1 aktip chek1 cdkn3 anapc2 ghrl ccdc88a cdc42 pak2 frs2 pilrb birc5 ccnt2 map3k2 spred1 tgfb1 cdc37 hrb gdi1 tbc1d17 ddef1 tbc1d10b pcbd1 smo irak1 gdi2 fbxo5 fgd6 cks1b rbl2	73	332	0.000699
regulation of MAP kinase activity	ppp2r1a spred1 gab1 shc1 plce1 ptplad1 dbnl ghrl htr2a pik3cb trib2 gps1 hipk3 frs2 pkn1 daxx birc7 map3k2	18	59	0.00788
positive regulation of kinase activity	ccnd3 gab1 shc1 plce1 ptplad1 traf7 dbnl ghrl htr2a ccdc88a map3k7ip1 pik3cb map3k7 cdc42 dgka frs2 irak1 pkn1 pilrb daxx birc7 map3k2	22	78	0.00788
positive regulation of MAP kinase activity	pik3cb gab1 shc1 plce1 ptplad1 frs2 dbnl pkn1 htr2a ghrl daxx birc7 map3k2	13	38	0.00895
positive regulation of protein kinase activity	ccnd3 gab1 shc1 plce1 ptplad1 traf7 dbnl ghrl htr2a ccdc88a map3k7ip1 pik3cb map3k7 dgka irak1 frs2 pkn1 pilrb daxx birc7 map3k2	21	75	0.00895
positive regulation of transferase activity	ccnd3 gab1 shc1 plce1 ptplad1 traf7 dbnl ghrl htr2a ccdc88a map3k7ip1 pik3cb map3k7 cdc42 dgka frs2 irak1 pkn1 pilrb daxx birc7 map3k2	22	80	0.00895
positive regulation of catalytic activity	pmaip1 tp53 shc1 calca ptplad1 ncstn htr2a ghrl ccdc88a map3k7ip1 atp7a pik3cb map3k7 cdc42 gm2a dgka frs2 pilrb map3k2 birc7 ccnd3 gab1 plce1 smad3 dbnl ppp2r4 traf7 irak1 pkn1 daxx ednra nmur2	32	132	0.00979
regulation of JNK activity	gab1 ptplad1 hipk3 pkn1 dbnl daxx birc7 map3k2	8	18	0.0135
activation of MAPK activity	pik3cb gab1 shc1 plce1 ptplad1 frs2 dbnl pkn1 daxx ghrl birc7 map3k2	12	35	0.0148
activation of JNK activity	dbnl gab1 pkn1 daxx ptplad1 map3k2 birc7	7	15	0.0161
positive regulation of JNK activity	dbnl gab1 pkn1 daxx ptplad1 map3k2 birc7	7	16	0.0235

**Tab. 22 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (1426) in hMSC-alt (Referenz: 27356 Probesets, die in hMSC-alt und/oder hMSC-K exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
regulation of transcription, DNA-dependent	znf304 lass6 myo6 rbbp4 eya4 rbm39 znf546 znf720 ctnnb1 tulp4 ash1l ep300 znf654 med23 hsf5 znf643 bmi1 trib3 bhllhb3 rsf1 mnt znf236 c11orf30 hivep1 znf345 atf4 glis1 fubp3 rara lcor rab35 egr1 med16 hira znf101 epc1 zeb2 znf623 zbtb41 sp1 suds3 ikbkap znf134 gli3 znf142 sp3 mafg casz1 loc342892 znf3 znf573 zbtb2 sap30l tead1 taf4b foxc1 nfe2l2 znf542 elf1 gabpa klf13 tef runx1t1 smarcc1 zbtb24 loc729806 znf302 lmo4 nrbf2 egr3 spen mdfi zbtb44 hmbox1 taf3 znf468 pbrm1 wasl yeats4 eaf1 rybp klf7 gtf2a1 cux1 ankrd1 med13l nfatc3 msx1 trim33 mga id4 zxdb esf1 znf37a ccdc59 foxd1 fst jmjd2a taf11 znf770 epc2 c20orf20 rfc1 scml1 sirt1 znf205 sox12 znf281 etv6 smad1	110	1371	0.000694
regulation of transcription	znf304 lass6 myo6 rbbp4 eya4 rbm39 znf546 znf720 ctnnb1 tulp4 ash1l ep300 znf654 med23 hsf5 znf643 bmi1 trib3 bhllhb3 rsf1 mnt znf236 c11orf30 hivep1 znf345 atf4 glis1 fubp3 rara lcor rab35 egr1 med16 hira znf101 epc1 zeb2 znf623 zbtb41 sp1 suds3 ikbkap znf134 vgl13 gli3 znf142 tgfbr1 sp3 mafg casz1 loc342892 rbm15b znf3 znf573 zbtb2 sap30l tead1 taf4b foxc1 nfe2l2 znf542 elf1 gabpa klf13 runx1t1 tef smarcc1 zbtb24 loc729806 znf302 lmo4 nrbf2 egr3 spen mdfi zbtb44 hmbox1 taf3 znf468 pbrm1 wasl yeats4 eaf1 klf7 gtf2a1 cux1 rybp gclc ankrd1 med13l nfatc3 msx1 trim33 mga id4 zxdb esf1 znf37a ccdc59 foxd1 fst jmjd2a taf11 znf770 epc2 c20orf20 rfc1 scml1 sirt1 znf205 sox12 znf281 etv6 smad1	114	1451	0.000695
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	myo6 foxc1 ctnnb1 elf1 klf13 gabpa tef ep300 med23 smarcc1 mdfi znf345 rybp klf7 cux1 glis1 atf4 ankrd1 lcor nfatc3 msx1 id4 egr1 med16 hira epc1 fst sp1 ikbkap sox12 znf281 smad1	32	281	0.000749
regulation of gene expression	znf304 lass6 myo6 rbbp4 eya4 rbm39 znf546 znf720 ctnnb1 tulp4 ash1l ep300 znf654 med23 hsf5 znf643 bmi1 trib3 bhllhb3 rsf1 mnt znf236 c11orf30 hivep1 znf345 atf4 glis1 fubp3 rara lcor rab35 egr1 med16 hira znf101 epc1 zeb2 znf623 eif5b zbtb41 sp1 suds3 ikbkap znf134 vgl13 gli3 znf142 tgfbr1 sp3 mafg casz1 loc342892 rbm15b mknk2 znf3 znf573 zbtb2 sap30l tead1 taf4b foxc1 nfe2l2 znf542 elf1 klf13 gabpa runx1t1 tef smarcc1 zbtb24 loc729806 igf2bp2 znf302 lmo4 nrbf2 egr3 spen mdfi zbtb44 hmbox1 eif2ak3 taf3 znf468 pbrm1 wasl yeats4 eaf1 klf7 gtf2a1 cux1 rybp gclc ankrd1 med13l trmt6 nfatc3 msx1 trim33 mga id4 zxdb esf1 znf37a ccdc59 foxd1 fst jmjd2a taf11 znf770 epc2 c20orf20 rfc1 scml1 sirt1 znf205 sox12 znf281 etv6 smad1	119	1551	0.000749
regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	znf304 lass6 myo6 rbbp4 eya4 rbm39 znf546 znf720 ctnnb1 tulp4 ash1l ep300 znf654 med23 hsf5 znf643 bmi1 trib3 bhllhb3 rsf1 mnt znf236 c11orf30 hivep1 znf345 atf4 glis1 fubp3 rara lcor rab35 egr1 med16 hira znf101 epc1 zeb2 znf623 zbtb41 sp1 suds3 ikbkap znf134 vgl13 gli3 znf142 tgfbr1 sp3 mafg casz1 loc342892 rbm15b znf3 znf573 zbtb2 sap30l tead1 taf4b foxc1 nfe2l2 znf542 elf1 gabpa klf13 runx1t1 tef smarcc1 zbtb24 loc729806 znf302 lmo4 nrbf2 egr3 spen mdfi zbtb44 hmbox1 taf3 znf468 pbrm1 wasl yeats4 eaf1 klf7 gtf2a1 cux1 rybp gclc ankrd1 med13l nfatc3 msx1 trim33 mga id4 zxdb esf1 znf37a ccdc59 foxd1 fst jmjd2a taf11 znf770 epc2 c20orf20 rfc1 scml1 sirt1 znf205 sox12 znf281 etv6 smad1	114	1492	0.00125
regulation of metabolic process	znf304 lass6 myo6 rbbp4 eya4 rbm39 znf546 znf720 ctnnb1 tulp4 ash1l ep300 znf654 med23 hsf5 znf643 capza2 bmi1 trib3 bhllhb3 rsf1 mnt znf236 c11orf30 hivep1 ptx3 znf345 atf4 glis1 fubp3 rara lcor egr1 rab35 med16 hira znf101 epc1 map4 zeb2 znf623 eif5b zbtb41 sp1 suds3 ikbkap znf134 vgl13 gli3 lima1 znf142 tgfbr1 sp3 mafg casz1 loc342892 rbm15b mknk2 znf3 znf573 zbtb2 sap30l nfe2l2 foxc1 tead1 taf4b elf1 znf542 klf13 gabpa runx1t1 tef smarcc1 ube2b zbtb24 loc729806 igf2bp2 znf302 lmo4 nrbf2 egr3 spen mdfi zbtb44 hmbox1 eif2ak3 taf3 znf468 pbrm1 wasl yeats4 eaf1 klf7 gtf2a1 cux1 rybp gclc ankrd1 med13l trmt6 nfatc3 msx1 trim33 mga id4 zxdb esf1 znf37a ccdc59 foxd1 fst jmjd2a taf11 znf770 epc2 c20orf20 rfc1 scml1 ube2o sirt1 znf205 sox12 znf281 etv6 smad1 ube2w	126	1704	0.00191
regulation of cellular metabolic process	znf304 lass6 myo6 rbbp4 eya4 rbm39 znf546 znf720 ctnnb1 tulp4 ash1l ep300 znf654 med23 hsf5 znf643 bmi1 trib3 bhllhb3 rsf1 mnt znf236 c11orf30 hivep1 znf345 atf4 glis1 fubp3 rara lcor rab35 egr1 med16 hira znf101 epc1 zeb2 znf623 eif5b zbtb41 sp1 suds3 ikbkap znf134 vgl13 gli3 znf142 tgfbr1 sp3 mafg casz1 loc342892 rbm15b mknk2 znf3 znf573 zbtb2 sap30l tead1 taf4b foxc1 nfe2l2 znf542 elf1 klf13 gabpa runx1t1 tef smarcc1 zbtb24 loc729806 igf2bp2 znf302 lmo4 nrbf2 egr3 spen mdfi zbtb44 hmbox1 eif2ak3 taf3 znf468 pbrm1 wasl yeats4 eaf1 klf7 gtf2a1 cux1 rybp gclc ankrd1 med13l trmt6 nfatc3 msx1 trim33 mga id4 zxdb esf1 znf37a ccdc59 foxd1 fst jmjd2a taf11 znf770 epc2 c20orf20 rfc1 scml1 sirt1 znf205 sox12 znf281 etv6 smad1	119	1613	0.00336

positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	sp1 myo6 egr1 foxc1 cttnnb1 elf1 klf13 epc1 ep300 tef glis1 atf4 smad1	13	87	0.0223
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	msx1 mdfi egr1 cttnnb1 znf281 epc1 fst cux1 rybp znf345 glis1 lcor	12	87	0.0641
positive regulation of transcription, DNA-dependent	sp1 myo6 rsf1 egr1 foxc1 yeats4 cttnnb1 elf1 klf13 epc1 tef ep300 atf4 glis1 smarcc1 smad1	16	141	0.071
regulation of biological process	znf304 lass6 rapgef6 tbc1d24 metrn rbbp4 hsf5 bmi1 bhlhb3 mnt znf236 igfbp5 c11orf30 znf345 ptx3 glis1 cdc2 utp20 lcor rab35 gnl3 hira bax stk4 znf623 zeb2 lin7c ikbkap vgl3 cav2 c6orf170 znf142 gli3 mafg ebag9 rnf7 mknk2 son znf573 cdh13 nrnx2 znf542 gabpa tef runx1t1 ube2b loc729806 kalrn znf302 igf2bp2 tnks2 lmo4 egr3 crim1 taf3 eif2ak3 hmbox1 pbrm1 rybp itch msx1 trim33 id4 sept9 esf1 myh10 znf37a fst foxd1 znf770 c20orf20 rfc1 sirt1 sox12 ei24 smad1 ube2w mmp14 myo6 eya4 rbm39 znf720 znf546 cttnnb1 tulp4 ash1l gopc znf654 ep300 med23 znf643 capza2 trib3 rsf1 hivep1 atf4 centb2 acvr2a fubp3 rara egr1 med16 znf101 epc1 map4 zbtb41 eif5b sp1 suds3 map3k3 htra1 znf134 lima1 tnfsf4 bnip3l tgfbr1 tp53i3 sp3 loc342892 casz1 rbm15b znf3 zbtb2 sap30l foxc1 nfe2l2 taf4b tead1 rps19 elf1 rgs18 klf13 smarcc1 zbtb24 nrbf2 spen mdfi bmpr2 plekhc1 zbtb44 fgg znf468 wasl yeats4 zdhxc13 eaf1 klf7 cux1 gtf2a1 gclc ankrd1 med13l trmt6 nfatc3 mga zxdb ccdc59 hsp90b1 taf11 jmjd2a epc2 gef2 scml1 ube2o pdgfa znf205 ptger4 znf281 etv6	169	2619	0.0879
regulation of cellular process	znf304 lass6 rapgef6 tbc1d24 rbbp4 hsf5 bmi1 bhlhb3 mnt znf236 igfbp5 c11orf30 znf345 ptx3 glis1 cdc2 utp20 lcor rab35 gnl3 hira bax stk4 znf623 zeb2 ikbkap vgl3 cav2 znf142 gli3 c6orf170 mafg ebag9 rnf7 mknk2 son znf573 cdh13 znf542 gabpa tef runx1t1 loc729806 kalrn znf302 igf2bp2 lmo4 egr3 crim1 taf3 eif2ak3 hmbox1 pbrm1 rybp itch msx1 trim33 id4 sept9 esf1 znf37a foxd1 fst znf770 c20orf20 rfc1 sirt1 sox12 ei24 smad1 mmp14 myo6 eya4 rbm39 znf720 znf546 cttnnb1 tulp4 ash1l gopc znf654 ep300 med23 znf643 capza2 trib3 rsf1 hivep1 atf4 centb2 acvr2a fubp3 rara egr1 med16 znf101 epc1 map4 zbtb41 eif5b sp1 suds3 map3k3 htra1 znf134 lima1 bnip3l tgfbr1 tnfsf4 sp3 tp53i3 loc342892 casz1 rbm15b znf3 zbtb2 sap30l foxc1 nfe2l2 taf4b tead1 rps19 elf1 rgs18 klf13 zbtb24 smarcc1 nrbf2 spen mdfi bmpr2 zbtb44 fgg znf468 wasl yeats4 zdhxc13 eaf1 klf7 cux1 gtf2a1 gclc ankrd1 med13l trmt6 nfatc3 mga zxdb ccdc59 hsp90b1 taf11 jmjd2a epc2 gef2 scml1 pdgfa znf205 znf281 etv6	159	2449	0.0893
<b>Zelluläre Komponente</b>				
nucleus	znf304 lass6 rbbp4 hsf5 bmi1 bhlhb3 kin mnt parp11 znf236 ddx5 c11orf30 znf345 glis1 dazap1 utp20 cdc2 lcor h3f3a crkrs gnl3 hira stk4 sfrs6 znf623 zeb2 zmat1 ikbkap vgl3 znf142 thoc2 gli3 hp1bp3 eme1 lsm5 mafg rnf7 sssbp4 son setd5 znf573 wdr43 znf542 gabpa tef runx1t1 ube2b aplp2 loc729806 znf302 appbp2 tnks2 lmo4 egr3 crop taf3 hmbox1 pbrm1 hnrnpl tsr1 taf15 psmb4 rybp itch prkci znf268 msx1 trim33 npm3 id4 rev1 dact1 esf1 znf37a zfand2a ptma foxd1 nol10 zcbr1 mobkl1a znf770 ythdc1 c20orf20 rfc1 usp48 top1 nup50 cmpk sirt1 sox12 palld fbxw7 smad1 myo6 eya4 rbm39 dis3 znf546 nek4 cttnnb1 ppil4 ash1l ep300 znf654 med23 rcp9 znf643 setd1b senp7 sc65 trib3 rsf1 c15orf15 tspyl1 iqwd1 rufy2 ccrn4l hivep1 atf4 rara fubp3 hnrnpa0 nufip2 egr1 med16 znf101 epc1 cept1 igf2r parva zbtb41 suds3 mab21l2 sp1 znf134 cops2 bnip3l sp3 casz1 rbm15b spop znf3 sap30l zbtb2 helz tead1 foxc1 nfe2l2 taf4b nutf2 rps19 papd5 elf1 wiz klf13 smarcc1 zbtb24 c20orf11 nrbf2 sfrs2ip spen mdfi mtdh zbtb44 znf468 wasl yeats4 eaf1 cops8 upf2 gtf2a1 cux1 klf7 synpo2 ankrd1 marcks med13l nhs trmt6 nfatc3 luzp1 mga zxdb ccdc59 jmjd2a taf11 epc2 strn3 ppig ankrd11 emd scml1 znf205 znf281 etv6 thoc4	196	2668	0.0445
actin filament bundle	lima1 plekhc1 sept9 myh10	4	8	0.057
stress fiber	lima1 plekhc1 sept9 myh10	4	8	0.057



**Tab. 23 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (2477) in hMSC-seneszent (Referenz: 25716 Probesets, die in hMSC-seneszent und/oder hMSC-K exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
regulation of mitosis	dlg7 kntc1 gtse1 pkmyt1 bub1 nek2 ccna2 hectd3 bub1b rcc1 ttk ube2c mphosph1 birc5 anl n mad2l1 zwint mad1l1 nusap1	19	46	5.23e-07
cell cycle checkpoint	tipin kntc1 bub1b bri p1 cdc6 ttk chek1 gtse1 bub1 birc5 brca2 zwint mad2l1 ccna2 mad1l1 ccne2	16	44	0.000204
regulation of progression through cell cycle	dlg7 cdc6 cdkn2c c11orf82 foxc1 chek1 bccip cdkn3 tgfb2 sphk1 hectd3 rcc1 bri p1 cks2 mphosph1 anl n birc5 gmnn zwint cdc2 bard1 mad1l1 nusap1 ppm1g kntc1 pkmyt1 gtse1 bub1 cdc7 nek2 ccna2 tipin mn1 bub1b ttk pycard ube2c brca2 mad2l1 fbxo5 sipa1 cks1b runx3 ccne2	44	220	0.0182
regulation of cell cycle	dlg7 cdc6 cdkn2c c11orf82 foxc1 chek1 bccip cdkn3 tgfb2 sphk1 hectd3 rcc1 bri p1 cks2 mphosph1 anl n birc5 gmnn zwint cdc2 bard1 mad1l1 nusap1 ppm1g kntc1 pkmyt1 gtse1 bub1 cdc7 nek2 ccna2 tipin mn1 bub1b ttk pycard ube2c brca2 mad2l1 fbxo5 sipa1 cks1b runx3 ccne2	44	223	0.0204
mitotic cell cycle checkpoint	kntc1 bub1b ttk gtse1 bub1 mad2l1 zwint ccna2 mad1l1	9	23	0.0609
regulation of progression through mitotic cell cycle	brca2 birc5 sphk1 fbxo5 cdc6 rcc1 foxc1 cdc2	8	20	0.0743
regulation of cell proliferation	lepre1 tbx2 cdc6 cdkn2c vegfa chek1 cri p2 lrp5 blm cdkn3 cdc25b tgfb2 sphk1 il7 prkra ptgs2 cd276 pold4 lamb1 tgfb1i1 tcirg1 clec11a ptn lif ctbp2 traf5 cd24 rarrs3 id4 rarrs1 cdc7 sox9 recq14 cd164 tnfsf13b tipin csk ttk pdgfa pds5b smo gli3 npm1 brca2 dlg3 runx3 col18a1	47	259	0.0743
<b>Zelluläre Komponente</b>				
chromosome, pericentric region	cenpo zwilch cenpk nuf2 cenpl cbx5 spc25 bub1 cenpi kif22 rcc2 cenpq hells cenph cdca8 sgol2 bub1b mlf1ip ndc80 kif2c cenpe aurkb itgb3bp birc5 mad2l1 cenpm spc24 zwint cenpa	29	52	5.05e-20
chromosomal part	cenpo orc6l rpa3 tmpo zwilch h2afx nuf2 rfc4 cenpl rfc3 acd foxc1 cbx5 h2afx ssrp1 chek1 spc25 suv39h2 blm cenpi kif22 mcm3 cenpq msl3l1 cenph pif1 pcna sc65 sgol2 pold3 hmgb3 mlf1ip ndc80 rcc1 cenpe hdac2 birc5 cdca5 spc24 zwint cenpa cenpk asf1b oip5 ncapd2 bub1 smc4 rcc2 hells rfc5 dnmt1 cdca8 tipin hmgb2 mcm2 bub1b kif2c aurkb chd7 itgb3bp mad2l1 cenpm prim1 mcm7	64	187	6.92e-20
chromosome	cenpo orc6l rpa3 tmpo h2afx cbx5 h2afx ssrp1 suv39h2 blm cenpi kif22 cenph pif1 sc65 sgol2 hmgb3 mlf1ip ndc80 rcc1 hdac2 top2a zwint cenpa prrx2 asf1b cenpk oip5 smc4 ncapd2 dnmt1 cdca8 mcm2 itgb3bp mad2l1 prim1 mcm7 zwilch nuf2 rfc4 cenpl rfc3 acd foxc1 chek1 spc25 mcm3 cenpq msl3l1 pcna fanci pold3 baz1a cenpe birc5 cdca5 spc24 polg2 bub1 rcc2 hells rfc5 tipin hmgb2 bub1b kif2c top1 aurkb chd7 cenpm	70	222	1.5e-18
microtubule cytoskeleton	tubb2c kif22 ccd5 c18orf24 cep76 tubb3 ccnb1 racgap1 top2a akt1 ttl1 pde4d mad1l1 cdc2 tubb2b ckap2 cep70 tubgcp3 cep152 rp4-691n24.1 kif4a cep57 npm1 cenpj brca2 prc1 dlg7 tpx2 cdc6 dnali1 kif11 aurka shroom2 spag5 ckap5 kif20a cdc25b plk1 kif15 cdc20 tubb cenpe loc146909 mphosph1 birc5 c16orf48 cep250 nde1 clip2 nusap1 eml4 kntc1 kif21a kif18a tubb2a gtse1 stmn1 bub1 nek2 rcc2 kif14 kif23 bub1b kif2c ttk fam33a ccnb2 aurkb dnal4 pknox2 fbxo5 ift88	72	241	4.73e-17
spindle	prc1 dlg7 kntc1 tpx2 cdc6 kif11 aurka bub1 spag5 c18orf24 tubgcp3 kif23 bub1b cdc20 ttk racgap1 kif4a fam33a cenpe aurkb birc5 fbxo5 akt1 nde1 cdc2 mad1l1	26	57	2.9e-13
microtubule	prc1 tubb2c kif11 shroom2 spag5 kif22 ccd5 kif20a tubb3 kif15 tubb racgap1 cenpe mphosph1 birc5 nde1 ttl1 clip2 cdc2 nusap1 eml4 tubb2b ckap2 kntc1 kif21a kif18a tubb2a gtse1 stmn1 rcc2 tubgcp3 kif14 kif23 rp4-691n24.1 kif2c kif4a cep57 dnal4 cenpj	39	126	1.16e-09
cytoskeletal part	tubb2c kif22 ccd5 c18orf24 cep76 tubb3 vim ccnb1 racgap1 top2a anl n akt1 ttl1 pde4d mad1l1 cdc2 tubb2b ckap2 cep70 tubgcp3 lmn1 cep152 rp4-691n24.1 kif4a cep57 npm1 cenpj brca2 prc1 dlg7 tpx2 cdc6 dnali1 kif11 aurka shroom2 myo19 spag5 ckap5 kif20a cdc25b plk1 kif15 cdc20 tubb cenpe loc146909 mphosph1 birc5 cep250 nde1 clip2 nusap1 eml4 kntc1 kif21a kif18a tubb2a gtse1 stmn1 bub1 nek2 rcc2 kif14 kif23 bub1b ttk kif2c fam33a aurkb dnal4 fbxo5	72	305	2.16e-09

