

# **Die Rolle der Modulatoren 1,25-Dihydroxyvitamin D3, Aktivin A, Myostatin und der Sauerstoffspannung bei der Schlüsselentscheidung zwischen Stemness und Morphogenese**

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

vorgelegt von

**Barbara Klotz**

geboren in Miltenberg

Würzburg, 2012

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: ..... Prof. Dr. Wolfgang Rössler

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, 25.07.2012

.....

Barbara Klotz



# INHALTSVERZEICHNIS

1-2	1	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>
3-4	2	<b>SUMMARY</b>
5-34	3	<b>EINLEITUNG</b>
5	3.1	<b>Knochen</b>
5	3.1.1	Geweberemodellierung des Knochens (bone remodeling)
6	3.1.2	Aufbau und Entstehung des Knochens
7	3.1.3	RANK-, RANKL- und OPG-Signalweg
9	3.1.4	Wnt-Signalweg
10	3.1.4.1	Interaktion zwischen Wnt- und RANK/RANKL/OPG-Signalwegen
11	3.1.5	PTH-Signalweg
11	3.1.6	BMP-Signalweg
12	3.1.7	FGF-Signalweg
13	3.1.8	Sexualhormone, Wachstumshormone und IGF1
14	3.1.9	Mesenchymale Stammzellen
15	3.2	<b>Alterung</b>
15	3.2.1	Die Theorie der freien Radikale
16	3.2.2	Die mitochondriale Theorie des Alterns
17	3.2.3	Immunseneszenz
18	3.2.4	Zelluläres Altern
20	3.2.4.1	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und Alterung
21	3.3	<b>Das Vitamin D-endokrine System</b>
21	3.3.1	Synthese und Metabolismus von 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3)
22	3.3.2	Relevanz von 1,25D3 im menschlichen Organismus
24	3.3.3	1,25D3 und Alterung
24	3.3.4	1,25D3 und Stammzellen
24	3.3.5	Vitamin D-assoziierte Erkrankungen
25	3.4	<b>Die TGF<math>\beta</math>-Familie</b>
26	3.4.1	Aktivin und Myostatin als Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie
26	3.4.1.1	Aktivin
28	3.4.1.1.1	Aktivin und Stammzellen
28	3.4.1.1.2	Aktivin und Knochen
29	3.4.1.2	Myostatin
30	3.4.1.2.1	Myostatin und Stammzellen
31	3.4.1.2.2	Myostatin und Knochen
31	3.4.1.3	Natürliche Aktivin und Myostatin Antagonisten
32	3.4.1.4	Therapeutische Aktivin und Myostatin Antagonisten
33	3.5	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>
35-44	4	<b>MATERIAL</b>
35	4.1	<b>Geräte</b>
36	4.2	<b>Verbrauchsmaterial</b>
36	4.3	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>
38	4.4	<b>Kits</b>
38	4.5	<b>Primer für die semi-quantitative RT-Polymerase-Kettenreaktion</b>
40	4.6	<b>Rekombinante humane Proteine</b>
40	4.7	<b>Antikörper</b>
41	4.8	<b>Enzyme</b>
41	4.9	<b>Nährmedien und Zusätze für die Gewebekultur</b>
42	4.10	<b>Puffer und Lösungen</b>
44	4.11	<b>Software und Internet-Seiten</b>
45-63	5	<b>METHODEN</b>
45	5.1	<b>Zellbiologische Methoden</b>

45	5.1.1	Isolierung von hMSC
46	5.1.2	Kultivierung von hMSC
46	5.1.3	Kryokonservierung von hMSC
47	5.1.4	Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität
47	5.1.4.1	<i>In vitro</i> Alterung von hMSC
48	5.1.4.2	Analyse der Zellwachstumsrate
48	5.1.5	Verwendung von 1,25D3 in der Zellkultur
48	5.1.5.1	Retransformation der 1,25D3 kultivierten Zellen
49	5.1.6	Verwendung von rekombinanten Proteinen in der Zellkultur
49	5.1.7	Verwendung von Low Oxygen Bedingungen in der Zellkultur
50	5.1.8	Colony Forming Unit Assay
50	5.1.9	Proliferations und Apoptose Assay
50	5.1.9.1	Proliferations Assay
51	5.1.9.2	Apoptose Assay
51	5.1.9.3	Proliferations und Apoptose Assay von stimulierten und unstimulierten hMSC
52	5.1.10	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung
53	5.1.11	Durchflusszytometrische Zellanalyse des oxidativen Stresses
54	5.1.12	<i>In vitro</i> Differenzierung der hMSC
54	5.1.12.1	Chondrogene Differenzierung
55	5.1.12.2	Adipogene Differenzierung
55	5.1.12.3	Osteogene Differenzierung
56	<b>5.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>
56	5.2.1	Isolierung von zellulärer RNA
57	5.2.2	Synthese der cDNA mittels Reverser Transkriptase
57	5.2.3	Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion
58	5.2.4	Agarose-Gelelektrophorese
59	5.2.5	Densitometrie
60	5.2.6	Photometrische Analysen
60	<b>5.3</b>	<b>Proteinbiologische Methoden</b>
60	5.3.1	Nachweis von Proteinen mittels immunzytochemischer Färbung
61	<b>5.4</b>	<b>Zytochemische Methoden</b>
61	5.4.1	Alcianblau-Färbung
61	5.4.2	Ölrot-O-Färbung
61	5.4.3	Alizarin Rot S-Färbung
62	5.4.4	Alkalische Phosphatase Färbung
62	5.4.5	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galactosidase Färbung
63	<b>5.5</b>	<b>Statistik</b>
63	<b>5.6</b>	<b>Nomenklatur der Gene und Proteine</b>
<b>64-100</b>	<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>
64	<b>6.1</b>	<b>Der Einfluss von 1,25D3 auf hMSC</b>
64	6.1.1	Das Expressionsniveau 1,25D3-responsiver Gene in hMSC
65	6.1.2	Immunphänotyp von 1,25D3 behandelten und 1,25D3 unbehandelten hMSC
67	6.1.3	Klonogene Kapazität von 1,25D3 behandelten und 1,25D3 unbehandelten hMSC
67	6.1.4	Kurzzeit-Einflüsse von 1,25D3 auf Proliferation und Apoptose von hMSC
68	6.1.5	Analyse der Wachstumsrate von permanent 1,25D3 supplementierten hMSC
71	6.1.6	Morphologische Charakteristika von 1,25D3 behandelten hMSC
71	6.1.7	Retransformation von 1,25D3 behandelten hMSC
73	6.1.8	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galactosidase Aktivität in 1,25D3 kultivierten hMSC
73	6.1.9	Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in 1,25D3 behandelten hMSC
74	6.1.10	Einfluss der 1,25D3 Supplementierung auf die Differenzierungskapazität von hMSC
78	6.1.11	Einfluss von 1,25D3 auf die Expression von Seneszenz-Markern
79	6.1.12	Einfluss von 1,25D3 auf die Expression von Quieszenz-assoziierten Markern
80	<b>6.2</b>	<b>Der Einfluss von rekombinantem humanen (rh) Aktivin A und rh Myostatin auf hMSC</b>
80	6.2.1	Signaltransduktion von rh Aktivin A und rh Myostatin in hMSC
80	6.2.2	Immunphänotyp von rh AA und rh MSTN behandelten hMSC
83	6.2.3	Klonogene Kapazität von rh AA und rh MSTN stimulierten hMSC

83	6.2.4	Der Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die mesenchymale Differenzierungskapazität von hMSC
84	6.2.4.1	Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die adipogene Differenzierungskapazität in hMSC
85	6.2.4.2	Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die osteogene Differenzierungskapazität in hMSC
87	6.2.5	Kurzzeit-Einflüsse von rh AA und rh MSTN auf Proliferation und Apoptose von hMSC
89	<b>6.3</b>	<b>Der Einfluss von Low Oxygen (LO) auf hMSC</b>
90	6.3.1	Immunphänotyp von LO behandelten und unbehandelten hMSC
91	6.3.2	Analyse der Wachstumsrate von Langzeit LO kultivierten hMSC
92	6.3.3	Analyse des Expressionsmusters ausgewählter Gene in LO kultivierten hMSC
93	6.3.4	Kurzzeit Einflüsse einer LO Kultivierung auf das Genexpressionsmuster von Stemness-assoziierten und Seneszenz-assoziierten Genen in hMSC
95	6.3.5	Langzeit Einflüsse einer LO Kultivierung auf das Genexpressionsmuster von Stemness-assoziierten und Seneszenz-assoziierten Genen in hMSC
97	6.3.6	Proteinexpression in LO kultivierten hMSC
97	6.3.6.1	OCT4 Proteinexpression in LO expandierten hMSC
98	6.3.6.2	P16 Proteinexpression in Langzeit LO expandierten hMSC
99	<b>6.4</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>
<b>101-131</b>	<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>
<b>101</b>	<b>7.1</b>	<b>Die permanente 1,25D3 Kultivierung verzögert die zelluläre Alterung in hMSC bei gleichzeitigem Erhalt der multipotenten Kapazität</b>
<b>101</b>	7.1.1	Die 1,25D3 Signaltransduktion in hMSC ist gewährleistet
<b>102</b>	7.1.2	Eine 1,25D3 Supplementation erhält den mesenchymalen Stammzellcharakter
<b>103</b>	7.1.3	1,25D3 induzierte morphologische Veränderungen des hMSC Phänotyps sind teilweise reversibel
<b>103</b>	7.1.4	Auswirkungen von 1,25D3 auf basale Zellfunktionen der hMSC
<b>103</b>	7.1.4.1	Die kurzzeitige 1,25D3 Stimulation verringert Proliferation und Apoptose
<b>105</b>	7.1.4.2	Die permanente 1,25D3 Supplementation verzögert die Wachstumsrate der hMSC
<b>106</b>	7.1.5	1,25D3 Supplementation verzögert die Entstehung replikativer Seneszenz
<b>107</b>	7.1.5.1	1,25D3 Kultivierung beeinflusst die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in hMSC
<b>108</b>	7.1.5.2	1,25D3 Supplementation verringert die SA-β-Gal Aktivität in hMSC
<b>108</b>	7.1.6	Versetzt die permanente 1,25D3 Supplementation die hMSC in einen quieszenten Zustand?
<b>109</b>	<b>7.2</b>	<b>Rh AA und rh MSTN unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf hMSC</b>
<b>110</b>	7.2.1	Eine AA und MSTN Signaltransduktion in hMSC ist möglich
<b>110</b>	7.2.2	Die rh AA und rh MSTN Stimulation erhält die mesenchymalen Oberflächenmarker und die klonogene Kapazität
<b>111</b>	7.2.3	Differente Effekte von rh MSTN und rh AA auf die Differenzierungskapazität der hMSC
<b>111</b>	7.2.3.1	Rh MSTN erhält die Differenzierungskapazität in hMSC
<b>113</b>	7.2.3.2	Rh AA hält die hMSC in einem undifferenzierten Zustand fest
<b>115</b>	7.2.4	Der Einfluss von rh AA und rh MSTN auf Proliferation und Apoptose in hMSC
<b>115</b>	7.2.4.1	Die rh AA und rh MSTN Stimulation beeinflusst die Proliferation in hMSC nicht
<b>116</b>	7.2.4.2	Eine rh AA und rh MSTN Stimulation beeinflusst die Apoptose in hMSC nicht
<b>117</b>	<b>7.3</b>	<b>Der Einfluss von LO auf hMSC</b>
<b>118</b>	7.3.1	Die LO Kultivierung hält den mesenchymalen Stammzellcharakter in einem Zustand der Reprogrammierung fest
<b>118</b>	7.3.1.1	Die LO Kultivierung erhält die Expression mesenchymaler Oberflächenmarker und die klonogene Kapazität in hMSC
<b>119</b>	7.3.1.2	Die LO Kultivierung hält die hMSC in einem undifferenzierten Zustand fest
<b>119</b>	7.3.2	Die LO Kultivierung fördert die Wachstumsrate der hMSC
<b>120</b>	7.3.3	Die LO Kultivierung verändert das Expressionsmuster ausgewählter Gene

<b>123</b>		7.3.4	Auswirkung der LO Kultivierung auf Stemness und Seneszenz
<b>123</b>		7.3.4.1	Die LO Kultivierung erhält die OCT4 Proteinexpression
<b>123</b>		7.3.4.2	Kurzzeit LO Kultivierung erhöht die Expression von Stemness-assoziierten Markern
<b>127</b>		7.3.4.3	Langzeit LO Kultivierung verstärkt die OCT4-Expression und inhibiert die PSG1-Expression als Seneszenz-assoziiertes Gen
<b>128</b>		7.3.4.4	LO expandierte hMSC zeigen keine P16 Proteinexpression in der letzten, seneszenten Passage
<b>129</b>	<b>7.4</b>		<b>Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick</b>
<b>132-155</b>	<b>8</b>		<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>
<b>156-162</b>	<b>9</b>		<b>ANHANG</b>
<b>156</b>	<b>9.1</b>		<b>Abkürzungen</b>
<b>158</b>	<b>9.2</b>		<b>Abbildungsverzeichnis</b>
<b>159</b>	<b>9.3</b>		<b>Tabellenverzeichnis</b>
<b>160</b>	<b>9.4</b>		<b>Veröffentlichungen und Kongressbeiträge</b>
<b>160</b>		9.4.1	Originalarbeiten
<b>160</b>		9.4.2	Übersichten
<b>160</b>		9.4.3	Kongressbeiträge
<b>162</b>	<b>9.5</b>		<b>Danksagung</b>



## ZUSAMMENFASSUNG

### 1 ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Knochenmark isolierte humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind als Vorläuferzellen der Osteoblasten an der Knochenformation sowie an der Knochenremodellierung beteiligt und aufgrund ihrer Multipotenz in der Lage, in mesenchymales Gewebe (Knochen, Knorpel, Fett) zu differenzieren. Aufgrund dieser Eigenschaften gelten sie als Quelle der Regeneration und der Heilung im Hinblick auf zellbasierte Therapien zur Behandlung degenerativer Erkrankungen (Arthrose, Osteoporose) des muskuloskelettalen Systems. Die besondere Situation der Geweberegeneration beim älteren Menschen ist gekennzeichnet durch den Anstieg der Produktion von Hemmstoffen der Geweberegeneration und durch verschiedene häufige Mangelzustände wie z.B. den Vitamin D-Mangel.

In der vorliegenden Arbeit wurden Modulatoren (Morphogene) untersucht, die in der Lage sind, die hMSC *in vitro* in ihrem proliferativen, undifferenzierten Zustand (transient amplifying pool) und am Übergang in die Differenzierung und Reifung zu beeinflussen. Ziel war es, durch die Charakterisierung solcher Modulatoren, Verfahren zu etablieren, die zu einer verbesserten Zellqualität bei regenerativen Therapiestrategien führen, sei es *in situ* oder beim Tissue Engineering. Der Fokus lag auf der Geweberegeneration beim älteren Menschen. Dafür wurden als Morphogene 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>), Aktivin A (AA), Myostatin (MSTN) und Low Oxygen (LO) ausgewählt und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf Stemness, Differenzierung und Seneszenzentwicklung in der Zellkultur getestet. Alle 4 Kandidaten nehmen im menschlichen Organismus wichtige regulatorische Aufgaben ein. 1,25D<sub>3</sub> wirkt nicht nur lokal auf Zellen und Gewebe, sondern mit der Mineralisierung des Knochens und der Regulierung des Kalzium- und Phosphatspiegels im Serum auch systemisch. AA und MSTN werden als Mitglieder der TGFβ-Familie mit dem muskuloskelettalen System in Verbindung gebracht, da eine Inaktivierung von MSTN bei Mensch und Tier zu einem deutlichen Anstieg der Skelettmuskelmasse führt. Gleichzeitig fördert ein Aktivin Antagonist, der neue Wirkstoff Sotatercept (ACE-011), die Knochenbildung im Menschen. Mit der Kultivierung der hMSC unter reduzierter Sauerstoffspannung (2,5 % Sauerstoff, LO) sollten Bedingungen in der Zellkultur geschaffen werden, die - im Vergleich zur traditionellen Kultivierung mit einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 21 % - näher an den physiologischen Gegebenheiten bei der Geweberegeneration sind. Zu Beginn wurde sichergestellt, dass alle 4 Modulatoren die Expression typischer mesenchymaler Oberflächenmarker nicht beeinflussten und die klonogene Kapazität der stimulierten hMSC erhielten. Im Rahmen weiterer Untersuchungen zeigte sich, dass eine permanente 1,25D<sub>3</sub> Supplementierung die chondrogene, adipogene und osteogene Differenzierungskapazität der hMSC erhielt und somit den Stammzellcharakter der hMSC nicht beeinträchtigte. Die verstärkte Expression der Quieszenz-assoziierten Gene in 1,25D<sub>3</sub>

## ZUSAMMENFASSUNG

stimulierten hMSC deutete darauf hin, dass sich die hMSC aufgrund der 1,25D3 Supplementation in Richtung Quieszenz verändern. Die permanente 1,25D3 Supplementation übt somit eine vor Alterungsprozessen schützende Wirkung in der Zellkultur aus, indem die Entwicklung replikativer Seneszenz verzögert wird und das multipotente Potential der hMSC erhalten wird. Im Bezug auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen verhielten sich rh AA und rh MSTN konträr. Während eine rh MSTN Stimulation keine Wirkung auf die adipogene und osteogene Differenzierung hatte, schränkte rh AA das adipogene und osteogene Differenzierungspotential der hMSC nahezu vollständig ein und die Zellen wurden in einem Zustand des Prä-Kommittments festgehalten. Da die LO Expandierung die Stemness erhöhte bzw. die Seneszenz reduzierte und die hMSC in einem proliferativen Zustand bei gleichzeitiger Hemmung der Differenzierung arretierte, scheint diese Art der Kultivierung ein besonderer Schutz für die hMSC zu sein.

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, wirksame Morphogene (1,25D3, rh AA, LO) zu finden, die in der Lage sind, modulatorisch auf die hMSC einzuwirken ohne dabei den Stammzellcharakter zu verändern. Durch ihre Modulation kann nicht nur die Qualität der hMSC verbessert werden, sondern je nach Bedarf können auch die verschiedenen Phasen der Geweberegeneration insbesondere beim Übergang vom „transient amplifying pool“ zur Differenzierung gesteuert werden. Diese Ergebnisse können Konsequenzen für die Anwendung haben, bei der *in situ* Geweberegeneration ebenso wie für das *ex vivo* Tissue Engineering.

## SUMMARY

### 2 SUMMARY

Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow are skeletal precursors which are actively involved in bone formation and remodeling. Being multipotent cells they can give rise to mesenchymal tissues such as bone, cartilage and adipose tissue. These attributes qualify them as a source of regeneration and healing with regard to treatment of degenerative diseases of the musculoskeletal system, e.g. osteoarthritis and osteoporosis. During aging the healing capacity generally decreases due to the enhanced production of inhibitors of tissue regeneration and also various deficiencies such as hypovitaminosis D.

In this thesis morphogenic modulators were characterized which are capable of influencing hMSC in their proliferative and undifferentiated phase (transient amplifying pool) and at the transition border of lineage commitment and maturation. The aim was to establish strategies which by modulating these factors enhance cell quality in regenerative therapeutic applications both *in situ* and in tissue engineering. The main focus was tissue regeneration in the elderly. The morphogens 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3), Activin A (AA), Myostatin (MSTN) and Low Oxygen (LO) were characterized with respect to their effects on stemness, differentiation and senescence development in cell culture. All four candidates have important regulatory tasks in the human organism. 1,25D3 has both local effects on cells and tissues and systemic effects on the regulation of bone mineralization and systemic calcium and phosphate levels. AA and MSTN, both members of the TGF $\beta$ -family of proteins, are linked to the musculoskeletal system since inactivation of MSTN in humans and animals causes enhanced muscle mass, while activin antagonists like Sotatercept (ACE-011) enhance both bone and muscle mass in animals and humans respectively. By cultivating cells in cell culture at low oxygen tension (2.5%, LO) the culture conditions were kept in a more physiological range for tissue regeneration when compared to a conventional culture at 21% oxygen. Typical mesenchymal surface markers and the clonogenic capacity were initially analyzed to exclude an influence of these morphogenic factors on the multipotent mesenchymal hMSC phenotype. Permanent culture under the influence of 1,25D3 did not impair the stemness character of hMSC, maintained their chondrogenic, adipogenic and osteogenic differentiation capacity. A trend towards enhanced expression of markers for quiescence during this treatment indicated a permissive effect towards quiescence development. In essence permanent culture in 1,25D3 exerts a defense against aging processes by delaying senescence development while maintaining the multipotent state. rh AA and rh MSTN were oppositional with respect to the differentiation capacity of hMSC. While rh MSTN was without influence on adipogenic and osteogenic differentiation *in vitro*, rh AA robustly inhibited the osteogenic and adipogenic differentiation potential, hence arrested cells in a state of pre-commitment. LO cell culture seemed to represent a special protection for hMSC since it enhanced

## SUMMARY

stemness, reduced senescence development, arrested cells in a highly proliferative pre-commitment state and inhibited differentiation. Overall in this work morphogens were characterized as active modulators of hMSC (1,25D3, rh AA, LO) which at the same time maintain their stem cell character.

This study has succeeded in finding effective morphogens (1,25D3, rh AA, LO) which are able to act as modulators on hMSC without changing their stem cell character. Using this modulation not only stem cell quality and expansion capacity may be enhanced but also various phases of tissue regeneration may be actively operated, especially the switch from the transient amplifying pool to differentiation and maturation. This may have consequences for *in situ* and *ex vivo* tissue regeneration and engineering.

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 | Knochen

Das menschliche Skelett verleiht dem Körper Gestalt und als Teil des Muskel/Skelettsystems ermöglicht es dem Menschen eine nahezu unendliche Vielfalt an Bewegungsvorgängen. Im Laufe des Lebens verändert sich das Skelett, das sich während der Kindheit und in den Jahren danach in einer Phase des Wachstums und der Knochenbildung befindet. Etwa ab dem 30. Lebensjahr beginnt ein langsamer gradueller Verlust der Knochendichte, der mit zunehmendem Alter dramatisch ansteigen kann und sich im ungünstigsten Fall in dem Krankheitsbild der Osteoporose manifestiert. Generell werden Knochen mit zunehmendem Alter spröde und dadurch auch brüchiger und der Heilungsprozess bei Knochenbrüchen dauert somit länger als bei jungen Menschen (Ho et al. 2005).

##### 3.1.1

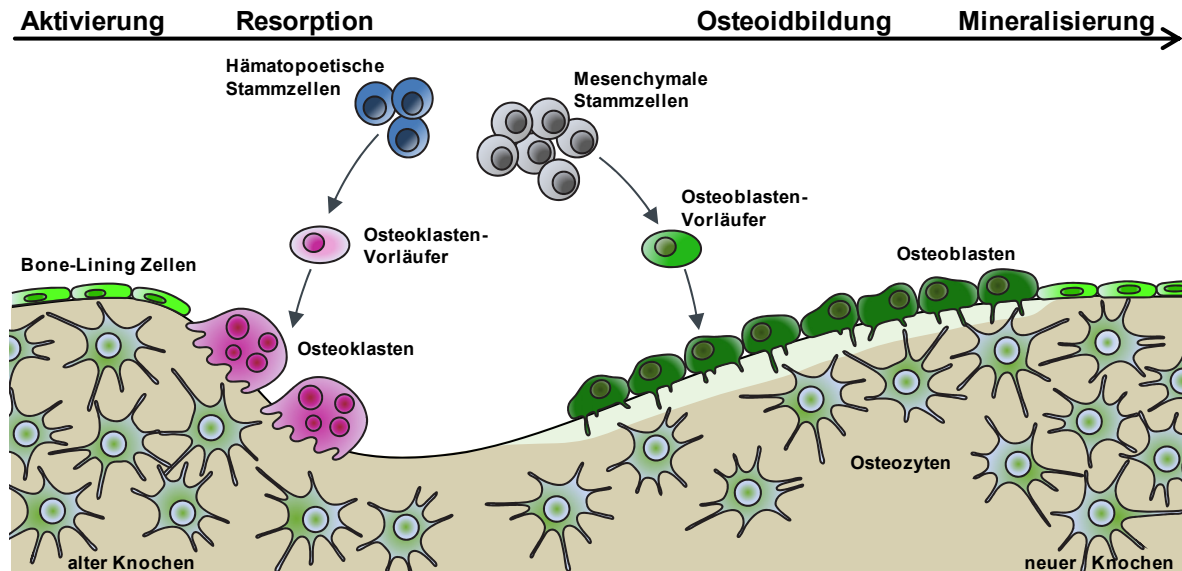
#### Geweberemodellierung des Knochens (bone remodeling)

---

Da Knochen kein starres Konstrukt ist, erfolgt im Laufe des Lebens fortwährend ein Umbau der Knochenmasse, der von knochenaufbauenden Zellen (Osteoblasten, Osteozyten) und knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten) moduliert wird (Soltanoff et al. 2009). Die multinukleären Osteoklasten gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor und sezernieren Salzsäure und Proteinase, dadurch entsteht ein saures Milieu. Auf diese Weise lösen sie hydroxyliertes Kalziumphosphatsalz, den Hauptbestandteil des Knochengewebes, auf und resorbieren somit bestehende Knochensubstanz (Vaananen and Laitala-Leinonen 2008). Die entstehenden Resorptionslakunen, sogenannte Howship-Lakunen, werden von den Osteoblasten daraufhin wieder durch die Synthese von Typ I Kollagenen, Fibronectin, Proteoglykanen und knochenspezifischen Proteinen wie beispielsweise Osteocalcin, Osteopontin oder Osteonectin aufgefüllt und eine neue unmineralisierte organische kollagene Knochenmatrix (Osteoid) entsteht. Durch die Sekretion von Hydroxylapatitkristallen durch reife Osteoblasten kalzifiziert das Osteoid im weiteren Verlauf und es wird neuer Knochen gebildet (Crockett et al. 2011). Die Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor und für diesen Differenzierungsprozess ist die Expression der Transkriptionsfaktoren RUNX2 (runt-related transcription factor 2) und OSX (osterix) unverzichtbar. Darüber hinaus sind im Rahmen des Differenzierungsvorgangs hin zu einem reifen Osteoblasten auch die Gene *ATF4* (activating transcription factor 4) sowie die *BMPs* (bone morphogenetic proteins), insbesondere *BMP4*, und der kanonische Wnt-Signalweg von Bedeutung (Ducy et al. 1997, Caetano-Lopes et al. 2007). Osteoblasten, die vollständig von einer mineralisierten Matrix umgeben sind, können entweder zu Osteozyten differenzieren oder in die Apoptose eintreten. An der Oberfläche

## EINLEITUNG

des mineralisierten Knochens entstehen aus den Osteoblasten sogenannte „Bone-Lining“ Zellen. Sie fungieren als eine Art Schranke für Kalzium-Ionen sowie als Initiator des Knochenumbauprozesses ( Franz-Odendaal et al. 2006, Bonewald 2011) (Abb. 1).



**Abb. 1 Knochenremodellierung.** Für das Gleichgewicht zwischen Resorption und Aufbau des Knochens ist das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten nötig. Nach (Long 2012).

### 3.1.2

#### Aufbau und Entstehung des Knochens

Der Knochen baut sich aus der Substantia spongiosa im Knocheninneren und der äußeren kompakten Schicht (Substantia compacta), die nach außen von der Knochenhaut (Periost) überzogen wird, auf. Im Knocheninneren ist das Knochenmark in dem schwammartigen Konstrukt feiner Knochenbälkchen der Substantia spongiosa gelegen und hier werden auch die Blutzellen produziert. Das Periost verfügt über Nerven und Blutgefäße und übernimmt dadurch eine versorgende Funktion bzw. verfügt über ein hohes Regenerationspotential. Knochen kann aus Bindegewebe (desmale Ossifikation) und aus Knorpelgewebe (enchondrale Ossifikation) entstehen. Nach der Genese des Knochens wird dabei zwischen platten Knochen wie beispielsweise Schädelknochen, die bei der desmalen Ossifikation gebildet werden, und lange Röhrenknochen, die aufgrund enchondraler Ossifikation entstehen, unterschieden. Während bei der desmalen Ossifikation das Knochengewebe direkt aus dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym) durch Verdichtung der mesenchymalen Zellen und anschließender Differenzierung zu Osteoblasten gebildet wird, entsteht bei der enchondralen

## EINLEITUNG

Ossifikation des Knorpelgewebes über eine knorpelartige Struktur, die anschließend durch Knochen und Knochenmark ersetzt wird. Im Verlaufe dieses Prozesses erfolgt zunächst die Kondensation mesenchymaler Zellen, die anschließend zu Chondrozyten differenzieren. Die stark proliferierenden Chondrozyten exprimieren Knorpel-Matrixgene wie z.B. Aggrecan (*ACAN*), Typ II Kollagen (*COL2A1*) und Typ IV Kollagen (*COL4A6*). Ausgehend von der Mitte stellen die Chondrozyten anschließend ihre Proliferation ein, vergrößern ihr Volumen, erzeugen eine Knorpelmatrix und differenzieren zu hypertrophen Chondrozyten, die schließlich apoptotisch werden. Gleichzeitig wandern Blutgefäße in die Knorpelmatrix ein, die nun von Osteoklasten abgebaut wird, und Osteoblasten-Vorläufer bilden zusammen mit Osteoblasten die primäre Spongiosa, die als Vorstufe von Knochenmark und trabekulärem Knochen angesehen wird (Colnot et al. 2004, Hojo et al. 2010).

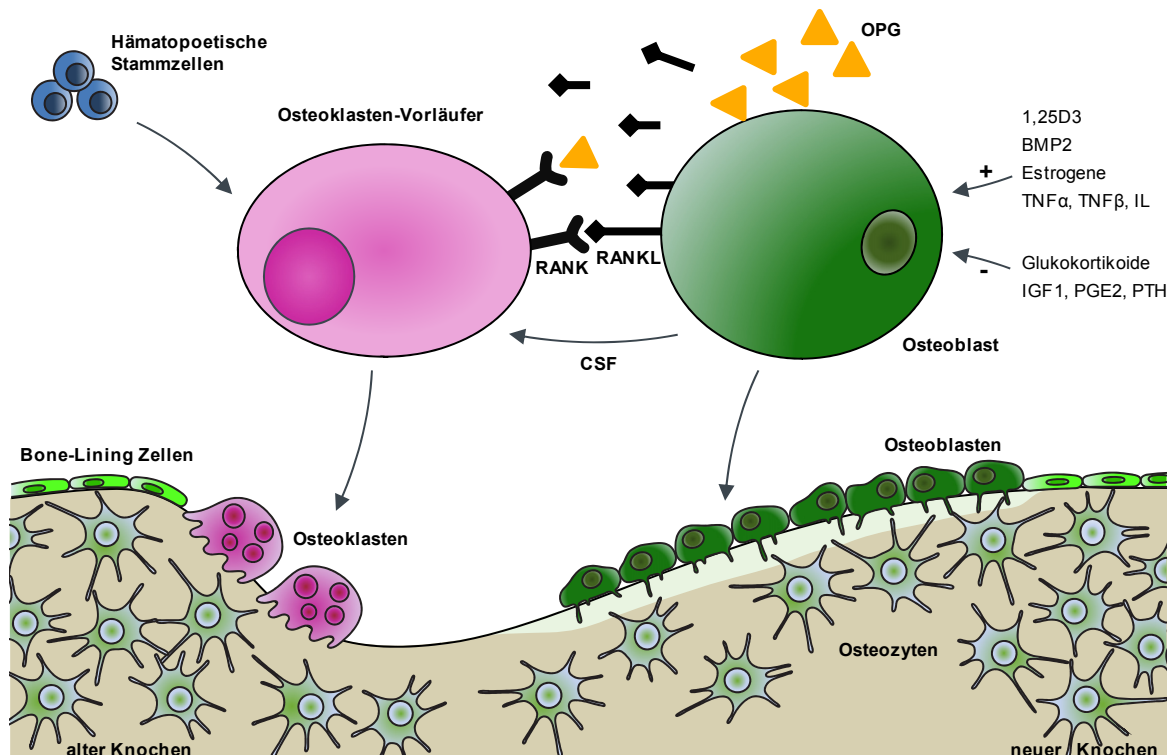
### 3.1.3

#### **RANK-, RANKL- und OPG-Signalweg**

Der RANKL/RANK/OPG-Signalweg übernimmt im Verlaufe der Geweberemodellierung des Knochens eine Schlüsselfunktion. Osteoblasten, aber auch Immunzellen und einige bösartige Tumorzellen, synthetisieren den Liganden RANKL (receptor activator of nuclear factor kappaB ligand) (Tat et al. 2009), der durch Bindung an den RANK (receptor activator of nuclear factor-kappa B) Rezeptor auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläufer aktivierend und somit stimulierend auf die Knochenresorption wirkt (Abb. 2). Die 3 vorliegenden Isoformen (RANKL 1, 2, 3) von RANKL werden als membrangebundenes Protein auf Osteoblasten synthetisiert und durch Metalloproteasen in eine lösliche Form gespalten. Verglichen mit der membrangebundenen Form hat die lösliche Form eine niedrigere Kapazität, Osteoklasten-Vorläufer zu aktivieren und dadurch die Ausdifferenzierung zu Osteoklasten zu induzieren (Nakashima et al. 2000). Zusätzlich stimuliert der colony stimulating factor (CSF), der von Osteoblasten exprimiert und sezerniert wird, die Proliferation der Osteoklasten-Vorläufer sowie ihre Differenzierung zu reifen Osteoklasten (Sims and Gooi 2008). Die Bindung von RANKL an RANK aktiviert mehrere intrazelluläre Signaltransduktionswege. Unter anderem wird der tumor necrosis factor (TRAF) 6 rekrutiert, der durch Bindung an die zytoplasmatische Domäne von RANK zu einer Aktivierung von nuclear factor kappa B (NFκB) führt. Das aktivierte NFκB transloziert in den Zellkern und verstärkt dort die FOS (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) Expression und über eine Interaktion mit NFATC1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1) wird die osteoklastogene Gentranskription reguliert (Boyce and Xing 2007). Osteoprotegerin (OPG) wird von den Osteoblasten sezerniert und bindet als Decoy-Rezeptor an RANKL und verhindert somit die Bindung von RANKL an RANK sowie die RANKL induzierte Knochenresorption (Silva and Branco 2011). Die OPG und RANKL Expression in Osteoblasten wird

## EINLEITUNG

durch viele verschiedene Faktoren wie Östrogene, z.B. 17 $\beta$ -Östradiol, einer Vielzahl an Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren, z.B. TNF (tumor necrosis factor), TNF $\beta$ , TGF $\beta$  (transforming growth factor, beta 1), BMP2 (bone morphogenetic protein 2), IL (interleukin), Wnt Signaling und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) verstärkt. Glukokortikoide, IGF1 (insulin-like growth factor 1), Prostaglandin E2 (PGE2) sowie Parathormon (PTH) reduzieren die Expression von OPG und RANKL (Vega et al. 2007) (Abb. 2).



**Abb. 2 Die Rolle von RANK, RANKL und OPG bei der Induktion der Osteoklastogenese. Nach (Caetano-Lopes et al. 2007).**

Das Verhältnis der OPG und RANKL Expression ist ein wichtiges Stellglied im Zusammenhang mit der Knochenresorption, denn bei einer verstärkten RANKL Expression erfolgt gleichzeitig eine Herunterregulation der OPG Expression und damit eine Begünstigung der Osteoklastogenese bzw. ein Anstieg der Osteoklasten Anzahl und Aktivität (Theoleyre et al. 2004, Koga et al. 2005). Eine osteoprotektive Rolle von OPG wird sowohl in Mausexperimenten deutlich, in denen die Überexpression von OPG Osteopetrose hervorruft, während ein Mangel an OPG Osteoporose verursacht (Caetano-Lopes et al. 2007) als auch in Menschen, die aufgrund einer OPG Defizienz an der juvenilen Form der Paget Erkrankung (Hyperostosis corticalis deformans juvenilis) leiden und



## EINLEITUNG

neben einem deutlich gesteigerten Knochenumsatz, Frakturen und Osteopenie aufweisen (Whyte et al. 2002). Mit dem 2010 zugelassenen Arzneimittel Prolia® (Denosumab) zur Behandlung einer Osteoporose bei postmenopausalen Frauen wird das Wirkprinzip von OPG imitiert, da es sich dabei um einen humanen monoklonalen Antikörper (IgG2) handelt, der RANKL mit sehr hoher Affinität und Spezifität bindet und so die Aktivierung der Osteoklasten durch die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK unterbindet. In der Folge wird die Knochenresorption unterdrückt. Die durchgeführte FREEDOM (Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis every six Months) Studie ergab eine Reduzierung der Knochenbrüche um knapp 5 % nach 3-jähriger Therapie mit Denosumab in postmenopausalen Patienten mit erhöhtem Frakturrisiko verglichen mit der Placebo Gruppe. Gleichzeitig war eine Zunahme der Knochendichte (bone mineral density, BMD) zu verzeichnen (Cummings et al. 2009).

### 3.1.4

---

#### Wnt-Signalweg

Als extrazelluläre Glykoproteine können die Mitglieder der Wnt-Familie an Rezeptoren der Zellmembran binden und die Wnt-Signalwege induzieren. Von allen Wnt-Signalwegen ist der kanonische ( $\beta$ -Catenin-abhängige) Wnt-Signalweg am besten erforscht und übt zudem eine Schlüsselfunktion bei der Knochenformation aus. Neben Zellproliferation und Zellpolarität reguliert der kanonische Wnt-Signalweg auch die Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten (Day et al. 2005, MacDonald et al. 2009). Die Signalübertragung des kanonischen Wnt-Signalweges wird in Gang gesetzt, sobald ein Wnt-Protein an den Rezeptorkomplex, bestehend aus Frizzled und den beiden Wnt-Korezeptoren LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related proteins 5 bzw. 6), an der Zelloberfläche bindet, und unter der Beteiligung mehrerer intrazellulärer Proteine schließlich in die Hochregulation von Transkriptionsfaktoren, die für die Differenzierung von Osteoblasten wichtig sind, resultiert (Crockett et al. 2011). Ist kein Wnt und damit kein aktivierendes Signal vorhanden, wird  $\beta$ -Catenin durch das Zusammenspiel von Dishevelled (DVL1), Axin, APC (adenomatous polyposis coli), CSNK1A1 (casein kinase 1, alpha 1) und GSK3 (glycogen synthase kinase 3) abgebaut. GSK3 phosphoryliert  $\beta$ -Catenin an spezifischen Serin- und Threonin-Resten und nach der Erkennung durch  $\beta$ -TRCP, einer zellulären Ubiquitin-Ligase, wird  $\beta$ -Catenin ubiquitiniert und proteasomisch degradiert (MacDonald et al. 2009). Dadurch wird eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma bzw. die Translokierung in den Zellkern verhindert. Im Falle eines aktivierenden Wnt-Signals bindet  $\beta$ -Catenin im Zellkern an die Transkriptionsfaktoren (LEF1 lymphoid enhancer-binding factor 1), TCF1 (T cell factor 1), TCF3 und TCF4 und aktiviert die Transkription von Wnt-Zielgenen (z.B. *AXIN2*) (Mosimann et al. 2009). Veränderungen im kanonischen Wnt-Signalweg spielen eine Rolle bei Knochen-

## EINLEITUNG

assoziierten Erkrankungen. So gilt eine loss-of-function Mutation im humanen *LRP5* Gen als Ursache des Osteoporose Pseudoglioma Syndroms, einer juvenilen Form der Osteoporose (Gong et al. 2001). Indem sie eine erhöhte Knochenmasse induzieren, wirken sich auch sogenannte gain-of-function Mutationen im humanen *LRP5* Gen auf den Knochen aus (Boyden et al. 2002). Aufgrund einer übermäßigen Knochenbildung haben die Betroffenen zwar ein reduziertes Knochenbruch-Risiko, leiden jedoch häufig unter deutlich verdickten Schädeldachknochen und dadurch an sehr starken Kopfschmerzen (Ai et al. 2005). Laut Takada et al. (2007) unterdrückt der nicht-kanonische Wnt-Signalweg die Transaktivierung von *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) und induziert gleichzeitig die Expression von *RUNX2*, daraus resultiert eine Förderung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten und eine Inhibition der Differenzierung in Adipozyten (Takada et al. 2007).

### 3.1.4.1

#### Interaktion zwischen Wnt- und RANK/RANKL/OPG-Signalwegen

---

Beeinflusst wird die OPG Expression durch die Wnt-Signaltransduktion in Osteoblasten, die OPG als positiven Modulator hochreguliert und zugleich RANKL herunterreguliert und somit fördernd auf die Knochenformation wirkt. Gleichzeitig mündet eine Unterbrechung des kanonischen Wnt-Signaling in Osteoblasten durch Antagonisten wie beispielsweise DKK1 (dickkopf 1 homolog (*Xenopus laevis*)), sFRPs (secreted frizzled-related proteins) oder SOST (sclerostin) in eine verminderte OPG Expression und in Knochenverlust (Glass et al. 2005). Ebenso wie SOST verhindert auch DKK1 durch Bindung an LRP5/6 die Interaktion mit dem Wnt/Frizzled Rezeptorkomplex. Durch die zusätzliche Bindung von DKK1 an die Korezeptoren KRM1/2 (kringle containing transmembrane protein 1 bzw. 2) wird ein Komplex gebildet, der endozytotisch von der Zelloberfläche entfernt wird. Auf diese Weise ist DKK1 in der Lage, das kanonische Wnt-Signaling zu inhibieren. Allerdings ist die nicht-kanonische Weitergabe des Wnt-Signals über den Wnt/Frizzled Rezeptorkomplex noch möglich. Die Antagonisten sFRPs können die kanonische und nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion unterbinden, indem sie entweder direkt an Wnt-Proteine binden und somit die Interaktion der Wnt-Proteine mit dem Frizzled Rezeptor verhindern oder indem sie selbst an den Frizzled Rezeptor binden und die Wnt-Bindungsstelle blockieren (Krishnan et al. 2006, Fujita and Janz 2007). Fujita und Janz (2007) haben herausgefunden, dass DKK1 und 2 inhibierend auf eine Wnt/ $\beta$ -Catenin-abhängige verminderte Regulation von RANKL bzw. verstärkte Expression von OPG wirkt und dadurch eine fördernde Wirkung auf die Osteoklastogenese hat (Fujita and Janz 2007).

## EINLEITUNG

### 3.1.5

---

#### PTH-Signalweg

PTH (Parathormon) wird in der Nebenschilddrüse gebildet und spielt zusammen mit Calcitonin und 1,25D3 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kalzium Homöostase im Körper (s. 3.3.2). Ein Anstieg des Kalziumplasmaspiegels über den Normalwert hemmt die Sekretion von PTH, umgekehrt führt ein niedriger Kalziumspiegel im Plasma zu einer verstärkten Ausschüttung von PTH aus den Nebenschilddrüsen. Das freigesetzte PTH stimuliert neben der Freisetzung von Kalzium aus dem Knochengewebe die Ausscheidung von Phosphat über die Niere bzw. die Bildung von 1,25D3 in den Nieren. Dadurch wird zum einen die Kalziumausscheidung reduziert und andererseits die Kalziumresorption im Darm erhöht. Zusätzlich zum katabolen Einfluss auf Knochen hat PTH jedoch auch eine knochenaufbauende Wirkung. Dazu ist eine intermittierende PTH Exposition notwendig zusammen mit weiteren Komponenten innerhalb des Mikromilieus des Knochens. So wurde beispielsweise die Wirkung von PTH in *DKK1* überexprimierenden Mäusen gehemmt. Eine Verbindung zwischen PTH und Wnt-Signaling wird durch die Bindung von PTH an seinen Rezeptor sowie die Rekrutierung und Phosphorylierung von LRP6 und die nachfolgende Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin hergestellt (Goltzman 2008, Wan M. et al. 2008, Guo J. et al. 2010). Das Parathormon-Fragment Teriparatid (Forsteo®) wird zur Therapie von Osteoporose bei postmenopausalen Frauen mit erhöhtem Frakturrisiko eingesetzt und zeichnet sich durch seine anabole Wirkung auf den Knochen in Kombination mit einer Reduktion des Frakturrisikos aus (Neer et al. 2001, Jakob et al. 2012b).

### 3.1.6

---

#### BMP-Signalweg

Als Mitglieder der TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) Familie, die ausführlich unter Punkt 3.4 beleuchtet wird, sind die BMPs (bone morphogenetic proteins) in vielfältigster Weise an Prozessen im menschlichen Organismus beteiligt und wurden bereits 1965 aufgrund ihrer Fähigkeit, die ektopische Knochenbildung zu induzieren, entdeckt (Urist 1965). Neben ihrer Fähigkeit die Knochenformation zu induzieren, wirken sie unter anderem auch regulatorisch an der Teilung, der Migration, der Differenzierung sowie der Apoptose von Zellen mit (Urist 1965, Feng X. H. and Derynck 2005). Während der embryonalen Entwicklung ist die BMP-Signaltransduktion unter anderem an der Erzeugung der Körperachse, der neuronalen Differenzierung, der Organogenese und der skelettalen Entwicklung beteiligt (Wu M. Y. and Hill 2009). Die Bindung der BMPs an die extrazelluläre Bindedomäne der Typ I- und Typ II-Rezeptoren der TGF $\beta$ -Superfamilie, die in ihrem

## EINLEITUNG

zytoplasmatischen Teil über eine Serin/Threonin Kinase verfügt, führt zur Phosphorylierung von SMAD1, SMAD5 und SMAD8. Durch eine anschließende Komplexbildung mit SMAD4 und der Translokation in den Zellkern kann die Expression BMP-responsiver Zielgene reguliert werden (Kollias and McDermott 2008). BMP2 stimuliert die osteogene Differenzierungskapazität von mesenchymalen Stammzellen und die Expression von *RUNX2*, *ALPL* (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney), *OSX* und *OC* (Wu X. et al. 2007). Somit fördert die Signaltransduktion über BMP2 und auch BMP4 die Differenzierung von Osteoblasten und damit auch die Osteogenese (Bandyopadhyay et al. 2006). BMP3 wirkt antagonistisch zu dem osteogenen BMP2 bzw. BMP4, indem es durch Bindung an den Typ II-Rezeptor die BMP2 und BMP4 vermittelte Signalübertragung inhibiert. Darüber hinaus zeigen transgene *BMP3* überexprimierende Mäuse spontane Frakturen, die sich laut Gamer et al (2009) aus Schäden während der Differenzierung der hypertrophen Chondrozyten sowie der Knochenformation ergeben (Gamer et al. 2009). Gleichzeitig bilden *BMP3* Knockout Mäuse mehr trabekulären Knochen als die Wildtyp-Tiere und weisen somit einen Anstieg der Knochenmasse auf (Daluisi et al. 2001, Gamer et al. 2009). Diese Ergebnisse stimmen mit der Rolle von BMP3 als Negativ-Regulator der Knochenformation überein. In weiteren Tierexperimenten wurde herausgefunden, dass infolge eines Knockouts des *BMPRI1A* (bone morphogenetic protein receptor, type IA, Typ I-Rezeptor) in Osteoblasten die Knochenmasse ansteigt. Gleichzeitig wurde in den *BMPRI1A* Knockout Mäusen durch die Unterbrechung des BMP Signalings die Knochenresorption reduziert (Kamiya et al. 2008).

### 3.1.7

#### FGF-Signalweg

---

Die Familie der Fibroblast Growth Factors (FGFs) setzt sich beim Menschen aus 22 Mitgliedern zusammen (Ornitz and Itoh 2001). Infolge der Bindung der FGFs an die FGF Rezeptoren (FGFR; FGFR1-FGFR4 im Menschen) erfolgt die Dimerisierung der FGFR sowie die daran anschließende Phosphorylierung einer Reihe von Signalmolekülen wie z.B. MAPK (mitogen-activated protein kinase) oder PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Beenken and Mohammadi 2009). Die Bedeutung der FGF Signaltransduktion für die Skelettentwicklung wurde mit der Entdeckung, dass eine Punktmutation im FGFR3 Ursache der Achondroplasie ist, deutlich. Die Achondroplasie gilt als die häufigste Form eines genetisch bedingten Minderwuchses in Menschen. Weitere skelettale Dysplasien im Menschen konnten mit Mutationen innerhalb der FGFR in Verbindung gebracht werden (Shiang et al. 1994). Der FGFR2 fördert nicht nur die Proliferation der Osteoblasten-Vorläufer, sondern auch die aufbauende Funktion der reifen Osteoblasten und eine Inaktivierung des FGFR2 in Mäusen resultiert in Minderwuchs und einer verminderten Knochendichte (Yu K. et al. 2003). Dass die FGF

## EINLEITUNG

Signaltransduktion eine wichtige regulatorische Aufgabe bei der vorgeburtlichen und postnatalen Skelettentwicklung übernimmt, wurde in Mäusen gezeigt. Zum Beispiel wurde in *FGF3* Knockout Mäusen eine verminderte Knochendichte und eine gestörte Knochenmineralisierung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren festgestellt (Valverde-Franco et al. 2004). Zusätzlich weisen *FGF2* Knockout Mäuse aufgrund einer reduzierten Proliferationsrate der Osteoblasten-Vorläufer sowie einer eingeschränkten Funktion der Osteoblasten, eine Verminderung der Knochenmasse und eine Herabsetzung der Knochenneubildung auf (Montero et al. 2000). Ohbayashi et al. (2002) haben gezeigt, dass FGF18 für die Osteogenese und Chondrogenese in der Skelettentwicklung erforderlich ist, da FGF18 als Positiv-Regulator die Proliferation des osteogenen Mesenchyms sowie die Differenzierung zu Osteoblasten fördert und hemmend auf die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten wirkt (Ohbayashi et al. 2002). Die verminderte Proliferationsrate der Chondrozyten, sowie eine verzögerte skelettale Vaskularisierung kann in Verbindung mit einer deutlich verzögerten Mineralisierung des Skeletts in *FGF18* Knockout Mäuse gesetzt werden (Liu Z. et al. 2007). FGF23 wird von Osteoblasten gebildet (Mirams et al. 2004) und übt eine regulatorische Wirkung auf die Phosphat Homöostase und die Synthese von 1,25D3 aus (s. 3.3.2). Für die Signaltransduktion benötigt FGF23 den Kofaktor Klotho, der durch seine Bindung an FGFR1 (IIIc) die Spezifität des Rezeptors für FGF23 erhöht und somit die FGF23 Signalübertragung ermöglicht (Urakawa et al. 2006). Durch einen Defekt im *KLOTHO* Gen werden in Mäusen Anzeichen einer vorzeitigen Alterung hervorgerufen (Kuro-o et al. 1997), dagegen führt eine Überexpression des *KLOTHO* Gens zu einer verlängerten Lebensdauer in Mäusen (Kurosu et al. 2005) (s. 3.3.3). Unabhängig von seinen vielfältigen regulatorischen Funktionen, spielt FGF23 auch in der Knochenmineralisierung eine Rolle (Sitara et al. 2008).

### 3.1.8

#### Sexualhormone, Wachstumshormone und IGF1

---

Auch Sexualhormone wie z.B. Östrogen und Testosteron sind in der Lage den Knochenmetabolismus zu beeinflussen und sind darüber hinaus für die Aufrechterhaltung der Knochenmasse erforderlich. Eine Abnahme dieser Hormone, vor allem ein niedriger Östrogen Spiegel, infolge der Menopause, führt zu einer Verringerung der Knochenmineraldichte und ist einer der Hauptgründe für das Krankheitsbild der Osteoporose (Turner et al. 1994). Die Östrogen Wirkung auf den Knochen, aber auch auf verschiedene andere Gewebe, wird über die beiden Rezeptoren Estrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) sowie Estrogen-Rezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) weitergeleitet. Neben ihrem klassischen im Zellkern lokalisierten Rezeptor-Mechanismus, bei dem die Signalübertragung von Östradiol durch Bindung an den Estrogen-Rezeptor im Zellkern die Gentranskription aktivieren oder inhibieren kann, haben die ER-

## EINLEITUNG

Rezeptoren noch zusätzliche von ihrer DNA-Bindungsfähigkeit unabhängige Funktionen. Dabei geben die in der Zellmembran lokalisierten ER-Rezeptoren ihr Signal über G-Proteine weiter und können so die Transkription beeinflussen (Spelsberg et al. 1999, Levin 2005). Estrogene fördern die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten und wirken somit osteoanabol (Venken et al. 2008). Darüber hinaus haben Östrogene einen knochenprotektiven Effekt, indem sie die Zahl der Osteoklasten und damit auch die Knochenresorption inhibieren. Diese Wirkung verläuft unter anderem über das RANK/RANKL/OPG System, da Östrogene die Synthese von OPG in Osteoblasten fördern und die Produktion von IL-1 (interleukin 1, beta), IL-6 (interleukin 6 (interferon, beta 2)), TNF $\alpha$  und CSF hemmen. Auf diese Weise wird die Aktivität und die Neubildung von Osteoklasten vermindert (Frenkel et al. 2010). Für das postnatale Knochenwachstum ist das Wachstumshormon (Growth hormone, GH), das in somatotropen Zellen der Hypophyse synthetisiert wird, von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich erfolgt unter der Kontrolle von GH in der Leber und im Knochen die Produktion von IGF1 (insulin-like growth factor 1), das zusammen mit GH regulatorisch beim Knochenumbau mitwirkt. Für die stimulatorische Wirkung von GH auf die Proliferationsrate von Osteoblasten wird gleichzeitig IGF1 zur Aktivierung des IGF1 Rezeptors (IGFR1) benötigt (Giustina et al. 2008). Im Mausmodell beeinflusst eine Deletion des *IGF1R* in Osteoblasten *in vivo* in Kombination mit einer GH Stimulation die Anzahl der Osteoblasten nicht, während die Wildtyp-Tiere infolge der GH Stimulation eine Verdopplung der Osteoblasten-Anzahl zeigen (DiGirolamo et al. 2007). Darüber hinaus können Mäuse ohne den IGFR keinen trabekulären Knochen ausbilden. Sie weisen neben einer verminderten Anzahl an Osteoblasten auch eine reduzierte Knochenformation auf (Fulzele et al. 2010).

### 3.1.9

#### Mesenchymale Stammzellen

---

Stammzellen sind eine Art „Ursprungszelle“ mit Selbsterneuerungspotential und der Fähigkeit in alle Zelltypen, z.B. Nervenzellen oder Muskelzellen, des Körpers differenzieren zu können. Dies wird als „Pluripotenz“ bezeichnet und ist charakteristisch für embryonale Stammzellen, während multipotente Stammzellen adulter Organismen in ihrer Differenzierungsfähigkeit auf bestimmte Zelltypen beschränkt sind. Adulte Stammzellen können sich symmetrisch oder asymmetrisch, im Gegensatz zu embryonale Stammzellen, jedoch nicht unbegrenzt teilen. Bei der asymmetrischen Teilung entstehen eine Stammzelle, zum Erhalt des Stammzellpools, und eine differenzierte Tochterzelle. Die darauf folgende Zellgeneration wird als transient amplifying pool bezeichnet und diese Zellen können in Abhängigkeit der Umwelteinflüsse ihrer Mikroumgebung differenzieren. Als Beispiel für adulte multipotente Stammzellen können mesenchymale Stammzellen aus

## EINLEITUNG

verschiedenen adulten Geweben, wie beispielweise Knochenmark, Fett-oder Bindegewebe isoliert werden (Caplan 1991, Fuchs et al. 2004, Sethe et al. 2006). Durch ihre Fähigkeit in die mesenchymalen Gewebe Knochen, Knorpel, Sehne, Muskel oder Fett, allerdings nicht in hämatopoetische Zellen, zu differenzieren, verfügen mesenchymale Stammzellen über ein regeneratives Potential im Hinblick auf die Regeneration von mesenchymalem Gewebe. Zellbasierte Tissue Engineering Verfahren versuchen dieses vielversprechende Potential mesenchymaler Stammzellen auszunutzen, um Schäden an den entsprechenden Geweben möglichst elegant zu beheben (Caplan 1991, 2005, Pittenger et al. 1999, Panetta et al. 2009). *In vitro* zeichnen sich mesenchymale Stammzellen durch folgende Charakteristika aus: neben Plastik-Adhärenz und einer Fibroblasten-ähnlichen Morphologie bilden sie sogenannte colony forming units (CFUs). Als Voraussetzung dafür müssen die Zellen bei der Aussaat über ein Zellsieb vereinzelt werden. Zusätzlich exprimieren mesenchymale Stammzellen spezifische Oberflächenantigene (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, Stro-1) und zeigen keine Expression der hämatopoetischen Marker CD14, CD34, CD45 und HLA-DR (Pittenger et al. 1999, Barry and Murphy 2004).

## 3.2 | Alterung

Alterung ist ein komplexer biologischer Prozess, der durch eine fortschreitende Verminderung physiologischer Funktionen charakterisiert ist. Abgesehen von der Funktionalität reduziert sich auch das regenerative Potential aller Gewebe und Organe im Zuge des Alterungsprozesses, der mit altersassoziierten Erkrankungen wie beispielsweise Arteriosklerose, Demenz, Krebs oder Osteoporose einhergeht (Kirkwood 2005). Obgleich der Vorgang der Alterung in nahezu allen Organismen konserviert ist, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch weitgehend ungeklärt (Cui et al. 2012). Es werden zahlreiche Hypothesen der Alterung diskutiert, die verschiedenste Erklärungsansätze vorschlagen. Dabei hat sich zunehmend ein Konsens dahingehend entwickelt, Altern als genetisch bedingten und durch Umwelteinflüsse epigenetisch beeinflussten multifaktoriellen Vorgang zu verstehen (Kirkwood 2005). Im Folgenden wird ein Überblick über die unterschiedlichen Modelle der Alterungs-Forschung gegeben.

