

**Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie und dem Orthopädischen Zentrum  
für Muskuloskeletale Forschung der Universität Würzburg**

**Direktor: Prof. Dr. med. M. Rudert**

**Forschungsleitung Prof. Dr. med. F. Jakob**

**Bedeutung hypothetischer Gene bei der Transdifferenzierung humaner mesenchymaler**

**Stammzellen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Ulrike Meyer**

**aus Heilbronn**

**Würzburg, November 2009**

**Referent Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze**

**Koreferent Prof. Dr. med. Franz Jakob**

**Dekan Prof. Dr. med. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung :**

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Degenerative Knochenerkrankungen .....	1
1.2	Osteoporose auf molekularer Ebene.....	1
1.3	Knochenremodelling .....	1
1.4	Stammzellen .....	1
1.4.1	Definition einer Stammzelle .....	1
1.4.1.1	Mesenchymale Stammzellen .....	1
1.4.1.2	Regenerierung und Erhalt der Stammzellen .....	1
1.4.2	Differenzierung von MSCs.....	1
1.4.2.1	Osteogene Differenzierung .....	1
1.4.2.2	Adipogene Differenzierung .....	1
1.4.3	Transdifferenzierung .....	1
1.5	Rolle unbekannter Gene bei der Transdifferenzierung.....	1
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	1
2.	Material und Methoden .....	1
2.1	RNA-Isolation .....	1
2.2	cDNA-Synthese .....	1
2.3	Semiquantitative PCR.....	1
2.3.1	Normalisierung mit EF1 alpha-PCR.....	1
	Etablierung der PCR der hypothetischen Gene mithilfe von spezifischen Primern .....	1
2.4	Densitometrische Auswertung.....	1
2.4.1	Ladepuffer .....	1

2.4.2	Agarose-Gele .....	1
2.4.3	Basenpaarleiter .....	1
2.4.4	Gelelektrophorese .....	1
2.5	Sequenzierung .....	1
2.5.1	Sequenzierungs-PCR .....	1
2.5.2	Aufreinigung .....	1
2.5.3	Ethanol-fällung .....	1
2.5.4	Sequenzierung .....	1
3.	Ergebnisse .....	1
3.1	RNA .....	1
3.2	Primerauswahl .....	1
3.3	PCR-Etablierung .....	1
3.4	Überprüfung der Spezifität der PCR Produkte .....	1
3.5	Untersuchung des Expressionsmusters innerhalb der transdifferenzierten Proben	1
3.5.1	Untersuchung des Expressionsmusters in Array und Densitometrie am Beispiel des hypothetischen Genes FLJ46041 .....	1
3.5.2	Untersuchung des Expressionsmusters in Array und Densitometrie am Beispiel des hypothetischen Genes AI73 .....	1
3.5.3	Untersuchung des Expressionsmusters in Array und Densitometrie am Beispiel des hypothetischen Genes AW27 .....	1
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	1
4.	Diskussion .....	1
4.1	Diskussion der Etablierung der PCR für hypothetische Gene .....	1

4.1.1	Gelungene PCR und erfolgreiche Sequenzierung .....	1
4.1.2	Erfolgreiche PCR-Etablierung und mögliche Gründe .....	1
4.1.3	Gründe für nicht reproduzierbare PCR-Resultate bei gleich bleibenden Bedingungen .....	1
4.1.4	Gründe für die Entstehung eines PCR-Produktes, welches nicht mit der erwarteten Basenpaarsequenz übereinstimmt.....	1
4.2	Vergleich der Ergebnisse der Arrayanalysen mit denen der densitometrischen Auswertung der PCR.....	1
4.2.1	Gründe für eine geringere Übereinstimmung zwischen Array und Densitometrie bei hypothetischen Genen als bei bekannten Genen.....	1
4.2.2	Einordnung in die Ergebnisse der aktuellen Literatur .....	1
4.3	Funktion der bis dahin unbekanntem Gene .....	1
4.4	Ausblick.....	1
5.	Zusammenfassung.....	1
6.	Literaturverzeichnis.....	1
7.	Abbildungsverzeichnis .....	1
8.	Tabellenverzeichnis.....	1
9.	Danksagung.....	1
10.	Lebenslauf .....	1

## 1. Einleitung

### 1.1 Degenerative Knochenerkrankungen

Osteoporose ist eine weit verbreitete degenerative Erkrankung des menschlichen Knochens; sie ist charakterisiert durch eine erniedrigte Knochenmasse, eine verminderte Qualität des Knochens und erhöhte Anfälligkeit für Frakturen.<sup>1</sup>

Die am häufigsten vorkommende Form der Osteoporose betrifft ältere Menschen, sie kommt bei beiden Geschlechtern und in allen Bevölkerungen vor.

Seit die Lebenserwartung der Bevölkerung deutlich ansteigt, wird diese Erkrankung immer häufiger offensichtlich. Im frühen 19. Jahrhundert wurde sie vom dem englischen Chirurgen Astley Cooper zum ersten mal als „the lightness and softness that bones acquire in the more advanced stages of life“ beschrieben.

Klinisch manifestiert sich die Osteoporose in Frakturen, wobei die Wirbelkörper und der proximale Oberschenkelhals am häufigsten betroffen sind.

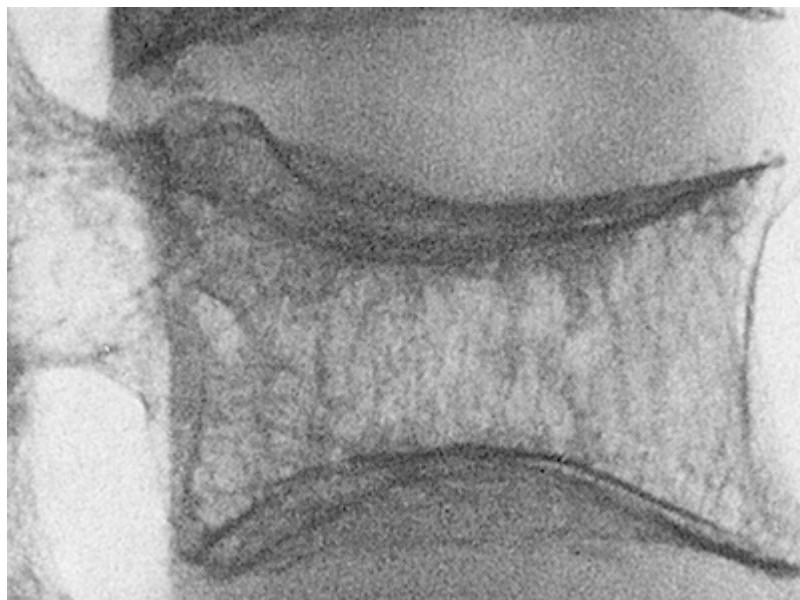


Abbildung 1: **Röntgenaufnahme eines osteoporotischen Wirbelkörpers**

© Urban & Fischer 2003 – Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl.; Röntgenaufnahme eines osteoporotischen Wirbelkörpers, typische Merkmale sind die vermehrte Strahlentransparenz aufgrund einer verminderten Knochendichte sowie die durch Deckplatteneinbrüche verursachte Form der Fischwirbelbildung.

---

<sup>1</sup> Rodan, G.A. et al., Pathophysiology of osteoporosis. Principles of bone biology. San Diego, academic press 1275-1289, 2002

Spezifisch für die Osteoporose ist, dass diese Brüche durch ein geringes oder aber nicht bemerktes Trauma erfolgen. So führen Grund- und Deckplatteneinbrüche der Wirbelkörper im Bereich der Brustwirbelsäule durch eine Höhenminderung der Vorderkante des betreffenden Wirbelkörpers zu der typischen „Fischwirbelbildung“.

Die daraus resultierende, auch als „Witwenbuckel“ bezeichnete Kyphose der Brustwirbelsäule sowie dadurch bedingte chronische Rückenschmerzen sind ein typisches Merkmal der Osteoporose. Ein radiologisches Diagnosekriterium ist die erhöhte Strahlentransparenz des betroffenen Knochengewebes.

Die Ursache dieser Erkrankung ist eine durch zahlreiche Faktoren verursachte Verminderung der mineralisierten Knochenmasse und somit der Knochendichte im gesamten Organismus. Die Balance zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau ist verschoben.

Es kommt zu einer verminderten Aktivität der aufbauenden Knochenzellen, den Osteoblasten und zu einer vermehrten Aktivität der den Knochen abbauenden Knochenzellen, den Osteoklasten. Darüber hinaus ist der Protein- und Mineralstoffwechsel der Knochenmatrix gestört,<sup>2</sup> in Folge dessen findet eine verminderte Einlagerung von Kalzium, Kollagen und Protein statt. Dadurch wird die Qualität des Knochens gemindert, er wird porös und das Risiko von Frakturen steigt deutlich an.

Als zugrunde liegende Faktoren dieser degenerativen Erkrankung des Knochens wurden Geschlecht, Lebensalter, Ernährung, Vor- und Begleiterkrankungen, sowie eine genetische Prädisposition nachgewiesen.<sup>3</sup> Auch der Mangel an Östrogen, Calcium und Vitamin D trägt zur Ausbildung einer Osteoporose bei. Die genauen Mechanismen, welche diese Veränderung der Knochensubstanz bewirken und die ihnen zu Grunde liegenden molekularen Vorgänge sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

---

<sup>2</sup> Rössler; Rüther, Orthopädie, Urban&Fischer, 2000

<sup>3</sup> Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T, Genetics of osteoporis, Endocrine Rev 2002; 23:303-326 25

## 1.2 Osteoporose auf molekularer Ebene

Zahlreiche Körpergewebe entstehen aus mesenchymalen Stammzellen. Dies sind Stammzellen, aus denen die verschiedenen Bindegewebe des Körpers entstehen. So können aus diesen Zellen unter anderem Knochen-, Knorpel-, Fett- und Muskelzellen hervorgehen.

In höherem Lebensalter und in verstärktem Ausmaß bei Prädisposition für Osteoporose entstehen aus diesen Zellen eine geringere Anzahl an Osteoprogenitorzellen (Knochenvorläuferzellen), gleichzeitig eine höhere an Adipozytenprogenitorzellen (Fettgewebsvorläuferzellen).

Darüber hinaus bilden sich aus einem Teil der Osteoprogenitorzellen nicht wie erwartet Osteoblasten, sondern Adipozyten. Diese Veränderung ist eine natürliche Reaktion im Alterungsprozess menschlicher oder tierischer Organismen und ist auch bei anderen Zelltypen zu beobachten.

Bei der Umwandlung von Osteoprogenitorzellen zu Adipoprogenitorzellen konnte auf molekularer Ebene eine verstärkte oder aber verminderte Expression zahlreicher Gene beobachtet werden.

Der Schlüssel zum Verständnis und zu einer möglichen Therapie von degenerativen Knochenkrankungen liegt darin, die für diesen Vorgang verantwortlichen Gene, ihre Funktion und die Veränderungen dieser Funktion auf molekularer Ebene zu verstehen.

Für eine Reihe von Genen konnte die Bedeutung bei degenerativen Prozessen der Knochenmasse bereits aufgeklärt werden. Darunter befinden sich Gene, welche Zytokine, Wachstumsfaktoren oder den Knochenumsatz regulieren ebenso sowie solche, welche einzelne Komponenten der Knochenmatrix kodieren.

Bereits 1994 wurde von Morrison et al.<sup>4</sup> die Bedeutung des Vitamin D Rezeptors im Zusammenhang mit der Knochendichte beschrieben. Allerdings ergaben neuere Studien, dass die Auswirkungen der genetischen Variabilität dieses Rezeptors auf den Knochenstoffwechsel und somit auf die Entstehung von Osteoporose relativ gering sind.

Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil der Knochenmatrix. Die diese Substanz kodierenden Gene, COLIA1 und COLIA2 sind wichtige und bereits gut erforschte Faktoren in der Patho-

---

<sup>4</sup> Morrison, N.A. et al., Prediction of bone density from vitamin d receptor alleles, Nature, 1994



genese der Osteoporose. Ein Bereich dieses Genes, der Transkriptionsfaktor Sp1 binding site wurde mit der Knochendichte, der Zusammensetzung extrazellulärer Matrix und mechanischer Stärke in Verbindung gebracht.<sup>5</sup> Eine vermehrte Varianz dieses Transkriptionsfaktors Sp1 binding site wurde bei Patienten mit Osteoporose nachgewiesen.<sup>6</sup>

Durch den engen Zusammenhang zwischen Östrogenmangel und verminderter Knochendichte ist darüber hinaus der Östrogenrezeptor seit langem ein gut erforschter Faktor im Knochenmetabolismus. Östrogen hat einen fördernden und protektiven Effekt auf die Entwicklung von Osteoblasten, den Erhalt und die Homöostase des Skeletts. Sein Einfluss wird über zwei sowohl im Zytosol als auch Zellkern gelegene Rezeptoren, ER alpha und beta (Östrogenrezeptor) vermittelt. Beide Rezeptoren werden in Osteoblasten, Osteoklasten und Knochenmarkszellen exprimiert.<sup>7</sup>

ER alpha kommt vermehrt im Kortex des Knochen vor, ER beta ist vermehrt in den Knochen trabekeln exprimiert. Beide Rezeptoren weisen zahlreiche genetische Polymorphismen auf.<sup>8</sup> So wurde in Mäusen, welche keinen funktionsfähigen ER alpha ausbilden konnten, stark verminderte Knochendichten gefunden.<sup>9</sup> Dennoch wird der Einfluss der genetischen Polymorphismen des Östrogenrezeptors auf das Osteoporoserisiko kontrovers diskutiert und eindeutige Studien liegen noch nicht vor.

Mehrere Studien legen eine Interaktion zwischen den Polymorphismen des Östrogenrezeptors und denen des Vitamin-D Rezeptors nahe.<sup>10</sup>

Das Gen **CYP19** kodiert das für die Umwandlung von Androgenen in Östrogen verantwortliche Enzym Aromatase. In einer australischen Studie wurde nachgewiesen, dass Polymorphismen einer bestimmten Sequenz dieses Genes mit erhöhten Östradiolspiegeln im Blut

---

<sup>5</sup> Mann, V. et al., COL1A1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality, Journal Clinical Investigation, 2001

<sup>6</sup> Grant, S.F.; Reid, D.M.; Blake, G.; Herd, R.; Fogelman, I.; Ralston, S.H., Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type alpha 1 gene, Nature genetics, 1996

<sup>7</sup> Compston J.E. Sex steroids and bone. Physiol. Rev 2001;81:419-47

<sup>8</sup> Coleman R.T et al., Human estrogen receptor (ESR) gene locus: PstI dimorphism. Nucleic Acids Res, 1988

<sup>9</sup> Korach K.S, Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes. J Soc Gynecol Investig 2000

<sup>10</sup> Zhang Y.Y et al., Estrogen receptor alpha and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density: association study of healthy pre- and postmenopausal Chinese women. Biochem Biophysics Res Commun 2003

und somit mit einer erhöhten Knochendichte einhergehen.<sup>11</sup> Des Weiteren wurden die Gene für TGF $\beta$ 1, IL-6, BMP-2<sup>12</sup> sowie die Gene für Osteocalcin mit der Knochendichte, der Knochenqualität<sup>13</sup> und osteoporotischen Frakturen in Verbindung gebracht.

### 1.3 Knochenremodelling

Der Prozess des „Bone Remodelling“ wurde zuerst von Frost et al.<sup>14</sup> beschrieben.

Die Knochenmasse ist eine im ständigen Umbau und in Anpassung an die wechselnden Belastungen und Anforderungen des Knochens befindliche Substanz.

Durch mechanische Belastung formt sich der Knochen ständig neu, er wird abgebaut und in veränderter, an die gegenwärtigen statischen Bedingungen angepasster Form wieder aufgebaut. Dabei halten sich die abbauenden und die aufbauenden Vorgänge jedoch das Gleichgewicht. Im Allgemeinen kommt es während dessen nicht zu einer Schwächung des Knochens.

Die einzelnen Schritte dieser Umbauvorgänge, des „Bone Remodelings“ sind gut erforscht.

Hämatopoetische Vorläuferzellen, Osteoblasten und Entzündungszellen aktivieren Osteoklasten. Durch deren Aktivierung erfolgt eine Resorptionsphase des Knochens, diese wiederum wird gefolgt von einer kurzen Umkehrphase (reversal phase).

Während dieser Phase wird der Knochen von einer Schicht mononukleärer Zellen bedeckt, es kommt jedoch noch nicht zur Knochenneubildung. Während der darauf folgenden Formationsphase wird neuer Knochen gebildet. Dieser Vorgang wird durch Faktoren angestoßen, welche von Osteoklasten oder aber von bereits bestehender Knochenmatrix freigesetzt werden

---

<sup>11</sup> Dick, M.I., Association of an aromatase TTAA repeat polymorphism with circulating estrogen, bone structure and biochemistry in elderly women, American journal of Physiology and Endocrinology Metabolism, 2004

<sup>12</sup> Chen, D. et al., Bone morphogenic proteins, Growth factors 22:233-241, 2004

<sup>13</sup> Andrew, T et al., Linkage and association for bone mineral density and heel ultrasound measurement with a simple tandem repeat polymorphism near the osteocalcin gene in female dizygotic twins, Osteoporosis international, 2002

<sup>14</sup> Frost, H.M., The Laws of Bone Structure, Charles C. Thomas, Springfield, 1964

und dauert über einen längeren Zeitpunkt an als die vorherigen Phasen. Somit kommt es bei erhöhtem Knochenumbau zu einer Minderung der Knochenmasse.<sup>15</sup>

Im Verlauf eines Wachstumsschubes während der Pubertät wird zwar ebenfalls vermehrt Knochen gebildet, es kommt aber dennoch nicht zu einer Minderung der Knochendichte, da hier eine vermehrte und beschleunigte Knochenbildung stattfindet.