intracellular non-membrane-bound organelle	tubb2c c20orf42 ssrp1 suv39h2 kif22 blm synpo cep76 cenph gphn vim sgol2 ndc80 mlf1ip racgap1 tgfb1i1 plekhh1 hdac2 anlncenpa cdc2 pde4d rps9 rp3-377h14.5 tubb2b ckap2 rpl22l1 oip5 smc4 rpl37a ncapd2 ptpn6 flnb lmnbl rpl36 mcm2 rp4-691n24.1 nol5a cenpj itgb3bp zwilch acd rfc3 cdc6 mki67 shroom2 aurka myo19 mcm3 cenpq kif20a rhof pcna fanci kif15 pold3 cdc20 lsp1 cenpe mphosph1 cep250 c16orf48 birc5 spc24 clip2 mrps6 nusap1 eml4 kif21a npm3 tubb2a pdlim1 gtse1 bub1 fscn1 rcc2 rfc5 spag4 hmgb2 ttk fam33a top1 ccnb2 chd7 cenpm rpa3 cenpo orc6l tmpo tcof1 h2afz ddx54 cbx5 h2afx cenpi ccdc5 c18orf24 sympk oasl tubb3 pif1 sc65 ccnb1 hmgb3 rcc1 top2a zwint akt1 ttl1 prrx2 mett11d1 fgd1 mad1l1 tyk2 cenpk asf1b cep70 tubgcp3 syne2 sgcd parp1 cep152 dnmt1 cdca8 rpl39l tmsl8 rpl17 kif4a cep57 npm1 brca2 mad2l1 prim1 mcm7 prc1 dlq7 tpx2 rfc4 nuf2 dnali1 cenpl kif11 arpc1a foxc1 spc25 chek1 ckap5 spag5 ctnbp2nl cdc25b rpl31 rcl1 msl3l1 rps24 parvb cotl1 plk1 sspn baz1a tubb loc146909 cdca5 nde1 wipf2 kntc1 kif18a polg2 nek2 stmn1 kif14 hells kif23 tipin bub1b kif2c aurkb dnal4 pknox2 fbxo5 ift88	180	1017	4.75e-09
non-membrane-bound organelle	tubb2c c20orf42 ssrp1 suv39h2 kif22 blm synpo cep76 cenph gphn vim sgol2 ndc80 mlf1ip racgap1 tgfb1i1 plekhh1 hdac2 anlncenpa cdc2 pde4d rps9 rp3-377h14.5 tubb2b ckap2 rpl22l1 oip5 smc4 rpl37a ncapd2 ptpn6 flnb lmnbl rpl36 mcm2 rp4-691n24.1 nol5a cenpj itgb3bp zwilch acd rfc3 cdc6 mki67 shroom2 aurka myo19 mcm3 cenpq kif20a rhof pcna fanci kif15 pold3 cdc20 lsp1 cenpe mphosph1 cep250 c16orf48 birc5 spc24 clip2 mrps6 nusap1 eml4 kif21a npm3 tubb2a pdlim1 gtse1 bub1 fscn1 rcc2 rfc5 spag4 hmgb2 ttk fam33a top1 ccnb2 chd7 cenpm rpa3 cenpo orc6l tmpo tcof1 h2afz ddx54 cbx5 h2afx cenpi ccdc5 c18orf24 sympk oasl tubb3 pif1 sc65 ccnb1 hmgb3 rcc1 top2a zwint akt1 ttl1 prrx2 mett11d1 fgd1 mad1l1 tyk2 cenpk asf1b cep70 tubgcp3 syne2 sgcd parp1 cep152 dnmt1 cdca8 rpl39l tmsl8 rpl17 kif4a cep57 npm1 brca2 mad2l1 prim1 mcm7 prc1 dlq7 tpx2 rfc4 nuf2 dnali1 cenpl kif11 arpc1a foxc1 spc25 chek1 ckap5 spag5 ctnbp2nl cdc25b rpl31 rcl1 msl3l1 rps24 parvb cotl1 plk1 sspn baz1a tubb loc146909 cdca5 nde1 wipf2 kntc1 kif18a polg2 nek2 stmn1 kif14 hells kif23 tipin bub1b kif2c aurkb dnal4 pknox2 fbxo5 ift88	180	1017	4.75e-09
replication fork	pcna rpa3 rfc4 pold3 rfc3 h2afx chek1 hdac2 blm mcm3 prim1 rfc5 dnmt1 mcm7	14	24	1.6e-06
cytoskeleton	tubb2c c20orf42 kif22 ccdc5 c18orf24 sympk synpo cep76 tubb3 gphn vim ccnb1 tgfb1i1 plekhh1 racgap1 top2a anlncenpa akt1 ttl1 fgd1 cdc2 mad1l1 pde4d tubb2b tyk2 ckap2 cep70 tubgcp3 ptpn6 syne2 flnb lmnbl sgcd cep152 tmsl8 rp4-691n24.1 kif4a cep57 cenpj npm1 brca2 prc1 dlq7 tpx2 cdc6 dnali1 kif11 aurka shroom2 arpc1a myo19 ckap5 spag5 ctnbp2nl kif20a rhof cdc25b parvb cotl1 plk1 kif15 cdc20 sspn tubb lsp1 cenpe mphosph1 loc146909 cep250 c16orf48 birc5 nde1 clip2 wipf2 nusap1 eml4 kntc1 kif21a kif18a tubb2a pdlim1 gtse1 nek2 bub1 stmn1 fscn1 rcc2	100	535	5.19e-06
nuclear chromosome	orc6l rpa3 acd foxc1 cbx5 chek1 mcm3 pif1 sc65 tipin hmgb2 pold3 mcm2 rcc1 baz1a prim1 prrx2 mcm7	18	58	0.000268
microtubule organizing center	dlq7 aurka bub1 cep70 nek2 ckap5 tubgcp3 cdc25b cep152 cep76 plk1 ccnb1 rp4-691n24.1 cep57 top2a mphosph1 npm1 cenpj cep250 birc5 brca2 nde1 mad1l1 pde4d ift88	25	97	0.000587
nucleus	e2f8 foxp4 mcm6 pir znf253 ddx39 snrpa hnrnpc tdp1 phf2 gen1 cenph silf11 dnmt3b sgol2 mlf1ip usp18 ndc80 racgap1 tgfb1i1 znf300 phf10 dusp8 irx5 cenpa naca uhrf1 thyn1 aof2 irx1 gins1 znf692 oip5 npip hnrnpa2b1 taf5 casc5 znf568 hkr1 bh1hb2 ptpn18 rpl36 rad54b rnaseh2a znf93 itgb3bp mett14 nubp2 ccnf kpna2 arhgap22 znf593 chaf1a acd rfc3 mki67 clcc1 phc1 cenpq bccip lsm2 dlx1 fanci mex3b urlc9 c12orf48 pold3 cenpe ptov1 ccnl2 znf273 spc24 znf334 whsc1 clk1 sall1 hszfp36 id4 nfe2l3 stip1 prr6 pdlim1 exo1 bub1 znf214 sox9 ptma ccna2 prkcd znf292 hmgb2 snai1 ccnb2 irf9 znf711 twist1 med27 cenpo h2afx ddx54 cbx5 c11orf82 rbm39 polr1d ehd3 tle3 pif1 nup93 hoxa9 sc65 nucb2 ccnb1 men1 hnrpdl rbm4b mcm5 hoxa3 top2a znf680 mad1l1 ctbp2 cenpk hlft neil3 znf667 znf167 eefsec tbl1x mafb tcf19 syne2 znf137 sfmbt1 trerf1 otud7b tmem48 zfp1 pttg1 pold1 npm1 mad2l1 e2f7 prim1 dlx5 prc1 nuf2 rfc4 foxc1 znf485 ppm1m mcm4 gata2 rcl1 pole2 msl3l1 ezh2 ddx17 patz1 plk1 znf423 strbp znf594 pold4 arih2 mcm10 rfxank nfatc3 taf1a irx3 nek2 ruvbl2 hells gtf3a fance rmi1 bub1b scml1 plcd4 pds5b aurkb znf85 rarb fbxo5 thoc4 runx3 hic2 dcps lcorl meox2 ssrp1 nat14 tle2 znf212 suv39h2 c17orf49 blm kif22 sox11 rbm10 nfya clk2 bripl1 zscan21 fkbp5 hdac2 plekha2 anlncenpa2 usp1 znf185 oas1 ewsr1 gemin6 cdc2 dazap1 ppm1g ncapd2 smc4 pogz zmiz1 nfc ints2 ptpn6 vrk1 brd3 dclre1b lmnbl1 kiaa0649 yeats2 pim1 znf675 recql4 pole mpg mzf1 satb2 mcm2 nol5a gli3 fen1 rbm3 samhd1 irs1 ccne2 tbx2 cdc6 aurka mcm3 cpsf1 atxn3 znf302 pcna mphosph1 mx2 birc5 ptgds pias4 mat2b trim21 nusap1 c6orf173 rad51l3 npm3 trip13 rcc2 zcchc8 atf7ip2 ssx2ip nono rfc5 znf204 polr3a ilf3 dkfz434j1015 top1 znf22 chd7 cenpm ruvbl1 orc6l rpa3 tmpo znf793 tcof1 psmb9 fkbp4 bach2 h2afx c14orf106 znf322a gtf2f1 cenpi nkx3-1 sympk oasl med26 zscan18 znf232 hnrpm senp7 ptgs2 hoxa5 bat2 rcc1 hmgb3 hn1 ncbp1 akt1 zwint erg prrx2 asf1b hoxb3 e2f1 med16 cdc7 pcgf2 poli siva1 dnmt1 nsmce1 parp1 orc1l cdca8 ifi35 mett13 bat1 selenbp1 wdhd1 kif4a gcn5l2 cep57 nrm fus brca2 tsc22d4 sipa1 chaf1b znf511 mcm7 kiaa0101 dlq7 tpx2 cenpl cdkn2c znf697 foxm1 znf691 spc25 chek1 exosc8 dtl mex3a oas2 trim28 znf135 hctcd3 pabpn1 rfx1 dut baz1a yeats4 cdca5 parp14 polr3d bard1 ncaph kntc1 lbr dbf4 htra2 gins2 mdm1 hcg_1646157 mns1 znf83 ccnj kif23 tipin ints7 kif2c hoxb2 rccc1 cirbp pknox2 ncapg znf284	387	2862	0.00208

centrosome	dlg7 aurka cep70 nek2 ckap5 tubgcp3 cdc25b cep76 cep152 plk1 ccnb1 rp4-691n24.1 cep57 top2a nrm1 cenpj mphosph1 cep250 birc5 brca2 nde1 mad111 pde4d	23	92	0.00234
nuclear chromosome part	orc6l rpa3 sc65 tipin pold3 mcm2 rcc1 acd foxc1 cbx5 mcm3 prim1 mcm7 pif1	14	41	0.00263
spindle microtubule	prc1 birc5 kntc1 tubgcp3 kif11 cdc2 kif4a spag5	8	16	0.00331
DNA replication factor C complex	pcna rfc4 rfc3 rfc5	4	5	0.0142
kinetochore	zwilch bub1b cbx5 bub1 cenpe kif22 mad211 zwint cenph	9	24	0.0155
chromatin	tmpo asf1b h2afz foxc1 oip5 cbx5 h2afx srrp1 suv39h2 hells msl3l1 dnmt1 tipin hmgb2 rcc1 hmgb3 mcm2 hdac2 chd7 cenpa mcm7	21	94	0.0276
spindle pole	dlg7 kntc1 tpx2 nde1 tubgcp3 kif11 bub1	7	17	0.0276
microtubule associated complex	kif23 kif15 kif21a kif18a dnali1 kif11 kif2c kif4a cenpe dnal4 mphosph1 loc146909 kif22 kif20a kif14 clip2	16	66	0.0317
extracellular region part	col6a2 lepre1 mif vegfa col7a1 cxcl16 scrg1 col5a1 col14a1 matn1 il7 has1 mmp3 kctd12 ces1 nucb2 nid1 bmp1 col27a1 slit2 lamb1 sspn col1a2 ptn gpx3 ecgf1 ccl26 lcat lif gpi cklf col5a3 tfpi2 mdk isg15 bgn sulf2 c5 emilin1 ccl28 sgcd arsa tnfsf13b matn2 kal1 pdgfa lgals3bp spp1 podnl1 nid2 col18a1 adamts5	52	302	0.0317
nuclear replication fork	rpa3 mcm3 pold3 prim1 mcm7	5	12	0.0992

**Tab. 24 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (1284) in hMSC-seneszent (Referenz: 25716 Probesets, die in hMSC-seneszent und/oder hMSC-K exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
regulation of heart contraction	cugbp2 atp2a2 hspb7 kcnj12	4	12	0.1
<b>Zelluläre Komponente</b>				
plasma membrane	htr1f sectm1 cap2 epha4 cd14 itga2 has3 centa1 pkd2 slc22a4 gria3 pkp4 mgam tmem47 ptrpr1 kirrel3 slc1a1 csf2rb slc20a2 ntf3 folr1 utrnl kctd20 ptger3 slc2a5 daglb kctd16 itgb1 oxtr jmjd6 nrcam prrg1 plce1 slc4a7 slc22a5 trak2 vep1 dab2 kctd4 slc5a5 fzd6 gna1 vabp cd55 gpr176 perp lamp2 wnt2 ccr1 slc31a2 slc17a5 pip5k1a rras2 scn3a cldn11 cd163l1 kcnj14 kcnj12 itgb5 kcnd2 mbp sdpr slc25a4 hrh2 nt5e slc11a2 clcn5 acvr1b crim1 eps15 stx12 cpe itga4 abcc4 trpc4 atp8b1 atp2a2 gna14 siglec6 centd3 apbb1ip cd59 slc30a1 gpr116 swap70 dsp f3 serinc1 atp6ap2 rims1 il6st nexn dpp4 cntn3 bst1 pcdh10 magi2 cd36 gng12 ccr9	100	1039	6.71e-11
membrane part	htr1f sectm1 epha4 lass6 cd14 rab6a itga2 has3 ormdl3 kcnh7 pkp4 tmem47 mospd1 kirrel3 slc1a1 epha5 folr1 pqlc2 utrnl kctd20 daglb itgb1 oxtr aqp12a slc39a8 fam73a mtch2 slc4a7 slc22a5 rnf144b rdh10 cyp2u1 c13orf21 slc5a5 fzd6 vabp cd55 gpr176 slc7a14 pex26 scd5 slc31a2 tmem55b slc17a5 chst4 scn3a cldn11 pik3ip1 cd163l1 kcnj14 slc25a4 bcl2l1 atp2c1 crim1 acvr1b tgfb2 spg11 ostm1 ndfip2 fzd4 stx12 itga4 tmeff2 pgrmc2 trpc4 abcc4 slc9a5 atp2a2 march4 kiaa1913 megf9 npal2 pcdhb16 folr3 tmem185a chgn atp6ap2 rims1 st6galnac5 nexn pcdh10 cd36 gng12 c15orf27 asph elfn2 rab21 pkd2 mgat4b slc22a4 gria3 mgam ptrpr1 st3gal6 csf2rb slc20a2 ptger3 slc2a5 cyb5r1 itfg1 cyb5d2 kctd16 dhrr7b tm6sf2 ssr3 nrcam tmem127 heg1 prrg1 tmem41b plce1 clgn gpnmb ctns dab2 kctd4 gna1 cybrd1 slc43a2 tram1 perp lamp2 mrvi1 wnt2 ccr1 slc35f5 b4galt5 nckap1 kcnj12 cyp26b1 aph1b dscr3 itgb5 kcnd2 mbp sdpr antxr1 tnfrsf11a hrh2 slc11a2 clcn5 ndufc1 golgb1 slc44a3 eps15 lrn3 atp8b1 gna14 siglec6 apbb1ip slc30a1 gpr116 c5orf4 chodl sel1l2 dsp knk17 fry f3 serinc1 slc9a7 c5orf15 il6st dpp4 cybasc3 bst1 magi2 nr3c2 spag9 atp10d pigz mansc1 stoml1 tmco7 ccr9 ndufa2	176	2385	2.15e-08