### 3.2.1

---

#### Die Theorie der freien Radikale

Bereits im Jahr 1956 schlug Denham Harman die Theorie der freien Radikale vor. Dabei wurde von einem Zusammenhang zwischen dem Alterungsprozess und der Reaktion freier Radikale, die auf der Grundlage von Stoffwechsel-Vorgängen aus molekularem Sauerstoff in Zellen gebildet werden,

## EINLEITUNG

ausgegangen (Harman 1956). Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxide ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $\cdot OH$ ) zählen zu den reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) und werden als Nebenprodukt des intrazellulären Stoffwechsels in Mitochondrien, Peroxisomen sowie zytosolischen enzymatischen Systemen oder als Reaktion auf die verschiedensten Stimuli (z.B. inflammatorische Zytokine, Toxine, ionisierende Strahlung) erzeugt (Halliwell 1991, Wink et al. 1996, Spry et al. 2007, Liu J. et al. 2009a). In niedrigen Konzentrationen fungieren ROS als intrazelluläre Signalmoleküle in vielen physiologischen Prozessen sowie unter anderem als stimulierender Faktor bei der Zellproliferation (Clement and Pervaiz 1999, Droge 2002). Nachteilig wirken sich ROS in höheren Konzentrationen aus, da sie oxidative Schäden an Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen verursachen und aufgrund ihrer Akkumulation im Laufe der Zeit zur Entstehung degenerativer Erkrankungen sowie Alterungsprozessen in Zellen, Geweben oder Organen beitragen (Cooke et al. 2003, Evans et al. 2004). Als freie Radikale verfügen ROS über ein ungepaartes Elektron und sind daher sehr reaktionsfreudig. So verursachen ROS Läsionen in der DNA (z.B. DNA-Doppelstrangbrüche, oxidierte DNA-Basen), die zu genomischer Instabilität führen können. Mit Hilfe verschiedener Mechanismen wie Basen-Exzisionsreparatur, Nukleotid-Exzisionsreparatur, Doppelstrangbruch-Reparatur oder Basenfehlpaarungs-Reparatur können Schädigungen der DNA behoben werden (Memisoglu and Samson 2000a, b, Maynard et al. 2009). Um ROS unschädlich zu machen, setzen Zellen antioxidative Abwehrmechanismen ein, bei denen antioxidative Enzyme wie Superoxid Dismutasen (SOD), Katalasen, Glutathion Peroxidasen und Thioredoxin Reduktasen als Radikalfänger wirken, indem sie die Umwandlung von ROS katalysieren. Die SOD wandelt Superoxidradikale in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um, daraufhin wird das gebildete zelltoxisch wirkende Wasserstoffperoxid von Katalasen oder Glutathion Peroxidasen in Wasser verwandelt (Nordberg and Arner 2001, Romano et al. 2010). Besteht ein Gleichgewicht zwischen der ROS Produktion und ihrer Detoxifizierung wird die physiologische Homöostase erhalten. Sobald jedoch die ROS Produktion die neutralisierende Kapazität der antioxidativen Enzyme überschreitet, entsteht in Zellen oxidativer Stress, der durch eine Anhäufung oxidativer Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen den Alterungsprozess fördert (Halliwell 1991, Sies 1993, Wink et al. 1996, Kohrle et al. 2005, Spry et al. 2007, Liu J. et al. 2009a, Cui et al. 2012).

### 3.2.2

#### Die mitochondriale Theorie des Alterns

---

Da in Zellen ein Großteil der ROS in Mitochondrien erzeugt wird, wurde die Theorie der freien Radikale in die mitochondriale Theorie des Alterns weiterentwickelt. Dabei sollen durch ROS hervorgerufene Mutationen mitochondrialer DNA (mtDNA) ebenso wie oxidative Schäden an



## EINLEITUNG

mitochondrialen Makromolekülen, die mit fortschreitendem Alter akkumulieren, für den Alterungsprozess mitverantwortlich sein (Harman 1972, Cadenas and Davies 2000). Trifunovic et al. (2004) sehen einen ursächlichen, die Theorie des mitochondrialen Alterns unterstützenden Zusammenhang, zwischen mtDNA Mutationen und einem altersassoziierten Phänotyp in Säugetieren, da Mäuse, die eine Proofreading-defiziente mitochondriale DNA Polymerase exprimieren, eine erhöhte Entwicklung von mtDNA Mutationen und zur gleichen Zeit eine Verminderung der Lebensdauer einhergehend mit Symptomen verfrühter Alterung wie z.B. Osteoporose, Gewichtsabnahme, Alopecia oder verringerter Fruchtbarkeit zeigen (Trifunovic et al. 2004, Kujoth et al. 2005). In der Literatur werden ambivalente Erkenntnisse im Hinblick auf die Verbindung zwischen oxidativen Schäden und dem Alterungsprozess beschrieben. Zum einen zeigen *SOD1*<sup>-/-</sup> Mäuse eine reduzierte Lebenserwartung einhergehend mit der Entwicklung von Lebertumoren (Elchuri et al. 2005). Ein gegenteiliger Effekt wird durch eine *SOD1*, *SOD2* bzw. Katalase Überexpression in *Drosophila* bewirkt (Orr and Sohal 1994), während in Mäusen keine verlängerte Lebensdauer erzielt werden konnte (Huang et al. 2000, Chen X. et al. 2004). Transgene Mäuse, die durch eine Überexpression der humanen mitochondrialen Katalasen charakterisiert sind, leben deutlich länger als die Wildtyp-Tiere (Schriner et al. 2005). Keine die Lebensspanne verlängernde Wirkung hat die Überexpression von wichtigen antioxidativen Enzymen wie Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (CuZnSOD, SOD1) oder Mangan Superoxid-Dismutase (MnSOD, SOD2) in transgenen Mäusen, die neutralisierend auf Superoxid-Radikale und Wasserstoff-Peroxide in zytosolischen sowie mitochondrialen Kompartimenten wirkt (Perez et al. 2009). Darüber hinaus hat eine Inaktivierung von SOD2 in *Caenorhabditis elegans* sowie von MCLK1, einem mitochondrialen Enzym, in Mäusen eine Verlängerung der Lebensdauer zur Folge (Liu X. et al. 2005, Van Raamsdonk and Hekimi 2009). Gerade die zuletzt erwähnten Resultate sprechen sich gegen eine mitochondriale Theorie des Alterns aus (Lapointe and Hekimi 2010).

### 3.2.3

---

#### **Immunseneszenz**

Das Immunsystem höherer Lebewesen dient der Abwehr von Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten oder anderen umweltbedingten Faktoren. Mit der unspezifischen (angeborenen) Immunabwehr und der spezifischen (adaptiven) Immunabwehr verfügt das Immunsystem über 2 Abwehrmechanismen, die sich in ihrem Wirkmechanismus unterscheiden und ergänzen. Das unspezifische Immunsystem ist, z.B. mittels entzündlicher Reaktionen, sofort verfügbar und dient als eine Art erste Verteidigungslinie des Körpers gegenüber pathogenen Mikroorganismen. Dazu werden, neben zellulären Mechanismen wie beispielsweise der Phagozytose

## EINLEITUNG

oder der Degranulation toxischer Substanzen, mittels Basophilen, Mastzellen und Eosinophilen auch humorale Mechanismen (z.B. Komplementsystem, Interferone) eingesetzt. Die unspezifische Immunabwehr wird häufig durch eine Reihe unterschiedlicher Zellen, unter anderem Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen oder natürliche Killerzellen vermittelt. Im Laufe des Lebens entwickelt sich das adaptive Immunsystem durch den direkten Kontakt mit pathogenen Krankheitserregern. Dabei vermitteln B- und T-Lymphozyten eine spezifische Immunabwehr, indem sie die Antigene der pathogenen Eindringlinge erkennen und spezifische Antikörper dagegen bilden (Messaoudi et al. 2011).

Altersbedingte Veränderungen des Immunsystems resultieren in einer verminderten Immunantwort auf Infektionskrankheiten sowie Impfungen und gehen mit einem gesteigerten Risiko für Autoimmunerkrankungen oder Krebs in älteren Menschen einher. Die fortschreitende Funktionsabnahme des Immunsystems im Laufe des menschlichen Alterungsprozesses wird als Immunseneszenz bezeichnet und wirkt sich sowohl auf das adaptive als auch auf das unspezifische Immunsystem dahingehend aus, dass Anzahl und Funktion der dendritischen Zellen im Blut vermindert werden. Weiter bewirken eine Abnahme bzw. eine Funktionsschwäche naiver T-Lymphozyten, ein Anstieg von T-Gedächtniszellen sowie eine Abnahme naiver B-Zellen und B-Gedächtniszellen, eine reduzierte Aktivierung der adaptiven Immunantwort auf pathogene Antigene. Eine Begleiterscheinung der Immunseneszenz ist die verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Weiskopf et al. 2009, Frasca and Blomberg 2011, Messaoudi et al. 2011).

### 3.2.4

#### Zelluläres Altern

---

Nach einer begrenzten Anzahl an Zellteilungen gehen primäre Zellen in einen Zustand der replikativen (zellulären) Seneszenz über. Charakterisiert wird diese Phase durch einen Arrest des Zellzyklus sowie einen daraus resultierenden irreversiblen Stillstand des Zellwachstums. Obgleich die Zellen ihre Replikationsfähigkeit verlieren, bleiben sie weiterhin metabolisch aktiv und somit lebensfähig. Gleichzeitig nehmen seneszente Zellen eine vergrößerte, verbreiterte sowie insgesamt abgeflachte Zellgestalt an, dabei steigen die granulären Anteile in der Zelle an (Hayflick and Moorhead 1961, Hayflick 1976, Campisi 2001, 2005, Sharpless and DePinho 2004, Krishnamurthy et al. 2004, Ho et al. 2005, Janzen et al. 2006). Mit fortschreitendem Alter vermindert sich die Zellteilungsfähigkeit in vielen humanen Geweben und kann dadurch zum Alterungsprozess beitragen. Als Ursache dafür kommt eine Verkürzung der Telomere, die als repetitive DNA-Sequenzen an den linearen Chromosomenenden vor Abbau und Instabilität schützen sollen, in Frage. Das Telomerase Enzym fügt in einigen ausgewählten Zelltypen wie beispielsweise in Keimzellen, embryonalen

## EINLEITUNG

Stammzellen oder in den meisten Tumor-Zellarten bei der Zellteilung am Chromosomenende verloren gegangene telomere Sequenzen wieder an. In den meisten somatischen Zellarten kann jedoch keine Telomerase Aktivität nachgewiesen werden, die Folgen sind bei jeder Replikationsrunde kürzer werdende Chromosomenenden und schließlich der Eintritt in einen Zustand der replikativen Seneszenz oder der Apoptose (Hayflick and Moorhead 1961, Bodnar et al. 1998, Johnson et al. 1999, Kirkwood 2005). Neben Schädigungen der DNA tragen auch oxidativer Stress und die Ansammlung von P16 (oder CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) zu einem seneszenten Zustand bei. Mit fortschreitendem Alter wird P16 in zahlreichen murinen sowie menschlichen Geweben verstärkt exprimiert und in unterschiedlichen Zelltypen mit replikativer Seneszenz assoziiert (Chkhotua et al. 2003, Melk et al. 2003, Melk et al. 2004, Krishnamurthy et al. 2004). TERC ist eine RNA Komponente der Telomerase und ist in der Lage den Vorgang der Alterung direkt zu beeinflussen, da *TERC*/Mäuse neben einer verkürzten Lebensdauer auch Beeinträchtigungen in hämatopoetischen Stammzellen sowie Keimzellen aufweisen (Lee H. W. et al. 1998). Die Aktivität der Telomerase nimmt mit zunehmender Differenzierung der Zellen ab (Sharma H. W. et al. 1995, Li H. et al. 2005). Als Schutzmechanismus bewahrt die replikative Seneszenz die Zellen davor, dass sich durch eine Ansammlung genomischer sowie proteomischer Schäden Tumore entwickeln (Aubert and Lansdorp 2008). Es besteht eine enge Korrelation zwischen Telomerase Aktivität und Karzinogenese, da in ca. 85 bis 90 % der Fälle bei Krebs im Menschen eine Telomerase Aktivität nachgewiesen werden konnte (Shay and Bacchetti 1997) und da eine Hemmung in Telomerase-positiven Krebszellen das Tumorwachstum inhibiert und den Zelltod auslöst (Hahn et al. 1999, Cassar et al. 2008). So liegen in den meisten humanen Tumoren inaktivierende Mutationen im TP53 (tumor protein p53) oder P16/retinoblastoma (Rb) Signalweg vor, beide Signalwege gelten als wichtiger molekularer Bestandteil bezüglich der Seneszenzentstehung (Classon and Harlow 2002, Toledo and Wahl 2006). Der Transkriptionsfaktor TP53 reguliert die Expression von Zielgenen, die wiederum Zellzyklus-Arrest, Apoptose, Seneszenz oder DNA-Reparatur auslösen (Campisi 2001, Toledo and Wahl 2006). Wenn Zellen seneszent werden steigt die Aktivität des Transkriptionsfaktors TP53 an. Die Ursache dafür liegt in einem Anstieg der P16 Expression, hervorgerufen durch DNA-Schäden oder durch den E2F transcription factor 1 (E2F1) sowie durch den onkogenen Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 (RASGRF1). P16 inhibiert MDM2 (p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)), das als Regulator von TP53 für dessen Abbau verantwortlich ist. Zusätzlich induziert RASGRF1 neben einem Zustand der replikativen Seneszenz den Tumor Suppressor PML (promyelocytic leukemia), der sich ebenfalls stimulierend auf die TP53 Aktivität auswirkt. TP53 wirkt induzierend auf die Transkription von P21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), welches ebenso wie P16 die CDKs (cyclin-dependent kinases) inhibiert. CDKs kontrollieren als Proteinkinasen den Zellzyklus und phosphorylieren und inaktivieren während des Verlaufes des Zellzyklus das Retinoblastom Protein.

## EINLEITUNG

Am Ende des Retinoblastom Signalweges steht der G1 Zellzyklus-Arrest (Bringold and Serrano 2000, Ferbeyre et al. 2000, Pearson et al. 2000). Der Mechanismus der zellulären Alterung kann auch an einigen ausgewählten Krankheiten beobachtet werden. Zum Beispiel führt eine loss-of-function Mutation im *WRN* Gen, die für das Werner Syndrom ursächlich ist, unter anderem zu einer Verkürzung der Telomere. Die Betroffenen vergreisen vorzeitig und zeigen weitere für eine vorzeitige Alterung charakteristische Symptome wie Arteriosklerose, raschere Hautalterung oder Osteoporose (Johnson et al. 1999).

### 3.2.4.1

#### Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und Alterung

---

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) exprimieren in der Zellkultur keine Telomerase bzw. kaum nachweisbare Mengen an Telomerase (Shay et al. 2001, Zimmermann et al. 2003, Parsch et al. 2004, Wagner W. et al. 2010b). Dadurch wird die Länge der Telomere mit jeder Zellteilung verkürzt und nach einer begrenzten Anzahl an Zellteilungen stellen die hMSC ihre Proliferation ein und erreichen eine Phase der zellulären Seneszenz. Damit einhergehend sind morphologische Veränderungen, die durch einen Verlust der spindelförmigen fibroblastischen Zellgestalt und der Entwicklung eines vergrößerten und verbreiterten Phänotyps der hMSC charakterisiert werden. Zusätzlich vergrößern sich die Lysosomen und es tritt eine gesteigerte endogene  $\beta$ -Galactosidase Aktivität auf (Campisi 2001, Ho et al. 2005, Janzen et al. 2006, Wagner W. et al. 2010a, Wagner W. et al. 2010b). Humane MSC, die stabil mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) transduziert wurden, zeigen *in vitro* mit mehr als 260 Populationsverdopplungen eine deutlich verlängerte Proliferationskapazität im Vergleich zu den Kontroll-hMSC, die nach circa 26 Populationsverdopplungen ihre Proliferation stoppten. Humane MSC-hTERT können *in vitro* in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung differenzieren und weisen keine Anzeichen für eine Tumorbildung auf (Simonsen et al. 2002). Bereits in frühen Passagen weisen manche hMSC eine für den Zustand der Seneszenz typische morphologische Veränderungen sowie eine nachweisbare  $\beta$ -Galactosidase Aktivität auf. Dies deutet darauf hin, dass ein Proliferationsstopp kein zeitgleicher und homogener Prozess der hMSC in der Kultur ist (Stenderup et al. 2003, Zhou S. et al. 2008). Senescente hMSC weisen mit einer signifikant erhöhten Expression von z.B. *P16*, *P21* (oder *CDKN1A*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) und *TP53* ein differentielles Genexpressions-Muster im Vergleich zu hMSC einer frühen Passage auf. Zusätzlich werden in späten Passagen Zellzyklus-, DNA-Reparatur- und DNA-Replikation-assoziierte Gene signifikant herunterreguliert. Mit zunehmender Passagenzahl nimmt die Proliferationskapazität der hMSC schrittweise bis zum finalen Proliferationsstopp ab und Wagner W. et al. (2008b) beschreiben zudem eine Abnahme der

## EINLEITUNG

adipogenen Differenzierungsfähigkeit sowie eine Steigerung der osteogenen Differenzierungskapazität (Izadpanah et al. 2008, Wagner W. et al. 2008b). Zusätzlich müssen an dieser Stelle die Auswirkungen einer Kultivierung der hMSC unter reduzierten Sauerstoffbedingungen erwähnt werden. Der physiologische Sauerstoffdruck im Körper des Menschen variiert je nach Körpergewebe und beträgt beispielsweise im Knorpel 1 % und zwischen 10 und 13 % in Lunge, Leber sowie Arterien. Im Gegensatz dazu liegt der Sauerstoffanteil im Knochenmark zwischen 1 und 7 % (Grant and Smith 1963, Chow et al. 2001, D'Ippolito et al. 2006). Somit ist der Sauerstoffdruck *in vivo* deutlich niedriger als in der Zellkultur unter Standardbedingungen (21 % Sauerstoffanteil). Daher ist die Verwendung reduzierter Sauerstoffkonzentrationen in der Zellkultur repräsentativer für die *in vivo* Situation. Niedrig Sauerstoffbedingungen (3 % Sauerstoff) in der Zellkultur erhöhen die Proliferationsrate und vermindern das adipogene bzw. osteogene Differenzierungspotential der hMSC. Gleichzeitig wird die Expression der Stemness-Marker *OCT4* (octamer-binding protein 4), *REXO1* (RNA exonuclease 1 homolog) und die *TERT* (telomerase reverse transcriptase) in hMSC unter reduzierten Sauerstoffbedingungen deutlich erhöht verglichen mit den normalen Sauerstoffbedingungen (21 % Sauerstoff) (D'Ippolito et al. 2006, Fehrer et al. 2007). Diese Beobachtungen deuten auf einen Erhalt der Stemness der Zellen und keinerlei Seneszenz-assoziierte Anzeichen hin.

## 3.3 | Das Vitamin D-endokrine System

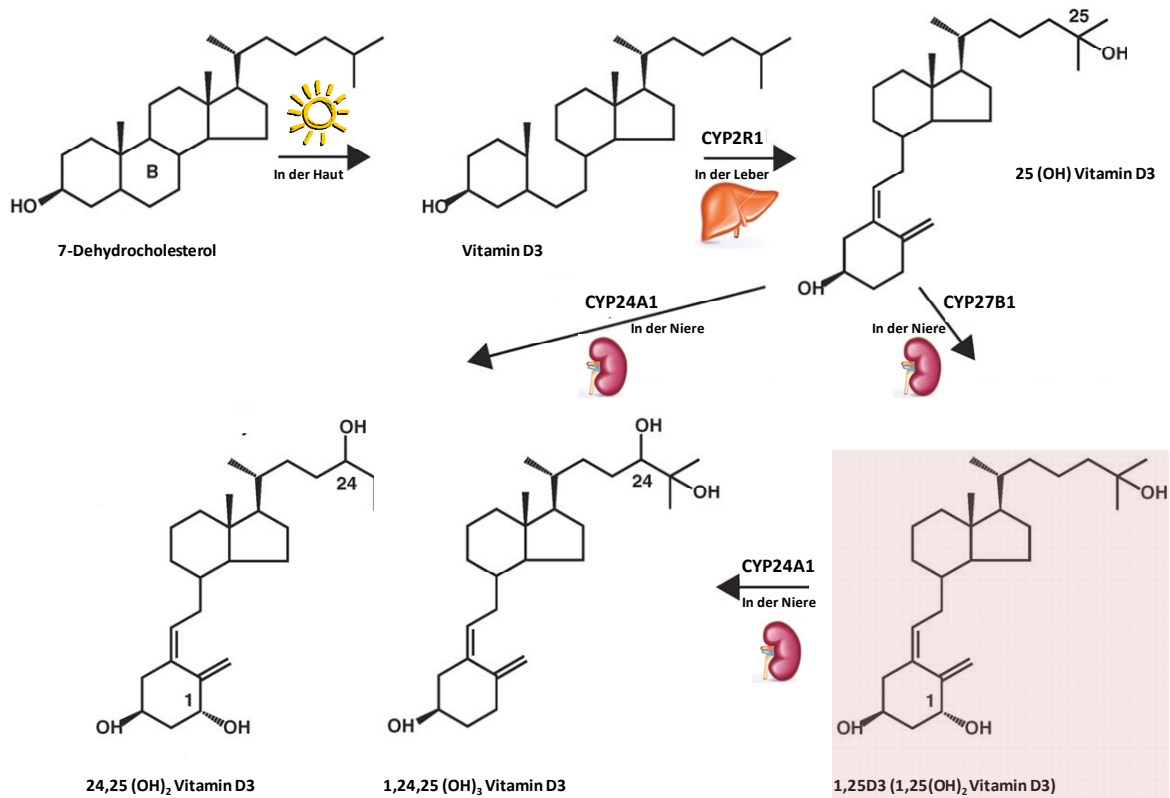
### 3.3.1

#### Synthese und Metabolismus von 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3)

Anders als die Bezeichnung impliziert, ist Vitamin D3 kein Vitamin, sondern ein Prohormon des biologisch aktiven Seco-Steroidhormons 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3). Über mehrere aufeinanderfolgende Schritte erfolgt die Synthese von 1,25D3 endogen im Körper. Unter der Einwirkung von UVB-Strahlung wird 7-Dehydrocholesterol in der Haut in Vitamin D3 (Cholecalciferol) umgewandelt. Von hier wird das Vitamin D3 über die Blutzirkulation mittels eines Trägerproteins, dem sogenannten Vitamin D bindenden Protein (DBP), zur Leber transportiert. Dort hydroxyliert die Monooxygenase CYP2R1 (25-Hydroxylase) Vitamin D3 am Kohlenstoffatom (C) der Position 25 und es entsteht 25(OH) Vitamin D3. Anschließend transportiert das DBP das 25(OH) Vitamin D3 von der Leber zu der Niere, wo eine weitere Hydroxylierung erfolgt. Dabei katalysiert CYP27B1 (1 $\alpha$ -Hydroxylase), ein Enzym der Cytochrom P450 Familie, die Hydroxylierung von 25(OH) Vitamin D3 am C der Position 1 und das aktive 1,25D3 entsteht. Ein weiteres Vitamin D-metabolisierendes Enzym, das sogenannte CYP24 (24-Hydroxylase) Enzym induziert die katabole Kaskade von 1,25D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>

## EINLEITUNG

Vitamin D<sub>3</sub>), aber auch von 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>, indem es beide an der C24 Position hydroxyliert und in 1,24,25(OH)<sub>3</sub> Vitamin D<sub>3</sub> bzw. 25,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> umwandelt (Christakos et al. 2003, Holick 2011) (Abb. 3).



**Abb. 3 Vitamin D Metabolismus. Das biologisch aktive Steroidhormon 1,25D<sub>3</sub> wurde farblich markiert. Nach (Ebert et al. 2006).**

### 3.3.2

#### Relevanz von 1,25D<sub>3</sub> im menschlichen Organismus

Für die Ausübung vielfältiger physiologischer Funktionen ist eine Umwandlung der Vitamin D-Metabolite in das aktive 1,25D<sub>3</sub> notwendig. Mit seiner Wirkung auf die Kalzium und Phosphat Homöostase nimmt 1,25D<sub>3</sub> unter Beteiligung von PTH und Calcitonin eine sehr wichtige biologische Funktion im menschlichen Organismus ein. Nach der Bildung in der Niere, wird 1,25D<sub>3</sub> von dem DBP über das Blut zu den entsprechenden Zielgeweben befördert. Im Dünndarm erhöht 1,25D<sub>3</sub> die Resorption von Phosphat und Kalzium, indem durch Wechselwirkung mit dem Vitamin D-Rezeptor (VDR) die Expression epithelialer Kalziumkanäle sowie die Expression von Calbindin, einem Kalzium

## EINLEITUNG

bindenden Protein, gesteigert wird (Christakos et al. 2003). Die erhöhte Verfügbarkeit von Phosphat und Kalzium führt zum Einbau in den Knochen und dadurch zu einer verstärkten Knochenformation. Zusätzlich entfaltet 1,25D3 auch eine knochenresorptive Wirkung. Im Knochen wird RANKL durch die Interaktion von 1,25D3 mit dem VDR der Osteoblasten stärker exprimiert. Durch die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläufer wird, wie bereits unter 3.1.3 beschrieben, eine Signalkaskade angestoßen, in deren Verlauf zunächst die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläufer zu reifen Osteoklasten erfolgt. Durch die knochenresorptive Wirkung der reifen Osteoklasten wird Kalzium und Phosphat aus dem mineralisierten Knochen in die Blutzirkulation freigesetzt und die Kalzium/Phosphat Homöostase gewährleistet (Khosla 2001). Einen weiteren regulatorischen Beitrag zur Kalzium und Phosphat Homöostase liefert 1,25D3 durch die renale tubuläre Rückresorption von Kalzium und Phosphat sowie durch die Unterdrückung der PTH Biosynthese bzw. Ausschüttung aus den Nebenschilddrüsen. Aufgrund niedriger Phosphat- und Kalzium-Spiegel sowie erhöhter PTH Spiegel im Serum wird die Aktivität von CYP27B1 gesteigert und dadurch verstärkt 1,25D3 in der Niere gebildet. Über einen Rückkopplungsmechanismus inhibiert 1,25D3 die PTH Produktion und die CYP27B1 Aktivität. Das Enzym CYP24 wird durch geringe Kalzium- und PTH-Serumspiegel gehemmt und von 1,25D3 stimuliert. Somit werden CYP27B1 und CYP24 gegenläufig reguliert. Zusätzlich fördert Calcitonin bei einem normalen Kalzium-Serumspiegel die Produktion von 1,25D3, welches wiederum durch FGF23 in seiner Synthese in der Niere gehemmt und infolge einer erhöhten CYP24 Aktivität katabolisiert wird. Da 1,25D3 die FGF23 Expression im Knochen vermindert, entsteht zwischen FGF23 und dem Vitamin D-endokrinen System ein negativer Rückkopplungsmechanismus (Brenza et al. 1998, Shinki et al. 1999, Omdahl et al. 2002, Shimada et al. 2004). Holick (2011) sieht in der Mineralisierung des Skeletts, neben der Regulierung des Kalzium- und Phosphat-Spiegels im Serum, die bedeutendste Aufgabe von 1,25D3 im menschlichen Organismus (Holick 2011). Neben der beschriebenen systemischen Wirkung zur Regulierung des Kalzium, Phosphat und Knochen Metabolismus gibt es auch einen lokalen 1,25D3 Effekt in Zellen, Geweben und Organen, die das CYP27B1 Enzym exprimieren und über die notwendigen enzymatischen Komponenten verfügen (Mawer et al. 1994, Schwartz et al. 1998, Radermacher et al. 2006, Jones 2007). Der lokalen 1,25D3 Produktion werden zahlreiche gesundheitsfördernde Funktionen im menschlichen Organismus zugeschrieben. Beispielsweise inhibiert 1,25D3 das Wachstum von Krebszellen und induziert in Makrophagen oder Keratinozyten die Synthese von Cathelicidin. Durch seine bakterizide Wirkung ist Cathelicidin bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten wie z.B. Tuberkulose bedeutsam. Darüber hinaus schützt 1,25D3 vor der Entstehung bestimmter immunvermittelter Krankheiten (Liu P. T. et al. 2006, Tuohimaa 2008).



## EINLEITUNG

### 3.3.3

---

#### 1,25D3 und Alterung

Alterung ist ein multifaktorieller Prozess, an dem eine Vielzahl von Genen sowie Umweltfaktoren beteiligt sind. Einer dieser Faktoren ist Vitamin D3, da in *FGF23*-defizienten sowie *KLOTHO*-defizienten Mäusen ein Zusammenhang zwischen beschleunigter Alterung und Hypervitaminose D besteht (Razzaque and Lanske 2006). Für beide Knockout Modelle sind zusätzlich zu einer Wachstumsretardierung, Symptome vorzeitiger Alterung sowie erhöhte Phosphat- und 1,25D3-Spiegel im Serum charakteristisch (Kuro-o et al. 1997, Razzaque et al. 2006). Durch eine zusätzliche Inaktivierung von *CYP27B1* in den *FGF23*<sup>-/-</sup> sowie *KLOTHO*<sup>-/-</sup> Mäusen können die beschriebenen Veränderungen wieder rückgängig gemacht werden (Sitara et al. 2008, Ohnishi et al. 2009). Diese Beobachtungen verknüpfen eine VDR-abhängige Signalübertragung mit vorzeitiger Alterung. Allerdings gibt es auch Hinweise auf einen durch eine VDR-abhängige Signalübertragung vermittelten anti-aging Effekt, da VDR Knockout Mäuse verglichen mit den Wildtyp-Tieren Symptome verfrühter Alterung entwickeln (Razzaque and Lanske 2006, Keisala et al. 2009).

### 3.3.4

---

#### 1,25D3 und Stammzellen

Die kombinierte Behandlung von hMSC mit 1,25D3 und thrombozytenreichem Plasma (PRP) führt zu einer Förderung der osteogenen Differenzierung (Feng Y. et al. 2010). Zudem wurde 1,25D3 als eine die osteogene Differenzierung induzierende Substanz in humanen stromalen Zellen, die aus dem Fettgewebe gewonnen wurden, entdeckt. Dadurch kann 1,25D3 als ausgesprochen fähiges Ersatzmittel für Dexamethason zur Induktion der osteogenen Differenzierung verwendet werden (Zhou Y. S. et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine 1,25D3 Stimulierung Alterungsvorgänge in hMSC modulieren kann.

### 3.3.5

---

#### Vitamin D-assozierte Erkrankungen

Bei den Vitamin D-assozierten Erkrankungen wird zwischen vererbten und erworbenen Krankheiten unterschieden. Dabei entwickeln sich erworbene Krankheiten aufgrund äußerer Umstände und sind nicht angeboren. So führt im Kindesalter eine unzureichende Kalzium Aufnahme oder ein Mangel an 1,25D3 zur Rachitis. Für das Erscheinungsbild der Rachitis ist eine gestörte Knochenmineralisation, verformte Gliedmaßen wie z.B. Beinverkrümmungen oder eine Wachstumsretardierung



## EINLEITUNG

charakteristisch. Bei Erwachsenen wird das entsprechende Krankheitsbild als Osteomalazie bezeichnet. Zu den vererbten Krankheiten zählen unter anderem die Vitamin D-abhängige Rachitis Typ 1 und Typ 2 (VDDR1, VDDR2). Die Ursache für VDDR1 ist eine inaktivierende Mutation im CYP27B1 Gen, die in eine verminderte Produktion von 1,25D3 resultiert. Infolge des 1,25D3 Mangels kommt es bei Kindern zu Rachitis und bei Erwachsenen zu Osteomalazie. Allerdings kann durch die Verabreichung von 1,25D3 VDDR1 sehr wirksam therapiert werden (Dardenne et al. 2004). Sogenannte „loss-of-function“ Mutationen im VDR gelten als Ursache von VDDR2.

### 3.4 | Die TGFβ-Familie

Aktivin A und Myostatin gehören zu der TGFβ (transforming growth factor β) Familie, deren 33 strukturell verwandte Mitglieder äußerst wichtige Prozesse im Laufe der Embryogenese und der Homöostase im erwachsenen Organismus regulieren, indem sie viele zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose steuern. Sezernierte und seit der Evolution multizellulärer Organismen konservierte Polypeptide zählen zu der TGFβ Superfamilie, unter anderem die TGFβs 1, 2, 3, die BMPs, die GDFs (growth differentiation factors), die Aktivine/Inhibine, Myostatin und Nodal (Derynck and Miyazono 2008, Huminiecki et al. 2009). Sie nehmen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Selbsterneuerungs-Kapazität und Differenzierung von embryonalen Stammzellen ein. Dabei fördert das BMP Signaling (s. 3.1.6) die Proliferation und Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen, während TGFβ eine reziproke Wirkung entfaltet und die Proliferation und die Differenzierung inhibiert. Insbesondere BMP4 ist zusammen mit Wnt an der Erhaltung der Stemness der murinen embryonalen Stammzellen beteiligt (Watabe and Miyazono 2009). Zusätzlich unterbindet die TGFβ vermittelte Signaltransduktion durch Einleitung des Zellzyklus-Arrestes und der Apoptose das unkontrollierte Wachstum von Epithelzellen sowie tumorigenen Zellen. Dabei werden, einhergehend mit der Repression von MYC und den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die CDK Inhibitoren P15 und P21 verstärkt exprimiert. Gleichzeitig kann TGFβ neben seiner Tumor-suppressiven Wirkung fördernd auf das Fortschreiten und die Metastasierung des Krebses wirken, z.B. indem es regulierend auf Prozesse wie Zellinvasion oder Neoangiogenese wirkt (Massague 2008). In Fibroblasten wird durch die TGFβ induzierte Verstärkung der Expression von Fibronectin, Kollagenen und dem connective tissue growth factor (CTGF) die Ablagerung extrazellulärer Matrix gefördert, die für die Gewebemöostase und den Wundheilungsprozess wichtig ist (Verrecchia and Mauviel 2007).

## 3.4.1

### Aktivin und Myostatin als Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie

#### 3.4.1.1

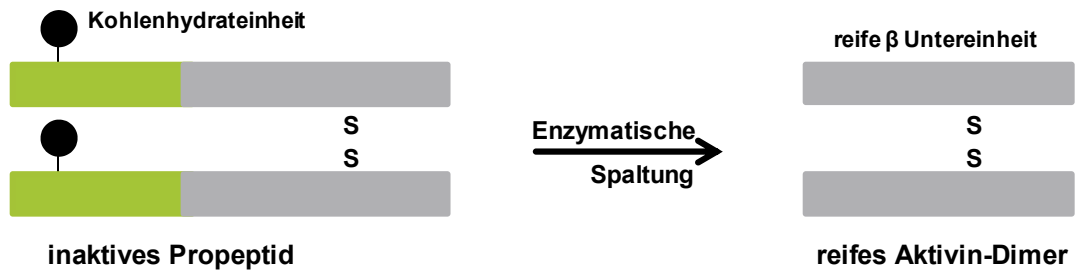
##### Aktivin

Aktivine und Inhibine wurden zuerst im Zusammenhang mit ihrer Fähigkeit, die Sekretion des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und somit zusammen mit weiteren Hormonen die Reproduktion zu regulieren, identifiziert (Coss et al. 2010). Darüber hinaus sind die Aktivine in vielfältige weitere Funktionen involviert. Hierbei sind unter anderem ihre Beteiligung an der Neurogenese, der Regulation des Wachstums von Krebszellen oder der Regulation der Pluripotenz und Differenzierung von Stammzellen zu nennen (Katik et al. 2009, Vallier et al. 2009). Aktivine sind dimere Proteine, die aus 2  $\beta$  Untereinheiten aufgebaut sind und durch eine Disulfidbindung miteinander verbunden sind. Von den 5 bekannten  $\beta$  Untereinheiten wurden  $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ C und  $\beta$ E in Säugetieren identifiziert, während  $\beta$ D im *Xenopus laevis* entdeckt wurde und dort als Mesoderm induzierender Faktor wirkt (Oda et al. 1995). Je nach Kombinationsmöglichkeit der  $\beta$ A und  $\beta$ B Untereinheiten entstehen die folgenden gut charakterisierten Aktivin Isoformen: Aktivin A ( $\beta$ A $\beta$ A), Aktivin B ( $\beta$ B $\beta$ B) und Aktivin AB ( $\beta$ A $\beta$ B) (Abb.4). Im Gegensatz dazu werden die Untereinheiten  $\beta$ C und  $\beta$ E bisher als funktionslos angesehen.



**Abb. 4 Ein Aktivin Molekül setzt sich aus jeweils 2  $\beta$  Untereinheiten zusammen. Aktivin A wurde farblich hervorgehoben.**

Wie alle anderen Liganden der TGF $\beta$ -Familie werden auch die Aktivine als Vorläufermoleküle translatiert und vor ihrer Sekretion proteolytisch gespalten (Sengle et al. 2011). Dabei weisen diese glykosylierten  $\beta$  Untereinheiten eine Signalsequenz, eine Pro-Domäne sowie eine C-terminale Sequenz auf. Durch enzymatische Abspaltung der terminalen Kohlenhydrateinheit an der  $\beta$  Untereinheit entsteht die biologisch aktive Form der Aktivine (Butler et al. 2005) (Abb. 5).



**Abb. 5 Die intrazelluläre enzymatische Prozessierung des inaktiven Aktivin Vorläufers führt zu einem bioaktiven reifen Aktivin Protein. Nach (Butler et al. 2005).**

Der Signaltransduktionsweg für Aktivin und die übrigen TGFβ Mitglieder verläuft über ein Rezeptor/SMAD System. Die Aktivine benötigen für ihre Signalübertragung 2 Rezeptortypen: den Typ II Aktivin Rezeptor (Aktivin Rezeptor IIA (ACVR2A) und IIB (ACVR2B) sowie den Typ I Aktivin Rezeptor. Diese Rezeptoren sind transmembrane Serin/Threonin Kinasen, die weitere TGFβ Mitglieder wie beispielsweise Myostatin oder Nodal mit unterschiedlichen Affinitäten binden können. Gegenwärtig sind 5 Typ II Rezeptoren und 7 Typ I Rezeptoren (Aktivin receptor like kinase, ALK 1-7) bekannt (Tsuchida et al. 2009). Sobald Aktivin an den in der Zellmembran lokalisierten ACVR2A oder ACVR2B bindet, phosphoryliert die konstitutiv aktive Typ II Rezeptor Kinase den Typ I Rezeptor (ALK 4, 7) in seiner regulatorischen GS Domäne, einer Glycin- und Serin-reichen Sequenz (Wrana et al. 1994, Willis et al. 1996). Der phosphorylierte und somit aktivierte Typ I Rezeptor ist nun in der Lage seinerseits sogenannte Rezeptor-regulierte SMAD Proteine (R-SMAD) zu binden bzw. zu phosphorylieren. Nach der Komplexbildung der phosphorylierten R-SMADs mit dem Komediator SMAD Protein (Ko-SMAD) erfolgt die Translokation in den Zellkern und dort regulieren diese Transkriptionsfaktoren zusammen mit weiteren Faktoren die Expression von Zielgenen. Es werden 3 Kategorien von SMAD Proteinen unterschieden: neben den R-SMADs (SMAD1, 2, 3, 5 und 8) und Ko-SMAD (SMAD4) gibt es noch die Inhibitor SMAD Proteine (I-SMAD), zu denen SMAD6 und 7 zählen. Die I-SMADs sind in der Lage den Aktivin Signaltransduktionsweg zu inhibieren, indem sie mit den R-SMADs um den Typ I Rezeptor bzw. um das Ko-SMAD konkurrieren (Massague et al. 2005). Der Aktivin-Signalweg verläuft über die durch den aktivierten Typ I Rezeptor phosphorylierten R-SMADs2 und 3 (Abb. 8).

## EINLEITUNG

### 3.4.1.1.1

---

#### **Aktivin und Stammzellen**

Aktivin A kann die Pluripotenz in humanen embryonalen Stammzellen erhalten (Beattie et al. 2005) und wird in humanen Knochenmarkzellen sowie Monozyten exprimiert und durch Glukokortikoide und inflammatorische Zytokine reguliert (Dolter et al. 1998). Die Aktivine regulieren das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zelltypen sowie der mesenchymalen Stammzellen über einen SMAD-abhängigen Signalweg (Chen Y. G. et al. 2006, Djouad et al. 2010). Für die Funktion von Aktivin A in der Differenzierung wurden zum Teil widersprüchliche Effekte publiziert. So beschreiben Ikenoue et al (1999) eine inhibitorische Aktivin A Wirkung auf die Differenzierung von Calvarienzellen fötaler Ratten (Ikenoue et al. 1999). Dagegen stimuliert Aktivin A in murinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark die Osteoblastogenese aber auch die Formation der Osteoklasten (Gaddy-Kurten et al. 2002). Laut Sakai et al. (1993) fördert Aktivin A zwar die Bildung der Osteoklasten, jedoch nicht deren Aktivität und hat somit keine direkte knochenresorptive Wirkung (Sakai et al. 1993). *In vitro* inhibiert Aktivin A die Matrixmineralisierung im Rahmen der Differenzierung der humanen Osteoblasten-Vorläufer. Da es zusätzlich im Knochen exprimiert wird, nimmt es nicht nur eine wichtige und vielversprechende Rolle bei der osteogenen Differenzierung ein, sondern auch hinsichtlich des gesamten Knochenstoffwechsels (Eijken et al. 2007).

### 3.4.1.1.2

---

#### **Aktivin und Knochen**

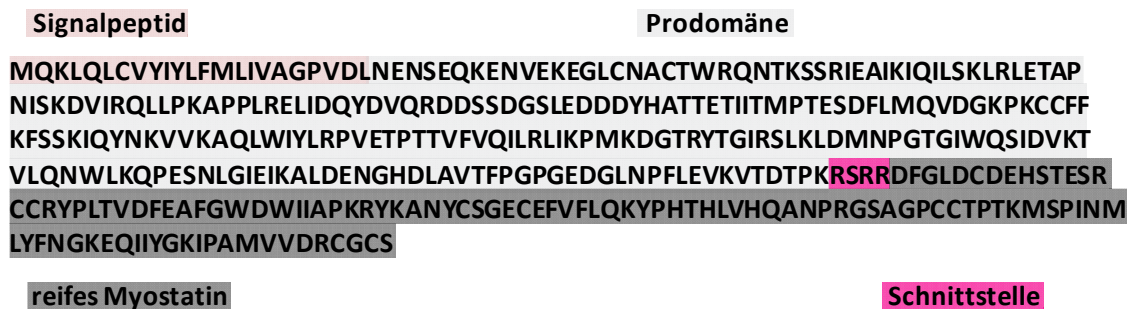
Kontroverse Aktivin A Effekte wurden nicht nur *in vitro* (s. 3.4.1.1.1) sondern auch *in vivo* publiziert. Die Verabreichung von Aktivin A direkt in einer durch Osteotomie verursachten Fraktur in Ratten führt zu einem verbesserten Heilungsprozess, außerdem zu einem signifikanten Anstieg der Kallusgröße sowie der Kallusstärke (Sakai et al. 1999). Bereits seit dem Jahr 2000 ist bekannt, dass die Gabe von rekombinantem Aktivin A die Knochenmasse der Tibia von jungen, noch wachsenden Ratten erhöht (Sakai et al. 2000). Zudem steigert die Gabe von rekombinantem Aktivin A dreimal die Woche über den Zeitraum von 12 Wochen die Knochenmasse sowie den Mineralisierungsprozess in alten ovariectomierten Ratten (Sakai et al. 2000). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde eine knochenanabole Wirkung durch eine Fusionsprotein, das als Aktivin Antagonist wirkt, in Tier und Mensch erzielt (Pearsall et al. 2008, Lotinun et al. 2010, Raje and Vallet 2010) (s. 3.4.1.4).

## EINLEITUNG

### 3.4.1.2

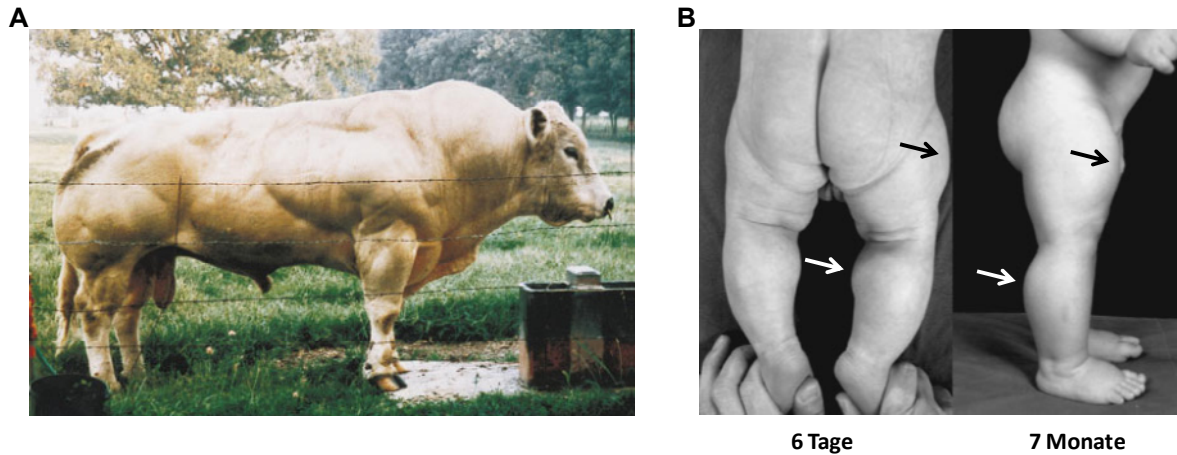
#### Myostatin

Auch das TGF $\beta$ -Mitglied Myostatin, das als Negativ-Regulator des Skelettmuskel Wachstums bekannt ist, wird als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und erst durch enzymatische Spaltung zum reifen Myostatin (MSTN, GDF8) Protein prozessiert (Abb. 6).



**Abb. 6 Aminosäuresequenz des humanen Myostatin Proteins. An der Schnittstelle mit der Sequenz RSRR erfolgt die Abspaltung der Pro-Domäne und das reife Myostatin wird freigesetzt. Sequenz aus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.**

Erst dann kann Myostatin seine Signalwirkung entfalten und mit hoher Affinität an den ACVR2B und in geringerem Maße an den ACVR2A binden (Lee S. J. and McPherron 2001). Die weitere Signalübertragung verläuft über den aktivierten Typ I Rezeptor (ALK 4, 5) und die nachfolgend phosphorylierten R-SMADs2 und 3, die sich anschließend mit SMAD4 verbinden, um in den Zellkern zu translozieren und die Transkription von Zielgenen wie z.B. MyoD zu regulieren (Abb. 8). SMAD7 unterdrückt diese Myostatin vermittelte Signalübertragung, indem es die Aktivierung von SMAD2 und 3 verhindert. Gleichzeitig induziert Myostatin die Expression von SMAD7, dies deutet auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus hin (Zhu et al. 2004, Joulia-Ekaza and Cabello 2007, Tsuchida et al. 2008). Das Myostatin Gen wird im Skelettmuskel, im Herz und im Fettgewebe exprimiert (Sharma M. et al. 1999). Bei Myostatin Knockout Mäusen wurde zudem ein Anstieg der Muskelmasse einhergehend mit einer Reduktion des Fettgewebes beobachtet (McPherron and Lee 2002). Natürlich vorkommende Myostatin Mutationen erhöhen in Rindern und im Menschen die Muskelmasse und führen zur Entwicklung einer ausgeprägten Skelettmuskulatur (Kambadur et al. 1997, McPherron and Lee 1997, Schuelke et al. 2004) (Abb. 7).



**Abb. 7 Phänotyp eines Rindes (A) bzw. eines Neugeborenen (B) mit Myostatin Mutation. (A) aus (McPherron and Lee 1997) und (B) aus (Schuelke et al. 2004).**

---

### 3.4.1.2.1

#### Myostatin und Stammzellen

In zahlreichen Untersuchungen wurde eine regulatorische Wirkung von Myostatin auf die Myogenese deutlich. Es wurde gezeigt, dass die myogenen Marker myoD und Myogenin durch Myostatin deutlich vermindert exprimiert werden und damit einhergehend die myogene Differenzierung inhibiert wird. Zusätzlich kann Myostatin die Proliferation von Myoblasten durch eine Steigerung der *P21* Expression inhibieren (Rios et al. 2002, Lee S. J. 2004). Zur Funktion von Myostatin in Hinblick auf die adipogene Differenzierung gibt es gegensätzliche Ergebnisse. In der murinen mesenchymalen Stammzelllinie C3H10T(1/2) stimuliert rekombinantes Myostatin die Adipogenese (Artaza et al. 2005). Gleichzeitig wurde in weiteren Studien eine hemmende Wirkung von Myostatin auf die adipogene Differenzierung von murinen oder bovinen Adipozyten Vorläufer-Zelllinien festgestellt (Rebbapragada et al. 2003, Hirai et al. 2007). Als Ursache der gegenläufigen Ergebnisse müssen Unterschiede hinsichtlich des Versuchsaufbaus, der Kultivierungsbedingungen und der verwendeten Materialien (Zelllinien, rekombinantes Myostatin) berücksichtigt werden. Guo et al. (2008) haben herausgefunden, dass Myostatin die Adipogenese in hMSC von jungen (20 bis 40 Jahre) nicht-adipösen Spendern durch eine Myostatin vermittelte Aktivierung von SMAD3 und der nachfolgenden Herunterregulation der Zielgene *PPARG* und *CEBPA* inhibiert (Guo W. et al. 2008). Der ACVR2B Rezeptor, an den Myostatin mit hoher Affinität bindet, konnte in murinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden und murine mesenchymale Stammzellen,

## EINLEITUNG

die aus dem Knochenmark von Myostatin-defizienten Mäusen gewonnen wurden, weisen eine erhöhte osteogene Differenzierungsfähigkeit auf. Dieser Effekt wird durch eine Behandlung mit rekombinantem Myostatin nicht abgeschwächt (Hamrick et al. 2007).

### 3.4.1.2.2

#### Myostatin und Knochen

---

Myostatin Knockout Mäuse weisen neben einer deutlich erhöhten Skelettmuskelmasse zusätzlich eine gesteigerten Knochenmasse bzw. -festigkeit auf (Hamrick et al. 2003). 2 bzw. 4 Wochen nach einer Osteotomie haben Myostatin-defiziente Mäuse einen größeren Kallus gebildet, da Progenitorzellen ungehindert an die verletzte Stelle rekrutiert werden können und dort proliferieren können. Zusätzlich kommt es durch den Myostatin Mangel verstärkt zu einer *SOX5* Expression, was zu einer Anregung der Chondrozyten Proliferation führt, gleichzeitig werden *RUNX2* sowie *OSX* vermindert exprimiert. Aufgrund der begünstigten Entwicklung eines chondrogenen Gewebes unter der Abwesenheit von Myostatin kann schließlich Knochengewebe entstehen (Kellum et al. 2009).

### 3.4.1.3

#### Natürliche Aktivin und Myostatin Antagonisten

---

Je nach der Verteilung in den entsprechenden Geweben und dort vorherrschender lokaler Konzentration können Liganden wie z.B. BMP4, BMP7, GDF1, GDF4, Inhibine, Aktivine oder Myostatin um den ACVR2B konkurrieren und somit indirekt als Antagonisten für andere Liganden wirken. Zusätzlich existieren sezernierte Proteine, welche die Liganden extrazellulär binden und dadurch deren Interaktion mit dem eigentlichen Rezeptor unterbinden. Follistatin bindet als Decoy-Rezeptor an die Aktivine und die BMPs, aber auch an Myostatin, und verhindert so deren Signaltransduktion. Dadurch spielt Follistatin eine wichtige regulatorische Rolle z.B. im Knochen- und Muskelmetabolismus, aber auch im Differenzierungsprozess (Schneyer et al. 2004). In transgenen Follistatin-exprimierenden Mäusen bindet Follistatin an das C-terminale Myostatin-Dimer, Myostatin wird neutralisiert und die Tiere zeigen eine dramatisch erhöhte Muskelmasse und somit einen ähnlichen Phänotyp wie die Myostatin Knockout Mäuse (Lee S. J. and McPherron 2001). In Myostatin-defizienten Mäusen resultiert eine Follistatin Überexpression in einem erheblichen Muskelzuwachs. Dies legt zum einen die Vermutung nahe, dass Myostatin seine Muskulatur-unterdrückende Wirkung im Zusammenspiel mit weiteren TGF $\beta$ -Liganden entfaltet bzw. dass Follistatin über eigene Muskel-stimulierende Effekte verfügt (Lee S. J. 2007). Letzteres wird von der Erkenntnis unterstützt, dass Follistatin Knockout Mäuse bei der Geburt über eine reduzierte



## EINLEITUNG

Muskelmasse verfügen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Matzuk et al. 1995). 2010 haben Lee et al (2010) Hinweise gefunden, dass Follistatin neben Myostatin auch Aktivin A als weiteren TGF $\beta$ -Liganden inhibiert und so regulatorisch auf die Muskelmasse einwirkt (Lee S. J. et al. 2010). Zusätzlich wird Myostatin von den Proteinen Follistatin-related gene (FLRG) sowie Myostatin Propeptid *in vitro* und *in vivo* inhibiert. Ebenso wie Follistatin ist auch FLRG in der Lage, zusätzlich an Aktive und BMPs zu binden und somit ihre Signalwirkung zu neutralisieren (Hill et al. 2002). Nach der proteolytischen Prozessierung wird das reife Myostatin Protein frei, durch Bindung an sein Propeptid entsteht ein biologisch inaktiver Komplex, der nicht an den Myostatin Rezeptor binden kann (Lee S. J. and McPherron 2001, Thies et al. 2001). Es ist daher nicht überraschend, dass eine Überexpression des Myostatin Propeptides in transgenen Tieren zu einer beträchtlichen Steigerung der Muskelmasse führt (Lee S. J. and McPherron 2001). Darüber hinaus ist das growth and differentiation factor-associated serum protein1 (GASP1) in der Lage, nicht nur das reife Myostatin Protein, sondern auch das Myostatin Propeptid zu neutralisieren (Hill et al. 2003). Insgesamt ist für die Auswirkungen auf die Gewebe oder das betreffende System die Balance zwischen den Antagonisten und den TGF $\beta$ -Liganden entscheidend.

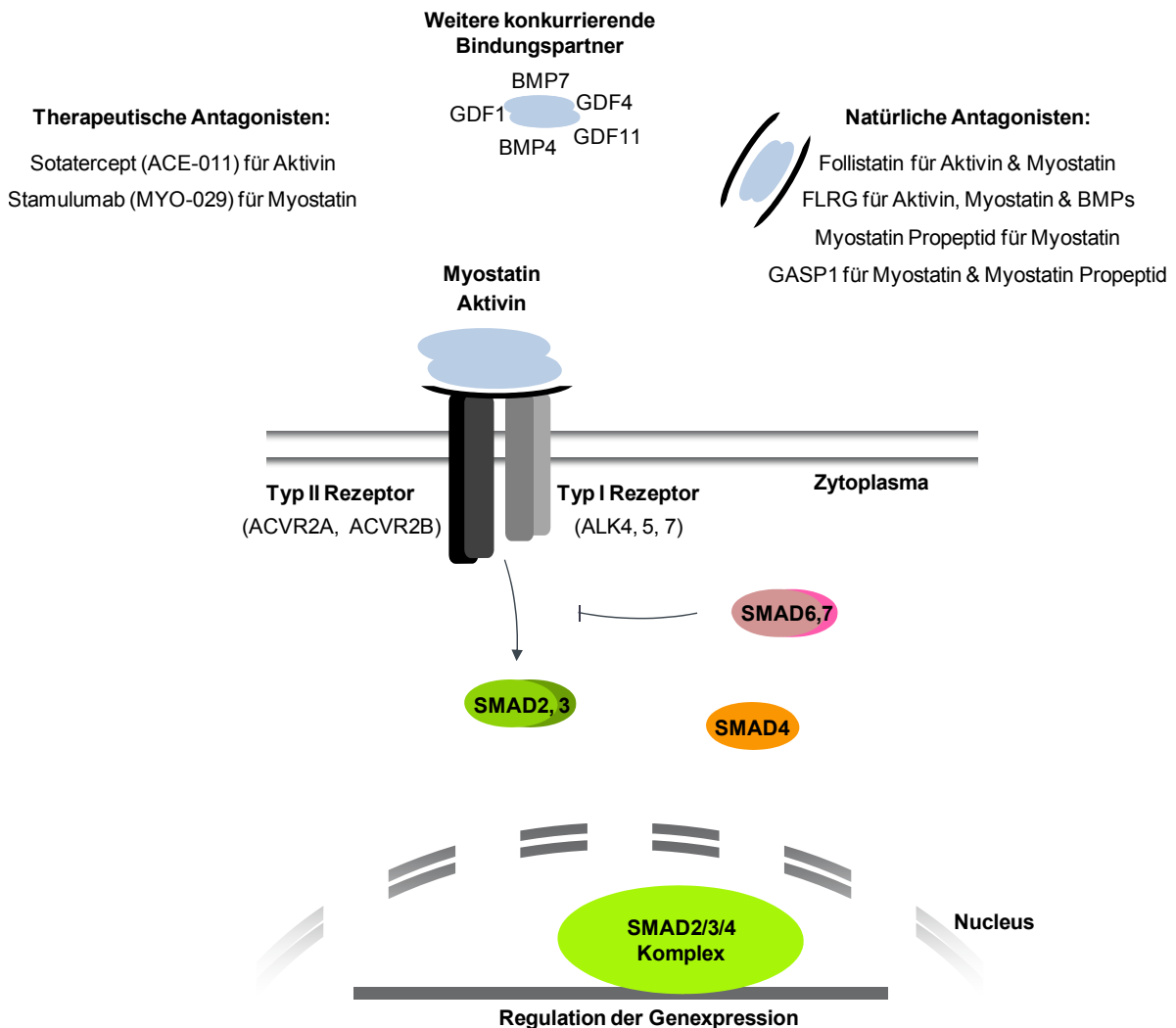
### 3.4.1.4

#### Therapeutische Aktivin und Myostatin Antagonisten

---

Junge gesunde, adulte weibliche Cynomolgus Affen wurden zweimal die Woche mit 10 mg/kg humanem ACVR2A-IgG1-Fc (ACE-011, Sotatercept) oder Placebo therapiert. Nach 3 Monaten zeigten die ACE-011 behandelten Tiere einen signifikanten Anstieg des Knochenvolumens sowie der Knochenbildungsrate einhergehend mit einer Abnahme der Osteoklasten auf der Oberfläche (Lotinun et al. 2010). Bereits 2 Jahre zuvor wurde ein anaboler Effekt des ACVR2A-mFc Fusionproteins, bestehend aus der extrazellulären Domäne von ACVR2A und murinem IgG2a-Fc, auf den Knochen in Mäusen mit Knochenverlust (ovarektomierte bzw. normale Mäuse) nachgewiesen (Pearsall et al. 2008). Mittlerweile wird ein Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Domäne von ACVR2A und der Fc-Domäne von humanem IgG1, mit Aktivin-antagonistischer Wirkung klinisch als Medikament gegen die Tumorinduzierte bzw. die Chemotherapie-induzierte Anämie sowie die Osteoporose unter dem Namen Sotatercept (ACE-011) erprobt (Raje and Vallet 2010). Mit MYO-029 (Stamulumab) wurde ein gegen Myostatin neutralisierender Antikörper in einer Phase-I/II klinischen Studie bei erwachsenen Muskeldystrophie-Patienten getestet. Bei guter Verträglichkeit konnten keine Verbesserungen hinsichtlich der Stärke oder Funktion der Muskeln festgestellt werden (Wagner K. R. et al. 2008a) (Abb. 8).





