

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein)**

**Die Rolle des canonischen Wnt-Signalweges während
der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen
Stammzellen aus dem humanen Knochenmark**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)**

**vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von: Anna Völker
geboren am 30.12.1981 in Berlin**

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ

**Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ
Prof. Dr. med. Christoph Heyde
Prof. Dr. sc. nat. Rüdiger Horstkorte**

Datum der Verteidigung: 16.03.2010

Referat und bibliographische Beschreibung

Mesenchymale Stammzellen haben in den letzten Jahren einen zunehmenden Stellenwert in der Untersuchung von neuen Ressourcen in der regenerativen Medizin eingenommen, da sie potentiell Zellen in erkrankten Geweben ersetzen und so zur Geweberegeneration beitragen können. Bisher ist noch wenig bekannt über die zur gewebespezifischen Differenzierung notwendigen Signalwege. Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss des canonischen Wnt-Signalweges auf die hepatogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen.

Die untersuchten mesenchymalen Stammzellen wurden aus humanem Knochenmark des Femur gewonnen und mittels Dichtegradient und Plastikadhärenz isoliert. Die isolierten Zellen wurden anhand von Oberflächenantigenen typisiert und die Fähigkeit zur Multipotenz durch die osteogene und adipogene Differenzierbarkeit der isolierten Zellen bestätigt. Die MSC wurden expandiert und hepatogen differenziert.

Die Aktivierung des β -Catenin abhängigen Wnt-Signalweges wurde durch die Zugabe des GSK-3 β Inhibitors BIO induziert. Molekularbiologisch ließ sich aufgrund der Expression hepatogener Marker (Albumin, TFN, PCK1, CX32, CD26, CK18) während der hepatogenen Differenzierung zeigen, dass mesenchymale Stammzellen aus dem humanen Knochenmark zu hepatozyten-ähnlichen Zellen differenzierbar sind und die zusätzliche Behandlung der Zellen mit BIO nicht inhibierend auf die hepatogene Differenzierung wirkt. Die molekularen Komponenten des Wnt-Signalweges (GSK-3 β , Phospho-GSK-3 β , β -Catenin, Phospho- β -Catenin, und TCF4) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden untersucht. In allen Untersuchungen zeigte sich eine Aktivierung der Signalkaskade durch BIO. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass BIO die β -Catenin-abhängige Aktivierung der TCF4/Lef1 vermittelten Genexpression in mesenchymalen Stammzelle im Verlauf der hepatogenen Differenzierung steigert.

Insgesamt betrachtet scheint der canonische Wnt-Signalweg somit eine wichtige Rolle in der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zu spielen.

Völker, Anna: Die Rolle des canonischen Wnt-Signalweges während der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem humanen Knochenmark Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Stammzellen	1
1.2.	Mesenchymale Stammzellen	1
1.3.	Die hepatogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen	4
1.4.	Zelltherapeutische Ansätze zur Behandlung von Lebererkrankungen	6
1.5.	Der canonische und nicht-canonische/Ca ²⁺ -abhängige Wnt-Signalweg	7
1.6.	Die Regulation des canonischen Wnt-Signalweges	9
1.7.	Die Glycogensynthase-Kinase 3	10
1.8.	Inaktivierung der Glycogensynthase-Kinase 3 durch den selektiven Inhibitor BIO	11
1.9.	Der Wnt-Signalweg in Stammzellen	11
1.10.	Die Rolle des canonischen Wnt-Signalweges in der Leberentwicklung und der Leberregeneration	12
1.11.	Der HGF-Rezeptor	12
2.	ZIELSTELLUNG	14
3.	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1.	Geräte	15
3.2.	Chemikalien	15
3.3.	Puffer und Lösungen	16
3.4.	Medien	19
3.4.1.	ErhaltungsmEDIUM mit 6 Faktoren	19
3.4.2.	Hepatogenens Differenzierungsmedium	19
3.4.3.	Osteogenes Differenzierungsmedium	19
3.4.4.	Adipogenes Differenzierungsmedium	19
3.5.	Antikörper	20
3.5.1.	Primärantikörper	20
3.5.2.	Sekundärantikörper	21
3.6.	Oligonucleotide	21
3.7.	Zellbiologische Methoden	22
3.7.1.	Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem humanen Knochenmark	22
3.7.2.	Lentivirale Infektion von humanen mesenchymalen Stammzellen	23