membrane	htr1f sectm1 cap2 epha4 lass6 cd14 rab6a itga2 has3 ormdl3 kcnh7 pkp4 tmem47 mospd1 kirrel3 slc1a1 epha5 folr1 pqlc2 utrn kctd20 daglb itgb1 oxtr aqp12a slc39a8 fam73a mtch2 slc4a7 trak2 slc22a5 vep1 rdh10 rnf144b bcl2l2 cyp2u1 c13orf21 slc5a5 fzd6 prss12 vabp cd55 gpr176 slc7a14 pex26 scd5 slc31a2 tmem55b slc17a5 pip5k1a arhgap5 chst4 scn3a frmd6 cldn11 pik3ip1 cd163l1 kcnj14 slc25a4 nt5e bcl2l1 atp2c1 ogfrl1 clic4 tgfb2 acvr1b crim1 spg11 ostm1 ndfip2 fzd4 stx12 cpe pgrmc2 tmeff2 itga4 trpc4 abcc4 slc9a5 atp2a2 march4 kiaa1913 megf9 npal2 pcdhb16 folr3 tmem185a slc30a7 jak3 chgn atp6ap2 rims1 st6galnac5 nexn gcom1 pcdh10 cd36 gng12 c15orf27 asph elfn2 rab21 pkd2 mgat4b centa1 gria3 slc22a4 mgam scrn1 ptpz1 st3gal6 csf2rb slc20a2 ntf3 ptger3 slc2a5 cyb5d2 cyb5r1 itfg1 dhrr7b kctd16 tm6sf2 srr3 jmj6 nrcam tmem127 heg1 prrg1 plce1 tmem41b clgn gpnmb ctns dab2 kctd4 gnai1 slc43a2 cybrd1 tram1 flnc perp mrv1 lamp2 wnt2 ccr1 cerk ppp2r1a rras2 slc35f5 b4galt5 nckap1 cyp26b1 kcnj12 aph1b itgb5 kcnd2 mbp dscr3 sdpr antxr1 tnfrsf11a hrh2 spry4 slc11a2 clcn5 ndufc1 golgb1 slc44a3 eps15 lrrn3 atp8b1 gna14 siglec6 centd3 cd59 apbb1ip slc30a1 gpr116 swap70 c5orf4 chodl sel1l2 dsp kcnk17 f3 fry serinc1 slc9a7 loxl4 strn3 c5orf15 il6st dpp4 cntn3 cybasc3 bst1 nr3c2 magi2 spag9 atp10d pigz mansc1 stoml1 tmco7 ccr9 ndufa2	206	2949	4.65e-08
plasma membrane part	htr1f epha4 scn3a cd14 cldn11 kcnj14 itga2 kcnj12 has3 gria3 slc22a4 mbp kcnd2 itgb5 pkp4 sdpr mgam slc25a4 ptpz1 slc1a1 hrh2 csf2rb slc20a2 slc11a2 clcn5 folr1 utrn acvr1b kctd20 ptger3 eps15 kctd16 itgb1 stx12 oxtr itga4 atp8b1 nrcam siglec6 atp2a2 gna14 prrg1 apbb1ip slc4a7 dsp dab2 kctd4 atp6ap2 rims1 il6st fzd6 dpp4 nexn gnai1 magi2 cd36 cd55 gpr176 perp gng12 wnt2 ccr9 ccr1 slc31a2 slc17a5	65	653	5.98e-08
integral to membrane	htr1f sectm1 epha4 lass6 itga2 has3 ormdl3 kcnh7 tmem47 mospd1 kirrel3 slc1a1 epha5 pqlc2 folr1 kctd20 daglb itgb1 oxtr aqp12a slc39a8 fam73a mtch2 slc4a7 slc22a5 rnf144b rdh10 cyp2u1 c13orf21 slc5a5 fzd6 vabp cd55 gpr176 slc7a14 pex26 scd5 slc31a2 tmem55b slc17a5 chst4 scn3a cldn11 cd163l1 pik3ip1 kcnj14 slc25a4 bcl2l1 atp2c1 crim1 acvr1b tgfb2 spg11 ostm1 ndfip2 fzd4 stx12 itga4 tmeff2 pgrmc2 abcc4 trpc4 slc9a5 march4 atp2a2 kiaa1913 megf9 npal2 pcdhb16 tmem185a chgn atp6ap2 st6galnac5 pcdh10 cd36 c15orf27 asph elfn2 mgat4b pkd2 slc22a4 gria3 mgam ptpz1 st3gal6 csf2rb slc20a2 ptger3 slc2a5 cyb5r1 itfg1 cyb5d2 kctd16 dhrr7b tm6sf2 srr3 nrcam tmem127 heg1 prrg1 tmem41b clgn gpnmb ctns kctd4 cybrd1 slc43a2 tram1 perp lamp2 mrv1 ccr1 slc35f5 b4galt5 nckap1 kcnj12 aph1b kcnd2 itgb5 antxr1 tnfrsf11a hrh2 slc11a2 clcn5 slc44a3 golgb1 lrrn3 atp8b1 siglec6 slc30a1 gpr116 c5orf4 chodl sel1l2 kcnk17 fry f3 serinc1 slc9a7 c5orf15 il6st dpp4 cybasc3 spag9 pigz atp10d mansc1 stoml1 tmco7 ccr9	150	1985	8.31e-08
intrinsic to membrane	htr1f sectm1 epha4 lass6 itga2 has3 ormdl3 kcnh7 tmem47 mospd1 kirrel3 slc1a1 epha5 pqlc2 folr1 kctd20 daglb itgb1 oxtr aqp12a slc39a8 fam73a mtch2 slc4a7 slc22a5 rnf144b rdh10 cyp2u1 c13orf21 slc5a5 fzd6 vabp cd55 gpr176 slc7a14 pex26 scd5 slc31a2 tmem55b slc17a5 chst4 scn3a cldn11 cd163l1 pik3ip1 kcnj14 slc25a4 bcl2l1 atp2c1 crim1 acvr1b tgfb2 spg11 ostm1 ndfip2 fzd4 stx12 itga4 tmeff2 pgrmc2 abcc4 trpc4 slc9a5 march4 atp2a2 kiaa1913 megf9 npal2 pcdhb16 tmem185a chgn atp6ap2 st6galnac5 pcdh10 cd36 c15orf27 asph elfn2 mgat4b pkd2 slc22a4 gria3 mgam ptpz1 st3gal6 csf2rb slc20a2 ptger3 slc2a5 cyb5r1 itfg1 cyb5d2 kctd16 dhrr7b tm6sf2 srr3 nrcam tmem127 heg1 prrg1 tmem41b clgn gpnmb ctns kctd4 cybrd1 slc43a2 tram1 perp lamp2 mrv1 ccr1 slc35f5 b4galt5 nckap1 kcnj12 aph1b kcnd2 itgb5 antxr1 tnfrsf11a hrh2 slc11a2 clcn5 slc44a3 golgb1 lrrn3 atp8b1 siglec6 slc30a1 gpr116 c5orf4 chodl sel1l2 kcnk17 fry f3 serinc1 slc9a7 c5orf15 il6st dpp4 cybasc3 spag9 pigz atp10d mansc1 stoml1 tmco7 ccr9	150	1995	1.16e-07
integral to plasma membrane	htr1f epha4 scn3a itga2 kcnj14 has3 kcnj12 slc22a4 itgb5 kcnd2 ptpz1 slc25a4 slc1a1 csf2rb hrh2 slc20a2 slc11a2 folr1 clcn5 kctd20 acvr1b ptger3 kctd16 itgb1 oxtr itga4 atp8b1 nrcam siglec6 atp2a2 prrg1 kctd4 il6st fzd6 cd55 cd36 gpr176 ccr9 ccr1 slc31a2 slc17a5	41	421	0.000143
intrinsic to plasma membrane	htr1f epha4 scn3a itga2 kcnj14 has3 kcnj12 slc22a4 itgb5 kcnd2 ptpz1 slc25a4 slc1a1 csf2rb hrh2 slc20a2 slc11a2 folr1 clcn5 kctd20 acvr1b ptger3 kctd16 itgb1 oxtr itga4 atp8b1 nrcam siglec6 atp2a2 prrg1 kctd4 il6st fzd6 cd55 cd36 gpr176 ccr9 ccr1 slc31a2 slc17a5	41	427	0.000209
cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex	ccnd2 cdkn1a ccnd1 cdk6	4	7	0.00253
cell projection	centd3 dnah7 myo5a apbb1ip swap70 slc4a7 kcnj12 pkd2 kcnd2 cdk6 clic4 fgd4 mtpn itgb1 wnt2 nrcam	16	154	0.0331
extrinsic to membrane	folr3 gna14 cd14 gng12 bst1 gnai1	6	34	0.0532
cell fraction	ppp2r1a fbln5 edn1 cyp26b1 kcnj12 sdpr slc1a1 slc20a2 nt5e clic4 folr1 utrn crim1 srr3 abcc4 atp8b1 atp2a2 siglec6 cd59 plce1 folr3 rdh10 chgn cyp2u1 strn3 magi2 cd36 adm cd55 lamp2 wnt2 cerk slc17a5	33	421	0.0627
receptor complex	itgb5 itgb1 tgfb2 itga4 itga2 csf2rb	6	37	0.0668
membrane fraction	atp2a2 siglec6 cd59 plce1 cyp26b1 kcnj12 folr3 rdh10 sdpr cyp2u1 strn3 slc1a1 slc20a2 nt5e folr1 utrn magi2 crim1 cd36 lamp2 srr3 wnt2 abcc4 atp8b1 cerk slc17a5	26	314	0.0668

voltage-gated potassium channel complex	kcnd2 kctd16 kctd20 kctd4 kcnj14	5	27	0.0672
integrin complex	itgb5 itgb1 itga4 itga2	4	19	0.0868
ruffle	centd3 myo5a itgb1 cdk6 fgd4	5	30	0.0924
<b>Molekulare Funktion</b>				
negative regulation of protein kinase activity	cdkn1a lats1 ppp2r1a rgs4 hexim1 dusp9	6	34	0.0531
negative regulation of kinase activity	cdkn1a lats1 ppp2r1a rgs4 hexim1 dusp9	6	34	0.0531
regulation of transferase activity	ccnd2 cdkn1a ppp2r1a tspyl2 rgs4 plce1 ccnd1 edn1 hexim1 dusp9 lats1 map2k3 gadd45a serinc1 cerk	15	148	0.0531
negative regulation of transferase activity	cdkn1a lats1 ppp2r1a rgs4 hexim1 dusp9	6	36	0.0531
regulation of catalytic activity	ccnd2 cap2 cdkn1a ppp2r1a centd3 moap1 tspyl2 col4a3 rgs4 plce1 edn1 hexim1 centa1 aph1b lats1 gadd45a ctglf3 serinc1 ccnd1 dusp9 fgd4 chm map2k3 cerk	24	283	0.0531
regulation of protein kinase activity	ccnd2 cdkn1a ppp2r1a tspyl2 rgs4 plce1 ccnd1 edn1 hexim1 dusp9 lats1 map2k3 gadd45a cerk	14	140	0.0533
regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	ccnd2 cdkn1a lats1 gadd45a ccnd1 hexim1	6	39	0.0533
regulation of kinase activity	ccnd2 cdkn1a ppp2r1a tspyl2 rgs4 plce1 ccnd1 edn1 hexim1 dusp9 lats1 map2k3 gadd45a cerk	14	144	0.0549

**Tab. 25 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (995) in hMSC-OP nach Abzug der Alters-assoziierten Genexpressionsänderungen (Referenz: 25158 Probesets, die in hMSC-OP und/oder hMSC-K exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differenziell	Referenz	
<b>Zelluläre Komponente</b>				
chromosomal part	orc6l zwilch cenpk rfc3 cbx5 oip5 nsbp1 pola1 spc25 mcm3 hells orc2l cdca8 atrx hmgn4 smc2 sgol2 pold3 ndc80 cenpe zmiz2 hnrpd chrac1 mad2l1 h2afv zwint rpa1 nsl1 hmgn3	29	186	1.12e-09
chromosome	orc6l zwilch rfc3 cbx5 nsbp1 pola1 spc25 mcm3 smc2 sgol2 fanci pold3 ndc80 cenpe zwint h2afv rpa1 cenpk oip5 smarce1 hells atrx cdca8 orc2l hmgn4 top1 zmiz2 hnrpd chrac1 mad2l1 nsl1 hmgn3	32	223	1.99e-09
chromosome, pericentric region	cdca8 orc2l zwilch cenpk sgol2 ndc80 cbx5 spc25 cenpe zwint mad2l1 hells nsl1	13	52	4.91e-05
nuclear replication fork	chrac1 mcm3 pold3 rpa1 pola1 zmiz2	6	12	0.000526
nuclear chromosome part	atrx orc2l orc6l pold3 cbx5 pola1 zmiz2 chrac1 mcm3 rpa1	10	41	0.00068
nuclear chromosome	atrx orc2l orc6l smc2 pold3 cbx5 pola1 zmiz2 mcm3 smarce1 chrac1 rpa1	12	59	0.00068
organelle part	atf1 slc25a40 pdhb polr1c ubxd2 rnf34 smad2 march5 dync1i2 timm8b tsga14 sgol2 krt10 ndc80 racgap1 nup35 gemin6 sumo1 u1snrnpb rps9 syncrip procr ckap2 tuba1a arl6ip1 oip5 mtch2 hnrnpa2b1 bnip2 lmnb1 med7 ndufs1 znf326 afg3l2 acsl4 coq3 hmgn3 zwilch dctn4 rfc3 pola1 copg2 mcm3 kif20a mrpl22 pcgf6 mrpl1 smc2 crop pold3 arntl prpf4b cenpe taf15 rcn1 mrps6 pii1 rpl38 krt18 sub1 katnal1 ggcx orc2l pigy top1 zmiz2 chrac1 cse1l orc6l glce myo5a blzf1 cbx5 nsbp1 ccdc5 scrn1 hnrpm ccnb1 rev3l rpl27a nox4 cdc23 zwint h2afv fkbp14 cenpk c16orf33 cep70 tbce cdca8 crat abat hmgn4 rnp3 wdhd1 dlgl1 isy1 hnrpd ipo9 mad2l1 pigc nsl1 mrpl28 dlgl7 rab2a mall map9 spc25 ndufa9 spag5 lars2 bscl2 pin4 ezh2 mcl1 ppm2c mtdh pigm loc146909 fars2 rpa1 gtf2h1 wdr44 arl2bp smarce1 hnrpa3 snrpc taf2 hells atrx rab22a pmpcb abca5 kif23 ddx46 pop1 rbm22 fbxo5 galnt4	139	2198	0.00141
nuclear replisome	chrac1 mcm3 pold3 rpa1 pola1	5	10	0.00141
replisome	chrac1 mcm3 pold3 rpa1 pola1	5	10	0.00141

intracellular organelle part	atf1 slc25a40 pdhb polr1c ubxd2 rnf34 smad2 march5 dync1i2 timm8b tsga14 sgol2 krt10 ndc80 racgap1 nup35 gemin6 sumo1 u1snrnpbp rps9 syncrip procr ckap2 tuba1a arl6ip1 oip5 mtch2 hnrnpa2b1 bnip2 lmnb1 med7 ndufs1 znf326 afg3l2 acsl4 coq3 hmgn3 zwilch dctn4 rfc3 pola1 copg2 mcm3 kif20a mrpl22 pcgf6 mrpl1 smc2 crop pold3 arntl prpf4b cenpe taf15 rcn1 mrps6 ppil1 rpl38 krt18 sub1 katnal1 ggcx orc2l pigy top1 zmiz2 chrac1 cse1l orc6l glce myo5a blzf1 cbx5 nsbp1 ccdc5 scrn1 hnrpm ccnb1 rev3l rpl27a nox4 cdc23 zwint h2afv fkbp14 cenpk c16orf33 cep70 tbce cdca8 crat abat hmgn4 rnpc3 wdhd1 dlgl isy1 hnrpd ipo9 mad2l1 pigc nsl1 mrpl28 dlgl7 mall map9 spc25 ndufa9 spag5 lars2 bscl2 pin4 ezh2 mcl1 ppm2c mtdh pigm loc146909 fars2 rpa1 gtf2h1 wdr44 arl2bp smarce1 hnrpa3 snrpc taf2 hells atrx rab22a pmpcb abca5 kif23 ddx46 pop1 rbm22 fbxo5 galnt4	138	2191	0.00141
kinetochore	orc2l zwilch mad2l1 zwint cbx5 nsl1 cenpe	7	24	0.0021
DNA polymerase complex	chrac1 rev3l pold3	3	3	0.00237
replication fork	chrac1 mcm3 pold3 rfc3 rpa1 pola1 zmiz2	7	25	0.00237
intracellular non-membrane-bound organelle	orc6l myo5a cbx5 nsbp1 polr1c ccdc5 dync1i2 tsga14 sgol2 rpl27a krt10 ccnb1 ndc80 racgap1 h2afv zwint stk38l rps9 procr cenpk klhl5 ckap2 tuba1a oip5 cep70 tbce lmnb1 parva cdca8 tmsl8 hmgn4 hnrpd mad2l1 hmgn3 nsl1 mrpl28 zwilch dctn4 dlgl7 map9 rfc3 pola1 spc25 spag5 mcm3 kif20a mrpl22 mrpl1 fanci smc2 pold3 cenpe loc146909 ppp1r12a rpa1 mrps6 rpl38 krt18 arl2bp smarce1 katnal1 hells atrx orc2l kif23 klhl20 top1 zmiz2 pop1 chrac1 fbxo5 rpl23a	72	1015	0.00297
non-membrane-bound organelle	orc6l myo5a cbx5 nsbp1 polr1c ccdc5 dync1i2 tsga14 sgol2 rpl27a krt10 ccnb1 ndc80 racgap1 h2afv zwint stk38l rps9 procr cenpk klhl5 ckap2 tuba1a oip5 cep70 tbce lmnb1 parva cdca8 tmsl8 hmgn4 hnrpd mad2l1 hmgn3 nsl1 mrpl28 zwilch dctn4 dlgl7 map9 rfc3 pola1 spc25 spag5 mcm3 kif20a mrpl22 mrpl1 fanci smc2 pold3 cenpe loc146909 ppp1r12a rpa1 mrps6 rpl38 krt18 arl2bp smarce1 katnal1 hells atrx orc2l kif23 klhl20 top1 zmiz2 pop1 chrac1 fbxo5 rpl23a	72	1015	0.00297
nucleus	atf1 meox2 emx2 polr1c rnf34 smad2 psma5 klf3 sgol2 ndc80 racgap1 nup35 sobp rbbp9 sfrs10 fh1l1 gemin6 dazap1 sumo1 u1snrnpbp uhrf1 syncrip gins1 oip5 hnrnpa2b1 bnip2 znf193 vrk1 lmnb1 casc5 commd1 med7 rbm45 sfrs3 ublcp1 znf326 rad54b eme1 fen1 hmgn3 dek dctn4 rfc3 ube3c sfrs2 pola1 mcm3 tceb1 pnrc2 pcgf6 smc2 mier1 crop fanci pold3 arntl prpf4b znf512 cenpe taf15 mat2b ppil1 c6orf173 id4 c2orf3 osgep znf124 ptma sub1 anp32a ccna2 orc2l kiaa1267 nppeps top1 zmiz2 chrac1 rfxap nr2f2 cse1l med27 orc6l cdc73 blzf1 c11orf82 c14orf106 cbx5 nsbp1 rbbp8 zmynd11 ash1l scrn1 hnrpm nasp ccnb1 rev3l nox4 rufy2 spast cdc23 mier3 zwint h2afv znf680 nol7 cenpk hoxb3 sfrs7 tsna c16orf33 pop4 cdc7 sfrs5 dgki cdca8 parva hmgn4 rnpc3 wdhd1 isy1 hnrpd ipo9 mad2l1 psma7 nr2c2 nsl1 chuk mrpl28 dlgl7 foxm1 spc25 mcm4 wdsf1 pole2 ezh2 psma2 mcl1 dtl znf544 mtdh dut ing3 pomp mcm10 hn1l rpa1 gtf2h1 luzp1 prmt6 smarce1 hnrpa3 snrpc zic1 gins2 taf2 hells atrx kif23 stag1 psmc3 ddx46 pop1 adi1 rbm22 fbxo5 zranb1 ncapg	167	2854	0.00716
nuclear part	orc6l atf1 cbx5 pola1 polr1c rnf34 mcm3 smad2 scrn1 ezh2 pcgf6 hnrpm smc2 crop pold3 arntl mtdh prpf4b nup35 cdc23 taf15 gemin6 rpa1 sumo1 gtf2h1 u1snrnpbp ppil1 syncrip c16orf33 oip5 bnip2 hnrnpa2b1 smarce1 sub1 hnrpa3 snrpc taf2 lmnb1 med7 orc2l atrx rnpc3 znf326 wdhd1 isy1 top1 ddx46 zmiz2 hnrpd chrac1 pop1 ipo9 rbm22 cse1l	54	752	0.0155
spliceosome	hnrpm rnpc3 syncrip prpf4b c16orf33 isy1 hnrnpa2b1 rbm22 hnrpa3 snrpc gemin6 ppil1 u1snrnpbp	13	112	0.0156
macromolecular complex	orc6l atf1 myo5a cbx5 polr1c smad2 psma5 dync1i2 timm8b hnrpm rpl27a rev3l nup35 psmd5 cdc23 zwint h2afv gemin6 sumo1 u1snrnpbp rps9 syncrip tuba1a arl6ip1 c16orf33 pop4 hnrnpa2b1 ppm1a med7 ndufs1 cdca8 itga10 abat rnpc3 isy1 hnrpd ipo9 fh mad2l1 psma7 nsl1 mrpl28 zwilch dctn4 scn3a rfc3 ube3c pola1 eef1d ndufa9 mcm3 higd1a kif20a wdsf1 ezh2 mrpl22 psma2 pcgf6 psmd2 mrpl1 ppm2c smc2 arntl pold3 prpf4b cenpe pomp loc146909 taf15 rpa1 mrps6 mat2b ppil1 gtf2h1 rpl38 smarce1 sub1 hnrpa3 snrpc taf2 orc2l kif23 pigy psmc3 mycbp pop1 chrac1 rbm22 cse1l rpl23a	90	1415	0.0197
condensed chromosome, pericentric region	orc2l nsl1 cenpe	3	6	0.0227
condensed chromosome kinetochore	orc2l nsl1 cenpe	3	6	0.0227
ribonuclease MRP complex	pop1 pop4	2	2	0.0259
microtubule cytoskeleton	dctn4 ckap2 dlgl7 procr map9 tuba1a arl2bp cep70 spag5 ccdc5 kif20a tbce katnal1 dync1i2 kif23 tsga14 ccnb1 racgap1 cenpe loc146909 fbxo5	21	239	0.0441
cytoskeletal part	dctn4 ckap2 dlgl7 myo5a procr map9 tuba1a arl2bp cep70 krt18 spag5 ccdc5 kif20a tbce katnal1 lmnb1 dync1i2 krt10 kif23 ccnb1 tsga14 racgap1 cenpe loc146909 fbxo5	25	305	0.0511
chromocenter	cbx5 oip5	2	3	0.0623

intracellular organelle	slc25a40 creld2 ubxd2 rnf34 psma5 march5 klf3 dync1i2 tsga14 sgol2 ndc80 racgap1 rbbp9 sfrs10 fh1 sumo1 u1snrnpbp rps9 Uhrf1 gins1 tmem50b oip5 idh1 hnrnpa2b1 bnip2 znf193 commd1 casc5 znf326 ublcp1 sfrs3 rbm45 rad54b acsl4 eme1 fh coq3 trim37 zwilch dctn4 rfc3 ube3c sfrs2 pola1 pnrc2 pcgf6 smc2 mier1 crop fanci pold3 arntl cenpe taf15 id4 znf124 ptma rab10 anp32a ccna2 orc2l kiaa1267 kiaa0141 nr2f2 sacm1l cse1l med27 cdc73 glce myo5a c11orf82 cbx5 rbbp8 nasp rev3l ccnb1 rufy2 spast mier3 cdc23 stk38l h2afv znf680 nol7 klhl5 cenpk c16orf33 sfrs5 dgki glrx5 parva tmsl8 abat crat hmgn4 dlgl1 hnrpd psma7 mad2l1 pigc nr2c2 nsl1 ccdc91 ndufa9 lars2 pin4 wdsf1 mcm4 pole2 ezh2 znf544 ppm2c mtdh ing3 pigm pomp loc146909 mcm10 hn1l rab27a herc3 rpa1 fars2 prmt6 zic1 hells atrx rab22a pmpcb abca5 stag1 psmc3 ddx46 adi1 pop1 rbm22 fbxo5 c5orf21 rpl23a atf1 meox2 pdhb emx2 polr1c smad2 timm8b krt10 nup35 sobp gemin6 dazap1 ckap2 procr syncrip arl6ip1 tuba1a mtch2 vrk1 lmnb1 med7 ndufs1 lsg1 afg3l2 fen1 hmgn3 dek ctsl1 copg2 mcm3 kif20a tceb1 mrpl22 mrpl1 lipa prpf4b znf512 ppp1r12a rcn1 mrps6 mat2b ppil1 c6orf173 rpl38 c2orf3 osgep krt18 sub1 katnal1 ggcx pigy npepps klhl20 top1 zmiz2 chrac1 rfxap orc6l c14orf106 blzf1 nsbp1 amacr ccdc5 ash1l zmynd11 scrn1 hnrpm rpl27a nox4 zwint fkbp14 hoxb3 sfrs7 tsnaX pop4 cep70 cdc7 tbce oma1 cdca8 rnpc3 wdhd1 isy1 ipo9 ggh chuk mrpl28 stx2 dlgl7 rab2a map9 mall foxm1 spc25 spag5 bsc1 psma2 mcl1 dtl dut gtf2h1 luzp1 wdr44 arl2bp smarce1 hnrpa3 snrpc gins2 taf2 ahsa1 sec23ip kif23 alg13 aga zranb1 galnt4 ncapg	256	4896	0.0794
condensed chromosome	orc2l smc2 rpa1 nsl1 cenpe	5	28	0.0794
organelle	slc25a40 creld2 ubxd2 rnf34 psma5 march5 klf3 dync1i2 tsga14 sgol2 ndc80 racgap1 rbbp9 sfrs10 fh1 sumo1 u1snrnpbp rps9 Uhrf1 gins1 tmem50b oip5 idh1 hnrnpa2b1 bnip2 znf193 commd1 casc5 znf326 ublcp1 sfrs3 rbm45 rad54b acsl4 eme1 fh coq3 trim37 zwilch dctn4 rfc3 ube3c sfrs2 pola1 pnrc2 pcgf6 smc2 mier1 crop fanci pold3 arntl cenpe taf15 id4 znf124 ptma rab10 anp32a ccna2 orc2l kiaa1267 kiaa0141 nr2f2 sacm1l cse1l med27 cdc73 glce myo5a c11orf82 cbx5 rbbp8 nasp rev3l ccnb1 rufy2 spast mier3 cdc23 stk38l h2afv znf680 nol7 klhl5 cenpk c16orf33 sfrs5 dgki glrx5 parva tmsl8 abat crat hmgn4 dlgl1 hnrpd psma7 mad2l1 pigc nr2c2 nsl1 ccdc91 ndufa9 lars2 pin4 wdsf1 mcm4 pole2 ezh2 znf544 ppm2c mtdh ing3 pigm pomp loc146909 mcm10 hn1l rab27a herc3 rpa1 fars2 prmt6 zic1 hells atrx rab22a pmpcb abca5 stag1 psmc3 ddx46 adi1 pop1 rbm22 fbxo5 c5orf21 rpl23a atf1 meox2 pdhb emx2 polr1c smad2 timm8b krt10 nup35 sobp gemin6 dazap1 ckap2 procr syncrip arl6ip1 tuba1a mtch2 vrk1 lmnb1 med7 ndufs1 lsg1 afg3l2 fen1 hmgn3 dek ctsl1 copg2 mcm3 kif20a tceb1 mrpl22 mrpl1 lipa prpf4b znf512 ppp1r12a rcn1 mrps6 mat2b ppil1 c6orf173 rpl38 c2orf3 osgep krt18 sub1 katnal1 ggcx pigy npepps klhl20 top1 zmiz2 chrac1 rfxap orc6l c14orf106 blzf1 nsbp1 amacr ccdc5 ash1l zmynd11 scrn1 hnrpm rpl27a nox4 zwint fkbp14 hoxb3 sfrs7 tsnaX pop4 cep70 cdc7 tbce oma1 cdca8 rnpc3 wdhd1 isy1 ipo9 ggh chuk mrpl28 stx2 dlgl7 rab2a map9 mall foxm1 spc25 spag5 bsc1 psma2 mcl1 dtl dut gtf2h1 luzp1 wdr44 arl2bp smarce1 hnrpa3 snrpc gins2 taf2 ahsa1 sec23ip kif23 alg13 aga zranb1 galnt4 ncapg	256	4899	0.0794
chromatin	atrx orc2l hmgn4 cbx5 oip5 nsbp1 pola1 h2afv hells hmgn3	10	91	0.085