Eine inadäquate Antwort der den Knochen aufbauenden Osteoblasten muss somit bei der Pathophysiologie der Osteoporose eine entscheidende Rolle spielen.<sup>16 17</sup>

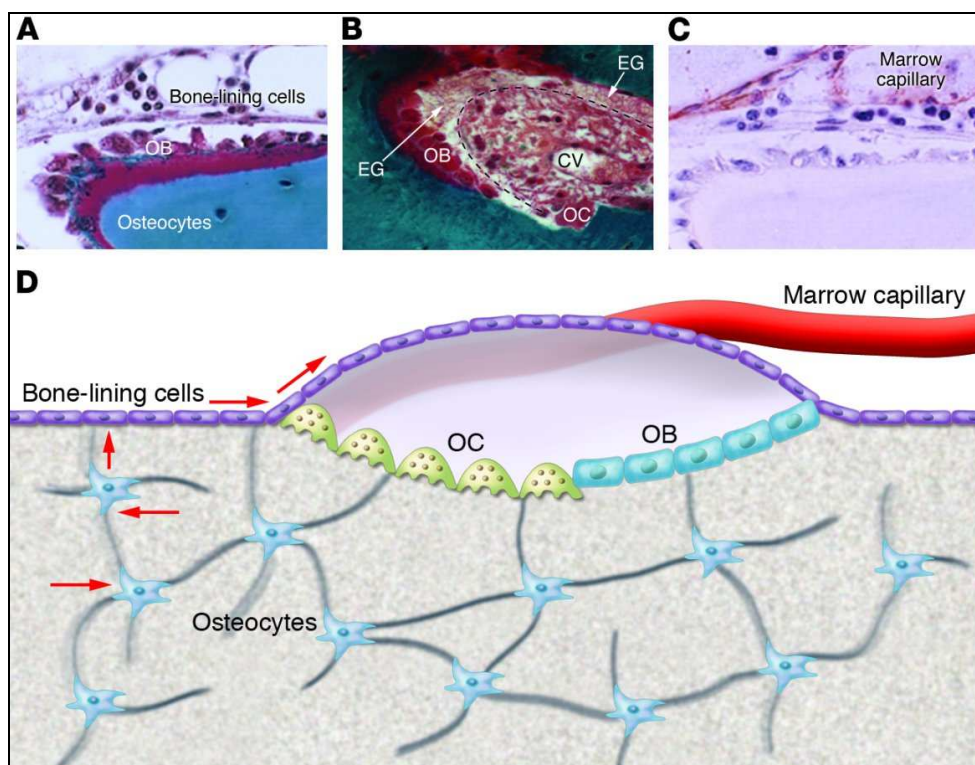


Abbildung 2: Modell des "Bone Remodellings"

Mit Genehmigung von Sundeep Khosla, Jennifer J. Westendorf, and Merry Jo Oursler, J Clin Invest 2008 Feb;118(2): 421-8. Modell des "Boneremodellings", welches die unterschiedlichen Phasen des Knochenumbaus und die daran beteiligten Zellen zeigt. Abkürzungen: EG: Erythrocyte ghosts (hämatopoetische Vorläuferzellen), OB: Osteoblasten, OC: Osteozyten oder Osteoblastenvorläuferzellen, CV: Central vessel, (zentrales Gefäß der knochenbildenden Einheit)

<sup>15</sup> Avioli, L.V.; Lindsay, R., The female osteoporotic syndrome(s), metabolic bone disease and clinically related disorders, Philadelphia,

<sup>16</sup> Lawrence, G. et al., Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, J Clin Invest. 115:3318, 2005

<sup>17</sup> Lanyon, L., Skerry, T., Postmenopausal osteoporosis as a failure of bone`s adaptation to functional loading, J Bone Min Res, 2001

## 1.4 Stammzellen

### 1.4.1 Definition einer Stammzelle

Laut Definition ist eine Stammzelle eine undifferenzierte Zelle des menschlichen oder tierischen Organismus, aus welcher Tochterzellen hervorgehen können. Diese Tochterzellen sind entweder ebenfalls Stammzellen oder aber sie unterliegen einem Entwicklungsprozess, welcher zur Differenzierung zu einem speziellen Zelltyp führt.

Dabei entstehen zunächst Vorläuferzellen (precursor cells oder Progenitorzellen). Diese Zellen teilen sich mehrfach, bevor sie sich endgültig differenzieren und zu speziellen Zellen ausbilden. Manche Definition der Stammzelle beinhaltet, dass diese sich für die Lebensdauer des übergeordneten Organismus oder sogar auf unbegrenzte Zeit reproduzieren kann.

Im erwachsenen Organismus verbleiben Stammzellen die meiste Zeit im Ruhezustand und somit in einem nicht proliferativen Stadium. Sie werden erst dann aktiviert, wenn Gewebeschaden und Umbauprozesse des Körpers Signalkaskaden anstoßen, welche die Proliferation und Differenzierung von Stammzellen zur Regeneration von speziellen Zellen, z.B. Osteoblasten, aktivieren und steuern.<sup>18 19</sup>

#### 1.4.1.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen wurden bereits 1966 von Friedenstein und Petrova als knochenformende Progenitorzellen beschrieben.<sup>20</sup> Zellen, welche die Morphologie mesenchymaler Stammzellen aufwiesen, wurden nicht nur im Knochenmark, sondern auch in im peripheren Blut adulter Organismen, im Fettgewebe, in der Haut, in der Leber und im Nabelschnurblut gefunden.<sup>21 22 23</sup>

---

<sup>18</sup> Fuchs, E. et al., Socializing with the neighbors, Stem cells and their niche, Cell: 116, 769-778, 2004

<sup>19</sup> Hirao, A. et al., Lawrence, G. et al., Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, J Clin Invest, 2004

<sup>20</sup> Friedenstein, A.J. et al., Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, Journal Embryol Exp Morph., 1966

<sup>21</sup> Zvaifler, N.J. et al., Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals, Arthritis Research, 2000

Mesenchymale Stammzellen liegen meist in einem heterogenen Verband mit Fibroblasten vor und befinden sich im Knochenmark, im peripheren Blut, im Fettgewebe, in der Plazenta und im Nabelschnurblut.

Humane mesenchymale Stammzellen sind multipotente Zellen, welche sich zu Zellen des mesenchymalen Gewebes differenzieren können. Dies sind Knochen-, Knorpel-, Fett-, Sehnen-, Muskel- oder Knochenzellen.<sup>24</sup> Mesenchymale Stammzellen können aus unterschiedlichen Geweben isoliert werden und weisen ein heterogenes Proliferations- und Differenzierungspotential auf.

Sie besitzen das Potential zur Erneuerung und Reparatur von durch Trauma, Krankheit oder Alterungsprozesse beschädigten Geweben. Ein besonderes Merkmal mesenchymaler Stammzellen ist ihre Fähigkeit, zu Zellreihen anderer embryonaler Herkunft, so etwa Neuronen ektodermalen Ursprungs oder Hepatozyten endodermalen Ursprungs zu differenzieren. Darin sind sie den embryonalen Stammzellen ähnlich.<sup>25</sup>, wengleich dies z. T. kontrovers diskutiert wird.

Dennoch gibt es kein eindeutiges Charakteristikum, welches eine mesenchymale Stammzelle grundlegend definiert. Zu ihrer Identifikation ist es deshalb besonders wichtig, einen allen Stammzellen gemeinsamen Marker zu finden. Neben ihrer mikroskopischen Morphologie lassen sich auch auf molekularer Ebene zahlreiche spezifische Markerproteine auf der Zelloberfläche nachweisen.<sup>26</sup> Kolf, Cho und Tuan untersuchten die Oberflächenproteine von

---

<sup>22</sup> Chunmeng, S. et al., Effects of plastic adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU in rats, *Transplant Proc.*, 2004

<sup>23</sup> Lee, R.H. et al., Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, *Cell Physiology Biochemistry* 14, 2004

<sup>24</sup> Pittenger, M. F., Multilineage potential of human mesenchymal stem cells, *Science*, 1999

<sup>25</sup> Jiang, Y. et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature* 418, 2002

<sup>26</sup> Jackson, L. et al., Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications, *J Postgrad Med*, 2007

Stammzellen unterschiedlicher Herkunft und Spezies und stellen aus den wichtigsten eine Tabelle zusammen.<sup>27</sup>

---

<sup>27</sup> Kolf, E. et al., Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells, Arthritis Research Therapy, 2007

Tabelle 1: Gemeinsame Oberflächenproteine isolierter mesenchymaler Stammzellen

Surface antigens commonly identified during isolation of mesenchymal stem cells (MSCs)								
Marker type	Surface antigen <sup>a</sup>	Number of populations reported with specified antigen levels <sup>b</sup>						References
		Human MSCs <sup>c</sup>			Murine MSCs <sup>c</sup>			
		+	+/-	-	+	+/-	-	
Positive	Stro-1	7	1	2	0	0	0	4-7,66,82-84
	CD13	5	0	0	1	0	1	2,12,84-87,89-90
	CD29	5	0	0	11	0	0	2,12,63,84-87,90
	CD44	11	0	1	10	1	0	2,63,82,84-87,90-91
	CD73	5	0	0	0	0	0	2,10,83-85
	CD105	7	0	0	1	0	0	2,10,12,83-87
	CD106	4	0	2	4	1	0	2,5,83-84,86-89
Negative	CD11b	0	0	3	0	1	5	2,82,86-88,90
	CD31	0	3	10	0	0	6	2,82,84-91
	CD34	1	1	10	5	6	3	2,12,63,82,84-89,91
	CD45	0	0	11	0	0	6	2,82,84-91
	CD117	0	2	3	1	1	13	2,63,82,87-90
Variable	Sca-1	0	0	0	6	5	4	63,87-88,90
	CD10	6	0	5	0	1	0	82,85-87,89
	CD90	11	1	1	2	4	10	2,12,63,82,84-85,87-91
	Flk-1	2	1	1	0	0	5	82,88-89

Kolf, E. et al., Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells, *Arthritis Research Therapy*, 9:204, 2007. Diese Tabelle zeigt die von Kolf, Tun et al. mithilfe von Antigenen untersuchten Oberflächenmarker zur Identifikation mesenchymaler Stammzellen. Dabei bedeutet (+), dass der Marker weitgehend positiv auf der Zelloberfläche exprimiert wurde, (+/-) bedeutet, er wurde leicht positiv exprimiert und (-) bedeutet, er wurde negativ, d.h. nicht exprimiert. Es wurden mesenchymale Stammzellen des Menschen und mesenchymale Stammzellen der Maus untersucht

Sie beschrieben eine Reihe von positiven Markern zur Definition von mesenchymalen Stammzellen. Dies ist zum einem Stro-1, welches für die Bildung von CFU-Faktor (clony forming factor) notwendig ist. Dieser Faktor fördert die Ausbildung mesenchymaler Zellreihen. Das Oberflächenprotein Stro-1 verliert jedoch im Laufe der *in vitro*-Kultivierung von

mesenchymalen Stammzellen seine Aktivität,<sup>28</sup> so dass das gemeinsame Auftreten dieses Markers mit CD106 oder VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) empfohlen wird. Letzteres wird im Endothel von Blutgefäßen exprimiert und ist für Chemotaxis, Zelladhäsion und Signaltransduktion verantwortlich. Zellen, welche beide Marker gleichzeitig auf ihrer Oberfläche exprimieren, verfügen über für mesenchymale Stammzellen charakteristische Eigenschaften wie Multipotenz, hohe Teleomeraseaktivität und Proliferation.

Jackson et al. wiesen nach, dass mehr als 95 % aller MSCs auf ihrer Zelloberfläche CD 29 oder CD 105 oder beide Marker zusammen aufweisen.

Aufgrund der Schwierigkeit, einen eindeutigen positiven Marker für Stammzellen zu finden, wurde auch die Abwesenheit einiger Marker auf der Oberfläche von mesenchymalen Stammzellen als signifikant gewertet. Diese negativen Marker sind CD11, ein Oberflächenprotein für Zellen des Immunsystems, Glycophorin-a, eines der erythroiden Entwicklung und CD34, ein Marker primitiver Zellen der hämatopoetischen Zellreihe.

Auf molekularer Ebene konnten zahlreiche Gene gefunden werden, deren Ausprägung für mesenchymale Stammzellen spezifisch ist. Dies sind beispielsweise die Gene Vimentin, connective tissue growth factor, collagen Typ 1 alpha und eucaryotic translation growth factor 1alpha. Die Expression dieser Gene wird zwar als molekularer Nachweis bewertet, über die Rolle dieser Gene bei Selbsterhalt oder Regeneration der Stammzellen ist bis heute jedoch wenig bekannt.

Somit ist unklar, ob diese charakteristischen Gene in der ruhenden mesenchymalen Stammzelle Versorgungsvorgänge steuern oder aber ob sie aktiv an der Unterdrückung von Differenzierungsvorgängen und somit am Erhalt des undifferenzierten Status beteiligt sind.

Noch immer herrscht kein Konsens darüber, ob ausschließlich die proliferierenden, Fibroblasten-ähnlichen Progenitorzellen aus dem Knochenmark als mesenchymale Stammzellen zu betrachten sind, oder ob dies für alle Zellen gilt, welche in der Lage sind, zu mesenchymalem Bindegewebe zu differenzieren. Die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu adipogenen, chondrogenen oder osteogenen Vorläuferzellen kann *in vitro* durch unterschiedliche Nährmedien induziert und molekular durch die gesteigerte Expression und Transkription von differenzierungsspezifischen Genen bewirkt werden.

---

<sup>28</sup> Gronthos, S. et al, Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal cells from human bone marrow, Journal Cell Science, 2003



#### 1.4.1.2 Regenerierung und Erhalt der Stammzellen

Der Pool an undifferenzierten und pluripotenten Stammzellen befindet sich in einem steten Gleichgewicht. Diejenigen Prozesse, welche zu einer konstanten Erneuerung der mesenchymalen Stammzellen führen, sind ebenso wie diejenigen Prozesse, welche eine Differenzierung induzieren, noch weitgehend unerforscht.

Bei einem Vergleich der genetischen Profile von Stammzellen mesenchymalen, embryonalen und hämatologischen Ursprungs zeigte sich eine Gruppe von Genen, welche allen drei Zellreihen gemeinsam ist. Es wurde vermutet, dass diese Gene für den Erhalt der Zellen und das Verbleiben in einem undifferenzierten und pluripotenten Status verantwortlich sind.<sup>29 30</sup>

Durch Arrayanalysen konnten diese für die Erneuerung und den Erhalt des Stammzellenpools relevanten Gene oct4, sox-2 und rex-1 quantitativ untersucht werden.<sup>31</sup> Diese Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, welche ursprünglich als Marker für embryonale Stammzellen bezeichnet wurden. Sie werden jedoch auch auf einer Vielzahl von mesenchymalen Stammzellen bei Säugetieren exprimiert. Die Aktivierung dieser Gene unterdrückt die Exprimierung von jenen Genen, welche eine Differenzierung auslösen. Erhalt und Regeneration mesenchymaler Stammzellen werden von extrazellulären Wachstumsfaktoren wie u.a. fibroblast growth factor, LIF (leukemia inhibiting factor,) und Faktoren des wnt-Signalweges gesteuert. LIF und der wnt-Signalweg regulieren nicht nur den Erhalt der Stammzellen, sondern auch die Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten.

Die Modulation des wnt-Signalweges aktiviert die Proliferation von MSCs, hemmt jedoch weitgehend die osteogene Differenzierung. Peterson et al.<sup>32</sup> untersuchten die Bedeutung der Gene OCT4 (octamer binding transcription factor 4), SOX2 und NANOG für den Erhalt des Stammzellenpools.

---

<sup>29</sup> Golan-Mashiach, M. et al., Design principle of gene expression used by human stem cells: Implication for pluripotency, FASEB, Januar 2005

<sup>30</sup> Suarez-Farinas, M. et al., Comparing independent microarray studies: The case of human embryonic stem cells, J Invest Dermatol., März 2008

<sup>31</sup> Kolf, E. et al., Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells, Arthritis research therapy, Februar 2007

<sup>32</sup> Peterson, C., Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch, Computational Biology, Juli 2006

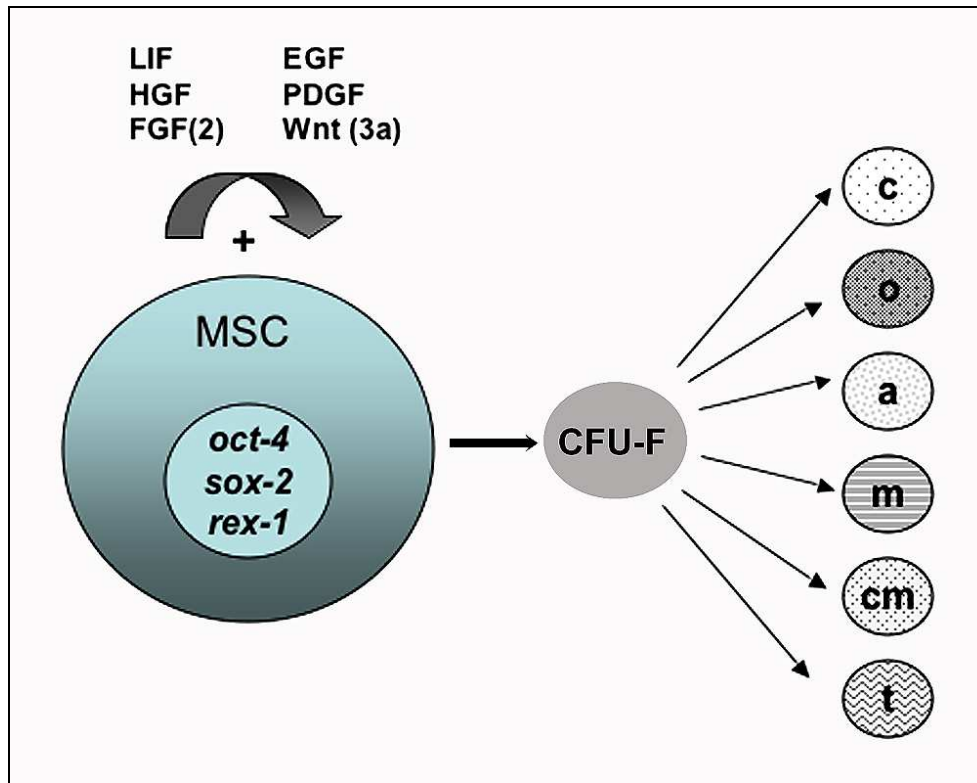


Abbildung 3: Erneuerung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Kolf, E. et al., Mesenchyma stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells, *Arthritis Research Therapy*, 9:204, 2007. Extrazelluläre Faktoren, darunter Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die *in vitro* Regeneration von mesenchymalen Stammzellen fördern oder erhalten sind LIF, leukemia inhibitory factor; EGF, epidermal growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; FGF, fibroblast growth factor. Darüber hinaus sind diejenigen Gene, welche charakteristisch für den Erhalt des mesenchymalen Stammzellenpooles sind dargestellt: *oct-4*, *sox-2*, and *rex-1*. Die potentiellen, ausdifferenzierten Zellen, welche u. a. durch CFU-F colony forming unit-fibroblast; aus mesenchymalen Stammzellen entstehen können sind c, Chondroblasten; o, Osteoblasten; a, Adipozyt; m, Myoblasten; cm, Cardio-Myoblasten; t, Tendoblasten

Sind diese Transkriptionsfaktoren aktiviert, werden die für Erhalt und Proliferation der Stammzelle relevanten Gene aktiviert. Diejenigen Gene, welche eine Differenzierung induzieren könnten, werden währenddessen „ausgeschaltet“. Somit können durch die o. g. Gene bzw. durch die sie kodierenden Transkriptionsfaktoren die für den weiteren Entwicklungsverlauf der Zelle relevanten Gene reguliert werden.

Bei embryonalen Stammzellen konnte eine wesentliche höhere Anzahl an exprimierten Genen nachgewiesen werden als bei in Differenzierung befindlichen Progenitorzellen.

Bei bereits vollständig ausdifferenzierten Zellen wurde eine noch geringere Anzahl von exprimierten Genen gefunden, als dies bei Progenitorzellen der Fall war.

Golan-Mashiach et al. formulierten die Hypothese, dass embryonale Stammzellen die genetischen Voraussetzungen für eine Vielzahl an möglichen Entwicklungsrichtungen bereit halten. In Progenitorzellen, welche sich auf dem Wege zur differenzierten Zelle befinden, ist bereits eine Vielzahl dieser für eine mögliche Entwicklung bereit stehenden Gene supprimiert.

Sie können jedoch durch eine Veränderung des externen Milieus und eine Rückkehr der Progenitorzelle in einen undifferenzierten und pluripotenten Status erneut exprimiert werden.

An embryonalen Stammzellen wurde des Weiteren gezeigt, dass im undifferenzierten Stadium zahlreiche Gene vorliegen. Diese sind jedoch nur in geringem Ausmaß reguliert und werden von anderen, übergeordneten Genen, welche eine spezielle Differenzierung dieser embryonalen Stammzellen verhindern, an ihrer vermehrten Regulation gehindert. Wird durch äußere Faktoren ein Differenzierungsprozess initiiert, so werden zunächst diejenigen übergeordneten Gene, welche die Differenzierung inhibieren, in zunehmend geringerem Ausmaß reguliert. Diejenigen Gene, welche für die entsprechende Differenzierung charakteristisch sind, werden jedoch in verstärktem Ausmaß reguliert.