3.7.3.	Fluorometrische Messung.....	24
3.7.4.	Bestimmung der Zellzahl.....	24
3.7.5.	Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse	24
3.7.6.	Kryokonservierung humaner mesenchymaler Stammzellen.....	25
3.7.7.	Zellkultur von humanen mesenchymalen Stammzellen und deren hepatogene Differenzierung.....	25
3.7.8.	Isolierung von mRNA mittels Phenol/ Chloroform	26
3.7.9.	Bestimmung des Gehalts der Gesamt-RNA.....	27
3.7.10.	DNase-Verdau.....	27
3.7.11.	Reverse Transkription.....	28
3.7.12.	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
3.7.13.	Real-time semiquantitative PCR	29
3.7.14.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	30
3.7.15.	Proteingewinnung aus Zelllysaten.....	31
3.7.16.	Proteinbestimmung mit der BCA-Methode	31
3.7.17.	Western Blot	31
3.8.	Zytochemie	33
3.8.1.	Sudan-III-Färbung.....	33
3.8.2.	Alizarin-Red-S Färbung	33
4.	ERGEBNISSE	35
4.1.	Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.....	35
4.1.1.1	Isolierung und Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen	35
4.1.2.	Nachweis von typischen Oberflächenantigenen auf humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark	35
4.1.3.	Nachweis der Multipotenz humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark anhand deren adipogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit.....	36
4.2.	Die hepatogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen unter und ohne Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO	38
4.2.1.	Morphologie humaner mesenchymaler Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung.....	38
4.2.2.	Expression von hepatozytären Markergenen in humanen mesen- chymalen Stammzellen im Verlauf der hepatogenen Differenzierung	40
4.2.3.	Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der hepatogenen Differenzierung.....	41

4.2.4.	Expression von CD26 während der hepatogenen Differenzierung humaner mesenchymalen Stammzellen	45
4.4.	Aktivierung des β -Catenin-abhängigen canonischen Wnt-Signal- weges durch die Behandlung von humanen mesenchymalen Stammzellen mit dem GSK-3 Inhibitor BIO	46
4.4.1.	Inaktivierung der GSK-3 β durch den selektiven Inhibitor BIO.....	46
4.4.2.	Zelluläre Verteilung von Gesamt- β -Catenin und phosphorylierten β -Catenin im Verlauf der hepatogenen Differenzierung unter dem Einfluss von BIO	50
4.4.3.	Beta-Catenin-abhängigen Aktivierung der TCF/Lef-vermittelten Gen- expression in humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3 β Inhibitors BIO	56
4.4.4.	Aktivierung der Transkriptionsfaktoren TCF4 und TCF7 in Abhängigkeit der Stimulation des canonischen Wnt-Signalweges	58
4.4.5.	Expression des Proliferationsmarkers c-MYC in humanen mesen- chymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO.....	59
5.	DISKUSSION.....	61
5.1.	Humanes Knochenmark aus dem Femur enthält mesenchymale Stammzellen	61
5.2.	Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark lassen sich <i>in vitro</i> hepatogen differenzieren.....	61
5.3.	Der GSK-3-Inhibitor BIO aktiviert den β -Catenin-abhängigen Wnt- Signalweg in humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.....	63
5.4.	Der Einfluss des GSK-3-Inhibitor BIO auf die hepatogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.....	65
6.	ZUSAMMENFASSUNG	67
7.	LITERATURVERZEICHNIS	69
8.	THESEN	78