**Tab. 26 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (1478) in hMSC-OP nach Abzug der Alters-assoziierten Genexpressionsänderungen (Referenz: 25158 Probesets, die in hMSC-OP und/oder hMSC-K exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
positive regulation of cell motility	trip6 hbefg sphk1 bcl6 edg1	5	11	0.043
positive regulation of locomotion	trip6 hbefg sphk1 bcl6 edg1	5	11	0.043
regulation of MAPKKK cascade	cd24 traf7 sorbs3 timp2	4	7	0.043

regulation of biological process	sost foxp4 lass6 metrn rbbp4 lmcd1 ndfip1 igf2 six5 tle2 trip6 timp2 znf526 rxra cd276 atoh8 prdx2 mnt eglN1 sfrs17a hgs cic sergef smad7 znf787 sorbs3 maz mta1 spry2 cd24 fbx11 camkk2 cdc42bpb ramp1 nfc cdc42ep5 traf7 ddit4 bok phf6 dnajc1 hhex bhlhb2 znf395 znf582 hoxc10 prex1 hoxb5 znf791 aplp1 bin1 serpinf1 arhgef1 gbf1 serpine1 sirt3 cabin1 crk khdrbs3 rgl3 mknk2 znf323 arhgap22 hnrpul1 tgif1 ctf1 ralgsd arid1a rad9a igfbp4 jrk hoxa11 erf igf2bp2 jarid1c nr1d1 snap25 dgcr8 fyn angptl4 slc1a3 znf331 bap1 sspb3 cbx4 ptov1 btg1 tead2 cep250 ptgds hmga1 cyr61 ngfb tgfb1 dab2ip cnot3 hic1 pml rbm14 eya2 sept9 arhgdia ppp1r15a gsn lhx4 tigd5 btbd14b ppp1r13l bcl3 map3k11 vegfb rab11b irf2 nfatc4 znf24 cdc42ep1 rbak pik3r2 znf384 bach2 cbx7 lrp5 itgb2 tada2l phf20 edg1 stim1 ptgs2 clasp1 msc grn mef2d hoxc8 nab2 iqsec2 bbc3 plaur gatad1 slc35b2 nfkb2 mad1l1 thra adams14 vash1 centd2 heyl fosl2 bcl6 znf358 znf667 arfgap1 pcgf2 sin3b arhgef19 sgsm2 mafb hbegf tbl1x lama3 hsf1 zfhx3 inha hoxc11 khsrp calr sncaip itga7 epas1 maff actn1 rexo1 gas1 zeb1 junb ercc2 ppp2r1a tiam2 zbtb22 npas2 cd74 sipa1l3 egr2 tfe3 slc2a4rg sphk1 fstl3 nol3 zfp36l2 fosl1 trim28 camta2 patz1 mid1ip1 igfbp2 ube2r2 olig1 nbl1 smarcd1 preb rhog znf768 bckdha sox13 cdkn1a pea15 stat4 scyl1 znf581 znf555 gamt jarid2 nhlh2 kiaa0415 tbc1d10b foxc2 zbtb7a dhps znf579 slc6a8 irf1 hmga2 ovol2 sertad1 runx3 taf10	225	2502	0.043
regulation of transcription	foxp4 lass6 rbbp4 lmcd1 six5 tle2 znf526 rxra atoh8 mnt sfrs17a eglN1 cic znf787 smad7 sorbs3 mta1 maz fbx11 camkk2 nfc traf7 phf6 hhex bhlhb2 znf582 znf395 hoxc10 hoxb5 znf791 sirt3 crk khdrbs3 znf323 arhgap22 tgif1 hnrpul1 arid1a jrk hoxa11 erf jarid1c nr1d1 znf331 sspb3 ptov1 cbx4 tead2 btg1 hmga1 tgfb1 cnot3 hic1 rbm14 pml eya2 lhx4 tigd5 btbd14b ppp1r13l bcl3 rab11b nfatc4 irf2 znf24 rbak znf384 bach2 cbx7 phf20 tada2l edg1 msc hoxc8 mef2d nab2 gatad1 nfkb2 thra heyl fosl2 bcl6 znf358 znf667 pcgf2 sin3b mafb tbl1x hsf1 zfhx3 hoxc11 calr khsrp epas1 maff rexo1 zeb1 junb ercc2 ppp2r1a zbtb22 npas2 egr2 tfe3 slc2a4rg fosl1 trim28 camta2 patz1 olig1 smarcd1 preb znf768 bckdha sox13 stat4 scyl1 znf581 znf555 jarid2 nhlh2 kiaa0415 foxc2 zbtb7a znf579 irf1 hmga2 ovol2 sertad1 taf10 runx3	131	1373	0.043
regulation of gene expression	foxp4 lass6 rbbp4 lmcd1 igf2 six5 tle2 znf526 rxra cd276 atoh8 mnt sfrs17a eglN1 cic znf787 smad7 sorbs3 maz mta1 fbx11 camkk2 nfc traf7 phf6 hhex bhlhb2 znf582 znf395 hoxc10 hoxb5 znf791 sirt3 crk cabin1 khdrbs3 mknk2 znf323 arhgap22 tgif1 hnrpul1 arid1a jrk hoxa11 erf igf2bp2 jarid1c nr1d1 dgcr8 znf331 sspb3 ptov1 cbx4 tead2 btg1 hmga1 tgfb1 cnot3 hic1 rbm14 pml eya2 lhx4 tigd5 btbd14b ppp1r13l bcl3 rab11b irf2 nfatc4 znf24 rbak znf384 bach2 cbx7 phf20 tada2l edg1 msc hoxc8 mef2d nab2 gatad1 nfkb2 thra heyl fosl2 bcl6 znf358 znf667 pcgf2 sin3b mafb tbl1x hsf1 zfhx3 hoxc11 inha calr khsrp epas1 maff rexo1 zeb1 junb ercc2 ppp2r1a zbtb22 npas2 egr2 tfe3 slc2a4rg fosl1 trim28 camta2 patz1 olig1 smarcd1 preb znf768 bckdha sox13 stat4 znf581 scyl1 znf555 jarid2 nhlh2 kiaa0415 foxc2 zbtb7a znf579 hmga2 irf1 sertad1 ovol2 taf10 runx3	139	1474	0.043
regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	foxp4 lass6 rbbp4 lmcd1 six5 tle2 timp2 znf526 rxra atoh8 mnt sfrs17a eglN1 cic znf787 smad7 sorbs3 maz mta1 fbx11 camkk2 nfc traf7 phf6 hhex bhlhb2 znf582 znf395 hoxc10 hoxb5 znf791 sirt3 crk khdrbs3 znf323 arhgap22 tgif1 hnrpul1 rad9a arid1a jrk hoxa11 erf jarid1c nr1d1 znf331 sspb3 ptov1 cbx4 tead2 btg1 hmga1 tgfb1 cnot3 hic1 rbm14 pml eya2 lhx4 tigd5 btbd14b ppp1r13l bcl3 rab11b irf2 nfatc4 znf24 rbak znf384 bach2 cbx7 phf20 tada2l edg1 msc hoxc8 mef2d nab2 gatad1 nfkb2 thra heyl fosl2 bcl6 znf358 znf667 pcgf2 sin3b mafb tbl1x hsf1 zfhx3 hoxc11 calr khsrp epas1 maff rexo1 zeb1 junb ercc2 ppp2r1a zbtb22 npas2 egr2 tfe3 slc2a4rg zfp36l2 fosl1 trim28 camta2 patz1 olig1 smarcd1 preb znf768 bckdha sox13 stat4 znf581 scyl1 znf555 jarid2 nhlh2 kiaa0415 foxc2 zbtb7a znf579 hmga2 irf1 sertad1 ovol2 taf10 runx3	134	1415	0.043
regulation of cellular process	sost foxp4 lass6 rbbp4 lmcd1 ndfip1 six5 tle2 trip6 timp2 znf526 rxra cd276 atoh8 prdx2 mnt sfrs17a eglN1 hgs cic smad7 znf787 sorbs3 maz mta1 spry2 cd24 fbx11 cdc42bpb camkk2 ramp1 nfc traf7 cdc42ep5 bok ddit4 phf6 dnajc1 hhex bhlhb2 znf395 znf582 hoxc10 prex1 hoxb5 znf791 aplp1 bin1 arhgef1 gbf1 sirt3 crk khdrbs3 rgl3 mknk2 znf323 arhgap22 tgif1 hnrpul1 ctf1 ralgsd rad9a arid1a igfbp4 jrk hoxa11 erf igf2bp2 jarid1c nr1d1 angptl4 znf331 bap1 sspb3 cbx4 ptov1 btg1 tead2 cep250 hmga1 cyr61 ngfb tgfb1 dab2ip cnot3 hic1 pml rbm14 eya2 sept9 arhgdia ppp1r15a gsn lhx4 tigd5 btbd14b ppp1r13l bcl3 map3k11 vegfb rab11b irf2 nfatc4 znf24 cdc42ep1 rbak pik3r2 znf384 bach2 cbx7 lrp5 itgb2 tada2l phf20 edg1 stim1 ptgs2 clasp1 grn msc hoxc8 mef2d iqsec2 nab2 bbc3 gatad1 slc35b2 nfkb2 mad1l1 thra adams14 vash1 centd2 heyl fosl2 bcl6 znf358 znf667 arfgap1 pcgf2 sin3b arhgef19 sgsm2 mafb hbegf tbl1x lama3 hsf1 zfhx3 inha hoxc11 khsrp calr epas1 maff actn1 rexo1 gas1 zeb1 junb ercc2 ppp2r1a tiam2 zbtb22 npas2 cd74 sipa1l3 egr2 tfe3 slc2a4rg sphk1 nol3 fstl3 zfp36l2 fosl1 trim28 patz1 camta2 mid1ip1 olig1 igfbp2 nbl1 smarcd1 preb rhog znf768 bckdha sox13 cdkn1a pea15 stat4 scyl1 znf581 znf555 jarid2 nhlh2 kiaa0415 tbc1d10b foxc2 zbtb7a dhps znf579 irf1 hmga2 ovol2 sertad1 runx3 taf10	208	2342	0.043



regulation of transcription, DNA-dependent	foxp4 lass6 rbbp4 bach2 lmcd1 six5 tle2 cbx7 tada2l phf20 edg1 msc znf526 rxra mnt mef2d hoxc8 nab2 sfrs17a cic gatad1 smad7 znf787 sorbs3 nfkb2 maz mta1 thra hey1 fbxl11 fosl2 znf358 bcl6 znf667 pcgf2 sin3b nfic mafb tbl1x traf7 hsf1 zfmx3 hoxc11 phf6 hhx bhlhb2 znf395 znf582 calr khshrpx hoxc10 epas1 hoxb5 maff znf791 sirt3 crk khdrbs3 rexo1 zeb1 zbtb22 ercc2 junb znf323 arhgap22 hnrpul1 npas2 tgif1 egr2 tfe3 arid1a slc2a4rg hoxa11 jarid1c erf nr1d1 fosl1 trim28 camta2 patz1 znf331 olig1 ssbp3 cbx4 ptov1 tead2 smarcd1 preb hmga1 znf768 bckdha sox13 tgfb1 hic1 cnot3 pml rbm14 eya2 stat4 scyl1 znf581 lhx4 znf555 btbd14b jarid2 nhlh2 ppp1r13l bcl3 kiaa0415 foxc2 zbtb7a rab11b znf579 nfatc4 irf2 znf24 rbak irf1 hmga2 znf384 ovol2 sertad1 runx3 taf10	124	1296	0.043
regulation of cellular metabolic process	foxp4 lass6 rbbp4 lmcd1 six5 tle2 timp2 znf526 rxra cd276 atoh8 mnt sfrs17a eglN1 cic znf787 smad7 sorbs3 maz mta1 cd24 fbxl11 camkk2 nfic traf7 phf6 hhx dnajc1 bhlhb2 znf582 znf395 hoxc10 hoxb5 znf791 aplp1 sirt3 crk khdrbs3 mknk2 znf323 arhgap22 tgif1 hnrpul1 rad9a arid1a jrk hoxa11 erf igf2bp2 jarid1c nr1d1 znf331 ssbp3 ptov1 cbx4 tead2 btg1 hmga1 tgfb1 cnot3 hic1 rbm14 pml eya2 lhx4 tigd5 btbd14b ppp1r13l bcl3 rab11b irf2 nfatc4 znf24 rbak znf384 bach2 cbx7 itgb2 phf20 tada2l edg1 msc hoxc8 mef2d nab2 gatad1 nfkb2 thra hey1 fosl2 znf358 bcl6 znf667 pcgf2 sin3b mafb tbl1x hsf1 zfmx3 hoxc11 inha calr khshrpx epas1 maff rexo1 zeb1 junb ercc2 ppp2r1a zbtb22 npas2 egr2 tfe3 slc2a4rg zfp36l2 fosl1 trim28 camta2 patz1 olig1 smarcd1 preb znf768 bckdha sox13 cdkn1a stat4 znf581 scyl1 znf555 jarid2 nhlh2 kiaa0415 foxc2 zbtb7a znf579 hmga2 irf1 sertad1 ovol2 taf10 runx3	143	1537	0.043
regulation of developmental process	cd24 centd2 ngfb ppp2r1a tgfb1 metrn bcl6 mafb cdc42ep5 lama3 itgb2 timp2 inha itga7 btg1 maff serpinf1 cdc42ep1	18	117	0.043
regulation of metabolic process	foxp4 lass6 rbbp4 lmcd1 six5 tle2 timp2 znf526 rxra cd276 atoh8 mnt sfrs17a eglN1 hgs cic znf787 smad7 sorbs3 maz mta1 cd24 fbxl11 camkk2 nfic traf7 cdc42ep5 phf6 hhx dnajc1 bhlhb2 znf582 znf395 hoxc10 hoxb5 znf791 aplp1 sirt3 crk khdrbs3 mknk2 znf323 arhgap22 tgif1 hnrpul1 rad9a arid1a jrk hoxa11 jarid1c erf igf2bp2 nr1d1 znf331 ssbp3 ptov1 cbx4 tead2 btg1 hmga1 tgfb1 cnot3 hic1 rbm14 pml eya2 gsn lhx4 tigd5 btbd14b ppp1r13l bcl3 rab11b irf2 nfatc4 znf24 rbak znf384 bach2 cbx7 itgb2 phf20 tada2l edg1 clasp1 msc hoxc8 mef2d nab2 plaur gatad1 nfkb2 thra hey1 fosl2 znf358 bcl6 znf667 pcgf2 sin3b mafb tbl1x hsf1 zfmx3 hoxc11 inha calr khshrpx epas1 maff rexo1 zeb1 zbtb22 ercc2 junb ppp2r1a npas2 egr2 tfe3 slc2a4rg zfp36l2 trim28 fosl1 camta2 patz1 mid1ip1 ube2r2 olig1 smarcd1 preb znf768 bckdha sox13 cdkn1a stat4 scyl1 znf581 znf555 jarid2 nhlh2 kiaa0415 foxc2 zbtb7a znf579 hmga2 irf1 sertad1 ovol2 taf10 runx3	150	1626	0.043
regulation of cell motility	centd2 bcl6 trip6 hbegf sphk1 lama3 actn1 edg1	8	33	0.0577
regulation of angiogenesis	btg1 angptl4 pml serpinf1 sphk1 serpene1	6	20	0.0611
regulation of locomotion	centd2 bcl6 trip6 hbegf sphk1 lama3 actn1 edg1	8	34	0.0611
positive regulation of cell migration	trip6 hbegf sphk1 edg1	4	9	0.0611
regulation of cell activation	cd24 cdkn1a tgfb1 cd276 cd74 inha bcl6	7	28	0.0729
regulation of B cell activation	cdkn1a tgfb1 inha bcl6	4	10	0.0872
<b>Zelluläre Komponente</b>				
plasma membrane	bsg epha4 eno2 ptpru aqp1 slc16a6 slc29a1 trip6 itgb2 myo1c diras1 edg1 stim1 ptgs2 bai2 pthr1 arhgap1 cd276 gpr27 gpc1 plaur ptk7 sorbs3 epha2 trpm4 cnn2 spry2 cd24 vdac1 lynx1 insr cd97 cdc42bpb ramp1 cdc42ep5 hbegf traf7 tln1 ptpra neu1 clec2b p2ry4 tm7sf2 slc5a5 calr prex1 itga7 cercam cd83 aplp1 mpp2 syt5 styk1 arhgef1 glrb nelf actn1 slc22a18 cldn18 crk dgkd gas1 hla-f kcnj15 kcns3 rin1 shroom2 cd44 clstn3 epor npc1 parvb snap25 epn1 tmem11 fyn zyx slc41a1 lsp1 hla-dra ttyh3 enpp2 osmr c18orf1 ptov1 cd151 slc43a1 rhog lrp1 slc1a5 ndrg1 col13a1 cyfip2 apbb1ip sept9 laptm5 slc2a8 ptprd tnfrsf1b arfip2 ptprf lilrb4 il4r trpm2 syngnr2 trpv4 rab11b rab33a accn2 nkd2 slc6a8 vamp2 kcnc4 evl hyal2	115	1019	0.000125
intrinsic to plasma membrane	gas1 epha4 kcnj15 kcns3 ptpru aqp1 slc16a6 cd44 slc29a1 epor trip6 itgb2 npc1 edg1 stim1 tmem11 pthr1 zyx hla-dra enpp2 osmr gpc1 cd151 ptk7 slc43a1 lrp1 slc1a5 epha2 cd24 insr cd97 laptm5 slc2a8 ptprd ramp1 hbegf traf7 ptprf ptpra il4r clec2b p2ry4 tm7sf2 trpm2 syngnr2 itga7 accn2 slc6a8 vamp2 kcnc4 cd83 mpp2 glrb	53	419	0.00248
plasma membrane part	epha4 ptpru aqp1 slc16a6 slc29a1 trip6 myo1c itgb2 edg1 stim1 ptgs2 pthr1 cd276 gpc1 ptk7 sorbs3 epha2 cnn2 cd24 insr cd97 cdc42bpb ramp1 traf7 hbegf tln1 ptpra clec2b tm7sf2 p2ry4 calr itga7 aplp1 cd83 mpp2 syt5 glrb actn1 slc22a18 cldn18 gas1 hla-f kcnj15 kcns3 shroom2 cd44 epor npc1 parvb snap25 epn1 tmem11 zyx hla-dra enpp2 osmr cd151 slc43a1 lrp1 slc1a5 cyfip2 apbb1ip slc2a8 laptm5 ptprd ptprf il4r trpm2 syngnr2 slc6a8 accn2 vamp2 kcnc4 evl	74	641	0.00248