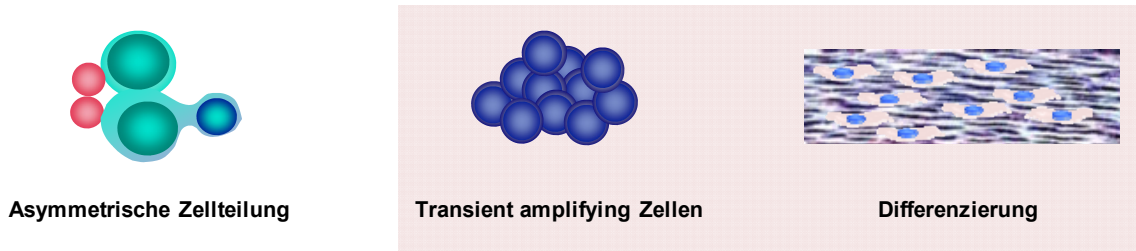
**Abb. 8 Die Signaltransduktion der TGF $\beta$ -Liganden Aktivin und Myostatin über die Aktivin Rezeptoren. Nach (Tsuchida et al. 2009).**

### 3.5 | Zielsetzung der Arbeit

Die eingeführten Morphogene 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3), Aktivin A (AA), Myostatin (MSTN) sowie Low Oxygen (LO) nehmen vielfältige und wichtige regulatorische Funktionen im menschlichen Organismus ein. Aus der Funktionseinheit zwischen Muskulatur und Knochen und der Tatsache, dass die Muskelstärke einen sehr bedeutenden Einfluss auf die Stärke der Knochen hat, ergeben sich viele therapeutische Angriffspunkte für 1,25D3, AA und MSTN. Insbesondere mit zunehmendem Alter rücken 1,25D3, AA und MSTN in den Fokus, da in dieser Phase der Serumspiegel von 1,25D3 sinkt und gleichzeitig die Serum Konzentration von AA und MSTN ansteigt. Somit stellen diese

## EINLEITUNG

Modulatoren wichtige Komponenten für die Verbesserung der Geweberegeneration bzw. der *in situ* Geweberegeneration dar (Jakob et al. 2012a). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Einflüsse der Morphogene 1,25D3, AA, MSTN und LO auf die Selbsterneuerungs-Kapazität, die frühe Phase des Kommittments, die Differenzierungsfähigkeit und die Seneszenzentwicklung von hMSC zu untersuchen (Abb.9).



**Abb. 9** Ob die Morphogene 1,25D3, MSTN, AA und LO hMSC vor Stress, frühzeitiger Differenzierung und Seneszenzentwicklung schützen können, wurde in hMSC während der Phase der transient amplifying Zellproliferation und der Zelldifferenzierung (rosa markiert) untersucht. Nach (Jakob et al. 2012a).

Aufgrund der zukünftigen therapeutischen Relevanz der hMSC in der Klinik bei der Behandlung degenerativer Erkrankungen (Arthrose, Osteoporose) im Skelett- und Bewegungsapparat ist es von besonderem Interesse, Verfahren zu entwickeln, mit deren Hilfe die Qualität aber auch die Seneszenzentstehung in hMSC positiv beeinflusst bzw. verzögert werden kann. Durch den Einsatz dieser Zellen bei der zellbasierten Regeneration soll ein Heilungsprozess von erkrankten und durch Alterungsvorgänge degenerierten Geweben erzielt und somit das regenerative Potential in kranken und alten Menschen gesteigert werden.

## 4 MATERIAL

### 4.1 | Geräte

Geräte	Hersteller
AxioCam MRC	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Axioskop 2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
BD LSR I	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD LSR II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Biofuge	Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode, Deutschland
Brutschrank, Inkubator HERAcell 240	Heraeus Sensor Technology, Kleinostheim, Deutschland
Consort E835 Power Supply	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
CLSM Leica TCS SP2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Heizblock	HLC-Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Hochleistungs pH-mV-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Mikropipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	ABIMED GmbH, Langenfeld, Deutschland
Mikroskop Wilovert	Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
Multifuge 1 S-R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Deutschland
Pipetboy	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Sterilwerkbank HERA SAFE KS	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler peQSTAR	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler Primus 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler Primus	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
lab4you TS-100 ThermoShaker	ProfiLab24 UG, Bernau bei Berlin, Deutschland
UV-Transilluminator mit Kamera Modul	LFT Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
Vortexer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Waage Scout II	OHAUS Corporation, Parsippany, USA
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland

**Tab. 1 Liste der verwendeten Geräte sowie deren Hersteller.**

## 4.2 | Verbrauchsmaterial

Material	Firma
BD Falcon™ 5 ml	BD GmbH, Heidelberg, Deutschland
Filter (2 mm, 45 mm)	Sartorius Stedim biotech S.A., Aubagne, Frankreich
Kryoröhrchen	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multiwell Platten (6, 12, 96 Well-Format)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
NucleoSEQ Columns	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Optical Flat Cap Stripes	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PCR SoftTubes, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischalen (35 mm, 96 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	ABIMED GmbH, Langenfeld, Deutschland
Zellschaber (24 cm, 30 cm)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zellsiebe (100 µm)	SPL LIFE SCIENCE, Gyeonggi-Do, Korea
25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

**Tab. 2** Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

## 4.3 | Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Firma
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Alcian Blue 8GX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Alizarin Rot S	Chroma-Gesellschaft Schmid & Co., Stuttgart, Deutschland
Aluminiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumsulfatlösung (25 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Aceton	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) für die Zellkultur	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Crystal Violet	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H <sub>2</sub> DCF-DA)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTP-Set	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

## MATERIAL

Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
HPLC-H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
K-Hexacyanoferrat II	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
K-Hexacyanoferrat III	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Loading Dye (6x)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Methanol	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
M-MLV-Puffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N,N-Dimethyl-Formamid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Oligo-(dT)-Primer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Ölrot O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RT-PCR-Puffer S (10 x)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
RT-PCR-Puffer Y (10 x)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
peQGold 100 bp DNA Leiter Plus	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
peQGold 1 kb DNA Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Proteininhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mount Aqua	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (10000 x)	BioWhittaker Molecular Application, Rockland, USA
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-Cl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TritonX-100	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

## MATERIAL

Vectashield Hard<sup>®</sup> mit DAPI

Linaris Biolog. Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland

Xylencyanolblau

Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

Zitronensäure

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Tab. 3 Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.**

## 4.4 | Kits

Kit	Firma
Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit 86-C	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
CellTiter-Glo <sup>®</sup> 3/7 Luminescent Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Caspase-Glo <sup>®</sup> 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Nucleo Spin <sup>®</sup> RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Nucleo Trap <sup>®</sup>	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Nucleo Bond <sup>®</sup> PC 500	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
PeqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

**Tab. 4 Liste der verwendeten Kits.**

## 4.5 | Primer für die semi-quantitative RT-Polymerase-Kettenreaktion

Die nachfolgend aufgeführten Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH in Ulm, Deutschland erworben.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße (bp)	Zyklen (n)	T <sub>m</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)
ACAN for	GGGTTTTCTGACTCTGAGG	180	38	59	3
ACAN rev	GCATGGGGTCGATGAAATAG	180	38	59	3
ACVR2A for	TTCCGGAGATGGAAGTCAC	451	42	57	1,5
ACVR2A rev	TGATCAGCCAAAGATCCACA	451	42	57	1,5
ACVR2B for	TGCTGTGAAGGCAACTTCTG	447	35	57	1,5
ACVR2B rev	CTCGGCAGCAATGAACTGTA	447	35	57	1,5
ALPL for	TGGAGCTTCAGAAGCTCAACAC	454	33	51	1,5
ALPL rev	ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGT	454	33	51	1,5
CD24 for	AGGGCAATGATGAATGAGAAT	231	35	56	3
CD24 rev	CTGGGCGACAAAGTGAGA	231	35	56	3
DPT for	CCCATATTCCTGCTGGCTAA	154	32	53	3
DPT rev	AAGAACCCATAGCATCCAAGTC	154	32	53	3
EEF1A1 for	AGGTGATTATCCTGAACCATCC	233	30	54	1,5
EEF1A1rev	AAAGGTGGATAGTCTGACTGTT	233	30	54	1,5

## MATERIAL

FABP4 for	AACCTTAGATGGGGGTGTC	177	32	60	1,5
FABP4 rev	ATGCGAACTTCAGTCCAGGT	177	32	60	1,5
FGFR2 for	CTCCTCCATGAACTCCAAC	872	38	53	1
FGFR2 rev	CTGGCTTATCCATTCTGTG	872	38	53	1
FOXO1a for	GACGCCGTGCTACTCGTT	458	37	55	3
FOXO1a rev	CGGTTCATACCCGAGGTG	458	37	55	3
FOXO3a for	AACCCAGGGCGCTCTTGGTG	281	38	62	3
FOXO3a rev	ATGAGTTCCTACTACGGATAATGG	281	38	62	3
FOXO4 for	CCCTCTCAGGAGCCATCA	530	37	55	3
FOXO4 rev	ACCTGGTCCGTAGGGGAG	530	37	55	3
HELLS for	ATGCTGCCAGAACTAA	354	38	46	2
HELLS rev	TGTAACAAGGCGATAA	354	38	46	2
HIF1A for	TGCTCATCAGTTGCCACTTC	177	38	57	2
HIF1A rev	AAACCATCCAAGGCTTTCAA	177	38	57	2
IGFBP5 for	GACCGCAGAAAGAAGCTGAC	210	55	27	1,5
IGFBP5 rev	GAATCCTTTGCGGTCACAAT	210	55	27	1,5
KLF4 for	TGGGTCTTGAGGAAGTGCTG	287	40	63	2
KLF4 rev	CTTGAGATGGGAAGCTTTGTG	287	40	63	2
LPL for	GAGATTTCTCTGTATGGCACC	276	35	55	2,5
LPL rev	CTGCAAATGAGACACTTTCTC	276	35	55	2,5
MYC for	CACGAACTTTGCCATAGCA	303	40	62	1,5
MYC rev	TCCTCCTCGTCGAGTAGAAAT	303	40	62	1,5
NANOG for	TTCCTCCTCCATGGATCTG	448	35	51	2
NANOG rev	ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC	448	35	51	2
NOG for	CACTACGACCCAGGCTTCAT	119	37	53	3
NOG rev	ATGGGGTACTGGATGGGAAT	119	37	53	3
OC for	ATGAGAGCCCTCACACTCTC	293	35	60	2,5
OC rev	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	293	35	60	2,5
CYP24A1 for	TATGAGGCTTACGCCGAGTG	446	40	62	1,5
CYP24A1 rev	CCGCTTCCCTGAGTTGGATG	446	40	62	1,5
OPN for	ACCCTTCCAAGTAAGTCCAA	400	40	58	2,5
OPN rev	GTGATGTCCTCGTCTGTAGC	400	40	58	2,5
RUNX2 for	TCCGCACCGACAGCCCCAACTT	240	35	60	2,5
RUNX2 rev	CGTCCACTCCGGCCACAAATC	240	35	60	2,5
SOX2 for	CCCCTGTGGTTACCTCTTCC	261	40	52	2,5
SOX2 rev	CCTCCATTTCCCTCGTTTT	261	40	52	2,5
TP53 for	CCTCCTCAGCATCTTATCCG	259	28	55	1
TP53 rev	GCACAAACACGCACCTCAAA	259	28	55	1
TxNIP for	CCTGGTAATTGGCAGCAGATC	199	28	51	2
TxNIP rev	CTTGAGACCATCCATGTCA	199	28	51	2
P15 for	CGTTAAGTTTACGGCCAACG	302	43	58	1

## MATERIAL

P15 rev	GGTAGAGTGGCAGGGTCT	302	43	58	1
P16 for	GGTGCGGGCGCTGCTGGA	210	43	46	1,5
P16 rev	AGCACCACCAGCGTGTCC	210	43	46	1,5
P21 for	GGAAGACCATGTGGACCTGT	403	27	58	1
P21 rev	ATGCCCAGCACTCTTAGGAA	403	27	58	1
P27 for	AGTTCGGCTCTGTGAACACC	336	27	58	1
P27 rev	CCACAGTACTGCCACCACAC	336	27	58	1
PBX1 for	ACCATACGGAGCTGGAGAAA	450	40	57	1,5
PBX1 rev	CAGCTGTTTTGGCAGCATAA	450	40	57	1,5
PBX2 for	GTGTCCCCTGACAACCTCCAT	450	40	56	1,5
PBX2 rev	CCTCTTGTGCCAAACCAGT	450	40	56	1,5
OCT4 for	CCGCCGTATGAGTTCTGTG	360	40	59	2,5
OCT4 rev	GATGGTCGTTGGCTGAATA	360	40	59	2,5
PSG1 for	TGAAGTCAGCCTTGTTTGG	240	35	55	2,5
PSG1 rev	TTCCCTCTATGGGCATCTC	240	35	55	2,5
PSG5 for	TACAAAGGACAACCTGATGGACC	540	30	57	2,5
PSG5 rev	CTGGGGAGGTCTGGACCAT	540	30	57	2,5
PPARG for	GCTGTTATGGGTGAACTCTG	352	40	61	2,5
PPARG rev	ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC	352	40	61	2,5
WISP2 for	GAGTACCCCTGGTGCTGGAT	211	28	55	3
WISP2 rev	GTCTCCCCTCCCGATACA	211	28	55	3

**Tab. 5 Liste der verwendeten Primer für die semi-quantitative RT-PCR.**

## 4.6 | Rekombinante humane Proteine

Rekombinante humane (rh) Proteine	Firma
rh Aktivin A	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
rh Myostatin	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

**Tab. 6 Liste der verwendeten rekombinanten humanen Proteine.**

## 4.7 | Antikörper

Antikörper	Firma
<b>1. Antikörper</b>	
Oct-3/4 (H-134): sc9081	Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA
p16 (C-20): sc-468	Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA
<b>2. Antikörper</b>	
NorthernLights™ Anti-rabbit IgG-NL557	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland



## MATERIAL

Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	
FITC Mouse Anti-Human HLA-DR	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FITC Mouse Anti-Human CD45	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PE Mouse Anti-Human CD73	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mouse Anti-HumanCD90:RPE	MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf, Deutschland
FITC Mouse Anti-Human CD45	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mouse Anti-HumanCD34:FITC	MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mouse Anti-HumanCD105:RPE	MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mouse IgG1 Negative Control:FITC	MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mouse IgG1 Negative Control:RPE	MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf, Deutschland

**Tab. 7 Liste der verwendeten Antikörper.**

## 4.8 | Enzyme

Enzyme	Firma
MMLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
DNase	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
RNase	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

**Tab. 8 Liste der verwendeten Enzyme.**

## 4.9 | Nährmedien und Zusätze für die Gewebekultur

Außer 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3), L-Ascorbat acid 2-phosphate und IST+1 (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) wurden alle Nährmedien und Zusätze, die für die Arbeit mit hMSC benötigt wurden, von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland, erworben. Das mit Stern gekennzeichnete IST+1 setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 10 mg/ml bovines Insulin, 5 mg/ml Transferrin, 5 µg/l Selenit, 4,7 µg/ml Linolsäure sowie 0,5mg/ml BSA.

hMSC-Medium	
DMEM Ham`s F 12 mit L-Glutamin	500 ml
FCS (fetal calf serum)	10 %
Penicillin	1 U/ml
Streptomycin	100 g/ml
L-Ascorbat acid 2-phosphate	50 µg/ml
Chondrogenes Differenzierungsmedium	
DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin	500 ml
Penicillin	1 U/ml

## MATERIAL

Streptomycin	100 g/ml
L-Ascorbat acid 2-phosphate	50 µg/ml
Dexamethason	100 nM
Pyruvat	100 µg/ml
L-Prolin	40 µg/ml
ITS+1*	1 %
TGFβ1	10 ng/ml
<b>Adipogenes Differenzierungsmedium</b>	
DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin	500 ml
FCS (fetal calf serum)	10 %
Penicillin	1 U/ml
Streptomycin	100 g/ml
Dexamethason	1 µM
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	0,5 mM
Insulin	1 µg/ml
Indomethacin	100 µM
<b>Osteogenes Differenzierungsmedium</b>	
DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin	500 ml
FCS (fetal calf serum)	10 %
Penicillin	1 U/ml
Streptomycin	100 g/ml
L-Ascorbat acid 2-phosphate	50 µg/ml
β-Glycerophosphat	10 mM
Dexamethason	100 nM
<b>Stimulationszusätze im hMSC-Medium</b>	
1,25-Dihydroxyvitamin D3	100 nM
rh Aktivin A	0,01 µg/ml oder 0,1 µg/ml
rh Myostatin	0,01 µg/ml oder 0,1 µg/ml

**Tab. 9** Tabelle der verwendeten Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur.

## 4.10 | Puffer und Lösungen

Je nach benötigter Reinheit wurden Puffer sowie Lösungen mit deionisiertem Wasser, destilliertem deionisiertem Wasser (Aqua bidest.) oder mit HPLC-Wasser angesetzt.

<b>DNA-Marker</b>	
peQGold DNA Leiter (100 bp, 1 kb)	10 µl
Ladepuffer	10 µl
Aqua bidest.	ad 100 µl
<b>DNA-Ladepuffer</b>	
Glycerol	25 ml

## MATERIAL

0,5 M EDTA, pH 8,0	100 µl
Xylencyanolblau	125 mg
Bromphenolblau	125 mg
Aqua bidest.	ad 50 ml
<b>10 x TBE</b>	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA, pH 8,0	40 ml
Aqua bidest.	ad 1 l
<b>1 x PBS (pH 7,4)</b>	
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	9,5 g
Aqua bidest.	ad 1 l
auf pH 7,4 einstellen	
<b>0,2 M Zitronensäure/Na-Phosphat (pH 6,0)</b>	
0,1 M Zitronensäurelösung	36,85 ml
0,2 M Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	63,15 ml
<b>Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierlösung</b>	
Formaldehyd	2 %
Glutaraldehyd	0,2 %
1 x PBS	ad 50 ml
<b>β-Galactosidase-Färbelösung</b>	
X-Gal*	1 mg/ml
Zitronensäure/Na-Phosphat (pH 6,0)	40 mM
K-Hexacyanoferrat II	5 mM
K-Hexacyanoferrat III	5 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
HPLC-Wasser	ad 200 ml
<b>Seneszenz-assoziierte β-Galactosidase-Lösung</b>	
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (pH 5,1)	50 mM
β-Mercaptoethanol	40 mM
O-Nitrophenyl-Galaktopyranosid	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HPLC-Wasser	ad 200 µl
<b>Kernechtrot-Lösung</b>	
Aluminiumsulfat	50 g/l
Kernechtrot	1 g/l
Aqua bidest.	ad 100 ml
<b>Trypanblau-Lösung</b>	
Trypanblau	0,4 %
NaCl	0,9 %

## MATERIAL

Aqua bidest.	ad 40 ml
<b>1 % Alcianblau-Lösung (pH 1,0)</b>	
<b>Citrat-Aceton-Formaldehyd-Fixierungslösung</b>	
Aceton	66,3 %
Citrate Solution**	25,5 %
Formaldehyd (37 %)	8,2 %
<b>0,5 % Ölrot O-Stammlösung</b>	
Ölrot O	0,005 g/L
Isopropanol	ad 100 ml
▶ Für 0,3 % Ölrot O Gebrauchslösung 6 Teile der 0,5 % Lösung mit 4 Teilen Aqua bidest. mischen und filtrieren	
<b>1 % Alizarin Rot S-Lösung</b>	
Alizarin Rot S (Alizarin sulfosaures Natrium)	1 %
Ammoniaklösung (25 %)	0,25 %
Aqua bidest.	ad 100 ml

**Tab. 10 Tabelle der verwendeten Puffer und Lösungen.** \*X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid). \*\*Citrat Solution (Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit No. 86C).

## 4.11 | Software und Internet-Seiten

Software	Firma
AxioVision 4.4.1.0	Carl Zeiss Vision GmbH, Aalen, Deutschland
AxioVision Rel. 4.6	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
BD CellQuest Pro™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BioCapt MW, Version 99	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
BioEdit	Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA
BioProfil Bio I.D., Version 99	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
FlowJo	<a href="http://www.flowjo.com/">http://www.flowjo.com/</a>
Gene Cards	<a href="http://www.genecards.org">http://www.genecards.org</a>
LTF Bio 1D	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
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/">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>

**Tab. 11 Liste der benutzten Software und Internet-Seiten.**

# 5 METHODEN

## 5.1 | Zellbiologische Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden an einer Sterilbank mit sterilen Materialien durchgeführt, dabei wurden stets Handschuhe getragen.

### 5.1.1

---

#### Isolierung von hMSC

Primäre humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden aus Hüftköpfen, die infolge der Implantation einer Hüftendoprothese entnommen wurden, isoliert. Neben der Dysplasie war die altersbedingte Arthrose die Ursache für eine Hüftoperation, die in der Orthopädischen Klinik, König-Ludwig-Haus in Würzburg durchgeführt wurde. Die Spender waren zwischen 32 und 83 Jahre alt, im Durchschnitt 63 Jahre  $\pm$  12 Jahre (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 60$ ). Die Isolation der hMSC fand unter der informierten Einwilligungserklärung der Patienten sowie der Befürwortung der lokalen Ethik-Kommission der Universität Würzburg statt. Die hMSC wurden aus der dabei anfallenden Spongiosa des Hüftkopfes oder der Hüftpfanne nach einem leicht modifizierten Protokoll von Nöth et al. (2002) isoliert (Noth et al. 2002). Spongiosa aus dem Beckenkamm oder dem Hüftkopf wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt, mit hMSC-Medium (Kultivierungsmedium, Expansionsmedium) gewaschen und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des fetthaltigen Überstandes und der erneuten Befüllung des Röhrchens mit 10 ml hMSC-Medium wurden die Zellen durch kräftiges Schütteln und Vortexen aus der Spongiosa ausgewaschen. Das auf diese Weise mit Zellen angereicherte Expansionsmedium wurde über einen Zellfilter, der größere Knochenpartikel zurückhielt, in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Diese Vorgehensweise wurde fünfmal wiederholt. Danach wurden die Zellen bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes und der Resuspendierung der hMSC in 20 ml hMSC-Medium wurden die Zellen gezählt und in einer Dichte von ca.  $1 \times 10^9$  Zellen in  $175 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen mit 25 ml hMSC-Medium ausgesät. Etwa 3 Tage nach der Isolierung wurde der Überstand mit nicht-adhärenenten Zellen (u. a. Erythrozyten, Plasmozyten, Leukozyten) entfernt und die mittels Plastikadhärenz selektionierten hMSC wurden 1 x mit PBS gewaschen und danach in hMSC-Medium weiterkultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurde das hMSC-Medium gewechselt, bis die Zellen eine Subkonfluenz von 80 bis 90 % erreichten. Anschließend wurden die Zellen in Passage 1 (P1) subkultiviert.

## METHODEN

### 5.1.2

#### Kultivierung von hMSC

---

Die Kultivierung der hMSC erfolgte in einem Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit sowie 5 % Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>). In Passage (P) 0 benötigten hMSC etwa 2 bis 3 Wochen bis zum Erreichen der Subkonfluenz. Sobald die hMSC eine Subkonfluenz von 80 bis 90 % erreicht hatten, wurden sie passagiert (subkultiviert). Dabei wurde zunächst das verbrauchte hMSC-Medium abgesaugt und die Zellen gründlich mit 1 x PBS gewaschen. Danach wurde das zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmte 1 x Trypsin/EDTA (0,5 g/l) auf die Zellen in der Zellkulturflasche gegeben und für kurze Zeit im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 5 min wurde mit Hilfe des Mikroskops überprüft, ob sich die am Boden der Zellkulturfläche haftenden hMSC vollständig abgelöst haben. War dies der Fall wurde die enzymatische Trypsin-Reaktion durch Zugabe von hMSC-Medium gestoppt und die Zellsuspension 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Nach Absaugen des überständigen hMSC-Mediums wurde das gebildete Zellpellet in 10 ml hMSC-Medium vorsichtig resuspendiert und über einen Zellfilter vereinzelt. Abschließend wurden die hMSC gezählt (s. 5.1.4) und in einer definierten Zellzahl sowie in Abhängigkeit der geplanten Experimente in Zellkulturflaschen (25, 75 oder 175 cm<sup>2</sup>) oder in Multiwell-Platten (6-well, 12-well oder 96-well) kultiviert. Während der Kultivierungsphase wurden die Zellen alle 3-4 Tage mit frischem hMSC-Medium versorgt. Um die hMSC möglichst schonend zu behandeln, wurde das Medium vor der Verabreichung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

### 5.1.3

#### Kryokonservierung von hMSC

---

Je nach Bedarf wurden hMSC bei jeder Subkultivierung mit einer definierten Zellzahl in Kryoröhrchen eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt erneut aufzutauen und weiterkultivieren zu können. Bei diesem Vorgang wurden je mindestens  $2,0 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium in die Kryoröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde vorsichtig eine Mischung aus hitzeinaktiviertem FCS und DMSO im Verhältnis 1:1 langsam auf die Zellsuspension des Kryoröhrchens getropft und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen bei -80 °C für eine Nacht zwischengelagert und abschließend in flüssigem Stickstoff (-196 °C) konserviert. Um den Vorgang des Auftauens möglichst rasch durchzuführen, wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff geholt und in das 37 °C warme Wasserbad gehalten. Die so aufgetaute Zellsuspension im Kryoröhrchen wurde in hMSC-Medium aufgenommen und zur Entfernung des DMSOs 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des gebildeten Überstandes

## METHODEN

wurde das Zellpellet in frischem hMSC-Medium resuspendiert und je nach vorliegender Zellzahl in 25 cm<sup>2</sup> (2,0 x 10<sup>5</sup> bis 3,0 x 10<sup>5</sup> Zellen) oder 75 cm<sup>2</sup> (ab 3,0 x 10<sup>5</sup> Zellen) Zellkulturflaschen kultiviert.

### 5.1.4

---

#### Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität wurden die subkonfluenten (80 bis 90 %) Zellmonolayer gründlich vom Kultivierungsmedium befreit, mit PBS gewaschen und danach abtrypsiniert. Die abgelösten hMSC wurden 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das gebildete Pellet in 10 ml frischem hMSC-Medium resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gut vermischt und 10 µl dieser Mischung wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zählfläche der Neubauer-Zählkammer ist in 4 x 4 Quadrate aufgeteilt und lebende Zellen innerhalb dieser 4 x 4 Quadrate wurden gezählt. Lebende Zellen nehmen den Trypanblau Farbstoff nicht auf und erscheinen somit transparent, bei toten Zellen tritt der Farbstoff durch die poröse Zellmembran in das Zytoplasma ein und färbt diese blau. Aus der gezählten Zellzahl der 4 x 4 Quadrate wird ein Mittelwert gebildet, der anschließend mit dem Verdünnungsfaktor 2 sowie dem Kammerfaktor 10<sup>4</sup> multipliziert wird (Lindl 2002).

#### 5.1.4.1

---

##### *In vitro* Alterung von hMSC

Bei der *in vitro* Alterung wurden die hMSC ab P1 bis zum Erreichen der letzten seneszenten Passage x (Px) kultiviert. Die seneszente Px charakterisierte sich dadurch, dass die hMSC innerhalb von 3 Wochen keine 80 bis 90 %ige Konfluenz erreichten und die Zellen morphologische Veränderungen aufwiesen. Neben ihrem deutlich höheren granulösen Anteil sind seneszente Zellen deutlich breiter und flächiger als nicht-seneszente Zellen. Hatten die hMSC ihre seneszente Px erreicht, wurde die Kultivierung beendet. Bei jeder Subkultivierung wurde im Laufe der Kultivierungsphase ab P0 bis Px eine definierte Zellzahl mit 5000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Darüber hinaus wurde nach jeder Passage RNA geerntet und je nach Versuchsansatz gegebenenfalls Zellen für weitere Experimente wie beispielsweise Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galactosidase Färbungen oder immunzytochemische Färbungen ausgesät.

## METHODEN

### 5.1.4.2

---

#### Analyse der Zellwachstumsrate

Die Wachstumsrate der kultivierten hMSC wurde über die Berechnung der Populationsverdopplungen analysiert. Zu Beginn wurden die Zellen der P0 nach Erreichen einer 80 bis 90 %igen Subkonfluenz abtrypsiniert und abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Nach Entfernen des Überstandes wurde das gebildete Zellpellet in 10 ml frischem hMSC-Medium resuspendiert und über einen Zellsieb vereinzelt. Anschließend erfolgten die Zählung der Zellen sowie die Subkultivierung in einer definierten Zelldichte (5000 Zellen pro  $\text{cm}^2$ ) in frischem Expansionsmedium. Bei jeder darauffolgenden Passagierung wurde die Zellzahl ermittelt und die Anzahl der Populationsverdopplungen (PD) rechnerisch nach folgender Formel bestimmt (Cristofalo et al. 1998):

$$PD = [\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_1)] / \log_{10}(2)$$

Dabei ist  $N_H$  die geerntete Zellzahl und  $N_1$  die ausgesäte Zellzahl. Durch Addition der so errechneten PD auf die PD der folgenden Passagen erhielt man die kumulativen Populationsverdopplungen (KPDs), welche die Anzahl der PD als Funktion zu der Zeit in der Kultur darstellt. Da die PD erst ab P1 bestimmt wurden, konnten die KPD erst nach P2 ermittelt werden (Cristofalo et al. 1998, Kern et al. 2006).

### 5.1.5

---

#### Verwendung von 1,25D3 in der Zellkultur

Ebenso wurden die Auswirkungen von 1,25D3 als biologisch aktive Form des Vitamin D3 auf hMSC in der Zellkultur analysiert. Bei allen durchgeführten Experimenten wurde 1,25D3 in der Konzentration 100 nM eingesetzt. Dies wird nicht nur als eine geläufige Konzentration im Zusammenhang mit Steroidhormonen angesehen, sondern stimmt auch mit früheren Literaturangaben überein (Jakob et al. 1992, Jakob et al. 1994).

### 5.1.5.1

---

#### Retransformation der 1,25D3 kultivierten hMSC

Humane MSC wurden ab P1 permanent mit 1,25D3 supplementiert. Beim Erreichen einer Subkonfluenz von 80 bis 90 % in P3 wurden die Zellen trypsiniert und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Expansionsmedium resuspendiert und gezählt. Nach dem



## METHODEN

Aussäen in frisches hMSC-Medium wurde die Hälfte der Zellen weiter permanent mit 1,25D3 supplementiert, während der anderen Teil der hMSC ohne 1,25D3 weiterkultiviert wurde. Pro Versuchsansatz wurden 200 Zellen pro  $\text{cm}^2$  in 25  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen ausgesät. Nach einer Wachstumsdauer von 2 Wochen wurde die Zellzahl der permanent 1,25D3 behandelten hMSC mit den Zellen, die ab P3 unter 1,25D3 Entzug kultiviert wurden, verglichen. Dazu wurde zunächst das verbrauchte hMSC-Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS gründlich gewaschen. Nachdem die hMSC abtrypsiniert und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert wurden, erfolgte nach der Resuspendierung der Zellpellets in frischem hMSC-Medium die Zellzählung der beiden Versuchsansätze.

### 5.1.6

---

#### Verwendung von rekombinanten Proteinen in der Zellkultur

Die Wirkung von Aktivin A und Myostatin auf die Zellbiologie der hMSC, insbesondere auf den Immunphänotyp, die klonogene Kapazität, die adipogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit sowie die Proliferation und die Apoptose, wurde durch Stimulation mit den rekombinanten humanen (rh) Proteinen Aktivin A (AA) und Myostatin (MSTN) untersucht. Rh AA ist ein Polypeptid aus 115 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 13 kDa. Das verwendete rh MSTN ist ein polypeptidisches Homodimer aus 2 x 109 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 25 kDa. Zunächst werden sowohl Aktivin A als auch Myostatin als Vorläuferproteine hergestellt und erst durch proteolytische Spaltung entstehen die reifen bioaktiven Proteine, die in der vorliegenden Arbeit als rh Proteine eingesetzt wurden (Gray and Mason 1990, Mason et al. 1996, Lee S. J. 2008). Im Rahmen der Stimulationsexperimente mit rh AA und rh MSTN wurden biologisch effektive Konzentrationen in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur ausgewählt (Langley et al. 2002, Rosenberg et al. 2010). So wurden rh AA und rh MSTN im Proliferations- und Apoptose-Assay in den Konzentrationen 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt, für alle übrigen Experimente wurde 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des jeweiligen rh Proteins verwendet.

### 5.1.7

---

#### Verwendung von Low Oxygen Bedingungen in der Zellkultur

Die standardisierten Kultivierungsbedingungen von hMSC zeichnen sich durch eine Temperatur von 37 °C in Kombination mit einer Atmosphäre bestehend aus 95 % Luftfeuchtigkeit, 21 % Sauerstoff und 5 %  $\text{CO}_2$  aus. Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Kultivierung der hMSC in der vorliegenden Arbeit nach diesen Standardbedingungen. Darüber hinaus wurde auch untersucht, inwieweit eine Kultivierung der hMSC unter niedrigen Sauerstoffbedingungen (2,5 % Sauerstoff),

## METHODEN

auch bezeichnet als Low Oxygen (LO), zellbiologische Prozesse modulieren kann. Die LO Kultivierung der hMSC erfolgte bei 37 °C in einem Zellkultur-Inkubator, dessen Gasgemisch sich aus 92,5 % Stickstoff (N<sub>2</sub>), 5 % CO<sub>2</sub> und 2,5 % Sauerstoff (O<sub>2</sub>) zusammensetzte. Als Referenz wurden dabei stets unter Standardbedingungen kultivierte bzw. High Oxygen kultivierte Zellen (HO, 21 % Sauerstoff) mitgeführt.

### 5.1.8

#### Colony Forming Unit Assay

---

Mit der Verwendung des Colony Forming Unit (CFU) Assays wurde die Fähigkeit der hMSC, Zellkolonien zu bilden, bestimmt. Dazu wurden die Zellen in Petrischalen (Durchmesser: 9,6 mm) kultiviert und alle 3 bis 4 Tage mit frischem hMSC-Medium versorgt. 1,25D3 behandelte hMSC sowie unbehandelte hMSC wurden in P1 und P3 in Petrischalen expandiert. Für die Stimulationsexperimente mit rh AA, rh MSTN und LO wurden hMSC in P1 verwendet und mit unbehandelten Kontroll-hMSC (P1) verglichen. 1,25D3 bzw. die rh Proteine rh AA und rh MSTN wurden mit jedem Mediumwechsel alle 3 bis 4 Tage neu hinzugegeben. Die LO stimulierten hMSC wurden für die Dauer des gesamten CFU Experiments unter reduzierten Sauerstoff Bedingungen kultiviert und mit HO kultivierten Kontroll-hMSC verglichen. Sechzehn Tage nach der standardisierten Aussaat von 800 Zellen pro Petrischale (14 Zellen pro cm<sup>2</sup>) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Methanol fixiert und anschließend mit 0,5 % Crystal Violet gefärbt. Die ausgehend von einer klonalen Zelle entstandenen Zellcluster von mehr als 25 Zellen wurden als CFU gezählt und in die Auswertung mit einbezogen, die mit Hilfe der AxioVision Rel. 4.6 Software durchgeführt wurde.

### 5.1.9

#### Proliferations und Apoptose Assay

---

##### 5.1.9.1

##### Proliferations Assay

---

Mittels des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assays wurden metabolisch aktive Zellen in der Zellkultur über die Bestimmung ihres ATP-Gehaltes ermittelt. Da ATP in jeder metabolisch aktiven Zelle vorhanden ist, fungiert es als Indikator für die Aktivität von Zellen. Die im CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay enthaltene Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase katalysiert Luciferin in Anwesenheit von ATP, Mg<sup>2+</sup> und Sauerstoff in eine angeregte Carbonylverbindung. Diese emittiert beim Übergang in den Grundzustand gelb-grünes Licht, das mittels Luminometer gemessen werden

## METHODEN

kann und proportional zu der ATP-Konzentration in den Zellen ist. Der CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay gibt daher indirekt über die Proliferationsrate der Zellen Aufschluss.

### 5.1.9.2

#### **Apoptose Assay**

Mit Hilfe des Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assays konnte die Aktivität der Caspase-3 und Caspase-7, welche als Maß für die Apoptoserate dient, in den Zellen gemessen werden. Caspasen übernehmen bei der Apoptose-Induktion eine wichtige Rolle und das im Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay enthaltene Substrat Z-DEVD-Aminoluciferin wird von den Caspasen-3 und -7 gespalten, dabei wird Aminoluciferin freigesetzt. Die Katalyse von Aminoluciferin durch die UltraGlo<sup>™</sup> Luciferase führt zur Lumineszenz. Da die Lumineszenz-Stärke in Korrelation zur Caspase-3/7 Aktivität steht, dient sie in diesem lumineszierenden Assay als Maß für die Apoptoserate.

### 5.1.9.3

#### **Proliferations und Apoptose Assay von stimulierten und unstimulierten hMSC**

Humane MSC (P1) wurden mit 1,25D3, rh AA oder rh MSTN kultiviert, um einen möglichen Einfluss auf die Proliferation und die Apoptose zu ermitteln. Mit Hilfe des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay bzw. des Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay konnte die Proliferation und die Apoptose der stimulierten und unstimulierten Zellen gemäß den Herstellerangaben wie folgt quantifiziert werden: Für die Durchführung wurden  $1,0 \times 10^3$  hMSC pro Well mit 100  $\mu$ l Expansionsmedium in 96-Well-Platten ausgesät und bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 h wurde das hMSC-Medium abgenommen und durch 100  $\mu$ l supplementiertes hMSC-Medium, welches zuvor mit den entsprechenden Stimulanzen (1,25D3, rh AA, rh MSTN) angereichert worden war, ersetzt (Konzentration der verwendeten Stimulanzen s. 5.1.5 und 5.1.6). Als Kontrolle dienten hMSC, die in hMSC-Medium, jedoch ohne den Zusatz von 1,25D3, rh AA oder rh MSTN, expandiert wurden. Nach einer 24, 48 oder 72 stündigen Inkubationsdauer im Brutschrank wurden 100  $\mu$ l des entsprechenden Reagenz (CellTiter-Glo<sup>®</sup> im Proliferations-Assay bzw. Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 im Apoptose-Assay) in jedes Well pipettiert und die 96-well-Platte anschließend 2 min bei 750 rpm geschüttelt. Nach Ablauf der 2 minütigen Schütteldauer wurde die 96-Well-Platte für 8 min (CellTiter-Glo<sup>®</sup> Reagenz) bzw. für 28 min (Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Reagenz) im Dunkeln inkubiert. Für die darauffolgende Quantifizierung der Lumineszenz-Stärke wurde ein Orion II Luminometer verwendet und die dabei erhaltenen Zahlenwerte wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 analysiert.

### 5.1.10

#### Durchflusszytometrische Immunphäotypisierung

Das Verfahren der Durchflusszytometrie ermöglicht eine Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität. Auch intrazelluläre Proteine oder Oberflächenmoleküle können auf diese Weise bestimmt werden. Anhand von mesenchymalen Oberflächenantigenmarkern und deren spezifisch bindenden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern wurde eine immunologische Phäotypisierung der hMSC durchgeführt. Für die Immunphäotypisierung von 1,25D3 behandelten Zellen wurden hMSC über eine bzw. über 3 Passagen mit und ohne 1,25D3 kultiviert. Humane MSC in P1 wurden 10 Tage mit rh AA und rh MSTN stimuliert bzw. unter LO Bedingungen kultiviert und anschließend immunphäotypisiert. Als Kontrolle wurden unstimulierte hMSC verwendet.

Für die durchflusszytometrische Immunphäotypisierung wurde das hMSC-Medium von dem konfluenten Zellmonolayer abgenommen und dieser gründlich mit 1 x PBS nachgespült. Anschließend wurden die hMSC trypsiniert und 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde durch Resuspendieren in PBS plus 1 % BSA gewaschen und in 15 ml Röhrchen überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet erneut mit PBS plus 1 % BSA gewaschen und zentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt und im Anschluss daran wurden die Zellen im Dunkeln mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)- und Phycoerythrin (PE)-konjugierten monoklonalen Antikörpern gelabelt. Dabei wurden die Antikörper gemäß den Angaben der Hersteller eingesetzt. Es wurden die Antikörper CD105, CD90, CD73 (mesenchymale Marker), HLA-DR, CD45 sowie CD34 (hämatopoetische Marker) verwendet. Durch den Gebrauch von Antikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (FITC bzw. PE) konnten Doppelfärbungen an den hMSC durchgeführt werden und dadurch Zellmaterial eingespart werden (s. Tab. 12). Als Kontrollen wurden Isotypen Antikörper (Maus) mitgeführt. Nach 20 bis 30 minütiger Inkubationsdauer bei Dunkelheit wurden die hMSC 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Danach wurde das Zellpellet mit PBS plus 1 % BSA gründlich resuspendiert und abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Nach der Wiederholung dieses Prozedere wurden für die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (Durchflusszytometrie) mindestens  $1 \times 10^5$  gelabelte Zellen pro Messpunkt in 500  $\mu$ l PBS plus 1 % BSA resuspendiert und in speziellen für die durchflusszytometrische Analyse gefertigte Röhrchen überführt. Die Lagerung der gelabelten hMSC erfolgte bis zur Messung im Dunklen und auf Eis. Bei der Messung wurden pro Messpunkt  $1 \times 10^4$  Zellen (events) gemessen, als Analysegerät diente ein BD LSR II Durchflusszytometer. Die Abbildungen wurden mit Hilfe der FlowJo Software erstellt.

Mesenchymale Marker (PE)	Hämatopoetische Marker (FITC)
CD105	HLA-DR
CD90	CD34
CD73	CD45

**Tab. 12 Doppelfärbung der hMSC durch Kombination unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper.**

---

### 5.1.11

#### Durchflusszytometrische Zellanalyse des oxidativen Stresses

Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde in den Zellen mittels 2',7'-Dichlorofluorescindiacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) bestimmt. Intrazelluläre ROS wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl-Radikale oxidieren nicht-fluoreszentes H<sub>2</sub>DCF-DA zu fluoreszierendem Dichlorofluorescin (DCF) (LeBel et al. 1992, Royall and Ischiropoulos 1993). Um eine mögliche Anreicherung von ROS in 1,25D3 kultivierten hMSC zu ermitteln, wurden die Zellen zunächst in P1 und P3 mit und ohne 1,25D3 kultiviert und im Anschluss daran mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Färbung wurden die hMSC mit 30 µM des Fluoreszenzfarbstoffs H<sub>2</sub>DCF-DA im Brutschrank inkubiert. Nach einer 45 minütigen Inkubationsdauer wurde der Überstand von dem konfluenten Zellmonolayer abgesaugt und die hMSC mit 1 x Trypsin/EDTA (0,5 g/l) abtrypsiniert und 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde dreimal mit PBS plus 1 % BSA resuspendiert bzw. gewaschen. Daraufhin wurde die Oxidationsrate der gelabelten und mit 1,25D3 stimulierten bzw. unbehandelten hMSC durchflusszytometrisch analysiert. Davor wurden zu den gelabelten Zellen noch 1 µg/ml Propidiumiodid zugegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Da sich Propidiumiodid durch die perforierte Zellmembran toter Zellen bewegt und dort in die ds DNA interkalieren kann, gleichzeitig jedoch an der intakten Zellmembran lebender Zellen scheitert, wird es bei der durchflusszytometrischen Analyse zur Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen verwendet. Als Analysegerät wurde ein BD LSR I Durchflusszytometer verwendet und es wurden jeweils 3 x 10<sup>5</sup> hMSC pro Probe analysiert. Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurde die CellQuest Pro Software verwendet. Dazu wurde eine Region innerhalb des DCF-Propidiumiodid

## METHODEN

Dot blot mit  $2 \times 10^3$  Propidiumiodid-negativen Zellen definiert. Der Mittelwert dieser Population wurde bestimmt und für die weitere statistische Auswertung verwendet (Schupp et al. 2007).

### 5.1.12

---

#### ***In vitro* Differenzierung der hMSC**

Die Stimulation mit 1,25D3, rh AA oder rh MSTN kann sich auf die Differenzierungskapazität der hMSC auswirken. Um mögliche Effekte zu untersuchen, wurden hMSC mit und ohne 1,25D3 über 3 Passagen kultiviert und danach für Differenzierungsexperimente verwendet. Sobald die Zellen in P3 konfluent waren, wurde die Differenzierung eingeleitet. Für die Differenzierungsexperimente unter der Verwendung von rh AA oder rh MSTN wurden hMSC in P1 benutzt. Auch hier wurde mit der Differenzierung begonnen, sobald die hMSC konfluent waren. Allerdings wurden die Zellen erst ab diesem Zeitpunkt mit rh AA oder rh MSTN stimuliert. Der Einfluss einer 1,25D3 Kultivierung wurde auf die Differenzierungskapazität in die chondrogene, adipogene und osteogene Richtung untersucht, während im Laufe der Differenzierungsphase die Stimulation der hMSC mit rh AA oder rh MSTN lediglich im Hinblick auf adipogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit erforscht wurde. Im Rahmen der Differenzierungsexperimente wurden die hMSC in dem entsprechenden Differenzierungsmedium kultiviert und zusätzlich wurden Zellen in Expansionsmedium kultiviert und dienten somit als Negativ-Kontrolle.

#### 5.1.12.1

---

##### **Chondrogene Differenzierung**

Als Differenzierungsmodell für die chondrogene Differenzierung von hMSC wurde die high-density Pellet-Kultur (Johnstone et al. 1998) verwendet. Zunächst wurde der Überstand des konfluenten Zellmonolayers abgesaugt, abtrypsiniert und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das gebildete Zellpellet in hMSC-Medium resuspendiert und es erfolgte die Zählung der Zellen sowie die Verteilung von  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 15 ml Röhrchen. Nach erneutem Abzentrifugieren (5 min, 1500 rpm) wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 500 µl chondrogenem Differenzierungsmedium resuspendiert. Dabei setzte sich das chondrogene Differenzierungsmedium aus nachfolgenden Komponenten zusammen: DMEM High Glucose mit L-Glutamin supplementiert mit 50 µg/ml L-Ascorbat acid 2-phosphate, 100 nM Dexamethason, 100 µg/ml Pyruvat, 40 µg/ml L-Prolin, 1 % ITS+1, 1 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 ng/ml TGFβ1, mit und ohne Zugabe von 1,25D3. Das chondrogene Differenzierungsmedium enthielt kein FCS. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension zur Pelletbildung in einem 15 ml Röhrchen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert

## METHODEN

und in einem Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit sowie 5 % CO<sub>2</sub> mit halbaufgedrehtem Deckel zum Gasaustausch kultiviert. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage ausgetauscht, dabei wurde jeweils frisches TGFβ1 hinzugefügt (Noth et al. 2002). Als Negativkontrolle dienten Zellpellets, die in chondrogenem Differenzierungsmedium ohne den Zusatz von TGFβ1 kultiviert wurden. Nach 3 Wochen wurden die Pellets in 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Schnitte mit einer Stärke von 4 µm wurden mit einer 1 %igen Alcianblau-Lösung (pH 1,0) (ausführliche Methode s. 5.4.1) angefärbt. Die Alcianblau-Färbung dient zum Nachweis negativ geladener sulfatierter Proteoglykane, die als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix gelten und somit eine Art Indikator der chondrogenen Differenzierung darstellen. Die Zellkerne wurden mit Kernechtrot gegengefärbt.

### 5.1.12.2

---

#### **Adipogene Differenzierung**

Für die adipogene Differenzierung wurden hMSC in einer Dichte von  $2,1 \times 10^4$  Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Sobald die Zellen den Zustand der Konfluenz erreicht hatten, wurde das verbrauchte hMSC-Medium abgesaugt und die Phase der Differenzierung durch Verabreichen des adipogenen Differenzierungsmediums eingeleitet. Als Bestandteile des adipogenen Differenzierungsmediums sind folgende Komponenten zu nennen: DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin, 10 % FCS, 1 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 µM Dexamethason, 0,5 mM IBMX, 1 µg/ml Insulin und 100 µM Indomethacin. Nach 14 tägiger Inkubationszeit wurden die gebildeten intrazellulären Lipidvesikel der Zellmonolayer unter Verwendung einer Ölrot O-Lösung angefärbt (ausführliche Methode s. 5.4.2). Als Negativkontrolle dienten hMSC, die in Expansionsmedium und nicht in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Mit Beginn des adipogenen Differenzierungsprozesses wurde kein 1,25D3 verabreicht. Rh MSTN und rh AA wurden erst nach dem Erreichen der Konfluenz und mit Beginn der Differenzierung dem adipogenen Differenzierungsmedium zugesetzt.

### 5.1.12.3

---

#### **Osteogene Differenzierung**

Für die osteogene Differenzierung wurden die hMSC in einer Dichte von  $2,1 \times 10^4$  Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Nach dem Absaugen des verbrauchten Expansionsmediums wurde osteogenes Differenzierungsmedium auf die konfluenten Zellmonolayer pipettiert, dadurch

## METHODEN

wurde der Prozess der osteogenen Differenzierung in Gang gesetzt. Das osteogene Differenzierungsmedium setzt sich aus den Komponenten DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin, 10 % FCS, 50 µg/ml L-Ascorbat acid 2-phosphate, 10 mM β-Glycerophosphat, 1 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 nM Dexamethason zusammen. Nach einem Differenzierungszeitraum von 2 Wochen wurde die alkalische Phosphatase im Zytoplasma unter Verwendung des Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit 86-C gemäß den Angaben des Herstellers angefärbt. Nach 4 wöchiger osteogener Differenzierung erfolgte der Nachweis der mineralisierten extrazellulären Matrix durch Anfärbung des Calciumhydrogenphosphats mittels einer Alizarin Rot S-Lösung (ausführliche Methode s. 5.4.3). In hMSC-Medium kultivierte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Supplementation mit 1,25D3 wurde gestoppt, sobald der osteogene Differenzierungsprozess induziert wurde. Dagegen wurden die rh Proteine rh AA und rh MSTN erst nach dem Erreichen der Konfluenz und mit Beginn der Differenzierung dem osteogenen Differenzierungsmedium zugesetzt.

## 5.2 | Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1

#### Isolierung von zellulärer RNA

Für die Isolierung zellulärer Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde der NucleoSpin® RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel herangezogen und nach den Angaben des Herstellers angewandt. Nach der Entfernung des verbrauchten Kulturmediums von dem Zellmonolayer erfolgte die Lyse der konfluenten hMSC mit einem Guanidium Isothiocyanat sowie β-Mercaptoethanol enthaltenden Puffer, der RNasen inaktivierte. Daraufhin wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in ein RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Reduktion der Viskosität wurde das erhaltene Zelllysate auf einen im Kit enthaltenen Filter gegeben und 1 min bei 11000 x g abzentrifugiert. Dem homogenisierten Zelllysate wurde 70 %iger Ethanol hinzugefügt, um die RNA an die Silikagel-Membran-Säulen zu binden. Dabei entsprach das Ethanol-Volumen dem eingesetzten Volumen des Lysepuffers. Um die Effektivität des nachfolgenden DNase Verdau zu erhöhen, wurde zunächst ein Membrane Desalting Buffer (MDB) auf die Membran der Säule pipettiert. Dieser MDB-Puffer hatte die Funktion das Salz von der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die Membran durch Zentrifugieren (1 min, 11000 x g) getrocknet und danach erfolgte durch die Anwendung eines DNase Verdau die selektive Entfernung der genomischen DNA. Nachfolgende Waschschriffe beseitigten mögliche Kontaminationen bevor die RNA in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Die erhaltenen RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert. Um



## METHODEN

Kontaminationen mit RNasen möglichst zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass während des RNA-Isolationsprozesses stets Handschuhe getragen wurden und immer sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße verwendet wurden. RNA wurde aus hMSC isoliert, die entweder mit 1,25D3, rh AA, rh MSTN oder unter LO Bedingungen stimuliert wurden. Die exakten Stimulationszeiten sind den einzelnen Methoden bzw. den entsprechenden Ergebnisabschnitten zu entnehmen.

### 5.2.2

#### Synthese der cDNA mittels Reverser Transkriptase

---

Als Grundlage für die Reverse Transkription diente die aus den Zellen isolierte RNA. Diese wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus dem Moloney-Mausleukämievirus (M-MLV), in komplementäre, einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg der Gesamt-RNA mit Oligo-(dT)-Primern (50 pmol/µl) vermischt und auf 16 µl mit HPLC-Wasser aufgefüllt. Darauf folgte eine 5 minütige Inkubation bei 70 °C mit dem Ziel die RNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren. Nach der Abkühlung auf Eis wurden zu dem Reaktionsansatz 1 x M-MLV-Puffer, 20 mM dNTPs, MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) sowie die entsprechende Menge HPLC-Wasser dazu pipettiert und 1 h bei 42 °C inkubiert. Ein abschließendes Erhitzen auf 94 °C für die Dauer von 10 min stoppte die Reaktion. Die erhaltenen cDNA-Proben wurden nun mit 25 µl HPLC-Wasser auf ein finales Volumen von 50 µl verdünnt.

### 5.2.3

#### Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion

---

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dient der Vervielfältigung und dem Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen. Der Vorgang der semi-quantitativen RT-PCR umfasste zwischen 20 und 43 Zyklen, wodurch eine exponentielle Vermehrung der Template DNA erzielt wurde. Als Template wurde in der vorliegenden Arbeit 1 µl cDNA, gewonnen aus Gesamt-RNA, für die Amplifizierung ausgewählter Gene in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Der Standard-Reaktionsmix enthielt 10 x Reaktion Puffer (einschließlich 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 20 mM von jedem der vier dNTPs, 25 pmol spezifischer sense Primer, 25 pmol spezifischer antisense Primer sowie 1,25 U der Taq DNA Polymerase. Standardmäßig wurden nachfolgende RT-PCR Bedingungen verwendet.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sec	} Primer-spezifisch (s. 4.5)
Annealing	46 - 63 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 - 100 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Termination	12 °C	forever	1

**Tab. 13 Bedingungen für die RT-PCR.**

Um Kontaminationen zu erkennen wurde bei jedem RT-PCR-Ansatz eine Negativ-Kontrolle, bei der als Template HPLC-Wasser statt cDNA eingesetzt wurde, mitgeführt. Die Effizienz einer RT-PCR-Reaktion konnte beispielsweise durch die Zugabe von DMSO oder auch durch eine Veränderung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration gesteigert werden. In Tab. 5 (s. 4.5) sind die verwendeten Primer-Sequenzen, Annealing-Temperaturen,  $MgCl_2$ -Konzentrationen sowie die Größe der entsprechenden RT-PCR Produkte aufgeführt. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur  $T_m$  (°C) wurde folgende Formel verwendet:

$$T_m = 4^\circ C(G+C) + 2^\circ C(A+T)$$

Die erhaltene Transkriptmenge wurde mittels Gelelektrophorese evaluiert und nach Schütze N. *et al.* (2005) unter Verwendung der LTF Bio 1D Software densitometrisch quantifiziert (Schütze *et al.* 2005).

### 5.2.4

#### Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Analyse von Nukleinsäuren. Dabei wandern negativ geladene Nukleinsäuren im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und da sich kleine Nukleinsäure-Fragmente schneller durch die poröse siebartige Struktur des Agarose-Gels bewegen

## METHODEN

als große Moleküle, erfolgt die Auftrennung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe. In Abhängigkeit der Größe der zu trennenden Nukleinsäuren wurden 1 bis 2 %ige Agarose-Gele hergestellt, indem die Agarose in 0,5 x TBE-Puffer ca. 5 min bei 400 W aufgeköcht wurde. Sobald die Agarose gelöst war und die Agarose-TBE-Mischung wieder auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt war, wurde 0,5 µg/µl Ethidiumbromid dazu pipettiert und die gesamte Mischung in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Agarose-Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gegeben und die Kammer mit 0,5 x TBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel bedeckt war. Dann wurden 10 µl des RT-PCR Produktes mit 2 µl des Ladepuffers gut vermischt und direkt in jede Tasche des Agarose-Gels pipettiert. Gleichzeitig wurde als Marker zur Bestimmung der Bandengröße der Nukleinsäuren ein geeigneter Größenmarker auf das Agarose-Gel aufgetragen. Im Anschluss daran wurde durch das Anlegen einer Spannung (zwischen 60 und 140 V) ein elektrisches Feld erzeugt. Die aufgetrennten Nukleinsäure-Fragmente wurden durch das Ethidiumbromid, das zwischen den Basen der DNA oder RNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert, sichtbar gemacht. Die Fotos der Banden der RT-PCR-Produkte wurden mittels der BioCapt MW, Version 99 Software dokumentiert.