Als Schlussfolgerung daraus formulierten Golan-Mashiach et al. die Hypothese, dass das genetische Programm der Stammzellen zwei Gegensätze vereine: Einerseits das Potential zum Verbleib im nichtdifferenzierten und unmittelbar pluripotenten Stadium, die „Just-in-case“ Strategie, andererseits die Möglichkeit, zu einem bestimmten Zeitpunkt benötigte Gene genau an diesem Zeitpunkt zu exprimieren, die „Just-in-time“ Strategie.

Hierbei ist auf molekularer Ebene eine große Anzahl von Genen zu finden, welche verschiedene Differenzierungsrichtungen initiieren und somit zu unterschiedlichen Zellentwicklungen führen können. Gleichzeitig folgt die Stammzelle der Strategie, auf dem Wege zur voll ausdifferenzierten Zelle die dafür notwendigen Gene verstärkt, alle anderen jedoch vermindert zu regulieren.

Diejenigen Gene, welche für den Erhalt des nicht differenzierten Zustandes verantwortlich sind, werden im Verlauf des Differenzierungsprozesses ausgeschaltet.

Embryonale Stammzellen besitzen somit die Eigenschaft, über eine große Anzahl von Genen für eine mögliche Differenzierung zu verfügen, diese aber nur bei Bedarf zu aktivieren und ansonsten in einem gering ausgeprägten Ruhezustand bereit zu halten.

## 1.4.2 Differenzierung von MSCs

Differenzierung bedeutet die Ausprägung einer bestimmten Zellart, z. B. Osteoblasten oder Adipozyten. Diese Zellen weisen eine für sie charakteristische Morphologie sowie ein definiertes genetisches Muster und spezifische Oberflächenmarker auf.

Die Mechanismen, welche darüber bestimmen, ob eine Stammzelle weitere Stammzellen produziert oder aber sich zu einem bestimmten Zelltyp ausdifferenziert, sind weitgehend unbekannt.

Zwar sind bereits einige der Mechanismen, welche über die weitere Entwicklung einer Stammzelle entscheiden, erforscht, dennoch sind momentan zahlreiche Details über diese Vorgänge unbekannt.

Als Auslöser der Differenzierung werden genetische Informationen der Ursprungszelle und exogene Faktoren diskutiert. Aus mesenchymalen Stammzellen entstandene Progenitorzellen, welche bereits eine bestimmte Differenzierungsrichtung eingeschlagen haben, können sich zu Zellen einer anderen Zellreihe umwandeln. Dies geschieht über Zwischenschritte, De-Differenzierung und darauf folgende Re-Differenzierung bzw. Transdifferenzierung.

In den folgenden Abschnitten werden für die Differenzierung wichtige und bereits bekannte Prozesse am Beispiel der osteogenen und der adipogenen Differenzierung erläutert werden.

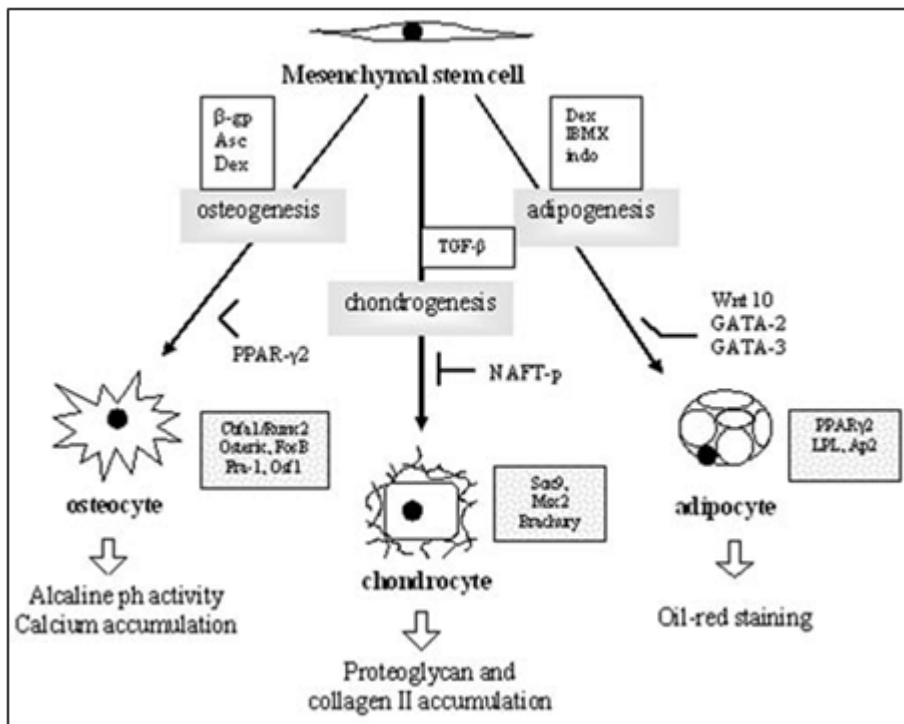


Abbildung 4: Schema der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Bobis S., Jarocha D., Majka M. Department of Transplantation, Polish-American Institute of Pediatrics, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland. FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA, Vol. 44, No. 4, 2006, pp. 215-230; Schema der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu den drei Zellreihen Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. In den oberen Boxen sind diejenigen Faktoren, welche die jeweilige Entwicklungsrichtung induzieren dargestellt, in den unteren Boxen die wichtigsten Transkriptionsfaktoren. Durch Pfeile sind zelltypspezifische Nachweise dargestellt.

Abkürzungen:  $\beta$ -gp - $\beta$ -Glycerolphosphate; Asc – Ascorbinsäure; Dex -Dexamethason; TGF- $\beta$ -Transforming growth factor- $\beta$ ; IBMX -Isobutylmethylxanthin; Indo -Indomethacin; PPAR $\gamma$ 2 -Peroxisomen proliferationsaktivierter Rezeptor  $\gamma$ 2; NAFT-p – Nuclear factor of activated T cell; LPL – Lipoprotein-Lipase; ay2 -Fettsäurebindung

#### 1.4.2.1 Osteogene Differenzierung

Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Die Knochenbildung findet nicht nur in einem im Wachstum befindlichen Organismus statt, sondern ist ein lebenslanger Prozess. Dieser wird durch das Zusammenspiel zahlreicher Faktoren gesteuert.

Knochenzellen entstehen aus mesenchymalen Stammzellen. Ein spezielles Nährmedium induziert *in vitro* die Bildung von Osteoblastenprogenitorzellen und Osteoblasten.

Dieses Nährmedium enthält Dexamethason, Ascorbinsäurebisphosphat und  $\beta$ -Glycerolphosphat.

Datta et al. zeigten, dass nach Entfernen von dort kultivierten Osteoblasten die auf einem Titaniumgerüst verbliebene extrazelluläre Knochenmatrix bei im Anschluss dort exponierten MSCs die Expression osteogener Markersubstanzen wie Alkalische Phosphatase und Calciumablagerungen förderte. Somit muss eine osteogene Differenzierung dieser Stammzellen stattgefunden haben.<sup>33</sup>

Osteogenese lässt sich makroskopisch durch mineralisierte Ablagerungen sowie laborchemisch durch eine erhöhte Aktivität des Enzymes Alkalische Phosphatase nachweisen. Das Protein BMP (Bone morphogenic protein) wurde 1965 von Urist<sup>34</sup> erstmals beschrieben. Es weist auf das Vorhandensein von Osteoblasten bzw. auf eine erhöhte osteogene Aktivität hin. BMP induziert die Knochenbildung aus mesenchymalen Stammzellen und spielt bei der Ausdifferenzierung von Muskel- und Knochenzellen eine Rolle.

---

<sup>33</sup> Datta, N. et al., Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on osteoblastic differentiation of marrow stromal cells, *Biomaterials*, 2005

<sup>34</sup> Urist, M. R., Bone: formation by autoinduction, *Science*, 150(698): 893-9, 1965

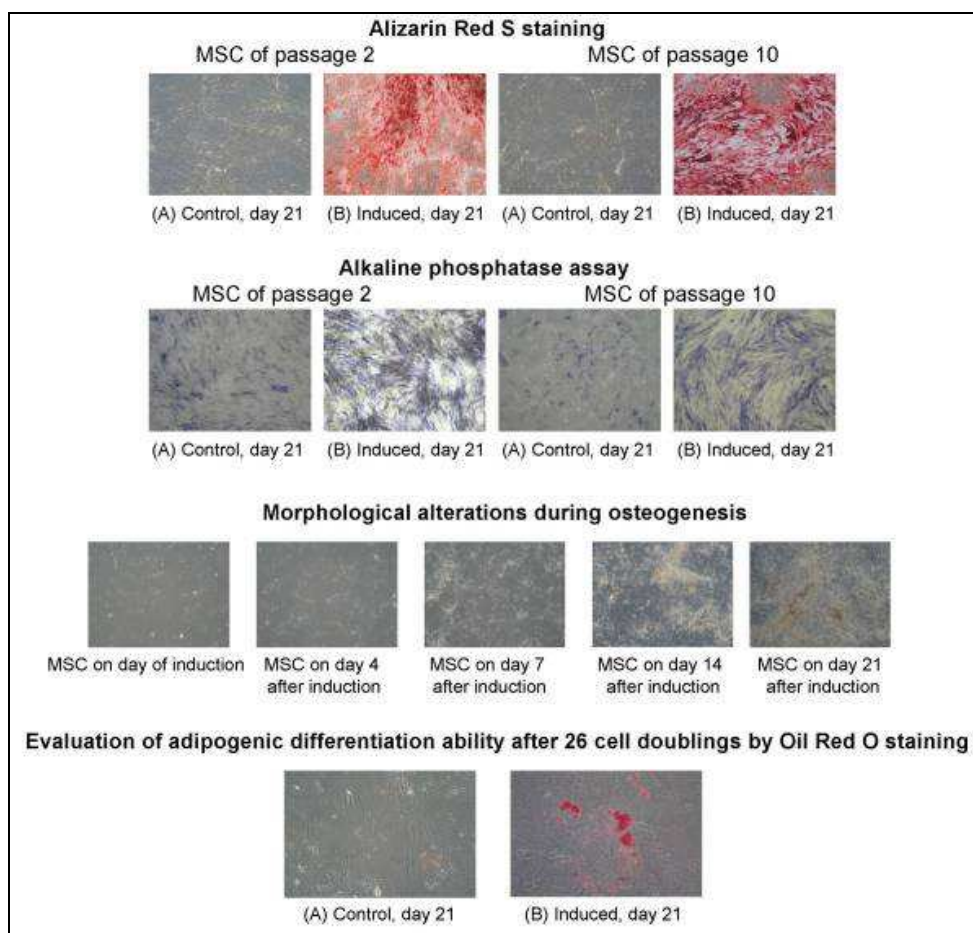


Abbildung 5: **Histologischer Nachweis osteogener und adipogener Differenzierung durch Färbung**

Birgit Kulterer et al., „ Genetisches Expressionsprofil von humanen MSCs der Expansion und Osteoblastendegeneration“ BMC Genomics, Expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation

Auf molekularer Ebene werden osteogene Prozesse durch Expression und Translation spezifischer Gene nachgewiesen. Diese Gene sind u.a. Osterix, cbfal1, Osteopontin, Osteocalcin und Bone Sialoprotein.<sup>35</sup>

Ein weiterer bedeutender Regulator der osteogenen Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor **Runx2**. Dieser wird durch das osteogene Markerprotein BMP2 (Bone morphogenic protein2) aktiviert und trägt ebenfalls zu Bildung von Osteoblasten bei. Das aktivierte Genprodukt von Runx2 induziert die Expressierung zahlreicher für die Osteogenese relevanter Gene wie

<sup>35</sup> Friedman, M.S. et al., Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenic protein-6, J cell Biochem., 2006

Osteocalcin, Typ 1 Kollagen und Alkalische Phosphatase. Runx2 selbst kann wiederum durch das Zytokin TNF alpha (Tumornekrosefaktor alpha) enzymatisch inaktiviert werden. TNF alpha wird mit entzündungsvermitteltem Knochenabbau assoziiert. Homozygote Runx2 Knock-out Mäuse entwickeln keinerlei Knochenstrukturen und sind nicht lebensfähig. Heterozygote Tiere hingegen sind lebensfähig, weisen jedoch die auch beim Menschen bekannte und als *cleidocranial dysplasia* bezeichnete Störung der Knochenbildung und Ausreifung auf.<sup>36</sup> Noda et al.<sup>37</sup> wiesen nach, dass Runx2 für den Erhalt der Knochenmasse in Ruhephasen ohne mechanischen Stimulus des Knochens von Bedeutung ist.

Auch das Gen **TBX5** (T-box transcription factor 5) spielt bei der osteogenen Differenzierung eine entscheidende Rolle. Durch Rezeptorbindung aktiviert es das osteogene Zielgen **FGF10** (Fibroblast growth factor). Ein bereits erforschter Schalter der unipolaren osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist der im Zellkern befindliche Rezeptor TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif). Durch Interaktion mit diesem wird die Aktivierung osteogener Gene wie Runx und Tbx5 gefördert und gleichzeitig die adipogene Differenzierung durch PRAR gamma (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) gehemmt.

Auch die sich verändernde Expression des für die osteogene Differenzierung spezifischen Markergenes Alkalische Phosphatase konnte mittels RT-PCR im Verlauf des Differenzierungsprozesses verfolgt werden. Dabei zeigte sich, dass die Expression ab dem 4. Tag nach Induktion der Differenzierung anstieg, ab dem 14. Tag jedoch wieder sank. Somit scheint dieses Gen zu Beginn der Differenzierung eine Rolle zu spielen, im späteren Prozess jedoch keine weitere Funktion mehr zu übernehmen.

Das Gen **MSX2** konnte in Osteoprogenitorzellen nachgewiesen werden und wird während des gesamten Differenzierungsprozesses verstärkt exprimiert,<sup>38</sup> seine genaue Funktion ist jedoch noch nicht geklärt.

**ID4** ist ein weiteres Gen, dessen Bedeutung bei der Osteogenese bisher erst teilweise erforscht wurde. Es hat eine Rückkopplungsfunktion für die Markerproteine BMP2, BMP6 und

---

<sup>36</sup> Mundlos S. et al., Mutations involving the transcription factor CBFA1 causing cleidocranial dysplasia, Cell, 1997

<sup>37</sup> Noda, M. et al., Runx2 is a target of mechanical unloading to alter osteoblastic activity and bone formation in vivo, Endocrinology, 2005

<sup>38</sup> Kulterer B. et al., Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells during expansion and osteoblast degeneration, BMC Genomics, 2007



BMP8 und kann somit regulierend auf die Osteogenese wirken. Es zählt zu einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, welche die Bindung osteogener Transkriptionsfaktoren an die DNA hemmen. Um den Fortschritt des osteogenen Differenzierungsprozesses nicht zu beenden, muss folglich die Expression dieses Genes ID4 vermindert sein.

Auch das Gen **SORT1** (Sortilin1) wurde mit osteogenen Prozessen in Zusammenhang gebracht, seine Bedeutung hierbei jedoch ebenfalls noch nicht endgültig geklärt. Das Genprodukt Sortilin1 ist ein ursprünglich im Gehirn isoliertes, jedoch ubiquitär vorkommendes Glykoprotein, welches die Ausbildung extrazellulärer Matrix zu fördern scheint. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses Gen während der osteogenen Differenzierung in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird und dass es in seiner Expression ein ähnliches Muster wie die gut erforschten osteogenen Gene Alkalische Phosphatase und BMPs zeigt. Somit wird eine Ähnlichkeit in Bedeutung und Wirkung mit diesen beiden Genen diskutiert.

#### 1.4.2.2 Adipogene Differenzierung

Adipozyten bilden das Fettgewebe des Körpers und entstehen ebenfalls aus MSCs. Auch die adipogene Differenzierung wird *in vitro* durch ein spezielles Medium initiiert. Dieses enthält Dexamethason, Insulin und eine PPAR-gamma wirksame Substanz. Für die Adipogenese verantwortliche Gene sind PPAR-gamma, C/EBP-alpha,-beta und -gamma (CAAD enhancer binding proteins).

PPAR gamma ist der für die Adipogenese entscheidende Regulator. Durch ihn wird die adipogene Differenzierung gefördert, die osteogene hingegen gehemmt.

C/EBP beta und gamma sind Marker der frühen adipogenen Differenzierung, C/EBP alpha und PPAR gamma hingegen weisen die späte Phase der Differenzierung bzw. der ausdifferenzierten Adipozyte nach. Weitere adipozytenspezifische Proteine sind Leptin und Adipsin.<sup>39</sup> Die erfolgreiche Differenzierung von Adipozyten wird mikroskopisch durch lipidgefüllte intrazelluläre Tröpfchen nachgewiesen. Der enzymatische Nachweis von Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase gilt als Marker für ausdifferenzierte Adipozyten.

---

<sup>39</sup> Evan, D. et al., C/EBP alpha induces adipogenesis through PRARY: a unified pathway, Genes and development, 2001

Die für die Adipogenese spezifischen oben genannten Gene sind auf molekularer Ebene in ihrer quantitativen Expression mittels RT-PCR nachweisbar.<sup>40</sup>

### 1.4.3 Transdifferenzierung

Transdifferenzierung bedeutet die Umwandlung eines differenzierten Zelltyps in einen anderen, ebenfalls differenzierten Zelltyp.<sup>41 42</sup>

Der Begriff Transdifferenzierung wurde von Okada geprägt.<sup>43 44</sup>

Dabei wurden folgende Kriterien bestimmt: Jede Veränderung der Zellmorphologie muss durch Veränderungen auf molekularer Ebene verursacht werden und die beiden Zellreihen klar voneinander unterscheiden, außerdem müssen beide Zelltypen in einem genetischen Verwandtschaftsverhältnis zueinander stehen.<sup>45</sup>

Konkret bedeutet dies, dass sich z.B. Knochenzellen durch veränderte exogene Bedingungen in Fettzellen umwandeln. Zahlreiche degenerative Prozesse des Organismus beruhen auf solchen Umwandlungsprozessen eines Zelltypes in einen anderen.

Dabei wird auf dem Weg von der differenzierten Zelle hin zu einer Zelle anderer Ausprägung ein Stadium der De-Differenzierung durchlaufen.

Park et al.<sup>46</sup> wiesen nach, dass Adipozyten aus dem adulten Organismus in der Lage sind, zu de-differenzieren und anschließend erneut sowohl zu Adipozyten als auch zu Osteoblasten zu differenzieren bzw. zu transdifferenzieren.

---

<sup>40</sup> Neubauer, M. et al., Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor *in vitro*, Tissue engineering, 2005

<sup>41</sup> Tosh, D. et al., Cells change their phenotype, Nat. Rev. Mol., Cell. Biology, 2002

<sup>42</sup> Slack J.M. and Tosh, D., Transdifferentiation and metaplasia: switching off cell types, Curr. Opin. Gen. Dev., 2001

<sup>43</sup> Okada, T. S., Transdifferentiation: Flexibility in cell differentiation, Oxford Clarendon Press, 1991

<sup>44</sup> Okada, T. S., Lens studies continue to provide landmarks of embryology (developmental biology), J Bioscience 25, 133-141, 2000

<sup>45</sup> Burke, Z.D. and Tosh, D., Therapeutical potential of transdifferentiated cells, Clinical science 108, 309-321., 2005

<sup>46</sup> Park, S.R. et al., Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes *in vitro*, Bone, 1999

Dieses Phänomen der De-Differenzierung, welches der Transdifferenzierung voran schreitet, wurde von Tagami et al. bestätigt.<sup>47</sup> Durch Entzug der die Differenzierung triggernden Stimuli wurden Adipozyten sowohl auf struktureller als auch auf molekularer Ebene erneut in den Status mesenchymaler Stammzellen zurück geführt.