integral to plasma membrane	epha4 kcnj15 kcns3 ptpu aqp1 slc16a6 cd44 slc29a1 epor trip6 itgb2 npc1 edg1 stim1 tmem11 pthr1 zyx hla-dra enpp2 osmr gpc1 cd151 ptk7 slc43a1 lrp1 slc1a5 epha2 insr cd97 slc2a8 laptm5 ptpd ramp1 hbegef ptpf ptpa il4r clec2b p2ry4 tm7sf2 trpm2 syng2 itga7 accn2 slc6a8 vamp2 knc4 cd83 mpp2 glrb	50	413	0.00835
adherens junction	trip6 evl sorbs3 tln1 zyx actn1 shroom2	7	21	0.0147
focal adhesion	trip6 evl sorbs3 tln1 actn1	5	11	0.0173
cell-substrate adherens junction	trip6 evl sorbs3 tln1 actn1	5	12	0.0209
intrinsic to membrane	bsg nfasc epha4 lass6 ptpu ndfip1 mrc2 cd68 layn bet1 gpr108 trip6 c1orf78 tspan32 ndst1 sema4c popdc3 cd276 pqlc2 tetran gpr27 ptk7 tmem58 il15ra epha2 trpm4 scarf2 cd24 vdac1 zdhhc8 slc26a6 npip ramp1 slc25a29 traf7 ptpa dnajc1 clec2b tm7sf2 slc5a5 b3gat3 tm9sf4 kdelr1 gramd1b aplp1 ctxn1 pld3 taz slc22a18 cldn18 c1orf160 adam15 kcns3 rnf150 rhbdf2 igf8 cd44 epor slc35c2 zfyve27 ninj1 tmem11 adcy6 ca12 slc1a3 slc41a1 hla-dra ttyh3 vasn enpp2 tmem35 cd151 slc43a1 itfg3 lrp1 slc9a1 mxra8 rfng slc9a5 gpr137 laptm5 itm2c fads3 ptpf lirlb4 il4r vat1 kremen1 knc4 tmem86b aqp1 slc25a1 slc16a6 bri3 slc29a1 lrp5 gpr172a itgb2 rnf19b gramd1a edg1 stim1 astn2 bai2 fam26c pthr1 gpc1 plaur slc35b2 chst7 dnajb12 pnpla3 c1orf66 insr cd97 tmem63a hbegef lemd2 tmem54 stard3 p2ry4 prcd grina itga7 cd83 cercam ece2 syt5 mpp2 styk1 glrb gas1 tpcn1 hla-f slc2a3 kcnj15 abcd1 cd74 clstn3 npc1 herpud1 mst150 ipo13 zyx osmr c18orf1 rtn2 preb slc1a5 agpat1 btn3a1 col13a1 gpm6b abcd4 tmem161a slc2a8 gpr175 bcap29 ptpd dgat1 tnfrsf1b mospd3 acpt dram gdpd3 sez6l2 trpm2 syng2 trpv4 ints1 accn2 chst1 slc6a8 vamp2 plxn3 dullard wfs1	177	1964	0.0279
cell-matrix junction	trip6 evl sorbs3 tln1 actn1	5	13	0.0284
membrane	bsg nfasc epha4 lass6 ptpu ndfip1 mrc2 cd68 layn bet1 gpr108 trip6 c1orf78 tspan32 ndst1 sema4c popdc3 cd276 pqlc2 tetran gpr27 hgs ptk7 tmem58 il15ra sorbs3 epha2 trpm4 cnn2 pde4d scarf2 spry2 cd24 vdac1 cdc42bbp zdhhc8 npip slc26a6 ramp1 slc25a29 cdc42ep5 traf7 tln1 ptpa dnajc1 clec2b tm7sf2 slc5a5 b3gat3 tm9sf4 kdelr1 prex1 gramd1b aplp1 ctxn1 arhgef1 nelf pld3 taz sec23b slc22a18 cldn18 crk adam15 c1orf160 nucb1 rnf150 kcns3 strn4 rhbdf2 rin1 shroom2 cd44 igf8 epor slc35c2 shb zfyve27 ninj1 snap25 epn1 tmem11 ca12 adcy6 fyn slc1a3 slc41a1 hla-dra lsp1 ttyh3 vasn tmem35 enpp2 ptov1 cd151 slc43a1 gnptg ptgds itfg3 lrp1 slc9a1 mxra8 pla2g6 rfng ndrg1 slc9a5 dab2ip sept9 gpr137 laptm5 p4hb itm2c fads3 arfp2 ptpf lirlb4 il4r vat1 kremen1 vegfb rab11b rab33a mfge8 knc4 evl ph-4 tmem86b cdc42ep1 eno2 atxn2l aqp1 bri3 plod3 slc16a6 slc25a1 slc29a1 lrp5 gga3 itgb2 gpr172a myo1c rnf19b gramd1a diras1 edg1 astn2 stim1 fam26c bai2 ptgs2 pthr1 arhgap1 gpc1 plaur snta1 chst7 slc35b2 dnajb12 tom1 ghdc pnpla3 c1orf66 centd2 lynx1 insr cd97 tmem63a lemd2 hbegef tmem54 neu1 stard3 p2ry4 prcd grina calr lppr2 sncaip itga7 ece2 cercam cd83 mpp2 syt5 golga3 styk1 glrb actn1 dgkd gas1 tpcn1 hla-f dlgap4 ppp2r1a slc2a3 kcnj15 map1lc3a abcd1 cd74 atp5d clstn3 npc1 parvb herpud1 ipo13 mst150 zyx osmr pdgfc c18orf1 rtn2 pappa preb rhog slc1a5 agpat1 btn3a1 col13a1 pik3r5 gpm6b cyfip2 abcd4 apbb1ip tmem161a slc2a8 gpr175 dgat1 ptpd bcap29 tnfrsf1b mospd3 acpt dram gdpd3 sez6l2 trpm2 syng2 trpv4 napa ints1 accn2 chst1 nkd2 slc6a8 vamp2 hyal2 plxn3 dullard wfs1	249	2908	0.0385
integral to membrane	bsg nfasc epha4 lass6 ptpu ndfip1 mrc2 cd68 layn bet1 gpr108 trip6 c1orf78 tspan32 ndst1 sema4c popdc3 cd276 pqlc2 tetran gpr27 ptk7 tmem58 il15ra epha2 trpm4 scarf2 vdac1 zdhhc8 slc26a6 npip ramp1 slc25a29 ptpa dnajc1 clec2b tm7sf2 slc5a5 b3gat3 tm9sf4 kdelr1 gramd1b aplp1 ctxn1 pld3 taz slc22a18 cldn18 c1orf160 adam15 kcns3 rnf150 rhbdf2 igf8 cd44 epor slc35c2 zfyve27 ninj1 tmem11 adcy6 ca12 slc41a1 slc1a3 hla-dra ttyh3 vasn enpp2 tmem35 cd151 slc43a1 itfg3 lrp1 slc9a1 mxra8 rfng slc9a5 gpr137 laptm5 itm2c fads3 ptpf lirlb4 il4r vat1 kremen1 knc4 tmem86b aqp1 slc25a1 slc16a6 bri3 slc29a1 lrp5 gpr172a itgb2 rnf19b gramd1a edg1 stim1 astn2 bai2 fam26c pthr1 gpc1 plaur slc35b2 chst7 dnajb12 pnpla3 c1orf66 insr cd97 tmem63a hbegef lemd2 tmem54 stard3 p2ry4 prcd grina itga7 cd83 cercam ece2 syt5 mpp2 styk1 glrb tpcn1 hla-f slc2a3 kcnj15 abcd1 cd74 clstn3 npc1 herpud1 mst150 ipo13 zyx osmr c18orf1 rtn2 preb slc1a5 agpat1 btn3a1 col13a1 gpm6b abcd4 tmem161a slc2a8 gpr175 bcap29 ptpd dgat1 tnfrsf1b mospd3 acpt dram gdpd3 sez6l2 trpm2 syng2 trpv4 napa ints1 accn2 chst1 nkd2 slc6a8 vamp2 hyal2 plxn3 dullard wfs1	174	1954	0.0466
extracellular matrix part	col13a1 hspg2 col8a2 aplp1 lum lama3 timp2 col6a1 col6a3 col5a1	10	59	0.0821

**Tab. 27 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (42) in hMSC-OP, hMSC-alt und hMSC-seneszent (Referenz: 28112 Probesets, die in mindestens einer der drei Gruppen exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Referenz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
M phase	kntc1 nuf2 aurka ttk chek1 ccnb2 birc5 ruvbl1 cdc2 nusap1	10	196	3.98e-09
mitotic cell cycle	kntc1 nuf2 aurka ttk chek1 ccnb2 birc5 ruvbl1 cdc2 nusap1	10	227	6.41e-09
mitosis	kntc1 nuf2 aurka ttk ccnb2 birc5 ruvbl1 cdc2 nusap1	9	165	6.41e-09
cell cycle phase	kntc1 nuf2 aurka ttk chek1 ccnb2 birc5 ruvbl1 cdc2 nusap1	10	241	6.41e-09
M phase of mitotic cell cycle	kntc1 nuf2 aurka ttk ccnb2 birc5 ruvbl1 cdc2 nusap1	9	167	6.41e-09
cell cycle	kntc1 nuf2 mcm2 aurka ttk chek1 ccnb2 birc5 ruvbl1 cdc2 nusap1	11	504	4.35e-07
cell cycle process	kntc1 nuf2 aurka ttk chek1 ccnb2 birc5 ruvbl1 cdc2 nusap1	10	402	6.39e-07
cell division	birc5 kntc1 nuf2 ruvbl1 cdc2 ccnb2 nusap1	7	171	4.41e-06
regulation of mitosis	birc5 kntc1 ttk nusap1	4	46	0.000131
cell cycle checkpoint	birc5 kntc1 ttk chek1	4	47	0.000131
microtubule-based process	kif15 kif14 aurka ttk nusap1	5	118	0.000217
regulation of progression through cell cycle	birc5 kntc1 ttk cdc2 chek1 nusap1	6	234	0.000397
regulation of cell cycle	birc5 kntc1 ttk cdc2 chek1 nusap1	6	237	0.000397
DNA metabolic process	top2a usp1 mcm2 ruvbl1 chek1 mcm5 neil3	7	517	0.00312
organelle organization and biogenesis	top2a kif15 kif14 ruvbl1 mcm2 aurka ttk nusap1	8	757	0.00422
cytoskeleton organization and biogenesis	kif15 kif14 aurka ttk nusap1	5	290	0.00626
DNA repair	top2a usp1 chek1 neil3	4	196	0.0107
response to DNA damage stimulus	top2a usp1 chek1 neil3	4	235	0.0144
chromosome organization and biogenesis	top2a mcm2 ruvbl1 nusap1	4	253	0.0185
cellular component organization and biogenesis	kif15 kntc1 mcm2 aurka ttk top2a birc5 kif14 ruvbl1 nusap1	10	1652	0.0216
response to endogenous stimulus	top2a usp1 chek1 neil3	4	279	0.0216
protein amino acid phosphorylation	aurka ttk cdc2 chek1	4	373	0.0393
<b>Zelluläre Komponente</b>				
microtubule cytoskeleton	kif15 kntc1 aurka ttk ccnb2 top2a birc5 kif14 cdc2 nusap1	10	248	9.49e-09
intracellular non-membrane-bound organelle	zwilch kif15 kntc1 nuf2 mcm2 aurka ttk chek1 ccnb2 top2a birc5 kif14 cdc2 nusap1	14	1066	5.34e-07
non-membrane-bound organelle	zwilch kif15 kntc1 nuf2 mcm2 aurka ttk chek1 ccnb2 top2a birc5 kif14 cdc2 nusap1	14	1066	5.34e-07
cytoskeletal part	top2a birc5 kif15 kntc1 kif14 aurka ttk cdc2 nusap1	9	325	6.58e-07
spindle	birc5 kntc1 aurka ttk cdc2	5	57	2.91e-06
cytoskeleton	kif15 kntc1 aurka ttk ccnb2 top2a birc5 kif14 cdc2 nusap1	10	565	4.28e-06
microtubule	birc5 kif15 kntc1 kif14 cdc2 nusap1	6	132	5.72e-06
chromosome	zwilch top2a birc5 nuf2 mcm2 chek1	6	235	0.000126
nucleus	kntc1 nuf2 aurka chek1 neil3 ddx17 mcm2 mcm5 plcd4 ccnb2 top2a birc5 usp1 ruvbl1 cdc2 trim21 nusap1	17	3005	0.000403
chromosomal part	zwilch birc5 nuf2 mcm2 chek1	5	196	0.000527

## Anhang

intracellular organelle part	zwilch kif15 kntc1 nuf2 mcm2 aurka ttk chek1 top2a birc5 kif14 ruvbl1 cdc2 nusap1	14	2291	0.000809
organelle part	zwilch kif15 kntc1 nuf2 mcm2 aurka ttk chek1 top2a birc5 kif14 ruvbl1 cdc2 nusap1	14	2298	0.000809
intracellular organelle	zwilch kntc1 nuf2 aurka chek1 neil3 kif14 ddx17 kif15 mcm2 ttk mcm5 plcd4 ccnb2 top2a birc5 usp1 ruvbl1 cdc2 trim21 nusap1	21	5152	0.00517
organelle	zwilch kntc1 nuf2 aurka chek1 neil3 kif14 ddx17 kif15 mcm2 ttk mcm5 plcd4 ccnb2 top2a birc5 usp1 ruvbl1 cdc2 trim21 nusap1	21	5155	0.00517
intracellular part	zwilch kntc1 nuf2 aurka chek1 neil3 kif14 ddx17 kif15 mcm2 ttk mcm5 plcd4 ccnb2 top2a gfpt2 birc5 usp1 ruvbl1 cdc2 trim21 nusap1	22	6137	0.0209
intracellular	zwilch kntc1 nuf2 aurka chek1 neil3 kif14 ddx17 kif15 mcm2 ttk mcm5 plcd4 ccnb2 top2a gfpt2 birc5 usp1 ruvbl1 cdc2 trim21 nusap1	22	6423	0.0317
protein complex	zwilch top2a birc5 kif15 kif14 mcm2 ruvbl1	7	1164	0.0342
macromolecular complex	zwilch top2a birc5 kif15 kif14 mcm2 ruvbl1 trim21	8	1471	0.0364
intracellular membrane-bound organelle	kntc1 nuf2 aurka chek1 neil3 ddx17 mcm2 mcm5 plcd4 ccnb2 top2a birc5 usp1 ruvbl1 cdc2 trim21 nusap1	17	4665	0.0686
membrane-bound organelle	kntc1 nuf2 aurka chek1 neil3 ddx17 mcm2 mcm5 plcd4 ccnb2 top2a birc5 usp1 ruvbl1 cdc2 trim21 nusap1	17	4666	0.0686
<b>Molekulare Funktion</b>				
ATP binding	ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvbl1 cdc2	12	874	1.79e-05
adenyl ribonucleotide binding	ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvbl1 cdc2	12	883	1.79e-05
adenyl nucleotide binding	ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvbl1 cdc2	12	931	2.13e-05
ribonucleotide binding	ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvbl1 cdc2	12	1085	6.66e-05
purine ribonucleotide binding	ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvbl1 cdc2	12	1085	6.66e-05
purine nucleotide binding	ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvbl1 cdc2	12	1135	8.97e-05
nucleotide binding	ddx17 kif15 mcm2 aurka ttk loc129607 chek1 mcm5 top2a kif14 ruvbl1 cdc2	12	1323	0.000382
ATPase activity, coupled	ddx17 top2a mcm2 mcm5	4	184	0.0127
ATPase activity	ddx17 top2a mcm2 mcm5	4	213	0.0197
protein serine/threonine kinase activity	aurka ttk cdc2 chek1	4	275	0.0413
kinase activity	aurka ttk loc129607 cdc2 chek1	5	498	0.0465
hydrolase activity	ddx17 mcm2 mcm5 neil3 plcd4 top2a usp1 ruvbl1	8	1255	0.0478
protein kinase activity	aurka ttk cdc2 chek1	4	367	0.048
nucleoside-triphosphatase activity	ddx17 top2a mcm2 mcm5	4	383	0.0512
transferase activity	gfpt2 b3gntl1 aurka ttk loc129607 cdc2 chek1	7	1097	0.0512
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	aurka ttk loc129607 cdc2 chek1	5	604	0.0512
pyrophosphatase activity	ddx17 top2a mcm2 mcm5	4	406	0.0543
hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	ddx17 top2a mcm2 mcm5	4	408	0.0543
hydrolase activity, acting on acid anhydrides	ddx17 top2a mcm2 mcm5	4	409	0.0543
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	aurka ttk cdc2 chek1	4	447	0.0629

**Tab. 28 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (354) in hMSC-alt und hMSC-seneszent (Referenz: 27938 Probesets, die in mindestens einer der zwei Gruppen exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
cell cycle process	ccnf rad51l3 tpx2 e2f1 ncapd2 kif22 cdkn3 tgfb2 plk1 hectd3 kif23 pttg1 dmwd kif2c ube2c aurkb brca2 mad2l1 fbxo5 msh5 cks1b bard1 ccne2 cit	24	400	4.41e-07
cell cycle phase	ccnf rad51l3 tpx2 e2f1 ncapd2 kif22 cdkn3 hectd3 plk1 kif23 pttg1 dmwd kif2c ube2c aurkb brca2 mad2l1 msh5 fbxo5 cit	20	239	3.65e-06
M phase	ccnf rad51l3 tpx2 ncapd2 kif22 hectd3 plk1 kif23 dmwd pttg1 kif2c ube2c aurkb brca2 mad2l1 fbxo5 msh5 cit	18	196	3.65e-06
cell cycle	ccnf rad51l3 tpx2 e2f1 mki67 ncapd2 kif22 cdkn3 tgfb2 plk1 hectd3 kif23 pttg1 dmwd kif2c ube2c aurkb brca2 mad2l1 fbxo5 msh5 cks1b bard1 chaf1b cit ccne2	26	501	3.65e-06
mitotic cell cycle	ccnf tpx2 e2f1 ncapd2 kif22 cdkn3 hectd3 plk1 kif23 pttg1 kif2c ube2c aurkb brca2 fbxo5 mad2l1 cit	17	225	0.000118
mitosis	ccnf hectd3 plk1 kif23 pttg1 tpx2 kif2c ncapd2 aurkb ube2c kif22 mad2l1 fbxo5 cit	14	165	0.000254
M phase of mitotic cell cycle	ccnf hectd3 plk1 kif23 pttg1 tpx2 kif2c ncapd2 aurkb ube2c kif22 mad2l1 fbxo5 cit	14	167	0.000254
cell division	ccnf kif23 pttg1 ncapd2 ube2c aurkb brca2 fbxo5 mad2l1 tgfb2 cks1b cit ccne2	13	170	0.00144
response to endogenous stimulus	dtl rad51l3 pttg1 tyms tdp1 nudt1 top2a brca2 acads msh5 akt1 nono lcat chaf1b bard1	15	277	0.00152
immune system process	gpi psmb9 cript2 il1rapl2 tgfb2 oas3 oas1 ifi35 cd164 prex1 tapbp tubb akt1 samhd1 oas1	16	331	0.0063
response to virus	ifi35 mx2 mx1 irf9 ifi44 oas1	6	47	0.0153
immune response	gpi oas2 ifi35 cd164 psmb9 tapbp tubb il1rapl2 samhd1 tgfb2 oas3 oas1 oas1	13	222	0.0153
response to DNA damage stimulus	dtl rad51l3 pttg1 tyms tdp1 nudt1 top2a brca2 nono msh5 chaf1b bard1	12	233	0.0508
response to other organism	ifi35 mx2 mx1 irf9 ifi44 oas1	6	71	0.0798
<b>Zelluläre Komponente</b>				
chromosome, pericentric region	aurkb kif22 cenpm mad2l1 cenpa kif2c cenph	7	54	0.00836
spindle	aurkb kif23 akt1 fbxo5 tpx2 tubgcp3	6	57	0.0318
microtubule cytoskeleton	plk1 kif23 tpx2 dnali1 kif2c tubb aurkb kif22 top2a brca2 fbxo5 akt1 tubgcp3	13	248	0.0318
microsome	acs15 oas2 p4hb oas3 oas1 tapbp	6	73	0.0697
vesicular fraction	acs15 oas2 p4hb oas3 oas1 tapbp	6	76	0.0697
chromosomal part	tmpo asf1b kif2c ncapd2 aurkb kif22 cenpm mad2l1 cenpa cenph	10	194	0.0697
chromosome	tmpo asf1b kif2c ncapd2 aurkb top2a kif22 cenpm mad2l1 cenpa cenph	11	232	0.0697
cytoskeletal part	plk1 kif23 tpx2 dnali1 kif2c tubb aurkb kif22 top2a brca2 fbxo5 akt1 tubgcp3	13	323	0.0898

**Tab. 29 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (98) in hMSC-OP und hMSC-alt (Referenz: 27581 Probesets, die in mindestens einer der zwei Gruppen exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Zelluläre Komponente</b>				
proteasome complex (sensu Eukaryota)	psmd1 psmd2 shfm1 psmd11	4	42	0.00133
cytosol	atg4c psmd1 psmd2 shfm1 pfdn1 psmd11	6	339	0.0587

**Tab. 30 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (89) in hMSC-OP und hMSC-alt (Referenz: 27581 Probesets, die in mindestens einer der zwei Gruppen exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
developmental process	mmp14 mab2112 trib3 efhd1 gpc4 metrn emd mnt unc5b nrnx2 gli3 itgb5 itch mafg igf2bp2 col11a1	16	1628	0.0679
anatomical structure development	mmp14 mab2112 efhd1 gpc4 metrn emd nrnx2 gli3 itch mafg igf2bp2 col11a1	12	980	0.0744
multicellular organismal development	mmp14 mab2112 efhd1 metrn emd mnt unc5b nrnx2 gli3 itgb5 mafg col11a1	12	1050	0.0744
anatomical structure morphogenesis	gli3 mmp14 efhd1 itch gpc4 metrn mafg igf2bp2	8	530	0.0744
cell proliferation	gli3 mmp14 tnfsf4 gpc4 mafg mnt pdgfa	7	428	0.0744
neurogenesis	gli3 mmp14 efhd1 metrn	4	126	0.0744
nervous system development	gli3 mmp14 mab2112 efhd1 metrn nrnx2	6	334	0.0744
system development	mmp14 mab2112 efhd1 metrn emd nrnx2 gli3 mafg col11a1	9	757	0.0744
regulation of cell proliferation	gli3 tnfsf4 mafg mnt pdgfa	5	265	0.0744
multicellular organismal process	mmp14 mab2112 efhd1 metrn emd mnt unc5b nrnx2 gli3 itgb5 mafg col11a1	12	1365	0.0859
regulation of biological process	mmp14 rbm15b metrn rbm39 taf4b nrnx2 tef igf2bp2 trib3 ube2o mnt pdgfa gli3 tnfsf4 sox12 itch mafg rara	18	2645	0.101