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
δ	Dichte
ad	(bis) zu, (bis) nach
ADA	Adenosindesaminase complexing protein
AFP	Alpha Fetoprotein
Alb	Albumin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous Polyposis coli Protein
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BIO	(2'Z,3'E)-6-bromoindirubin-3'-oxime
BRG-1	brahma-related gene 1
BSA	Bovines Serum Albumin
β -TrCP	Beta-transducin repeat Containing Protein
CD	Cluster of Differentiation
CD105	Endoglin
CD13	Aminopeptidase N
CD166	Activated leukocyte cell adhesion molecule
CD26	Dipeptidylpeptidase IV
CD29	Integrin beta1
CD31	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
CD34	Hematopoetic progenitor cell marker CD34
CD45	Protein tyrosine phosphatase, receptor type
CD73	Ecto-5-prime-nucleotidase
CD90	Thy-1 cell surface antigen
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
cDNA	complementary DNA
CK	Cytokeratin
CK1a	Casein Kinase 1a
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Threshold Cycle
CX32	Connexin 32

d	Tag(e)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dsh	Dishevelled
E	Embryogenese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EM6F	Erhaltungsmedium mit 6 Faktoren
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FFL	Firefly Luciferase
FITC	Fluoreszcinisothiocyanat
FoxM1	Forkhead Box M1
Fzd	Frizzled
g	Schwerebeschleunigung/ Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase
h	hour (Stunde)
hBM-MSC	Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGM	Hepatocyte Growth Medium
HHMM	Human Hepatocyte Maintenance Medium
HLA-DR	humane Leukozytenantigen-System (Klasse II Antigen)
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA
ICAT	Inhibitor of β -Catenin and TCF4
IgG	Immunglobulin G
IR	infrarot
IZC	Immunzytochemie
Lef1	lymphoid enhancer-binding factor 1
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	Low-density lipoprotein receptor related Protein
M	Molarität ($\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)
mA	Milliampere

MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar ($\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$)
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymale Stammzellen
Na_2HPO_4	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
nd	nicht differenziert
nM	Nanomolar ($\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$)
OC	Osteocalcin
OD	optische Dichte
ON	Osteonectin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCK1	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
P- β -Catenin	Phospho- β -Catenin
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RFU	Relative Fluoreszenz Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	Serin
SF	Scatter factor

SFRP	Secreted frizzled-related protein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Strep	Streptomycin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TCF4	T-Cell Factor 4
TCF7	T-Cell Factor 7
TEA	Triethanolamin-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TFN	Transferrin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
undiff	undifferenziert
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot
WIF	Wnt Inhibitory factor
XSox	SRY-related HMG-box transcription factor Sox

1. Einleitung

Der molekulare Mechanismus der hepatogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist nicht bekannt. Daher sollte die vorliegende Arbeit zum Verständnis der zellulären und molekularen Grundlagen der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem humanen Knochenmark *in vitro* beitragen. Insbesondere die Rolle des canonischen Wnt-Signalweges bei der Proliferation und Differenzierung der Zellen sollte untersucht werden.

1.1. Stammzellen

Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und sich zu differenzierten Zellen zu entwickeln. Im menschlichen Organismus werden zwei Arten von Stammzellen aufgrund ihres Differenzierungspotentials unterschieden: die embryonalen und die adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen kommen in der inneren Zellmasse der Blastozyste vor und besitzen pluripotente Differenzierungsfähigkeit. Sie sind in der Lage sich zu Geweben aller drei Keimblätter, dem Mesoderm, dem Endoderm und dem Ektoderm zu entwickeln.

Adulte Stammzellen hingegen besitzen multipotente Fähigkeit und können sich zu Zellen aus dem Keimblatt differenzieren, aus dem sie entstehen.

Im Knochenmark finden sich zwei Arten von adulten Stammzelltypen: multipotente Stammzellen der lymphohämatopoetischen Linie, die sich zu unipotenten Vorläufern der Blutzellen entwickeln und die multipotenten mesenchymalen Stammzellen (Abb. 1.1).