Auch Song und Tuan et al.<sup>48</sup> zeigten, dass adulte hMSCs nach Abschluss ihrer Entwicklung zu einem bestimmten Zelltyp durch veränderte externe Faktoren charakteristische Merkmale anderer Zellen ausbilden können. Bevor Merkmale einer anderen Zellart nachweisbar waren, musste jedoch zunächst ein undifferenziertes Stadium der entsprechenden Zellen erreicht werden.

Durch Beobachtung der Genexpression bereits ausdifferenzierter Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen durch exogene Stimuli zu Zellen eines anderen Typus umgewandelt werden konnten.

Die molekularen Muster von undifferenzierten adulten MSCs, ausdifferenzierten Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten, sowie die der o. g. dedifferenzierten Zellen wurden miteinander verglichen. Durch diese Analyse konnten zwei Sorten von Genen unterschieden werden: Gene, welche für den Erhalt der undifferenzierten Stammzellen wichtig sind und während der Differenzierung vermindert reguliert sind, während der De-Differenzierung jedoch vermehrt exprimiert werden. In der Untersuchung von Song, Tuan et al. zeigten die dedifferenzierten Zellen erwartungsgemäß ein Genexpressionsmuster, welches weitgehend mit demjenigen der ursprünglichen hMSCs überein stimmte.

---

<sup>47</sup> Tagami, M et al., Genetic und ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cells, Cell tissue reg., 2003

<sup>48</sup> Song, L. and Tuan, R.S., Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, FASEB Journal, 2004

## **1.5 Rolle unbekannter Gene bei der Transdifferenzierung**

Unbekannte oder auch hypothetische Gene sind Gene, welche in ihrer Sequenz zwar weitgehend entschlüsselt, jedoch noch nicht in jeder einzelnen Basenpaarabfolge endgültig gesichert sind. Über diese Gene ist nichts oder nur wenig bekannt. Zu einzelnen von ihnen existieren bereits Einträge in Datenbanken. Durch Arrayanalysen kann die Regulation oder Veränderung derselben bei einer bestimmten Fragestellung und zu einem festgelegten Zeitpunkt festgestellt werden.

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene, welche bei der Transdifferenzierung von Adipozyten zu Osteoblasten und von Osteoblasten zu Adipozyten eine möglicherweise entscheidende Funktion inne haben, untersucht.

Dazu wurden von der Arbeitsgruppe Schütze am Orthopädischen Zentrum für Muskuloskeletale Forschung der Universität Würzburg aus Hüftköpfen, welche bei elektiven Operationen entnommen wurden, MSCs isoliert. Diese MSCs wurden durch ein entsprechendes Nährmedium in einen Differenzierungsprozess gebracht. Ein Teil der Zellen wurde osteogen differenziert, der andere Teil adipogen.

Darüber hinaus wurde erneut ein Teil dieser Zellen durch Nährmediumswechsel in die jeweils andere Entwicklungsrichtung - entweder adipogen - oder osteogen transdifferenziert. Aus denjenigen Zellen, welche sich in einem durch äußere Faktoren induzierten Differenzierungsprozess befanden, ebenso wie aus denjenigen Zellen, welche sich in einem ebenfalls durch äußere Faktoren induzierten Transdifferenzierungsprozess befanden, wurde zu zwei Zeitpunkten RNA isoliert. Auch das Isolieren und Expandieren in Zellkultur sowie die Differenzierung und Transdifferenzierung wurde im Vorfeld von der Arbeitsgruppe Schütze durchgeführt.

Durch Arrayanalysen wurde die Genexpression der jeweiligen Zellen zu diesen Zeitpunkten im Verlauf des Transdifferenzierungsprozesses bestimmt. Die Durchführung der Arrayanalysen erfolgte durch die Arbeitsgruppe Klein Hitpaß am Institut für Zellbiologie der Universität

Essen, die Auswertung der Resultate erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Kufner der Lehr- und Forschungseinheit Bioinformatik am Lehrstuhl für Informatik der LMU München. Bei dieser Auswertung fanden sich zahlreiche Gene, welche in der einen Transdifferenzierungsrichtung signifikant vermehrt, in der gegenläufigen Richtung jedoch signifikant vermindert reguliert wurden. Die Arrayanalysen wurden wiederholt und eine Rangliste mit folgenden Kriterien erstellt: Gegenläufige Genexpression, relevante, d.h. mindestens 2,5-fache Veränderung derselben und Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse. Bei einigen der Gene dieser Rangliste handelte es sich um bisher unbekannte, sogenannte hypothetische Gene. Die am höchsten bewerteten Genkandidaten wurden ausgewählt, um die vorliegenden Ergebnisse des Array mittels RT-PCR zu reevaluieren.

Als erster Schritt der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe der Seite <http://frodo.wi.mit.edu/> Primer zu den entsprechenden Genkandidaten herausgesucht. Die Spezifität dieser Primer wurde mithilfe der Seite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi> überprüft.

Anschließend sollten mithilfe dieser Primer die bei den ausgewählten Genkandidaten bereits im Array gefundenen Ergebnisse mittels RT-PCR und deren Auswertung erneut bestätigt oder aber Abweichungen von diesen bereits gewonnenen Ergebnissen festgestellt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 RNA-Isolation

Aus humanen Hüftköpfen wurden im Zuge elektiver Eingriffe mesenchymale Stammzellen isoliert und *in vitro* bis zur Konfluenz expandiert. Anschließend erfolgte eine unterschiedliche Weiterbehandlung dieser zunächst undifferenzierten Zellen. Durch Inkubation im osteogenem bzw. adipogenem Differenzierungsmedium wurde die Differenzierung zu Osteoblasten bzw. Adipozyten angestoßen. Bei einem Teil dieser Zellen wurde durch einen Wechsel des Differenzierungsmediums eine Transdifferenzierung induziert.

Die o. g. mesenchymalen Stammzellen wurden in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung bzw. Transdifferenzierung aus der Zellkultur entnommen und ihre jeweilige RNA isoliert. Die für diese Arbeit benötigten Proben wurden bereits im Vorfeld als isolierte und gereinigte RNA zur Verfügung gestellt.

Eine ausführliche Beschreibung der RNA-Proben erfolgt im Kapitel 3.1.

### 2.2 cDNA-Synthese

Aus der RNA wurde zum Zweck der PCR-Etablierung cDNA geschrieben. Es wurden insgesamt 11 unterschiedliche RNA-Proben eingesetzt. Es wurden jeweils 9 µl autoklaviertes HPLC-Wasser (Karl Roth GmbH, Karlsruhe) in 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt und 2 µl der jeweiligen RNA-Suspension zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 11 µl ergab. Zu jeder Lösung wurde 1 µl (1µg/µl) Random-Hexamer (Bioline GmbH, Luckenwalde) sowie 1 µl 10 mM dNTPs (Bioline GmbH, Luckenwalde) gegeben. Die Reaktionsgefäße mit der Lösung wurden im Heizblock 10 min lang bei 70 °C gewärmt, danach 5 min auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Zu jeder Probe wurden 7 µl PCR-Reaktionsmix, bestehend aus jeweils 2,75 µl HPLC-Wasser, 0,25 µl Reverse Transkriptase (Bioline GmbH, Luckenwalde) sowie 4 µl Puffer (Bioline GmbH, Luckenwalde) hinzugefügt und die Lösung mithilfe eines Vortexgerätes gemischt.

Anschließend wurde diese Lösung bei Raumtemperatur 10 min sowie im Heizblock für 50 min bei 42°C und weitere 15 min bei 70° inkubiert. Anschließend wurden jeweils 20 µl HPLC-Wasser hinzugefügt. Das Endvolumen jeder cDNA-Probe betrug 50 µl.

## 2.3 Semiquantitative PCR

### 2.3.1 Normalisierung mit EF1 alpha-PCR

Um die Effizienz der cDNA-Synthese für die verschiedenen Proben zu prüfen, wurde vor Beginn der Experimente mit den ausgewählten Primern und allen elf cDNA Proben eine PCR mit dem in allen Zellen in gleichem Ausmaß exprimierten Haushaltsgen EF1-alpha durchgeführt.

Die Lösungen der sense- und anti-sense Primer (Bioline GmbH, Luckenwalde) wurden aus je 5 µl Primerstocklösung (100 pmol/µl) und 95 µl HPLC-Wasser hergestellt. Es wurde je 1 µl cDNA sowie eine Negativkontrolle mit jeweils 1 µl HPLC-Wasser in ein PCR-Reaktionsgefäß gefüllt und zu jeder Probe 29 µl PCR-Reaktionsmix gegeben. Dieser bestand je Probe aus 22,7 µl HPLC-Wasser, 3µl 10x Puffer, 1 ml 10mM dNTPs, je 1µl (5 pmol/µl) der Primerlösung des sense- und des anti-sense Primers sowie 0,3 µl (5000 U/ml) Taq-Polymerase (Bioline GmbH, Luckenwalde). Die PCR-Röhrchen wurden anschließend in einer Fugeone-Zentrifuge zentrifugiert und nach folgendem Programm in dem auf 94°C vorgeheizten Thermocycler (PTC-200 Peltier thermal cyler, Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf) inkubiert.

Tabelle 2: Ablauf der PCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in min
1	94	3
2	94	0,5
3	Annealing Temperatur	1
4	72	1
5	Gehe zu Schritt 2	x Wiederholungen
6	72	5
7	12	unendlich

3 Annealing Temperatur wurde für jeden Primer individuell festgelegt; 5 Go to Stepp 2 bedeutet die Zyklenzahl, die ebenfalls für jeden Primer individuell festgelegt wurde.



In Schritt 1 wurden die PCR-Röhrchen 3,5 min in dem auf 94°C vorgeheizten Thermocycler inkubiert. In dieser Phase wurde ein Aufbrechen der DNA-Doppelbindung erreicht. Im nächsten Schritt wurde das Gerät auf die jeweilige Annealing Temperatur bzw. wenige Grad Celsius darunter eingestellt, bei welcher die sense- und anti-sense Primer spezifisch an den komplementären Bereich der DNA-Einzelstränge binden. Danach erfolgte bei 72 °C eine Minute lang die Elongation der begonnenen PCR-Produkte. Im darauf folgenden Schritt begann ein neuer Zyklus bei Schritt 1. Dies wiederholte sich entsprechend der erwünschten Zyklenzahl. Nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgte erneut eine dreiminütige Inkubation bei 72°C. Während dieser Zeit konnten unvollständige PCR-Produkte vervollständigt werden.

Im letzten Schritt wurden die entstandenen PCR-Produkte auf 12 °C gekühlt und bis zum manuellen Beenden des Programms bei dieser Temperatur gehalten.

### **2.3.2 Etablierung der PCR der hypothetischen Gene mithilfe von spezifischen Primern**

Alle ausgewählten Primer (siehe Ergebnisteil 3.3) wurden mit den elf cDNA Proben nach dem oben beschriebenen Verfahren der PCR zugeführt. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle zum Ausschluss von Kontamination durchgeführt. Um die PCR für ein bestimmtes, durch einen ausgewählten Primer hergestelltes PCR Produkt zu etablieren, wurde eine RNA Probe ausgewählt, welche im Array für das jeweilige darzustellende Gen eine starke Expression zeigte. Zunächst wurde eine Annealing Temperatur ca. 5°C unter der Schmelztemperatur gewählt und die Zyklenzahl auf 40 eingestellt. Anschließend erfolgte je nach Ergebnis eine Veränderung der Zyklenzahl oder der Temperatur. Bei nicht darstellbaren oder sehr schwachen PCR-Banden im Gelbild wurde das Hilfsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt, um die Brücken zwischen den einzelnen Basenpaaren zu sprengen und die Bindung der Primer an die DNA zu erleichtern.

## **2.4 Densitometrische Auswertung**

### **2.4.1 Ladepuffer**

Es wurden 1,1  $\mu$ l 10-x Ladepuffer in ein PCR-Röhrchen vorgelegt, dazu 9,9  $\mu$ l der jeweiligen, durch RT-PCR entstandenen PCR-Produkte beigefügt und der Inhalt der Röhrchen anschließend mithilfe eines Vortex Gerätes durchmischt. Der 10-x Ladepuffer bestand aus 3 ml Glycerol (absolut), 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 1 ml 10% SDS, 5 mg Bromphenolblau (SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim), 5mg Xylencyanol sowie aus 4 ml Aqua dest.

### **2.4.2 Agarose-Gele**

2 g Agarose (SeaKem, Rockland, USA) wurde in 100 ml kochendem, 0,5x TBE-Puffer gelöst, nach kurzem Abkühlen 5  $\mu$ l Ethidiumbromid hinzugefügt und das flüssige Gel in speziellen Gießvorrichtungen durch mindestens 30 Minuten langes Abkühlen zum Erstarren gebracht. In die durch Kämme entstandenen Taschen wurden 10  $\mu$ l der aus Ladepuffer und PCR-Produkt bestehenden Lösung sowie die PCR-Negativkontrolle (an Stelle von cDNA wurde HPLC-Wasser für die PCR eingesetzt) eingefügt, in die erste Tasche wurden 5  $\mu$ l 100 bp DNA-Leiter gefüllt.

### **2.4.3 Basenpaarleiter**

Es wurden 100  $\mu$ l einer 100 bp DNA-Leiter (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), 100  $\mu$ l 6-x Ladepuffer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und 400  $\mu$ l EDTA 50 mM pH 8,0 gemischt.

#### **2.4.4 Gelelektrophorese**

Das beladene Gel wurde in der Gelkammer mit 0,5-x TBE-Puffer bedeckt. Durch Anlegen einer Gleichstromspannung von 145 V über circa 45 min wanderten die PCR-Produkte in Richtung Pluspol. Anschließend wurde das Gel in einer UV-Kammer (LTF Bio ID, LTF, Wasserburg) belichtet und das Bild gespeichert, anschließend erfolgte mithilfe eines Computerprogrammes die Umrechnung der Intensität in Zahlenwerte. Im Laborjournal wurde ein Bild der aufgenommenen Gelbanden dokumentiert. Die Intensität der jeweilig dokumentierten Gelbande wurden mit der entsprechenden Bande des Haushaltsgenes EF1-alpha abgeglichen. Genauere Erläuterungen hierzu folgen im Ergebnisteil.

## 2.5 Sequenzierung

### 2.5.1 Sequenzierungs-PCR

Für jeden Genkandidaten wurde je ein PCR-Produkt, welches eine Bande mittlerer Intensität aufwies, ausgewählt. Es wurde je 1 µl PCR-Produkt in ein PCR-Röhrchen vorgelegt und 19 µl PCR-Reaktionsmix beigefügt. Dieser setzte sich zusammen aus 4 µl 2,5-facher Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt), 2 µl Big Dye Sequenzierung Buffer (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt), 1 µl Primer ( 5 pmol/µl) entweder sense oder antisense (Operon GmbH, Köln), 1-2 µl PCR-Produkt (cDNA), 11-12 µl HPLC-Wasser (Karl Roth GmbH, Karlsruhe).

Die zur Sequenzierung ausgewählten PCR-Proben wurden unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

Tabelle 3: PCR zur Sequenzierung

Schritt	Temperatur in °C	Dauer in sec
1	94	240
2	94	30
3	50	60
4	60	60
5	Schritt 1 - 4 24-mal wiederholen	
5	72	300
6	12	unendlich

Die PCR Bedingungen wurden analog zu Kapitel 2.3.1 durchgeführt.

### 2.5.2 Aufreinigung

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe von speziellen Säulen (NucleoSeq, Macherey und Nagel GmbH, Düren) von freien Nukleotiden und anderen Bestandteilen des PCR-Reaktionsmixes gereinigt.

Diese Säulen wurden zunächst mit Auffangröhrchen versehen und 30 s lang bei 3500 U/min zentrifugiert, um das trockene Gel in der Säule zu sammeln.

Anschließend wurden 600 µl HPLC-Wasser in jedes Röhrchen gefüllt, diese kurz mithilfe eines Vortex Gerätes geschüttelt und die Säulen im Anschluss daran mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das Gel aufquellen zu lassen. Nach mehrfachem Invertieren der Gelmatrix wurde der Verschluss am unteren Ende der Säule abgebrochen und die Säulen anschließend erneut in ein Auffangröhrchen platziert, 2 min bei 3500 U/min zentrifugiert und das Auffangröhrchen mit dem „Lagerungspuffer“ verworfen.

Die Säule wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und max. 20 µl des gewonnenen Sequenzierungs-PCR-Produktes (siehe Kapitel 2.6.1) tropfenweise auf die Mitte der Säule gegeben, anschließend wurde erneut 5 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Danach wurde die Säule verworfen.

### **2.5.3 Ethanolfällung**

Nach der Reinigung über die Säule wurde das Eluat mit dem Sequenzierungs-PCR-Produkt mit 3 µl 3M Na-Acetat (pH 4,3) und 80 µl 100% Ethanol versetzt, der Inhalt der Reaktionsgefäße mithilfe eines Vortexgerätes gemischt und 15 min bei Raumtemperaturen inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße 20 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zu den im Gefäß verbliebenen Pellets (DNA-Partikel) jeweils 250 µl 70% unvergällter Ethanol gegeben. Die Lösung wurde 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand erneut abgenommen und die Pellets bei offenem Deckel der Reaktionsgefäße ca. 5 min lang getrocknet. Anschließend wurde jedes Pellet in 15 µl Template Sequencing-Reagenz (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) gelöst und die Suspension in ein Sequenzierungsgefäß der Firma Applied Biosystems gegeben. Die Sequenzierungsgefäße wurden im Thermocycler zur Denaturierung der DNA für 4 min bei 94 °C inkubiert und die Proben zum

Abkühlen 2 bis 3 min auf Eis gelagert und im Anschluß daran in das Sequenzierungsgerät (Abi Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) gestellt.

#### **2.5.4 Sequenzierung**

Die Resultate der Sequenzierungs-PCR wurden mithilfe einer speziellen Software (Biocapt MV) analysiert.

Die Homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ermöglichte einen Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit den in Datenbanken dokumentierten DNA-Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/MEGABLAST> oder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide-Nucleotide>) bzw. mit der Sequenz des erwarteten PCR-Produktes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>). Falls eine hohe Übereinstimmung vorlag und keine anderen Gene detektiert wurden, wurde die PCR-Reaktion und die Etablierung des Genkandidaten als erfolgreich bewertet.

Wenn die Übereinstimmung zwischen den erwarteten und erhaltenen Sequenzen zu gering ausfiel, wurde die Sequenzierungs-PCR mit dem nicht benutzten Primer (sense oder anti-sense) wiederholt. Das entstandene PCR-Produkt wurde erneut sequenziert und die DNA-Sequenz mit der erwarteten Basenpaarabfolge verglichen.

### 3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, die für die Transdifferenzierung von MSCs verantwortlichen Gene näher zu untersuchen und die bei diesem Prozess entscheidenden Gene zu bestimmen.