**Tab. 31 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (180) in hMSC-OP und hMSC-seneszent (Referenz: 26058 Probesets, die in mindestens einer der zwei Gruppen exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differ entiell	Refer enz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
cell cycle	cep55 ckap2 dl7 c11orf82 spc25 cdc7 spag5 mcm3 ccdc5 hells ccna2 cdca8 sgol2 ccnb1 fanci kif23 ndc80 pbk racgap1 cks2 cenpe mad2l1 fbxo5 zwint ncapg Uhrf1	26	485	3.64e-17
cell division	cep55 spc25 cdc7 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 sgol2 ndc80 racgap1 cenpe cks2 mad2l1 zwint fbxo5 ncapg	19	166	2.39e-12
mitosis	cep55 dl7 spc25 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 ndc80 pbk cenpe fbxo5 mad2l1 zwint ncapg	17	161	1.55e-10
M phase of mitotic cell cycle	cep55 dl7 spc25 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 ndc80 pbk cenpe fbxo5 mad2l1 zwint ncapg	17	163	1.55e-10
M phase	cep55 dl7 spc25 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 ndc80 pbk cenpe cks2 mad2l1 zwint fbxo5 ncapg	18	191	1.55e-10
cell cycle phase	cep55 dl7 spc25 cdc7 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 ndc80 pbk cenpe cks2 mad2l1 zwint fbxo5 ncapg	19	236	4.88e-10
mitotic cell cycle	cep55 dl7 spc25 cdc7 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 ndc80 pbk cenpe mad2l1 zwint fbxo5 ncapg	18	223	1.55e-09
cell cycle process	cep55 dl7 c11orf82 spc25 cdc7 spag5 ccdc5 hells ccna2 cdca8 ccnb1 kif23 ndc80 pbk racgap1 cks2 cenpe mad2l1 fbxo5 zwint ncapg	21	388	4.49e-08
DNA metabolic process	orc6l gins1 rfc3 cbx5 mcm3 mcm4 gins2 hells pole2 ezh2 dtl fanci pold3 dut top1 rad54b fen1 mcm10 Uhrf1	19	503	4.25e-07
DNA replication	dtl orc6l gins1 pold3 dut rfc3 top1 mcm3 fen1 mcm10 mcm4 gins2 pole2	13	155	5.3e-07
spindle organization and biogenesis	kif23 zwint ndc80 cks2 spag5	5	17	3.59e-05
mitotic sister chromatid segregation	dl7 zwint ndc80 ncapg cenpe	5	19	6.08e-05
sister chromatid segregation	dl7 zwint ndc80 ncapg cenpe	5	20	7.42e-05

## Anhang

chromosome segregation	dlg7 sgol2 zwint ndc80 ncapg cenpe	6	37	9.22e-05
microtubule-based process	kif23 ndc80 cenpe cks2 spag5 loc146909 kif20a zwint	8	110	0.000824
microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	kif23 zwint ndc80 cks2 spag5	5	49	0.00514
phosphoinositide-mediated signaling	fen1 zwint ndc80 cks2 spag5	5	50	0.00536
cytoskeleton organization and biogenesis	kif23 tmsl8 ndc80 racgap1 cenpe cks2 spag5 loc146909 kif20a zwint	10	277	0.0203
response to DNA damage stimulus	dtl fanci pold3 rfc3 rad54b fen1 ccna2 pole2 uhrf1	9	229	0.0203
DNA-dependent DNA replication	mcm3 mcm4 pold3 rfc3 top1	5	70	0.0223
regulation of mitosis	dlg7 mad2l1 zwint ccna2	4	46	0.0314
microtubule-based movement	loc146909 kif20a kif23 cenpe	4	51	0.0411
second-messenger-mediated signaling	fen1 zwint ndc80 cks2 spag5	5	88	0.0457
response to endogenous stimulus	dtl fanci pold3 rfc3 rad54b fen1 ccna2 pole2 uhrf1	9	271	0.0457
regulation of progression through cell cycle	dlg7 c11orf82 cdc7 cks2 fbxo5 mad2l1 zwint ccna2	8	223	0.0468
regulation of cell cycle	dlg7 c11orf82 cdc7 cks2 fbxo5 mad2l1 zwint ccna2	8	226	0.0468
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	hnrnpa2b1 hnrpm rbm25 gemin6	4	57	0.0468
nuclear mRNA splicing, via spliceosome	hnrnpa2b1 hnrpm rbm25 gemin6	4	57	0.0468
RNA splicing, via transesterification reactions	hnrnpa2b1 hnrpm rbm25 gemin6	4	57	0.0468
cytoskeleton-dependent intracellular transport	loc146909 kif20a kif23 cenpe	4	59	0.0517
DNA repair	fanci fen1 pold3 rfc3 pole2 rad54b uhrf1	7	191	0.062
chromosome organization and biogenesis	dlg7 zwint hells ndc80 cbx5 ezh2 ncapg cenpe	8	245	0.0624
organelle organization and biogenesis	dlg7 kif23 tmsl8 ndc80 cbx5 racgap1 cenpe cks2 spag5 loc146909 kif20a zwint hells ezh2 ncapg	15	733	0.0998
<b>Zelluläre Komponente</b>				
chromosome, pericentric region	cdca8 zwilch cenpk sgol2 ndc80 cbx5 spc25 cenpe zwint mad2l1 hells	11	52	3.53e-10
intracellular non-membrane-bound organelle	orc6l zwilch dlg7 rfc3 cbx5 spc25 spag5 mcm3 ccdc5 kif20a sgol2 ccnb1 fanci pold3 ndc80 racgap1 cenpe loc146909 zwint mrps6 rps9 cenpk ckap2 oip5 cep70 hells lmnb1 cdca8 kif23 tmsl8 top1 mad2l1 fbxo5	33	1027	3.53e-10
non-membrane-bound organelle	orc6l zwilch dlg7 rfc3 cbx5 spc25 spag5 mcm3 ccdc5 kif20a sgol2 ccnb1 fanci pold3 ndc80 racgap1 cenpe loc146909 zwint mrps6 rps9 cenpk ckap2 oip5 cep70 hells lmnb1 cdca8 kif23 tmsl8 top1 mad2l1 fbxo5	33	1027	3.53e-10
chromosome	orc6l zwilch cenpk rfc3 cbx5 oip5 spc25 mcm3 hells cdca8 fanci sgol2 pold3 ndc80 top1 cenpe zwint mad2l1	18	226	8.71e-10
chromosomal part	orc6l zwilch cenpk rfc3 cbx5 oip5 spc25 mcm3 hells cdca8 sgol2 pold3 ndc80 cenpe mad2l1 zwint	16	189	4.01e-09
nucleus	orc6l dlg7 meox2 rfc3 foxm1 c11orf82 c14orf106 cbx5 spc25 mcm3 mcm4 pole2 ezh2 hnrpm dtl ccnb1 fanci sgol2 dut ndc80 racgap1 cenpe mcm10 zwint znf680 gemin6 dazap1 mat2b uhrf1 c6orf173 hoxb3 cenpk id4 gins1 oip5 cdc7 hnrnpa2b1 ptma gins2 vrk1 lmnb1 hells casc5 ccna2 cdca8 kif23 wdhd1 top1 rad54b fen1 mad2l1 fbxo5 ncapg med27	55	2891	1.05e-05
kinetochore	zwilch mad2l1 zwint cbx5 cenpe	5	24	9.37e-

				05
microtubule cytoskeleton	ccnb1 ckap2 dl7 kif23 racgap1 cenpe cep70 spag5 loc146909 kif20a ccdc5 fbxo5	12	241	0.000175
cytoskeletal part	ccnb1 ckap2 dl7 kif23 racgap1 cenpe cep70 spag5 loc146909 kif20a ccdc5 fbxo5 lmn1	13	308	0.000383
spindle	dl7 kif23 fbxo5 racgap1 cenpe spag5	6	57	0.000434
microtubule	ckap2 ccdc5 kif20a kif23 racgap1 cenpe spag5	7	126	0.00468
nuclear chromosome part	orc6l mcm3 pold3 cbx5	4	41	0.01
cytoskeleton	ccnb1 ckap2 dl7 kif23 tmsl8 racgap1 cenpe cep70 spag5 loc146909 kif20a ccdc5 fbxo5 lmn1	14	541	0.0103
intracellular organelle part	orc6l slc25a40 zwilch dl7 rfc3 cbx5 spc25 spag5 mcm3 ccdc5 kif20a ezh2 hnrpm sgol2 ccnb1 pold3 ndc80 racgap1 cenpe loc146909 zwint gemin6 mrps6 rps9 cenpk ckap2 arl6ip1 oip5 cep70 hnrnpa2b1 hells lmn1 cdca8 kif23 wdhd1 top1 mad211 fbxo5	38	2217	0.0132
organelle part	orc6l slc25a40 zwilch dl7 rfc3 cbx5 spc25 spag5 mcm3 ccdc5 kif20a ezh2 hnrpm sgol2 ccnb1 pold3 ndc80 racgap1 cenpe loc146909 zwint gemin6 mrps6 rps9 cenpk ckap2 arl6ip1 oip5 cep70 hnrnpa2b1 hells lmn1 cdca8 kif23 wdhd1 top1 mad211 fbxo5	38	2224	0.0133
nuclear chromosome	orc6l mcm3 pold3 cbx5	4	59	0.028
intracellular organelle	orc6l slc25a40 meox2 c11orf82 c14orf106 cbx5 ccdc5 hnrpm sgol2 ccnb1 ndc80 racgap1 zwint znf680 gemin6 dazap1 uhrf1 rps9 cenpk ckap2 hoxb3 gins1 arl6ip1 oip5 cdc7 cep70 hnrnpa2b1 vrk1 lmn1 casc5 cdca8 tmsl8 wdhd1 rad54b ggh fen1 mad211 zwilch dl7 rfc3 foxm1 spc25 spag5 mcm3 kif20a mcm4 pole2 ezh2 dtl fanci pold3 dut cenpe loc146909 mcm10 mrps6 mat2b c6orf173 id4 ptma gins2 hells ccna2 kif23 top1 fbxo5 ncpg med27	68	4958	0.029
organelle	orc6l slc25a40 meox2 c11orf82 c14orf106 cbx5 ccdc5 hnrpm sgol2 ccnb1 ndc80 racgap1 zwint znf680 gemin6 dazap1 uhrf1 rps9 cenpk ckap2 hoxb3 gins1 arl6ip1 oip5 cdc7 cep70 hnrnpa2b1 vrk1 lmn1 casc5 cdca8 tmsl8 wdhd1 rad54b ggh fen1 mad211 zwilch dl7 rfc3 foxm1 spc25 spag5 mcm3 kif20a mcm4 pole2 ezh2 dtl fanci pold3 dut cenpe loc146909 mcm10 mrps6 mat2b c6orf173 id4 ptma gins2 hells ccna2 kif23 top1 fbxo5 ncpg med27	68	4961	0.029
microtubule associated complex	loc146909 kif20a kif23 cenpe	4	66	0.029
intracellular membrane-bound organelle	orc6l slc25a40 dl7 meox2 rfc3 foxm1 c11orf82 c14orf106 cbx5 spc25 mcm3 kif20a mcm4 pole2 ezh2 dtl hnrpm ccnb1 fanci sgol2 pold3 dut ndc80 racgap1 cenpe mcm10 zwint znf680 gemin6 mrps6 dazap1 mat2b uhrf1 c6orf173 hoxb3 cenpk id4 gins1 arl6ip1 oip5 cdc7 hnrnpa2b1 ptma gins2 vrk1 hells casc5 lmn1 ccna2 cdca8 kif23 wdhd1 top1 rad54b ggh fen1 fbxo5 mad211 ncpg med27	60	4497	0.0964
membrane-bound organelle	orc6l slc25a40 dl7 meox2 rfc3 foxm1 c11orf82 c14orf106 cbx5 spc25 mcm3 kif20a mcm4 pole2 ezh2 dtl hnrpm ccnb1 fanci sgol2 pold3 dut ndc80 racgap1 cenpe mcm10 zwint znf680 gemin6 mrps6 dazap1 mat2b uhrf1 c6orf173 hoxb3 cenpk id4 gins1 arl6ip1 oip5 cdc7 hnrnpa2b1 ptma gins2 vrk1 hells casc5 lmn1 ccna2 cdca8 kif23 wdhd1 top1 rad54b ggh fen1 fbxo5 mad211 ncpg med27	60	4498	0.0964
<b>Molekulare Funktion</b>				
DNA-dependent ATPase activity	mcm3 mcm4 rfc3 rad54b	4	39	0.0877
microtubule motor activity	loc146909 kif20a kif23 cenpe	4	41	0.0877

**Tab. 32 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (50) in hMSC-OP und hMSC-seneszent (Referenz: 26058 Probesets, die in mindestens einer der zwei Gruppen exprimiert wurden)**

GO-Gruppe	Gen-Symbol	Anzahl Gene		p-Wert
		differenziell	Referenz	
<b>Biologischer Prozess</b>				
regulation of cellular metabolic process	kiaa0415 cdkn1a lass6 ppp2r1a atoh8 lmcd1 igf2bp2	7	1557	0.101
regulation of metabolic process	kiaa0415 cdkn1a lass6 ppp2r1a atoh8 lmcd1 igf2bp2	7	1647	0.101



## 8.1.1 Ranglisten

Tab. 33 Rangliste der besten 200 Kandidatengene für die Seneszenz in hMSC inklusive Literatur-Referenzen

Gen Symbol	Gen Name	hMSC-seneszenz/ hMSC-K		FC q-Wert (%)	Probeset-Punkte	Probese- exklusive Exp. Punkte	FC-Punkte	Literatur-Punkte			total	Literatur-Referenz		
		Alterung	Knochen					Osteoporose	Alterung	Knochen		Osteoporose		
SAAL/SA42	serum amyloid A1 /serum amyloid A2	52,18	0,89	10	10	20	20	10	5	0	45	Dinarelo et al., 2006	Kovacevic et al., 2008	
NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	14,33	0,00	10	10	5	10	10	10	0	45	Krug et al., 2010	Agarwal et al., 1996	
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	8,69	1,02	10	10	5	10	10	10	10	45	Kim et al., 2007	Canalis et al., 2009	Canalis et al., 2009
EDN1	endothelin 1	6,48	1,61	10	10	5	10	10	10	10	45	Di Giulio et al., 2009	Gulhan et al., 2009	Gulhan et al., 2009
TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator	3,77	4,16	10	10	2	10	10	10	10	42	Mazziotti et al., 2006	Richards et al., 2009	Richards et al., 2009
CD36	CD36 molecule	7,14	7,00	7	5	5	5	5	10	10	37	Fuhrman et al., 2002	Balla et al., 2008	Balla et al., 2008
PTPRZ1	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z, polypeptide 1	5,78	1,02	10	5	5	5	5	10	0	35	Nisato et al., 2005	Schinke et al., 2008	
OXR	oxytocin receptor	5,21	1,61	10	5	5	5	0	10	10	35	Tamma et al., 2009	Elabd et al., 2008	
HDAC9	histone deacetylase 9	6,30	0,31	13	5	5	5	10	5	0	33	Mason et al., 2004	Vega et al., 2004	
COL4A4	collagen, type IV, alpha 4	34,70	0,00	10	20	0	0	0	0	0	30			
COL4A3	collagen, type IV, alpha 3	25,29	0,00	10	20	0	0	0	0	0	30			
PSG7	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7	12,60	3,36	10	10	10	10	0	0	0	30	Endoh et al., 2008		
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin	5,67	0,43	10	5	5	5	5	5	0	27	Gao et al., 2009	Liu et al., 2009	
PSG1	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1	13,73	4,84	7	10	10	10	0	0	0	27	Endoh et al., 2008		
CACNB4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	4,91	2,43	10	5	2	0	5	5	5	27	Tada et al., 2010	Hoenderop et al., 2003	
PRKG2	protein kinase, cGMP-dependent, type II	4,71	0,19	10	5	2	0	0	10	0	27	Smerdel-Ramoya et al., 2002		
CCND2	cyclin D2	10,76	3,36	10	10	10	10	5	0	0	25	Alberts, 2008		
PSG6	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6	9,08	0,31	10	5	10	0	0	0	0	25	Endoh et al., 2008		
SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, B, member 2	8,99	0,89	10	5	10	0	0	0	0	25			
CYP26B1	cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1	8,47	0,50	10	5	0	0	10	0	0	25		Laue et al., 2008	
PSG4	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4	7,72	9,54	10	5	5	5	10	0	0	25	Endoh et al., 2008		
WNM2	wingless-type MMTV integration site family member 2	7,00	0,43	10	5	5	0	5	0	0	25			
SLC39A8	solute carrier family 39, member 8	6,83	3,36	10	5	5	0	5	0	5	25	Endoh et al., 2008	Mak et al., 2009	Yamaguchi et al., 2010
PSG9	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9	6,38	0,58	10	5	0	0	0	0	0	15	Endoh et al., 2008		
EPHA5	EPH receptor A5	6,31	1,43	10	5	0	0	10	0	0	25			
PSG5	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5	5,89	0,89	10	5	0	0	0	0	0	15	Endoh et al., 2008		
MYOZ2	myozenin 2	10,17	1,61	13	10	0	0	0	0	0	23			
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	2,76	0,89	13	0	0	0	0	10	0	23		Zambuzzi et al., 2009	
MBP	myelin basic protein	5,53	5,75	7	5	5	0	0	0	0	12	Ghosh et al., 2008		
PSG2	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 2	4,83	1,43	10	2	0	0	0	0	0	12	Endoh et al., 2008		
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	4,79	0,00	10	2	0	0	0	0	0	12	Bringold et al., 2000		
PSG3	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3	4,78	8,02	10	2	0	0	0	0	0	12	Endoh et al., 2008		
RNF144B	ring finger protein 144B	3,79	0,72	10	2	0	0	0	0	0	12	Ng et al., 2003		
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	3,73	4,16	10	5	2	0	0	0	0	17	Fan et al., 2010		
KCND2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	8,31	1,02	10	5	0	0	5	0	0	20		Li et al., 2005	
HIST1H2BG	histone cluster 1, H2bg	7,31	0,31	10	5	0	0	0	0	0	20			
TRPC4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	4,10	0,89	13	5	0	0	5	0	0	20		Abed et al., 2009	
RG54	regulator of G-protein signaling 4	3,02	4,84	13	2	0	0	5	0	0	20		Tepljuk et al., 2008	
HRH2	histamine receptor H2	2,45	2,43	10	5	0	0	0	0	0	20		Pochampally et al., 2007	
TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase	2,02	9,54	10	5	0	0	0	0	0	20		Saulnier et al., 2009	
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1	6,34	0,72	13	5	0	0	0	0	0	18			
PDE11A	phosphodiesterase 11A	5,85	2,43	13	5	0	0	0	0	0	18			
MRV1	murine retrovirus integration site 1 homolog	5,77	4,16	13	5	0	0	0	0	0	18			
OSBP4	oxysterol binding protein-like 8	5,26	1,99	13	5	0	0	0	0	0	18			
GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	4,99	7,00	10	5	2	0	0	0	0	17			
SELL12	sel-1 suppressor of lin-12-like 2 (C. elegans)	3,98	9,54	10	5	2	0	0	0	0	17			
CCL11	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	3,76	4,16	10	5	2	0	0	0	0	17			
KCNJ12	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	3,52	1,61	10	5	2	0	0	0	0	17			

<i>HIST1H2BG</i>	histone cluster 1, H2bg	7,31	0,31	10	5	5	0	0	0	0	20	
<i>TRPC4</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	4,10	0,89	13		2	0	5	0	0	20	Abed et al., 2009
<i>RG54</i>	regulator of G-protein signalling 4	3,02	4,84	13		2	0	5	0	0	20	Teplyuk et al., 2008
<i>HRH2</i>	histamine receptor H2	2,45	2,43	10	5	0	0	5	0	0	20	Pochampally et al., 2007
<i>TDO2</i>	tryptophan 2,3-dioxygenase	2,02	9,54	10	5	0	0	5	0	0	20	Saulnier et al., 2009
<i>PIK3R1</i>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1	6,34	0,72	13		5	0	0	0	0	18	
<i>PDE11A</i>	phosphodiesterase 11A	5,85	2,43	13		5	0	0	0	0	18	
<i>MRV1</i>	murine retrovirus integration site 1 homolog	5,77	4,16	13		5	0	0	0	0	18	
<i>OSBP18</i>	oxysterol binding protein-like 8	5,26	1,99	13		5	0	0	0	0	18	
<i>GPRCSB</i>	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	4,99	7,00	10	5	2	0	0	0	0	17	
<i>SELLL2</i>	sel-1 suppressor of lin-12-like 2 (C. elegans)	3,98	9,54	10	5	2	0	0	0	0	17	
<i>CCRL1</i>	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	3,76	4,16	10	5	2	0	0	0	0	17	
<i>KCNJ12</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	3,52	1,61	10	5	2	0	0	0	0	17	
<i>KCTD16</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 16	3,39	0,43	10	5	2	0	0	0	0	17	
<i>ARMC4</i>	armadillo repeat containing 4	3,24	0,43	10	5	2	0	0	0	0	17	
<i>SLC7A14</i>	solute carrier family 7, member 14	9,67	1,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>CHODL</i>	chondrolectin	9,32	2,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>PHACTR2</i>	phosphatase and actin regulator 2	9,30	0,89	10		5	0	0	0	0	15	
<i>LRRN3</i>	leucine rich repeat neuronal 3	8,39	7,00	10		5	0	0	0	0	15	
<i>CSF2RB</i>	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity	8,01	1,25	10		5	0	0	0	0	15	
<i>RIMS1</i>	regulating synaptic membrane exocytosis 1	7,87	1,99	10		5	0	0	0	0	15	
<i>GNA14</i>	guanine nucleotide binding protein, alpha 14	6,86	2,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>TNFRSF21</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	6,56	0,58	10		5	0	0	0	0	15	
<i>SDPR</i>	serum deprivation response	6,48	0,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>CNTN3</i>	contactin 3	6,13	1,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>PPP4R4</i>	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4	6,00	4,16	10		5	0	0	0	0	15	
<i>HSPB3</i>	heat shock 27kDa protein 3	5,97	0,19	10		5	0	0	0	0	15	
<i>AMPD3</i>	adenosine monophosphate deaminase	5,94	1,61	10		5	0	0	0	0	15	
<i>CLDN11</i>	claudin 11	5,55	2,70	10		5	0	0	0	0	15	
<i>SCN3A</i>	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	5,35	4,84	10		5	0	0	0	0	15	
<i>SCIN</i>	scinderin	5,27	2,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>CPE</i>	carboxypeptidase E	5,06	2,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>LRRN4CL</i>	LRRN4 C-terminal like	5,03	1,43	10		5	0	0	0	0	15	
<i>CUGBP2</i>	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	4,28	3,36	13		2	0	0	0	0	15	
<i>USP53</i>	ubiquitin specific peptidase 53	3,88	4,16	13		2	0	0	0	0	15	
<i>MFAP5</i>	microfibrillar associated protein 5	3,32	1,43	13		2	0	0	0	0	15	
<i>RDH10</i>	retinol dehydrogenase 10	3,24	3,36	13		2	0	0	0	0	15	
<i>EIF5A2</i>	eukaryotic translation initiation factor 5A2	3,24	0,00	13		2	0	0	0	0	15	
<i>HTR1F</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F	2,89	9,54	10	5	0	0	0	0	0	15	
<i>SYNPO2L</i>	synaptopodin 2-like	2,71	4,84	10	5	0	0	0	0	0	15	
<i>AKAP6</i>	A kinase anchor protein 6	2,21	8,02	10	5	0	0	0	0	0	15	
<i>WDR17</i>	WD repeat domain 17	2,18	3,36	10	5	0	0	0	0	0	15	
<i>PTCD1</i>	pentatricopeptide repeat domain 1	2,14	5,75	10	5	0	0	0	0	0	15	