1.2. Mesenchymale Stammzellen

Im Mesenchym vorkommende Vorläuferzellen (1), die mesenchymalen Stammzellen (MSC), sind zur Selbsterhaltung durch Zellteilung befähigt und können in Zellen verschiedener mesenchymaler Gewebe differenzieren. Gewebe mesenchymalen Ursprungs sind Knochen, Knorpel, quergestreifte Muskulatur, subkutanes Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßsystem, Urogenitalsystem und die bindegewebigen Komponenten von Organen, die aus Entoderm und Ektoderm abstammen. MSC, auch bekannt als Marrow Stromal Cells (2), sind in den verschiedenen mesenchymalen Geweben in ihrer Stammzellnische zu finden. In der Stammzellnische wird der Stammzellcharakter aufrechterhalten durch Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen in der Mikroumgebung der Nische. Diese reguliert auch die Auswanderung und die Differenzierung von Stammzellen (3).

Aufgrund der besonderen Eigenschaften der MSC zur Selbsterneuerung und ihrer Plastizität werden große Hoffnungen in die Verwendung von MSC in der Zell- und Gentherapie gesetzt. Auch in der regenerativen Medizin, im Rahmen von Zelltransplantationen bei generalisierten Erkrankungen und bei lokalen Gewebedefekten, scheint die klinische Anwendungen möglich (4).

Erste Therapieveruche mit MSC wurden im Rahmen der Behandlung der Osteogenesis Imperfeka unternommen (5). Dieser genetischen Erkrankung liegt ein Defekt in der Synthese des Kollagen I zugrunde, welches einen hohen Prozentsatz der Knochenmatrix ausmacht. Heute wird die Möglichkeit zum Einsatz von MSC bei verschiedenen Anwendungen in der Medizin *in vitro* und *in vivo* untersucht (6). In Tierversuchen wurde inzwischen der therapeutische Nutzen von MSC bei Lebererkrankungen (7), Myokardinfarkt (8), verschiedenen neurologischen Erkrankungen (9), bei der Regeneration von Muskelgewebe (10), bei Nieren- (11) und Lungenerkrankungen (12) untersucht und zumindest teilweise belegt.

Im Jahre 1968 wurden die MSC aus Knochenmark von Friedenstein et al. isoliert, der sie den fibroblast colony-forming units (CFU-F) zuordnete (13, 14). In den folgenden Jahren wurden MSC erfolgreich aus weiteren Geweben isoliert, unter anderem aus Skelettmuskel (15), Fettgewebe (16), Nabelschnur (17), Synovialmembran (18), Zahnpulpa (19), Amnionflüssigkeit, foetalem Blut (20), Leber, Knochenmark und Lunge (21).

Die International Society for Cellular Therapy setzte drei Mindestkriterien zur Charakterisierung von mesenchymale Stammzellen fest:

1. MSC müssen in der Zellkultur an Plastik adhärieren
2. MSC müssen mindestens die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90, dürfen jedoch nicht CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α und HLA-DR exprimieren
3. MSC müssen *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzierbar sein (22).