Im Vorfeld wurden dazu MSCs in osteogenem und adipogenem Medium zu Adipozyten- und Osteoblastenvorläuferzellen kultiviert. Durch einen Mediumswechsel wurde bei einem Teil dieser Vorläuferzellen ein Transdifferenzierungsprozess eingeleitet. So wurden Adipozytenvorläuferzellen osteogen, Osteoblastenvorläuferzellen hingegen adipogen transdifferenziert.

Aus den Vorläuferzellen sowie aus den jeweils transdifferenzierten Zellen wurden zu zwei festen Zeitpunkten RNA entnommen und das genetische Expressionsmuster dieser RNA mittels Microarray analysiert. In der RNA derjenigen Zellen, welche eine Transdifferenzierung durchlaufen hatten, konnte bei zahlreichen Genen im Vergleich zu den weiterhin differenziierten Zellen eine signifikante, d.h. mindestens 2,5-fache Veränderung der Expression zahlreicher Gene nachgewiesen werden.

Von besonderem Interesse waren diejenigen Gene, bei welchen diese Veränderung darüber hinaus in den beiden Transdifferenzierungsrichtungen gegenläufig vorlag. Außerdem musste die Veränderung auch bei Wiederholung des Arrays reproduzierbar bleiben. Aus den Kriterien der signifikanten Veränderung, der Reproduzierbarkeit und dem reziproken Verhältnis der Veränderung in beiden Transdifferenzierungsrichtungen wurde ebenfalls im Vorfeld eine Rangliste erstellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus dieser Rangliste einige Genkandidaten auszusuchen und die durch Arrayanalysen gewonnenen Erkenntnisse mithilfe von geeigneten Primern und PCR zu bestätigen.

Die somit gewonnenen Erkenntnisse sollten dazu beitragen, weitere, u. a. funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung dieser Gene innerhalb des Transdifferenzierungsprozesses zu ermöglichen und Aufschlüsse über degenerative Prozesse im Knochenstoffwechsel zu erhalten.

### 3.1 RNA

Für die Arrays und die PCRs wurde in cDNA umgeschriebene RNA verwendet. Diese RNA wurde im Vorfeld aus Zellen in unterschiedlichen Phasen des Transdifferenzierungs- bzw. Differenzierungsprozesses isoliert. Diese Zellen waren ursprünglich mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus humanen Hüftköpfen.

Diese MSCs wurden vor Beginn der hier vorliegenden Arbeit *in vitro* nach folgendem Schema weiterbehandelt:

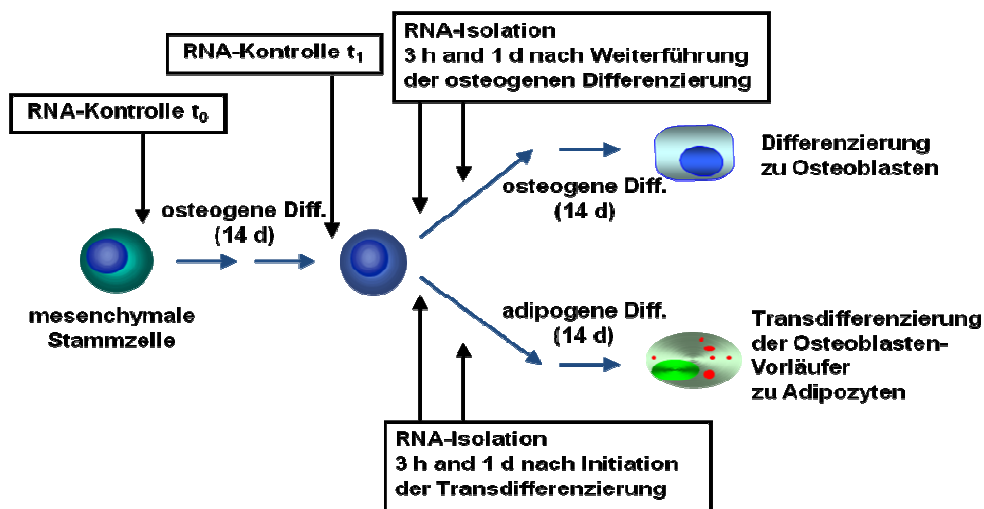


Abbildung 6: RNA-Isolation während der Transdifferenzierung – Osteoblast (OB) zu Adipozyt (AC)



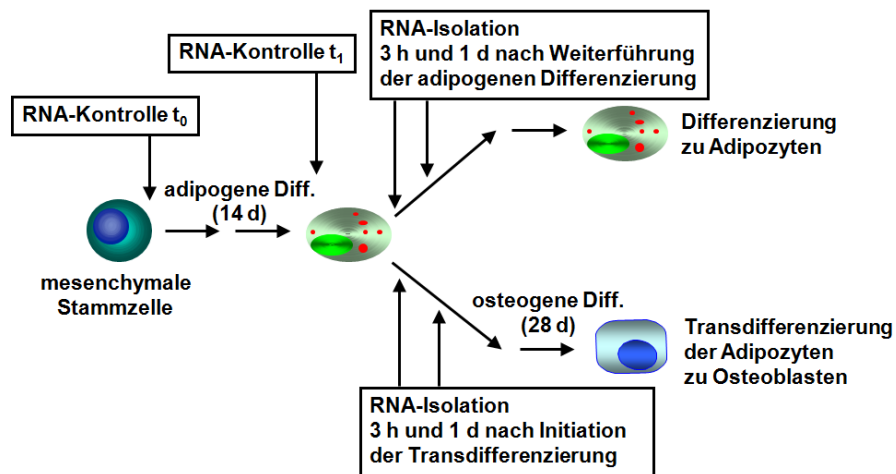


Abbildung 7: RNA-Isolation während der Transdifferenzierung – Adipozyt(AC) – Osteoblast (OB)

Es wurden insgesamt 11 cDNA Proben für die PCR eingesetzt und die Daten densitometrisch ausgewertet.

RNA 29 wurde mesenchymalen Stammzellen entnommen, RNA 30 wurde mesenchymalen Stammzellen entnommen, welche in einem Nährmedium 14 d osteogen differenziert wurden. RNA 31 entstammt mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d und 3 h osteogen differenziert wurden. RNA 32 entstammt mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d osteogen differenziert und 3 h adipogen transdifferenziert wurden.

RNA 33 wurde mesenchymalen Stammzellen entnommen, welche 14 d und 24 h osteogen differenziert wurden, RNA 34 mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d osteogen, danach 24 h adipogen transdifferenziert wurden. RNA 35 entstammt mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d adipogen differenziert wurden, RNA 36 mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d und 3 h adipogen differenziert wurden.

RNA 37 entstammt mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d adipogen differenziert und danach 3 h osteogen transdifferenziert wurden. RNA 38 entstammt mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d und 24 h adipogen differenziert wurden. RNA 39 entstammt mesenchymalen Stammzellen, welche 14 d adipogen differenziert, danach 3 h osteogen transdifferenziert wurden.

Die isolierte RNA bzw. cDNA wurde zu zwei Zeitpunkten sowohl im Array als auch durch PCR und Densitometrie untersucht. Der erste Zeitpunkt war 3 h nach Initiierung der Transdifferenzierung bzw. in der Kontrollprobe 3 h oder 24 h nach Weiterführung der Differenzierung (RNA 31, 32, 33, 34).

Der zweite Zeitpunkt war 24 h nach Initiierung der Transdifferenzierung bzw. 24 h nach Weiterführung der Differenzierung (RNA 36, 37, 38).

### 3.2 Primerauswahl

Folgende Primer konnten mithilfe der Seite <http://frodo.wi.mit.edu/> als spezifisch für die ausgewählten Genkandidaten gefunden werden.

Tabelle 4: Primer im Überblick

	Kompletter Name	Sense-Primer	Antisense-Primer	Datenbankeintrag (refseq oder andere Datenbank) <sup>49,50</sup>	Länge des bp-Produktes
1	MGC45780	GGGGTGGGGAGTAGGAAT AA	GTTTGAGATTCCCCCAAG GT	NM_173833.3	194
2	LOC144347	GAAGAAGCCTCTCAGCCG TA	AGAGTTGCAGCGGATCTC AT	NM_181709.2	164
3	LOC283824	TCACGTTGTCTTTGGCTCT G	GATGGGAGAAGCAAGTTG GA	LOC283824	197
4.	C6orf85	ATTTTGCCTGGCTGGAATC	TAGAGCAGCATGAGCAGG AA	NM_021945	204
5	AW97	CACCCACGGAAAAGGTAA TG	AAGATCATTGCCTCCCCTC T	AW976035	188
6	AA74	AATTTACACCCTGCCCAA T	CCAAGATCGCACCATTAC AC	AA740632	172
7	DKFZ434	CATCTTCGGTTGGA CTGC TT	GAGCCACTGGTATTTGGT TGA	NM_015621	203
8	AW27	ATCAAAGCGACCCAAATG AC	GCTTGGCGAAACCTCATT AC	AW274846.1	193
9	C7orf10	GGAGCAGGAAATAACCAG CA	GGACTCCACTGCCTTCAA AA	NM_024728	193
10	AA166	CGTGATTAGCCTTCTTCAG CA	GGTAAGGATGTACAGGAA AAATCA	NT_010718.15	193
11	BG25	TTTGGAAAACAAAACACAC CA	AAAACAGACCCATGGCAC AC	BG252802	173

<sup>49</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

<sup>50</sup> [www.genecards.org](http://www.genecards.org)

Ergebnisse

	Kompletter Name	Sense-Primer	Antisense-Primer	Datenbankeintrag (refseq oder andere Datenbank) <sup>49,50</sup>	Länge des bp-Produktes
12	C10orf3	AAGAAGGGCAGATGTGCA AC	ATGCCTGCATCTGTTGTTC	NM_018131	219
13	FLJ46	GTTTCATGCCGCCTGATGA C	TCTCCGGGTGGTAGAACT TG	NT_025741.13	155
14	FLJ21	CCATAAACGACCACAAAAT GC	ACTGCTTTCCACCCTCTGCA A	NM_024788.2	192
15	DKFZp76	CATCTTCGGTTGGACTGC TT	GAGCCACTGGTATTTGGT TGA	NM_001008495	256
16	LOC34	GAGCAGGCCAAACTCTTC TG	TGATGAGGAGCTCAGGCT CT	NM_198282.1	241
17	FLJ13	CAGGACATGCCCTTTTCT A	TTTCTCCGATCTCCATCCA C	NM_032181	150
18	FLJ37	TGGGGATGGAGATGTTTG AT	GAGCAAGCTGGTCTGGAA AG	GenelD:151176?	172
19	BOC	CGTTGGCTTCAGACCTTT GT	TTCATCCTTGAGGTTCCA C	ENSG000001448 57	222
20	AK001	CTGATGAGCTACGCAAAC CA	CCAAGAATAAACGGGCAA GA	gi 7022018?	240
21	c1orf110	AGTTCCAGCCCAGCTAGT GA	AAGGCACCCTGTTTTCACA C	c1orf110 = MGC48998	308
22	AI73	ATTTGAGGTGGGCAAAGA TG	GCCATGCCATGAATAGGA GT	AI739132	198
23	KIAA1199	ATAACAACGTGACCGGCA TT	CTCCAGTCGGGAACATTG AT	NM_018689	223
24	AI590	CGTGCCATCAGTCCTACA AA	TGTTTCATGCAGAAGCAAA GG	gi 4599238	310
25	DRE1-LOC33	TGTTTGTGATTGGTGGAG GA	GTTTTCTGACGGCTGAAT G	LOC339924	242

### 3.3 PCR-Etablierung

Insgesamt konnte bei 23 von 25 Genkandidaten mithilfe der ausgewählten Primer ein PCR-Produkt gewonnen werden.

Ein weiteres Gen (DRE1) konnte mit der cDNA Probe, welche im Array das stärkste Signal aufwies, zunächst erfolgreich etabliert werden. Beim Durchführen der PCR-Reaktion mit allen elf cDNAs war jedoch kein reproduzierbares Ergebnis zu erzielen, obwohl Fehler so weit als möglich ausgeschlossen wurden. Es wurde somit als nicht erfolgreich etabliert bewertet.

Für 22 hypothetische Genkandidaten konnte somit eine reproduzierbare PCR-Reaktion aller cDNA-Proben etabliert werden.

Bei 2 von den o. g. 25 hypothetischen Genen, den Genkandidaten LOC144347 und LOC283824 konnte kein PCR Produkt etabliert werden. Dies gelang auch unter Zuhilfenahme des Mittels DMSO zum Eröffnen der Basenpaarbindungen und Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Primerbindung nicht.

Bei 2 von den o. g. 25 hypothetischen Genen, den beiden Genkandidaten AA740632 und FLJ21062 zeigte sich jedoch in der Sequenzierung der PCR-Produkte, dass das erhaltene nicht mit dem erwarteten PCR-Produkt übereinstimmte. Hierauf wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

In der folgenden Tabelle sind alle Genkandidaten aufgelistet, dazu die spezifischen Primersequenzen, die Länge des erwarteten Basenpaarproduktes und die definitive Anzahl der Zyklen.

Tabelle 5: Übersicht aller Genkandidaten und Primer

	Kompletter Name	Annealing-Temperatur (in°C)	Anzahl der Zyklen	Sense-Primer	Antisense-Primer	Länge des bp-Produktes	Resultat
1.	LOC144347	50	40	GAAGAAGCCTCTCAG CCGTA	AGAGTTGCAGCGGAT CTCAT	164	Kein PCR Produkt etablierbar
2.	LOC283824	50	40	TCACGTTGTCTTTGG CTCTG	GATGGGAGAAGCAA GTTGGA	197	Kein PCR Produkt etablierbar
3.	MGC45780	55	33	GGGGTGGGGAGTAG GAATAA	GTTTGAGATTCCCCC AAGGT	194	erfolgreich
4.	C6orf85	53	40	ATTTTGCCTGGCTGG AATC	TAGAGCAGCATGAGC AGGAA	204	erfolgreich
5.	AW97	55	38	CACCCACGGA AAAAG GTAATG	AAGATCATTGCCTCC CCTCT	188	erfolgreich
6.	AA74	53	38	AATTTACACCCTGCC CCAAT	CCAAGATCGCACCAT TACAC	172	Sequenz. nicht erfolgreich
7.	DKFZ434	55	34	CATCTTCGGTTGGAC TGCTT	GAGCCACTGGTATTT GGTTGA	203	erfolgreich
8.	AW27	53	38	ATCAAAGCGACCCAA ATGAC	GCTTGCGGAAACCTC ATTAC	193	erfolgreich
9.	C7orf10	55	39	GGAGCAGGAAATAAC CAGCA	GGACTCCACTGCCTT CAAAA	193	erfolgreich
10	AA166	55	42	CGTGATTAGCCTTCT TCAGCA	GGTAAGGATGTACAG GAAAAATCA	193	erfolgreich
11	BG25	50	39	TTTGGAAAAACAAAAC ACACCA	AAAACAGACCCATGG CACAC	173	erfolgreich
12	C10orf3	55	38	AAGAAGGGCAGATGT GCAAC	ATGCCTGCATCTGTT GTTC	219	erfolgreich
13	FLJ46	55	40	GTTTCATGCCGCCTGA TGAC	TCTCCGGGTGGTAGA ACTTG	155	erfolgreich
14	FLJ21	55	34	CCATAAACGACCACA AAATGC	ACTGCTTTCACCCTC TGCAA	192	Sequenz. nicht erfolgreich

Ergebnisse

	Kompletter Name	Annealing-Temperatur (in°C)	Anzahl der Zyklen	Sense-Primer	Antisense-Primer	Länge des bp-Produktes	Resultat
15	DKFZp76	60	33	CATCTTCGGTTGGAC TGCTT	GAGCCACTGGTATTT GGTTGA	256	erfolgreich
16	LOC34	55	39	GAGCAGGCCAAACTC TTCTG	TGATGAGGAGCTCAG GCTCT	241	erfolgreich
17	FLJ13	55	36	CAGGACATGCCCTT TTCTA	TTTCTCCGATCTCCA TCCAC	150	erfolgreich
18	FLJ37	55	38	TGGGGATGGAGATGT TTGAT	GAGCAAGCTGGTCTG GAAAG	172	erfolgreich
19	BOC	55	39	CGTTGGCTTCAGACC TTTGT	TTCATCCTTGGAGGT TCCAC	222	erfolgreich
20	AK001	56	36	CTGATGAGCTACGCA AACCA	CCAAGAATAAACGGG CAAGA	240	erfolgreich
21	c1orf110	55	41	AGTTCCAGCCCAGCT AGTGA	AAGGCACCCTGTTTT CACAC	308	erfolgreich
22	AI73	55	33	ATTTGAGGTGGGCAA AGATG	GCCATGCCATGAATA GGAGT	198	erfolgreich
23	KIAA1199	55	36	ATAACAACGTGACCG GCATT	CTCCAGTCGGGAACA TTGAT	223	erfolgreich
24	AI590	55	34	CGTGCCATCAGTCCT ACAAA	TGTTTCATGCAGAAGC AAAGG	310	erfolgreich
25	DRE1-LOC33	55	38	TGTTTGTGATTGGTG GAGGA	GTTTTCTGACGGCT GAATG	242	Kein reproduzierbares PCR Produkt

### **3.4 Überprüfung der Spezifität der PCR Produkte**

Bei 2 der 22 erfolgreich etablierten Primer entstand ein PCR-Produkt, welches nicht mit dem erwarteten identisch war. Dies waren die Genkandidaten AA47 und FLJ21.

Bei den anderen 20 Primerpaaren entstand das PCR Produkt, welches der jeweils erwarteten DNA-Sequenz entsprach. Somit konnte bei 20 von insgesamt 25 Primern erfolgreich PCR Produkte etabliert werden.

### **3.5 Untersuchung des Expressionsmusters innerhalb der transdifferenzierten Proben**

Für alle 11 cDNA Proben in den unterschiedlichen Phasen des Differenzierungsprozesses und des Transdifferenzierungsprozesses wurde mithilfe der o. g Primer PCR-Reaktionen durchgeführt. Die entstandenen Gelbanden wurden densitometrisch vermessen und ausgewertet.

Bei einigen der Kandidatengene zeigte sich bei der Auswertung eine hohe Übereinstimmung zwischen den Daten der Densitometrie und denen des Arrays. Dies soll durch die folgenden Beispiele veranschaulicht werden.

#### **3.5.1 Untersuchung des Expressionsmusters in Array und Densitometrie am Beispiel des hypothetischen Genes FLJ46041**

Etablierung einer PCR für das hypothetische Gen FLJ46:

In der unten stehenden Tabelle sind die in der UV-Kammer gemessenen Intensitäten der Gelbanden der PCR Produkte (dies sind die DNA-Abschnitte, welche zwischen den spezifischen Primern für ein hypothetisches Gen liegen) in Zahlenwerte umgerechnet.

Wie bereits in Kapitel 2.3 geschildert, wurden alle Rohwerte mit der dazugehörigen EF1 alpha PCR abgeglichen.



Je stärker die Intensität der Gelbände, desto höher der Zahlenwert in der unten aufgeführten Spalte „Wert“.

Aus dem Zahlenwert der transdifferenzierten Probe (cDNA Nr. 32, 34, 37, 39, im Gelbild Bande Nr. 4, 6, 9, 11) und demjenigen der differenzierten Zellen (cDNA 31, 33, 36, 38, im Gelbild Bande Nr. 3, 5, 8, 10) wurde ein Quotient gebildet.