<i>SECTM1</i>	secreted and transmembrane 1	2,11	9,54	10	5	0	0	0	0	0	0	15	
<i>GFOD1</i>	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1	2,09	5,75	10	5	0	0	0	0	0	0	15	
<i>PRSS1</i>	protease, serine, 1 (trypsin 1)	2,02	9,54	10	5	0	0	0	0	0	0	15	
<i>TEX9</i>	testis expressed 9	6,16	0,72	7		5	0	0	0	0	0	12	
<i>PCDH10</i>	protocadherin 10	4,92	2,70	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>GPR116</i>	G protein-coupled receptor 116	4,86	1,25	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>PRSS12</i>	protease, serine, 12 (neurotrypsin, motopsin)	4,70	4,16	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>ARHGAP29</i>	Rho GTPase activating protein 29	4,52	3,36	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>FOUR3</i>	folate receptor 3	4,51	1,43	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>AOX1</i>	aldehyde oxidase 1	4,51	0,31	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>SLC22A4</i>	solute carrier family 22, member 4	4,51	1,43	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>FRMPD4</i>	FERM and PDZ domain containing 4	4,44	0,00	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>FLG</i>	flaggrin	4,34	2,70	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>ST3GAL6</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	4,25	2,43	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>STOX2</i>	storkhead box 2	4,19	9,54	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>SLC2A5</i>	solute carrier family 2, member 5	4,10	0,72	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>SSTR1</i>	somatostatin receptor 1	4,00	1,99	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>RBM24</i>	RNA binding motif protein 24	3,75	1,99	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>TMEFF2</i>	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	3,66	9,54	10		2	0	0	0	0	0	12	
<i>HELLS</i>	helicase, lymphoid-specific	0,19	0,50	13		5	10	10	10	10	10	48	Sun et al., 2004
<i>CA2</i>	carbonic anhydrase II	0,02	1,61	10		20	0	10	5	5	5	45	Sun et al., 2004 Orimo, 2010 Zhang et al., 2009
<i>HIMMR</i>	hyaluronan-mediated motility receptor	0,03	0,00	10		20	10	5	0	0	0	45	Bose und Masellis, 2005
<i>FOXM1</i>	forkhead box M1	0,05	0,00	10		5	20	10	0	0	0	45	Li et al., 2008
<i>HASI</i>	hyaluronan synthase 1	0,05	1,25	10		20	10	5	0	0	0	45	Bose und Masellis, 2005
<i>HGF</i>	hepatocyte growth factor	0,07	0,00	7		5	10	10	10	10	10	42	Standal et al., 2007
<i>CDC20</i>	cell division cycle 20 homolog	0,05	0,00	10		5	20	5	0	0	0	40	Sanada et al., 2009 Alberets, 2008
<i>LMNB1</i>	lamin B1	0,13	0,00	10		5	5	10	10	10	10	40	Vergnes et al., 2004
<i>DEPDC1</i>	DEP domain containing 1	0,03	0,00	13		5	20	0	0	0	0	38	
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5	0,05	0,00	13		5	20	0	0	0	0	38	
<i>SOX11</i>	SRY (sex determining region Y)-box 11	0,09	0,00	13		5	10	0	10	0	0	38	Kubo et al., 2009
<i>PTN</i>	pleiotrophin	0,11	0,00	13		5	5	0	10	10	10	38	Trost et al., 2010 Nissen-Meyer et al., 2007
<i>SOX4</i>	SRY (sex determining region Y)-box 4	0,17	0,00	13		5	5	0	10	10	10	38	Trost et al., 2010 Nissen-Meyer et al., 2007
<i>SCRG1</i>	stimulator of chondrogenesis 1	0,05	0,21	10		20	0	5	0	0	0	35	Ochi et al., 2006
<i>BUB1</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	0,05	0,00	10		5	10	10	0	0	0	35	Baker et al., 2008
<i>CDC48</i>	cell division cycle associated 8	0,06	0,00	10		5	10	10	0	0	0	35	
<i>SCD</i>	stearoyl-CoA desaturase	0,07	1,02	10		10	10	10	5	0	0	35	Ford, 2010
<i>TACC3</i>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	0,09	0,00	10		5	10	0	10	0	0	35	Uckan et al., 2009 Raouf und Seth 2002
<i>BUB1B</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	0,09	0,00	10		5	10	10	0	0	0	35	Baker et al., 2008
<i>CDC2</i>	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	0,05	0,00	13		20	0	0	0	0	0	33	
<i>MKI67</i>	antigen identified by monoclonal ab Ki-67	0,09	0,00	13		10	10	10	0	0	0	33	Sliwiska et al., 2009

EX01	exonuclease 1	0.05	0.00	10	5	10	5	10	0	0	0	0	30	Gravel et al., 2008	Miraoui et al., 2008
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	0.09	0.00	10	10	10	0	10	0	0	0	0	30		
AURKB	aurora kinase B	0.11	0.00	10	5	5	10	0	0	0	0	0	30	Bethel et al., 2009	
TK1	thymidine kinase 1, soluble	0.12	0.00	10	5	5	10	0	0	0	0	0	30	Chen, 1997	
PLK4	polo-like kinase 4	0.10	0.00	13	5	5	5	0	0	0	0	0	28	Moret et al., 2009	
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A	0.23	0.58	10	5	2	10	0	0	0	0	0	27	Sandhu et al., 2000	
CCNB2	cyclin B2	0.05	0.00	1	20	5	0	0	0	0	0	0	26	Alberts, 2008	
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	0.05	1.61	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog	0.05	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
NDC80	NDC80 homolog, kinetochore complex component	0.06	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
ANLN	anillin, actin binding protein	0.06	0.00	10	10	5	0	0	0	0	0	0	25		
KIF20A	kinesin family member 20A	0.06	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
FAM70A	family with sequence similarity 70, member A	0.07	0.21	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog	0.08	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	0.09	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
TROAP	trophinin associated protein	0.09	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
CCNB1	cyclin B1	0.09	0.00	10	5	10	5	0	0	0	0	0	25	Alberts, 2008	
SKA1	spindle and kinetochore associated complex subunit 1	0.09	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
DSG2	desmoglein 2	0.09	1.25	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		
KIF18B	kinesin family member 18B	0.09	0.00	10	5	10	0	0	0	0	0	0	25		Fuchshofer et al., 2009
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	0.10	0.00	10	10	10	0	0	5	0	0	0	25		
CDC25C	cell division cycle 25 homolog C	0.10	0.00	10	5	5	5	0	0	0	0	0	25	Alberts, 2008	
CCNF	cyclin F	0.12	0.00	10	5	5	5	0	0	0	0	0	25	Alberts, 2008	
HUURP	Holliday junction recognition protein	0.14	0.00	10	5	5	5	0	0	0	0	0	25	Kato et al., 2007	
PLK1	polo-like kinase 1	0.16	0.00	10	5	5	5	0	0	0	0	0	25	Bassermann et al., 2008	
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	0.10	0.00	13	5	10	0	0	0	0	0	0	23		
KYNU	kynureninase	0.17	1.02	13	5	5	0	0	0	0	0	0	23		
MCM10	minichromosome maintenance complex component 10	0.06	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
DTL	denticleless homolog	0.06	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
PBK	PDZ binding kinase	0.06	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
KCNG1	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	0.06	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	0.06	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
RRM2	ribonucleotide reductase M2	0.06	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
TTK	TTK protein kinase	0.07	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	0.07	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	0.07	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
DLGAP5	discs, large homolog-associated protein 5	0.07	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
CEP55	centrosomal protein 55kDa	0.08	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	0.09	0.34	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	0.09	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	0.09	0.00	10	10	10	0	0	0	0	0	0	20		

<i>TYMS</i>	thymidylate synthetase	0,10	0,00	10	10	0	0	0	0	0	20
<i>KIF14</i>	kinesin family member 14	0,10	0,00	10	10	0	0	0	0	0	20
<i>KIAA0101</i>	KIAA0101	0,10	0,00	10	10	0	0	0	0	0	20
<i>F2RL1</i>	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0,10	0,34	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>LRRN1</i>	leucine rich repeat neuronal 1	0,11	1,02	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>CRIP1</i>	cysteine-rich protein 1	0,11	1,61	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>E2F8</i>	E2F transcription factor 8	0,12	0,21	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>CKAP2L</i>	cytoskeleton associated protein 2-like	0,12	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>OAS1</i>	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	0,12	4,16	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>FAM83D</i>	family with sequence similarity 83, member D	0,12	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>NEURL1B</i>	neuronal homolog 1B	0,13	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>GINS2</i>	GINS complex subunit 2	0,14	0,50	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>FAM64A</i>	family with sequence similarity 64, member A	0,15	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>ERCC6L</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like	0,15	0,34	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>ZNF367</i>	zinc finger protein 367	0,16	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>SPAG5</i>	sperm associated antigen 5	0,16	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>HCG4</i>	HLA complex group 4	0,16	2,43	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>SKA3</i>	spindle and kinetochore associated complex subunit 3	0,18	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>OIP5</i>	Opa interacting protein 5	0,18	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>SIPA1L2</i>	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	0,18	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>H2BFM/</i>	H2B histone family, member M / H2B histone	0,18	0,43	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>H2BFXP</i>	family, member X, pseudogene	0,18	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>KIF15</i>	kinesin family member 15	0,18	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>CHST1</i>	carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	0,18	1,99	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>FAM388</i>	family with sequence similarity 38, member B	0,19	1,43	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>CELSR1</i>	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	0,19	0,21	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>PFKFB4</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	0,19	2,70	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>BRD1</i>	BRCA1 associated RING domain 1	0,19	1,25	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>CDC45</i>	cell division cycle associated 5	0,20	0,00	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>CENPE</i>	centromere protein E, 312kDa	0,20	1,02	10	5	0	0	0	0	0	20
<i>KCTD15</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 15	0,16	0,00	13	5	0	0	0	0	0	18
<i>OAS2</i>	2',5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	0,18	1,43	13	5	0	0	0	0	0	18
<i>MTIM</i>	metallothionein 1M	0,20	0,34	10	5	2	0	0	0	0	17
<i>ASF1B</i>	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B	0,21	0,50	10	5	2	0	0	0	0	17
<i>MTP18</i>	mitochondrial protein 18 kDa	0,22	0,00	10	5	2	0	0	0	0	17
<i>ARHGAP11A</i>	Rho GTPase activating protein 11A	0,22	0,72	10	5	2	0	0	0	0	17
<i>MND1</i>	meiotic nuclear divisions 1 homolog	0,22	0,00	10	5	2	0	0	0	0	17
<i>ZNF711</i>	zinc finger protein 711	0,23	0,00	10	5	2	0	0	0	0	17

Tab. 34 Rangliste der besten 200 Kandidatengene für die Osteoporose in hMSC inklusive Literatur-Referenzen

Gen Symbol	Gen Name	hMSC-OP/ hMSC-K	Probeset- Punkte	exklusive Exp. Punkte	FC- Punkte	Literatur-Punkte		total	gleich exprimiert in hMSC-ait	Literatur-Referenzen			
						Alterung	Knochen			Alterung	Knochen	Osteoporose	
		q-Wert (%)				Alterung	Knochen	Osteoporose			Osteoporose		
IGF2	insulin-like growth factor 2	6,39	3,21	13	10	10	10	0	43	Fu et al., 2008	Chen et al., 2010		
FOXC2	forkhead box C2	2,89	0,62	10	2	10	10	10	42	Yang et al., 2009	Kim et al., 2009	Yamada et al., 2006	
MAB21L2	mab-21-like 2	14,43	0,00	10	20	0	10	0	40	X	Baldessari et al., 2004		
SOST	sclerostosis	7,30	2,18	10	10	0	10	10	40		Ten Dijke, 2008	Gaudio, 2010	
IBSP	integrin-binding sialoprotein	5,72	0,00	10	10	0	10	10	40		Ross et al., 2005	Trost et al., 2010	
CALR	calreticulin	2,62	1,60	13	2	10	10	5	40	X	Oikku und Mahonen, 2009	Coppolino und Dedhar, 1998	
ITGB2	integrin, beta 2	2,94	0,62	10	2	5	10	10	37	Epperly et al., 2006	Hopwood et al., 2007	Mtura et al., 2005	
NOTCH3	Notch homolog 3	2,90	0,90	10	2	10	10	5	37	Carey et al., 2007	Bai et al., 2008	Pereira et al., 2002	
EGR2	early growth response 2	5,97	0,62	10	10	0	10	5	35		Gabet et al., 2010	Gabet et al., 2010	
ANGPTL4	angiopoietin-like 4	3,69	7,26	10	5	0	10	10	35		Knowles et al., 2010	Hopwood et al., 2009	
PTH1R	parathyroid hormone 1 receptor	3,00	2,70	10	2	0	10	10	32		Martin et al., 2006	Silver und Bushinsky, 2004	
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	2,71	8,24	10	2	10	10	0	32	Kinkel et al., 2004	Yamashita et al., 2008		
PML	promyelocytic leukemia	2,70	1,40	10	2	10	10	0	32	Janderová-Rossmislová et al.	Janderová-Rossmislová et al.		
SDC3	syndecan 3	3,41	1,60	10	5	0	10	0	30	X	Tepluyuk et al., 2009		
BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b	6,29	3,54	10	10	0	5	0	25		Canalis, 2009		
COL10A1	collagen, type X, alpha 1	5,25	0,00	10	10	0	5	0	25		Lamas et al., 2010		
FSTL3	folliculin-like 3	3,40	1,60	10	5	0	10	0	25		Tsuchida et al., 2001		
NBL1	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	3,34	0,62	10	5	0	10	0	25		Gazzero und Canalis, 2006		
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	3,11	2,46	10	5	10	0	0	25	Estep et al., 2009			
PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa	2,91	2,70	13	2	0	5	5	25			Durand et al., 2008	Harvey et al., 1989
PKD1	polycystic kidney disease 1	3,80	1,33	7	5	0	10	0	22	Krygowska-Wajs et al., 2008	Xiao et al., 2010		
SNCAIP	synuclein, alpha interacting protein	2,88	0,90	10	2	10	0	0	22	Obermajer et al., 2009			
ENO2	enolase 2	2,83	4,38	10	2	10	0	0	22				
TRPM2	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2	2,77	4,93	10	2	0	10	0	22				
ZNF208	zinc finger protein 208	6,33	0,62	10	10	0	0	0	20				
CTXN1	cortixin 1	5,57	0,62	10	10	0	0	0	20				
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	5,27	0,00	10	10	0	0	0	20				
RNF208	ring finger protein 208	4,70	0,00	10	5	5	0	0	20				
FBXO17	F-box protein 17 / seryl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	4,36	0,62	10	5	5	0	0	20				
APLP1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1	3,72	2,46	10	5	5	0	0	20				
RHCE	Rh blood group, CcEe antigens	3,55	1,33	10	5	5	0	0	20				
PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog	3,71	0,00	13	5	0	0	0	18				
PTPRD	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	3,50	3,90	13	5	0	0	0	18				
SEPT9	septin 9	5,11	0,00	7	10	0	0	0	17	X			
MINK1	missshapen-like kinase 1	3,87	1,60	7	5	5	0	0	17		Nicke et al., 2005		
TMEM201	transmembrane protein 201	2,96	0,90	10	5	2	0	0	17				
ADAMTS7	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 7	2,88	0,62	10	2	0	5	0	17			Liu et al., 2006	
KLHL22 / SCARF2	kelch-like 22 / scavenger receptor class F, member 2	2,50	4,38	10	5	2	0	0	17				
PCK3	PCK3 protein kinase 3	4,80	1,40	10	5	0	0	0	15				

PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog	3,71	0,00	13	5	0	0	0	0	18
PTPRD	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	3,50	3,90	13	5	0	0	0	0	18
SEPT9	septin 9	5,11	0,00	7	10	0	0	0	0	17
MINK1	missshapen-like kinase 1	3,87	1,60	7	5	5	0	0	0	17
TMEM201	transmembrane protein 201	2,96	0,90	10	5	2	0	0	0	17
ADAMT57	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 7	2,88	0,62	10	2	0	5	0	0	17
KLHL22 / SCARF2	kelch-like 22 / scavenger receptor class F, member 2	2,50	4,38	10	5	2	0	0	0	17
PCTK3	PCTAIRE protein kinase 3	4,80	1,40	10	5	0	0	0	0	15
CLEC2B	C-type lectin domain family 2, member B	4,65	8,24	10	5	0	0	0	0	15
MTSSL1	metastasis suppressor 1-like	4,39	0,00	10	5	0	0	0	0	15
AQP1 / INMT	aquaporin 1 / indolethylamine N-methyltransferase	4,34	2,70	10	5	0	0	0	0	15
TSPAN32	tetraspanin 32	4,30	7,26	10	5	0	0	0	0	15
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	4,16	3,21	10	5	0	0	0	0	15
MUSK	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase	4,10	4,38	10	5	0	0	0	0	15
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	3,93	2,46	10	5	0	0	0	0	15
MTA1	metastasis associated 1	3,87	0,00	10	5	0	0	0	0	15
HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	3,87	0,00	10	5	0	0	0	0	15
HLA-DRB1 / HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 / major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	3,81	3,54	10	5	0	0	0	0	15
SOX12	SRY (sex determining region Y)-box 12	3,81	0,00	10	5	0	0	0	0	15
MARCF9	membrane-associated ring finger (C3HC4) domain containing 9	3,75	0,62	10	5	0	0	0	0	15
HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	3,72	5,70	10	5	0	0	0	0	15
PRR7	proline rich 7 (synaptic)	3,67	0,62	10	5	0	0	0	0	15
NRXN2	neurexin 2	3,66	0,00	10	5	0	0	0	0	15
IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	3,64	0,62	10	5	0	0	0	0	15
TMEM148	transmembrane protein 148	3,54	0,62	10	5	0	0	0	0	15
SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	3,51	1,40	10	5	0	0	0	0	15
RPP25	ribonuclease P/MRP 25kDa subunit	3,43	0,90	10	5	0	0	0	0	15
AP2A1	adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit	3,42	0,62	10	5	0	0	0	0	15
XAB2	XPA binding protein 2	3,41	0,62	10	5	0	0	0	0	15
PLUNC	palate, lung and nasal epithelium associated	3,36	3,21	10	5	0	0	0	0	15
DAB2IP	DAB2 interacting protein	3,27	1,40	10	5	0	0	0	0	15
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	3,22	1,40	10	5	0	0	0	0	15
ATN1	atrophin 1	3,20	0,62	10	5	0	0	0	0	15

NHLH2	nescient helix loop helix 2	3,20	8,24	10	5	0	0	0	0	0	15	
METRN	meteorin, glial cell differentiation regulator	3,19	0,00	10	5	0	0	0	0	0	15	X
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	3,17	0,00	10	5	0	0	0	0	0	15	X
ARHGDI A	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	3,11	1,40	10	5	0	0	0	0	0	15	
CHST1	carbohydrate sulfotransferase 1	3,10	7,26	10	5	0	0	0	0	0	15	
SLCGA10P / SLC6A8	solute carrier family 6, member 10 / solute carrier family 6, member 8	3,08	1,20	10	5	0	0	0	0	0	15	
FRAS1	Fraser syndrome 1	3,07	1,40	10	5	0	0	0	0	0	15	X
DIRAS1	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1	3,06	0,00	10	5	0	0	0	0	0	15	
PRSS22	protease, serine, 22	2,46	2,70	10	5	0	0	0	0	0	15	
LRRC68	leucine rich repeat containing 68	2,36	2,70	10	5	0	0	0	0	0	15	
MEF2D	myocyte enhancer factor 2D	2,93	2,46	7	5	2	0	0	0	0	14	
VAMP2	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	2,38	0,62	13	0	0	0	0	0	0	13	
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	3,47	2,18	7	5	0	0	0	0	0	12	
SLC6A8	solute carrier family 6, member 8	3,13	0,90	7	5	0	0	0	0	0	12	
SF3A2	splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa	3,00	0,62	10	2	0	0	0	0	0	12	
FBXO16 / ZNF395	F-box protein 16 / zinc finger protein 395	2,99	3,21	10	2	0	0	0	0	0	12	
LAPTM5	lysosomal protein transmembrane 5	2,97	0,62	10	2	0	0	0	0	0	12	
P2RY4	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 4	2,95	8,24	10	2	0	0	0	0	0	12	
MPP2	membrane protein, palmitoylated 2	2,91	1,33	10	2	0	0	0	0	0	12	
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	2,87	0,00	10	2	0	0	0	0	0	12	
MYO15A	myosin XVA	2,83	2,70	10	2	0	0	0	0	0	12	
PACS1	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	2,82	0,62	10	2	0	0	0	0	0	12	
ZDHHC8	zinc finger, DHHC-type containing 8	2,81	0,00	10	2	0	0	0	0	0	12	
PHLDB3	pleckstrin homology-like domain, family B, member 3	2,80	1,33	10	2	0	0	0	0	0	12	
FCHSD1	FCH and double SH3 domains 1	2,77	2,70	10	2	0	0	0	0	0	12	
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1	2,77	1,60	10	2	0	0	0	0	0	12	X
ZYX	zyxin	2,76	0,90	10	2	0	0	0	0	0	12	
SLC27A1	solute carrier family 27, member 1	2,75	0,90	10	2	0	0	0	0	0	12	
FKBP8	FK506 binding protein 8, 38kDa	2,74	1,60	10	2	0	0	0	0	0	12	
PPP1R9B	protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B	2,73	0,00	10	2	0	0	0	0	0	12	
SCARF2	scavenger receptor class F, member 2	2,72	3,21	10	2	0	0	0	0	0	12	
ZNF579	zinc finger protein 579	2,72	0,62	10	2	0	0	0	0	0	12	
SLC5A5	solute carrier family 5, member 5	2,72	1,60	10	2	0	0	0	0	0	12	
SIK1	salt-inducible kinase 1	2,69	3,21	10	2	0	0	0	0	0	12	
ARHGGEF1	Rho guanine nucleotide exchange factor 9 (GEF) 19	2,68	0,90	10	2	0	0	0	0	0	12	
CRISPLD2	cysteine-rich secretory protein LCC1 domain containing 2	2,66	0,62	10	2	0	0	0	0	0	12	