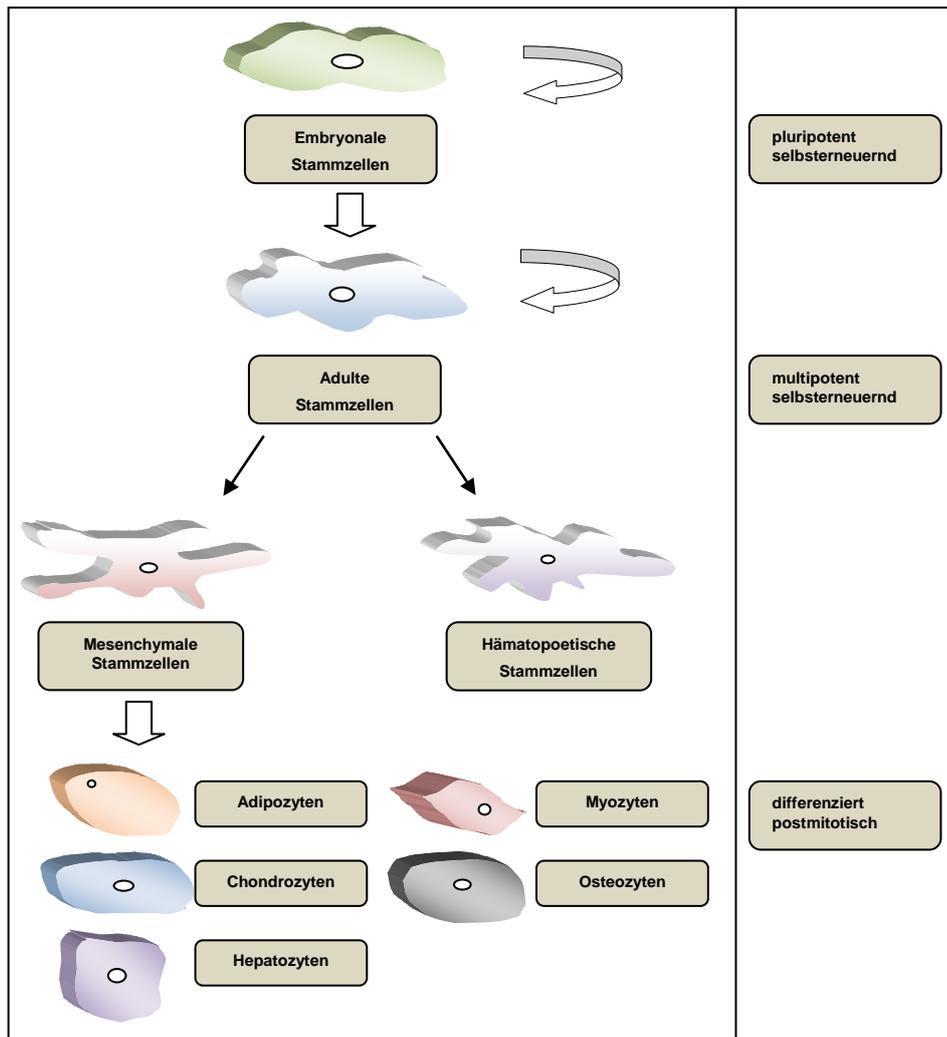


Abbildung 1.1: Übersicht der im menschlichen Körper vorkommenden Stammzellen. Die Stammzellen wurden in der Abbildung entsprechend ihrer Fähigkeit zur Differenzierung absteigend angeordnet (embryonale, adulte Stammzellen).

Heute steht fest, dass MSC in Richtung unterschiedlicher Zelltypen mesenchymaler Gewebe differenzieren können. Während der neurogenen Differenzierung exprimieren die Zellen neuronale Gene (β -III-Tubulin, Tau, Neurofilament-M) (23). Im Zuge der hepatogenen Differenzierung ist die Expression leberspezifischer Gene (Albumin, PCK) (7) nachweisbar. Osteogen oder chondrogen differenzierte MSC bilden Alkalische Phosphatase und Typ II-Kollagen (24). Die Differenzierung von MSC zu Zellen mit ectodermalen oder entodermalen Charakter zeigt also, dass sie ähnlich wie die pluripotenten, embryonalen Stammzellen vielfältig differenzierbar sind (25). Aufgrund des Vorhandenseins verschiedener typischer MSC-Oberflächenmarker und des Fehlens von hämatopoetischen Markern auf der Zellmembran lassen sich MSC phänotypisch klassifizieren. Eine Auswahl von Oberflächengenen zur eindeutigen Charakterisierung von MSC sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (26).

Tabelle 1.1: Oberflächenmarker zur Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen

Auf MSC vorhandene Oberflächenmarker		Auf MSC nicht vorhandene Oberflächenmarker
CD13	CD73	CD31
CD90	CD166	CD34
CD29	CD105	CD45

1.3. Die hepatogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Die Leber ist als größtes Organ des menschlichen Körpers mit einer Vielzahl von überlebenswichtigen Funktionen betraut. Sie besteht zu 70 % aus Parenchymzellen - den Hepatozyten- und zu 30 % aus Gallengangsepithelzellen, Kupfferschen Sternzellen, Itozellen und Endothelzellen. Ihre wichtigsten Aufgaben sind die Verwertung von Nährstoffen, die Aufrechterhaltung der Glucose-, Aminosäuren-, Ammoniak- und Hydrogencarbonathomöostase, die Synthese von Plasmaproteinen, die Gallensäuresynthese, die Metabolisierung von Endo- und Xenobiotika sowie die Bildung und Speicherung von Signalmolekülen.