Falls dieser Quotient einen Wert  $< 1$  ergab, wurde dieser in seinen negativen Kehrwert umgeschrieben. Somit entstand für eine geringere Expression des Gens in den transdifferenzierten Proben ein negativer Zahlenwert, welcher sich im Diagramm als x-fache Regulation, in diesem Fall negativ, veranschaulichen lässt.

Anschließend wurde eine Übereinstimmung oder Abweichung mit den Ergebnissen des Array festgestellt.

Der erste Zahlenwert der EF1-alpha PCR, cDNA 29, hier die Zahl 25056, wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt. Alle weiteren Zahlenwerte der EF1 alpha PCR wurden durch diesen Maßstab, den Betrag 25056, dividiert. Somit entstanden für die jeweilige cDNA-Proben Zahlenwerte von 0,86 -2,06. Diese befinden sich in der Spalte „EF1 alpha Abgleich“.

Die Rohwerte, d.h. die Zahlenwerte derjenigen PCR-Produkte, welche einen cDNA-Abschnitt des hypothetischen Gens FLJ 46 in den Gelbänden zeigen, wurden wiederum durch diese Zahlenwerte dividiert.

In dem oben beschriebenen Fall liegt eine hohe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Array und denen der Densitometrie vor.

Verglichen wurden die Werte der transdifferenzierten mit denjenigen der weiterhin differenzierten Probe. In diesem Fall liegt zu den vier Vergleichsmomenten eine Übereinstimmung vor. Eine signifikante, d.h. mehr als +2,5 -fache oder - 2,5 -fache Veränderung der Signalintensität im Array wird durch eine vermehrte oder verminderte Intensität in den Gelbänden bestätigt.



Abbildung 8: Gelbanden der PCR-Produkte der hypothetischen Gene FLJ46041

ost.: osteogenes Medium, adp.: adipogenes Medium

1: mesenchymale Stammzellen (MSC)

2: 14 d ost.

3: 14 d ost. + 3 h ost.

4: 14 d ost. + 3 h adp.

5: 14 d ost. + 24 h ost.

6: 14 d ost. + 24 h adp.

7: 14 d adp.

8: 14 d adp. + 3 h adp.

9: 14 d adp. + 3 h ost.

10: 14 d adp. + 24 h adp.

11: 14 d adp. + 24 h ost.

Densitometrisch vermessen wurden die Ergebnisse der Gelbanden Nr. 3 - 6 und Nr. 8- 11

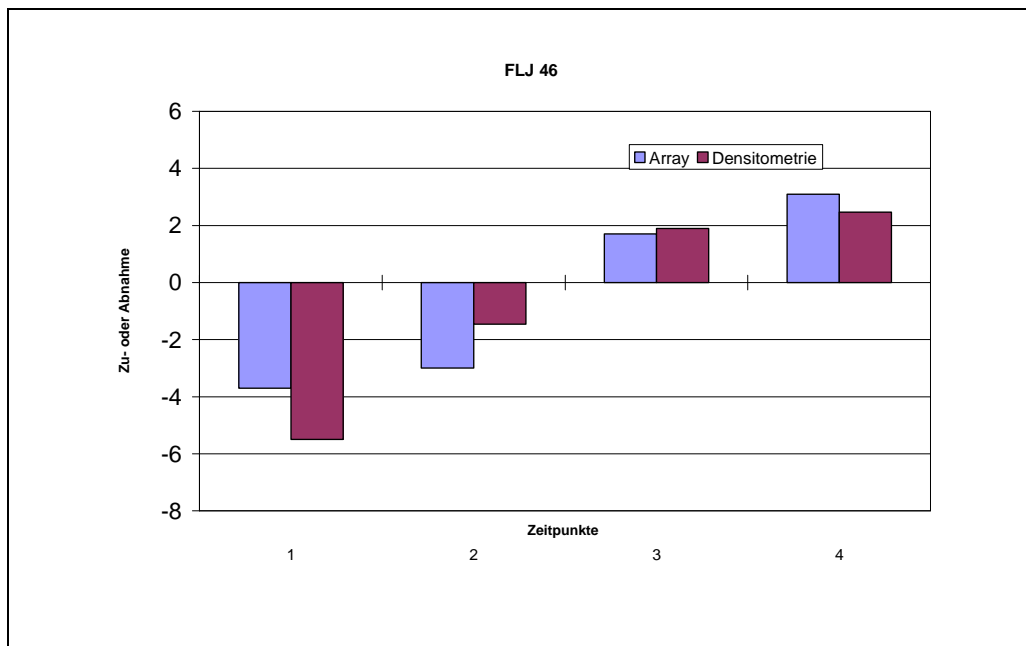


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Ergebnisse des hypothetischen Gens FLJ46

Zeitpunkt 1: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 3 h osteogener Differenzierung und 14 d osteogener Differenzierung und 3h adipogener Transdifferenzierung

Zeitpunkt 2: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 24 h osteogener Differenzierung und 14 d osteogener Differenzierung und 24 h adipogener Transdifferenzierung

Zeitpunkt 3: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 3 h adipogener Differenzierung und 14 d adipogener Differenzierung und 3 h osteogene Transdifferenzierung

Zeitpunkt 4: a Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden us cDNA Proben nach 14 d und 24 h adipogener Differenzierung und 14 d adipogener Differenzierung und 24 h osteogener Transdifferenzierung

### 3.5.2 Untersuchung des Expressionsmusters in Array und Densitometrie am Beispiel des hypothetischen Genes AI73

Etablierung einer PCR für das hypothetische Gen AI73:

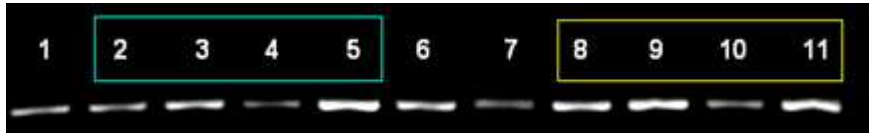


Abbildung 10: Gelbanden der PCR Produkte für das hypothetische Gen AI73

ost.: osteogenes Medium, adp.: adipogenes Medium

1: mesenchymale Stammzellen (MSC)

2: 14 d ost.

3: 14 d ost. + 3 h ost.

4: 14 d ost. + 3 h adp.

5: 14 d ost. + 24 h ost.

6: 14 d ost. + 24 h adp.

7: 14 d adp.

8: 14 d adp. + 3 h adp.

9: 14 d adp. + 3 h ost.

10: 14 d adp. + 24 h adp.

11: 14 d adp. + 24 h ost.

Densitometrisch vermessen wurden die Ergebnisse der Gelbanden Nr. 3-6 und Nr.8-11.

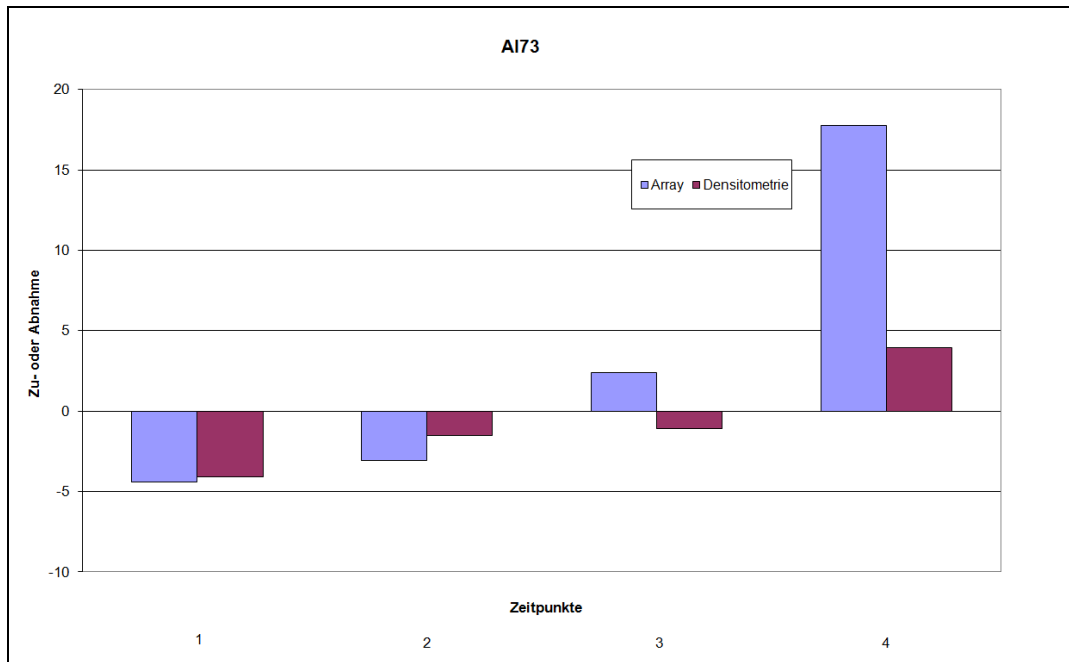


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Ergebnisse des hypothetischen Gens AI73

Zeitpunkt 1: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 3 h osteogener Differenzierung und 14 d osteogener Differenzierung und 3h adipogener Transdifferenzierung

Zeitpunkt 2: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 24 h osteogener Differenzierung und 14 d osteogener Differenzierung und 24 h adipogener Transdifferenzierung

Zeitpunkt 3: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 3 h adipogener Differenzierung und 14 d adipogener Differenzierung und 3 h osteogene Transdifferenzierung

Zeitpunkt 4: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 24 h adipogener Differenzierung und 14 d adipogener Differenzierung und 24 h osteogener Transdifferenzierung

### 3.5.3 Untersuchung des Expressionsmusters in Array und Densitometrie am Beispiel des hypothetischen Genes AW27

Etablierung einer PCR für das hypothetische Gen AW27:



Abbildung 12: Gelbanden der PCR-Produkte der hypothetischen Gene FLJ46041

ost.: osteogenes Medium, adp.: adipogenes Medium

1: mesenchymale Stammzellen (MSC)

2: 14 d ost.

3: 14 d ost. + 3 h ost.

4: 14 d ost. + 3 h adp.

5: 14 d ost. + 24 h ost.

6: 14 d ost. + 24 h adp.

7: 14 d adp.

8: 14 d adp. + 3 h adp.

9: 14 d adp. + 3 h ost.

10: 14 d adp. + 24 h adp.

11: 14 d adp. + 24 h ost.

Densitometrisch vermessen wurden die Ergebnisse der Gelbanden Nr. 3 -6 und Nr. 8 - 11

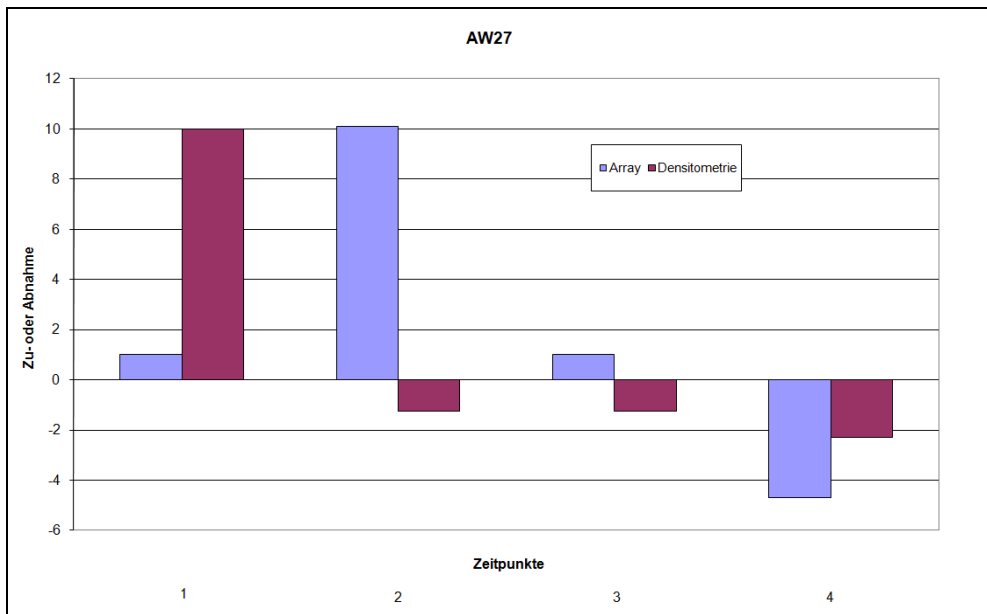


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Ergebnisse des hypothetischen Gens AW27

Zeitpunkt 1: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 3 h osteogener Differenzierung und 14 d osteogener Differenzierung und 3h adipogener Transdifferenzierung

Zeitpunkt 2: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 24 h osteogener Differenzierung und 14 d osteogener Differenzierung und 24 h adipogener Transdifferenzierung

Zeitpunkt 3: Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden aus cDNA Proben nach 14 d und 3 h adipogener Differenzierung und 14 d adipogener Differenzierung und 3 h osteogene Transdifferenzierung

Zeitpunkt 4: a Regulation der Expression des Genproduktes berechnet aus den optische Dichten der PCR-Banden us cDNA Proben nach 14 d und 24 h adipogener Differenzierung und 14 d adipogener Differenzierung und 24 h osteogener Transdifferenzierung

### 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von 25 hypothetischen Genkandidaten konnten 20 durch spezifische Primer mittels PCR erfolgreich etabliert, sequenziert und densitometrisch ausgewertet werden.

Die erhobenen Daten wurden mit im Vorfeld angefertigten Arrayanalysen verglichen.

Dieser Vergleich wurde für DNA-Proben aus Zellen der Transdifferenzierungsrichtung Osteoblast-Adipozyt und für DNA-Proben aus Zellen der gegenläufigen Transdifferenzierungsrichtung, Adipozyt-Osteoblast zu jeweils zwei Zeitpunkten (3h und 24h nach Beginn der Transdifferenzierung) vorgenommen. Ergab sich im Array bei einem Genkandidaten zu einem oder zu beiden Zeitpunkten zwischen der transdifferenzierten und differenzierten Probe keine oder eine weniger als 2,5-fache und somit nicht signifikante Veränderung, wurde dieser fehlende oder nicht signifikante Wert im Verlauf der Umrechnung als „not available“ bzw. als 1 bezeichnet. Das Gen konnte deswegen zu einem oder zu beiden Zeitpunkten nicht in den Vergleich miteinbezogen werden.

Es konnten 20 Genkandidaten zu jeweils zwei Zeitpunkten und in zwei Transdifferenzierungsrichtungen untersucht werden. Dies entspricht insgesamt 80 Vergleichsmomenten. Durch die o. g. Bedingungen mussten jedoch einige Vergleichsmomente aus der Bewertung genommen werden.

Für die **Transdifferenzierungsrichtung Osteoblast-Adipozyt** konnten 24 Vergleichsmomente gewertet werden.

Für den Zeitpunkt 3 h nach Beginn der Transdifferenzierung ergab sich eine Übereinstimmung von 4 bei insgesamt 7 Vergleichswerten, dies entspricht 57 %.

Für den Zeitpunkt 24 h nach Beginn der Transdifferenzierung ergab sich eine Übereinstimmung von 12 bei insgesamt 17 Vergleichspunkten, dies entspricht 71 %.

Insgesamt zeigten sich bei dieser Transdifferenzierungsrichtung bei 16 von 24 Vergleichsmomenten eine Übereinstimmung zwischen den Werten des Arrays und denen der Densitometrie, dies entspricht einer Quote von 67 %.

Für die **Transdifferenzierungsrichtung Adipozyt-Osteoblast** konnten 25 Vergleichsmomente gewertet werden.

Für den Zeitpunkt 3 h nach Beginn der Transdifferenzierung ergab sich eine Übereinstimmung von 5 bei insgesamt 7 Vergleichspunkten. Dies entspricht einer Quote von 70 %.



Für den Zeitpunkt 24 h nach Beginn der Transdifferenzierung ergab sich eine Übereinstimmung von 10 von insgesamt 18 Vergleichspunkten. Dies entspricht einer Quote von 55 %. Insgesamt zeigten sich bei dieser Transdifferenzierungsrichtung bei 15 von 25 Vergleichsmomenten eine Übereinstimmung zwischen den Werten des Arrays und denen der Densitometrie.

Die nachfolgende Tabelle fasst die gewonnenen Ergebnisse zusammen. Dabei zeigt sich bei folgenden Genkandidaten eine hohe Übereinstimmung der Daten aus Array und Densitometrie: AI73, DKFZp434, C7orf10, AA166, FLJ46, LOC34, KIAA1199 und FLJ13.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse

Hypothe-tisches Gen	Ergebnisse des Array OB-AC (3 h)	Ergebnisse des Array OB-AC (24 h)	Ergebnisse des ArrayAC-OB (3 h)	Ergebnisse des Array AC-OB (24 h)	Ergebnisse der Densitometrie OB-AC (3 h)	Ergebnisse der Densitometrie OB-AC (24 h)	Ergebnisse der Densitometrie AC-OB (3 h)	Ergebnisse der Densitometrie AC-OB (24 h)	Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen des Array und der densitometrischen Auswertung
MGC45780	2,1	13,9	n.a.	-3,6	-2,38	1,85	1,28	1,76	1v3
c6orf85	n.a.	6,7	n.a.	-5,2	-2,28	4,85	2,26	3,3	1 v. 2
AW97	n.a.	n.a.	n.a.	-3,1	9,38	1,39	1,46	1,75	0 v.1
AI73	-4,38	-3,07	2,4	17,75	-4,11	-1,51	-1,11	3,97	3 v.4
DKFZp434	n.a.	3,5	-1,4	-3,2	-1,55	1,35	-1,99	1,78	2 v. 3
AW27	n.a.	10,1	n.a.	-4,7	9,98	-1,26	-1,24	-2,29	1v.2
C7orf10	n.a.	-2,8	n.a.	2,8	2,13	-1,04	1,28	2,53	2v.2
AA166	n.a.	-4	1,4	6,5	-2,26	-1,13	4,34	64,3	3 v.3
CHMP 1.5	2,5 3,1 2,6	2,3 2,6 1,0	-1,5 1/1	-2,2 -2,3 -14,2	-5,37	1,03	1,18	4,55	1 v.4
BG25	n.a.	-5,9	n.a.	4,2	0	4,93	1,3	2,45	1 v2.
c10orf3	n.a.	n.a.	n.a.	6,8	0	4,93	1,3	2,45	1v.1
FLJ46	-3,7	-3	1,7	3,1	-5,5	-1,46	1,89	2,47	4 v.4
DKFZp76	1	1,7 1,9 1	n.a.	-2,2 -1,8 -1,7	-1,36	-2,73	1,33	1,77	0 v.2
LOC34	n.a.	-2,4	n.a.	5,5	-1,22	-2,5	8,52	4,99	2 v.2
KIAA1199	n.a.	-1,4 -2,4	n.a.	3,8 3,9	1,02	-1,12	-1,02	1,61	2 v.2
FLJ37	n.a.	-2,97	3,73	19,29	n.a.	n.a.	1,32	-1,63	1 v.3
FLJ13	-3,4	-3,7	n.a.	19,4	-2,37	-63,52	1,55	16,22	3 v.3
BOC	n.a.	n.a.	-1,16	-3,25	n.a.	-1,98	-1,08	1,39	1v.2
AK001	-2,91	-3,86	n.a.	n.a.	-1,42	1,16	-1,07	1,05	1 v.2
c10orf110	-14,93	-24,76	n.a.	n.a.	5	-10,1	2,64	-1,08	1 v.2

*Ergebnisse*

	4 v. 7	12 v. 17	5 v. 7	10 v. 18					31/ 49
in %	57	71	71	56					63
Hypothe-tisches Gen	Ergebnisse des Array OB-AC (3 h)	Ergebnisse des Array OB-AC (24 h)	Ergebnisse des Array/AC-OB (3 h)	Ergebnisse des Array AC-OB (24 h)	Ergebnisse der Densitometrie OB-AC (3 h)	Ergebnisse der Densitometrie OB-AC (24 h)	Ergebnisse der Densitometrie AC-OB (3 h)	Ergebnisse der Densitometrie AC-OB (24 h)	Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen des Array und der densitometrischen Auswertung

OB- AC: Transdifferenzierung von osteogen zu adipogen; AC- OB: Transdifferenzierung von adipogen zu osteogen; die Zeitpunkte 3 h entsprechen 3 h nach Initiierung der Transdifferenzierung, die Zeitpunkte 24 h entsprechen 24 h nach Initiierung der Transdifferenzierung; die Spalte Übereinstimmungen enthält die Anzahl der Vergleichsmomente (siehe Text) mit übereinstimmenden Regulationen im Array und der RT-PCR; die Zahlenwerte in der Spalte Array bedeuten logarithmische Verstärkung (Signal log ratio) des Array Signales; die Zahlenwerte in der Spalte Densitometrie x- fache Regulation des PCR Produktes

## 4. Diskussion

Bei degenerativen Prozessen des menschlichen Körpers kommt es auf zellulärer Ebene zu Veränderungen oder verminderter Ausprägung bestimmter Gewebetypen. Dies hat zur Folge, dass dem gesamten Organismus oder aber einzelnen Organen weniger funktionsfähiges Gewebe zur Verfügung steht. So werden im erhöhten Lebensalter eines Organismus weniger Knochenzellen und vermindert Knochenmasse gebildet. Anstelle dessen kommt es zur adipogenen Degeneration und somit zu vermehrter Ausbildung von Fettzellen anstelle von Knochenzellen. Dieser Vorgang trägt beim Menschen zum Krankheitsbild der Osteoporose bei.