### 5.2.5

---

#### Densitometrie

Die bei der semi-quantitativen RT-PCR erhaltenen Produkte wurden zur weiteren Analyse auf Agarose-Gele aufgetragen. Um die Genexpressionsstärke anhand der Bandenintensitäten im Agarose-Gel bzw. um mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Banden zu quantifizieren, wurde die LTF Bio 1D Software herangezogen (Schutze et al. 2005). Im Rahmen der densitometrischen Auswertung wurden die Banden der semi-quantitativen RT-PCR Produkte der entsprechenden untersuchten Gene auf die Banden des verwendeten Housekeeping-Gens, das somit als Referenz diente, normalisiert. Danach wurden die erhaltenen Werte des analysierten Gens auf die erhaltenen Werte der dazugehörigen Kontrolle normalisiert. Für jeden Spender wurde der Fold Change berechnet, indem die Expression der 1,25D3, rh AA, rh MSTN oder LO stimulierten Zellen mit den Kontroll-Zellen verglichen wurde. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde Template DNA stets von mindestens 3 verschiedenen humanen Spendern eingesetzt.

### 5.2.6

#### Photometrische Analysen

---

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurde 1 µl einer DNA- oder RNA-Probe in eine Küvette pipettiert und mit 49 µl HPLC-Wasser 1:50 verdünnt. Der Nullabgleich wurde unter Verwendung von HPLC-Wasser ohne den Zusatz von DNA- oder RNA-Proben bestimmt. Die Konzentration wird aus der OD<sub>260</sub> errechnet und die Reinheit der Probe ergibt sich anhand des OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Verhältnisses. Weist die Nukleinsäure-Lösung ein Absorptionsverhältnis (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) von 1,8 bis 2,0 auf, so wird die Reinheit der Probe als optimal angesehen.

## 5.3 | Proteinbiologische Methoden

### 5.3.1

#### Nachweis von Proteinen mittels immunzytochemischer Färbung

---

Für die Durchführung einer immunzytochemischen Färbung wurden  $2,0 \times 10^5$  Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgesät und nach Erreichen der gewünschten Zelldichte dreimal bei RT mit PBS pH 7,2 gewaschen. Nach der Fixierung der Zellen mit eiskaltem Methanol und ihrer Lufttrocknung wurden die Zellen vor und nach ihrer Permeabilisierung mit 0,05 % Tween-20 erneut dreimal mit PBS pH 7,2 bei RT gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen 30 min mit PBS pH 7,2 plus 3 % BSA blockiert und dann mit ca. 1 ml 1. Antikörper-Lösung, bestehend aus der ausgetesteten Antikörper-Verdünnung sowie PBS pH 7,2 plus 1 % BSA, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nachdem am nächsten Tag die Antikörper-Lösung abgenommen wurde und die Zellen dreimal gründlich mit PBS pH 7,2 bei RT gewaschen wurden, wurde ca. 1 ml 2. Antikörper-Lösung, bestehend aus der ausgetesteten Antikörper-Verdünnung sowie PBS pH 7,2 plus 1 % BSA, bei RT abgedunkelt inkubiert. Nach 1 bis 2 h wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Zellen dreimal mit PBS pH 7,2 gewaschen. Die Deckgläser wurden nun vorsichtig aus der 6-well-Platte genommen und mit der Zelloberseite auf mit Vectashield versetzte Objektträger gelegt und mikroskopisch untersucht.

### 5.4 | Zytochemische Methoden

#### 5.4.1

---

##### **Alcianblau-Färbung**

Die Alcianblau-Färbung wurde verwendet, um negativ geladene sulfatierte Proteoglykane in chondrogen differenzierten Zellen anzufärben. Dazu wurden die Zellen 3 min in 3 % Essigsäure inkubiert und anschließend für die Dauer von 30 min in einer 1 %igen Alcianblau-Lösung (pH 1,0) gefärbt. Vor und nach der Gegenfärbung mit Kernechtrot wurden die Zellpellets mit destilliertem Wasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % und 95 % Ethanol für jeweils 3 sec, 100 % Isopropanol und Xylol für jeweils 2 x 5 min) entwässert. Es folgte die Einbettung der gefärbten Zellen in Entellan und die Auswertung mit der AxioVision Rel. 4.6 Software. Dazu wurden pro Objektträger zwischen 5 und 9 Bilder gespeichert.

#### 5.4.2

---

##### **Ölrot O-Färbung**

Mit der Ölrot O-Färbung wurden intrazelluläre Lipidtropfen, die infolge der adipogenen Differenzierung gebildet wurden, angefärbt. Die Zellmonolayer wurden mit PBS gewaschen, in 4 %igem Formaldehyd 10 min fixiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach 5 minütiger Inkubation in 60 % Isopropanol wurde der Zellmonolayer 10 min in der Ölrot O-Färbelösung gefärbt. Nach den Wachsritten mit 60 % Isopropanol und destilliertem Wasser wurden die Zellkerne 3 min mit der Hämalaun-Färbelösung angefärbt und anschließend mit fließendem Leitungswasser gespült (Pittenger et al. 1999). Die intrazellulären Lipidtropfen wiesen nun eine orange bis rote Färbung auf und konnten mit der AxioVision Rel. 4.6 Software quantifiziert werden. Dazu wurden pro Objektträger zwischen 5 und 9 Bilder gespeichert.

#### 5.4.3

---

##### **Alizarin Rot S-Färbung**

Bei der osteogenen Differenzierung dient die Alizarin Rot S-Färbung zum Nachweis der extrazellulären Matrixmineralisation. Das Anfärben der Calciumhydrogenphosphat Ablagerungen, die charakteristisch sind für die mineralisierte extrazelluläre Matrix von Osteoblasten, mittels Alizarin Rot S wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellmonolayer wurden mit PBS gewaschen, 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Daran anschließend folgte die Inkubation

## METHODEN

in der 1 %igen Alizarin Rot S-Färbelösung für 2 min. Vor der Einbettung in Glyceringelatine wurde überschüssige Färbelösung durch Waschen mit destilliertem Wasser entfernt (Schilling et al. 2007). Durch die Alizarin Rot S-Färbung wurde Calciumhydrogenphosphat in den Farben rot bis rotbraun angefärbt. Davon wurden pro Objektträger zwischen 5 und 9 Bilder aufgenommen und mit Hilfe der AxioVision Rel. 4.6 Software quantifiziert.

### 5.4.4

#### Alkalische Phosphatase Färbung

---

Die zytoplasmatische alkalische Phosphatase wurde unter Verwendung des Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit 86-C nach Angaben des Herstellers angefärbt: Nach der Entfernung des Mediums wurden die Zellen 30 sec mit einer Citrat-Aceton-Formaldehyd-Lösung fixiert und danach dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die darauffolgende Inkubation der Zellen für die Dauer von 15 min in einer alkalischen Diazonium Salz Färbelösung, die neben Nitrit und Naphtol auch Fast blue BB enthält, erfolgte im Dunklen. Vor der Einbettung in Glyceringelatine wurden die Zellmonolayer mit destilliertem Wasser gründlich gewaschen. Die AxioVision Rel. 4.6 Software ermöglichte eine quantitative Auswertung der blau angefärbten und somit Alkalische Phosphatase (AP) positiven Zellen. Dazu wurden von jedem Objektträger zwischen 5 und 9 Bilder aufgenommen.

### 5.4.5

#### Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galactosidase Färbung

---

Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase dient als Biomarker für die replikative Seneszenz in humanen Zellen (Dimri et al. 1995). Seneszente Zellen exprimieren die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal), die histochemisch bei pH 6,0 nachweisbar ist. Die  $\beta$ -Galactosidase spaltet das farblose X-Gal in Galaktose und ein Indoxylderivat, welches spontan dimerisiert und als blauer Farbstoff präzipitiert. Somit stellt die Blaufärbung ein Maß für die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase dar.

In Vorbereitung auf die  $\beta$ -Galactosidase Färbung wurde das Medium gründlich abgesaugt, die kultivierten Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 5 min in einer Formaldehyd/Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Nach erneutem Waschen mit 1 x PBS wurden die Zellen für 16 h bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> mit 1 ml frisch hergestellter SA- $\beta$ -Gal Färbelösung inkubiert. Nach dem Entfernen der Färbelösung und dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser folgte die Färbung der Zellkerne mit Kernechtrot für 2 min. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in Glyceringelatine eingebettet. SA- $\beta$ -Gal positive Zellen zeigten eine Blaufärbung im Zytoplasma sowie eine leichte Rotfärbung des Zellkerns auf und konnten demnach mikroskopisch ausgewertet werden.

## METHODEN

Es wurden jeweils 5 Bilder der SA- $\beta$ -Gal Färbung von jedem Objektträger gemacht und mit der AxioVision Rel. 4.6 Software quantifiziert.

### 5.5 | Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte + Standardfehler (SEM) oder als Mittelwerte + Standardabweichung (STABW) angegeben. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde entweder der student's t-test oder der Mann-Whitney U Test herangezogen. Dies wird stets in der Legende der Abbildungen des Ergebnisteils angezeigt.

### 5.6 | Nomenklatur der Gene und Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurden, unabhängig von der Spezies, Gene groß und kursiv geschrieben (z.B. *PSG1*) und Proteine ebenfalls durch große, jedoch nicht kursive Buchstaben gekennzeichnet (z.B. PSG1).

# 6 ERGEBNISSE

## 6.1 | Der Einfluss von 1,25D3 auf hMSC

Da niedrige Vitamin D3 Serumspiegel mit einer reduzierten Knochendichte und einer erhöhten Sturzgefahr in Verbindung gebracht werden (Cranney et al. 2007) und Vitamin D3 als wichtiger Faktor für die Knochengesundheit angesehen wird, wurde die Wirkung von 1,25D3 (biologisch aktive Form von Vitamin D3) in hMSC, der Quelle der Knochenregeneration, untersucht. Bei allen durchgeführten Experimenten wurde 1,25D3 in der Konzentration von 100 nM eingesetzt.

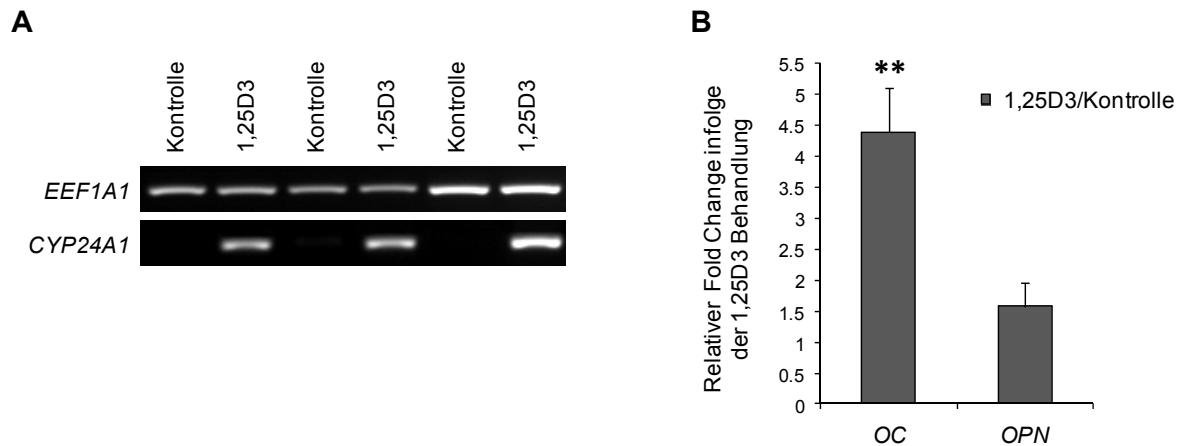
### 6.1.1

#### Das Expressionsniveau 1,25D3-responsiver Gene in hMSC

---

Im ersten Schritt wurden Zellen von 3 unterschiedlichen Spendern über einen Zeitraum von 24 h mit 1,25D3 stimuliert und anschließend ein möglicher Einfluss auf die Genexpression in hMSC analysiert. Es wurden bereits bekannte 1,25D3-responsive Gene ausgewählt (Christakos et al. 2007), um die Responsivität von hMSC auf eine 1,25D3 Behandlung zu untersuchen. Die RT-PCR-Analyse ergab, dass 1,25D3 die Expression von *CYP24A1* (cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1 oder 1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase) in allen 3 untersuchten Spendern induziert. Das Gen *CYP24A1* codiert die 24-Hydroxylase (oder CYP24), die für die Degradierung von 1,25D3 zuständig ist. Verglichen mit den 1,25D3 unstimulierten hMSC (Kontroll-Zellen) konnte in den 1,25D3 inkubierten Zellen eine signifikante 4,4-fache Erhöhung der Genexpression von Osteocalcin (auch bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein; *OC*) sowie eine 1,6-fach verstärkte Expression von Osteopontin (auch secreted phosphoprotein 1; *OPN*) beobachtet werden (Abb. 10).





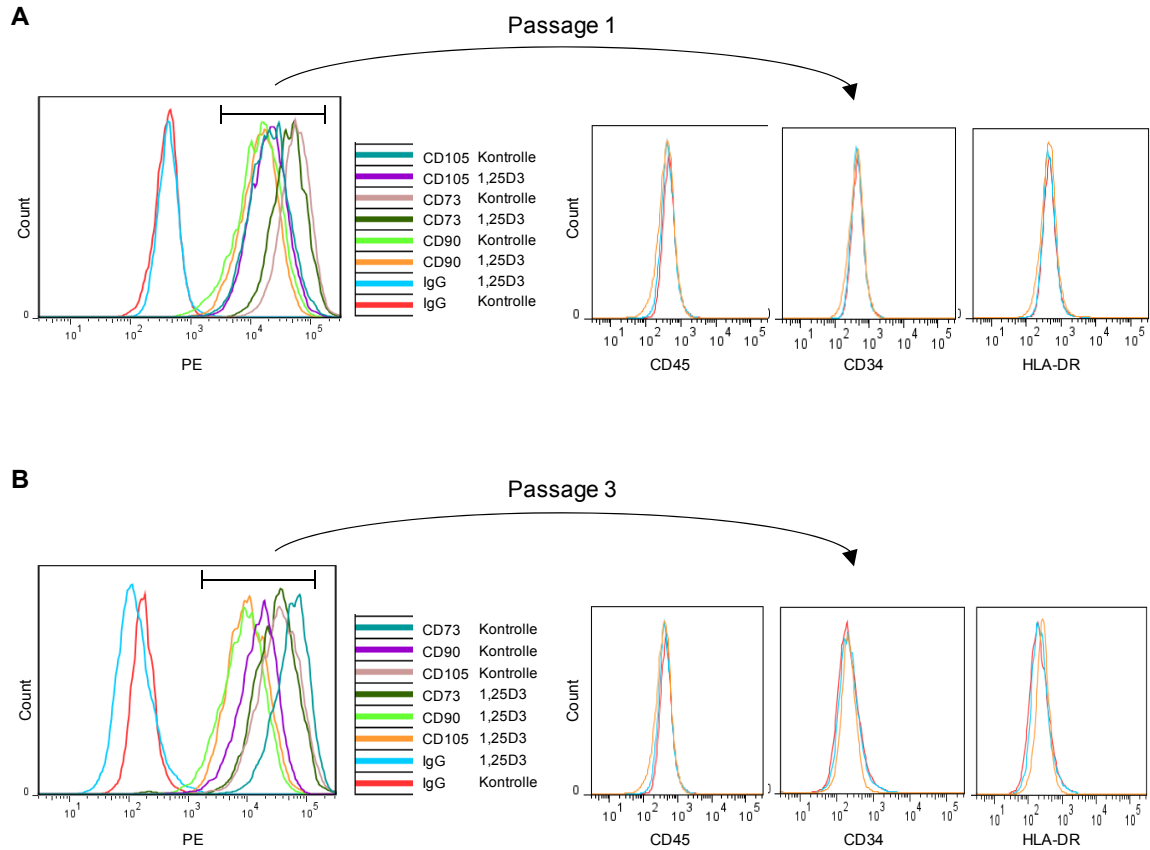
**Abb. 10 1,25D3 induzierte Änderung der Genexpression in hMSC.** **A** Semi-quantitative RT-PCR von cDNA aus hMSC, die 24 h mit 1,25D3 stimuliert wurden, verglichen mit unstimulierten Kontroll-hMSC. Da CYP24A1 von den unbehandelten Kontroll-Zellen nicht exprimiert wurde, war eine densitometrische Quantifizierung des CYP24A1 Gens nicht möglich. **B** Die Gene OC und OPN wurden mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert und anschließend densitometrisch quantifiziert. Nach der Normierung auf das Housekeeping-Gen EEf1A1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) wurde für alle 3 Spender der Fold Change berechnet, indem das Expressionsniveau der 1,25D3 stimulierten hMSC mit den unbehandelten Kontroll-hMSC verglichen wurde. Die Ergebnisse setzen sich aus 3 unabhängigen Donoren zusammen und sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) dargestellt. (\*\*,  $p < 0,01$  student's t-test). (CYP24A1 (cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1), OC (osteocalcin), OPN (osteopontin)).

### 6.1.2

#### Immunphänotyp von 1,25D3 behandelten und 1,25D3 unbehandelten hMSC

Die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung von hMSC erfolgte anhand von mesenchymalen Oberflächenantigenmarkern. Um mögliche Veränderungen des Phänotyps der hMSC im Laufe einer Langzeitkultivierung mit 1,25D3 aufzudecken, wurden 1,25D3 kultivierte hMSC und 1,25D3 unbehandelte hMSC (Kontroll-Zellen) von 3 Spendern nach P1 und nach P3 analysiert. Mittels Durchflusszytometrie konnte kein Unterschied zwischen 1,25D3 stimulierten hMSC und Kontroll-hMSC der P1 und P3 festgestellt werden. Sowohl 1,25D3 behandelte hMSC als auch 1,25D3 unbehandelte Zellen waren negativ für die hämatopoetischen Marker CD34, CD45 und HLA-DR (Abb. 11, rechte Reihe), und positiv für die mesenchymalen Marker CD73, CD90 und CD105 (Abb. 11, linke Reihe). In der Abbildung 11 wurden 1,25D3 behandelte hMSC und Kontroll-Zellen auf CD73, CD90 und CD105 Positivität gegated. Das Expressionsniveau der mesenchymalen Marker CD73, CD90 und CD105 der 1,25D3 behandelten hMSC und der Kontroll-Zellen lag zwischen 88,9 % und 98,7 %.

## ERGEBNISSE



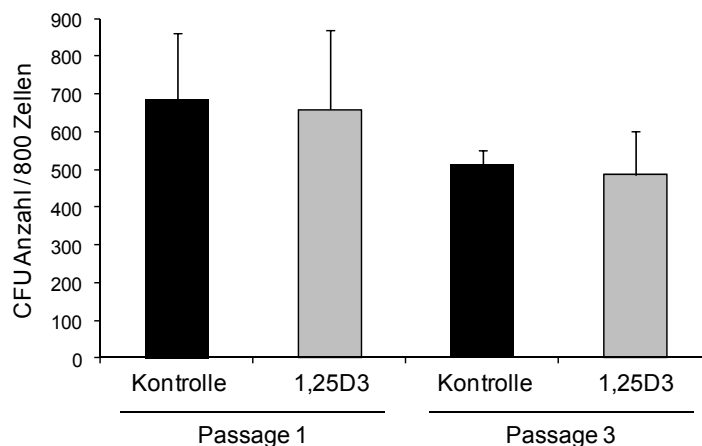
**Abb. 11 Der Immunphänotyp von 1,25D3 behandelten hMSC verglichen mit 1,25D3 unbehandelten hMSC.** Die Oberflächenmarker-Expression von 1,25D3 kultivierten hMSC und unbehandelten hMSC wurden nach P1 (A) und nach P3 (B) mittels Durchflusszytometrie analysiert. **A/B** Die gelben Kurven repräsentieren die spezifische Antikörperfärbung der Kontroll-hMSC, die spezifische Antikörperfärbung der 1,25D3 kultivierten Zellen werden durch blaue Kurven abgebildet und rote Kurven stellen die spezifische Antikörperfärbung der Isotypen Kontrolle von 1,25D3 behandelten hMSC dar (rechte Reihen). Die Überlagerungen im Histogramm zeigen die für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 positiven 1,25D3-hMSC sowie Kontroll-hMSC. Das Expressionsniveau von 1,25D3 kultivierten hMSC und unbehandelten Zellen lag für die Marker CD73, CD90 und CD105 zwischen 88,9 % und 98,7%. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Spenders und diese Ergebnisse bestätigten sich in allen 3 unabhängigen Experimenten von 3 verschiedenen Spendern (Kontrolle = unbehandelte Zellen; 1,25D3 = 1,25D3 kultivierte hMSC; IgG = Isotypen Kontrolle).

## ERGEBNISSE

### 6.1.3

#### Klonogene Kapazität von 1,25D3 behandelten und 1,25D3 unbehandelten hMSC

1,25D3 stimulierte und Kontroll-hMSC wurden hinsichtlich ihrer Anzahl an koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFUs) in P1 und P3 untersucht. Es wurden Zellen von 3 (P3) bzw. 5 (P1) Spendern verwendet. Zwischen den 2 untersuchten Gruppen wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der gebildeten Kolonien in P1 und P3 festgestellt (Abb. 12). Die Nummer der CFUs war sehr stark spenderabhängig und reichte von 318 bis 1352 CFUs pro 800 ausgesäter hMSC in P1 und von 412 bis 709 CFUs pro 800 ausgesäter Zellen in P3. Weder in P1 noch in P3 zeigte sich eine signifikante Korrelation (student's t-test) zwischen einer 1,25D3 Behandlung und der Anzahl an CFUs. Indes wurde eine nicht signifikante Reduzierung der CFUs der kultivierten Zellen beider Gruppen in P3 im Vergleich zu P1 beobachtet.



**Abb. 12 Die CFU Zahl von 1,25D3 kultivierten hMSC sowie Kontroll-hMSC in P1 und P3.** Der Einfluss der 1,25D3 Kultivierung auf die Anzahl der gebildeten CFUs wurde in 1,25D3 behandelten Zellen (graue Balken) analysiert und mit Kontroll-hMSC (schwarze Balken) verglichen. Es erfolgte eine unabhängige Durchführung der Experimente. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SEM von 3 (P3) bzw. 5 (P1) Spendern dargestellt.

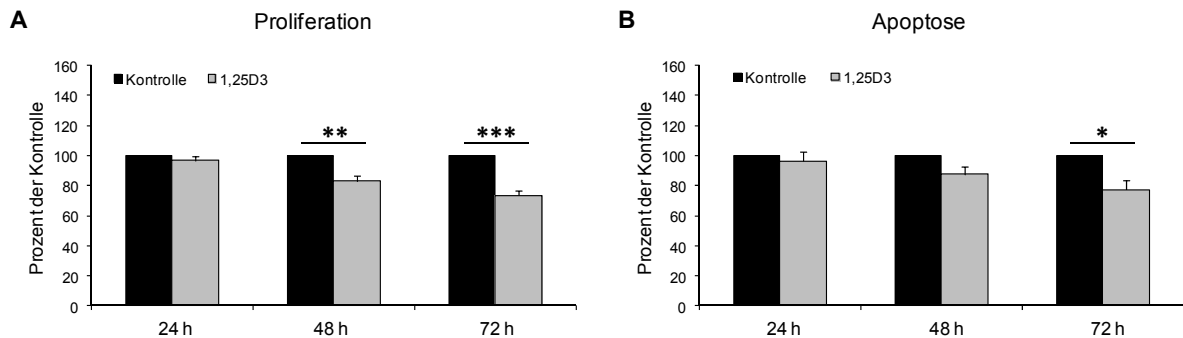
### 6.1.4

#### Kurzzeit-Einflüsse von 1,25D3 auf Proliferation und Apoptose von hMSC

Um die Bedeutung von 1,25D3 auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der hMSC zu untersuchen, wurden Zellen von 3 verschiedenen Spendern für die Dauer von 24, 48 sowie 72 h mit 1,25D3 stimuliert.

## ERGEBNISSE

Eine 1,25D3 Stimulation über 24 h bewirkte eine 3 %ige Reduktion der Zellproliferation. Eine 48 h dauernde 1,25D3 Behandlung der Zellen führte zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation um 17 % (\*\*,  $p < 0,01$ ) verglichen mit den unstimulierten hMSC. Die stärkste Wirkung zeigte eine Stimulation der hMSC mit 1,25D3 über einen Zeitraum von 72 h, hierbei bewirkte 1,25D3 eine signifikante Verminderung der Proliferation um 27 % (\*\*\*,  $p < 0,001$ ) (Abb. 13A). Neben der Proliferation wurde auch die Apoptose in 1,25D3 stimulierten hMSC reduziert. Eine 1,25D3 Behandlung der Zellen über 72 h inhibierte die Apoptoserate signifikant um 23 % im Vergleich mit den Kontroll-hMSC (\*,  $p < 0,05$ ). Eine 48 stündige Inkubation der hMSC verminderte die Apoptose um 12 % und nach 24 h wurde die Rate der Apoptose um 4 % reduziert verglichen mit den Kontroll-hMSC (Abb. 13B).



**Abb. 13 Die Einflüsse von 1,25D3 auf Proliferation und Apoptose von hMSC.** Humane MSC von 3 verschiedenen Spendern wurden für 24, 48 und 72 h mit 1,25D3 stimuliert (graue Balken) und anschließend wurden Proliferation (A) und Apoptose (B) bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils unstimulierte Zellen (schwarze Balken). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM dargestellt, dabei wurde jeder Versuchsansatz auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. Die 3 Experimente wurden unabhängig voneinander durchgeführt und es wurden Zellen von 3 verschiedenen Donoren verwendet. (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; student's t-test).

### 6.1.5

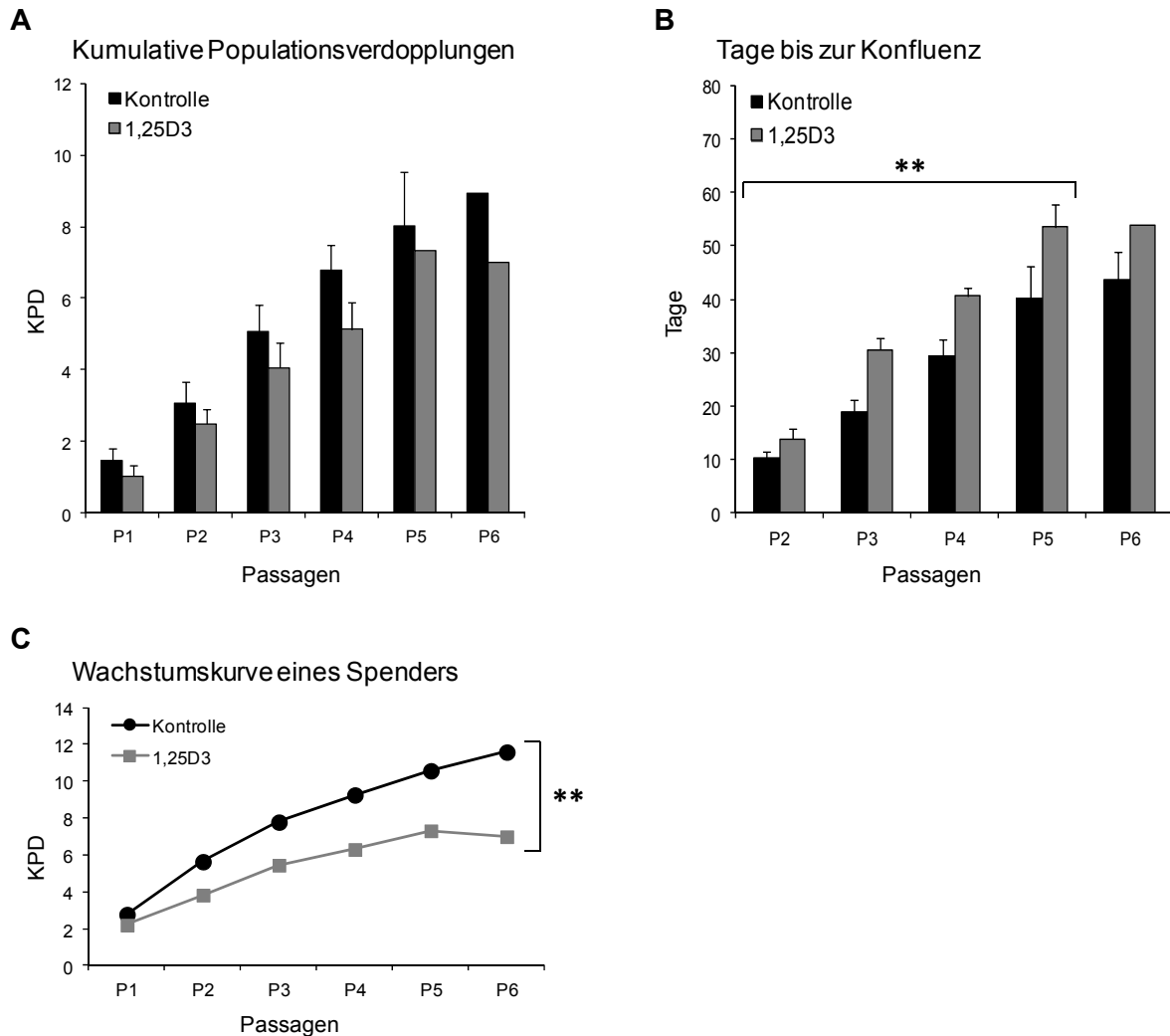
#### Analyse der Wachstumsrate von permanent 1,25D3 supplementierten hMSC

Über mehrere Passagen wurde die Proliferationskapazität (kumulative Populationsverdopplungen, KPDs) von hMSC, die ab P1 permanent mit 1,25D3 supplementiert wurden, ermittelt und mit unbehandelten Zellen verglichen. Die KPDs der Zellen von unterschiedlichen Spendern wurden ab P2 bestimmt und über einen Zeitraum von bis zu 6 Passagen ermittelt. Auf diese Weise konnten die Wachstumsraten von 1,25D3 kultivierten hMSC und Kontroll-hMSC bei jeder Subkultivierung untersucht werden.

## ERGEBNISSE

Permanent mit 1,25D3 kultivierte Zellen zeigten niedrigere KPDs als die 1,25D3 unbehandelten Kontroll-Zellen (Abb. 14A). Die Proliferationsrate der Kontroll-hMSC war nicht signifikant höher als die Proliferationsrate der 1,25D3 kultivierten Zellen. In der Abbildung Abb. 14C ist die Wachstumskurve sowie die entsprechenden KPDs eines repräsentativen Spenders dargestellt, hierbei wiesen die 1,25D3 stimulierten Zellen signifikant niedrigere KPDs auf als die Kontroll-Zellen (\*\*,  $p < 0,01$ ). Zusätzlich löste eine 1,25D3 Supplementierung der hMSC eine deutliche Wachstumsverlangsamung aus. Verglichen mit den Kontroll-Zellen benötigten die 1,25D3 kultivierten hMSC signifikant mehr Tage, um den Zustand der Subkonfluenz zu erreichen (\*\*,  $p < 0,01$ ) (Abb. 14B).

## ERGEBNISSE

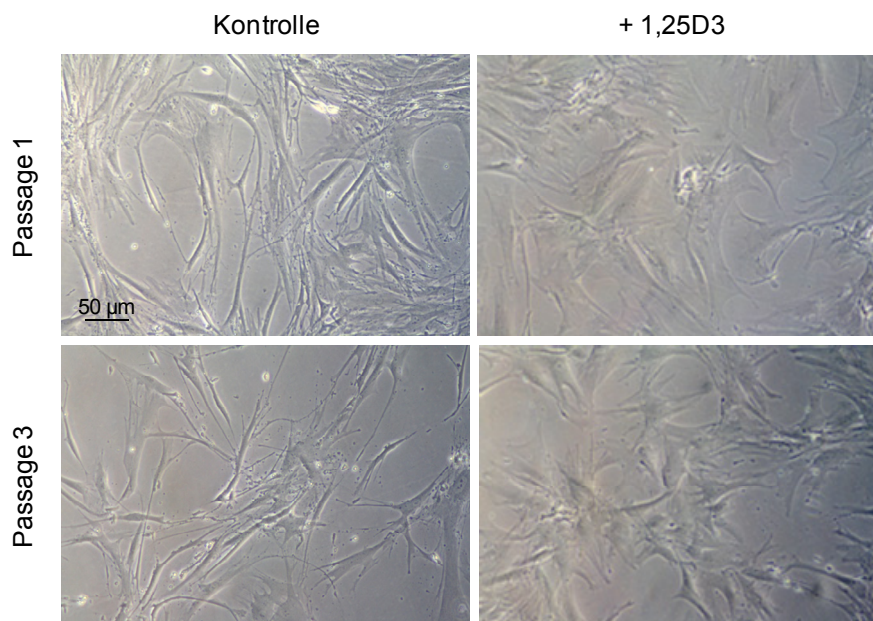


**Abb. 14 Der Einfluss von 1,25D3 auf die kumulative Populationsverdopplung (KPD) von hMSC. A** Die Wachstumsraten der 1,25D3 kultivierten hMSC (graue Balken) und Kontroll-hMSC (schwarze Balken) wurden mit Hilfe der Populationsverdopplungen (PDs) bei jeder Subkultivierung bestimmt. Die PDs wurden ab P1 ermittelt und die KPDs ab P2 berechnet. Es wurden unabhängige Experimente mit Zellen von unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Kontrolle: P1, P2, n = 6; P3, P4, n = 5; P5, n = 3; P6, n = 2. 1,25D3: P1, P2, n = 6; P3, P4, n = 4; P5, P6, n = 1. **B** In beiden Gruppen wurde die benötigte Zeit bis zum Erreichen der Subkonfluenz bestimmt. Die Versuchsansätze wurden unabhängig voneinander und mit hMSC von verschiedenen Spendern durchgeführt. Kontrolle: P1, P2, P3, P4, n = 6; P5, n = 5; P6, n = 3. 1,25D3: P1, P2, P3, n = 6; P4, n = 5; P5, n = 4; P6, n = 1. **C** Die Abbildung zeigt als repräsentatives Beispiel die KPDs der Zellen eines Spenders. (\*\*,  $p < 0,01$ ; student's t-test).

### 6.1.6

#### Morphologische Charakteristika von 1,25D3 behandelten hMSC

Die Behandlung der Zellen mit 1,25D3 veränderte die Morphologie der Zellen sehr deutlich. Die 1,25D3 kultivierten hMSC änderten ihre typische spindelförmige fibroblastische Zellgestalt in einen sehr stark verbreiterten, ausgedehnteren und insgesamt abgeflachten Phänotyp (Abb. 15). Diese morphologischen Veränderungen konnten in allen 1,25D3 kultivierten hMSC beobachtet werden.



**Abb. 15 Morphologische Charakteristika von 1,25D3 kultivierten hMSC.** Der Einfluss von 1,25D3 auf die Morphologie von hMSC wurde mit unbehandelten Kontroll-Zellen in P1 (obere Reihe) sowie P3 (untere Reihe) verglichen.

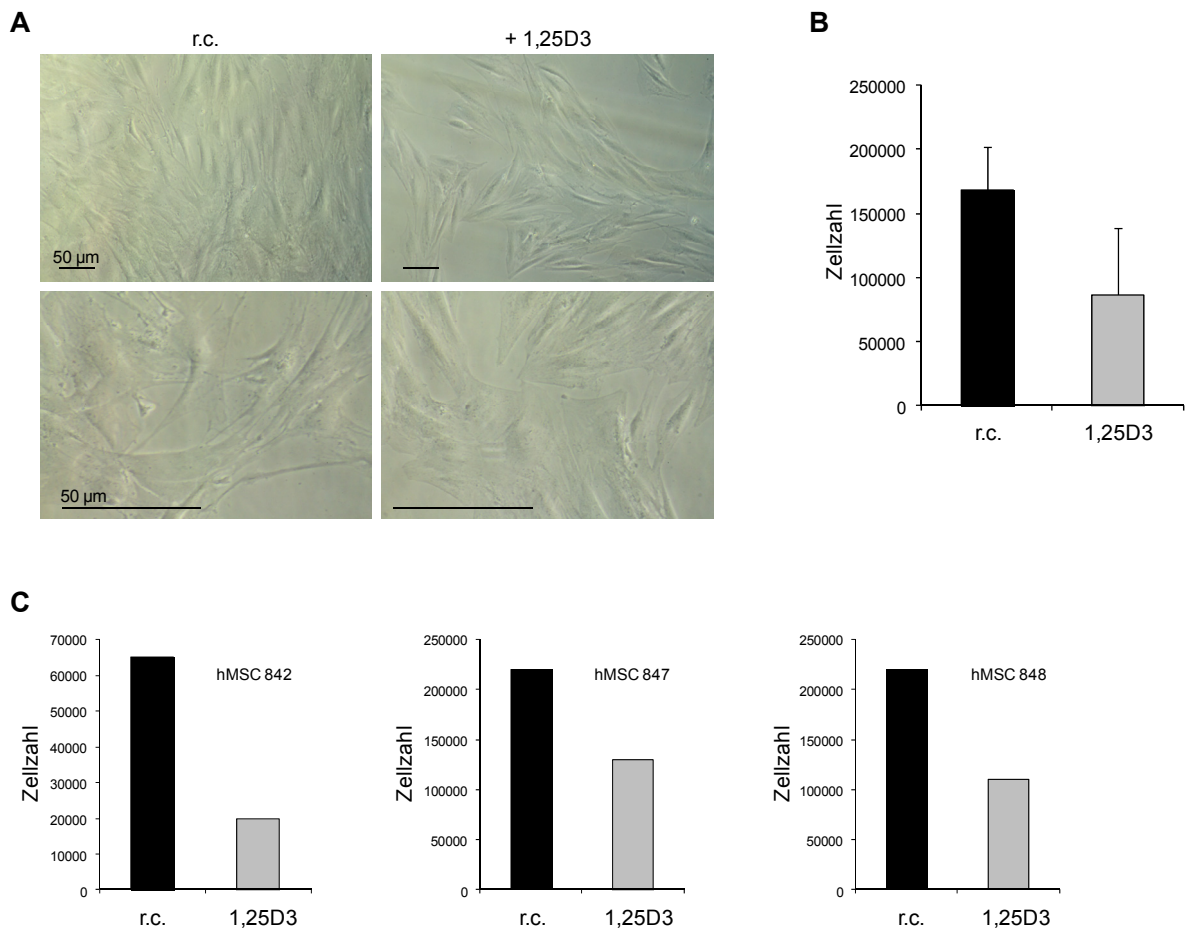
### 6.1.7

#### Retransformation von 1,25D3 behandelten hMSC

Die 1,25D3 induzierten morphologischen Veränderungen der hMSC konnten durch 1,25D3 Entzug teilweise rückgängig gemacht werden. Als Ausgangspunkt wurden hMSC von 3 verschiedenen Spendern gewählt, die über 3 Passagen mit 1,25D3 supplementiert wurden und im Anschluss daran ohne 1,25D3 in normalem Stammzell-Medium für die Dauer von 2 Wochen weiterkultiviert wurden (retransformierte Zellen; r.c.). Nach 2 Wochen ohne 1,25D3 Supplementierung kehrten sich die 1,25D3 induzierten morphologischen Änderungen teilweise wieder um. Manche hMSC nahmen ihren Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp wieder an, demgegenüber standen Zellen, die ihre vergrößerte,

## ERGEBNISSE

und verbreiterte Zellgestalt behielten (Abb. 16). Unterschiede zwischen den retransformierten Zellen und hMSC, die über die gesamte Dauer des Experimentes permanent mit 1,25D3 supplementiert wurden, ergaben sich auch hinsichtlich der Zellzahl beider Gruppen. Die Zellzahl der 1,25D3 kultivierten hMSC betrug  $0,8 \times 10^5$  Zellen (Mittelwert von 3 Donoren) und war niedriger als die Anzahl der retransformierten hMSC (Mittelwert von 3 Spendern: Zellzahl =  $1,6 \times 10^5$ ) derselben Passage (Abb. 16).



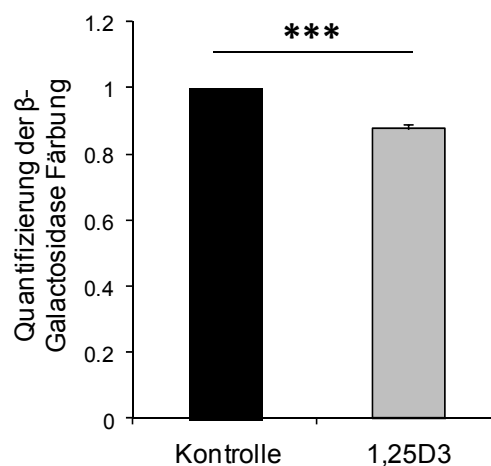
**Abb. 16 Die Retransformation von 1,25D3 kultivierten hMSC.** **A** Nach einer permanenten 1,25D3 Supplementierung über 3 Passagen wurden die hMSC in normalem Stammzell-Medium ohne 1,25D3 weitere 2 Wochen kultiviert (r.c. = retransformierte Zellen) und mit hMSC, die über die gesamte Dauer des Experimentes mit 1,25D3 supplementiert wurden, verglichen (1,25D3 = 1,25D3 kultivierte Zellen). Es sind die Ergebnisse einer repräsentativen hMSC-Charge gezeigt und die Beobachtungen waren in allen 3 untersuchten unabhängigen Experimenten einheitlich. Es wurden hMSC von 3 verschiedenen Spendern eingesetzt. Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m. **B** Die Zellzahl der retransformierten und 1,25D3 kultivierten Zellen der 3 untersuchten Donoren wurde bestimmt und als Mittelwerte + SEM dargestellt. **C** Die Abbildung zeigt die Zellanzahl von 1,25D3 kultivierten und retransformierten hMSC aller analysierten Spendern (n=3).



### 6.1.8

#### Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galactosidase Aktivität in 1,25D3 kultivierten hMSC

Humane MSC von 3 Spendern wurden über einen Zeitraum von bis zu 3 Passagen mit und ohne 1,25D3 kultiviert und der 1,25D3 Einfluss auf die zelluläre Seneszenz mittels der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) Färbung bestimmt. Die 1,25D3 kultivierten Zellen exprimierten signifikant weniger SA- $\beta$ -Gal als die unbehandelten Kontroll-Zellen (\*\*\*,  $p < 0,001$ ) (Abb. 17).

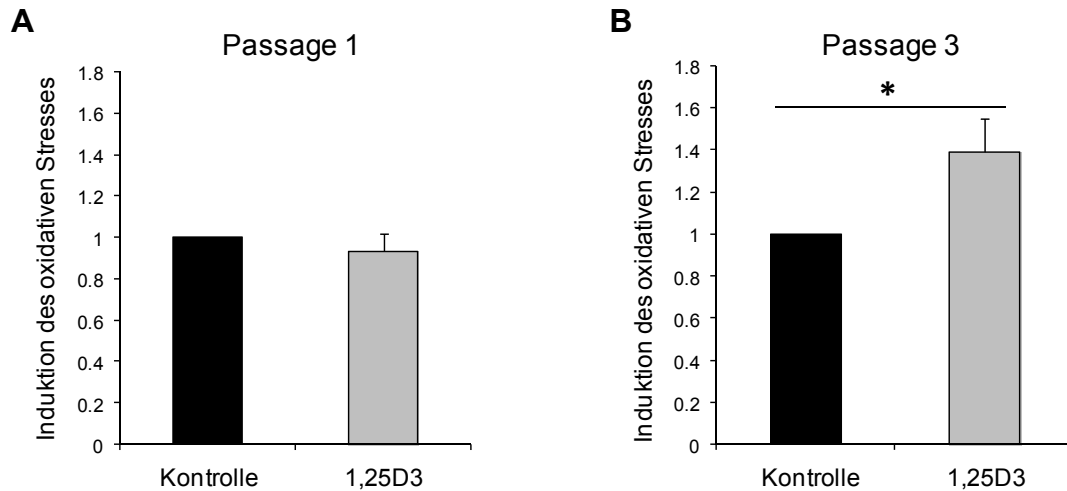


**Abb. 17 Die Quantifizierung der SA- $\beta$ -Gal Aktivität in 1,25D3 behandelten und unbehandelten hMSC.** Es wurden hMSC von 3 unterschiedlichen Donoren verwendet und die Kultivierung erstreckte sich über bis zu 3 Passagen. Abgebildet sind die Ergebnisse als Mittelwerte + SEM basierend auf 3 unabhängigen Versuchsansätzen. Jeder Versuchsansatz wurde auf seine Kontrolle normalisiert. Es wurden jeweils 5 Bilder pro SA- $\beta$ -Gal Färbung mit Hilfe des AutMess Tools der AxioVision Rel. 4.6. Software analysiert. (\*\*\*,  $p < 0,001$ ; student's t-test).

### 6.1.9

#### Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in 1,25D3 behandelten hMSC

Nach P1 und P3 wurde mittels Durchflusszytometrie die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in 1,25D3 kultivierten Zellen sowie unbehandelten hMSC bestimmt. Die 1,25D3 Behandlung über eine Passage (P1) reduzierte den oxidativen Stress in den hMSC minimal und nicht signifikant verglichen mit den Kontroll-hMSC. Nach einer 1,25D3 Kultivierung der Zellen über 3 Passagen (P3) kehrte sich dieser 1,25D3 induzierte Effekt in das Gegenteil um und es wurden signifikant mehr ROS in diesen Zellen gebildet (\*,  $p < 0,05$ ) (Abb. 18).



**Abb. 18 Die durchflusszytometrische Analyse der 1,25D3 induzierten ROS Bildung in hMSC nach P1 und P3.** Oxidativer Stress in hMSC, die über eine Passage (A) sowie über 3 Passagen (B) mit (graue Balken) und ohne (schwarze Balken) 1,25D3 kultiviert wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Jedes einzelne Experiment wurde auf seine Kontrolle normalisiert und es wurden Zellen von 3 verschiedenen Donoren benutzt. (\*,  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U Test).

### 6.1.10

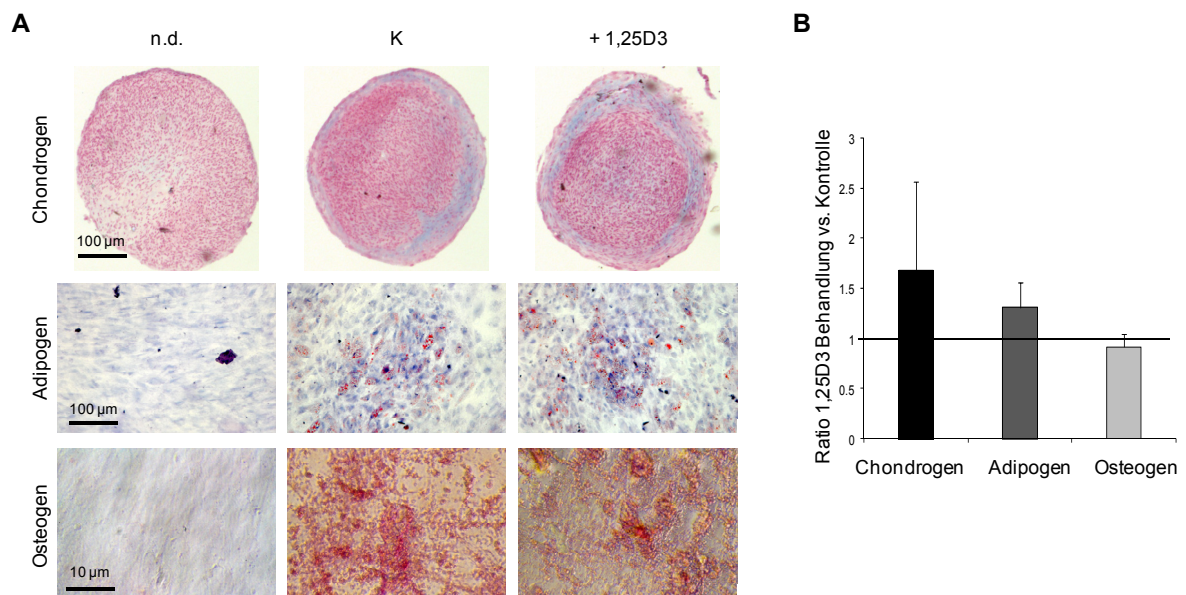
#### Einfluss der 1,25D3 Supplementierung auf die Differenzierungskapazität von hMSC

Um den Einfluss von 1,25D3 auf die Differenzierungskapazität von hMSC in die chondrogene, adipogene und osteogene Richtung zu untersuchen, wurden hMSC von 3 Spendern ab P1 mit 1,25D3 supplementiert. In P3 erfolgte die Differenzierung der permanent mit 1,25D3 supplementierten Zellen und der unbehandelten Kontroll-hMSC in die chondrogene, adipogene und osteogene Richtung.

Die chondrogene Differenzierungsfähigkeit der 1,25D3 supplementierten hMSC (P3) verstärkte sich nicht signifikant im Vergleich zu 1,25D3 unbehandelten Zellen (Abb. 19). 2 von 3 analysierten Donoren zeigten eine nahezu identische chondrogene Induktion in den Kontroll-hMSC und in den 1,25D3 supplementierten hMSC. Aufgrund der 1,25D3 Kultivierung der hMSC verstärkte sich die chondrogene Differenzierung im dritten untersuchten Spender. Die Induktion der Chondrogenese wurde durch die Anfärbung der Proteoglykane der extrazellulären Knorpelmatrix mittels Alcianblau bestimmt (Abb. 19, obere Reihe) und mit Hilfe digitaler Aufnahmen der chondrogenen Pellets quantifiziert. Neben der chondrogenen Differenzierung wurde die adipogene

## ERGEBNISSE

Differenzierungskapazität der 1,25D3 supplementierten hMSC im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. Die Formation der Lipidtropfen war in den unbehandelten Kontroll-Zellen geringer ausgeprägt als in den 1,25D3 kultivierten hMSC, wenngleich dieser Effekt keine Signifikanz aufwies (Abb. 19, mittlere Reihe). Nach vierwöchiger osteogener Differenzierung ergab die Alizarin Rot S-Färbung ein annähernd gleiches Mineralisierungsniveau in den 1,25D3 behandelten und unbehandelten hMSC (Abb. 19, untere Reihe).

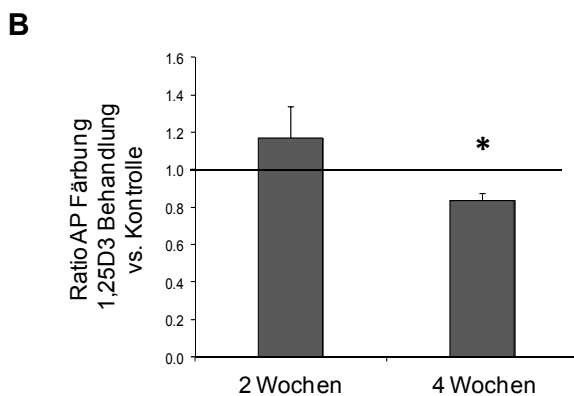
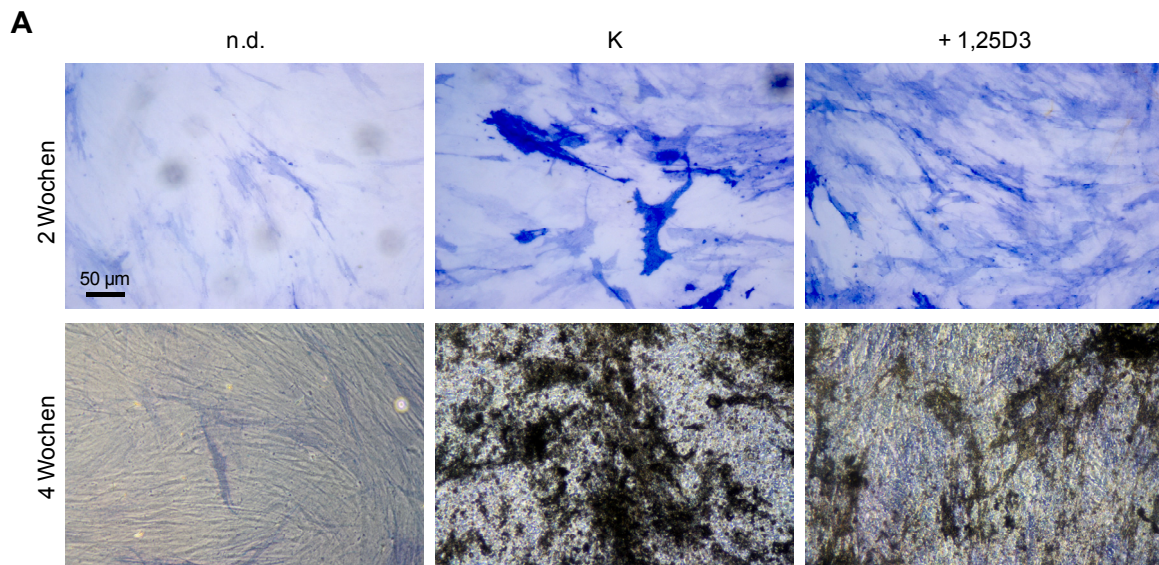


**Abb. 19 Die Differenzierungsfähigkeit von permanent 1,25D3 supplementierten hMSC im Vergleich zu 1,25D3 unbehandelten hMSC.** **A** Chondrogene, adipogene sowie osteogene Differenzierung von hMSC nach permanenter 1,25D3 Kultivierung über 3 Passagen. Abgebildet ist die Alzian Blau Färbung der chondrogen differenzierten hMSC (obere Reihe), die Ölrot O Färbung der im Laufe der adipogenen Differenzierung entstandenen intrazellulären Lipidvesikel (mittlere Reihe) sowie die Alizarin Rot S Färbung der mineralisierten extrazellulären Matrix nach der osteogenen Differenzierung (untere Reihe) (n.d. = nicht differenziert; K = differenzierte Kontrolle; + 1,25D3 = differenzierte über 3 Passagen mit 1,25D3 supplementierte hMSC). Die Darstellung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente, welche mit Zellen von 3 unterschiedlichen Spendern durchgeführt wurden. **B** Nach 3 Passagen permanenter 1,25D3 Supplementierung wurde die chondrogene, adipogene sowie osteogene Differenzierung quantifiziert und mit den unbehandelten Kontroll-Zellen verglichen. Für jede Differenzierungsrichtung wurde der Fold Change berechnet, indem ein Quotient aus der Induktion der Differenzierung der permanent 1,25D3 supplementierten hMSC und den unbehandelten, differenzierten Kontroll-Zellen gebildet wurde. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM von 3 unabhängigen Versuchsansätzen gezeigt und es wurden hMSC von 3 unterschiedlichen Spendern verwendet. Es wurden jeweils 5 bis 9 Bilder pro entsprechendem Differenzierungsansatz mit Hilfe des AutMess Tools der AxioVision Rel. 4.6. Software analysiert.

## ERGEBNISSE

Eine 2 Wochen dauernde osteogene Differenzierung führte zu einer 1,2-fach stärkeren Alkalische Phosphatase Färbung in 1,25D3 supplementierten hMSC (Abb. 20A, obere Reihe, Abb. 20B) und nach 4 Wochen unter osteogenen Bedingungen zeigten 1,25D3 supplementierte Zellen eine signifikant reduzierte (0,8-fach) Färbung der Alkalischen Phosphatase verglichen mit den unbehandelten Kontroll-hMSC (\*;  $p < 0,05$ ; student's t-test) (Abb. 20A, untere Reihe, Abb. 20B).

Zusammenfassend haben hMSC (P3), die ab P1 permanent mit 1,25D3 supplementiert wurden, ihre Differenzierungskapazität in die chondrogene, adipogene und osteogene Richtung erhalten verglichen mit 1,25D3 unbehandelten Kontroll-Zellen. Darüber hinaus ergab sich eine nicht-signifikante Tendenz der 1,25D3 Kultivierung die chondrogene und die adipogene Differenzierungs-Richtung zu fördern.



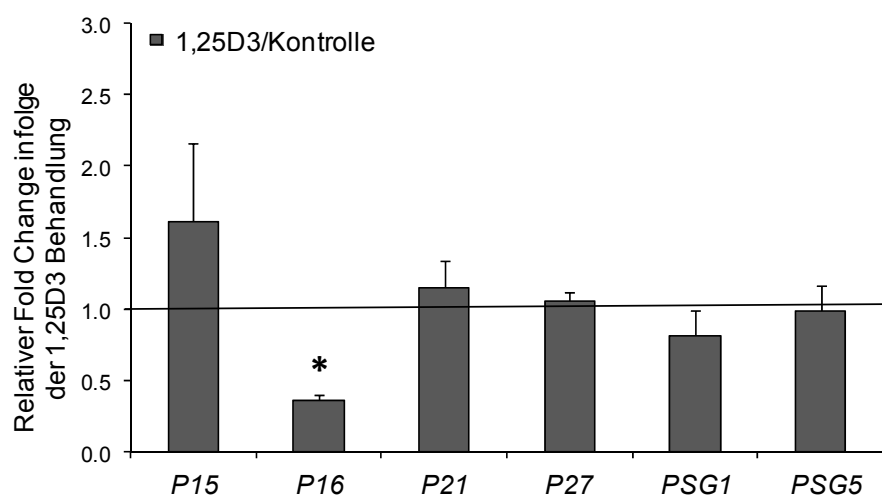
**Abb. 20 Die osteogene Differenzierungsfähigkeit von permanent 1,25D3 supplementierten hMSC verglichen mit 1,25D3 unstimulierten hMSC. A** Alkalische Phosphatase (AP) Färbung nach 2 wöchiger (obere Reihe) und nach 4 wöchiger (untere Reihe) osteogener Differenzierung. Die zytoplasmatische Alkalische Phosphatase Färbung wurde in undifferenzierten hMSC (n.d.) und in Zellen, die permanent mit 1,25D3 stimuliert wurden bzw. nicht stimuliert wurden, durchgeführt (K= differenzierte Kontrolle; +1,25D3 = differenzierte permanent mit 1,25D3 stimulierte hMSC). Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. **B** Darstellung der Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase Färbung nach 1,25D3 Inkubation der hMSC über den Zeitraum von 3 Passagen verglichen mit 1,25D3 unbehandelten Zellen als Ergebnis einer osteogenen Differenzierung über 2 bzw. 4 Wochen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten + SEM abgebildet. Dazu wurden hMSC von unterschiedlichen Spendern verwendet. Es wurden jeweils 6 Bilder der Alkalischen Phosphatase Färbung pro entsprechendem Differenzierungsansatz mit Hilfe des AutMess Tools der AxioVision Rel. 4.6. Software analysiert.