Makroskopisch lässt sich die Leber in 4 Leberlappen: Lobus dexter, Lobus sinister, lobus quadratus und Lobus caudatus einteilen. Arteriell Blut gelangt über die Arteria hepatica zur Leber und teilt sich im Organ in die Arteriae interlobulares. Nährstoffreiches Blut aus Magen, Darm, Pankreas und der Milz erreicht das Lebergewebe über die Vena portae. Diese verzweigt sich in der Leber in die Venae interlobulares. In den Lebersinusoiden mischt sich das Blut der Vena portae und der Arteria hepatica. Die Lebersinusoiden haben ein Lumen von ca. 9-12 µm Durchmesser und werden von gefensterter Endothel ausgekleidet. Zwischen dem Endothel und den Hepatozyten liegt der Disse'sche Raum, in den die Mikrovilli der Hepatozyten hineinragen.

Histologisch lässt sich das Lebergewebe in Zentralvenenläppchen, Portalvenenläppchen und dem Leberazinus einteilen. Ein Zentralvenenläppchen enthält eine zentral gelegene Vene und radial davon ausgehende Blutsinusoiden und Leberzellbalken aus Hepatozyten. In den Eckpunkten der Zentralvenenläppchen liegt die Glisson'sche Trias mit Endästen der Vena portae, der Arteria hepatica und einem interlobulären Gallengang (Abb. 1.2).

Bei der Einteilung der Leber nach Portalvenenläppchen werden diejenigen Sinusoiden und Leberzellbalken zusammengefasst, die von einem Portalkanal aus versorgt werden. Ein Azinus ist der von der Endstrecke einer Glisson'schen Trias versorgte

Gewebekomplex. Entsprechend der Abnahme des Sauerstoff- und des Metabolitengehalts des Blutes von der Glisson'schen Trias zur Zentralvene hin und der damit verbundenen unterschiedlichen Funktionalität der Hepatozyten, unterteilt man die Leberazini in drei Zonen (I = periportal, II = intermediär, III = perivenös).