Die Transdifferenzierung von Knochenvorläuferzellen hin zu Fettzellen unterliegt zahlreichen molekularen Prozessen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression einiger derjenigen Gene, welchen eine Schlüsselfunktion bei der Transdifferenzierung zugeschrieben wird, näher untersucht.

Durch die Arbeitsgruppe Klein-Hitpass am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen wurden zunächst Arrays von aus MSCs stammender RNA, welche sich im Prozess der Differenzierung bzw. Transdifferenzierung befand, angefertigt. Diese Arrays wurden durch die Arbeitsgruppe Kufner der Lehr- und Forschungseinheit Bioinformatik am Lehrstuhl für Informatik der LMU München analysiert.

In der RNA dieser Zellen konnten somit zahlreiche Genprodukte detektiert werden, welche im Zuge von osteogenen Differenzierungs- bzw. Transdifferenzierungsvorgängen eine deutlich verstärkte oder aber deutlich verminderte Expression aufwiesen. Die dazu gehörigen Gene wurden in einer Rangliste eingeordnet. Neben vielen bekannten Genen enthielt diese Liste auch eine Reihe von unbekanntem, sogenannten hypothetischen Genen.

Über die Funktion und Bedeutung dieser Gene war zum Zeitpunkt der Datengewinnung noch nichts bekannt.

Es wurden insgesamt 25 dieser hypothetischen Gene ausgewählt. Ihre durch die Arrayergebnisse nachgewiesene quantitative Veränderung auf molekularer Ebene und dadurch postulierte Bedeutung bei der Differenzierung und Transdifferenzierung sollte durch Reevaluierung mittels RT-PCR bestätigt werden.

Bei 22 von 25 ausgewählten Genkandidaten konnte mithilfe von Primern eine erfolgreiche Etablierung durch RT-PCR erfolgen.

Bei 2 von 25 Genkandidaten konnte kein PCR-Produkt gewonnen werden, bei einem konnte kein zuverlässiges PCR-Produkt gewonnen werden.

Bei weiteren 2 dieser 25 Genkandidaten zeigte sich in der Sequenzierung ein anderes als das erwartete PCR-Produkt.

Bei 20 von 25 ausgewählten hypothetischen Genkandidaten konnten mithilfe spezifischer Primer einzelne cDNA-Abschnitte erfolgreich amplifiziert, sequenziert und anschließend densitometrisch vermessen werden. Die Ergebnisse zu je zwei Zeitpunkten der Differenzierung bzw. der Transdifferenzierung (14 d und 3 h, sowie 14 d und 24 h) sowie in zwei Entwicklungsrichtungen (Osteoblast zu Adipozyt und Adipozyt zu Osteoblast) wurden mit den jeweiligen Ergebnissen der Arrayanalysen verglichen.

Die Bestätigung der im Array gewonnenen Ergebnisse durch PCR unterstreicht die Rolle dieser ausgewählten Genkandidaten und deren Bedeutung bei der Transdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen.

Dennoch wies die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Arrays und denen der densitometrischen Auswertung der PCR Produkte mit 67% einen deutlich geringen Wert auf, als dies aus der Erfahrung der Arbeitsgruppe beim Vergleich bekannter Gene mit den o. g. Methoden der Fall ist.

## **4.1 Diskussion der Etablierung der PCR für hypothetische Gene**

### **4.1.1 Gelungene PCR und erfolgreiche Sequenzierung**

Insgesamt wurden 25 hypothetische Gene und die dazu gehörigen Primer ausgewählt. Davon konnten 20 Genkandidaten erfolgreich mittels PCR etabliert, durch Sequenzierung als die erwarteten PCR-Produkte bestätigt und die im Gelbild sichtbaren Bande abschließend densitometrisch vermessen werden. Die somit gewonnenen Ergebnisse wurden mit denen des Arrays verglichen und eine Übereinstimmung oder Abweichung festgestellt.

### **4.1.2 Erfolgreiche PCR-Etablierung und mögliche Gründe**

Zahlreiche hypothetische Gene haben noch keinen definitiven Eintrag in offiziellen Datenbanken, sogenannte RefSeq – Eintragungen.

Die endgültige Basenpaarsequenz dieser Gene ist folglich noch nicht vollständig und reproduzierbar gesichert. Die in Datenbanken bisher dokumentierten Eintragungen sind noch unter Vorbehalt und können Fehler enthalten.

Daher besteht die Möglichkeit, dass in für die Primerbindung spezifischen Abschnitten dieser Gene eine andere als die vermeintlich erwartete Basenpaarabfolge vorliegt.

Somit können die Primer im Einzelfall nicht an dem vorgesehenen cDNA-Abschnitt binden und infolge dessen auch kein PCR-Produkt herstellen.

#### **4.1.3 Gründe für nicht reproduzierbare PCR-Resultate bei gleich bleibenden Bedingungen**

Wie bereits in Kapitel 3 näher erläutert konnte beim Genkandidaten **DRE1** kein reproduzierbares PCR-Ergebnis erzielt werden. Hier liegt möglicherweise eine nicht vollständig korrekte Datenbankeintragung vor. Auch in diesem Fall weisen die zur Primerbindung ausgewählten cDNA-Abschnitten des Genproduktes möglicherweise punktuell eine andere als die erwartete Basenpaarabfolge auf.

#### **4.1.4 Gründe für die Entstehung eines PCR-Produktes, welches nicht mit der erwarteten Basenpaarsequenz übereinstimmt**

Wie bereits in Kapitel 3 erwähnt ließ sich bei zwei Genkandidaten zwar ein PCR-Produkt etablieren, in der Sequenzierung zeigte sich jedoch eine andere Basenpaarabfolge als erwartet. Auch in diesem Fall kann die oben erwähnte Ungenauigkeit der bisher dokumentierten Sequenz dieser hypothetischen Gene **FLJ21** und **AA74** die Ursache für das unerwartete Genprodukt verantwortlich sein.

## 4.2 Vergleich der Ergebnisse der Arrayanalysen mit denen der densitometrischen Auswertung der PCR

Die Übereinstimmung und Abweichung der Ergebnisse der Arrays, der PCR-Etablierung und die densitometrische Auswertung derselben werden in der folgenden Tabelle erstmals zusammengefasst.

Vergleichsmomente: Anzahl derjenigen Werte aus den cDNA Proben, welche zu den identischen Zeitpunkten des Transdifferenzierungsprozesses isoliert wurden und jeweils mittels Array oder PCR/ Densitometrie quantitativ untersucht wurden. Um als signifikant zu gelten und in die Auswertung einbezogen zu werden, mussten die Werte jedoch die in Kap.1 genannten Kriterien erfüllen ( $< -2,5$  fache Veränderung oder  $>2,5$  fache Veränderung). Die Zahl der Übereinstimmung bezieht sich auf die Gesamtzahl der in die Auswertung einbezogenen Werte.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Auswertung

	Nach 14 d und 3 h	Nach 14 d und 24h	Übereinstimmung insgesamt
OB-AC	4/7 (57 %)	12/17 (70 %)	16/24 (66%)
AC-OB	5/7 (70 %)	10/18 (55 %)	15/25 (60%)
Summe	9/14 (64 %)	22/35 (62%)	31/49 (63%)

Die Tabelle zeigt, dass die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Arrayauswertung und denen der densitometrischen Vermessung der PCR sowohl in den einzelnen Richtungen der Transdifferenzierung als auch zu den einzelnen Zeitpunkten einen etwas geringeren Prozentsatz aufweist, als dies bekannten Genen der Fall ist. Dort beträgt die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Arrays und denen der Densitometrie bei gleichen Auswahlkriterien circa 80%. Nachfolgend werden mögliche Gründe hierfür diskutiert.

#### **4.2.1 Gründe für eine geringere Übereinstimmung zwischen Array und Densitometrie bei hypothetischen Genen als bei bekannten Genen**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene waren zum Zeitpunkt der Untersuchung noch vollkommen unbekannt. Die Zu- oder Abnahme ihrer Regulierung zu bestimmten Zeitpunkten der Transdifferenzierung wurde durch Arrayanalysen quantitativ festgestellt. Über die exakte Funktion dieser Gene und die Wirkmechanismen ihrer Genprodukte beim Prozess der Transdifferenzierung oder aber bei anderen Vorgängen ist wenig bzw. nichts bekannt. Da diese Gene noch nicht genau untersucht wurden, ist ihre DNA-Abfolge nicht endgültig und nicht für jedes einzelne Basenpaar gesichert. Die in den Datenbanken eingetragenen Sequenzen können somit Fehler enthalten. Somit kann eine nicht korrekte Ref-Seq-Eintragung vorliegen und die Oligonukleotidsequenzen auf dem Array eine fehlerhafte Abfolge aufweisen. Dadurch kann das Signal fälschlicherweise verstärkt oder vermindert abgebildet werden, möglicherweise sogar komplett fehlen. Des Weiteren kann es auf dem Chip zu Kreuzhybridisierungen kommen. All diese Möglichkeiten verursachen eine geringere Zuverlässigkeit der Arraydaten und möglicherweise eine geringe Übereinstimmung zwischen Array und PCR-Auswertung als bei Arbeiten, in welchen in Funktion und Sequenz eindeutig bekannte Genen nach gleichen Auswahlkriterien untersucht wurden.

#### **4.2.2 Einordnung in die Ergebnisse der aktuellen Literatur**

##### Beispiel einer erfolgreichen Reevaluierung bekannter Gene durch RT-PCR:

Ju Ah Jeong et al.<sup>51</sup> untersuchten Gene, welche für MSCs charakteristisch sind. Hierfür wurde DNA aus MSCs und aus MNCs (mononuklearen Zellen) aus humanem Nabelschnurblut gewonnen. In Arrayanalysen zeigten sich 47 Gene, welche in den MSCs eine 50-fach höhere Expression als in MNCs exprimieren. Von den oben genannten 47 Genen waren 42 bekannte und 5 unbekannte Gene.

---

<sup>51</sup> Jeong J.A., Hyun Hong, S., Gang E, Stem Cells, pp. 584-593, 2005



Die unbekanntenen Gene lauteten MGC3047, MGC17528, MGC3278 und FLJ12442, AGENCOURT\_6683145. Die Ergebnisse wurden mit DNA aus Zellen eines anderen Spenders im erneuten Versuch bestätigt und nach der Stärke ihrer Regulierung gelistet. Auch dabei konnten alle 10 Gene mit sehr hoher Expression in den MSCs nachgewiesen werden, jedoch nur schwach in den MNCs. Das Ergebnis wurde ein weiteres Mal mit DNA aus Zellen eines anderen Spenders wiederholt. Somit wurden die Ergebnisse der Arrayanalysen bestätigt.

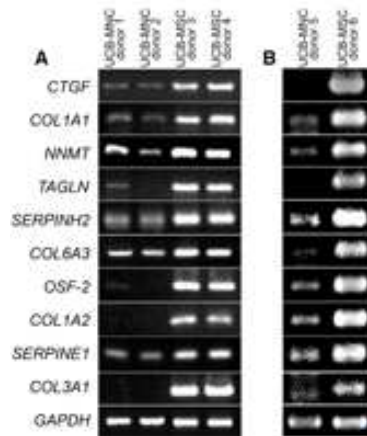


Abbildung 14: **Re-Etablierung bekannter Gene mittels PCR**

aus: Jeong J.A. et al , Stem Cells, 23:584-593, 2005; Erläuterung im Text

Die 10 mit der höchsten Expression bewerteten Gene wurden mit Hilfe von RT-PCR reevaluiert. In Abbildung 15-A sind die PCR-Ergebnisse der MNCs (Donor 1 und 2), sowie die der MSCs (Donor 3 und 4) dargestellt.

Im Bild 15-B wurde die PCR mit neuen Proben durchgeführt, MNCs (Donor 5) und MSCs (Donor 6).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die MSCs breite Banden und somit ein deutlich positives Resultat zeigen, die MNCs jedoch nur schwache Banden, bzw. überhaupt kein Genprodukt erkennen lassen.

Im Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genkandidaten handelt es sich hierbei um bereits bekannte Genprodukte.

#### Genetische Regulation des Erhaltes und der Erneuerung von Stammzellen:

Song et al.<sup>52</sup> untersuchten die molekularen und strukturellen Prozesse von mesenchymalen Stammzellen im Ruhezustand und auf dem Wege der Differenzierung. Untersucht wurden die aus ihnen hervorgegangenen Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten und darüber hinaus die durch De-Differenzierung dieser ausdifferenzierten Zellen gewonnenen fibroblastenähnlichen Stammzellen. Dabei konnten 460 Gene innerhalb der Stammzellreihen festgestellt werden, welche im Verlauf der Differenzierung vermindert, während der De-Differenzierung und im Ruhezustand der Stammzelle jedoch vermehrt exprimiert wurden. Gleichzeitig wurden 456 Gene detektiert, welche während der Differenzierung höher, im Zuge der De-Differenzierung oder aber im Zustand des Stammzellenerhaltes vermindert reguliert waren. Einige verstärkt oder vermindert regulierte Gene waren in mehreren Differenzierungsrichtungen nachzuweisen. Die Re-Evaluation der im Array gewonnenen Daten erfolgte durch jeweils zwei, ausschließlich für diese eine Differenzierungsrichtung spezifische Gene. Dies waren die Gene BSP und OC für Osteoblasten, LPL und FABP4 für Adipozyten und COMP und MMP13 für Chondrozyten.

Die im Array gewonnenen Daten konnten mittels RT-PCR bestätigt werden und die o. g. Gene als „molekularer Schalter“ über Selbsterhalt und Differenzierung bestätigt werden.

Im Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genkandidaten waren die Bedeutung dieser Gene für die jeweilige Transdifferenzierungsrichtung bereits bekannt. Dies bestätigt erneut, dass bei bereits bekannten und in ihrer Funktion näher untersuchten Genen die Etablierung der durch Array gewonnenen Daten mittels PCR eine höhere Erfolgsquote aufweist als dies bei unbekanntem Genen der Fall ist.

### **4.3 Funktion der bis dahin unbekanntem Gene**

Das hypothetische Gen FLJ1339, welches eine hohe Übereinstimmung zwischen Array und Densitometrie aufwies, wurde bis jetzt im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel noch nicht weiter untersucht. Unter seinem Synonym TMEMI 166 (Transmembran Protein

---

<sup>52</sup> Song L. et al., Identification and functional analysis of genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency, Stem cells, 2006

EMI166) wurde ein Zusammenhang zwischen der Regulation dieses Genes und der zellulären Autophagozytose und Apoptose beschrieben.

Das hypothetische Gen FLJ46041, welches ebenfalls eine hohe Übereinstimmung zeigte, ist unter seinem Synonym p34 als potentiell Tumor-Suppressor-Gen untersucht worden. Seine endgültige Bedeutung im Zusammenhang mit Lungenkarzinomen ist jedoch noch nicht geklärt.<sup>53</sup>

Das hypothetische Gen MGC45780 alias Scava5 (Scavenger Receptor5) scheint beim ferritinrezeptorvermittelten, jedoch nicht unmittelbar transferrinabhängigen Eisentransport im Verlaufe der Organogenese eine Rolle zu spielen.<sup>54</sup>

---

<sup>53</sup> Min Wang et al., Identification of a Novel Tumor Suppressor Gene *p34* on Human Chromosome 6q25.1 *Cancer Research* 67, pp.93-99, 2007

<sup>54</sup> Li J.Y., Paragas, N., Ned, R.M., Scava5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery, *Dev Cell.* 2009

## 4.4 Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Identifizierung unbekannter Gene mit relevanter Regulation in den Transdifferenzierungsprozessen mittels PCR zu reetablieren wurde erreicht.

In insgesamt 31 von insgesamt 49 in die Bewertung eingeschlossenen Vergleichsmomenten lag eine Übereinstimmung der Ergebnisse bei Genen mit reziproker, relevanter und reproduzierbarer Regulation vor.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen noch keine Veröffentlichungen zur Rolle dieser Gene bei der Transdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen oder beim Knochenstoffwechsel vor.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultate können weiteren Untersuchungen den Weg ebnen. So könnten beispielsweise Untersuchungen mit Zellen, welche die o. g. Gene überexprimieren, stattfinden und anschließend Marker der osteogenen und der adipogenen Zellreihe untersucht werden.

Des Weiteren könnten die Proteine der o. g. Gene hergestellt und in Nährmedium zu MSCs gegeben werden. Somit könnte die Wirkung dieser Gene, bzw. ihrer Proteine auf den Prozess der Transdifferenzierung näher untersucht werden. Darüber hinaus könnte im Tierversuch der Knochenstoffwechsel oder die Degeneration von Knochen bei Knock-out Mäusen untersucht werden.

Mechanistische Einblicke würde auch die Ausschaltung dieser Genprodukte durch siRNA- oder shRNA-Ansätze *in vitro* ermöglichen. Die dadurch erhobenen Daten könnten neue Gene mit funktioneller Relevanz für das muskuloskelettale System charakterisieren

## 5. Zusammenfassung

Zahlreiche Bindegewebe des menschlichen Körpers gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Zu diesen Geweben zählen u. a. Knochen, Muskeln, Sehnen, Knorpel und Fettzellen. Mesenchymale Stammzellen besitzen die Eigenschaft, lange Zeit in einem Ruhezustand zu verbringen. Durch äußeren Reiz, z.B. Gewebeschäden oder Botenstoffe werden sie dazu aktiviert, Tochterzellen zu produzieren, welche eine bestimmte Differenzierungsrichtung einschlagen, z.B. Knochenzellen. Weiterhin besitzen diese Zellen jedoch das Potential, durch veränderte externe Bedingungen (z.B. ein anderes Nährmedium) nun Tochterzellen zu produzieren, welche einen anderen molekularen und morphologischen Aufbau aufweisen als die vorherigen, z.B. Fettzellen.