## ERGEBNISSE

### 6.1.11

#### Einfluss von 1,25D3 auf die Expression von Seneszenz-Markern

Die permanente 1,25D3 Supplementierung der hMSC über eine Zeitdauer von 4 Passagen führte zu einer nicht signifikanten Verstärkung der *P15* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B) Expression und zu einer signifikanten Reduktion der *P16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) Expression verglichen mit den unbehandelten Kontroll-hMSC. Während die Expression von *P21* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) lediglich in geringer Weise erhöht wurde (Fold Change 1,2) blieb das Expressionslevel von *P27* (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9) infolge der 1,25D3 Kultivierung unbeeinflusst. Es wurden ebenfalls keine deutlichen Effekte der 1,25D3 Behandlung der hMSC auf die pregnancy specific beta-1-glycoproteins (*PSGs*) festgestellt. Verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen ergab die Untersuchung von *PSG1* eine 0,8-fache Reduktion der Expression, derweil die *PSG5* Expression durch die 1,25D3 Kultivierung unbeeinflusst blieb (Abb. 21).



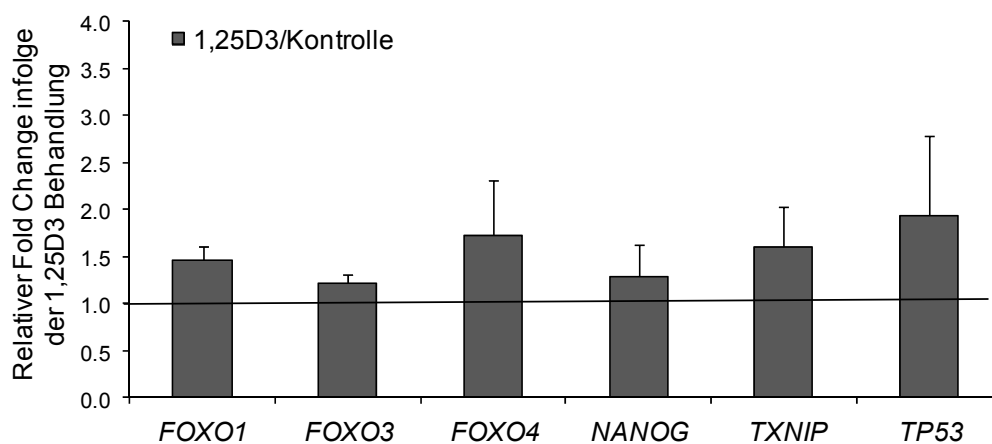
**Abb. 21 Der Einfluss der 1,25D3 Kultivierung auf Seneszenz-assoziierte Gene.** Es wurde die Expression Seneszenz-assoziiierter Gene mittels densitometrischer Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR Ergebnisse von 1,25D3 behandelten und unbehandelten hMSC untersucht. Dazu wurden hMSC von 3 unterschiedlichen Spendern verwendet. Für jeden Spender wurde der Fold Change bestimmt, indem die Genexpression von 1,25D3 behandelten hMSC und Kontroll-hMSC miteinander verglichen wurde. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM dargestellt. (\*,  $p < 0,05$ ; student's t-test). (*P15* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B), *P16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *P21* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), *P27* (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9), *PSG1* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1), *PSG5* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5)).



## 6.1.12

### Einfluss von 1,25D3 auf die Expression von Quieszenz-assoziierten Markern

Um herauszufinden, ob die morphologischen Veränderungen und die offensichtliche Verlangsamung des Zellwachstums von 1,25D3 supplementierten hMSC mit einem Zustand der Quieszenz in Verbindung gebracht werden können, wurde nach einer 1,25D3 Kultivierung über die Dauer von 3 Passagen das Expressionsniveau ausgewählter Quieszenz-assoziiierter Gene in 1,25D3 hMSC und Kontroll-Zellen untersucht. Dafür wurden hMSC von 3 humanen Donoren herangezogen. Das Gen *FOXO1* (forkhead box O1) wurde 1,5-fach verstärkt exprimiert, *FOXO3* (forkhead box O3) zeigte eine relative Genexpressionsänderung (Fold Change) von 1,2 und *FOXO4* (forkhead box O4) wies eine 1,7-fache Erhöhung des Expressionsgrades in 1,25D3 kultivierten Zellen der P3 auf im Vergleich zu den Kontroll-hMSC. Des Weiteren bewirkte eine 1,25D3 Behandlung eine leichte Induktion der *NANOG* (Nanog homeobox) Expression (Fold Change = 1,3) sowie eine 1,6-fache Verstärkung des *TXNIP* (thioredoxin interacting proteins). Als Folge der 1,25D3 Kultivierung wurde die *TP53* (tumor protein p53) Expression 1,9-fach erhöht (Abb. 22).



**Abb. 22 Der Einfluss der 1,25D3 Kultivierung auf Quieszenz-assoziierte Gene.** Dargestellt ist die Analyse der Expression ausgewählter Quieszenz-Marker sowie die densitometrische Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR Ergebnisse von Zellen (P3), die mit und ohne 1,25D3 kultiviert wurden. Es wurden hMSC von 5 unterschiedlichen Spendern verwendet. Für jeden Spender wurde der relative Fold Change bestimmt, indem die Expression von 1,25D3 behandelten hMSC und Kontroll-hMSC miteinander verglichen wurde. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM dargestellt. (*FOXO1* (forkhead box O1), *FOXO3* (forkhead box O3), *FOXO4* (forkhead box O4), *NANOG* (Nanog homeobox), *TXNIP* (thioredoxin interacting proteins), *TP53* (tumor protein p53)).

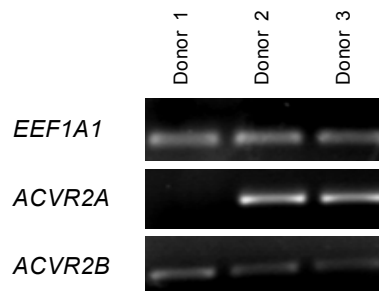
## 6.2 | Der Einfluss von rekombinatem humanem (rh) Aktivin A und rh Myostatin auf hMSC

Da die Kandidaten Aktivin A und Myostatin aufgrund ihrer Beteiligung an der Homöostase des muskuloskelettalen Systems (s. Einleitung) für die Entwicklung zellbasierter Therapien zur Regeneration von muskuloskelettalen Geweben eine bedeutende Rolle spielen, wurden im Folgenden ihre Einflüsse auf hMSC untersucht.

### 6.2.1

#### Signaltransduktion von rh Aktivin A und rh Myostatin in hMSC

Aktivin A (AA) bzw. rh AA sowie Myostatin (MSTN) bzw. rh MSTN konkurrieren als Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie um die gleichen Rezeptoren, zum einen um den Aktivin A Rezeptor Typ IIA (ACVR2A) sowie um den Aktivin A Rezeptor Typ IIB (ACVR2B) (Tsuchida et al. 2008). Da ACVR2A und ACVR2B für die Signalübertragung von AA (rh AA) und MSTN (rh MSTN) wesentlich sind, wurde mittels RT-PCR-Analyse die Expression von ACVR2A und ACVR2B in hMSC untersucht. Die Abbildung 23 zeigt eine spenderabhängige Expression des Rezeptors ACVR2A sowie eine durchgängige Expression des Rezeptors ACVR2B in allen 3 untersuchten hMSC-Spendern auf mRNA-Ebene.



**Abb. 23 Der Nachweis der Rezeptoren ACVR2A und ACVR2B in hMSC.** Die Expression der Rezeptoren ACVR2A und ACVR2B wurde in 3 hMSC Donoren mittels RT-PCR analysiert. (ACVR2A (aktivin A receptor, type IIA), ACVR2B (aktivin A receptor, type IIB)).

### 6.2.2

#### Immunphänotyp von rh AA und rh MSTN behandelten hMSC

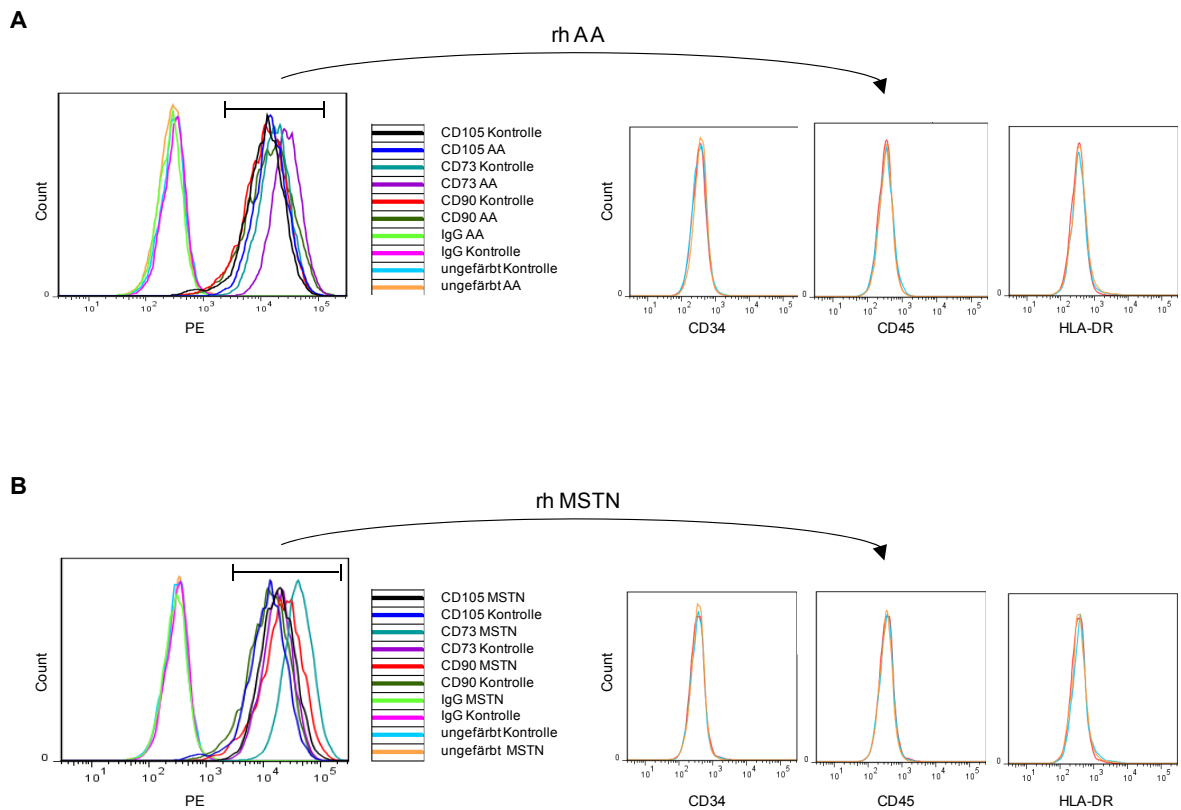
Nach 10 tägiger Supplementierung der hMSC mit rh AA bzw. rh MSTN wurde ein möglicher Einfluss auf die Expression von ausgewählten mesenchymalen Oberflächenmarkern mittels



## ERGEBNISSE

Durchflusszytometrie ermittelt. Es wurde der Phänotyp der rh AA sowie rh MSTN kultivierten hMSC und der Phänotyp von unbehandelten Kontroll-Zellen gegenübergestellt. Dabei trat hinsichtlich der mesenchymalen Oberflächenmarker (CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>) und der hämatopoetischen Oberflächenmarker (CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>) kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen (mit rh Protein stimulierte hMSC sowie unstimulierte hMSC) zutage (Abb. 24 A/B, linke und rechte Reihe). Die vorliegende Darstellung der Abbildung Abb. 24 A/B zeigt die stimulierten sowie die unbehandelten hMSC auf CD73, CD90 und CD105 Positivität gegated. Die Expression von CD73, CD90 und CD105 der rh AA oder rh MTSN behandelten hMSC und der unbehandelten Kontroll-Zellen war zwischen 97,4 % und 99,2 %.

## ERGEBNISSE

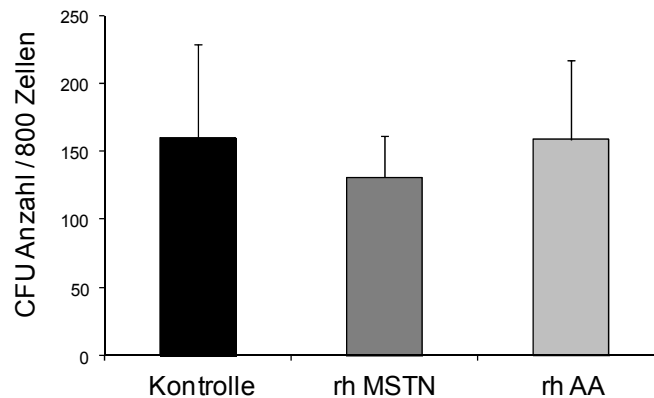


**Abb. 24 Der Immunphänotyp von mit rh AA sowie rh MSTN kultivierten hMSC im Vergleich zu unbehandelten hMSC.** Die Oberflächenmarker-Expression von hMSC, die über einen Zeitraum von 10 Tagen mit rh AA (A) und rh MSTN (B) stimuliert wurden, wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert und mit unbehandelten Kontroll-hMSC verglichen. Die gelben Kurven repräsentieren die spezifische Antikörperfärbung der Kontroll-hMSC, die spezifische Antikörperfärbung der mit rh Protein stimulierten Zellen werden durch blaue Kurven abgebildet und rote Kurven stellen die spezifische Antikörperfärbung der Isotypen Kontrolle von rh AA bzw. rh MSTN behandelten hMSC dar (rechte Reihen). Die Überlagerungen im Histogramm zeigen die für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 positiven rh AA-hMSC bzw. rh MSTN-MSC sowie Kontroll-hMSC. Das Expressionsniveau der rh AA behandelten hMSC und unbehandelten Zellen lag für die Marker CD73, CD90 und CD105 zwischen 98,1 % und 99,2%. Für die rh MSTN kultivierten hMSC sowie die entsprechenden Kontroll-hMSC variierte das Expressionslevel der Oberflächenmarker zwischen 97,4 % und 98,5%. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Spenders und diese Ergebnisse bestätigten sich in allen 3 unabhängigen Experimenten von 3 verschiedenen Spendern (Kontrolle = rh AA bzw. rh MSTN unbehandelte Zellen; AA = rh AA stimulierte hMSC; MSTN = rh MSTN stimulierte hMSC; IgG = Isotypen Kontrolle).

### 6.2.3

#### Klonogene Kapazität von rh AA und rh MSTN stimulierten hMSC

Im Weiteren wurden die Auswirkungen von rh AA und rh MSTN auf die klonogene Kapazität von hMSC in P1 quantifiziert (Abb. 25). Dazu wurden hMSC von 8 Spendern verwendet. Neben einer deutlich spenderabhängigen CFU-Anzahl, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen mit rh AA und rh MSTN supplementierten Zellen und unbehandelten Kontroll-hMSC. Pro 800 ausgesäeter hMSC (P1) reichte die Anzahl der gebildeten Kolonien in allen 3 analysierten Gruppen von 76 bis 263. Im Vergleich zu den unbehandelten hMSC wirkte sich die Gabe von rh AA nicht auf die Anzahl der gebildeten CFUs aus, dagegen reduzierte die Verabreichung von rh MSTN die Bildung von CFUs um 18 % verglichen mit den Kontroll-Zellen.



**Abb. 25** Der Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die Anzahl der CFUs. Die Anzahl der gebildeten CFUs wurde nach Behandlung der hMSC mit rh AA oder rh MSTN (beide 0,01 µg/ml) bestimmt und mit unbehandelten Kontroll-hMSC verglichen. Die Mittelwerte ergeben sich aus 8 unabhängigen Experimenten sowie aus unabhängigen hMSC Präparationen von 8 Spendern. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der einzelnen Messwerte.

### 6.2.4

#### Der Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die mesenchymale Differenzierungskapazität von hMSC

Mögliche Veränderungen der mesenchymalen Differenzierungskapazität als Folge der Behandlung der hMSC mit rh AA bzw. rh MSTN (beide 0,01 µg/ml) wurden auf mRNA-Ebene anhand der klassischen adipogenen Marker *LPL* (lipoprotein lipase), *FABP4* (fatty acid binding protein 4, adipocyte), *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) sowie der osteogenen Marker *ALPL* (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney), *RUNX2* (runt-related transcription factor 2),

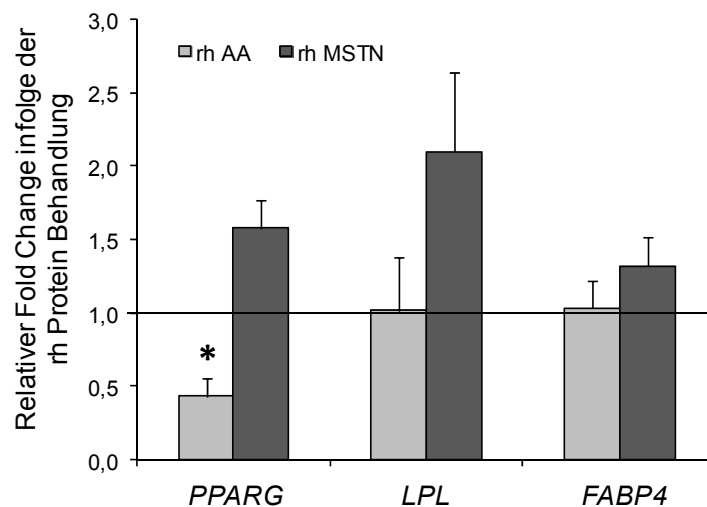
## ERGEBNISSE

OPN, OC untersucht. Mit Hilfe der Ölrot O-Färbung als Nachweis für die adipogene Differenzierungskapazität sowie der Alizarin Rot S-Färbung als Nachweis für die osteogene Differenzierungsfähigkeit sollten weitere mögliche rh AA und rh MSTN Einflüsse auf die hMSC aufgedeckt werden. Es wurden Zellen von 6 Donoren eingesetzt.

### 6.2.4.1

#### Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die adipogene Differenzierungskapazität in hMSC

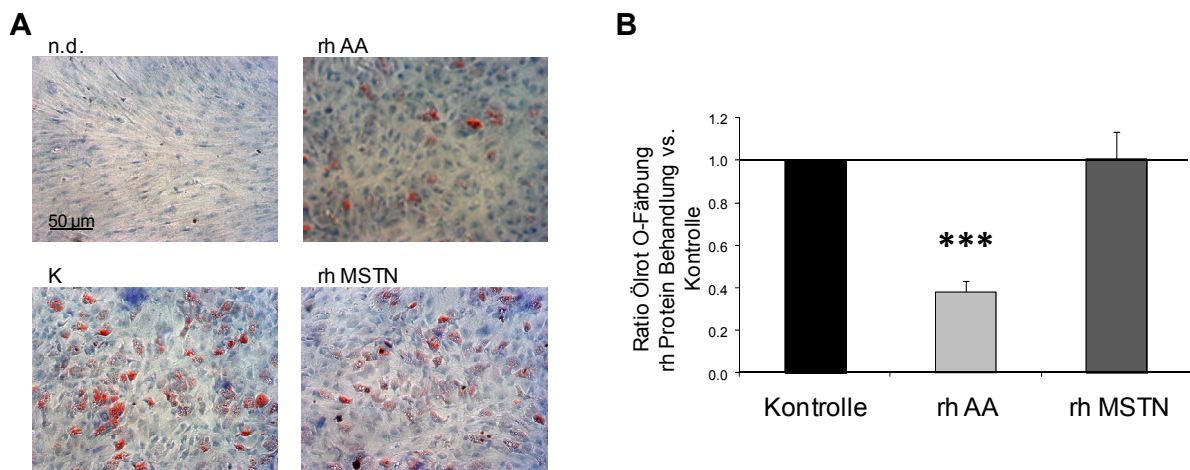
Die Gabe von rh AA reduzierte die Expression des adipogenen Markers *PPARG* signifikant um das 0,4-fache (\*,  $p < 0,05$ ). Dagegen konnten keine Änderungen der Genexpression von *LPL* (Fold Change 1,0) und *FABP4* (Fold Change 1,0) festgestellt werden (Abb. 26). Nach 2 Wochen adipogener Differenzierung der hMSC ergab die densitometrische Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR eine deutlich verstärkte Genexpression von *LPL* (Fold Change = 2,1), *PPARG* (Fold Change = 1,6) und *FABP4* (Fold Change = 1,3) in den Zellen, die mit rh MSTN stimuliert wurden (Abb. 26).



**Abb. 26 Die Expression der adipogenen Marker und die densitometrische Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR Ergebnisse in rh AA bzw. rh MSTN (beide 0,01 µg/ml) behandelten hMSC (P1) verglichen mit unbehandelten Kontroll-Zellen (P1).** Nach der Normierung auf das Housekeeping-Gen *EEF1A1* wurde für jeden Spender der Fold Change berechnet, indem ein Quotient aus den mit rh Protein kultivierten Zellen und den Kontroll-hMSC gebildet wurde. Es wurden hMSC von 6 verschiedenen Donoren verwendet und das Ergebnis wurde als Mittelwert + SEM dargestellt. (\*,  $p < 0,05$ ; student's *t*-test). (*EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), *LPL* (lipoprotein lipase), *FABP4* (fatty acid binding protein 4, adipocyte)).

## ERGEBNISSE

Die Supplementierung der hMSC mit rh AA während der adipogenen Differenzierung reduzierte die Formation der Lipidtröpfchen signifikant 0,4-fach (\*\*\*,  $p < 0,001$ ) (Abb. 27). Dagegen konnten keine Auswirkungen auf die Bildung der Lipidtröpfchen aufgrund der rh MSTN Stimulation der Zellen während der adipogenen Differenzierung verzeichnet werden. Die Quantifizierung der Ölrot O-Färbung in Kontroll-hMSC und rh MSTN behandelten hMSC resultierte in die gleiche Menge an intrazellulär gebildeten Lipidtröpfchen (Abb. 27).



**Abb. 27 Ölrot O-Färbung (A) sowie Quantifizierung der Ölrot O-Färbung (B) von stimulierten und unstimulierten adipogen differenzierten hMSC.** A Dargestellt ist die Ölrot O-Färbung intrazellulärer Lipidtröpfchen der mit rh Protein stimulierten bzw. unstimulierten adipogen (2 Wochen) differenzierten hMSC (n.d. = nicht differenziert; K = differenzierte Kontrolle; rh AA = differenzierte über 2 Wochen mit rh AA supplementierte hMSC, rh MSTN = differenzierte über 2 Wochen mit rh MSTN supplementierte hMSC). B Die Abbildung zeigt die Quantifizierung der Ölrot O-Färbung als Mittelwerte + SEM von 6 unabhängigen Experimenten und 6 separaten hMSC Präparationen. Durch Vergleich der rh AA bzw. rh MSTN (beide 0,01 µg/ml) kultivierten hMSC mit den Kontroll-hMSC ergab sich für die untersuchten Spender ein Fold Change. (\*\*\*,  $p < 0,001$ ; student's t-test).

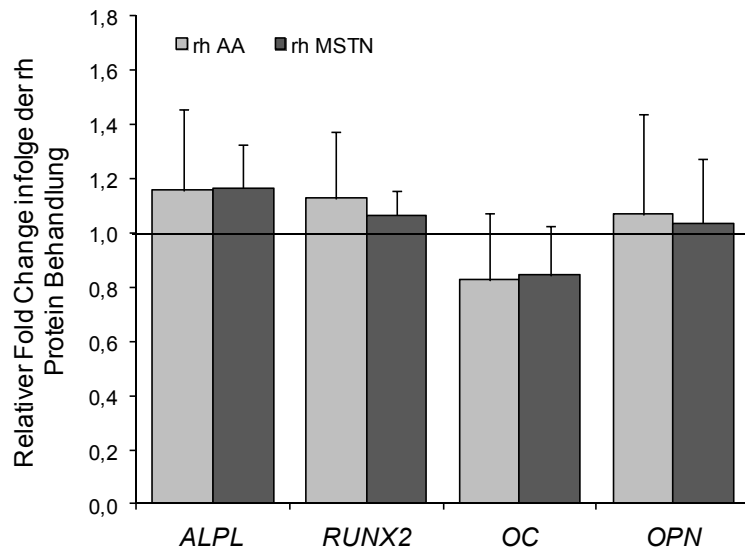
### 6.2.4.2

#### Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die osteogene Differenzierungskapazität in hMSC

Die Genexpression der osteogenen Marker *ALPL*, *RUNX2*, *OC* und *OPN* wurde nach 4 Wochen osteogener Differenzierung mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht und densitometrisch quantifiziert. Die Zugabe von rh AA während der osteogenen Differenzierung verstärkte das Expressionsniveau der Gene *ALPL* (Fold Change: 1,2), *RUNX2* und *OPN* (beide Fold Change: 1,1) nicht. Die Expression von *OC* wird durch rh AA Gabe 0,8-fach vermindert im Vergleich zu unbehandelten

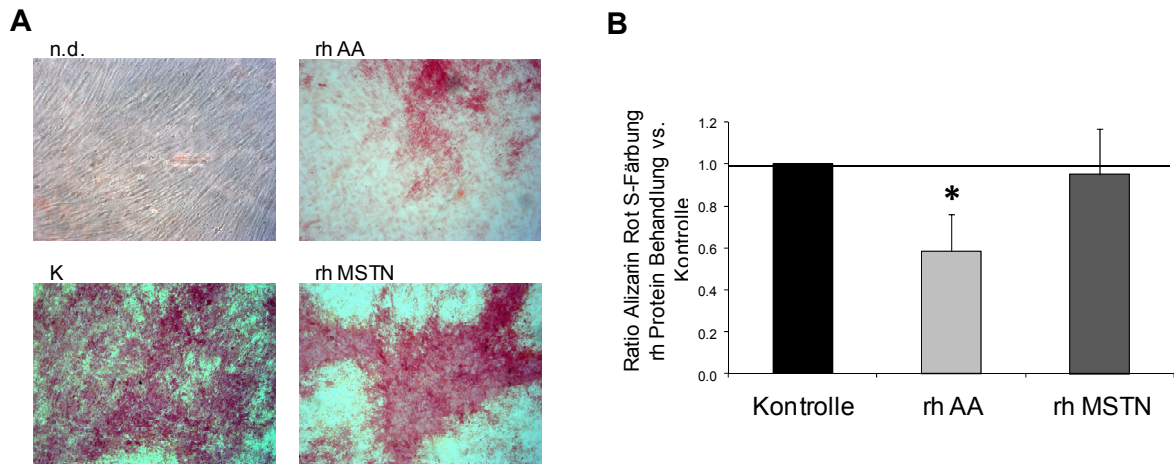
## ERGEBNISSE

Kontroll-hMSC. Die Stimulation der hMSC mit rh MSTN veränderte das Genexpressionsniveau von *ALPL* 1,2-fach, von *RUNX2* 1,1-fach und *OC* wird 0,8-fach vermindert exprimiert. Rh MSTN beeinträchtigte das Expressionsniveau von *OPN* nicht (Abb. 28).



**Abb. 28 Expressionsniveau osteogener Marker sowie densitometrische Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR Ergebnisse in rh MSTN bzw. rh AA behandelten hMSC (P1) verglichen mit unbehandelten hMSC (P1).** Nach der Normierung auf das Housekeeping-Gen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) wurde für jeden hMSC-Donor der Fold Change berechnet, indem die mit rh Protein behandelten differenzierten Zellen mit den unstimulierten differenzierten Kontroll-hMSC verglichen wurden. Dazu wurden hMSC von 6 verschiedenen Spendern verwendet. Abgebildet ist das Ergebnis als Mittelwerte + SEM. (*ALPL* (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney), *RUNX2* (runt-related transcription factor 2), *OC* (osteocalcin), *OPN* (osteopontin)).

Eine rh AA Kultivierung der hMSC während der 4 wöchigen osteogenen Differenzierungsphase reduzierte die Bildung von Kalziumhydrogencarbonat signifikant um 0,4 (\*,  $p < 0,05$ ) (Abb. 29). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Stimulation der hMSC mit rh MSTN die Bildung von Kalziumhydrogencarbonat verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen nicht (Abb. 29).



**Abb. 29 Alizarin Rot S-Färbung (A) sowie Quantifizierung der Alizarin Rot S-Färbung (B) der stimulierten und unstimulierten osteogen differenzierten hMSC. A** Darstellung der Alizarin Rot S-Färbung der mineralisierten extrazellulären Matrix von 4 Wochen osteogen differenzierten hMSC, die mit rh AA bzw. rh MSTN supplementiert wurden (n.d. = nicht differenziert; K = differenzierte Kontrolle; rh AA = differenzierte über 4 Wochen mit rh AA supplementierte hMSC; rh MSTN = differenzierte über 4 Wochen mit rh MSTN supplementierte hMSC). **B** Die Quantifizierung der Alizarin Rot S-Färbung ist als Mittelwerte von 6 unabhängigen Experimenten + SEM gezeigt. Für jeden Spender (n=6) wurde der Fold Change errechnet, indem die mit rh AA bzw. rh MSTN behandelten hMSC mit den unbehandelten differenzierten Kontroll-Zellen verglichen wurden. (\*,  $p < 0,05$ ; student's t-test).

### 6.2.5

#### Kurzzeit-Einflüsse von rh AA und rh MSTN auf Proliferation und Apoptose von hMSC

Mögliche Effekte der beiden rh Proteine rh AA und rh MSTN auf die Proliferations- und die Apoptoserate wurden mittels Kurzzeit-Stimulationen über 3 verschiedene Zeiträume analysiert. Dazu wurden Zellen (P1) von 6 verschiedenen Donoren 24, 48 und 72 h mit rh Protein in den Konzentrationen 0,01  $\mu\text{g/ml}$  und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Die Verabreichung der rh Proteine rh AA und rh MSTN erfolgte sowohl alleine als auch in Kombination. Um eine mögliche Wirkung der Stimulation mit rh Protein ermitteln zu können, erfolgte zur gleichen Zeit die Kultivierung von unbehandelten hMSC als Referenz-Kontrolle.

Eine 24 stündige Stimulationsdauer der Zellen mit 0,01  $\mu\text{g/ml}$  rh AA änderte die Proliferationsrate der Zellen nicht. Eine 5 %ige Erhöhung der Proliferationsrate der hMSC wurde aufgrund einer 48 stündigen rh AA (0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) Inkubation erzielt, nach 72 stündiger Stimulation schwächte sich dieser rh AA induzierte Effekt auf 3 % ab. Der Einsatz von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  rh AA verminderte die Rate der

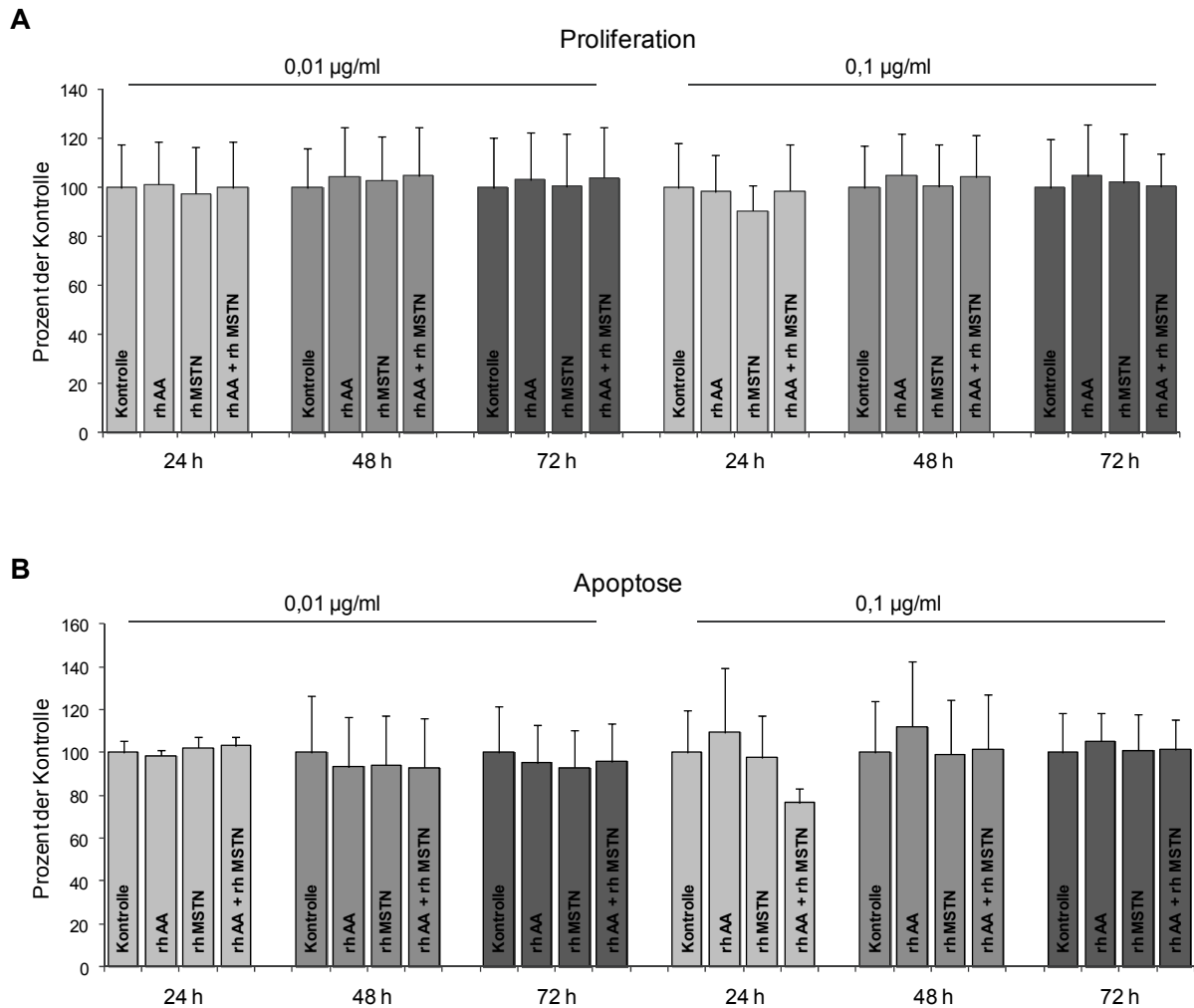
## ERGEBNISSE

Proliferation nach 24 h um 2 % und bewirkte nach 48 bzw. 72 h eine Erhöhung um 5 % (Abb. 30A). Nach 24 stündiger Inkubation der Zellen mit 0,01 µg/ml rh MSTN konnte eine Verminderung der Zellproliferation um 3 % verzeichnet werden, nach einer Verlängerung der Inkubationsdauer für weitere 24 h wurde die Proliferationsrate um 3 % erhöht verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen. Das Proliferations-Verhalten der hMSC blieb infolge einer 72 h andauernden rh MSTN Stimulation unbeeinträchtigt und wich nicht von den unstimulierten hMSC ab. Verglichen mit den unstimulierten Kontroll-hMSC inhibierte eine 24 stündige rh MSTN Behandlung (0,1 µg/ml) die Proliferation der hMSC um 10 %, dieser Effekt wurde bei einer Inkubationsdauer von 48 h wieder aufgehoben und kehrte sich nach 72 stündiger rh MSTN Stimulation sehr leicht ins Gegenteil um (Anstieg der Proliferation um 2%) (Abb. 30A). Die gleichzeitige Behandlung der hMSC mit rh AA und rh MSTN in den Konzentrationen 0,01 µg/ml sowie 0,1 µg/ml zeigte in den 6 untersuchten Spendern lediglich eine um maximal 5 % gesteigerte Proliferation der hMSC im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Abb. 30A).

Insgesamt löste eine Stimulation mit rh AA, rh MSTN und mit den beiden rh Proteinen in Kombination (0,01 µg/ml; 0,1 µg/ml) unabhängig von der Zeitdauer keine bzw. keine gravierende Erhöhung bzw. Verminderung der Proliferation in hMSC aus. Die Hemmung der Proliferation um 10 % infolge einer 24 stündigen rh MSTN Behandlung (0,1 µg/ml) war die stärkste beobachtete Auswirkung auf die Proliferationsverhalten der hMSC im Rahmen der Stimulationsexperimente mit den rh Proteinen.

Die Apoptose der hMSC wurde nach der Stimulation mit rh AA (0,01 mg/ml) um 7 % (nach 48 h) bzw. um 5 % (nach 72 h) verringert verglichen mit den unbehandelten hMSC. Die Verabreichung von rh AA in der höheren Konzentration 0,1 µg/ml erzielte einen Anstieg der Apoptose in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Nach 24 h erhöhte sich die Rate der Apoptose um 10 %, nach 48 h um 12 % und nach 72 h um 5 % (Abb. 30B). Die Gabe von rh MSTN (0,01 µg/ml) induzierte eine Verringerung der Apoptose nach 48 h um 6 % und nach 72 h um 7 % in den untersuchten hMSC. Wurde rh MSTN in der höheren Konzentration 0,1 µg/ml eingesetzt, verminderte sich der Einfluss auf die Apoptose (2 % Reduktion nach 24 h) bzw. die Apoptose blieb unbeeinflusst (Abb. 30B). Die kombinierte Stimulation der hMSC mit 0,01 µg/ml rh AA sowie rh MSTN erhöhte die Apoptose nach 24 h um 3 %, nach 48 h um 7 % und nach 72 h um 5 % im Vergleich zu den Kontroll-hMSC. Deutlichere Einflüsse offenbarte die kombinierte Inkubation in der Konzentration 0,1 µg/ml nach 24 h, hierbei war eine Apoptose Verminderung um 23 % zu verzeichnen. Nach einer Stimulationsdauer von 48 und 72 h konnte keine Veränderung im Vergleich zu den Kontroll-hMSC beobachtet werden (Abb. 30B).





**Abb. 30 Wirkung von rh AA und rh MSTN auf Proliferation und Apoptose der hMSC. A/B** Humane MSC wurde über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 h mit rh AA bzw. rh MSTN in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,01 µg/ml bzw. 0,1 µg/ml) inkubiert und anschließend wurden die Proliferations- und Apoptoseraten der Zellen bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte + SEM, dabei wurde jeder Versuchsansatz auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. Für das Experiment wurden aus unabhängigen Präparationen erhaltene hMSC von 3 verschiedenen Spendern verwendet und die 3 Experimente wurden unabhängig voneinander durchgeführt.

### 6.3 | Der Einfluss von Low Oxygen (LO) auf hMSC

Die Sauerstoffspannung von hMSC liegt im Knochenmark, ihrer natürlichen Umgebung, zwischen 1 % und 7 % (D'Ippolito et al. 2006). Daher wurde untersucht, inwieweit sich eine Kultivierung der hMSC unter niedrig Sauerstoffbedingungen (2,5 % Sauerstoff), auch bezeichnet als Low Oxygen (LO), positiv

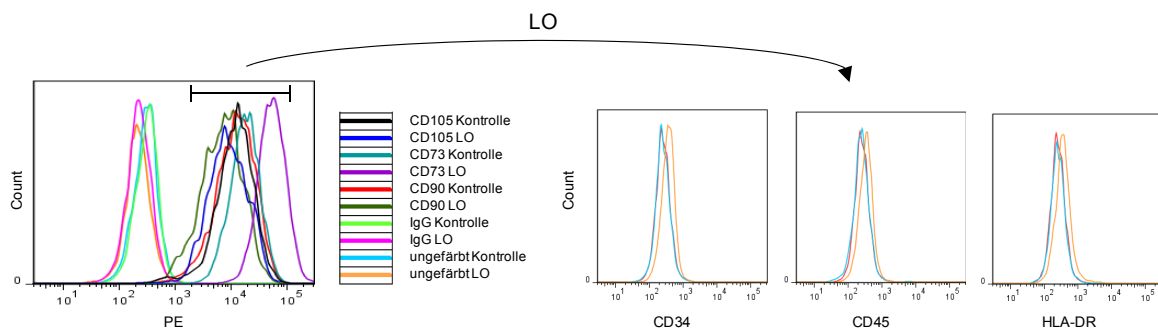
## ERGEBNISSE

auf den Erhalt der Stemness und die Entwicklung der Seneszenz auswirkt und mit Zellkulturbedingungen von 21 % Sauerstoff (High Oxygen, HO) verglichen.

### 6.3.1

#### Immunphänotyp von LO behandelten und unbehandelten hMSC

Humane MSC in P1 wurden für den Zeitraum von 10 Tagen unter LO Bedingungen kultiviert. Mögliche Veränderungen hinsichtlich der Expression der mesenchymalen Oberflächenmarker wurden mit der Methode der Durchflusszytometrie analysiert und mit HO kultivierten Kontroll-hMSC verglichen. Die Analyse der mesenchymalen Oberflächenmarker zeigte in LO stimulierten sowie unstimulierten hMSC die Expression der mesenchymalen Marker CD73, CD90, CD105 und keine Expression von hämatopoetischen Markern (CD37<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>) (Abb. 31A/B, linke und rechte Reihe). In der Abbildung 31 sind die LO kultivierten und die HO kultivierten (Kontroll-hMSC) Zellen positiv für die mesenchymalen Marker CD73, CD90 und CD105 gated. Die Expression von CD73, CD90 und CD105 lag bei den rh AA oder rh MTSN behandelten hMSC und den unbehandelten Kontroll-Zellen zwischen 93,4 % und 99,1 %.



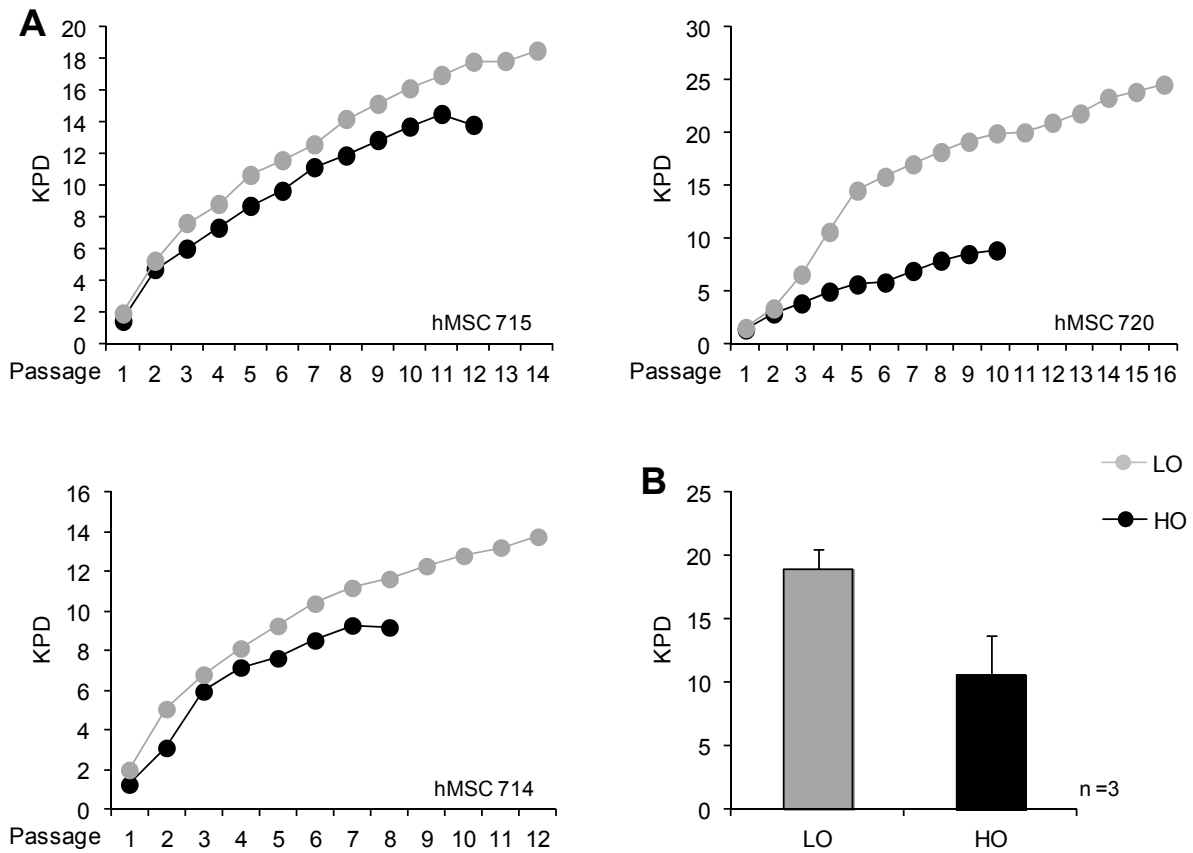
**Abb. 31 Der Immunphänotyp von LO kultivierten hMSC im Vergleich zu HO kultivierten hMSC.** Die gelben Kurven repräsentieren die spezifische Antikörperfärbung der HO Kontroll-hMSC, die spezifische Antikörperfärbung der LO kultivierten hMSC werden durch blaue Kurven abgebildet und rote Kurven stellen die spezifische Antikörperfärbung der Isotypen Kontrolle von LO kultivierten hMSC dar (rechte Reihen). Die Überlagerungen im Histogramm zeigen die für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 positiven LO-hMSC sowie Kontroll-Zellen. Das Expressionsniveau der LO kultivierten hMSC und der unbehandelten Zellen lag für die Marker CD73, CD90 und CD105 zwischen 93,4 % und 99,1 %. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Spenders und diese Ergebnisse bestätigten sich in allen 3 unabhängigen Experimenten von 3 verschiedenen Spendern (Kontrolle = unbehandelte HO kultivierte Kontroll-Zellen; LO = LO kultivierte hMSC; IgG = Isotypen Kontrolle).

### 6.3.2

#### Analyse der Wachstumsrate von Langzeit LO kultivierten hMSC

---

Inwieweit eine Langzeit LO Kultivierung das Proliferationsverhalten von hMSC beeinflusst und sich von der Proliferationsrate der HO expandierten Zellen abhebt wurde anhand der Auswertung der kumulativen Populationsverdopplungen (KPDs) beider Gruppen bestimmt. Hierzu wurden Zellen von 4 verschiedenen Spendern ab P1 bis zum Eintritt in die Seneszenz sowohl unter LO als auch unter HO kultiviert. Die Wachstumskurven der 3 untersuchten Donoren sowie die entsprechenden KPDs sind in Abbildung Abb. 32A aufgetragen. Die HO Kultivierung der Zellen führte zu einem früheren Eintritt in den Zustand der zellulären Seneszenz verglichen mit LO kultivierten hMSC. Abgesehen von der verlängerten Proliferationskapazität zeigten alle 3 untersuchten Spender höhere KPDs als die HO expandierten hMSC. Die gepoolten Ergebnisse der 3 Donoren ergaben infolge einer HO Kultivierung durchschnittliche KPDs von  $10,6 \pm 1,6$  PD und infolge einer LO Kultivierung durchschnittliche KPDs von  $18,9 \pm 3,1$  PD und somit einen deutlichen Unterschied ( $p=0,08$ ) (Abb. 32B).



**Abb. 32 Charakterisierung der Wachstumsrate von hMSC infolge einer LO bzw. HO Langzeit Kultivierung.** **A** Wachstumskurven von 3 unterschiedlichen hMSC-Populationen. Die hMSC wurden von Spendern unterschiedlichen Geschlechts sowie Alters erhalten und wuchsen unter LO (graue Linie) bzw. HO Bedingungen (schwarze Linie). **B** Vergleich des Mittelwertes der kumulativen Populationsverdopplungen von LO (grauer Balken) bzw. HO (schwarzer Balken) kultivierten Zellen. Die Mittelwerte wurden aus 3 unabhängigen Experimenten+ SEM berechnet.

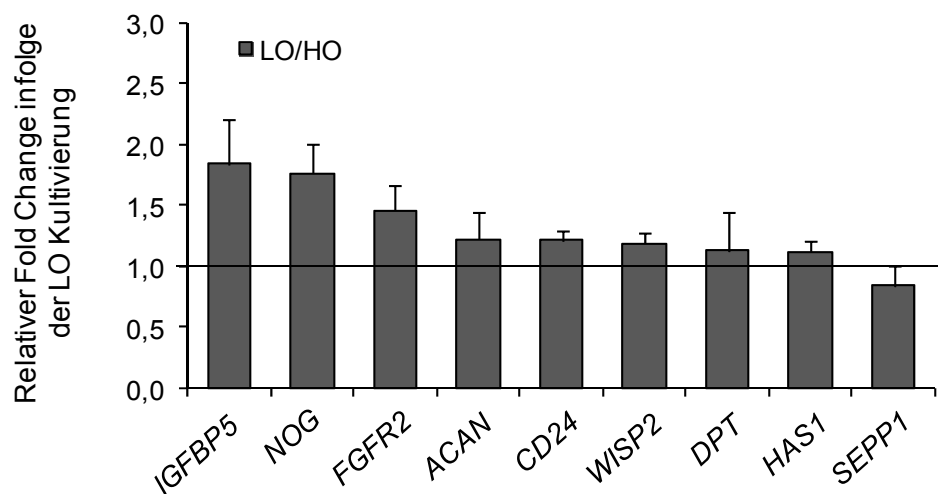
### 6.3.3

#### Analyse des Expressionsmusters ausgewählter Gene in LO kultivierten hMSC

Die Einflüsse einer LO Kultivierung der hMSC über den Zeitraum einer Passage (P1) auf das Genexpressionsniveau ausgewählter Gene, die mit Hilfe des Web Services von CARMAweb (Comprehensive R based Microarray Analysis web frontend) (Rainer et al. 2006) aus Hybridisierungsdaten der eigenen Arbeitsgruppe und der Gruppe um Prof. Günter Lepperdinger (Institut für Biomedizinische Altersforschung, Universität Innsbruck, Österreich), ermittelt wurden, wurden mit semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Humane MSC von 6 unterschiedlichen Spendern wurden ab P1 bis zum Erreichen ihrer Subkonfluenz unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (LO)

## ERGEBNISSE

inkubiert. Als Referenz dienten unter HO kultivierte hMSC. Das Expressionslevel der Gene *IGFBP5* (insulin-like growth factor binding protein 5) sowie *NOG* (noggin) wurde in LO kultivierten Zellen gegenüber HO kultivierten hMSC 1,8-fach gesteigert. Als Folge der LO Kultivierung konnte eine 1,5-fache Erhöhung der *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor 2) Expression beobachtet werden. Das Niveau der Expression der Gene *ACAN* (aggrecan), *CD24* (CD24 molecule), *WISP2* (WNT1 inducible signaling pathway protein 2) (alle Fold Change 1,2), *DPT* (dermatopontin), *HAS1* (hyaluronan synthase 1) (beide Fold Change 1,1) wurde durch die LO Kultivierung lediglich minimal oder nicht induziert sowie *SEPP1* (selenoprotein P, plasma, 1) 0,8-fach reduziert (Abb. 33).



**Abb. 33 Densitometrische Quantifizierung (semi-quantitative RT-PCR) des Genexpressionsmusters ausgewählter Gene abhängig von der LO bzw. der HO Kultivierung.** Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM, welche aus den individuellen Fold Changes von 6 unterschiedlichen Spendern nach der Normierung auf das Housekeeping-Gen *EEF1A1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) berechnet wurden. Hierbei wurde der Fold Change aus dem Quotient der Genexpression von LO kultivierten hMSC und HO kultivierten hMSC eines Spenders gebildet. (*IGFBP5* (insulin-like growth factor binding protein 5), *NOG* (noggin), *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor 2), *ACAN* (aggrecan), *CD24* (CD24 molecule), *WISP2* (WNT1 inducible signaling pathway protein 2), *DPT* (dermatopontin), *HAS1* (hyaluronan synthase 1), *SEPP1* (selenoprotein P, plasma, 1)).

### 6.3.4

#### Kurzzeit Einflüsse einer LO Kultivierung auf das Genexpressionsmuster von Stemness-assoziierten und Seneszenz-assoziierten Genen in hMSC

Das Niveau der Genexpression von ausgewählten Stemness-assoziierten Genen wie *OCT4* beispielsweise (oder *POU5F1*, octamer-binding protein 4), *SOX2* (SRY (sex determining region Y)-box

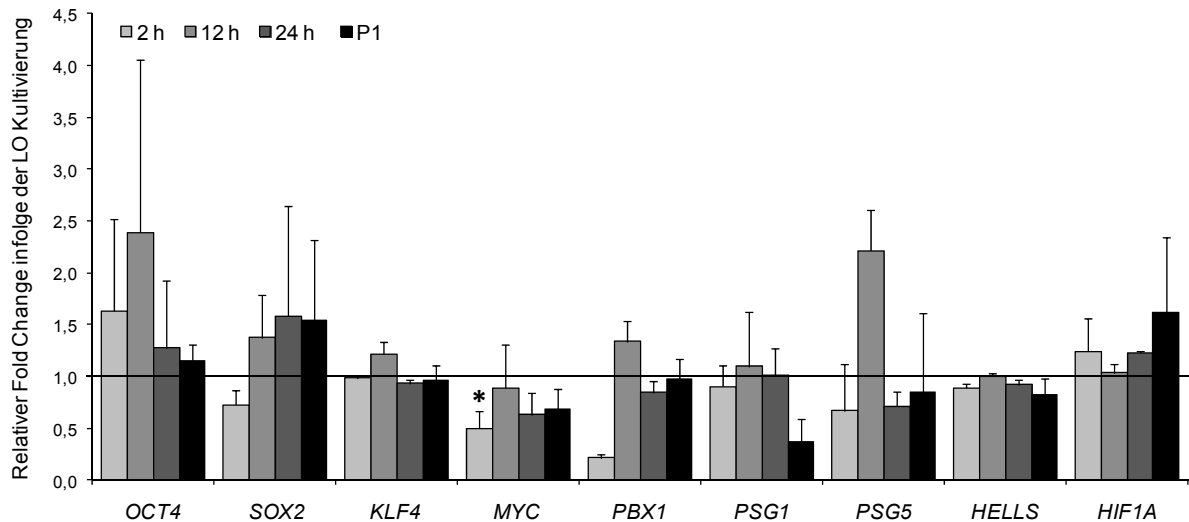
## ERGEBNISSE

2), *KLF4* (Krüppel-like factor 4 (gut)), *MYC* (myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)), *PBX1* (pre-B-cell leukemia homeobox 1) oder *PSG1*, *PSG5*, *HELLS* (helicase, lymphoid-specific) als Seneszenz-assoziierte Gene und *HIF1A* (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)) wurde in 3 verschiedenen Spendern untersucht, um herauszufinden, ob sich infolge einer kurzzeitigen LO Kultivierung die Stemness bzw. die Entwicklung eines seneszenten Zustandes in hMSC verändert. Dazu wurden 4 unterschiedlich lange Inkubationszeitpunkte von 2 h, 12 h, 24 h sowie über die Zeitdauer einer Woche (Passage 1, P1) gewählt und mit HO inkubierten Kontroll-Zellen verglichen (Abb. 34).

Die densitometrische Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR-Analyse ergab eine Verstärkung der *OCT4* Expression in den LO expandierten hMSC in allen 4 untersuchten Zeitpunkten. Bereits nach 2 stündiger LO Inkubation wurde eine 1,6-fache Erhöhung des Expressionsniveaus verglichen mit den HO inkubierten hMSC beobachtet. Ein Plateau der *OCT4* Expression wurde nach 12 stündiger LO Kultivierung erzielt (Fold Change = 2,4), danach verringerte sich das Niveau der *OCT4* Expression (24 h, Fold Change = 1,3; P1, Fold Change = 1,2) und näherte sich den Werten der HO kultivierten Zellen an. Nach einer 0,7-fachen Verminderung der *SOX2* Expression infolge einer 2 stündigen LO Inkubation führte die LO Kultivierung zu einem Expressions-Anstieg nach 12 h (Fold Change = 1,4) und 24 h (Fold Change = 1,6) sowie nach P1 (Fold Change = 1,5). Im Vergleich mit den HO expandierten Kontroll-hMSC blieb die Expression von *KLF4* durch die LO Kultivierung nahezu unbeeinträchtigt (2 h, Fold Change = 1,0; 12 h, Fold Change = 1,2; 24 h, Fold Change = 0,9; P1, Fold Change = 1,0). Zu allen 4 untersuchten Zeitpunkten wurde *MYC* in den LO kultivierten Zellen verglichen mit den Kontroll-hMSC vermindert exprimiert. Die stärkste 0,5-fache signifikante Reduktion der Expression konnte bereits nach 2 h LO Inkubation verzeichnet werden (\*,  $p < 0,5$ ), nach 12 h änderte sich die Expression nicht (Fold Change = 0,9). Eine Behandlung der hMSC für 24 h und einer Passage induzierte eine Änderung der Expression um den Faktor 0,6 (24 h) bzw. 0,7 (P1) verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen. Nach 2 stündiger LO Inkubation wurde *PBX1* in LO hMSC 0,2-fach vermindert exprimiert verglichen mit der Expressionsstärke von HO expandierten Zellen. Dieser Effekt kehrte sich nach 12 stündiger LO Kultivierung ins Gegenteil um (12 h, Fold Change = 1,3) und die Expressionsstärke wies nach 24 stündiger LO Kultivierung einen Fold Change von 0,8 auf und einer LO Kultivierung für eine Passage einen Fold Change von 1,0 auf. LO kultivierte Zellen zeigten keine Änderungen der *PSG1* Expression hinsichtlich einer 2, 12 und 24 stündigen LO Inkubation (2 h, Fold Change = 0,9; 12 h, Fold Change = 1,1; 24 h = Fold Change = 1,0). Allerdings wurde nach einer LO Stimulation über den Zeitraum einer Passage eine 0,4-fache Verminderung der Expression von *PSG1* festgestellt. Die Expression von *PSG5* wurde nach 2 h 0,7-fach vermindert, nach 12 h 2,2-fach erhöht und nach 24 h 0,7-fach reduziert bzw. nach P1 0,8-fach verringert verglichen mit den unstimulierten Kontroll-hMSC. Eine LO Kultivierung der hMSC induzierte unabhängig von der

## ERGEBNISSE

Inkubationsdauer keine oder nur minimalste Expressionsänderungen des *HELLS* Gens in den LO hMSC (2 h, Fold Change = 0,9; 12 h, Fold Change = 1,0; 24 h, Fold Change = 0,9; P1, Fold Change = 0,8). Die Expression von *HIF1A* erhöht sich nach 2 stündiger LO Inkubation 1,2-fach, 1,2-fach nach 24 h sowie 1,6-fach nach einer Passage unter LO Bedingungen im Vergleich mit den HO expandierten Zellen. Eine 12 stündige LO Kultivierung hatte keine Expressionsänderung zur Folge (Abb. 34).