NOX4	NADPH oxidase 4	0,35	4,38	10	5	2	10	10	0	37	McCraun et al., 2009	Yang et al., 2004
PENK	proenkephalin	0,34	5,70	10	2	2	10	10	0	32	Caffrey et al., 1994	Rosen et al., 1995
SH3BP2	SH3-domain binding protein 2	0,31	4,38	1	5	5	0	10	10	31	McCraun et al., 2009	McMahon und Ueki, 2008
RG54	regulator of G-protein signaling 4	0,20	4,38	13	10	10	0	5	0	28	Jung et al., 2010	Teplyuk et al., 2008
SUZ12	Suppressor of zeste 12 homolog	0,28	5,70	1	5	5	10	5	0	26	Csoka et al., 2004	Pizzatti 2010
MEOX2	mesenchyme homeobox 2	0,24	0,00	10	5	5	10	0	0	25	Liang und Van Zant, 2008	Balint et al., 2003
LXN	latexin	0,45	4,38	10	0	0	5	10	0	25	Wang und Gundersen, 1984	Zhao et al., 2009
TUBB2A	tubulin, beta 2A	0,48	3,90	10	0	0	10	5	0	25	Date et al., 2007	
CDC48	cell division cycle associated 8	0,48	9,04	10	5	0	10	0	0	25	Zeng et al., 2009	
FOXM1	forkhead box M1	0,40	6,30	10	2	2	10	0	0	22		
KALI	Kallmann syndrome 1 sequence	0,10	9,04	10	10	10	0	0	0	20		
SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	0,10	9,04	10	10	10	0	0	0	20		
PKIB	protein kinase inhibitor beta	0,12	1,33	10	10	10	0	0	0	20		
MALL	mal, T-cell differentiation protein-like	0,13	4,38	10	10	10	0	0	0	20		
ZIC1	Zic family member 1	0,13	4,38	10	10	10	0	0	0	20		
CNTN3	contactin 3	0,13	1,60	10	10	10	0	0	0	20		
F2RL1	coagulation factor II receptor-like 1	0,18	2,18	10	10	10	0	0	0	20		
CHI3L1	chitinase 3-like 1	0,22	4,38	10	5	5	0	5	0	20		Lavery et al., 2009
SHFM1	split hand/foot malformation type 1	0,45	1,90	10	10	10	0	10	0	20		Suzuki et al., 2007
MFAP5	microfibrillar associated protein 5	0,26	4,93	13	5	5	0	0	0	18		
P2RY6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	0,34	2,18	10	2	2	0	5	0	17		Daino et al., 2009
HNRNPUL2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	0,35	1,90	10	5	2	0	0	0	17		
EMX2	empty spiracles homeobox 2	0,36	4,38	10	2	2	0	5	0	17		Hill et al., 2006
PCDH85	protocadherin beta 5	0,37	7,26	10	5	2	0	0	0	17		
HOXB3	homeobox B3	0,38	6,30	10	2	2	0	5	0	17		Chung et al., 2009
ZFPM2	zinc finger protein, multitype 2	0,38	2,18	10	5	2	0	0	0	17		
DGKI	diacylglycerol kinase, iota	0,39	9,04	10	5	2	0	0	0	17		
MTPN	myotrophin	0,39	1,40	10	5	2	0	0	0	17		
KRT18	keratin 18	0,21	4,38	10	5	5	0	0	0	15		
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	0,21	7,26	10	5	5	0	0	0	15		
CNTNAP3B	contactin associated protein-like 3B	0,24	2,18	10	5	5	0	0	0	15		
EPHA3	EPH receptor A3	0,25	7,26	10	5	5	0	0	0	15		
SLC24A3	solute carrier family 24, member 3	0,25	9,04	10	5	5	0	0	0	15		
SIgLEC15	sialic acid binding Ig-like lectin 15	0,25	4,38	10	5	5	0	0	0	15		
LNXI	ligand of numb-protein X 1	0,25	5,70	10	5	5	0	0	0	15		
EMB	embigin homolog	0,26	4,38	10	5	5	0	0	0	15		
CARD6	caspase recruitment domain family, member 6	0,27	1,20	10	5	5	0	0	0	15		
NLGN1	neuroligin 1	0,28	6,30	10	5	5	0	0	0	15		
DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	0,28	2,46	10	5	5	0	0	0	15		
CMMPK2	cytidine monophosphate kinase 2, mitochondrial	0,29	9,04	10	5	5	0	0	0	15		



	molecule-like	0.32	1,09	1	5	5	0	0	0	0	0	11
<i>NUDCD2</i>	NudC domain containing 2	0.32	1,09	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>SEMA3F</i>	sema domain, immunoglobulin domain (lg), short basic domain, secreted, 3F	0.40	8,24	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>CDNF</i>	cerebral dopamine neurotrophic factor	0.40	9,04	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>CYP27C1</i>	cytochrome P450, family 27, subfamily C, polypeptide 1	0.40	6,30	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>GINS1</i>	GINS complex subunit 1	0.40	3,90	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>CKS2</i>	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	0.41	1,20	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>CEP55</i>	centrosomal protein 55kDa	0.41	4,93	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>DLGAP5</i>	discs, large homolog-associated protein 5	0.43	4,93	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>KCNQ5</i>	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5	0.43	9,04	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>NUF2</i>	NDC80 kinetochore complex component, homolog	0.44	3,90	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>ABHD3</i>	abhydrolase domain containing 3	0.44	7,26	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>COPG2</i>	coatomer protein complex, subunit gamma 2	0.45	3,54	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>NDP</i>	Norrie disease	0.45	7,26	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>ITFG2</i>	integrin alpha FG-GAP repeat containing 2	0.45	9,04	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>PLCD4</i>	phospholipase C, delta 4	0.46	9,04	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>FRMD5</i>	FERM domain containing 5	0.46	9,04	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>FKBP1B</i>	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa	0.46	4,38	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>SHCBP1</i>	SHC SH2-domain binding protein 1	0.46	4,93	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>FAM83D</i>	family with sequence similarity 83, member D	0.46	9,04	10	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>PBK</i>	PDZ binding kinase	0.47	7,26	10	0	0	0	0	0	0	0	10

## 8.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%	Prozent
∅	Durchschnitt, Mittelwert
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
d	Tag
dA	Desoxyadenosin
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppel-destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Desoxythymidin
E.coli	Escherichia coli
et al.	<i>et alia</i> , und andere
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O bidest.	Bidestilliertes Wasser
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle(n)
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
J.	Alter des Spenders in Jahren
kb	Kilobasen
l	Liter
m	männlich
M	Molar
mA	Milliampere
μF	Microfarad
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mm	millimeter
mM	Millimolar
M-MLV	Murines Leukämievirus
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
N	Anzahl
OD	Optische Dichte
P	Passage

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii
Poly(A)	Poly-Adenin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Px	Letzte Passage
Q-PCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
u.a.	Unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ $\mu$ l	Units per microliter (Einheiten pro Mikroliter)
UV	ultraviolett
w	weiblich
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau des Lamellenknochens .....	3
Abb. 2 Induktion der Osteoklastogenese .....	4
Abb. 3 Kontrolle des Knochenumbaus .....	6
Abb. 4 Einleitung des Zellzyklusarrestes in G <sub>1</sub> bzw. G <sub>2</sub> durch P16/RB- bzw. P53/P21-Signalwege .....	16
Abb. 5 Vektorkarte von pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/ V5-His TOPO® .....	35
Abb. 6 Vektorkarte pcDNA <sup>TM</sup> 3.1 (+) und (-) .....	35
Abb. 7 Sequenz von SAA1, die für Klonierung in pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/ V5-His TOPO® verwendet wurde .....	45
Abb. 8 Sequenz von SAA2, die für Klonierung in pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/ V5-His TOPO® verwendet wurde .....	45
Abb. 9 Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von Probsets mit Relevanz im NOTCH-Signalweg in hMSC-K und hMSC-alt. ....	55
Abb. 10 Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in hMSC-alt im Vergleich zu hMSC-K. ....	56
Abb. 11 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-alt beim Vergleich mit hMSC-K. ....	57
Abb. 12 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tab. 9 zur biologischen Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur <i>in-vivo</i> -Alterung von hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie. ....	59
Abb. 13 Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von hMSC-K und hMSC-alt. ....	60
Abb. 14 Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in seneszenten hMSC nach Vergleich mit hMSC-K. ....	60
Abb. 15 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-seneszent beim Vergleich mit hMSC-K. ....	61
Abb. 16 Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von hMSC-K und hMSC-seneszent. ....	64
Abb. 17 Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten nach Vergleich mit hMSC-K. ....	65
Abb. 18 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-OP beim Vergleich mit hMSC-K. ....	66
Abb. 19 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tab. 11 zur biologischen Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zu osteoporotischen hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie. ....	68
Abb. 20 Heatmap der Mikroarray-Hybridisierungssignale von hMSC-K und hMSC-seneszent. ....	68
Abb. 21 Venn-Diagramme des Vergleichs der differentiell exprimierten Genprodukte der SAM-Analysen zu hMSC-alt, hMSC-seneszent und hMSC-OP. ....	69
Abb. 22 Venn-Diagramm der Mikroarray-Ergebnisse zur differentiellen Genexpression in hMSC-OP aus Osteoporose-Patienten nach Vergleich mit hMSC-K und Abzug der Alters-bedingten Genexpressionsänderung. ....	75
Abb. 23 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO)-Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte in hMSC-OP beim Vergleich mit hMSC-K nach Abzug der Alters-assoziierten Gene, die in hMSC-alt ebenfalls differentiell exprimiert werden. ....	75
Abb. 24 Wachstumskurve von hMSC in Kultur. ....	77
Abb. 25 Nachweis des Seneszenz-Marker P16 in <i>in-vitro</i> -gealterten hMSC. ....	78
Abb. 26 Analyse der einzelnen Passagen von hMSC614 im Verlauf der <i>in-vitro</i> -Alterung mit Hilfe von Seneszenz-Markern. ....	79
Abb. 27 Analyse der einzelnen Passagen von hMSC625 im Verlauf der <i>in-vitro</i> -Alterung mit Hilfe von Seneszenz-Markern. ....	80
Abb. 28 Osteogene Differenzierung von hMSC und hMSC-TERT mit rekombinantem, humanem SAA1 .....	85
Abb. 29 Auswirkung der Überexpression von SAA1 bzw. SAA2 auf hMSC-TERT. ....	87
Abb. 30 Osteogene Differenzierung und Serumentzug von hMSC stabil transfiziert mit SAA1 und SAA2. ....	88
Abb. 31 Expressionsmuster ausgewählter Gene im Verlauf der <i>in-vitro</i> -Alterung von 5 hMSC-Populationen. ...	90
Abb. 32 Schematische Zusammenfassung der Daten zur Genexpression im Verlauf der <i>in-vitro</i> -Alterung. ....	91
Abb. 33 Immunocytochemischer Nachweis von HELLS in hMSC-TERT. ....	92
Abb. 34 Densitometrische Auswertung der semi-quantitativen PCR zur <i>MAB21L2</i> -Genexpression in hMSC aus Spendern mittleren Alters, älteren und Osteoporose-Patienten. ....	95
Abb. 35 Semi-quantitative PCR zur <i>SOST</i> -Expression in hMSC aus Spendern mittleren Alters, älteren und Osteoporose-Patienten. ....	96
Abb. 36 Osteogene Differenzierung von hMSC-OP und hMSC-alt. ....	96

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Liste der verwendeten Primer für semi-quantitative PCR.....	31
Tab. 2 Liste der verwendeten Primer für Sequenzierungs-PCR .....	33
Tab. 3 Liste der verwendeten Primärantikörper.....	33
Tab. 4 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	34
Tab. 5 Bedingungen für semi-quantitative PCR im Thermocycler .....	41
Tab. 6 Bedingungen für Sequenzierungs-PCR im Thermocycler .....	43
Tab. 7 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE .....	50
Tab. 8 Für Microchip-Hybridisierung verwendete RNA-Proben .....	53
Tab. 9 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zur <i>in-vivo</i> -Alterung von hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie .....	58
Tab. 10 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zu seneszenten hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie .....	62
Tab. 11 Biologische Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse zu osteoporotischen hMSC mittels semi-quantitativer PCR und Densitometrie .....	67
Tab. 12 Überrepräsentierte Gen Ontologie (GO)-Gruppen der differentiellen Genexpression, die sich in 2 bzw. 3 SAM-Analysen überlappen .....	71
Tab. 13 Einteilung differentiell exprimierter Gene aus den SAM-Ergebnissen zu hMSC-OP, hMSC-alt und hMSC-seneszent in funktionelle Gruppen .....	72
Tab. 14 Punktevergabe für Höhe des Foldchange (FC) in SAM von hMSC-seneszent versus hMSC-K .....	81
Tab. 15 Rangliste der besten 50 Kandidatengene für die Seneszenz in hMSC .....	82
Tab. 16 Ergebnisse der densitometrischen Auswertung von semi-quantitativen PCR-Analysen zur Expression von SAA1 und SAA2 in hMSC in Px nach <i>in-vitro</i> -Alterung im Vergleich zu P1.....	84
Tab. 17 Punktevergabe für Höhe des Foldchange (FC) in SAM von hMSC-OP versus hMSC-K.....	93
Tab. 18 Rangliste der besten 50 Kandidatengene für osteoporotische hMSC.....	93
Tab. 19 Differentiell exprimierte Genprodukte mit Relevanz im NOTCH-Signalweg aus der SAM zu hMSC-alt inklusive Hybridisierungssignale.....	140
Tab. 20 Überlappend, differentiell exprimierte Genprodukte aus den SAM von hMSC-alt, hMSC-seneszent und hMSC-OP .....	142
Tab. 21 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (3381) in hMSC-alt .....	156
Tab. 22 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (1426) in hMSC-alt .....	160
Tab. 23 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (2477) in hMSC-seneszent .....	162
Tab. 24 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (1284) in hMSC-seneszent ..	164
Tab. 25 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (995) in hMSC-OP nach Abzug der Alters-assoziierten Genexpressionsänderungen.....	166
Tab. 26 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (1478) in hMSC-OP nach Abzug der Alters-assoziierten Genexpressionsänderungen.....	168
Tab. 27 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (42) in hMSC-OP, hMSC-alt und hMSC-seneszent.....	172
Tab. 28 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (354) in hMSC-alt und hMSC-seneszent.....	174
Tab. 29 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (98) in hMSC-OP und hMSC-alt.....	174
Tab. 30 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (89) in hMSC-OP und hMSC-alt .....	175
Tab. 31 Überrepräsentierte GO-Gruppen der geringer exprimierten Genprodukte (180) in hMSC-OP und hMSC-seneszent.....	175
Tab. 32 Überrepräsentierte GO-Gruppen der höher exprimierten Genprodukte (50) in hMSC-OP und hMSC-seneszent.....	177
Tab. 33 Rangliste der besten 200 Kandidatengene für die Seneszenz in hMSC inklusive Literatur-Referenzen .....	178
Tab. 34 Rangliste der besten 200 Kandidatengene für die Osteoporose in hMSC inklusive Literatur-Referenzen .....	183

## 8.5 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

### Originalarbeiten:

Li YM, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Limbert C, Seufert J, Kassem M, Schütze N, Jakob F, Ebert R (2007) Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 363(1):209-15.

Limbert C, Ebert R, Schilling T, Path G, Benisch P, Klein-Hitpass L, Seufert J, Jakob F (2010) Functional signature of human islet-derived precursor cells compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 19(5):679-91

Nanda I, Benisch P, Fetting D, Haaf T, Schmid M (2011) Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1-10 in different avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. *Cytogenet Genome Res.* 132(3):165-81

### Übersichten:

Jakob F, Limbert C, Schilling T, Benisch P, Seefried L, Ebert R. (2008) Biology of mesenchymal stem cells. *Curr Rheumatol Rev.* 4:148-154

Jakob F, Benisch P, Klotz B, Seefried L, Mentrup B, Raaijmakers N, Ebert R, Hofbauer LC (2010) Sexualsteroid in der Homöostase des Knochens. *Osteologie* 19(2):105-110

Jakob F, Benisch P, Ebert R, Seefried L, Schieker M, Ignatius A (submitted) Zelluläre Defekte und Regulationsstörungen bei der Heilung osteoporotischer Frakturen. *Osteologie* 1/2011

### Posterpräsentationen:

Benisch P, Schilling T, Klein-Hitpass L, Kassem M, Jakob F, Ebert R (2008) *In vitro*-gealterte mesenchymale Stammzellen des Menschen als Seneszenz-Modell im Vergleich mit Telomerase-immortalisierten Stammzellen. *Osteologie 2008, Hannover*

Benisch P, Schilling T, Klein-Hitpass L, Kassem M, Jakob F, Ebert R (2008) Gene Expression Analysis of *In-vitro*-Aged and Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells. *ASBMR 30th Annual Meeting, Montreal, Kanada*

Benisch P, Seefried L, Klein-Hitpass L, Frey S, Jakob F, Ebert R (2009) Mikroarray-Untersuchungen zeigen relevante Veränderungen im Transkriptom von hBM-MSC aus Patienten mit Osteoporose. *Osteologie 2009, Frankfurt a. M.*

Benisch P, Seefried L, Klein-Hitpass L, Frey S, Jakob F, Ebert R (2009) Mikroarray Analyses reveal relevant Differences in the Transcriptome of hBM-MSC of Patients with Osteoporosis. *36th Meeting of the European Calcified Tissue Society of the ECTS, Wien, Österreich*

Benisch P, Zeck S, Meißner-Weigl, Schneider D, Regensburger M, Kober M, Kassem M, Ebert R, Jakob F (2010) Acute-phase Serum Amyloid A enhances mineralization processes and cellular senescence in mesenchymal stem cell populations *in vitro*. *ASBMR 32th Annual Meeting, Toronto, Kanada*



Vorträge:

Benisch P (2010) SAA ist ein Marker der zellulären Seneszenz und stimuliert die Mineralisierung während der osteogenen Differenzierung in hMSC. Osteologie 2010. Berlin

Benisch P, Jakob F. (2010) Stammzelldefekte bei Osteoporose des Menschen. 6. Internationales Forum: Knochen und Muskeln – Neue Welten. Würzburg

## 8.6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Orthopädischen Klinik in Würzburg im Orthopädischen Zentrum für muskuloskeletale Forschung durchgeführt. Hiermit möchte ich mich bei allen Kollegen als auch beim medizinischen Personal bedanken.

Mein besonderer Dank geht an den Leiter des Forschungszentrums und gleichzeitig meinen Betreuer Prof. Dr. Franz Jakob. Vielen Dank für die Vergabe des überaus interessanten und vielschichtigen Themas, sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen. Ich bin ebenfalls dankbar, dass Sie mir so oft ermöglichten meine Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen präsentieren zu können. Mein größter Dank gilt jedoch Ihrem steten Vertrauen in meine Person und meine Fähigkeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Krohne für die Übernahme der fachinternen Zweitbegutachtung meiner Dissertation bedanken.

Ein weiterer Dank geht an das OP-Personal und insbesondere an Dr. Lothar Seefried aus der Orthopädischen Klinik und Dr. Sönke Frey aus der Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie Würzburg für die stete Versorgung mit Patientenmateriel zur Isolierung von primären Stammzellen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass und seiner Arbeitsgruppe von der Universität Duisburg-Essen für die Durchführung der Mikroarray-Hybridisierungen und die SAM-Berechnungen bedanken. Vielen Dank auch an Dr. Regina Ebert und Dr. Tatjana Schilling für die geduldige Einführung in die Auswertung von Mikroarray-Daten.

Ein großes Dankeschön gilt auch dem gesamten Laborteam: Barbara Klotz, Nadja Raaijmakers, Christine Beck, Sigrid Müller-Deubert, Melanie Kober, Jutta Meißner-Weigl, Birgit Mentrup, Catarina Limbert, Martina Regensburger, Doris Schneider, Johannes-Nils Walther, Doris Hetzer, Anne Pratz, Stefanie Stoll und Sabine Zeck. Danke für eure Geduld, eurer Wissen und für die angenehme Gestaltung des Laboralltags. Danke an alle Wissenschaftler für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen. Ein besonderer Dank geht an Luisa-Astrid Fratila, die mit ihrer Diplomarbeit entscheidend zum Entstehen der Arbeit beigetragen hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich nochmals bei Barbara Klotz für die unermüdliche Zweitkorrektur dieser Dissertation.

Weiterer Dank geht an die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Norbert Schütze und Dr. André Steinert für ihre Hilfsbereitschaft und Kooperation in allen Belangen.

Danke auch an Fr. Monika Hofman für ihre Hilfe in allen organisatorischen Angelegenheiten.

Im privaten Bereich möchte ich mich vor allem bei meinen Freunden bedanken, insbesondere Karin Moll, ohne deren Unterstützung und Ermutigung diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich immer meinen Weg gehen ließen und mir dieses Studium durch Unterstützung und Vertrauen ermöglicht haben. Ihr wart schon immer weniger überrascht über meine Erfolge als ich. Danke dafür!