Die oben geschilderten Vorgänge verursachen im menschlichen Organismus Degeneration und funktionelle Veränderungen. So kommt es im Skelettsystem in höherem Lebensalter und bei persönlicher Prädisposition zur adipogenen Degeneration und verminderter Knochendichte. Dieser Vorgang trägt zum Krankheitsbild der Osteoporose bei.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese in Differenzierung befindlichen Zellen weiterhin ein pluripotentes Potential behalten. So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass Zellen, welche eine bestimmte Differenzierungsrichtung eingeschlagen hatten, durch Veränderung des exogenen Stimulus einen diesem neuen Stimulus folgenden, anderen Entwicklungsweg beschreiten und somit transdifferenzieren.

Die in der vorliegenden Arbeit diskutierten Untersuchungen waren eingebettet in ein Projekt, in welchem die o g Transdifferenzierungsvorgänge näher untersucht und die für diesen Vorgang relevanten und verantwortlichen Gene bestimmt wurden.

Zunächst wurden von der Arbeitsgruppe Schütze mesenchymale Stammzellen 14 Tage in einem adipogenen Medium zu Adipozytenvorläuferzellen kultiviert, anschließend wurde ein Teil dieser Zellen in ein osteogenes Nährmedium überbracht und somit osteogen transdifferenziert, der andere Teil wurde weiterhin adipogen kultiviert. Analog wurde mit der entgegengesetzten Transdifferenzierungsrichtung osteogen hin zu adipogen verfahren

Von der Arbeitsgruppe Schütze wurde jeweils eine Probe vor Beginn des Transdifferenzierungsprozesses entnommen, sowie zu zwei Zeitpunkten im Verlaufe desselben. Das Expressionsmuster der RNA zu diesen jeweils drei Zeitpunkten wurde von der Arbeitsgruppe Klein-Hitpass mittels Microarray untersucht.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, diejenigen Gene, welche bei Auswertung der Arrayanalysen eine mehr als 2,5-fache Veränderung der Signalintensität und somit signifikant veränderte Genexpression aufwiesen, mittels geeigneter Primer durch RT-PCR zu etablieren und die im Array gewonnenen Daten zu bestätigen.

Die ausgewählten Gene mussten im Array neben der bereits erwähnten relevanten auch eine reziproke Veränderung ihrer Signalintensität aufweisen und diese reziprok veränderte Regulation darüber hinaus im wiederholten Array reproduzierbar sein. Diejenigen Gene, welche alle drei Kriterien erfüllten, wurden in einer Liste zusammen gefasst.

Dabei handelte es sich teilweise um bisher unbekannte und nicht näher untersuchte Gene, deren Basenpaarabfolge zwar in Datenbanken vorliegt, über deren Funktion jedoch keinerlei Untersuchungen vorliegen. Es sind sogenannte hypothetische Gene. Aus der Liste dieser hypothetischen Gene wurden 25 Gene ausgewählt, um die im Microarray gewonnenen Ergebnisse durch RT-PCR zu bestätigen.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag darin, diejenigen Gene, welche durch die Arrayanalysen eine Rolle im Prozess der Transdifferenzierung zu spielen scheinen, mittels RT-PCR näher zu untersuchen und ihre vermehrte oder aber verminderte gegenläufige Genregulation zu bestimmten Zeitpunkten des Transdifferenzierungsprozesses zu bestätigen. Somit sollte die potenzielle Bedeutung dieser Gene für die Transdifferenzierung durch eine weitere Methode bestätigt werden.

Dabei zeigte sich allerdings, dass nicht für alle dieser Genkandidaten die RT-PCR erfolgreich etabliert werden konnte. Für 7 von 20 Genen konnte eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem „fold-change“ (–fache Veränderung) im Array und der densitometrisch berechneten Intensität des gewonnenen PCR Produktes nachgewiesen werden. Bei 13 weiteren Genen lag eine teilweise, bzw. keine Übereinstimmung vor. Alle Vergleichsmomente zusammen ergaben eine Übereinstimmung zwischen Array und PCR von 63 %. Dieser Prozentsatz ist etwas geringer als dies bei entsprechenden Untersuchungen für bereits bekannte Gene in diesem Projekt der Arbeitsgruppe der Fall war.

Diese Abweichung bei unbekanntem Genen in der vorliegenden Arbeit liegt darin begründet, dass es sich um hypothetische und somit bis jetzt noch weitgehend nicht bekannte Gene handelt, deren Bedeutung, Funktionsweise und Einordnung in molekulare Mechanismen bisher noch nicht untersucht wurde. Somit ist nicht auszuschließen, dass die Basenpaarsequenzen in den Datenbanken bei einzelnen dieser Gene noch nicht definitiv und fehlerfrei vorliegen.

Ein weiterer Aspekt ist die nicht bekannte Bedeutung und Funktion dieser Gene; möglicherweise ist ihre vollständige Expression nur im Zusammenspiel mit weiteren externen Faktoren, Transkriptionsfaktoren oder Signalkaskaden gegeben. Ebenfalls zu beachten ist, dass es sich bei den gewählten Zeitpunkten um willkürlich festgelegte Momentaufnahmen auf molekularer Ebene handelt.

Abschließend lässt sich sagen, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genprodukte, welche eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arrayanalysen aufwiesen, vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen darstellen.

Weitere Untersuchungen könnten die Frage klären, welche Auswirkung die Supprimierung oder Überexpression dieser Gene auf molekularer oder morphologischer Ebene der Zelle zu Folge hat.

Des Weiteren könnte die Herstellung der von diesen Genen kodierten Proteine und ihre Zugabe zu Nährmedium Aufschlüsse über ihre mögliche Wirkung geben. Somit könnte man beispielsweise die Ausbildung zelltypischer Marker oder extrazellulärer Matrix von in einem solchen Medium kultivierten Zellen untersuchen. Die Vorgänge, welche eine Veränderung des weiteren Weges von mesenchymalen Stammzellen bewirken, sind auf molekularer Ebene weitgehend unbekannt. Einige Gene konnten bereits als „molekulare Schalter“ definiert werden, welche über eine bestimmte Differenzierungsrichtung entscheiden.

Die weitere und differenzierte funktionelle Untersuchung dieser Kandidatengene könnte Aufschluss über die Mechanismen der Transdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen geben und somit in umfassendem Kontext die Ursachen der Entstehung von degenerativen Prozessen erklären

Die folgende Tabelle fasst diese Kandidatengene und die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultate zusammen

Tabelle 8: Gene mit hoher Übereinstimmung

Hypothetisches Gen	Ergebnisse des Array OB-AC	Ergebnisse des Array OB-AC	Ergebnisse des Array-AC-OB	Ergebnisse des Array AC-OB	Ergebnisse der Densitometrie OB-AC	Ergebnisse der Densitometrie OB-AC	Ergebnisse der Densitometrie AC-OB	Ergebnisse der Densitometrie AC-OB	Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen des Array und der densitometrischen Auswertung
	3 h	24 h	3 h	24 h	3 h	24 h	3 h	24 h	
AI73	-4,38	-3,07	2,4	17,75	-4,11	-1,51	-1,11	3,97	3 v.4
DKFZp434	n.a.	3,5	-1,4	-3,2	-1,55	1,35	-1,99	1,78	2 v. 3
C7orf10	n.a.	-2,8	n.a.	2,8	2,13	-1,04	1,28	2,53	2v.2
AA166	n.a.	-4	1,4	6,5	-2,26	-1,13	4,34	64,3	3 v.3
FLJ46	-3,7	-3	1,7	3,1	-5,5	-1,46	1,89	2,47	4 v.4
LOC34	n.a.	-2,4	n.a.	5,5	-1,22	-2,5	8,52	4,99	2 v.2
KIAA1199	n.a.	-1,4/-2,4	n.a.	3,8/3,9	1,02	-1,12	-1,02	1,61	2 v.2
FLJ13	-3,4	-3,7	n.a.	19,4	-2,37	-63,52	1,55	16,22	3 v.3



## 6. Literaturverzeichnis

Andrew T., Mak Y. T., Reed P., MacGregor A.J., Linkage and association for bone mineral density and heel ultrasound measurement with a simple tandem repeat polymorphism near the osteocalcin gene in female dizygotic twins, *Osteoporosis international*, 13/9, pp. 937-941/2002

Avioli, L.V., Lindsay, R., The female osteoporotic syndrome(s), metabolic bone disease and clinically related disorders, Philadelphia, pp. 397–451/1990

Burke, Z.D. and Tosh, D., Therapeutical potential of transdifferentiated cells, *Clinical science* 108, pp. 309-321/2005

Chen, D., Ming Z., Mundy, G., Bone morphogenic proteins, *Growth factors* 22, pp. 233-241/2004

Chunmeng, S., Tianmin, C., Effects of plastic adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU in rats, *Transplant Proc.* 36, pp. 1578–1581/2004

Coleman, R.T., Taylor J.E., Shine J-J., Human estrogen receptor (ESR) gene locus: PssI dimorphism. *Nucleic Acids Res* ,16/14, p. 7208/1988

Compton, J.E., Sex steroids and bone, *Physiol Rev*; 81, pp.419-47/2001

Costic, C., Shaw, P.H., Isolation and characterization of sixteen novel p53 response genes, *Oncogene*, 19/35, pp. 3978-87/2000

Datta, N., Holtorf, H.L., Sikavitsas, V.I., Jansen J.A., Mikos A.G., Effect of bone extracellular matrix synthesized *in vitro* on osteoblastic differentiation of marrow stromal cells, *Biomaterials*, 26/9, pp. 971-977/2005

Dick, M.I., Devine A., Prince A.L., Association of an aromatase TTAA repeat polymorphism with circulating estrogen, bone structure and biochemistry in elderly women, *American journal of physiology and Endocrinology and Metabolism*, 288, pp. 989-995/2005

Ducy P., Zhang, R, Geoffroy, V., *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell*, 89(5), pp. 677-680/1997

Evan, D., Chung-Hsin H., Xinzhong W., C/EBP alpha induces adipogenesis through PRARY: a unified pathway, *Genes and development* 16, pp. 22-26/2002

- Friedenstein A.J., Petroakova K.V., Kurolesova A.I., Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *Journal Embryol Exp Morph.*, 16, pp. 381–390/1966
- Friedman, M.S., Long M.W., Hankenson, M.W., Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenic protein-6, *J cell Biochem.*, 275, pp. 9645–9652/2006
- Frost, H.M., *The Laws of Bone Structure*, Charles C. Thomas, Springfield, 1964
- Fuchs E., Tumber T., Guasch G., Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche, *Cell*, 116, pp. 769-778/2004
- Genecards, [www.genecards.org](http://www.genecards.org)
- Golan-Mashiach M., Dazard J.E., Gerecht-Nir S., Design principle of gene expression used by human stem cells: Implication for pluripotency, *The FASEB Journal.*;19, pp. 147-149/2005
- Grant, S.F.; Reid, D.M.; Blake, G.; Herd, R.; Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type 1 gene, *Nature genetics*, Oct;14/2, pp. 203-205/1996
- Gronthos, S., Zannettino A., Hay S., Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal cells from human bone marrow, *Journal Cell Science*, 116, pp.1827-1835/2003
- Hirao A, Arai F, Suda T., Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche, *Cell cycle*, 3/12,pp. 1481-1483/2004
- Jackson, L., Jones D., Scotting P., Sottile V., Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications, *J Postgrad Med*, 53, pp. 121-127/2007
- Jeong, J.A., Hyun Hong, S., Gang E., Differential Gene Expression Profiling of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells by DNA Microarray, *Stem Cells*, 23, pp. 584-593/2005
- Jiang, Y., Jahagirdar, B., Reinhardt, R., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature*, 418, pp. 41-49 /2002
- Karsenty, G., The complexities of skeletal biology, *Nature*, 423, pp. 316-318/2003
- Kolf, E., Cho, E., Tuan, R.S., Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells, *Arthritis research therapy*, 9:204doi:10.1186/ar2116/2007

- Korach K.S, Estrogene receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes. J Soc Gynecol Investig, 01-02, pp.16-17/2000
- Kulterer B., Friedl, G., Jandrositz, A., Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells during expansion and osteoblast degeneration, BMC Genomics, 10/1186/1471-2164-8-70/2007
- Lanyon, L., Skerry, T., Postmenopausal osteoporosis as a failure of bone's adaptation to functional loading, J.Bone Min.Res.,11, pp.1937-1947/2001
- Lawrence, G., Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, J. Clin. Invest., 115(12), pp. 3318-3325/2005
- Lee, R.H., Kim B.C., Choi I., Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, Cell Physiol Biochem. 14, pp. 311-324/2004;
- Li J.Y., Paragas, N., Ned, R.M., Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery, Dev Cell., Jan;16(1):pp. 35-46/2009
- Mann, V., Hobson E., Baohua L., COL1A1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality, J Clin Invest., 107(7), pp 899–907/2001.
- Morrison, N.A., Qi, J.C, Tokita, A., Prediction of bone density from vitamin d receptor alleles, Nature, 367(6460), pp. 284-287/1994
- Mundlos S., Otto F., Mundlos C., Mutations involving the transcription factor CBFA1 causing cleidocranial dysplasia, Cell, 89/ 5, pp. 773-779/1997
- Neubauer, M., Hacker M., Bauer-Kreisel P., Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor *in vitro*, Tissue Engineering., 11-12, pp. 1840-1851/2005
- Noda, M., Salingcarnboriboon R., Tsuji K., Runx2 is a target of mechanical unloading to alter osteoblastic activity and bone formation in vivo, Endocrinology 147(5), pp. 2296–2305/2006  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/nucleotide-nucleotide>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Okada, T. S., Lens studies continue to provide landmarks of embryology (developmental biology), J Biosci. 25, pp. 133-141/2000

- Okada, T. S., *Transdifferentiation: Flexibility in cell differentiation*, Oxford Clarendon Press, 1991
- Park, S.R., Oreffo R.O.C., Triffitt J.T., Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro, *Bone*, 24/6, pp. 549-554/1999
- Peacock M., Turner C.H., Econs M.J., Foroud T., Genetics of osteoporosis, *Endocrine Rev.*, 23, pp. 303-326/2002
- Peterson, C., Chickarmane V., Troein C., Transcriptional Dynamics of the Embryonic Stem Cell Switch, *PLoS Comput Biol.*, 10.1371/journal.pcbi.0020123/2006
- Pittenger, M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Multilineage potential of human mesenchymal stem cells, *Science*, 284(5411), pp. 143-147/1999
- Rodan, G.A., Bilezikian J.P., Raisz, L.G., *Pathophysiology of osteoporosis. Principles of bone biology*. San Diego, academic press, pp. 1275-1289/2002
- Rössler, Rüter, *Orthopädie*, Urban&Fischer, pp. 87-89/2000
- Slack J.M., Shen C.N., Tosh, D., Transdifferentiation and metaplasia: switching off cell types, *Opinion in Genetics & Development*, 11 (5), pp. 581-586/2001
- Song L., Webb N., Tuan, S., Identification and functional analysis of genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency, *Stem cells*, 24, pp. 1707-1718/2006
- Song, L. and Tuan, R.S., Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, *FASEB J* 18, pp. 980–982/2004
- Suarez-Farinas, M., Magnasco M.O., Comparing independent microarray studies: The case of human embryonic stem cells, 128(3), pp. 606-615/2008
- Tagami, M., Ichinose S., Muneta T., Genetic und ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cells, *Cell Tissue Res.*, pp. 312:31–40/2003
- Tosh D, Slack JM., Cells change their phenotype, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, pp. 187-194/2002
- Urist, M. R., Bone: formation by autoinduction, *Science*, 150(698): pp. 893-899/1965
- Wang, W., Vikis, H., Wang, Y., Identification of a Novel Tumor Suppressor Gene *p34* on Human Chromosome 6q25.1, *Cancer research*. 02, 67(1):pp. 93-9/2007

Zhang, Y.Y., Long, J., Liu, P., Estrogen receptor alpha and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density : association study of healthy pre-and postmenopausal Chinese women, *Biochem Biophysics Res Commun*, pp. 777-783/2003

Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva L, Taylor P., Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals, *Arthritis Research*, 2: pp. 477-488/2000

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Röntgenaufnahme eines osteoporotischen Wirbelkörpers .....	1
Abbildung 2: Modell des “Bone Remodellings” .....	1
Abbildung 3: Erneuerung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....	1
Abbildung 4: Schema der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....	1
Abbildung 6: Histologischer Nachweis osteogener und adipogener Differenzierung durch Färbung.....	1
Abbildung 7: RNA-Isolation während der Transdifferenzierung – Osteoblast (OB) zu Adipozyt (AC).....	1
Abbildung 8: RNA-Isolation während der Transdifferenzierung – Adipozyt(AC) – Osteoblast (OB).....	1
Abbildung 9: Gelbanden der PCR-Produkte der hypothetischen Gene FLJ46041 .....	1
Abbildung 10: Grafische Darstellung der Ergebnisse des hypothetischen Gens FLJ46.....	1
Abbildung 11: Gelbanden der PCR Produkte für das hypothetische Gen AI73 .....	1
Abbildung 12: Grafische Darstellung der Ergebnisse des hypothetischen Gens AI73.....	1
Abbildung 13: Gelbanden der PCR-Produkte der hypothetischen Gene FLJ46041 .....	1
Abbildung 14: Grafische Darstellung der Ergebnisse des hypothetischen Gens AW27 .....	1
Abbildung 15: Re-Etablierung bekannter Gene mittels PCR.....	1

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gemeinsame Oberflächenproteine isolierter mesenchymaler Stammzellen.....	1
Tabelle 2: Ablauf der PCR .....	1
Tabelle 3: PCR zur Sequenzierung .....	1
Tabelle 4: Primer im Überblick.....	1
Tabelle 5: Übersicht aller Genkandidaten und Primer .....	1
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse .....	1
Tabelle 7: Zusammenfassung der Auswertung .....	1
Tabelle 8: Gene mit hoher Übereinstimmung .....	1

---

## **9. Danksagung**

Vielen Dank für die große Unterstützung während meiner Zeit im Labor an Susanne Jatzke und Dr. Tatjana Schilling !

Für die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Anika Gaggermeier, Dr. Florian Zormaier, Claudia und Dr. Henning von Garrel und bei meinen Eltern.



---

## **10. Lebenslauf**

Ulrike Meyer

Geburtsdatum: 5. April 1977

Geburtsort: Heilbronn

Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1983-1987 Grundschule in Heilbronn

1987-1996 Robert- Mayer- Gymnasium Heilbronn

Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife

### **Oktober1996 - Juli 1997**

Au-pair- Aufenthalt in Edinburgh/Schottland

Cambridge Certificate of proficiency in English Language, Telford College, Edinburgh, Mai 1997

### **Studium**

Ab Oktober 1997: Studium Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Juli 1999: Ärztliche Vorprüfung

März 2001: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

September: 2001- September 2002 Auslandsstudium an der Universität von Nizza/ Frankreich

März 2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Mai 2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

---

### **Berufliche Laufbahn**

Juni 2006- März 2008: Assistenzärztin der Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen

Juni 2008- Dezember 2008: Assistenzärztin der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin der Kreiskliniken Reutlingen

Seit Februar 2009: Assistenzärztin der Medizinischen Klinik I am Klinikum Sindelfingen-Böblingen