**Abb. 34 Densitometrische Quantifizierung (semi-quantitative RT-PCR) des Genexpressionsmusters ausgewählter Gene, die 2 h, 12 h, 24 h sowie über eine Passage (P1) unter LO bzw. HO Bedingungen inkubiert wurden.** Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM, die aus den individuellen Fold Changes von 3 Donoren nach der Normierung auf das Housekeeping-Gen *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) berechnet wurden. Die Bildung des Fold Changes ergab sich aus dem Quotienten der Genexpression LO kultivierter hMSC und HO kultivierter hMSC eines Spenders. (\*,  $p < 0,05$ ; student's t-test). (*OCT4* (octamer-binding protein 4), *SOX2* (*SRY* (sex determining region Y)-box 2), *KLF4* (Krüppel-like factor 4 (gut)), *MYC* (myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)), *PBX1* (pre-B-cell leukemia homeobox 1), *PSG1* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1), *PSG5* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5), *HELLS* (helicase, lymphoid-specific), *HIF1A* (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor))).

### 6.3.5

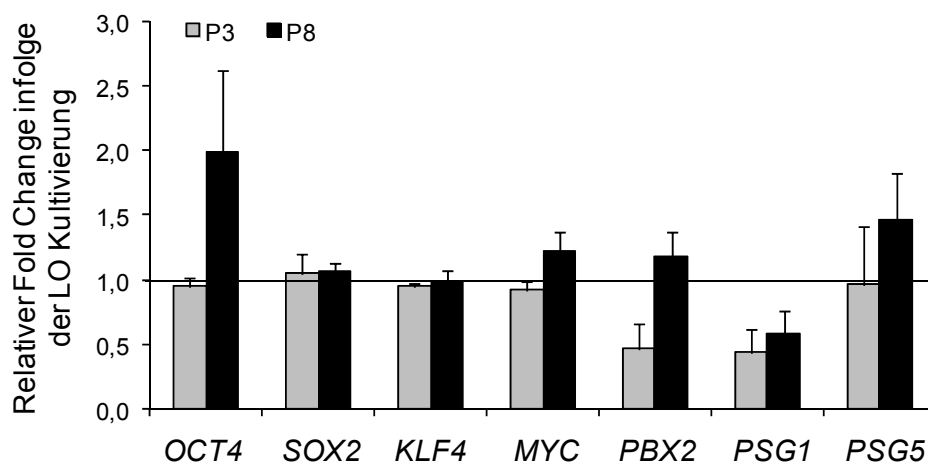
#### Langzeit Einflüsse einer LO Kultivierung auf das Genexpressionsmuster von Stemness-assoziierten und Seneszenz-assoziierten Genen in hMSC

Anhand zweier ausgewählter Zeitpunkte wurden mögliche Unterschiede im Expressionsmuster der Stemness-assoziierten Gene *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*, *PBX2* (pre-B-cell leukemia homeobox 2) sowie der Seneszenz-assoziierten Gene *PSG1* und *PSG5* von LO und HO kultivierten hMSC untersucht. Mit

## ERGEBNISSE

P3 wurde ein früher Zeitpunkt gewählt und P8 repräsentierte einen späten Zeitpunkt. Humane MSC-RNA von 3 Donoren bildete die Grundlage der semi-quantitativen RT-PCR Analyse.

Die Genexpression der Stammzellmarker *OCT4*, *SOX2* (beide Fold Change 1,0), *KLF4* sowie *MYC* (beide Fold Change 0,9) blieb in P3 und bei den Genen *SOX2* sowie *KLF4* (beide Fold Change 1,0) auch in P8 erhalten. Die Expansion der Zellen unter LO Bedingungen bewirkte in P8 einen 1,2-fachen Anstieg der *MYC* Expression und induzierte eine 2,0-fache Verstärkung der *OCT4* Expression verglichen mit den HO kultivierten hMSC. Die densitometrische Quantifizierung ergab eine gegenläufige Expression von *PBX2* in den beiden untersuchten Zeitpunkten. Während *PBX2* unter LO Bedingungen in P3 0,5-fach vermindert exprimiert wurde, kehrte sich dieser Effekt in P8 in eine 1,2-fache Erhöhung des Expressionsniveaus um verglichen mit den HO kultivierten hMSC. LO expandierte Zellen zeigten eine verringerte Expression von *PSG1* in P3 (Fold Change = 0,4) sowie in P8 (Fold Change = 0,6). Die LO Expansion der hMSC verursachte eine entgegengesetzte Tendenz hinsichtlich der Expression von *PSG5*, welches in P8 1,5-fach stärker exprimiert wurde als die Kontroll-Zellen. Dagegen konnte in P3 keine Änderung im Genexpressionsniveau der beiden analysierten Gruppen festgestellt werden (Abb. 35).



**Abb. 35 Densitometrische Quantifizierung (semi-quantitative RT-PCR) des Expressionsmusters von ausgewählten Genen in P3 und P8 in Abhängigkeit einer LO bzw. HO Kultivierung.** Dargestellt ist die relative Genexpressionsänderung (Fold Change) als Folge einer LO Kultivierung nach der Normierung auf das Housekeeping-Gen *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1). Der Fold Change wurde für jeden Spender berechnet, indem ein Quotient aus der Expression von LO hMSC und HO hMSC errechnet wurde. Die so erhaltenen individuellen Fold Changes wurden gemittelt und die Ergebnisse als Mittelwerte + SEM dargestellt. Grundlage waren Zellen von 3 unterschiedlichen hMSC-Donoren. (*OCT4* (octamer-binding protein 4), *SOX2* (*SRY* (sex determining region Y)-box 2), *KLF4* (Kruppel-like factor 4 (gut)), *MYC* (myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)), *PBX2* (pre-B-cell leukemia homeobox 2), *PSG1* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1), *PSG5* (pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5)).



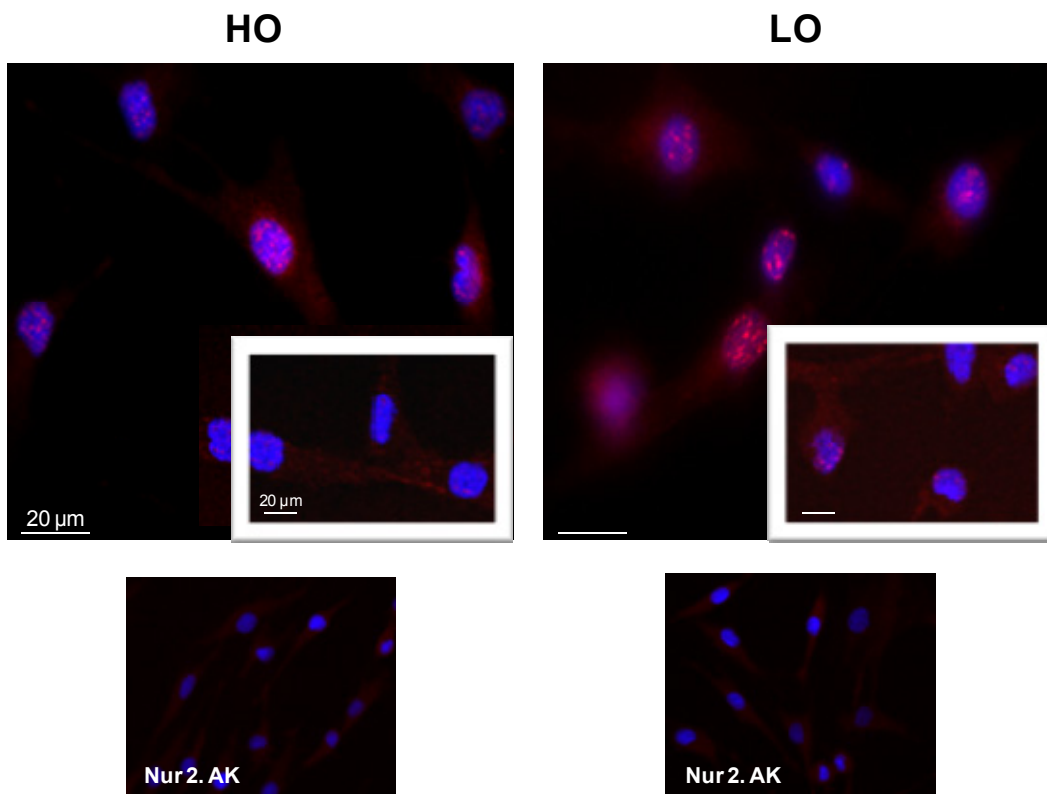
## 6.3.6

### Proteinexpression in LO kultivierten hMSC

#### 6.3.6.1

#### Proteinexpression von OCT4 in LO expandierten hMSC

Die Proteinexpression von OCT4 in LO kultivierten hMSC (P1) wurde untersucht und mit den HO expandierten hMSC verglichen. Ausgehend von diesen 2 Versuchsansätzen wurden die Zellen nach einer 9 Tage dauernden LO Kultivierung immunzytochemisch angefärbt. Bei beiden untersuchten Zellgruppen (LO-hMSC und HO-hMSC) konnte das OCT4 Protein im Zellkern nachgewiesen werden, jedoch wurde kein Unterschied der Proteinexpressionsstärke infolge der LO bzw. HO Kultivierung der Zellen festgestellt (Abb. 36).



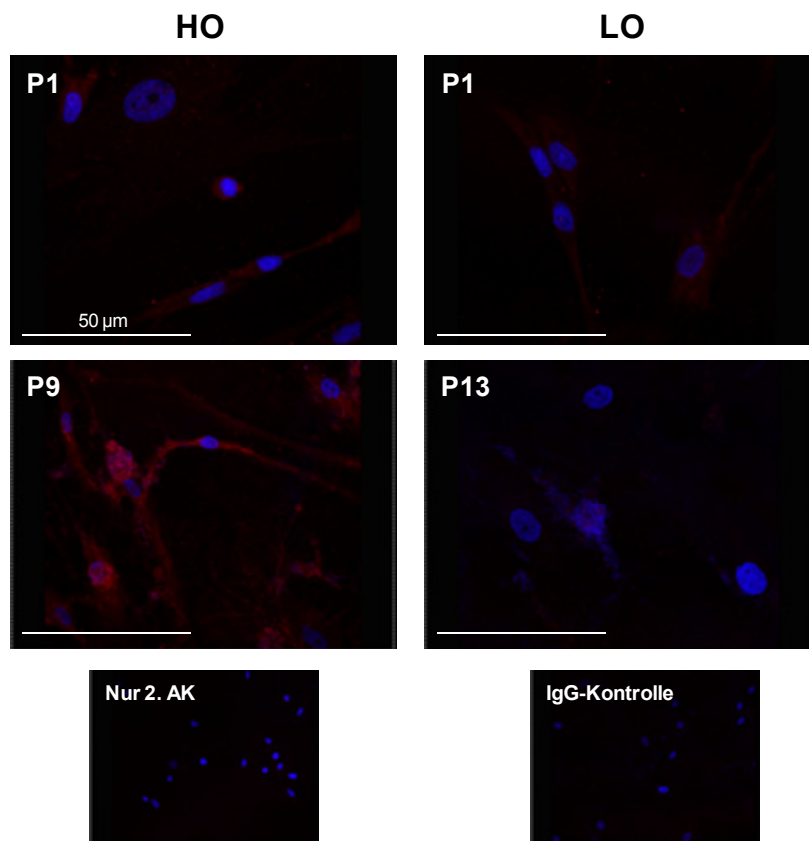
**Abb. 36 OCT4 Proteinexpression in LO-hMSC und HO-hMSC (P1).** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 9 Tagen unter LO bzw. HO Bedingungen kultiviert (Insert: Konfokale Aufnahme). Verwendeter 1. Antikörper: Oct4 (Oct-3/4) (sc-9081 Santa Cruz; 1:250). Verwendeter 2. Antikörper: NorthernLights™ Anti-rabbit IgG-NL557 (NL004 R&D Systems; 1:400).

## ERGEBNISSE

### 6.3.6.2

#### P16 Proteinexpression in Langzeit LO expandierten hMSC

Die Untersuchung der Expression des P16 Proteins in hMSC, die ab P1 bis zur seneszenten Passage unter LO bzw. HO Zellkulturbedingungen expandiert wurden, ergab keinen Unterschied hinsichtlich der Stärke der P16 Proteinexpression beider untersuchter Gruppen (LO kultivierte hMSC bzw. HO kultivierte hMSC) in P1. Dagegen wird in Abbildung 37 deutlich, dass das P16 Protein in der letzten seneszenten Passage in den HO kultivierten hMSC (P9) deutlich stärker im Zytoplasma exprimiert wird als in den LO expandierten Zellen (P13) (Abb. 37). Dieser Einfluss einer LO Kultivierung war in allen 4 untersuchten hMSC-Donoren konsistent.



**Abb. 37 Vergleich der P16 Proteinexpression in LO bzw. HO kultivierten hMSC.** Konfokale Aufnahme der Proteinexpression von P16 in hMSC, die ab P1 und bis zur seneszenten Passage unter LO (seneszente Passage: P13) bzw. HO (seneszente Passage: P9) Bedingungen kultiviert wurden. Es wurden hMSC von 4 unterschiedlichen Spendern verwendet. Verwendeter 1. Antikörper: P16 (sc-468 Santa Cruz; 1:50). Verwendeter 2. Antikörper: NorthernLights™ Anti-Rabbit IgG-NL557 (NL004 R&D Systems; 1:400). Verwendete IgG-Kontrolle: Negative Control Rabbit Immunglobulin Fraction (Dako Code No. X 0903; 1:50).

## 6.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Behandlung der hMSC mit 1,25D3, rh AA, rh MSTN und LO beeinträchtigte das Expressionsniveau der mesenchymalen Oberflächenmarker nicht und erhielt die klonogene Kapazität der Zellen (LO: nicht untersucht; da bereits Literatur-Daten vorliegen; s. 7.3.1.1). 1,25D3 und rh MSTN kultivierte hMSC zeigten keine Verminderung der Differenzierungskapazität verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen. Es konnte eine Tendenz hin zu einer verstärkten chondrogenen und adipogenen Differenzierungsfähigkeit der 1,25D3 kultivierten Zellen beobachten werden, gleichzeitig wurde die Differenzierung in die osteogene Richtung nach 2 wöchiger 1,25D3 Kultivierung leicht erhöht bzw. nach 4 Wochen minimal verringert. Eine durchgängige Kultivierung der hMSC mit 1,25D3 hatte niedrigere KPDs zur Folge und eine von der Dauer der 1,25D3 Inkubation abhängige signifikante Verminderung der Proliferations- und Apoptoserate. Quieszenz-assoziierte Gene wurden in 1,25D3 behandelten Zellen tendenziell stärker exprimiert, während gleichzeitig die SA-β-Gal Aktivität sowie die Expression des Seneszenz-assoziierten Markers *P16* signifikant reduziert wurde. Auf mRNA-Ebene reduzierte eine rh AA Stimulation in der Zellkultur nicht nur die Expression des adipogenen Markers *PPARG* signifikant, sondern auch die Formation von Lipidvesikeln und Kalziumhydrogenphosphat. Infolge der Supplementierung der hMSC mit rh MSTN wurden die adipogenen sowie osteogenen Marker auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert, allerdings wurde diese differenzierungsfördernde Wirkung bei der Auswertung der Ölrot O-Färbung und der Alizarin Rot S-Färbung nicht beobachtet, da die Menge an gebildeten Lipidtropfen und Kalziumhydrogencarbonat in den rh MSTN kultivierten und unbehandelten hMSC nahezu identisch war. Abgesehen von einer Reduktion der Apoptose um 23 % durch die kombinierte Gabe von rh AA und rh MSTN (beide 0,1 µg/ml) hatte eine Stimulation der hMSC mit rh AA oder rh MSTN keine gravierenden Auswirkungen auf die Proliferation und die Apoptose in hMSC. Eine LO Kultivierung der hMSC ab P1 bis zum Eintritt in einen Zustand der Seneszenz bewirkte höhere KPDs, einen zeitlich verzögerten Proliferationsstopp und darüber hinaus in der letzten Passage geringere Anzeichen der Seneszenz. Durch eine kurzzeitige LO Kultivierung wurden die Stemness-Marker *OCT4*, *SOX2* und *MYC* stärker bzw. schwächer exprimiert. Die Expression der Gene *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *MYC* blieb auch infolge einer mehrere Passagen andauernden LO Langzeit-Kultivierung erhalten, in P8 wies *OCT4* eine 2,0-fach verstärkte Expression auf. *PSG1* und *PSG5* wurden gegenläufig exprimiert. Während *PSG1* in P3 und P8 in LO kultivierten Zellen deutlich reduziert exprimiert wurden, hatte *PSG5* in LO kultivierten hMSC (P8) ein erkennbar höheres Expressionsniveau.

## ERGEBNISSE

	Mesenchymale Oberflächenmarker	Klonogene Kapazität	Differenzierungs Kapazität	KPD	Proliferation	Apoptose	Seneszenz
1,25D3	✓	✓	✓	↓	↓	↓	↓
rh AA	✓	✓	↓	n.g.	-	-	n.g.
rh MSTN	✓	✓	✓	n.g.	-	-	n.g.
LO	✓	n.g.	n.g.	↑	n.g.	n.g.	↓

**Tab. 14 Zusammenfassung der Ergebnisse.** Bedeutung der verwendeten Symbole: ✓ = diese Eigenschaft der hMSC bleibt erhalten; n.g. = in hMSC nicht getestet; K = kombinierte Stimulation der hMSC mit rh AA und rh MSTN; ↓ = Reduktion; ↑ = Anstieg; - = kein Einfluss auf hMSC.

### 7 DISKUSSION

Mit der Intention, Modulatoren aufzudecken, die in der Lage sind, hMSC in einem undifferenzierten proliferativen Zustand der Selbsterneuerung festzuhalten bzw. modulatorisch auf die nachfolgende Differenzierung einzuwirken, wurden in der vorliegenden Arbeit zelluläre Einflüsse der Morphogene 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25D3), Aktivin A (AA), Myostatin (MSTN) sowie Low Oxygen (LO) in hMSC in der Zellkultur erforscht. Die Schnittstelle zwischen Reprogrammierung und Differenzierung liefert eine hervorragende therapeutische Ansatzstelle, da es äußerst vorteilhaft wäre, mit Hilfe dieser Modulatoren die hMSC in einem undifferenzierten Zustand einzufangen und je nach Bedarf die Phase der Differenzierung einzuleiten.

#### 7.1 | Die permanente 1,25D3 Kultivierung verzögert die zelluläre Alterung in hMSC bei gleichzeitigem Erhalt der multipotenten Kapazität

Ausgehend von dem Wissen, dass im Tiermodell ein 1,25D3 Überschuss und gleichzeitig eine Unterbrechung der VDR Signalübertragung durch Knockout des VDR (s. 3.3.3) Symptome vorzeitiger Alterung hervorrufen, wurde der Einfluss von 1,25D3 auf hMSC mittels vielfältiger Analysemethoden untersucht. Vitamin D3 ist als Basistherapie bei der Osteoporose etabliert, daher ist es von besonderem Interesse, ob eine dauerhafte 1,25D3 Supplementation eine fördernde Wirkung auf zelluläre Alterungsprozesse ausübt.

##### 7.1.1

#### Die 1,25D3 Signaltransduktion in hMSC ist gewährleistet

Zunächst erfolgte als Fundament für weitere Experimente die Testung der 1,25D3 Responsivität der hMSC. Dabei zeigte sich, dass sich die Expression der Gene *CYP24A1*, *OC* und *OPN*, deren 1,25D3 Responsivität bereits in der Literatur beschrieben wurde (Christakos et al. 2007), infolge einer 24 stündigen 1,25D3 Kurzzeit Inkubation stark erhöhte (Abb. 10). *CYP24A1*, das als 1,25D3 und 25(OH) Vitamin D3 katabolisierendes Enzym bekannt ist, kommt dieser Aufgabe somit auch in hMSC unter Zellkulturbedingungen nach. Die Expressionserhöhung der genannten Gene lieferte die Bestätigung für eine funktionierende 1,25D3 Signalübertragung in hMSC.

### 7.1.2

#### **Eine 1,25D3 Supplementation erhält den mesenchymalen Stammzellcharakter**

Nach einer Kultivierung der hMSC über 3 Passagen mit 1,25D3 wurde zunächst überprüft, ob sich der mesenchymale Stammzellcharakter dieser Zellen infolge der 1,25D3 Supplementation verändert. Dazu wurden neben einer Analyse der Oberflächenmarker, die klonogene Kapazität und die Differenzierungsfähigkeit untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker ergab nach einer Passage und nach 3 Passagen permanenter 1,25D3 Kultivierung keine Änderungen im Expressionsniveau der hMSC (Abb. 11). So wurden in 1,25D3 kultivierten und unbehandelten hMSC die charakteristischen mesenchymalen Marker (CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>) gleichermaßen exprimiert und es konnte keine Expression der hämatopoetischen Marker (CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>) nachgewiesen werden. Die Anzahl der gebildeten CFUs war infolge einer 1,25D3 Supplementation nach P1 und P3 in den 1,25D3 behandelten und unbehandelten hMSC nahezu identisch, somit vermindert eine permanente 1,25D3 Supplementation die klonogene Kapazität der hMSC nicht (Abb. 12). Des Weiteren wurde die Differenzierungskapazität von 1,25D3 vorbehandelten hMSC bestimmt und mit 1,25D3 unstimulierten Zellen verglichen. Zwischen den beiden untersuchten Gruppen ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich ihrer chondrogenen, adipogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit (Abb. 19, Abb. 20). Aufgrund der 1,25D3 Vorbehandlung der Zellen differenzierte ein Spender von drei Untersuchten verstärkt in die chondrogene Richtung. Diese Spendervariabilität ist als Merkmal primärer Zellen nicht ungewöhnlich und kann im konkreten Fall der hMSC auf den unbekanntem medizinischen Hintergrund (z.B. Erkrankungen, Medikamenteneinnahme) zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beschreiben Dreier et al. (2008) einen 1,25D3 hemmenden Effekt auf die Kollagen X Produktion einhergehend mit der Verhinderung der Hypertrophie über den 1,25D3-MARRS (Membrane Associated, Rapid Response Steroid Binding) Rezeptor in Prä-Chondrozyten, die aus Kükenembryonen gewonnen wurden (Dreier et al. 2008). Durch eine IGF1 vermittelte Wirkung wird der Komplex aus 1,25D3 und MARRS-Rezeptor von der Zelloberfläche entfernt und dadurch die Differenzierung ausgelöst. Gleichzeitig wurde jedoch auch eine leicht stimulierende 1,25D3 Wirkung zusammen mit IGF1 auf die Kollagen II Bildung beobachtet (Dreier et al. 2008). Dieser Befund zeigt daher eine Tendenz in die gleiche Richtung wie die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse und schlägt darüber hinaus einen möglichen modulatorischen Einfluss von 1,25D3 auf Differenzierungsprozesse vor. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass die Differenzierungsfähigkeit der hMSC auch nach einer Langzeit-Stimulation mit 1,25D3 nicht verloren geht und dass eine alleinige Stimulation der Zellen mit 1,25D3 ohne die entsprechenden Differenzierungsmedien nicht als Stimulus ausreicht, um eine spontane Differenzierung in die chondrogene, adipogene oder osteogene Richtung auszulösen. Darüber hinaus

## DISKUSSION

werden trotz der permanenten 1,25D3 Langzeit-Stimulation die mesenchymalen Oberflächenmarker unverändert exprimiert und die klonogene Kapazität bleibt erhalten.

### 7.1.3

#### **1,25D3 induzierte morphologische Veränderungen des hMSC Phänotyps sind teilweise reversibel**

Humane MSC entwickelten im Laufe einer 1,25D3 Kultivierung morphologische Veränderungen, die durch eine deutlich breitere sowie ausgedehntere Zellgestalt gekennzeichnet waren und die sie deutlich sichtbar von den unbehandelten hMSC der gleichen Passage unterschied (Abb. 15). Da der Verlust des spindelförmigen, fibroblastischen Zellphänotyps sowie weitere Veränderungen der Morphologie in hMSC mit einem Zustand der replikativen Seneszenz assoziiert wird (Wagner W. et al. 2010b, Wagner W. et al. 2008b), könnte der 1,25D3 induzierte morphologische Wandel der Zellen als Anzeichen der replikativen Seneszenz in den 1,25D3 supplementierten hMSC interpretiert werden. Bevor die Verifizierung dieser ersten auf Seneszenz hindeutenden Zeichen mittels weiterer Experimente erfolgte, wurde den hMSC im Verlaufe einer Langzeit-Kultivierung nach P3 das 1,25D3 wieder entzogen. Dadurch kehrte sich der 1,25D3 induzierte Einfluss auf die Zellmorphologie zum Teil wieder um, d.h. nicht alle Zellen erlangten ihre ursprüngliche Fibroblasten-ähnliche Morphologie zurück (Abb. 16). Da annähernd die Hälfte der Zellen, der exakte Anteil ist kaum bestimmbar, ihren ursprünglichen Phänotyp zurückerlangten, waren sie zu diesem Zeitpunkt offensichtlich noch nicht in einen irreversiblen G1-Zellzyklusarrest, was ein weiteres Indiz für einen seneszenten Zustand gewesen wäre (Hayflick 1965), eingetreten bzw. verfügten noch über ausreichend metabolische Aktivität, was der Hypothese einer 1,25D3 induzierten Seneszenz widerspricht. Eher könnte man bereits diese Effekte als Folge eines permissiven Einflusses von 1,25D3 auf die Entwicklung von Quieszenz deuten.

### 7.1.4

#### **Auswirkungen von 1,25D3 auf basale Zellfunktionen der hMSC**

##### **7.1.4.1**

#### **Die kurzzeitige 1,25D3 Stimulation verringert Proliferation und Apoptose**

Humane MSC in der Kultur verfügen lediglich über eine begrenzte Proliferationskapazität, die zunächst mit zunehmender Passage abnimmt und laut (Wagner W. et al. 2008b) zwischen P7 und P12 schließlich zusammen mit weiteren Parametern wie beispielweise die bereits erwähnten

## DISKUSSION

morphologischen Veränderungen in einen Proliferationsarrest und somit in einen seneszenten Zustand mündet. Die Zellen verfügen nun über einen eingeschränkten Metabolismus, werden jedoch noch nicht apoptotisch (Cristofalo et al. 2004, Muller 2009). Eine Kurzzeit-Behandlung der hMSC mit 1,25D3 modifizierte die Proliferations- und Apoptoserate der Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-hMSC. So ergab die Kurzzeit-Stimulation (24 h, 48 h, 72 h) der hMSC in P1 den stärksten inhibitorischen Effekt auf Proliferation und Apoptose nach 72-stündiger 1,25D3 Inkubation und reduzierte sich mit abnehmender 1,25D3 Stimulationsdauer (Abb. 13). Die Ursache dafür könnte in der Wechselwirkung zwischen 1,25D3 und seinem nukleären Rezeptor (nVDR) und der daraus folgenden Regulierung der Gentranskription begründet sein. Hierbei ist die Signalübertragung langsamer als über den mVDR oder 1,25D3-MARRS Rezeptor, der in der Zellmembran lokalisiert ist und sich durch eine äußerst rasche Signalübertragung auszeichnet (Baker et al. 1988, Revelli et al. 1998, Khanal and Nemere 2007). Zudem könnten auch 1,25D3-responsive Gene eine Rolle spielen, indem sie regulatorisch auf downstream Effekte einwirken. Darüber hinaus wurde die 1,25D3 vermittelte Apoptosehemmung nicht nur in hMSC sondern auch in humanen Osteosarkomzellen (Hansen et al. 2001) und humanen Osteoblasten beobachtet (Duque et al. 2004). Ebenso wie in allen anderen Zellen kann auch in humanen Osteoblasten durch Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor auf der Zelloberfläche die Apoptose ausgelöst werden (Kawakami et al. 1998). Dabei aktiviert die zytoplasmatische Domäne des Fas-Rezeptors die zellulären Proteine TRADD (TNFRSF1A-associated via death domain) und FADD (Fas-associated via death domain) und die nachfolgende Signalübertragung mündet schließlich in die Aktivierung von Caspasekaskaden (z.B. Caspase-8) sowie die Induktion der Apoptose (Chao et al. 2002, Lavrik and Kramer 2012). 1,25D3 kann nun diesem apoptotischen Prozess in humanen Osteoblasten, der in der Zellkultur durch die Gabe eines agonistischen Fas-Rezeptor Antikörpers ausgelöst wird, entgegenwirken. Die 1,25D3 behandelten Osteoblasten zeigten unter anderem eine reduzierte Aktivität der Caspase-8, eine verminderte Expression von BAX, einem proapoptotischen Protein sowie eine verstärkte Expression des antiapoptotischen Faktors BCL-2. Diese Veränderungen resultieren in einer Reduktion der Apoptoseinduktion und werden als molekulare Ursache für den antiapoptotischen 1,25D3 Effekt in humanen Osteoblasten angesehen (Duque et al. 2004) und könnte auch für den in der vorliegenden Arbeit festgestellten antiapoptotischen Einfluss von 1,25D3 auf hMSC in Frage kommen. Dies müsste durch weiterführende Experimente bestätigt werden.



## DISKUSSION

### 7.1.4.2

#### Die permanente 1,25D3 Supplementierung verzögert die Wachstumsrate der hMSC

Der 1,25D3 induzierte inhibitorische Einfluss auf die Zellproliferation manifestierte sich auch in einer 1,25D3 Langzeit-Behandlung der hMSC, da Zellen, die über einen Zeitraum von 6 Passagen unter permanenter 1,25D3 Supplementierung kultiviert wurden, niedrigere KPDs aufwiesen und signifikant mehr Tage bis zum Erreichen der Subkonfluenz benötigten als die Kontroll-hMSC (Abb. 14). Daraus wird deutlich, dass eine 1,25D3 Supplementierung über mehrere Passagen sowie die begleitende Vitamin D3 Signaltransduktion nicht nur die Morphologie der hMSC veränderte, sondern auch proliferative Prozesse bei gleichzeitiger Reduktion der Apoptose verlangsamte. Allerdings kann der antiproliferative 1,25D3 Effekt nicht mit einer Apoptoseinduktion begründet werden, da 1,25D3 die Apoptose in den Kurzzeit-Experimenten mit zunehmender Stimulationsdauer reduzierte. In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurde ebenfalls eine 1,25D3 inhibierende Wirkung auf die Proliferation verschiedener Zelltypen beschrieben. 1,25D3 erzielte einen antiproliferativen Effekt in Brust- und Prostata-Krebszellen (Zhuang and Burnstein 1998, Banwell et al. 2003) und Pendas-Franco et al. (2008) berichteten, dass 1,25D3 das humane *DKK4* (dickkopf homolog 4 (*Xenopus laevis*) Gen, das bei Darmkrebs im Menschen verstärkt exprimiert wird und den migratorischen, invasiven sowie angiogenen Phänotyp der Darmkrebszellen fördert, in Darmkrebszellen inhibiert und somit antiproliferativ wirkt (Pendas-Franco et al. 2008). Als Ursache für den antiproliferativen 1,25D3 Einfluss auf MCF-7 Zellen, einer humanen Brustkrebszelllinie, wird angenommen, dass 1,25D3 regulatorisch auf zentrale Faktoren, die den Zellzyklus bzw. den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase kontrollieren, wirkt. So kann 1,25D3 beispielsweise die Aktivierung eines Komplexes, bestehend aus der cyclin dependent kinase 4 oder 6 (CDK4/6) und Cyclin D1 bzw. bestehend aus CDK2 und Cyclin A, verhindern und als Folge wird der Zellzyklus in der G1-Phase blockiert (Jensen et al. 2001). Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) gelten als Schlüsselregulatoren des Zellzyklus, dabei nehmen die Cycline eine sehr wichtige Rolle ein, da sie CDKs durch Bindung an die katalytische Untereinheit aktivieren. Gleichzeitig können die CDKs von sogenannten CDK-Inhibitoren (z.B. P15, P16, P18, P19, P21, P27 und P57) in ihrer Aktivität blockiert werden. CDK/Cyclin Komplexe, wie der oben erwähnte CDK4/6/Cyclin D1 Komplex, sind für die Übergänge zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen (G1-Phase, Übergang G1-S, S-Phase, Übergang S-M, M-Phase) von großer Bedeutsamkeit (Sherr and Roberts 1999, Li A. and Blow 2001). Zudem inhibiert 1,25D3 die Zellproliferation einer pankreatischen Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo* über eine verstärkte Expression der Zellzyklusinhibitoren P21 und P27 (Kawa et al. 2005, Schwartz et al. 2008). 1,25D3 und sein Analogon 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-26,27-hexafluorocholcalciferol lösen in Caco2-Zellen, einer humanen Darmkrebszelllinie, eine Proliferationshemmung aus, gleichwohl induziert nur das

## DISKUSSION

1,25D3 Analogon einen Zellarrest in der G1-Phase durch eine verstärkte Expression der CDK-Inhibitoren P21 und P27 (Scaglione-Sewell et al. 2000). 1,25D3 und das 1,25D3 Analogon TX527 hemmt das Wachstum von endothelialen Zellen *in vivo* und *in vitro*, zur gleichen Zeit konnte eine verstärkte Expression von P27 und eine reduzierte CCND1 (cyclin D1) Expression nachgewiesen werden (Gonzalez-Pardo et al. 2010). Die Zellproliferation in vaskulären glatten Muskelzellen, die aus der Aorta neugeborener Ratten gewonnen wurden, konnte durch die Verabreichung von 1,25D3 ebenfalls vermindert werden (Chen S. et al. 2010) und die Autoren schlagen als zugrundeliegenden Mechanismus eine 1,25D3 induzierte Abnahme der CDK2 Aktivität vor, gleichzeitig hat 1,25D3 jedoch keinen Effekt auf die Expression von CDK2 oder CDK2 assoziierter Cycline (Chen S. et al. 2010). Die vorgestellten Literaturdaten nehmen als zugrundeliegender Ursache für die 1,25D3 induzierte Zellproliferation einen regulatorischen 1,25D3 Einfluss auf den Zellzyklus an, der jedoch je nach Zelltyp und Versuchsansatz variiert und nach wie vor noch nicht vollständig enthüllt ist. Wie bereits zuvor erwähnt, ist eine 1,25D3 Kultivierung über mehrere Tage und Wochen in der Lage, die Proliferation der hMSC zu verlangsamen und dabei gleichzeitig eine vor Apoptose schützende Wirkung zu entfalten.

### 7.1.5

#### **1,25D3 Supplementation verzögert die Entstehung replikativer Seneszenz**

Um zu überprüfen, ob der antiproliferative 1,25D3 Effekt in den hMSC auf eine erhöhte Expression der CDK-Inhibitoren P15, P16, P21 oder P27 zurückzuführen ist und damit auf eine Hemmung des Zellzyklus sowie der Induktion eines seneszenten Zustandes, wurden die CDK-Inhibitoren zusammen mit weiteren Seneszenz-assoziierten Markern (PSG1, PSG5) analysiert. Dabei ergab sich überraschenderweise eine signifikante 0,4-fache Verminderung der *P16* Expression in den hMSC, die permanent mit 1,25D3 supplementiert wurden (Abb. 21). Somit reduziert eine permanente 1,25D3 Supplementation die *P16* Expression sehr deutlich und schränkt darüber hinaus *P16* in seiner Funktion als CDK4/6-Inhibitor ein. Eine *P16* Inhibition bzw. Inaktivierung führt zu einer verlängerten Lebensdauer von Zellen oder Zelllinien und wurde in zahlreichen Tumorarten entdeckt (Brenner et al. 1998). Umgekehrt ist *P16* in die replikative Seneszenz verwickelt und das Expressionsniveau steigt mit zunehmender Anzahl an KPDs an. Durch die Bindung von *P16* an CDK4/6/Cyclin D1 wird dieser Komplex in seiner Aktivität inhibiert und das Retinoblastoma Protein bleibt unphosphoryliert und damit inaktiv. Dadurch brechen die nachfolgende Signalübertragung und die Transkription von Zielgenen, die für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase wichtig sind, ab und es kommt zu einem Proliferationsstopp und zur Seneszenzentwicklung (Rayess et al. 2012). Die signifikante Reduktion der *P16* Expression in 1,25D3 kultivierten hMSC ist ein erstes Indiz, dass es sich hierbei

## DISKUSSION

nicht um eine Hemmung des Zellzyklus oder um einen Zustand der Seneszenz handelt. Die Expression der Seneszenz-assoziierten Gene *P15* und *P21* zeigte in den 1,25D3 supplementierten hMSC keine signifikante Änderung, jedoch wurde *P15* 1,6-fach erhöht exprimiert im Vergleich zu den Kontroll-hMSC. Dabei muss der beträchtliche Fehlerbalken berücksichtigt werden, der aus der Heterogenität der individuellen hMSC resultiert (Abb. 21). Durch eine Steigerung der Spenderanzahl könnte man möglicherweise die Aussagefähigkeit untermauern und den Fehlerbalken minimieren. *P27* wurde in beiden untersuchten Gruppen gleich stark exprimiert. Als weitere Seneszenzmarker wurden *PSG1* und *PSG5* als Vertreter aus der Familie der pregnancy specific beta-1-glycoproteins (PSGs), deren Gene sich durch sehr hohe Sequenzähnlichkeit auszeichnen, ausgewählt (Khan et al. 1992). Bereits vor mehr als 30 Jahren wurden die PSGs als Plazenta Proteine im Blutserum von schwangeren Frauen entdeckt und 2009 mit replikativer Seneszenz assoziiert, da in seneszenten humanen Fibroblasten ein erhöhtes Expressionsniveau der Gene *PSG1*, *PSG3*, *PSG4*, *PSG5*, *PSG6*, *PSG8*, *PSG9* und *PSG11* nachweisbar war (Endoh et al. 2009). In 1,25D3 behandelten hMSC erhöhte sich auf mRNA-Ebene die Stärke der Expression von *PSG1* und *PSG5* nicht (Abb. 21). Vielmehr zeigte sich durch die 1,25D3 Kultivierung eine minimale Tendenz hin zu einer verringerten *PSG1* Expression. Aufgrund einer 1,25D3 Behandlung der hMSC über 4 Passagen konnte auf mRNA-Ebene keine Induktion von Seneszenz-assoziierten Markern beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der anfänglichen Hypothese, die replikative Seneszenz als mögliche Ursache des veränderten morphologischen Phänotyps sowie der Proliferationsinhibition vermutet hat.

### 7.1.5.1

#### **1,25D3 Kultivierung beeinflusst die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in hMSC**

Da die Bildung von ROS im Zusammenhang mit Alterungsprozessen steht, wurde die ROS Akkumulation in 1,25D3 behandelten hMSC und Kontroll-Zellen mittels Durchflusszytometrie verglichen. Als Reaktion auf die 1,25D3 Supplementierung über eine Passage reduzierte sich die ROS Akkumulation in den hMSC, stieg jedoch aufgrund der verlängerten 1,25D3 Inkubation über 3 Passagen signifikant an verglichen mit den unbehandelten Zellen (Abb. 18). Wie bei der Analyse Seneszenz-assoziiierter Marker deutlich wurde und sich im Folgenden bestätigt, hat eine 1,25D3 Stimulation über mehrere Passagen keinen Einfluss auf die Seneszenzentstehung in hMSC, trotz des signifikanten Anstiegs von ROS in 1,25D3 kultivierten hMSC (P3). Dies mag mit einer gesteigerten Produktion protektiver Proteine erklärlich sein, bleibt aber weiter zu untersuchen (*FOXO1* und 4; s. 7.1.6) (Mentrup, unpublizierte Ergebnisse, eigene Arbeitsgruppe) (Klotz et al. 2012).

## DISKUSSION

### 7.1.5.2

#### **1,25D3 Supplementation verringert die SA- $\beta$ -Gal Aktivität in hMSC**

Um replikative Seneszenz als Auslöser der 1,25D3 vermittelten Effekte ausschließen zu können, wurden daher zur Sicherheit noch SA- $\beta$ -Gal Färbungen zum Nachweis seneszenter hMSC durchgeführt. Die anschließende Quantifizierung ergab eine signifikant reduzierte SA- $\beta$ -Gal Aktivität, die als typischer Marker für replikative Seneszenz herangezogen wird (Dimri et al. 1995), in 1,25D3 supplementierten hMSC verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen (Abb. 17). Dadurch wurde belegt, dass 1,25D3 zwar das Verhalten und den Phänotyp der hMSC dramatisch verändern kann, dass es sich bei diesen Effekten jedoch nicht um replikative Seneszenz handelt.

### 7.1.6

#### **Versetzt die permanente 1,25D3 Supplementation die hMSC in einen quieszenten Zustand?**

Um Aufschlüsse über den biologischen Hintergrund der 1,25D3 vermittelten Phänomene in hMSC zu erhalten und aufgrund der Vermutung, dass 1,25D3 die hMSC in eine Art Ruhephase, ähnlich der Quieszenz bei Stammzellen, versetzen kann, wurden Quieszenz-assoziierte Marker ausgewählt und auf mRNA-Ebene mittels semi-quantitativer RT-PCR-Analyse untersucht.

Quieszenz ist charakteristisch für Stammzellen und auch hMSC verharren *in vivo* in einer Art Ruhezustand in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus, der sie z.B. vor Mutationen schützt. Erst aufgrund eines Reizes verlassen die hMSC ihren quieszenten Zustand und treten in eine Phase der Proliferation oder der Differenzierung ein, um je nach Bedarf alte Zellen zu ersetzen oder entsprechende Zellen für die Geweberegeneration im menschlichen Organismus zu liefern (Friedman et al. 2006).

Zunächst wurde das Expressionsniveau der Quieszenz-assoziierten Marker *FOXO1*, *FOXO3* und *FOXO4* (Li J. 2011) in 1,25D3 supplementierten hMSC und Kontroll-Zellen miteinander verglichen (Abb. 22). In den 3 untersuchten humanen Spendern führte eine permanente 1,25D3 Supplementation der hMSC über 3 Passagen zu einer geringen Erhöhung der Genexpression, mit einem 1,5-fachen bzw. 1,7-fachen Expressionsanstieg von *FOXO1* bzw. *FOXO4* verglichen mit den unbehandelten Kontroll-hMSC. Die forkhead box O (FOXO) Proteine gelten laut Brunet et al. (2004) aufgrund ihrer Fähigkeit, ROS zu detoxifizieren oder Schädigungen der DNA zu reparieren, als Regulatoren der Langlebigkeit von Organismen (Brunet et al. 2004). Als Reaktion auf oxidativen Stress werden sie aktiviert und können den Zellzyklusarrest am Übergang von der G<sub>1</sub> zur S-Phase bzw. von der G<sub>2</sub> zur M-Phase kontrollieren (Furukawa-Hibi et al. 2002, Brunet et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Mechanismus einer Aktivierung bzw. einer moderaten Erhöhung der *FOXO* mRNAs aufgrund der ROS Akkumulation in hMSC, die über 3 Passagen permanent mit

## DISKUSSION

1,25D3 supplementiert wurden, gezeigt werden. Obwohl die 1,25D3 kultivierten hMSC lediglich einen Trend hin zu einer erhöhten *NANOG* Expression verglichen mit den Kontroll-hMSC zeigten, ist es vor dem Hintergrund, dass die Expression von *NANOG* in hMSC mit Quieszenz assoziiert wird (Pierantozzi et al. 2011), für die Interpretation der Daten von Interesse. In 1,25D3 behandelten hMSC versus unbehandelten Zellen wurde *TXNIP*, das als Schlüsselregulator zur Erhaltung der Quieszenz hämatopoetischer Stammzellen unter Stressbedingungen gilt (Jeong et al. 2009), 1,6-fach in seiner Expression verstärkt. Zusätzlich wurde eine 1,9-fache gesteigerte *TP53* Expression in den 1,25D3 supplementierten Zellen nachgewiesen. Neben der bedeutenden Beteiligung des Tumorsuppressor Proteins TP53 an der Induktion von Seneszenz, Apoptose und Zellzyklusarrest in vielen Zellen (Vousden and Lane 2007), wurde 2008 eine regulatorische Rolle von *TP53* bei der Quieszenz von hämatopoetischen Stammzellen entdeckt. Dabei zeigte sich, dass *TP53* den quieszenten Zustand der hämatopoetischen Stammzellen fördert und ein Fehlen von *TP53* die Quieszenz der Zellen beeinträchtigt (Liu Y. et al. 2009b). Somit zeigte sich insgesamt eine Tendenz hin zu einer verstärkten Expression der Quieszenz-assoziierten Marker und die Annahme, dass 1,25D3 die hMSC in einen quieszenten Zustand versetzt oder zumindest gute Voraussetzungen dafür schafft, wird von der 1,25D3 ausgelösten Verringerung der KPDs ohne eine gleichzeitige Seneszenzinduktion unterstützt.

Insgesamt ergibt sich aus den präsentierten Daten, dass eine permanente 1,25D3 Supplementierung keine replikative Seneszenz in hMSC induziert. Vielmehr versetzt 1,25D3 die hMSC in einen (prä-)quieszenten Zustand und übt dadurch eine vor Alterungsprozessen schützende Wirkung auf die hMSC in der Zellkultur aus, ohne dabei das multipotente Potential dieser Zellen zu beeinträchtigen. Damit wird 1,25D3 auch als wirksames Agens im Zusammenhang mit mesenchymaler Geweberegeneration interessant (Klotz et al. 2012).

## 7.2 | Rh AA und rh MSTN unterscheiden sich in ihrem Einfluss auf hMSC

Aufgrund ihrer Verbindung zum muskuloskelettalen System spielen AA und MSTN als Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie vor dem Hintergrund einer zukünftigen zellbasierten und regenerativen Therapie eine wichtige Rolle in den muskuloskelettalen Geweben. Mehrere Veröffentlichungen zeigen eine bedeutsame Funktion für AA, das im Knochen exprimiert wird (Ogawa et al. 1992, Eijken et al. 2007), im Knochenmetabolismus. Dabei liegen widersprüchliche Studien über die Wirkung von AA auf die osteogene Differenzierung vor (s. 3.4.1.1.1). *In vivo* fördert AA die Knochenbruchheilung sowie die Knochenformation in Ratten (Sakai et al. 1999), im Gegenteil dazu stimuliert ein lösliches Aktivin Rezeptor Typ IIA Fusionsprotein (ACE-011, Sotatercept) als Aktivin Antagonist die Knochenformation und die Knochenfestigkeit in Cynomolgus Affen (Lotinun et al. 2010). Bei Mensch und Tier ist MSTN

## DISKUSSION

als Negativ-Regulator des Skelettmuskel-Wachstums bekannt (McPherron and Lee 1997, Szabo et al. 1998, Schuelke et al. 2004, Shelton and Engvall 2007) und seine Serumkonzentration steigt mit zunehmendem Alter im humanen Serum an und wird daher mit der Entwicklung einer altersassoziierten Sarkopenie in Verbindung gebracht (Yarasheski et al. 2002). Da die Sarkopenie wiederum mit einem Verlust der Knochenmasse assoziiert wird (Hamrick et al. 2006), nimmt MSTN eine modulatorische Aufgabe als Vermittler zwischen Muskel und Knochen ein. Dies konnte in *MSTN*-defizienten Mäusen bestätigt werden, da sie zusätzlich zu einer erhöhten Skelettmuskelmasse eine gesteigerte Knochenmasse zeigen (Hamrick et al. 2003).

Um herauszufinden, wie sich AA und MSTN auf die Differenzierungswege in hMSC auswirken und ob sie möglicherweise als modulierende Substanzen für die Zelltherapie geeignet sind, wurden in der vorliegenden Arbeit die entsprechenden Experimente durchgeführt.

### 7.2.1

#### **Eine AA und MSTN Signaltransduktion in hMSC ist möglich**

Zunächst wurde durch den Nachweis der beiden Typ II Rezeptoren *ACVR2A* und *ACVR2B* auf mRNA-Ebene in hMSC (Abb. 23) gewährleistet, dass eine Signaltransduktion von AA und MSTN möglich ist, da die dafür notwendigen Rezeptoren in hMSC exprimiert werden. Aufgrund der höheren Bindungsaffinität der beiden Kandidaten zum *ACVR2B* Rezeptor (Lee S. J. and McPherron 2001, Greenwald et al. 2004), wird die Signalübertragung in hMSC durch die spenderabhängige Expression des *ACVR2A* Gens mit großer Wahrscheinlichkeit nicht beeinträchtigt.

### 7.2.2

#### **Die rh AA und rh MSTN Stimulation erhält die mesenchymalen Oberflächenmarker und die klonogene Kapazität**

Um zu überprüfen, ob hMSC durch eine rh AA und rh MSTN Behandlung ihren Stammzellcharakter verlieren, wurden vor der Durchführung weiterer Experimente zunächst die mesenchymalen Oberflächenmarker und die klonogene Kapazität der Zellen untersucht. Der mesenchymale Stammzellcharakter wurde im Hinblick auf das Expressionsniveau der mesenchymalen Oberflächenmarker infolge einer 10-tägigen rh AA bzw. rh MSTN Supplementierung der hMSC erhalten, da die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass die mit rh AA und die mit rh MSTN stimulierten hMSC positiv für die mesenchymalen Marker CD73, CD90, CD105 und gleichzeitig negativ für die hämatopoetischen Marker CD34, CD45 und HLA-DR waren (Abb. 24). Somit besteht kein Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten hMSC. Ebenfalls unbeeinflusst blieb die

## DISKUSSION

klonogene Kapazität der rh AA stimulierten Zellen, da kein Unterschied in der Anzahl der gebildeten CFUs im Vergleich mit den Kontroll-hMSC deutlich wurde (Abb. 25). Allerdings scheint rh MSTN einen geringen Einfluss auf die klonogene Kapazität der hMSC zu haben, da die rh MSTN Stimulation der Zellen die CFU Bildung um 18 % verminderte (Abb. 25). Dem entgegengesetzt sind die Ergebnisse von Hannan et al. (2009), die zeigten, dass rekombinantes MSTN die klonogene Kapazität von humanen embryonalen Stammzellen erhält (Hannan et al. 2009). Der Unterschied dieser Daten kann zum einen mit unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen erklärt werden, da die humanen embryonalen Stammzellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, die hMSC jedoch unter Verwendung von 10 % FCS. Darüber hinaus unterscheiden sich multipotente hMSC und pluripotente humane embryonale Stammzellen sehr deutlich und ein Vergleich dieser Zelltypen ist somit schwierig zu interpretieren.

### 7.2.3

---

#### Differente Effekte von rh MSTN und rh AA auf die Differenzierungskapazität der hMSC

##### 7.2.3.1

---

##### Rh MSTN erhält die Differenzierungskapazität in hMSC

Als Konsequenz der verminderten klonogenen Kapazität der rh MSTN behandelten hMSC, wurde eine eingeschränkte adipogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen erwartet. Jedoch bestätigte sich diese Annahme weder auf mRNA-Ebene noch bei der Quantifizierung der Färbungen. Im Gegenteil wurden die untersuchten adipogenen Marker (*PPARG*, *LPL*, *FABP4*) in den rh MSTN stimulierten Zellen deutlich stärker exprimiert als in den unbehandelten Kontroll-hMSC (Abb. 26), allerdings konnte dieser Unterschied bei der Quantifizierung der Ölrot O-Färbung nicht verifiziert werden (Abb. 27). Die verminderte Klonogenität kann somit eine Folge der Induktion eines Lineage Kommittments durch MSTN sein. Wie gezeigt kann eine rh MSTN Supplementierung die Formation von Lipidtropfen bzw. den Vorgang der adipogenen Differenzierung in hMSC nicht verhindern. Dies steht teilweise in Widerspruch respektive bestätigt Veröffentlichungen in der Literatur, die sowohl fördernde als auch hemmende MSTN Wirkungen auf den adipogenen Differenzierungsprozess in verschiedenen Zelltypen unterschiedlichen Ursprungs beschreiben. Im Gegensatz zu den widersprüchlichen *in vitro* Daten sind die *in vivo* Daten eindeutig und zeigen einen adipogenen Effekt von MSTN. So weisen transgene Mäuse, die *MSTN* im Skelettmuskel überexprimieren, eine höhere Körperfettmasse einhergehend mit einer niedrigeren Skelettmuskelmasse auf (Reisz-Porszasz et al. 2003). Umgekehrt hat eine *MSTN*-Defizienz einen antiadipogenen Effekt, da *MSTN*-defiziente Tiere zusätzlich zu einer deutlich erhöhte Skelettmuskelmasse über eine reduzierte Fettmasse verfügen



## DISKUSSION

(Lin et al. 2002, McPherron and Lee 2002). Eine fördernde (Artaza et al. 2005), aber zusätzlich auch eine hemmende (Rebbapragada et al. 2003) Wirkung von rekombinantem MSTN auf die Adipogenese wurde in der mesenchymalen, multipotenten Mauszelllinie C3H 10T (1/2) gezeigt. In Präadipozyten der 3T3-L1 Mauszelllinie inhibierte MSTN die adipogene Differenzierung (Kim et al. 2001). In porcinen fettabgeleiteten Stammzellen sowie porcinen Muskelsatellitenzellen inhibierte die rh MSTN Stimulation die Adipogenese während des adipogenen Differenzierungsprozesses (Deng et al. 2012). Dabei spielte der Zeitpunkt der Stimulation jedoch eine wichtige Rolle, da der adipogene Prozess in den fettabgeleiteten Stammzellen nur induziert wurde, wenn rh MSTN während der Differenzierungsphase verabreicht wurde. Dagegen konnte in den porcinen Muskelsatellitenzellen die adipogene Differenzierung unabhängig vom rh MSTN Stimulationszeitpunkt (vor bzw. während der Differenzierungsphase) induziert werden. In vom Schweinemuskel abgeleiteten mesenchymalen Stammzellen wurde gleichermaßen eine hemmende Wirkung von MSTN auf die Lipidakkumulation sowie auf die *PPARG* und *FABP4* Expression nachgewiesen (Lei et al. 2011). Eine Inhibition der adipogenen Differenzierung wurde in mesenchymalen Stammzellen (hMSC), die aus dem Knochenmark von 4 jungen humanen Spendern (< 40 Jahre) gewonnen wurden, beobachtet (Guo W. et al. 2008). Guo et al. (2008) zeigten in hMSC eine rh MSTN induzierte Hemmung der Lipidakkumulation verglichen mit den rh MSTN unbehandelten Differenzierungskontrollen sowie eine signifikante Reduktion der Expression der adipogenen Marker *PPARG*, *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha), *LEP* (leptin) und *FABP4* (Guo W. et al. 2008). Neben den erhaltenen Resultaten unterscheidet sich der Versuchsansatz von Guo et al. (2008) von dem hier Vorliegenden hinsichtlich des eingesetzten rh MSTN und der verwendeten rh MSTN Konzentrationen. Dabei fand die Arbeitsgruppe um Guo et al. (2008) heraus, dass die Hemmung der Lipidtröpfchen mit zunehmender Konzentration ansteigt und der stärkste Effekt auf die Adipogenese der hMSC mit 1,0 µg/ml rh MSTN erzielt wurde (Guo W. et al. 2008). Die niedrigste Konzentration (0,01 µg/ml), die mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration übereinstimmt, hemmte den adipogenen Prozess ebenfalls nicht. Zusätzlich unterscheiden sich die beiden Arbeiten noch in der Stimulationsdauer mit rh MSTN während der adipogenen Differenzierung sowie in der Dauer der gesamten adipogenen Differenzierung (3 Wochen versus 2 Wochen in der vorliegenden Arbeit). Auch das Durchschnittsalter der verwendeten Zellspender war in der vorliegenden Arbeit deutlich höher als in der Arbeit von Guo et al. (2008) (66 Jahre versus < 40 Jahre). Wie bereits zuvor erwähnt, war eine rh MSTN Behandlung der hMSC nicht in der Lage, das osteogene Differenzierungspotential in die eine oder andere Richtung zu beeinflussen. Dieses Ergebnis passt zu den Untersuchungen von Hamrick et al (2007), die zwar eine Steigerung der osteogenen Differenzierungskapazität in Knochenmark-abgeleiteten MSC (BMSC) *in vitro* beobachteten, die aus Röhrenknochen von *CD1-MSTN*-defizienten Mäusen isoliert wurden. Eine Behandlung der BMSCs von *MSTN*-defizienten



## DISKUSSION

Mäusen mit rekombinantem MSTN änderte die osteogene Differenzierungsfähigkeit der BMSCs jedoch nicht (Hamrick et al. 2007).

Insgesamt haben die Experimente der vorliegenden Arbeit ergeben, dass eine Behandlung der hMSC mit rh MSTN die adipogene und osteogene Differenzierungskapazität weder fördert noch inhibiert und somit zumindest die Differenzierungskapazität nicht beeinträchtigt, während die CFU-Bildung reduziert ist und daher die „Stemness“ von hMSC durch rh MSTN moduliert wird. Möglicherweise werden mit einer höheren rh MSTN Konzentration andere Resultate erzielt. Die konträren Literaturangaben im Hinblick auf Myostatin und seine adipogene Differenzierungsfähigkeit sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf verschiedene Versuchsansätze (Zeitpunkt und Zeitdauer der rh MSTN Stimulation, unterschiedliche Zelltypen) zurückzuführen und machen die Schwierigkeit deutlich, die richtigen Bedingungen für eine optimale rh MSTN Verwendung auch bezüglich eines therapeutischen Einsatzes zu finden. Andererseits sind die *in vivo* Ergebnisse so eindeutig, dass zumindest eine Inhibition der Adipogenese nicht anzunehmen ist und somit zumindest eine permissive Situation für Adipogenese entsteht.

### 7.2.3.2

#### **Rh AA hält die hMSC in einem undifferenzierten Zustand fest**

Im Gegensatz zu rh MSTN konnte rh AA das Differenzierungspotential der hMSC signifikant einschränken, da in allen untersuchten hMSC Donoren eine rh AA Stimulation die Lipidtropfen- und Kalziumhydrogencarbonat-Formation signifikant inhibierte verglichen mit den unstimulierten Zellen (Abb. 27, Abb. 29). Auf mRNA-Ebene zeigte die Expression der osteogenen Marker nur äußerst minimale Veränderungen, auch die adipogenen Markergene blieben durch eine rh AA Stimulation unbeeinträchtigt. Lediglich *PPARG* wurde in rh AA kultivierten hMSC signifikant niedriger exprimiert als in den Kontroll-hMSC. Während des adipogenen Differenzierungsprozesses wird die Expression adipogener Markergene induziert und *PPARG* wird dabei, neben anderen, als Schlüsselmarker betrachtet (Gregoire et al. 1998). In Präadipozyten der 3T3-L1 Mauszelllinie zeigte die Stimulation mit rh AA auf mRNA-Ebene eine signifikant reduzierte Expression der adipogenen Marker *CEBPA* und *PPARG* (Hirai et al. 2005), dies deutet auf einen inhibitorischen AA Einfluss während der Adipogenese hin und stimmt mit den hier vorliegenden Daten überein. Es wird angenommen, dass rh AA die Adipogenese über eine SMAD3 übertragene eingeschränkte Aktivierung der adipogenen Gene *CEBPA* und *PPARG* inhibiert (Hirai et al. 2005). Allerdings wird die Rolle von AA im Knochenstoffwechsel in mehreren Untersuchungen z. T. widersprüchlich beschrieben. Bereits 1992 wiesen Ogawa et al. (1992) nach, dass die extrazelluläre Matrix boviner Knochen reich an AA ist und es *in vivo* zusammen mit BMP2 oder BMP3 die ektopische Knochenformation verstärkt und daher eine sehr wichtige

## DISKUSSION

Bedeutung bei der Modulation der Knochenformation inne hat (Ogawa et al. 1992). Die Injektion von rekombinantem AA direkt in die Fraktur von Ratten fördert, wie bereits unter 3.4.1.1.2 erwähnt, die Kallusbildung und den Heilungsprozess (Sakai et al. 1999). In murinen Zellen, die aus dem Knochenmark des Femurs 3- bis 4-Monate alter Mäuse gewonnen wurden, fördert die Verabreichung von rh AA die Differenzierung in die osteogene Richtung (Gaddy-Kurten et al. 2002) zugleich aber auch die Bildung von Osteoklasten, wenn auch nicht deren Aktivierung (Sakai et al. 1993, Gaddy-Kurten et al. 2002). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden zudem auch Daten in der Literatur publiziert, die *in vitro* einen inhibitorischen AA Einfluss auf die Osteoblastogenese beschreiben. So beschreiben Ikenoue et al. (1999) eine rh AA induzierte Hemmung der osteogenen Differenzierung sowie der Mineralisierung in fötalen Rattenkalottenzellen (Ikenoue et al. 1999). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass AA in der Lage ist, die Matrixmineralisierung in fötalen, humanen Kalvariaknochenzellen (SV-HFO), in NHOst (normale humane Osteoblasten), VSMCs (vaskuläre glatte Muskelzellen) sowie in hMSC zwischen P3 und P6 deutlich zu inhibieren (Eijken et al. 2007). Im Unterschied dazu wurden in der hier vorliegenden Arbeit hMSC der P1, unterschiedliches Kultivierungsmedium (DMEM High Glucose mit den entsprechenden Differenzierungszusätzen versus SV-HFO-Medium), verschiedene AA Konzentrationen (0,01 µg/ml versus 0,02 µg/ml) verwendet. Eijken et al. (2007) haben zusätzlich herausgefunden, dass der AA inhibierende Effekt am deutlichsten ausgeprägt war, wenn AA vor der Differenzierungsphase verabreicht wurde (Eijken et al. 2007). Die Vielzahl an differenten AA Ergebnissen könnte der Heterogenität im Versuchsaufbau z.B. unterschiedliche Tiermodelle, variierende Stimulationszeitpunkte, verschiedene Zelltypen bzw. Zelllinien geschuldet sein. Trotzdem wird deutlich, dass AA eine äußerst bedeutende Rolle im Knochenmetabolismus übernimmt und als Schlüsselfaktor die Differenzierungsprozesse moduliert. In der vorliegenden Dissertation wurde nachgewiesen, dass rh AA die hMSC in einem Prädifferenzierungszustand arretieren kann, dabei wird die klonogene Kapazität der Zellen erhalten und das Differenzierungspotential in die adipogene und osteogene Richtung einschränkt. Djouad et al. (2010) haben Hinweise gefunden, dass das endogene AA Expressionsniveau in mesenchymalen Vorläuferzellen, die aus verschiedenen Geweben wie beispielweise Knochenmark, Muskel, Mandeln oder Zahnpulpa gewonnen wurden, mitentscheidend für die Multipotenz der mesenchymalen Vorläuferzellen ist und darüber hinaus richtungsweisend für ihre Differenzierung in einen bestimmten Phänotyp ist (Djouad et al. 2010). Die möglicherweise vorübergehende Arretierung in einem Zustand vor dem Lineage Kommittment könnte eine Verstärkung der Expansion reparativer MSC erlauben, was mit der verstärkten Kallusbildung konform geht. Wenn das Lineage Kommittment durch verschiedenste starke osteogene Reize schließlich erreicht wird, ist die Geweberegeneration auf einem verbesserten Niveau letztlich erreicht. Wenn es also ein biologisches Fenster und kooperative Phänomene für die osteogene Differenzierung im

## DISKUSSION

Rahmen der Geweberegeneration für AA gibt, so sind die verschiedenen Berichte in der Literatur doch wieder vereinbar. Sehr eindeutig sind wiederum die Ergebnisse der *in vivo* Studien, die zeigen, dass Aktivin-Antagonisten netto jedenfalls eine anabole Wirkung auf die Knochenformation haben. Bezogen auf das Tissue Engineering sowohl *in vitro* als auch *in situ* (Holzapfel et al. 2012, Jakob et al. 2012a) wäre es primär kein Schaden im Setting bei älteren Menschen AA im Stadium der hMSC Expansion vor Ort zu haben, das osteogene Kommtment wäre aber wahrscheinlich effektiver mit einem starken osteogenen Induktor oder unter der Neutralisierung von AA zu erreichen.

### 7.2.4

#### Der Einfluss von rh AA und rh MSTN auf Proliferation und Apoptose in hMSC

##### 7.2.4.1

#### Die rh AA und rh MSTN Stimulation beeinflusst die Proliferation in hMSC nicht

Um die Einflüsse der beiden rh Proteine AA und MSTN auf basale Zellfunktionen der hMSC wie Proliferation und Apoptose zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Stimulationsexperimente durchgeführt. Verglichen mit den Kontroll-hMSC verursachte die Stimulation mit rh AA, rh MSTN oder der kombinierten Gabe der beiden rh Proteine äußerst geringe und daher vernachlässigbare Einflüsse auf die Proliferation der untersuchten hMSC, mit Ausnahme der 24 stündige rh MSTN Behandlung (0,1 µg/ml), die zu einer 10 %igen Verringerung der Zellproliferation führte (Abb. 30A). Dieser rh MSTN induzierte Einfluss auf die Zellproliferation und die beschriebenen rh AA Effekte auf die Differenzierung der hMSC (s. 6.2.4, 6.2.5) gewährleisteten, dass die verwendeten rh Proteine funktionsfähig waren und nicht durch z. B. von hMSC sekretierten Proteinen in der Kultur inaktiviert wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass AA, wie andere Mitglieder der TGFβ-Familie auch, unterschiedliche Einflüsse auf die Proliferation verschiedener Zelltypen hat. Eine antiproliferative Wirkung von rh AA konnte in humanen umbilikalen venösen Endothelzellen, in Epithelzellen und Lymphozyten gezeigt werden (McCarthy and Bicknell 1993, Chen Y. G. et al. 2002). Dagegen wurde die Proliferation durch rekombinantes AA in Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten und humanen Lungenfibroblasten stimuliert, der Aktivin Antagonist Follistatin konnte diesen AA vermittelten Effekt wieder aufheben (Ohga et al. 1996, Ota et al. 2003). In der murinen Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 wurden durch rekombinantes AA (Konzentration 0,1 nM) ausgelöste mitogene Effekte auf die Zellreplikation beschrieben (Hashimoto et al. 1992). In diesem Fall wurde das rekombinante AA von CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) produziert und die Zellen der MC3T3-E1-Zelllinie 24 h damit inkubiert. Das rekombinante AA stimulierte die DNA-Synthese der MC3T3-E1-Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte und der verwendeten Serumkonzentration

## DISKUSSION

unterschiedlich stark. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten in Zellen, die aus dem Schädeldach fötaler Ratten isoliert wurden, keine rh AA initiierten Einflüsse auf die Proliferation und die Differenzierung festgestellt werden, trotz unterschiedlicher Stimulationsdauer sowie eingesetzten rh AA Konzentrationen (0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml und 0,1 µg/ml) (Ikenoue et al. 1999). Die Stimulationsexperimente der vorliegenden Arbeit wurden unter 10 % FCS durchgeführt. Dadurch könnten die rh AA Effekte maskiert werden, da Hashimoto et al. (1992) bei der reduzierten FCS-Konzentration von 0,3 % rekombinante AA induzierte Einflüsse auf die Proliferation beobachtete, bei einer 10 %igen FCS-Konzentration jedoch nicht und auch Ikenoue et al (1999) supplementierte das Medium mit 10 % FCS (Hashimoto et al. 1992, Ikenoue et al. 1999).

Laut den Untersuchungen von Elkasrawy et al. (2011) weisen Knochenmarkstromazellen, die aus *MSTN*-defizienten Mäusen gewonnen wurden, einen signifikanten 25 %igen Anstieg der Zellproliferation auf, verglichen mit den Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Elkasrawy et al. 2011). *In vitro* sind nur sehr wenige Literaturdaten in Bezug auf den Einfluss von *MSTN* auf die Zellproliferation vorhanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass rh *MSTN* einen antiproliferativen Effekt auf primäre humane Myoblasten ausübt (McFarlane et al. 2011). Wie bereits erwähnt erzielte auch die kombinierte Stimulation der hMSC mit rh AA und rh *MSTN* keine eindeutigen Veränderungen auf die Proliferation verglichen mit den unstimulierten Zellen. Allerdings konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. Durch die kombinierte, 24 stündige Stimulation der Zellen mit rh *MSTN* und rh AA (beide: 0,1 µg/ml) wurde die 10 %ige Proliferationshemmung, die durch die alleinige 24 stündige Gabe von rh *MSTN* (0,1 µg/ml) induziert wurde, aufgehoben. Da die beiden eingesetzten rh Proteine rh AA und rh *MSTN* als Mitglieder der TGFβ-Familie um die gleichen Rezeptoren konkurrieren, könnte es sein, dass das rh AA das rh *MSTN* von den Aktivin Typ II Rezeptoren verdrängt hat und dadurch die rh *MSTN* Wirkung aufgehoben wurde.

### 7.2.4.2

#### **Eine rh AA und rh *MSTN* Stimulation beeinflusst die Apoptose in hMSC nicht**

Die Stimulation der hMSC mit 0,01 µg/ml rh AA über verschiedene Zeiten hatte keinen Einfluss auf die Apoptose. Mit einer Erhöhung der rh AA Konzentration auf 0,1 µg/ml stieg die Apoptose um 10 % (24 h) und erreichte ihr Plateau nach 48 stündiger Stimulation (12 %). Nach einer rh AA Inkubation über 72 h lag die Apoptoserate der Zellen lediglich 5 % über der Apoptoserate der Kontroll-hMSC. Daher scheint die Wahl der eingesetzten Konzentration des rh AA Proteins sowie die Stimulationsdauer im Hinblick auf die ausgelösten Effekte eine wichtige Rolle zu spielen. Grundsätzlich stimmt der durch rh AA ausgelöste apoptotische Effekt mit den Literaturangaben

## DISKUSSION

überein, die eine Entfaltung der apoptotischen Wirkung der Aktivine, darunter insbesondere AA, in vielen verschiedener Zelltypen beschreiben. In HepG2 Zellen, einer humanen Hepatomzelllinie, erfolgte aufgrund einer 2,5 tägigen Inkubation mit rekombinantem AA die Apoptoseinduktion (Chen W. et al. 2000). Auch in Mausmyelomazellen löste die Stimulation mit rh AA apoptotische Prozesse aus und hemmte auf diese Weise die Zellproliferation (Yamato et al. 1997), eine AA Überexpression in der humanen Prostatakrebszelllinie LNCaP führte ebenfalls neben einer Wachstumshemmung zu einer Steigerung der Apoptoserate (Zhang et al. 1997). Diese und zahlreiche weitere Studien belegen, dass AA in vielen Geweben eine bedeutende Funktion bei der Tumorentstehung und der Tumorbekämpfung übernimmt (Yamato et al. 1997, Zhang et al. 1997, Zheng et al. 1998, Danila et al. 2000). Damit wirkt AA nicht nur regulatorisch auf das Zellwachstum und die Differenzierung, sondern scheint an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt zu sein (Chen Y. G. et al. 2002).

Der Zusammenhang zwischen MSTN und Apoptose ist noch weitgehend unbeschrieben. Das könnte daran liegen, dass MSTN keine gravierenden Einflüsse auf zelluläre apoptotische Prozesse ausübt. Dazu passen die Ergebnisse dieser Arbeit, da der Einfluss von rh MSTN (0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml) auf die Apoptose in hMSC insgesamt sehr gering war. Mit der Reduktion der Apoptose um 6 % bzw. 7 % nach 48 bzw. 72 stündiger rh MSTN (0,01 µg/ml) Stimulation wurde der stärkste Effekt erzielt. Allerdings stimulierte MSTN in C2C12 Zellen, einer murinen Muskelzelllinie, die Autophagie-Induktion und erhöhte die Expression Autophagie-assoziiierter Gene (Lee J. Y. et al. 2011). Somit kann MSTN in Abhängigkeit des Kultivierungsystems offensichtlich doch modulierend auf apoptotische Prozesse wirken, da Autophagie als Komponente der Apoptose angesehen wird. Zusätzlich bestätigen frühere Studien eine Funktion der TGFβ-Familienmitglieder (z.B. TGFβ), die ebenfalls die Autophagie-Bildung über den SMAD-Signalweg in bovinen Brustkrebszellen oder humanen hepatozellulären Karzinomzellen fördern (Gajewska et al. 2005, Kiyono et al. 2009). Die kombinierte Stimulation der hMSC über 24 h mit rh AA und rh MSTN (0,1 µg/ml) reduzierte die Apoptose um 23 % und könnte eventuell in direktem Zusammenhang mit der rh AA (0,1 µg/ml, 24 h) induzierten Steigerung der Apoptoserate um 10 % stehen (Abb. 30B). MSTN könnte durch die Konkurrenz um den Aktivin Typ II Rezeptoren die rh AA induzierte Apoptosesteigerung aufheben und durch das Zusammenspiel mit rh AA einen antiapoptotischen Effekt zeigen. Darüber hinaus bewirkte die kombinierte hMSC Stimulation keine eindeutigen Einflüsse verglichen mit den Kontroll-Zellen.

### 7.3 | Der Einfluss von LO auf hMSC

Humane MSC werden hauptsächlich aus dem Knochenmark gewonnen und die dort vorherrschende physiologische Sauerstoffspannung beträgt zwischen 1 % und 7 % Sauerstoff (D'Ippolito et al. 2006) und liegt damit deutlich unter der atmosphärischen Sauerstoffspannung (21 % Sauerstoff), die

## DISKUSSION

standardmäßig in der Zellkultur verwendet wird. Mit der Kultivierung unter reduzierten Sauerstoffspannungen sollte eine Annäherung an die *in vivo* Bedingungen der hMSC erfolgen und mögliche positive Einflüsse aufgedeckt werden.

### 7.3.1

#### Die LO Kultivierung hält den mesenchymalen Stammzellcharakter in einem Zustand der Reprogrammierung fest

##### 7.3.1.1

#### Die LO Kultivierung erhält die Expression mesenchymaler Oberflächenmarker und die klonogene Kapazität in hMSC

Um zu überprüfen, ob eine Kultivierung der hMSC (P1) unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (LO, 2,5 % Sauerstoff) den mesenchymalen Charakter in Bezug auf die Expression der mesenchymalen Oberflächenmarker erhält, wurden durchflusszytometrische Analysen nach 10 tägiger LO Inkubation durchgeführt und mit den High Oxygen (HO) expandierten hMSC verglichen. Die Datenauswertung ergab, dass die LO stimulierten hMSC negativ für die hämatopoetischen Marker (CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>) und positiv für die mesenchymalen Marker (CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> und CD105<sup>+</sup>) waren (Abb. 31). Somit konnte kein Unterschied gegenüber den HO kultivierten Kontroll-Zellen festgestellt werden und auch nach 10 tägiger LO Kultivierung behielten die hMSC ihr charakteristisches Profil in Bezug auf die mesenchymale Oberflächenmarkerexpression. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen von Holzwarth et al. (2010) und Basciano et al. (2011) (Holzwarth et al. 2010, Basciano et al. 2011). Holzwarth et al. (2010) kultivierten hMSC (Passage unbekannt) 14 Tage lang unter 1 %igen Sauerstoffbedingungen und Basciano et al. (2011) wählten Kultivierungsbedingungen mit einem Sauerstoffgehalt von 5 % und analysierten die Expression von mesenchymalen und hämatopoetischen Oberflächenmarkern nach P0 und P2 (Holzwarth et al. 2010, Basciano et al. 2011). Obwohl die Durchführung der beschriebenen Versuche von den 3 Arbeitsgruppen sehr verschieden waren (LO Sauerstoffkonzentrationen, LO Stimulationszeiten, verwendetes Passage der hMSC, verwendetes Expansionsmedium), wurde deutlich, dass sich der hMSC Phänotyp durch eine LO Kultivierung verglichen mit einer HO Kultivierung nicht verändert. Auch die klonogene Kapazität der hMSC blieb aufgrund einer LO Kultivierung nicht nur erhalten, sondern erhöhte sich verglichen mit der klonogenen Kapazität HO kultivierter Zellen (Grayson et al. 2006, Fehrer et al. 2007). Diese Ergebnisse sind nicht überraschend, da hMSC *in vivo* im Knochenmark unter einer Sauerstoffspannung von 1 bis 7 % beheimatet sind (D'Ippolito et al. 2006) und die reduzierten Sauerstoffbedingungen in der Kultur somit besser die *in vivo* Situation repräsentieren.

## DISKUSSION

### 7.3.1.2

---

#### **Die LO Kultivierung hält die hMSC in einem undifferenzierten Zustand fest**

Ebenso wie die klonogene Kapazität wurde auch die Differenzierungsfähigkeit der hMSC unter LO Bedingungen in der vorliegenden Arbeit nicht ausgetestet, sondern bereits bestehende Ergebnisse aus der Literatur herangezogen (D'Ippolito et al. 2006, Fehrer et al. 2007). Diese Daten ergaben übereinstimmend, dass eine LO Kultivierung (3 % Sauerstoff) der hMSC ihre osteogene Differenzierungskapazität vollständig inhibiert und damit einhergehend zeigten die für die osteogene Differenzierung charakteristischen Marker *RUNX2*, *IBSP* (integrin-binding sialoprotein), *OSX* und *OC* unter 3 %igen Sauerstoffbedingungen ein kaum nachweisbares Expressionsniveau (D'Ippolito et al. 2006). Zusätzlich zur osteogenen Differenzierung wurde auch die Adipogenese signifikant vermindert verglichen mit High Oxygen kultivierten hMSC (Fehrer et al. 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Sauerstoffgehalt *in vitro* als regulatorischer Faktor für das Gleichgewicht der hMSC zwischen einem proliferativen und differenzierten Zustand verantwortlich ist.

### 7.3.2

---

#### **Die LO Kultivierung fördert die Wachstumsrate der hMSC**

Das Proliferationsverhalten von hMSC unter reduzierten Sauerstoffbedingungen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Dabei wurden widersprüchliche Resultate, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf differente Versuchsansätze zurückzuführen sind, erzielt. Um einen Eindruck zu erhalten, wie sich eine LO Kultivierung auf die hMSC in unserem Zellkultursystem auswirkt, wurden in der vorliegenden Arbeit hMSC ab P1 bis zum Eintritt in die replikative Seneszenz unter HO bzw. unter LO Bedingungen kultiviert. Während HO expandierte Zellen nach durchschnittlich 128 Tagen ihre seneszenten, letzte Passage erreichten, proliferierten die LO kultivierten hMSC im Durchschnitt 47 Tage länger und erreichten nach 175 Tagen einen Zustand der replikativen Seneszenz (Abb. 32). Im Vergleich zu HO kultivierten hMSC wiesen LO expandierte Zellen zusätzlich höhere KPDs auf (Abb. 32). Diese LO induzierten Einflüsse auf die Proliferation von hMSC wurden auch von Fehrer et al. (2007) gezeigt, allerdings wuchsen die LO bzw. NO kultivierten hMSC nicht bis zum Erreichen ihrer seneszenten Passage, sondern lediglich über eine Zeitdauer von 100 Tagen (Fehrer et al. 2007). Weitere Unterschiede liegen im Detail, da Fehrer et al. (2007) die Zellkultivierung unter einer Sauerstoffspannung von 3 % (versus 2,5 % in der vorliegenden Arbeit) sowie unter der Verwendung von MEM-Medium (versus DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin in der vorliegenden Arbeit) und 20 % FCS Supplementierung (versus 10 % in der vorliegenden Arbeit) durchführten (Fehrer et al. 2007). Für hMSC, die aus dem Knochenmark isoliert wurden und aufgrund ihrer



## DISKUSSION

Differenzierungsfähigkeit *in vitro* in die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung von den Autoren als MIAMI (Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells) Zellen bezeichnet wurden, konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (D'Ippolito et al. 2006). Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurden die MIAMI Zellen über einen recht kurzen Zeitraum von 15 Tagen kultiviert. Dabei zeigte sich ab Tag 3 unter reduzierten Sauerstoffbedingungen ein Anstieg der Zellzahl in LO kultivierten Zellen. Die LO Kultivierung erfolgte unter 4 unterschiedlichen Sauerstoffspannungen (1 %, 3 %, 5 % und 10 % Sauerstoff) und die stärkste und signifikante Proliferationssteigerung wurde bei einem 3 %igen Sauerstoffanteil in der Kultur beobachtet (D'Ippolito et al. 2006). Trotz der unterschiedlichen Kultivierungsdauer konnten mit diesen Ergebnissen die Daten der vorliegenden Arbeit erneut bestätigt werden.

### 7.3.3

#### Die LO Kultivierung verändert das Expressionsmuster ausgewählter Gene

Anhand einer SAM Analyse (significance analysis of microarrays) mithilfe des Web Services von CARMAweb (Comprehensive R based Microarray Analysis web frontend) (Hybridisierungs-Daten von G. Lepperdinger und der eigenen Arbeitsgruppe) wurden 9 Gene ausgewählt, deren Expressionsunterschiede zwischen LO und NO kultivierten hMSC im Rahmen einer Microarray Analyse untersucht wurden und ein differentielles Expressionsmuster zeigten (Rainer et al. 2006). Dabei wurden die Proben der LO Hybridisierungen im Gegensatz zu den Proben der NO Hybridisierungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Günter Lepperdinger (Institut für Biomedizinische Altersforschung, Universität Innsbruck, Österreich) durchgeführt und auf die NO Hybridisierungen normalisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft ob, sich die auf der Microarray Analyse basierenden *in silico* Daten auch *in vitro* bestätigen lassen. Dazu wurden hMSC von 6 verschiedenen Spendern ab P1 bis zum Erreichen ihrer Subkonfluenz unter LO Bedingungen kultiviert und mit HO expandierten hMSC verglichen. Als Folge der LO Kultivierung zeigten die Gene *ACAN*, *CD24*, *WISP2*, *DPT*, *HAS1*, *SEPP1* nur minimale Änderungen der Expression (Abb. 33) und bestätigten somit die *in silico* erhaltenen Daten nicht, aus diesem Grund werden diese Gene im Folgenden nicht näher beleuchtet. Als mögliche Ursache für dieses Ergebnis kann die zeitlich und räumlich getrennte Durchführung der Hybridisierungen angesehen werden. Humane MSC, die unter reduzierten Sauerstoffbedingungen wuchsen, exprimierten die Gene *IGFBP5*, *NOG* und *FGFR2* deutlich höher als die HO kultivierten Kontroll-Zellen und entsprachen damit den Erwartungen der Microarray Analyse (Abb. 33). Diese 3 Kandidaten sind im Hinblick auf vielseitige Funktionen im Organismus von Interesse. Beispielsweise ist *IGFBP5* als Mitglied der insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) an wichtigen biologischen Prozessen beteiligt. Darunter an der Wachstumshemmung von



## DISKUSSION

Brustkrebszellen sowie an der Modulation der Proliferation von Knochenzellen. Indem es einen Caspase-abhängigen intrinsischen apoptotischen Signalweg induziert, wirkt IGFBP5 als proapoptotischer Faktor und wirksamer Wachstumsinhibitor von humanen Brustkrebszellen (Butt et al. 2003). Zusätzlich fungieren die IGFbps als Carrier der IGFs, die als wichtige Regulatoren des Knochenstoffwechsels gelten (s. 3.1.8), und modulieren darüber hinaus deren Aktivität (Kiefer et al. 1992, Hwa et al. 1999). Im Knochen ist IGFBP5 neben IGFBP4 am häufigsten von allen IGFbps vertreten und über die IGFs können sie stimulierend aber auch hemmend auf den Knochen wirken (Govoni et al. 2005). Mohan et al. (1995) fanden heraus, dass IGFBP4 eine inhibierende und IGFBP5 eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation der murinen Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 haben (Mohan et al. 1995). Jedoch wurden in der Literatur für IGFBP5 sowohl hemmende als auch stimulatorische Einflüsse auf die Proliferation und die Differenzierung von Osteoblasten oder allgemein auf die Regulation des Knochenwachstums erwähnt (Schneider et al. 2002, Mukherjee and Rotwein 2007, Conover 2008). Dabei wird der inhibitorische Einfluss durch die Bindung von IGFBP5 an die IGFs vermittelt (Conover 2008). Die Untersuchungen von Devlin et al. (2002) mit transgenen *IGFBP5* überexprimierenden Mäusen zeigten eine Abnahme bezüglich des trabekulären Knochenvolumens sowie Osteopenie als Folge einer verminderten Osteoblastenaktivität (Devlin et al. 2002). *In vivo* und *in vitro* konnte eine IGFBP5 stimulierende Wirkung auf die Knochenformation über einen IGF unabhängigen Mechanismus nachgewiesen werden (Miyakoshi et al. 2001). Interessant ist, dass sich die hMSC scheinbar an ihren Herkunftsort erinnern können und aufgrund der LO Kultivierung durch z.B. eine Erhöhung der *IGFBP5* Expression wieder daran anpassen. Inwieweit sich ein klarer Anstieg der *IGFBP5* Expression in den LO expandierten hMSC positiv oder negativ auf die untersuchten Zellen auswirkt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Des Weiteren zeigte *NOG* aufgrund der LO Kultivierung ebenfalls eine ausgeprägte Expressionserhöhung verglichen mit den Kontroll-Zellen. Als Mitglied des Spemann Organisations wird *NOG* unter anderem in der Skelettmuskulatur, in der Haut, im Knorpelgewebe und im Knochen exprimiert (Valenzuela et al. 1995, Canalis et al. 2012). Die Expression von *NOG* wurde auch in Osteoblasten nachgewiesen und seine Wirkung als BMP Antagonist reduziert die Effekte der BMPs in Osteoblasten (Gazzerro et al. 1998, Abe et al. 2000b, Canalis et al. 2012). In Osteoblasten wirkt eine *NOG* Überexpression supprimierend auf die Differenzierungsfähigkeit, wohingegen eine Reduktion des *NOG* mRNA-Niveaus die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker verstärkt (Gazzerro et al. 2003, Wan D. C. et al. 2007). *In vivo* fördert eine verminderte *NOG* Expression die Regeneration von Knochendefekten (Wan D. C. et al. 2007). Kürzlich wurde beschrieben, dass *NOG* nicht nur die Differenzierung in die osteogene Richtung sondern auch in die adipogene Richtung in MSC reguliert. Somit könnte *NOG* ein wichtiger modulierender Faktor hinsichtlich der Plastizität von hMSC sein. Die Gabe von rekombinantem *NOG* während der adipogenen Differenzierung von murinen und humanen

## DISKUSSION

MSC führte zu einem Anstieg der Adipozytenanzahl. Überdies wurden erhöhte NOG Plasmalevel in adipösen humanen Individuen (Body Mass Index > 27) und in adipösen Mäusen festgestellt. In MSC, die aus adipösen C57BL/6 Mäusen gewonnenen wurden, konnte eine erhöhte NOG Proteinexpression verglichen mit den Kontrollmäusen nachgewiesen werden. Die MSC aus den adipösen Mäusen differenzierten spontan und ohne Zugabe von exogenem NOG in die adipogene Richtung. Mäuse mit signifikant erhöhtem Körperfett verfügten gleichzeitig über eine deutlich reduzierte Knochendichte (Sawant et al. 2012). Basierend auf diesen Ergebnissen sehen die Autoren in NOG einen Verursacher der Adipogenese und einen möglichen Biomarker für den Nachweis von Adipositas (Sawant et al. 2012). Ausgehend von der erhöhten *NOG* Expression der unter LO expandierten hMSC und den Literatur-Daten könnten sich diese Zellen tendenziell spontan in Richtung adipogener Differenzierung verändern. Um darüber allerdings eine verlässliche Aussage treffen zu können, wären weitere Untersuchungen wie z. B. eine Ölrot O-Färbung zum Nachweis möglicher Adipozyten notwendig.

*FGFR2* zeigte als drittes Gen eine Erhöhung seiner Expression infolge der LO Kultivierung. Das *FGFR2* Gen codiert einen Rezeptor für die Wachstumsfaktoren Fibroblast Growth Factors (FGFs), die unter anderem in die Tumorigenese, fötale Morphogenese und die Homöostase von adultem Gewebe involviert sind (Dailey et al. 2005, Grose and Dickson 2005, Chaffer et al. 2007). *FGFR2* kommt in den 2 Splice-Varianten IIIb sowie IIIc vor, hierbei wird *FGFR2IIIc* als mesenchymale Splice-Variante von *FGFR2* angesehen, da es bei der Kondensation undifferenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen und später in der endochondralen sowie der intramembranösen Ossifikation exprimiert wird (Eswarakumar et al. 2002, Eames et al. 2003). Da *FGFR2*, ebenso wie *FGFR1* und *FGFR3*, mit der Knochenformation in Verbindung gebracht wird, sind Mutationen in diesem Gen für angeborene skelettale Erkrankungen wie z.B. Crouzon-Syndrom, Jackson-Weiss Syndrom oder Pfeiffer-Syndrom verantwortlich (Ornitz and Marie 2002, Katoh 2009). Coutu et al (2011) fanden heraus, dass die Signaltransduktion von *FGFR1* und *FGFR2* die Proliferationsrate von MSC durch Inhibition der replikativen Seneszenz stimuliert und daher eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerungskapazität sowie der Erhaltung der Stemness der MSC einnimmt (Coutu et al. 2011). Daher könnte die 1,5-fache Hochregulation von *FGFR2* darauf hinweisen, dass die Fähigkeit der hMSC zur Selbsterneuerung unter LO Bedingungen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen verstärkt wird.

### 7.3.4

---

#### Auswirkung der LO Kultivierung auf Stemness und Seneszenz

##### 7.3.4.1

---

##### Die LO Kultivierung erhält die OCT4 Proteinexpression

Um herauszufinden, ob die LO Kultivierung mit einer Veränderung der OCT4 Expression auf Proteinebene einhergeht, wurde in LO und NO kultivierten hMSC in P1 das OCT4 Protein immunzytochemisch angefärbt. Als eine Art Stemness-Marker für die Selbsterneuerungskapazität bzw. die Multipotenz von hMSC kodiert das *OCT4* Gen einen Transkriptionsfaktor, der für embryonale Stammzellen charakteristisch ist und als Schlüsselfaktor für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz dieser Zellen essentiell ist (Nichols et al. 1998, Niwa et al. 2000). Die immunzytochemische Untersuchung ergab keinen Unterschied des OCT4 Expressionsniveaus in einer der beiden Gruppen (Abb. 36). Dabei bleibt die LO induzierende Wirkung auf die Expansion der OCT4 Expression zu diesem frühen Zeitpunkt in P1 zu messen.

##### 7.3.4.2

---

##### Kurzzeit LO Kultivierung erhöht die Expression von Stemness-assoziierten Markern

Um Aufschluss über den multipotenten Zustand der hMSC unter reduzierten Sauerstoffbedingungen zu erhalten, wurde daher das Expressionsniveau von *OCT4* und weiterer sogenannter Stemness-assoziiierter (*SOX2*, *KLF4*, *MYC*, *PBX1*) bzw. Seneszenz-assoziiierter (*PSG1*, *PSG5*, *HELLS*) Markergene auf mRNA-Ebene untersucht und mit HO kultivierten Zellen verglichen (Abb. 34). Die Transkriptionsfaktoren *SOX2*, *KLF4* und *MYC* werden von den Genen *SOX2*, *KLF4* und *MYC* kodiert. Ebenso wie *OCT4* sind sie für die Regulation der embryonalen Entwicklung äußerst wichtig und als Stemness-Faktoren an der Selbsterneuerungskapazität und Pluripotenz embryonaler Stammzellen maßgeblich beteiligt. Das Potential dieser Faktoren offenbarte sich aufgrund ihrer Fähigkeit, somatische, also nicht-pluripotente Zellen, in induzierte pluripotente Stammzellen zu verwandeln bzw. umzuprogrammieren. Im Jahr 2006 etablierten Takahashi und Yamanaka (2006) dazu eine Methode, bei der mittels einer retroviralen Transfektion die Faktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *MYC* in murine Fibroblasten eingebracht und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) erzeugt wurden (Takahashi and Yamanaka 2006). Somit konnte erstmals die Reprogrammierung somatischer Zellen in iPS nachgewiesen werden, die neben charakteristischen morphologischen Eigenschaften auch für embryonale Stammzellen typische Gene exprimierten. Kurz darauf gelang es Yu et al. (2007) aus humanen somatischen Zellen mit den reprogrammierenden Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*,

## DISKUSSION

*NANOG* und *LIN28A* (lin-28 homolog A (*C. elegans*)) iPS einschließlich der für embryonale Stammzellen so charakteristischen Eigenschaften (z.B. Differenzierungspotential in die Gewebe aller 3 Keimblätter, Expression der typischen Oberflächenmarker und Gene, Telomeraseaktivität) zu erzeugen (Yu J. et al. 2007). Die Besonderheit an diesem Ansatz war, dass *MYC* im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der iPS ersetzt wurde, da es zusätzlich zu seiner Selbsterneuerungskapazität in embryonalen Stammzellen auch als Protoonkogen bekannt ist, das Apoptose und Differenzierung induzieren kann (Sumi et al. 2007) und in die Tumorentstehung involviert ist (Dominguez-Sola et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine kurzzeitige LO Inkubation (2 h, 12 h, 24 h, eine Passage (P1)) das Expressionsniveau von *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *MYC* beeinflusst und sich dadurch auf das multipotente Potential der hMSC auswirkt und von HO kultivierten hMSC unterscheidet (Abb. 34). Zunächst wurde überprüft, ob die hMSC auf die reduzierten Sauerstoffbedingungen mit einer Induktion der *HIF1A* Expression reagieren. Der Transkriptionsfaktor *HIF1A* wird von dem *HIF1A* Gen kodiert und wird aufgrund niedriger Sauerstoffbedingungen aktiviert, um infolgedessen auf eine Vielzahl von Genen (z.B. *VEGFA* (vascular endothelial growth factor A), *IGF* (insulin-like growth factor), *EPO* (erythropoietin)) regulatorisch einzuwirken. Somit nimmt der Transkriptionsfaktor *HIF1A* eine essentielle Bedeutung bei der Regulation der zellulären Sauerstoffhomöostase ein (Iyer et al. 1998, Semenza 2001). Die 2 und 24 stündige LO Kultivierung induzierte nur eine sehr geringe *HIF1A* Expressionsänderung (Fold Change = 1,2), nach einer Passage unter LO Bedingungen erhöhte sich die *HIF1A* Expression als Reaktion auf die reduzierten Sauerstoffbedingungen 1,6-fach verglichen mit den HO Kontroll-Zellen. Diese Steigerung des *HIF1A* Expressionsniveaus deutet darauf hin, dass hMSC auf reduzierte Sauerstoff Bedingungen antworten können, bis dieser Effekt vollständig ausgeprägt ist, kann es jedoch bis zu einer Passage dauern (Abb. 34). Unter reduzierten Sauerstoffbedingungen beschrieben Iida et al (2012) eine erhöhte *OCT4* und *SOX2* Expression durch die Aktivierung von *HIF1A*, dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Iida et al. 2012). Da die semi-quantitative Auswertung der Stemness-assoziierten Marker *OCT4* und *SOX2* eine LO induzierte Erhöhung der Genexpression in allen untersuchten Zeitpunkten ergab (Ausnahme *SOX2*: minimale, vernachlässigbare 0,7-fache Reduktion nach 2 stündiger LO Inkubation). Die deutlichste 1,6-fache bzw. 2,4-fache Erhöhung der *OCT4* Expression war nach 2 stündiger bzw. 12 stündiger LO Inkubation zu verzeichnen. Gleichzeitig zeigten diese beiden Messpunkte von allen 4 analysierten Zeitpunkten den größten Standardfehler, was auf eine spendervariable Reaktion hinsichtlich einer 2 bzw. 12 stündigen LO Kultivierung schließen lässt. Im weiteren Zeitverlauf nahm die *OCT4* Expression zunehmend ab, wenngleich sie dabei weiterhin über dem Expressionsniveau der HO kultivierten hMSC lag. Eine Hochregulation der *OCT4* Expression wurde auch in MIAMI Zellen, die 3 Wochen unter LO Bedingungen (3 % Sauerstoff) wuchsen, auf

## DISKUSSION

mRNA-Ebene beobachtet (D'Ippolito et al. 2006) und hMSC, die unter LO Bedingungen (2 % Sauerstoff) expandiert wurden, zeigten ebenfalls erhöhte *OCT4* mRNA-Level verglichen mit den HO kultivierten Zellen (Grayson et al. 2007). In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen, steigerte eine kurzzeitige LO Kultivierung die Expression von *OCT4* und kann dadurch die hMSC verstärkt in einem proliferativen undifferenzierten Zustand halten. Dasselbe gilt für den Einfluss der LO Kultivierung auf die *SOX2* Expression, da auch hier die Niedrig Sauerstoff Bedingungen zu einem deutlichen Anstieg des Expressionsniveaus führten verglichen mit NO expandierten Zellen. Der Stemness-Marker *SOX2* ist für den Erhalt der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen unverzichtbar und in der Lage über weitere Transkriptionsfaktoren die *OCT4* Expression zu regulieren (Masui et al. 2007). Zum jetzigen Zeitpunkt scheinen sich LO Kultivierungsbedingungen positiv auf die Multipotenz der hMSC auszuwirken, da *OCT4* und *SOX2* als charakteristische embryonale Marker ein zum Teil deutlich erhöhtes Expressionslevel verglichen mit den NO expandierten hMSC zeigten (Abb. 34). Im Gegensatz zu *OCT4* und *SOX2* induzierte eine LO Expandierung in den hMSC keine Änderung der *KLF4* Expression verglichen mit den Kontroll-Zellen. Somit kann LO das Expressionsniveau von *KLF4* nicht beeinflussen, allerdings beobachteten Hung et al. (2012) einen Expressionsanstieg von *KLF4* nach 7 tägiger Kultivierung unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (Hung et al. 2012). Erklären lassen sich die differenten Ergebnisse mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in der Kultur (2,5 % Sauerstoff in der vorliegenden Arbeit versus 1 % Sauerstoff), unterschiedlichen Kultivierungsmedien und verschieden langer LO Inkubationen (9 Tage und kürzer in dieser Arbeit versus 7 Tage). Anders als bei den bisher untersuchten Stemness-assoziierten Genen verminderte eine LO Kultivierung die *MYC* Expression in hMSC. Als Folge einer 2 stündigen LO Inkubation wurde *MYC* signifikant erniedrigt exprimiert (Fold Change = 0,5). Nach 12 h wurde dieser Effekt aufgehoben, um nach 24 h bzw. einer Passage erneut in eine eindeutige Expressionsreduktion zu münden verglichen mit den Kontroll-Zellen. Eine der Hauptaufgaben von *MYC* ist es, die Progression des Zellzyklus, aber auch die Apoptose zu fördern. Zusätzlich wirkt es regulatorisch auf die Expression spezifischer Zielgene (Dang 1999). Als Protoonkogen und, wie eben erwähnt, als wichtiger Regulator zellulärer Funktionen ist *MYC* mit einer Vielzahl von Krebserkrankungen assoziiert (Collins and Groudine 1982, Dalla-Favera et al. 1982, Grandori et al. 2000, Pasqualucci et al. 2001). *MYC* kodiert einen DNA-bindenden Faktor, der imstande ist, ebenso aktivierend wie auch inhibierend auf die Transkription zu wirken. Die Regulation zahlreicher Zielgene, die mit wichtigen zellulären Funktionen assoziiert werden, erfolgt über diesen Mechanismus (Grandori et al. 2000, Fernandez et al. 2003, Patel et al. 2004). Eine unkontrollierte Expression von *MYC* fördert in verschiedenartigen Zelltypen ebenso wie im transgenen Tiermodell die Onkogenese (Adams et al. 1985), deren detaillierter Ursprung noch immer unklar ist. Wade und Wahl (2006) beschreiben *MYC* als potentiell auslösendes Element für Schädigungen der DNA, verschlechterte DNA-Reparatur und eine veränderte Progression des

## DISKUSSION

Zellzyklusses (Wade and Wahl 2006). Darüber hinaus legen die Ergebnisse von Dominguez-Sola et al. (2007) dar, dass eine Deregulierung von *MYC* nicht nur DNA-Schäden sondern auch genomische Instabilität aufgrund von Replikationsstress hervorrufen kann (Dominguez-Sola et al. 2007). Die nach den drei Zeitpunkten 2 h, 24 h und einer Passage deutliche Reduktion der *MYC* Expression unter LO Bedingungen liefert keinerlei Hinweise für ein überschießendes Expressionsniveau, was im Zusammenhang mit *MYC* als günstig aufgenommen werden kann. Vielmehr wirkte die LO Kultivierung der hMSC unter reduzierten Sauerstoffbedingungen inhibitorisch auf die Expression von *MYC* und schränkte es somit in seiner Wirkungsweise ein. Als weiteres interessantes Stemness-assoziiertes Gen wurde *PBX1* untersucht. Es ist bekannt, dass *PBX1* eine regulatorische Funktion bei der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungskapazität humaner embryonaler Stammzellen einnimmt, indem es zusammen mit *KLF4* die Expression von *NANOG*, ein weiterer Schlüsselfaktor für die Pluripotenz embryonaler Stammzellen, reguliert (Chan et al. 2009). Untersuchungen an *PBX1* defizienten Mäusen ergaben eine wichtige regulatorische Funktion von *PBX1* im Hinblick auf die skelettale Musterbildung und die Osteogenese. Darüber hinaus schlussfolgern Selleri et al. (2001), dass *PBX1* in verschiedenen Vorläuferzellen regulatorisch auf den proliferativen Zustand bzw. die Differenzierungsfähigkeit der Zellen wirkt (Selleri et al. 2001). Die Funktion von *PBX1* im Knochenstoffwechsel wurde untersucht, indem für die *in vitro* Analyse humane Zellen aus dem Knochen (HBDC) und MC3T3-E1 Präosteoblasten aus der Maus verwendet wurden. Die Expression von *PBX1* auf mRNA Ebene konnte in HBDC und MC3T3-E1 nicht nur während der Proliferation sondern auch im Verlauf der Differenzierungs-Phase gezeigt werden. Transientes Silencing von *PBX1* mittels RNAi in MC3T3-E1 Präosteoblastenzellen resultierte in einer gesteigerten Proliferationsrate und in einer verminderten Expression der zwei für die Osteoblasten-Differenzierung wichtigen Regulatoren *RUNX2* und *OSX*, außerdem in einer verstärkten Matrix-Mineralisierung im Vergleich zu den Kontrollen. *PBX1* wirkt somit inhibitorisch auf Präosteoblasten und ist in die osteogene Differenzierung involviert (Cheung et al. 2009). Bis auf die 0,2-fache verringerte *PBX1* Expression aufgrund der 2 stündigen LO Inkubation, wurde die *PBX1* Expression in hMSC aufgrund der LO Kultivierung nicht verändert verglichen mit den Kontroll-Zellen. Interessanterweise zeigt *PBX1* damit das gleiche Verhalten wie *KLF4*, die beide zusammen und in Kooperation mit *OCT4* und *SOX2* *NANOG* regulieren. *PSG1* und *PSG5* wurden bereits als Seneszenz-assoziierte Markergene vorgestellt (s. 7.1.5) und die Expression von *PSG1* zeigte in den LO kultivierten hMSC lediglich nach einer Passage eine auffällige Veränderung in Form einer 0,4-fachen Reduktion der *PSG1* Expression verglichen mit den NO inkubierten Zellen. Zu den übrigen analysierten Zeitpunkten ergaben sich keine Expressionsänderungen des *PSG1* Gens, daher kann eine kurzzeitige LO Kultivierung nicht mit der replikativen Seneszenz assoziiert werden sondern scheint im Gegenteil bei einer LO Kultivierung über eine Passage (Fold Change = 0,4) einen protektiven Effekt auf die Zellalterung zu haben. Allerdings

## DISKUSSION

steht dieser Hypothese die 2,2-fach erhöhte Expression von *PSG5* nach 12 stündiger LO Inkubation gegenüber. Bei allen übrigen untersuchten Zeitpunkten wurde *PSG5* minimal vermindert exprimiert verglichen mit den Kontroll-Zellen. Abgesehen von den beiden beschriebenen Zeitpunkten werden *PSG1* und *PSG5* durch die LO Kultivierung nicht induziert. Die deutlich reduzierte *PSG1* Expression nach 2 stündiger LO Inkubation und die 2,2-fach gesteigerte *PSG5* Expression nach 12 stündiger LO Inkubation stellt eine gegenläufige Expressionsregulation der beiden Gene dar, die im Rahmen der Langzeit LO Kultivierung weiter untersucht wurden. Als Mitglied der SNF2-Superfamilie ist *HELLS* ein wichtiger Regulator der DNA-Methylierung, die als epigenetische Modifikation regulierend auf die Genexpression und Transkription wirkt. Darüber hinaus wird *HELLS* mit Alterung assoziiert (Raabe et al. 2001, Sun et al. 2004, Sun and Arceci 2005), da Fibroblasten, die aus *HELLS*-defizienten murinen Embryonen gewonnen wurden, einen Phänotyp der replikativen Seneszenz zeigen (Sun et al. 2004). Ausgehend von der gleichbleibenden *HELLS* Expression der LO kultivierten Zellen verglichen mit den Kontroll-hMSC hatte eine Kultivierung der Zellen unter reduzierten Sauerstoffbedingungen keinen Einfluss auf die Zellaalterung.

### 7.3.4.3

#### **Langzeit LO Kultivierung verstärkt die *OCT4*-Expression und inhibiert die *PSG1*-Expression als Seneszenz-assoziiertes Gen**

Eine kurzzeitige LO Kultivierung erhöhte unter anderem die *OCT4* und *SOX2* mRNA-Level. Um herauszufinden, ob eine über mehrere Passagen andauernde LO Kultivierung diese Effekte verstärkt oder vermindert und somit das Expressionsmuster Stemness-assoziiierter Gene und Seneszenz-assoziiierter Gene in hMSC beeinflussen kann, wurde neben einem frühen (P3) auch ein später (P8) Zeitpunkt der NO bzw. LO expandierten Zellen gewählt (Abb. 35). Nach einer 3 Passagen andauernden LO Kultivierung ergab die densitometrische Quantifizierung der Stemness-assoziierten Markergene (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*) keine Änderungen im Expressionsniveau verglichen mit den NO kultivierten hMSC. Eine LO Kultivierung über 8 Passagen änderte die mRNA-Beträge der Gene *SOX2*, *KLF4* und *MYC* nicht. Auffallend ist der Anstieg der *OCT4* Expression in P8 unter LO Bedingungen, die 2,0-fach im Vergleich zu den NO Bedingungen verändert wurde und somit dramatisch hochreguliert wurde. Diese ganz deutlich erhöhte *OCT4* Expression in P8 liefert ein Indiz dafür, dass sich eine LO Kultivierung vorteilhaft auf die Selbsterneuerungsfähigkeit der hMSC auswirkt und möglicherweise eine schützende Wirkung vor der Entwicklung der replikativen Seneszenz ausübt, da das Seneszenz-assoziierte Gen *PSG1* in P3 und in P8 in LO kultivierten hMSC vermindert exprimiert wurde verglichen mit den Kontroll-hMSC. Demgegenüber steht die differentielle Regulation von *PSG5*, das infolge der LO Kultivierung in P3 zwar eine unveränderte



## DISKUSSION

Expression aufwies, jedoch in P8 stärker exprimiert wurde als in den NO kultivierten Zellen und dadurch möglicherweise auf die Entwicklung replikativer Seneszenz hindeutet. Aus unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass im Laufe der *in vitro* Alterung von hMSC die Expression von *PSG5* früher ansteigt als die Expression von *P16* als weiteren sehr typischen Seneszenz-Marker. Somit käme *PSG5* in Bezug auf zellbasierte Therapieverfahren als Kandidat für die Qualitätskontrolle in Frage, da dieses Gen früher als typische Seneszenz-assoziierte Marker (z.B. *P16*) auf erste Anzeichen der Seneszenz hindeutet. Möglicherweise könnten die PSGs auch mit Stemness assoziiert werden, da sie als Hauptprodukt des Synzytiotrophoblasten, der aus dem Trophoblasten als äußere Zellschicht der Blastozyste differenziert wird, gebildet werden und in das Blutserum schwangerer Frauen abgegeben werden. Bis zum Ende der Schwangerschaft steigt die PSG Serumkonzentration an und niedrige PSG Serumkonzentrationen wurden mit dem Auftreten von Fehlgeburten assoziiert (Wurz et al. 1981, Silver et al. 1993, Arnold et al. 1999, Rawn and Cross 2008). Daher werden die PSGs offensichtlich auch in Stammzellen exprimiert und könnten zusätzlich zu ihrer Funktion als Seneszenz-assoziierte Marker möglicherweise auch als Stemness-assoziierte Marker wirken. Vor diesem Hintergrund könnte die erhöhte *PSG5* Expression in P8 als Folge der LO Kultivierung auch als Anzeichen der gesteigerten Stemness gewertet werden. Die Expression von *PBX2* wurde aufgrund der LO Kultivierung gegenläufig reguliert. Zunächst konnte in P3 eine deutliche 0,5-fache Reduktion des *PBX2* mRNA-Levels beobachtet werden. Nach P8 wurde dieser Effekt aufgehoben bzw. minimal in das Gegenteil verkehrt. Die Mitglieder der Pre B cell leukemia homeobox (*PBX*) Familie und somit auch *PBX2* kontrollieren Prozesse der Entwicklung, insbesondere der skelettalen Entwicklung sowie der Differenzierung (Selleri et al. 2001, Qiu et al. 2010). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen der *PBX2* Expressionsstärke in karzinogenen Geweben und den Überlebenschancen der Patienten hergestellt. Dabei zeigte sich, dass eine erhöhte *PBX2* Expression bei Magen- und Ösophaguskrebs zu einem verschlechterten Überleben führte (Qiu et al. 2010). Die Autoren schlussfolgern, dass *PBX2* fördernd auf das Tumorstadium wirken kann. In Bezug auf diese Ergebnisse kann die reduzierte *PBX2* Expression unter reduzierten Sauerstoffbedingungen als positives Zeichen gewertet werden.

### 7.3.4.4

#### **LO expandierte hMSC zeigen keine P16 Proteinexpression in der letzten, seneszenten Passage**

Ein Hinweis darauf, dass eine Kultivierung der hMSC unter LO Bedingungen Schutz vor der Entwicklung replikativer Seneszenz bietet, lieferte der immunzytochemische Nachweis der P16 Proteinexpression in der letzten, seneszenten Passage der LO und NO kultivierten hMSC. Denn



## DISKUSSION

obwohl die LO kultivierten hMSC 2 bis 6 Passagen länger expandiert wurden, exprimierten die HO expandierten Zellen deutlich mehr P16 Protein in ihrer letzten und seneszenten Passage. Im Gegensatz zu dieser ausgeprägten P16 Akkumulation, konnte nahezu keine P16 Proteinexpression in der letzten Passage der LO kultivierten hMSC nachgewiesen werden (Abb. 37). Die Akkumulation von P16 wird zusammen mit weiteren Faktoren als Indiz für einen seneszenten Zustand angesehen (Wagner W. et al. 2008b) und die kaum nachweisbare P16 Proteinexpression in der letzten Passage der LO expandierten hMSC bestätigt den zuvor erwähnten ersten Hinweis, dass eine LO Kultivierung eine protektive Wirkung vor der Seneszenzentwicklung bietet. Die Zellen beider untersuchter Gruppen zeigten in der subkonfluenten P1 geringe Unterschiede in der P16 Proteinexpression. In den LO kultivierten hMSC wurde P16 etwas geringer exprimiert als in den HO expandierten Zellen, jedoch stärker als in der letzten, seneszenten Passage LO expandierter Zellen (Abb. 37). Wie bereits in der Einleitung erwähnt (s. 3.2.4.1) können hMSC schon in frühen Passagen Zeichen replikativer Seneszenz präsentieren. Da dies jedoch kein synchroner Prozess in der Zellkultur ist, kann durch die Kultivierung der hMSC unter reduzierten Sauerstoffbedingungen eine Seneszenz-verzögernde Wirkung induziert werden, die sich erst im mit zunehmender Passagenzahl niederschlägt wie in Abb. 37 ersichtlich wurde.

Insgesamt scheint sich eine Kultivierung unter reduzierten Sauerstoffbedingungen positiv auf den Zustand der hMSC auszuwirken. Aufgrund einer verstärkten *OCT4* Expression auf mRNA-Ebene in hohen Passagen bei gleichzeitig äußerst geringer P16 Proteinexpression in der letzten Passage wird deutlich, dass die LO Kultivierung in der Lage ist, die hMSC auch noch in einem bereits fortgeschrittenen Stadium der Expandierung in einem proliferativen, undifferenzierten Zustand der Selbsterneuerung einzufangen. Damit scheint die Zellexpandierung unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (LO Kultivierung) für hMSC nicht nur ein besonderer Schutz vor der Seneszenzentwicklung darzustellen, sondern im Hinblick auf zellbasierte Therapieverfahren, durch den Erhalt ihrer Selbsterneuerungskapazität über längere Zeit in der Kultur, begünstigend auf die Effizienz und den Erfolg dieser Verfahren zu wirken. Aufgrund seiner möglicherweise zweideutigen Funktion als früher Seneszenz-assoziiertes Marker bzw. Stemness-assoziiertes Marker muss die Rolle von *PSG5*, das als Kandidat für die Qualitätskontrolle in diesen Therapieverfahren Frage kommt, in weiterführenden Experimenten genau untersucht werden.

## 7.4 | Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch den Einsatz sogenannter Morphogene hMSC in der Zellkultur über längere Zeit in einem proliferativen, undifferenzierten Zustand der Selbsterneuerung „eingefangen“ werden können und dadurch vor Seneszenz und vorzeitiger

## DISKUSSION

Differenzierung bewahrt werden. Als Morphogene wurden Faktoren (1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>), Aktivin A (AA), Myostatin (MSTN), Low Oxygen (LO)) gewählt, deren Bedeutung für den menschlichen Organismus außer Frage steht und von denen angenommen wurde, dass sie im Zusammenhang mit den Prozessen der Stemness und der Alterung eine Rolle spielen könnten.

Zu Beginn der Arbeit wurde mittels Durchflusszytometrie gewährleistet, dass es sich trotz der Stimulation der hMSC mit den erwähnten Morphogenen noch um mesenchymale Stammzellen handelte, die charakteristische mesenchymale Oberflächenmarker exprimierten und deren klonogene Kapazität erhalten blieb. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Supplementierung mit 1,25D<sub>3</sub> zelluläre Alterungsprozesse in hMSC fördert, da aus der Literatur dahingehende Hinweise vorlagen (s. 3.3.3). 1,25D<sub>3</sub> wird schon lange in der Osteoporose-Therapie eingesetzt und spielt eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung des Skeletts. Vor diesem Hintergrund schien es daher von Interesse, die 1,25D<sub>3</sub> Einflüsse auf hMSC zu untersuchen. Durch die permanente Supplementierung mit 1,25D<sub>3</sub> veränderten die hMSC ihren Phänotyp dramatisch. Dass die 1,25D<sub>3</sub> induzierten morphologischen Veränderungen und die antiproliferative bzw. proliferationsinhibierende 1,25D<sub>3</sub> Wirkung nicht in Zusammenhang mit Seneszenz oder verstärkter Differenzierung zu sehen sind, wurde mittels weiterer Untersuchungen bestätigt. Dabei wurde eine signifikante, reduzierte Expression des Seneszenz-Markers *P16* und der SA- $\beta$ -Gal Aktivität in den 1,25D<sub>3</sub> stimulierten hMSC festgestellt, einhergehend mit nahezu unveränderter Expression der übrigen Seneszenz-assoziierten Markergene und verglichen mit den unstimulierten Kontroll-hMSC. Verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen scheint 1,25D<sub>3</sub> die hMSC in einen quieszenten Zustand zu versetzen und dadurch eine schützende Wirkung im Laufe einer Langzeit Kultivierung zu haben. Somit wird offenkundig, dass die permanente Supplementierung der hMSC mit 1,25D<sub>3</sub> die replikative Seneszenzentwicklung verzögert und gleichzeitig die multipotenten Eigenschaften dieser Zellen erhält. Darüber hinaus übernimmt 1,25D<sub>3</sub> eine vor Alterungsprozessen schützende Aufgabe in der Zellkultur. Durch eine rh AA und rh MSTN Stimulation blieben basale Zellfunktionen wie Proliferation oder Apoptose in hMSC nahezu unbeeinflusst. Im Gegensatz zu rh MSTN erwies sich rh AA in Bezug auf die Differenzierungskapazität der hMSC als äußerst wirksames Morphogen, das während des adipogenen und des osteogenen Differenzierungsprozesses die Bildung von Lipidtropfen und Kalziumhydrogencarbonat signifikant hemmte bzw. fast vollständig blockierte. Bezogen auf diese Ergebnisse scheint AA in der Lage zu sein, die hMSC in einem proliferativen, undifferenzierten Zustand der Reprogrammierung und der Selbsterneuerung festzuhalten und im Zusammenspiel mit Inhibitoren wie z.B. Follistatin modulierend auf die Zellen einzuwirken. Durch die Verwendung reduzierter Sauerstoffbedingungen erfolgte eine Annäherung an die *in vivo* Gegebenheiten und dementsprechend zeigten LO kultivierte hMSC im Vergleich zu HO expandierten hMSC höhere KPDs in Kombination mit einer verlängerten Zellwachstumsrate. Verglichen mit den HO

## DISKUSSION

kultivierten hMSC war der Seneszenz-assoziierte Marker *PSG1* geringer exprimiert und die P16 Proteinexpression war in der letzten, seneszenten Passage kaum nachweisbar, gleichzeitig stieg die *OCT4* Expression auf mRNA-Ebene an. *PSG5* wurde gegenläufig zu *PSG1* exprimiert und kommt somit möglicherweise als frühes Seneszenz-assoziierte Gen als Kandidat für die Qualitätskontrolle in Betracht. In der Summe dieser Ergebnisse zeigten LO kultivierte hMSC verglichen mit den Kontrollzellen ein höheres proliferatives Potential bei gleichzeitiger Einschränkung der Differenzierungsfähigkeit, geringere Seneszenzanzeichen und insgesamt eine geringere Belastung der hMSC im Verlauf der Langzeitkultivierung. Dadurch werden die hMSC durch die Expandierung unter reduzierten Sauerstoffbedingungen in einem proliferativen Zustand bzw. in einem Zustand der Selbsterneuerung eingefangen und vor Differenzierung geschützt. Die Interpretation dieser Daten impliziert, dass Sauerstoffkonzentrationen als zentraler Faktor regulierend auf das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerungskapazität und Differenzierung von hMSC wirken und passt zu der Vorstellung der Stammzellnische, bei der Stammzellen zusammen mit anderen Zellarten im Knochenmark in einem einzigartigen Mikromilieu lokalisiert sind. Niedrige Sauerstoffbedingungen sind charakteristisch für das Mikromilieu und tragen zur Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungspotentials sowie zur Verhinderung der Differenzierung von Stammzellen bei.

Humane mesenchymale Stammzellen verfügen aufgrund ihrer Multipotenz und ihrer ethischen Unbedenklichkeit über ein einzigartiges Potential für zellbasierte Therapieansätze im Rahmen zahlreicher Erkrankungen. Eine weitere Besonderheit liegt in der patientenspezifischen Verwendung dieser Zellen, wodurch Abstoßungsreaktionen vermieden werden können. Vor der Anwendung im Patienten ist zunächst eine Expandierung der hMSC in der Kultur notwendig. Da hMSC im Laufe einer *in vitro* Kultivierung Alterungsprozesse durchlaufen, ist es vorteilhaft, Werkzeuge zur Verfügung zu haben, die dazu beitragen, das multipotente Potential und den Stammzell-Phänotyp zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen mit den Morphogenen 1,25D3, rh AA und LO derartige Werkzeuge zu finden, die in der Lage sind, in hMSC alterungsfördernde Prozesse zu verzögern, Differenzierung zu verhindern und die Zellen in einem proliferativen, undifferenzierten Zustand der Selbsterneuerung festzuhalten. Inwieweit diese Erkenntnisse in die SOP, die Standard Operating Procedures, für Tissue Engineering einfließen sollten bleibt im Sinne der Qualitätskontrolle beim klinischen Einsatz für verschiedene Therapiestrategien zu testen, die hier erzielten Ergebnisse legen dies nahe.

## 8 | LITERATURVERZEICHNIS

Abe E, Kuwahara K, Yoshida M, Suzuki M, Terasaki H, Matsuo Y, Takahashi EI, Sakaguchi N. 2000a. Structure, expression, and chromosomal localization of the human gene encoding a germinal center-associated nuclear protein (GANP) that associates with MCM3 involved in the initiation of DNA replication. *Gene* 255: 219-227.

Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC. 2000b. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 15: 663-673.

Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318: 533-538.

Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML. 2005. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 25: 4946-4955.

Arnold LL, Doherty TM, Flor AW, Simon JA, Chou JY, Chan WY, Mansfield BC. 1999. Pregnancy-specific glycoprotein gene expression in recurrent aborters: a potential correlation to interleukin-10 expression. *Am J Reprod Immunol* 41: 174-182.

Artaza JN, Bhasin S, Magee TR, Reisz-Porszasz S, Shen R, Groome NP, Meerasahib MF, Gonzalez-Cadavid NF. 2005. Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology* 146: 3547-3557.

Aubert G, Lansdorp PM. 2008. Telomeres and aging. *Physiol Rev* 88: 557-579.

Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW. 1988. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3294-3298.

Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2: e216.

Banwell CM, Singh R, Stewart PM, Uskokovic MR, Campbell MJ. 2003. Antiproliferative signalling by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in prostate and breast cancer is suppressed by a mechanism involving histone deacetylation. *Recent Results Cancer Res* 164: 83-98.

Barry FP, Murphy JM. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 568-584.

Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A. 2011. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol* 12: 12.

Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC, Hayek A. 2005. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 23: 489-495.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Beenken A, Mohammadi M. 2009. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8: 235-253.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.
- Bonewald LF. 2011. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-238.
- Boyce BF, Xing L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1: S1.
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346: 1513-1521.
- 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: 199-205.
- Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, Suda T, DeLuca HF. 1998. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1387-1391.
- Bringold F, Serrano M. 2000. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35: 317-329.
- Brunet A, et al. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303: 2011-2015.
- Butler CM, Gold EJ, Risbridger GP. 2005. Should activin betaC be more than a fading snapshot in the activin/TGFbeta family album? *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 377-385.
- Butt AJ, Dickson KA, McDougall F, Baxter RC. 2003. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 278: 29676-29685.
- Cadenas E, Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29: 222-230.
- Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. 2007. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* 32: 103-110.
- Campisi J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11: S27-31.
- . 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522.
- Canalis E, Brunet LJ, Parker K, Zanotti S. 2012. Conditional inactivation of noggin in the postnatal skeleton causes osteopenia. *Endocrinology* 153: 1616-1626.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650.
- . 2005. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11: 1198-1211.
- Cassar L, Li H, Pinto AR, Nicholls C, Bayne S, Liu JP. 2008. Bone morphogenetic protein-7 inhibits telomerase activity, telomere maintenance, and cervical tumor growth. *Cancer Res* 68: 9157-9166.
- Chaffer CL, Dopheide B, Savagner P, Thompson EW, Williams ED. 2007. Aberrant fibroblast growth factor receptor signaling in bladder and other cancers. *Differentiation* 75: 831-842.
- Chan KK, Zhang J, Chia NY, Chan YS, Sim HS, Tan KS, Oh SK, Ng HH, Choo AB. 2009. KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27: 2114-2125.
- Chao W, Shen Y, Li L, Rosenzweig A. 2002. Importance of FADD signaling in serum deprivation- and hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 277: 31639-31645.
- Chen S, Law CS, Gardner DG. 2010. Vitamin D-dependent suppression of endothelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through inhibition of CDK2 activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118: 135-141.
- Chen W, Woodruff TK, Mayo KE. 2000. Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins. *Endocrinology* 141: 1263-1272.
- Chen X, Liang H, Van Remmen H, Vijg J, Richardson A. 2004. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 422: 197-210.
- Chen YG, Lui HM, Lin SL, Lee JM, Ying SY. 2002. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 75-87.
- Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY. 2006. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 534-544.
- Cheung CL, et al. 2009. Pre-B-cell leukemia homeobox 1 (PBX1) shows functional and possible genetic association with bone mineral density variation. *Hum Mol Genet* 18: 679-687.
- Chkhotua AB, Gabusi E, Altimari A, D'Errico A, Yakubovich M, Vienken J, Stefoni S, Chieco P, Yussim A, Grigioni WF. 2003. Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy. *Am J Kidney Dis* 41: 1303-1313.
- Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. 2001. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 81: 685-696.
- Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. 2003. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88: 695-705.
- Christakos S, et al. 2007. Vitamin D: molecular mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 340-348.
- Classon M, Harlow E. 2002. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 910-917.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Clement MV, Pervaiz S. 1999. Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis. *Free Radic Res* 30: 247-252.
- Collins S, Groudine M. 1982. Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* 298: 679-681.
- Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA. 2004. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol* 269: 55-69.
- Conover CA. 2008. Insulin-like growth factor-binding proteins and bone metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E10-14.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17: 1195-1214.
- Coss D, Mellon PL, Thackray VG. 2010. A FoxL in the Smad house: activin regulation of FSH. *Trends Endocrinol Metab* 21: 562-568.
- Coutu DL, Francois M, Galipeau J. 2011. Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells. *Blood* 117: 6801-6812.
- Cranney A, et al. 2007. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*: 1-235.
- Cristofalo VJ, Allen RG, Pignolo RJ, Martin BG, Beck JC. 1998. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10614-10619.
- Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. 2004. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev* 125: 827-848.
- Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. 2011. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124: 991-998.
- Cui H, Kong Y, Zhang H. 2012. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct* 2012: 646354.
- Cummings SR, et al. 2009. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 361: 756-765.
- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. 2006. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone* 39: 513-522.
- Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 233-247.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7824-7827.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM. 2001. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* 27: 84-88.
- Dang CV. 1999. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19: 1-11.
- Danila DC, Inder WJ, Zhang X, Alexander JM, Swearingen B, Hedley-Whyte ET, Klibanski A. 2000. Activin effects on neoplastic proliferation of human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1009-1015.
- Dardenne O, Prud'homme J, Glorieux FH, St-Arnaud R. 2004. Rescue of the phenotype of CYP27B1 (1 $\alpha$ -hydroxylase)-deficient mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90: 327-330.
- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. 2005. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8: 739-750.
- Deng B, Wen J, Ding Y, Peng J, Jiang S. 2012. Different regulation role of myostatin in differentiating pig ADSCs and MSCs into adipocytes. *Cell Biochem Funct* 30: 145-150.
- Devlin RD, Du Z, Buccilli V, Jorgetti V, Canalis E. 2002. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor binding protein-5 display transiently decreased osteoblastic function and osteopenia. *Endocrinology* 143: 3955-3962.
- Derynck R, Miyazono K. 2008. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$ -family. In *The TGF- $\beta$* : Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Press. 29-43.
- DiGirolamo DJ, Mukherjee A, Fulzele K, Gan Y, Cao X, Frank SJ, Clemens TL. 2007. Mode of growth hormone action in osteoblasts. *J Biol Chem* 282: 31666-31674.
- Dimri GP, 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: 9363-9367.
- Djouad F, Jackson WM, Bobick BE, Janjanin S, Song Y, Huang GT, Tuan RS. 2010. Activin A expression regulates multipotency of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* 1: 11.
- Dolter KE, Palyash JC, Shao LE, Yu J. 1998. Analysis of activin A gene expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 70: 8-21.
- Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. 2007. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448: 445-451.
- Dreier R, Gunther BK, Mainz T, Nemere I, Bruckner P. 2008. Terminal differentiation of chick embryo chondrocytes requires shedding of a cell surface protein that binds 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Biol Chem* 283: 1104-1112.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747-754.



## LITERATURVERZEICHNIS

Duque G, El Abdaimi K, Henderson JE, Lomri A, Kremer R. 2004. Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways. *Bone* 35: 57-64.

Eames BF, de la Fuente L, Helms JA. 2003. Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69: 93-101.

Ebert R, Schutze N, Adamski J, Jakob F. 2006. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 248: 149-159.

Eijken M, et al. 2007. The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *FASEB J* 21: 2949-2960.

Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT. 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24: 367-380.

Elkasrawy M, Fulzele S, Bowser M, Wenger K, Hamrick M. 2011. Myostatin (GDF-8) inhibits chondrogenesis and chondrocyte proliferation in vitro by suppressing Sox-9 expression. *Growth Factors* 29: 253-262.

Endoh M, Kobayashi Y, Yamakami Y, Yonekura R, Fujii M, Ayusawa D. 2009. Coordinate expression of the human pregnancy-specific glycoprotein gene family during induced and replicative senescence. *Biogerontology* 10: 213-221.

Eswarakumar VP, Monsonogo-Ornan E, Pines M, Antonopoulou I, Morriss-Kay GM, Lonai P. 2002. The *Il1c* alternative of *Fgfr2* is a positive regulator of bone formation. *Development* 129: 3783-3793.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567: 1-61.

Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Gully C, Gassner R, Lepperdinger G. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6: 745-757.

Feng XH, Derynck R. 2005. Specificity and versatility in *tgf-beta* signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693.

Feng Y, Sun Y, Jia W, Zhang C. 2010. Platelet-rich plasma and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 32: 635-642.

Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14: 2015-2027.

Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B. 2003. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17: 1115-1129.

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235: 176-190.

Frasca D, Blomberg BB. 2011. Aging affects human B cell responses. *J Clin Immunol* 31: 430-435.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y. 2010. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol* 224: 305-310.
- Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. 2006. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 98: 538-554.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116: 769-778.
- Fujita K, Janz S. 2007. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 6: 71.
- Fulzele K, et al. 2010. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 142: 309-319.
- Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N. 2002. FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 277: 26729-26732.
- Gaddy-Kurten D, Coker JK, Abe E, Jilka RL, Manolagas SC. 2002. Inhibin suppresses and activin stimulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Endocrinology* 143: 74-83.
- Gajewska M, Gajkowska B, Motyl T. 2005. Apoptosis and autophagy induced by TGF-B1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 3: 143-157.
- Gamer LW, Cox K, Carlo JM, Rosen V. 2009. Overexpression of BMP3 in the developing skeleton alters endochondral bone formation resulting in spontaneous rib fractures. *Dev Dyn* 238: 2374-2381.
- Gazzerro E, Gangji V, Canalis E. 1998. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 102: 2106-2114.
- Gazzerro E, Du Z, Devlin RD, Rydziel S, Priest L, Economides AN, Canalis E. 2003. Noggin arrests stromal cell differentiation in vitro. *Bone* 32: 111-119.
- Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. 2008. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29: 535-559.
- Glass DA, 2nd, et al. 2005. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8: 751-764.
- Goltzman D. 2008. Studies on the mechanisms of the skeletal anabolic action of endogenous and exogenous parathyroid hormone. *Arch Biochem Biophys* 473: 218-224.
- Gong Y, et al. 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107: 513-523.
- Gonzalez-Pardo V, Martin D, Gutkind JS, Verstuyf A, Bouillon R, de Boland AR, Boland RL. 2010. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its TX527 analog inhibit the growth of endothelial cells transformed by Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor in vitro and in vivo. *Endocrinology* 151: 23-31.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Govoni KE, Baylink DJ, Mohan S. 2005. The multi-functional role of insulin-like growth factor binding proteins in bone. *Pediatr Nephrol* 20: 261-268.
- Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 653-699.
- Grant JL, Smith B. 1963. Bone marrow gas tensions, bone marrow blood flow, and erythropoiesis in man. *Ann Intern Med* 58: 801-809.
- Gray AM, Mason AJ. 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247: 1328-1330.
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 948-953.
- Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. 2006. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 207: 331-339.
- Greenwald J, Vega ME, Allendorph GP, Fischer WH, Vale W, Choe S. 2004. A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Mol Cell* 15: 485-489.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
- Grose R, Dickson C. 2005. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 179-186.
- Guo J, et al. 2010. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metab* 11: 161-171.
- Guo W, Flanagan J, Jasuja R, Kirkland J, Jiang L, Bhasin S. 2008. The effects of myostatin on adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells are mediated through cross-communication between Smad3 and Wnt/beta-catenin signaling pathways. *J Biol Chem* 283: 9136-9145.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. 1999. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5: 1164-1170.
- Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91: 14S-22S.
- Hamrick MW, Pennington C, Byron CD. 2003. Bone architecture and disc degeneration in the lumbar spine of mice lacking GDF-8 (myostatin). *J Orthop Res* 21: 1025-1032.
- Hamrick MW, Shi X, Zhang W, Pennington C, Thakore H, Haque M, Kang B, Isales CM, Fulzele S, Wenger KH. 2007. Loss of myostatin (GDF8) function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading. *Bone* 40: 1544-1553.
- Hamrick MW, et al. 2006. Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone* 39: 845-853.

## LITERATURVERZEICHNIS

Hannan NR, Jamshidi P, Pera MF, Wolvetang EJ. 2009. BMP-11 and myostatin support undifferentiated growth of human embryonic stem cells in feeder-free cultures. *Cloning Stem Cells* 11: 427-435.

Hansen CM, Hansen D, Holm PK, Binderup L. 2001. Vitamin D compounds exert anti-apoptotic effects in human osteosarcoma cells in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77: 1-11.

Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.

—. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20: 145-147.

Hashimoto M, Shoda A, Inoue S, Yamada R, Kondo T, Sakurai T, Ueno N, Muramatsu M. 1992. Functional regulation of osteoblastic cells by the interaction of activin-A with follistatin. *J Biol Chem* 267: 4999-5004.

Hayflick L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.

—. 1976. The cell biology of human aging. *N Engl J Med* 295: 1302-1308.

Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.

Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM. 2003. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* 17: 1144-1154.

Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, Qiu Y. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 277: 40735-40741.

Hirai S, Yamanaka M, Kawachi H, Matsui T, Yano H. 2005. Activin A inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Mol Cell Endocrinol* 232: 21-26.

Hirai S, Matsumoto H, Hino N, Kawachi H, Matsui T, Yano H. 2007. Myostatin inhibits differentiation of bovine preadipocyte. *Domest Anim Endocrinol* 32: 1-14.

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.

Hojo H, Ohba S, Yano F, Chung UI. 2010. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *J Bone Miner Metab* 28: 489-502.

Holick MF. 2011. Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Curr Drug Targets* 12: 4-18.

Holzappel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Noth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Huttmacher DW. 2012. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev*.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Muller I. 2010. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol* 11: 11.
- Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ. 2000. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: B5-9.
- Huminiiecki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin CH. 2009. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol* 9: 28.
- Hung SP, Ho JH, Shih YR, Lo T, Lee OK. 2012. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 30: 260-266.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20: 761-787.
- Iida H, Suzuki M, Goitsuka R, Ueno H. 2012. Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *Int J Oncol* 40: 71-79.
- Ikenoue T, Jingushi S, Urabe K, Okazaki K, Iwamoto Y. 1999. Inhibitory effects of activin-A on osteoblast differentiation during cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Biochem* 75: 206-214.
- Iyer NV, Leung SW, Semenza GL. 1998. The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics* 52: 159-165.
- Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, Bunnell BA. 2008. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68: 4229-4238.
- Jakob F, Gieseler F, Tresch A, Hammer S, Seufert J, Schneider D. 1992. Kinetics of nuclear translocation and turnover of the vitamin D receptor in human HL60 leukemia cells and peripheral blood lymphocytes--coincident rise of DNA-relaxing activity in nuclear extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42: 11-16.
- Jakob F, Seufert J, Sarrazin C, Schneider D, Kohrle J, Tony HP. 1994. Topoisomerase I-inhibition enhances vitamin D-responsive expression of the receptor for lipopolysaccharide binding protein CD 14. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 531-539.
- Jakob F, Ebert R, Rudert M, Noth U, Walles H, Docheva D, Schieker M, Meinel L, Groll J. 2012a. In situ guided tissue regeneration in musculoskeletal diseases and aging : Implementing pathology into tailored tissue engineering strategies. *Cell Tissue Res* 347: 725-735.
- Jakob F, et al. 2012b. Effects of teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis pre-treated with bisphosphonates: 36-month results from the European Forsteo Observational Study. *Eur J Endocrinol* 166: 87-97.
- Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443: 421-426.
- Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. 2001. Inhibitory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Mol Endocrinol* 15: 1370-1380.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Jeong M, et al. 2009. Thioredoxin-interacting protein regulates hematopoietic stem cell quiescence and mobilization under stress conditions. *J Immunol* 183: 2495-2505.
- Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L. 1999. Molecular biology of aging. *Cell* 96: 291-302.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238: 265-272.
- Jones G. 2007. Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin Dial* 20: 316-324.
- Joulia-Ekaza D, Cabello G. 2007. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr Opin Pharmacol* 7: 310-315.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscléd Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 7: 910-916.
- Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, Lucas DJ, Mochida Y, Yamauchi M, Kronenberg HM, Feng JQ, Mishina Y. 2008. Disruption of BMP signaling in osteoblasts through type IA receptor (BMPRIA) increases bone mass. *J Bone Miner Res* 23: 2007-2017.
- Katik I, Mackenzie-Kludas C, Nicholls C, Jiang FX, Zhou S, Li H, Liu JP. 2009. Activin inhibits telomerase activity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 668-672.
- Katoh M. 2009. FGFR2 abnormalities underlie a spectrum of bone, skin, and cancer pathologies. *J Invest Dermatol* 129: 1861-1867.
- Kawa S, Yoshizawa K, Nikaido T, Kiyosawa K. 2005. Inhibitory effect of 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3, maxacalcitol, on the proliferation of pancreatic cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 173-177.
- Kawakami A, et al. 1998. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 46-51.
- Keisala T, Minasyan A, Lou YR, Zou J, Kalueff AV, Pyykko I, Tuohimaa P. 2009. Premature aging in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 115: 91-97.
- Kellum E, Starr H, Aronleut P, Immel D, Fulzele S, Wenger K, Hamrick MW. 2009. Myostatin (GDF-8) deficiency increases fracture callus size, Sox-5 expression, and callus bone volume. *Bone* 44: 17-23.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301.
- Khan WN, Teglund S, Bremer K, Hammarstrom S. 1992. The pregnancy-specific glycoprotein family of the immunoglobulin superfamily: identification of new members and estimation of family size. *Genomics* 12: 780-787.
- Khanal RC, Nemere I. 2007. The ERp57/GRp58/1,25D3-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. *Curr Med Chem* 14: 1087-1093.
- Khosla S. 2001. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5055.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Kiefer MC, Schmid C, Waldvogel M, Schlapfer I, Futo E, Masiarz FR, Green K, Barr PJ, Zapf J. 1992. Characterization of recombinant human insulin-like growth factor binding proteins 4, 5, and 6 produced in yeast. *J Biol Chem* 267: 12692-12699.
- Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL, Baile CA. 2001. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 902-906.
- Kirkwood TB. 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell* 120: 437-447.
- Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, Morishita Y, Komuro A, Kano MR, Sugimoto K, Miyazono K. 2009. Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 69: 8844-8852.
- Klotz B, Mentrup B, Regensburger M, Zeck S, Schneidereit J, Schupp N, Linden C, Merz C, Ebert R, Jakob F. 2012. 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment delays cellular aging in human mesenchymal stem cells while maintaining their multipotent capacity. *PLoS One* 7: e29959.
- Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. 2005. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 11: 880-885.
- Kohrle J, Jakob F, Contempre B, Dumont JE. 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev* 26: 944-984.
- Kollias HD, McDermott JC. 2008. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104: 579-587.
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114: 1299-1307.
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. 2006. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 116: 1202-1209.
- Kujoth GC, et al. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-484.
- Kuro-o M, et al. 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45-51.
- Kurosu H, et al. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 309: 1829-1833.
- Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 277: 49831-49840.
- Lapointe J, Hekimi S. 2010. When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67: 1-8.
- Lavrik IN, Krammer PH. 2012. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ* 19: 36-41.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5: 227-231.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, 2nd, Greider CW, DePinho RA. 1998. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392: 569-574.
- Lee JY, Hopkinson NS, Kemp PR. 2011. Myostatin induces autophagy in skeletal muscle in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 415: 632-636.
- Lee SJ. 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 61-86.
- . 2007. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* 2: e789.
- . 2008. Genetic analysis of the role of proteolysis in the activation of latent myostatin. *PLoS One* 3: e1628.
- Lee SJ, McPherron AC. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9306-9311.
- Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, Soleimani A, Matzuk MM, Tsuchida K, Cohn RD, Barton ER. 2010. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol* 24: 1998-2008.
- Lei H, et al. 2011. Inhibition of adipogenic differentiation by myostatin is alleviated by arginine supplementation in porcine-muscle-derived mesenchymal stem cells. *Sci China Life Sci* 54: 908-916.
- Levin ER. 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19: 1951-1959.
- Li A, Blow JJ. 2001. The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol* 3: E182-184.
- Li H, Pinto AR, Duan W, Li J, Toh BH, Liu JP. 2005. Telomerase down-regulation does not mediate PC12 pheochromocytoma cell differentiation induced by NGF, but requires MAP kinase signalling. *J Neurochem* 95: 891-901.
- Li J. 2011. Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Exp Hematol* 39: 511-520.
- Lin J, Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA. 2002. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 701-706.
- Lindl T. 2002. Zell- und Gewebekultur. *Spektrum*:110-112.
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. 2009a. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238: 209-214.
- Liu PT, et al. 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311: 1770-1773.
- Liu X, Jiang N, Hughes B, Bigras E, Shoubridge E, Hekimi S. 2005. Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev* 19: 2424-2434.
- Liu Y, et al. 2009b. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4: 37-48.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Liu Z, Lavine KJ, Hung IH, Ornitz DM. 2007. FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Dev Biol* 302: 80-91.
- Long F. 2012. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 27-38.
- Lotinun S, et al. 2010. A soluble activin receptor Type IIA fusion protein (ACE-011) increases bone mass via a dual anabolic-antiresorptive effect in Cynomolgus monkeys. *Bone* 46: 1082-1088.
- MacDonald BT, Tamai K, He X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17: 9-26.
- Mason AJ, Farnworth PG, Sullivan J. 1996. Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Mol Endocrinol* 10: 1055-1065.
- Massague J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell* 134: 215-230.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19: 2783-2810.
- Masui S, et al. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9: 625-635.
- Matzuk MM, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A. 1995. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 374: 360-363.
- Mawer EB, Hayes ME, Heys SE, Davies M, White A, Stewart MF, Smith GN. 1994. Constitutive synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by a human small cell lung cancer cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 554-560.
- Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. 2009. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30: 2-10.
- McCarthy SA, Bicknell R. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. *J Biol Chem* 268: 23066-23071.
- McFarlane C, et al. 2011. Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C195-203.
- McPherron AC, Lee SJ. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12457-12461.
- . 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* 109: 595-601.
- Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. 2004. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 65: 510-520.
- Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, Halloran KM, Grimm P, Schmidt BM, Halloran PF. 2003. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int* 63: 2134-2143.

## LITERATURVERZEICHNIS

Memisoglu A, Samson L. 2000a. Contribution of base excision repair, nucleotide excision repair, and DNA recombination to alkylation resistance of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 182: 2104-2112.

—. 2000b. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res* 451: 39-51.

Messaoudi I, Estep R, Robinson B, Wong SW. 2011. Nonhuman primate models of human immunology. *Antioxid Redox Signal* 14: 261-273.

Mirams M, Robinson BG, Mason RS, Nelson AE. 2004. Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate? *Bone* 35: 1192-1199.

Miyakoshi N, Richman C, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. 2001. Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J Clin Invest* 107: 73-81.

Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser U, Dony C, Lang K, Baylink DJ. 1995. Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* 270: 20424-20431.

Montero A, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, Doetschman T, Coffin JD, Hurley MM. 2000. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest* 105: 1085-1093.

Mosimann C, Hausmann G, Basler K. 2009. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 276-286.

Mukherjee A, Rotwein P. 2007. Insulin-like growth factor binding protein-5 in osteogenesis: facilitator or inhibitor? *Growth Horm IGF Res* 17: 179-185.

Muller M. 2009. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 11: 59-98.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. 2000. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 768-775.

Neer RM, et al. 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344: 1434-1441.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95: 379-391.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-376.

Nordberg J, Arner ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31: 1287-1312.

Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20: 1060-1069.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Oda S, Nishimatsu S, Murakami K, Ueno N. 1995. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 581-588.
- Ogawa Y, et al. 1992. Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation. *J Biol Chem* 267: 14233-14237.
- Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, Takada S. 2002. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 16: 870-879.
- Ohga E, Matsuse T, Teramoto S, Katayama H, Nagase T, Fukuchi Y, Ouchi Y. 1996. Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 391-396.
- Ohnishi M, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS. 2009. Reversal of mineral ion homeostasis and soft-tissue calcification of *klotho* knockout mice by deletion of vitamin D 1alpha-hydroxylase. *Kidney Int* 75: 1166-1172.
- Omdahl JL, Morris HA, May BK. 2002. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 22: 139-166.
- Ornitz DM, Itoh N. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: REVIEWS3005.
- Ornitz DM, Marie PJ. 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16: 1446-1465.
- Orr WC, Sohal RS. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-1130.
- Ota F, Maeshima A, Yamashita S, Ikeuchi H, Kaneko Y, Kuroiwa T, Hiromura K, Ueki K, Kojima I, Nojima Y. 2003. Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2442-2449.
- Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT. 2009. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med* 51: 25-41.
- Parsch D, Fellenberg J, Brummendorf TH, Eschlbeck AM, Richter W. 2004. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med (Berl)* 82: 49-55.
- Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, Dalla-Favera R. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412: 341-346.
- Patel JH, Loboda AP, Showe MK, Showe LC, McMahon SB. 2004. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 4: 562-568.
- Pearsall RS, et al. 2008. A soluble activin type IIA receptor induces bone formation and improves skeletal integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7082-7087.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Pearson M, et al. 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406: 207-210.
- Pendas-Franco N, et al. 2008. DICKKOPF-4 is induced by TCF/beta-catenin and upregulated in human colon cancer, promotes tumour cell invasion and angiogenesis and is repressed by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Oncogene* 27: 4467-4477.
- Perez VI, Van Remmen H, Bokov A, Epstein CJ, Vijg J, Richardson A. 2009. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 8: 73-75.
- Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, Sorrentino V. 2011. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev* 20: 915-923.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Qiu Y, et al. 2010. Expression level of Pre B cell leukemia homeobox 2 correlates with poor prognosis of gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 36: 651-663.
- Raabe EH, Abdurrahman L, Behbehani G, Arceci RJ. 2001. An SNF2 factor involved in mammalian development and cellular proliferation. *Dev Dyn* 221: 92-105.
- Radermacher J, Diesel B, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J, Fischer U, Meese E. 2006. Expression analysis of CYP27B1 in tumor biopsies and cell cultures. *Anticancer Res* 26: 2683-2686.
- Rainer J, Sanchez-Cabo F, Stocker G, Sturn A, Trajanoski Z. 2006. CARMAweb: comprehensive R- and bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Res* 34: W498-503.
- Raje N, Vallet S. 2010. Sotatercept, a soluble activin receptor type 2A IgG-Fc fusion protein for the treatment of anemia and bone loss. *Curr Opin Mol Ther* 12: 586-597.
- Rawn SM, Cross JC. 2008. The evolution, regulation, and function of placenta-specific genes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 159-181.
- Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. 2012. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer* 130: 1715-1725.
- Razzaque MS, Lanske B. 2006. Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol Med* 12: 298-305.
- Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B. 2006. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J* 20: 720-722.
- Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 7230-7242.
- Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF. 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E876-888.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. 1998. Nongenomic effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Trends Endocrinol Metab* 9: 419-427.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C993-999.
- Romano AD, Serviddio G, de Matthaëis A, Bellanti F, Vendemiale G. 2010. Oxidative stress and aging. *J Nephrol* 23 Suppl 15: S29-36.
- Rosenberg N, Soudry M, Rosenberg O, Blumenfeld I, Blumenfeld Z. 2010. The role of activin A in the human osteoblast cell cycle: a preliminary experimental in vitro study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 118: 708-712.
- Royall JA, Ischiropoulos H. 1993. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: 348-355.
- Sakai R, Miwa K, Eto Y. 1999. Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model. *Bone* 25: 191-196.
- Sakai R, Eto Y, Ohtsuka M, Hirafuji M, Shinoda H. 1993. Activin enhances osteoclast-like cell formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 39-46.
- Sakai R, Fujita S, Horie T, Ohyama T, Miwa K, Maki T, Okimoto N, Nakamura T, Eto Y. 2000. Activin increases bone mass and mechanical strength of lumbar vertebrae in aged ovariectomized rats. *Bone* 27: 91-96.
- Sawant A, Chanda D, Isayeva T, Tsuladze G, Garvey WT, Ponnazhagan S. 2012. Noggin Is Novel Inducer of Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis: IMPLICATIONS FOR BONE HEALTH AND OBESITY. *J Biol Chem* 287: 12241-12249.
- Scaglione-Sewell BA, Bissonnette M, Skarosi S, Abraham C, Brasitus TA. 2000. A vitamin D<sub>3</sub> analog induces a G<sub>1</sub>-phase arrest in CaCo-2 cells by inhibiting cdk2 and cdk6: roles of cyclin E, p21Waf1, and p27Kip1. *Endocrinology* 141: 3931-3939.
- Schilling T, Noth U, Klein-Hitpass L, Jakob F, Schutze N. 2007. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 271: 1-17.
- Schneider MR, Wolf E, Hoeflich A, Lahm H. 2002. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol* 172: 423-440.
- Schneyer A, Sidis Y, Xia Y, Saito S, del Re E, Lin HY, Keutmann H. 2004. Differential actions of follistatin and follistatin-like 3. *Mol Cell Endocrinol* 225: 25-28.
- Schriner SE, et al. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308: 1909-1911.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350: 2682-2688.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Schupp N, Schmid U, Rutkowski P, Lakner U, Kanase N, Heidland A, Stopper H. 2007. Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1427-1434.
- Schutze N, Noth U, Schneidereit J, Hendrich C, Jakob F. 2005. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal* 3: 5.
- Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. 1998. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 391-395.
- Schwartz GG, Eads D, Naczki C, Northrup S, Chen T, Koumenis C. 2008. 19-nor-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D2 (paricalcitol) inhibits the proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 7: 430-436.
- Selleri L, Depew MJ, Jacobs Y, Chanda SK, Tsang KY, Cheah KS, Rubenstein JL, O'Gorman S, Cleary ML. 2001. Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128: 3543-3557.
- Semenza GL. 2001. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107: 1-3.
- Sengle G, Ono RN, Sasaki T, Sakai LY. 2011. Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem* 286: 5087-5099.
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5: 91-116.
- Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA, Nichols G, Khaled Z, Telang NT, Narayanan R. 1995. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12343-12346.
- Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ, Bass JJ. 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol* 180: 1-9.
- Sharpless NE, DePinho RA. 2004. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 113: 160-168.
- Shay JW, Bacchetti S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33: 787-791.
- Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. 2001. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 10: 677-685.
- Shelton GD, Engvall E. 2007. Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. *Neuromuscul Disord* 17: 721-722.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ. 1994. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78: 335-342.
- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T. 2004. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19: 429-435.
- Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T. 1999. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8253-8258.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219.
- Silva I, Branco JC. 2011. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port* 36: 209-218.
- Silver RM, Heyborne KD, Leslie KK. 1993. Pregnancy specific beta 1 glycoprotein (SP-1) in maternal serum and amniotic fluid; pre-eclampsia, small for gestational age fetus and fetal distress. *Placenta* 14: 583-589.
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M. 2002. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20: 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: 444-451.
- Sitara D, Kim S, Razzaque MS, Bergwitz C, Taguchi T, Schuler C, Erben RG, Lanske B. 2008. Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. *PLoS Genet* 4: e1000154.
- Soltanoff CS, Yang S, Chen W, Li YP. 2009. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19: 1-46.
- Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. 1999. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 13: 819-828.
- Spry M, Scott T, Pierce H, D'Orazio JA. 2007. DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Front Biosci* 12: 4191-4207.
- 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: 919-926.
- Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H. 2007. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene* 26: 5564-5576.
- 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: 3-5.
- Sun LQ, Lee DW, Zhang Q, Xiao W, Raabe EH, Meeker A, Miao D, Huso DL, Arceci RJ. 2004. Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev* 18: 1035-1046.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Szabo G, Dallmann G, Muller G, Patthy L, Soller M, Varga L. 1998. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome* 9: 671-672.
- Takada I, et al. 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9: 1273-1285.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Martel-Pelletier J. 2009. New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J Med* 58: 29-40.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. 2004. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 457-475.
- Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, Wolfman NM. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 18: 251-259.
- Toledo F, Wahl GM. 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6: 909-923.
- Trifunovic A, et al. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417-423.
- Tsuchida K, Nakatani M, Uezumi A, Murakami T, Cui X. 2008. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr J* 55: 11-21.
- Tsuchida K, Nakatani M, Hitachi K, Uezumi A, Sunada Y, Ageta H, Inokuchi K. 2009. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun Signal* 7: 15.
- Tuohimaa P. 2008. Vitamin D, aging, and cancer. *Nutr Rev* 66: S147-152.
- Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. 1994. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 15: 275-300.
- Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. 2006. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444: 770-774.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899.
- Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. 2008. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473: 132-138.
- Valenzuela DM, et al. 1995. Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15: 6077-6084.
- Vallier L, et al. 2009. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 136: 1339-1349.



## LITERATURVERZEICHNIS

- Valverde-Franco G, Liu H, Davidson D, Chai S, Valderrama-Carvajal H, Goltzman D, Ornitz DM, Henderson JE. 2004. Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3<sup>-/-</sup> mice. *Hum Mol Genet* 13: 271-284.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S. 2009. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5: e1000361.
- Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. 2007. CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4514-4521.
- Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. 2008. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int* 19: 1517-1525.
- Verrecchia F, Mauviel A. 2007. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 13: 3056-3062.
- Vousden KH, Lane DP. 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 275-283.
- Wade M, Wahl GM. 2006. c-Myc, genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details. *Curr Top Microbiol Immunol* 302: 169-203.
- Wagner KR, et al. 2008a. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 63: 561-571.
- Wagner W, Ho AD, Zenke M. 2010a. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 16: 445-453.
- Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Jousseen S, Ma N, Strunk D, Koch C. 2010b. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging (Albany NY)* 2: 224-230.
- Wagner W, et al. 2008b. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3: e2213.
- Wan DC, Pomerantz JH, Brunet LJ, Kim JB, Chou YF, Wu BM, Harland R, Blau HM, Longaker MT. 2007. Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *J Biol Chem* 282: 26450-26459.
- Wan M, Yang C, Li J, Wu X, Yuan H, Ma H, He X, Nie S, Chang C, Cao X. 2008. Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev* 22: 2968-2979.
- Watabe T, Miyazono K. 2009. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* 19: 103-115.
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. 2009. The aging of the immune system. *Transpl Int* 22: 1041-1050.
- Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S. 2002. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 347: 175-184.
- Willis SA, Zimmerman CM, Li LI, Mathews LS. 1996. Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol Endocrinol* 10: 367-379.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Wink DA, et al. 1996. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul* 34: 159-187.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370: 341-347.
- Wu MY, Hill CS. 2009. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 16: 329-343.
- Wu X, Shi W, Cao X. 2007. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 29-49.
- Wurz H, Geiger W, Kunzig HJ, Jabs-Lehmann A, Bohn H, Luben G. 1981. Radioimmunoassay of SP1 (pregnancy-specific beta1-glycoprotein) in maternal blood and in amniotic fluid normal and pathologic pregnancies. *J Perinat Med* 9: 67-78.
- Yamato K, Koseki T, Ohguchi M, Kizaki M, Ikeda Y, Nishihara T. 1997. Activin A induction of cell-cycle arrest involves modulation of cyclin D2 and p21CIP1/WAF1 in plasmacytic cells. *Mol Endocrinol* 11: 1044-1052.
- Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J, Gonzalez-Cadavid NF. 2002. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J Nutr Health Aging* 6: 343-348.
- Yu J, et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
- Yu K, Xu J, Liu Z, Susic D, Shao J, Olson EN, Towler DA, Ornitz DM. 2003. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development* 130: 3063-3074.
- Zachar V, Thomas RA, Goustin AS. 1993. Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. *Nucleic Acids Res* 21: 2017-2018.
- Zhang Z, Zheng J, Zhao Y, Li G, Batres Y, Luo M, Wan M, Ying S. 1997. Overexpression of activin A inhibits growth, induces apoptosis, and suppresses tumorigenicity in an androgen-sensitive human prostate cancer cell line LNCaP. *Int J Oncol* 11: 727-736.
- Zheng W, Luo MP, Welt C, Lambert-Messerlian G, Sung CJ, Zhang Z, Ying SY, Schneyer AL, Lauchlan SC, Felix JC. 1998. Imbalanced expression of inhibin and activin subunits in primary epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 69: 23-31.
- Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, Glowacki J. 2008. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 7: 335-343.
- Zhou YS, Liu YS, Tan JG. 2006. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin Med J (Engl)* 119: 1278-1286.
- Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL. 2004. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 26: 262-272.

## *LITERATURVERZEICHNIS*

Zhuang SH, Burnstein KL. 1998. Antiproliferative effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer cell line LNCaP involves reduction of cyclin-dependent kinase 2 activity and persistent G1 accumulation. *Endocrinology* 139: 1197-1207.

Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 17: 1146-1149.

## 9 ANHANG

### 9.1 | Abkürzungen

AA	Aktivin A
Abb.	Abbildungen
AP	alkalische Phosphatase
Aqua bidest.	zweifach destilliertes (bidestilliertes) Wasser
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
1,25D3	1,25-Dihydroxyvitamin D3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alia (und andere)
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaar
l	Liter
LO	Low Oxygen
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MLV	Murines Leukämievirus
n	Anzahl
N <sub>2</sub>	Stickstoff
nM	Nanomolar
MSTN	Myostatin
Nr.	Nummer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
P	Passage
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
ph	Pondus hydrogenii
pmol	Picomol

## ANHANG

Px	letzte Passage
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
rpm	rounds per minute
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
U/ $\mu$ l	Units per microliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## 9.2 | Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Knochenremodellierung. ....	S. 6
Abb. 2	Die Rolle von RANK, RANKL und OPG bei der Induktion der Osteoklastogenese. ....	S. 8
Abb. 3	Vitamin D Metabolismus. ....	S. 22
Abb. 4	Ein Aktivin Molekül setzt sich aus jeweils 2 $\beta$ Untereinheiten zusammen. ....	S. 26
Abb. 5	Die intrazelluläre enzymatische Prozessierung des inaktiven Aktivin Vorläufers führt zu einem bioaktiven reifen Aktivin Protein. ....	S. 27
Abb. 6	Aminosäuresequenz des humanen Myostatin Proteins. ....	S. 29
Abb. 7	Phänotyp eines Rindes (A) bzw. eines Neugeborenen (B) mit Myostatin Mutation. ....	S. 30
Abb. 8	Die Signaltransduktion der TGF $\beta$ -Liganden Aktivin und Myostatin über die Aktivin Rezeptoren. ....	S. 33
Abb. 9	Ob die Morphogene 1,25D3, MSTN, AA und LO hMSC vor Stress, frühzeitiger Differenzierung und Seneszenzentwicklung schützen können, wurde in hMSC während der Phase der transient amplifying Zellproliferation und der Zelldifferenzierung (rosa markiert) untersucht. ....	S. 34
Abb. 10	1,25D3 induzierte Änderung der Genexpression in hMSC. ....	S. 65
Abb. 11	Der Immunphänotyp von 1,25D3 behandelten hMSC verglichen mit 1,25D3 unbehandelten hMSC. ....	S. 66
Abb. 12	Die CFU Zahl von 1,25D3 kultivierten hMSC sowie Kontroll-hMSC in P1 und P3. ....	S. 67
Abb. 13	Die Einflüsse von 1,25D3 auf Proliferation und Apoptose von hMSC. ....	S. 68
Abb. 14	Der Einfluss von 1,25D3 auf die kumulative Populationsverdopplung (KPD) von hMSC. ....	S. 70
Abb. 15	Morphologische Charakteristika von 1,25D3 kultivierten hMSC. ....	S. 71
Abb. 16	Die Retransformation von 1,25D3 kultivierten hMSC. ....	S. 72
Abb. 17	Die Quantifizierung der SA- $\beta$ -Gal Aktivität in 1,25D3 behandelten und unbehandelten hMSC. ....	S. 73
Abb. 18	Die durchflusszytometrische Analyse der 1,25D3 induzierten ROS Bildung in hMSC nach P1 und P3. ....	S. 74
Abb. 19	Die Differenzierungsfähigkeit von permanent 1,25D3 supplementierten hMSC im Vergleich zu 1,25D3 unbehandelten hMSC. ....	S. 75
Abb. 20	Die osteogene Differenzierungsfähigkeit von permanent 1,25D3 supplementierten hMSC verglichen mit 1,25D3 unstimulierten hMSC. ....	S. 77
Abb. 21	Der Einfluss der 1,25D3 Kultivierung auf Seneszenz-assoziierte Gene. ....	S. 78
Abb. 22	Der Einfluss der 1,25D3 Kultivierung auf Quieszenz-assoziierte Gene. ....	S. 79
Abb. 23	Der Nachweis der Rezeptoren ACVR2A und ACVR2B in hMSC. ....	S. 80
Abb. 24	Der Immunphänotyp von mit rh AA sowie rh MSTN kultivierten hMSC im Vergleich zu unbehandelten hMSC. ....	S. 82
Abb. 25	Der Einfluss von rh AA und rh MSTN auf die Anzahl der CFUs. ....	S. 83
Abb. 26	Die Expression der adipogenen Markern und die densitometrische Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR Ergebnisse in rh AA bzw. rh MSTN (0,01 $\mu$ g/ml) behandelten hMSC (P1) verglichen mit unbehandelten Kontroll-Zellen (P1). ....	S. 84
Abb. 27	Ölrot O-Färbung (A) sowie Quantifizierung der Ölrot O-Färbung (B) von stimulierten und unstimulierten adipogen differenzierten hMSC. ....	S. 85
Abb. 28	Expressionsniveau osteogener Marker sowie densitometrische Quantifizierung der semi-quantitativen RT-PCR Ergebnisse in rh MSTN bzw. rh AA behandelten hMSC (P1) verglichen mit unbehandelten hMSC (P1). ....	S. 86
Abb. 29	Alizarin Rot S-Färbung (A) sowie Quantifizierung der Alizarin Rot S-Färbung (B) der stimulierten und unstimulierten osteogen differenzierten hMSC. ....	S. 87
Abb. 30	Wirkung von rh AA und rh MSTN auf Proliferation und Apoptose der hMSC. ....	S. 89
Abb. 31	Der Immunphänotyp von LO kultivierten hMSC im Vergleich zu HO kultivierten hMSC. ....	S. 90
Abb. 32	Charakterisierung der Wachstumsrate von hMSC infolge einer LO bzw. HO Langzeit Kultivierung. ....	S. 92

## ANHANG

Abb. 33	Densitometrische Quantifizierung (semi-quantitative RT-PCR) des Genexpressionsmusters ausgewählter Gene abhängig von der LO bzw. der HO Kultivierung.....	S. 93
Abb. 34	Densitometrische Quantifizierung (semi-quantitative RT-PCR) des Genexpressionsmusters ausgewählter Gene, die 2 h, 12 h, 24 h sowie über eine Passage (P1) unter LO bzw. HO Bedingungen inkubiert wurden. ....	S. 95
Abb. 35	Densitometrische Quantifizierung (semi-quantitative RT-PCR) des Expressionsmusters von ausgewählten Genen in P3 und P8 in Abhängigkeit einer LO bzw. HO Kultivierung.....	S. 96
Abb. 36	OCT4 Proteinexpression in LO-hMSC und HO-hMSC (P1). ....	S. 97
Abb. 37	Vergleich der P16 Proteinexpression in LO bzw. HO kultivierten hMSC. ....	S. 98

### 9.3 | Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Liste der verwendeten Geräte sowie deren Hersteller. ....	S. 35
Tab. 2	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien. ....	S. 36
Tab. 3	Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	S. 38
Tab. 4	Liste der verwendeten Kits. ....	S. 38
Tab. 5	Liste der verwendeten Primer für die semi-quantitative RT-PCR.....	S. 40
Tab. 6	Liste der verwendeten rekombinanten humanen Proteine. ....	S. 40
Tab. 7	Liste der verwendeten Antikörper.....	S. 41
Tab. 8	Liste der verwendeten Enzyme.....	S. 41
Tab. 9	Tabelle der verwendeten Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur.....	S. 42
Tab. 10	Tabelle der verwendeten Puffer und Lösungen. ....	S. 44
Tab. 11	Liste der benutzten Software und Internet-Seiten.....	S. 44
Tab. 12	Doppelfärbung der hMSC durch Kombination unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper.....	S. 53
Tab. 13	Bedingungen für die RT-PCR. ....	S. 58
Tab. 14	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	S. 100

## 9.4 | Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

### 9.4.1

---

#### Originalarbeiten

Ebert R, Zeck S, Meissner-Weigl J, Klotz B, Rachner TD, Benad P, Klein-Hitpass L, Rudert M, Hofbauer LC, Jakob F. (2012) Krüppel-like factors KLF2 and 6 and Ki-67 are direct targets of zoledronic acid in MCF-7 cells. *Bone*, 50(3):723-32. Epub 2011 Dec 7.

Klotz B., Mentrup B., Regensburger M., Zeck S., Schneidereit J., Schupp N., Linden C., Merz C., Ebert R., Jakob F. (2012) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Treatment Delays Cellular Aging in Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 7(1):e29959.

### 9.4.2

---

#### Übersichten

Jakob F., Klotz B., Seefried L., Ebert R. (2011) Activin-Antagonisten in der Therapie der Osteoporose. *Osteologie* 20(3): 217-221.

Mentrup B., Ebert R., Walther JN., Klotz B., Jakob F. (2011) Molekularbiologische Aspekte und Signalwege von Vitamin D. *Osteologie* 20(4): 293-298.

Seefried L., Ebert R., Müller-Deubert S., Klotz B., Kober M., Liedert A., Ignatius A., Jakob F. (2010) Mechanotransduktion im Alter und bei Osteoporose. *Osteologie* 19(3): 240-244.

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.

### 9.4.3

---

#### Kongressbeiträge

Klotz B., Ebert R., Benisch P., Mentrup B., Klein-Hitpass L., Jakob F. (2009) Der Einfluss von 1,25 Vitamin D3 auf die Alterung von mesenchymale Stammzellen. *Osteologie* 18, (Suppl. 1), P57

Klotz B., Benisch P., Schneider D., Zeck S., Meissner-Weigl J., Mentrup B., Klein-Hitpass L., Jakob F., Ebert R. (2009) 1,25 Vitamin D3 induces ageing of mesenchymal stem cells. *Bone* 44, Suppl. 2, P110

Klotz B., Klein-Hitpass L., Ebert R., Jakob F. (2010) Mitglieder der TGFβ-Familie und ihr Einfluss auf hMSC. *Osteologie* 19 (Suppl. 1), FV6.1

Klotz B., Regensburger M., Klein-Hitpass L., Ebert R., Jakob F. (2010) Effects of TGFβ-family Members on hMSC. *J. Bone Miner. Res.* 25, Abstracts, SU 0236

Klotz B., Ebert R., Jakob F. (2011) Low-Oxygen-Kultivierung von hMSC verzögert den Eintritt der Seneszenz und moduliert das Expressionsniveau von PSG-Proteinen. *Osteologie* 20 (Suppl. 1), 37.2



## ANHANG

Klotz B., Mentrup B., Ebert R., Jakob F. (2012) 1,25D3 verzögert zelluläre Alterung in humanen mesenchymalen Stammzellen unter Erhaltung der multipotenten Kapazität. *Osteologie* 21 (1), A28.

Klotz B., Mentrup B., Regensburger M., Zeck S., Schneidereit J., Linden C., Schupp N., Ebert R., Jakob F. (2012) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 treatment delays cellular aging in human mesenchymal stem cells while maintaining their multipotent capacity. *Bone* 50 (Suppl. 1), S71.

### 9.5 | Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Orthopädischen Zentrum für Muskuloskeletale Forschung am Lehrstuhl für Orthopädie im König-Ludwig-Krankenhaus der Universität Würzburg durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich all denjenigen ganz herzlich danken, die mich während dieser Zeit begleitet haben und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Jakob für die Überlassung des spannenden Themas und für die zahlreichen sehr hilfreichen Diskussionen und Anregungen. Sehr dankbar bin ich auch, dass Sie mir die Gelegenheit gaben, meine Ergebnisse auf nationalen wie internationalen Kongressen präsentieren zu können und besonders für Ihr Zutrauen in meine Fähigkeiten. Für das Interesse an meiner beruflichen Laufbahn und die Anteilnahme an meiner Entscheidungsfindung möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bei Ihnen bedanken.

Bei Herrn Prof. Krohne von der Fakultät für Biologie bedanke ich mich für die Übernahme des externen Zweitgutachtens meiner Dissertation.

Für die Finanzierung der Promotion bedanke ich mich bei der Bayerischen Forschungsförderung und dem Forschungsverbund FORZEBRA (Forschungsverbund für zellbasierte Regeneration des muskuloskelettalen Systems im Alter), in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde.

Für den Austausch von Methoden und für eine lehrreiche Kooperation danke ich Julia Kohler und PD Dr. Denitsa Docheva (Abteilung Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin, Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München).

Vielen Dank auch an Dr. Christian Linden (Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) und PD Dr. Nicole Schupp (Institut für Toxikologie, Universität Würzburg) für die unkomplizierte Hilfe bei den durchflusszytometrischen Analysen meiner Zellen sowie deren Auswertung.

Zusätzlich bedanke ich mich beim Team von der Pforte und bei den Fahrern vom technischen Betrieb, die dafür sorgten, dass die Zellen und ich für die oben genannten Analysen immer rechtzeitig am Zielort waren.

Für ihre Hilfe in allen organisatorischen Angelegenheiten möchte ich mich bei Monika Hofmann bedanken sowie bei Florian Glaubitt und Stefan Scheder für die Unterstützung in allen EDV-technischen Belangen.

Für die Versorgung mit Patientenmaterial danke ich dem gesamten OP-Personal, allen voran Dr. Lothar Seefried.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Arbeitsgruppen von Prof. Norbert Schütze und PD Dr. André Steinert für ihre Offenheit und ihre Hilfsbereitschaft.

Dem gesamten Laborteam des Osteologiezentrums gilt ein riesengroßes Dankeschön für eine angenehme Arbeitsatmosphäre im Laboralltag und oftmals für einen Grund zum Lachen: Dr. Peggy Benisch, Ulrich Goschenhofer, Stephanie Graser, Dr. Christine Hofmann, Melanie Krug, Jutta Meißner-Weigl, Dr. Birgit Mentrup, Cornelia Merz, Dr. Sigrid Müller-Deubert, Hanna Neer, Anne Pratz, Nadja Raaijmakers, Martina Regensburger, Paul Riekheit, Doris Schneider, Stefanie Stoll, Johannes-Nils Walther, Heike Wecklein und Sabine Zeck. Einen besonderen Dank richte ich an Dr. Regina Ebert für das rasche Korrekturlesen und für die Möglichkeit, jederzeit mit Fragen oder Anliegen vorbeikommen zu können sowie an Dr. Birgit Mentrup für vielfältige Unterstützung und Dr.

## ANHANG

Sigrid Müller-Deubert für den Austausch zwischen WP1 und WP3 und die netten gemeinsamen Fahrten: Würzburg-München bzw. München-Würzburg.

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bei Martina Regensburger für die Mithilfe an verschiedenen Projekten und für ihre Ruhe, die immer dann, wenn es nötig war, auf mich übersprang. Auch Sabine Zeck und Viola Monz danke ich sehr für die Pipettierunterstützung.

Ein spezieller Dank geht an Dr. Peggy Benisch und Dr. Tatjana Schilling für kritische und daher sehr hilfreiche Kommentare und für den Austausch über Labor- aber auch Lebensrelevante Themen.

Mein ganz besonderer Dank gebührt denjenigen, die nicht müde wurden, mich zu ermuntern und für mich da zu sein, allen voran Mathias Weisensee und Beatrice Trînca, sowie Almut Jäck, Maria Klotz, Juliane Melzer, Eva Ruttinger, Daniela Lieb, Daniela Stock und Kathrin Przibylla.

Am Ende möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für das Allerwichtigste bedanken!