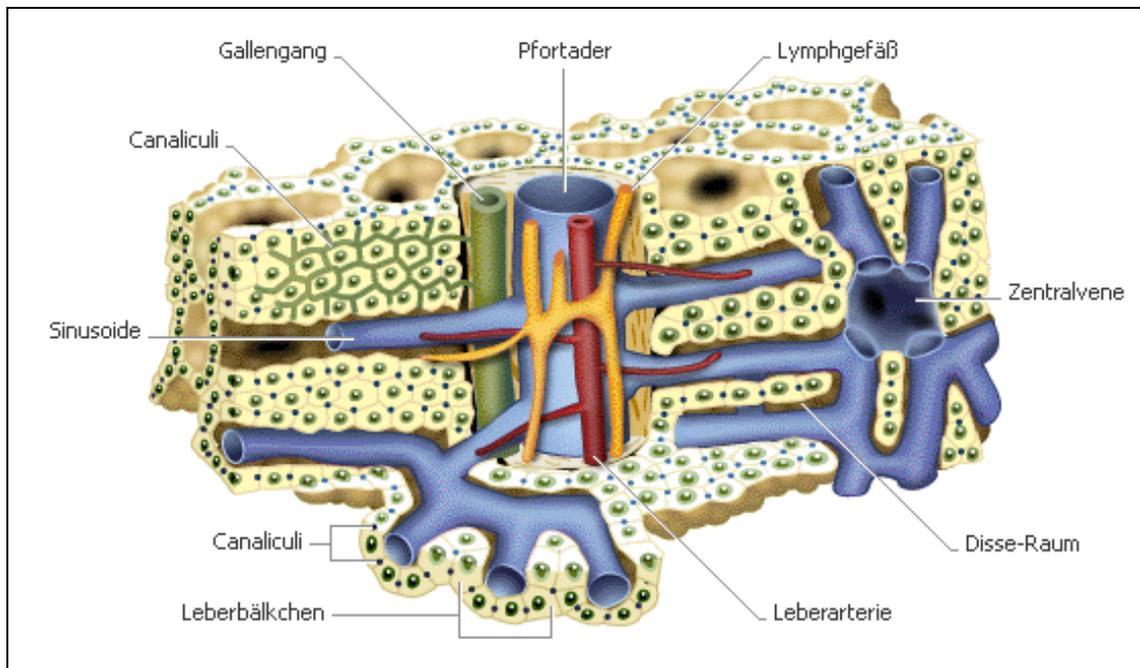


Abbildung 1.2.: Anatomischer Aufbau der Leber (www.braasch-megalith.de)

Die Hepatozyten bilden mit ihrem diploiden bis polyploiden Zellkernen fast $2/3$ des Lebertolumens. Ihre den Sinusoiden zugewandte Oberfläche ist mit Mikrovilli besetzt und ihre apikale Membran begrenzt das Lumen der Gallengangkapillaren. Entsprechend ihrer zentralen Aufgabe im Intermediärstoffwechsel enthalten Hepatozyten viele Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Wie zur Leber als Gesamtorgan gehören zu den Hauptaufgaben der Hepatozyten die Entgiftung des Organismus durch die Elimination von Ammoniak, Xeno- und Endobiotika, die Synthese von Fettsäuren und Gallensäuren, die Speicherung von Vitaminen und die Synthese von Plasmaproteinen wie z.B. des Albumins. Sie sind auch fähig zur Gluconeogenese und zur Glycogenspeicherung, das, stimuliert durch Insulin, in Form von Glycogenpartikeln abgelagert und bei sinkendem Blutzuckerspiegel durch Adrenalin und Glucagon mobilisiert wird. Die Hepatozyten sind also die kleinsten funktionellen Einheiten der Leber.

Nachfolgend soll kurz die Funktion einiger typischer hepatozytärer Proteine beschrieben werden, die in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung hepatozytärer Eigenschaften differenzierter MSC herangezogen wurden. Die Phosphoenolpyruvat-

Carboxykinase 1 katalysiert im Zytosol in einem Schlüsselschritt der Gluconeogenese, die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat (27). Transferrin, ein Glycoprotein, wird von den Hepatozyten synthetisiert und sezerniert und dient dem Transport dreiwertigen Eisens im Serum (28). Zytokeratin 18 ist ein Intermediärfilament, welches auf Hepatozyten und anderen epithelialen Zellen zu finden ist. Eine Mutation dieses Proteins kann zur chronischen Hepatitis und zu labilen Hepatozyten führen (29). Connexine sind die Zellmembran durchspannende Proteine, die so genannte Gap Junctions bilden und so den Transfer von Ionen und kleinen Molekülen zwischen den Zellen ermöglichen. Connexin 32 (CX32) ist ein Gap-Junction Protein, welches nur in Hepatozyten stark und schwächer in Pankreas, Gehirn und Niere exprimiert wird (30). Die intestinale Dipeptidylpeptidase IV (CD26) ist ein Aktivierungsmolekül für T-Zellen, welches als Glycoprotein auf verschiedenen epithelialen Zellen in der Leber, der Niere und im Pankreas zu finden ist. Es ist wahrscheinlich an der Regulation der extrazellulären Konzentration des Adenosine Deaminase Complexing Protein (ADA) beteiligt (31). Albumin wird in der Leber synthetisiert und gehört zur Gruppe der globulären Proteine. Es dient hauptsächlich zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Gefäßsystem und zum Transport von lipophilen Substanzen im Blut (32).

1.4. Zelltherapeutische Ansätze zur Behandlung von Lebererkrankungen

Kommt es zum Versagen der Leberfunktion aufgrund verschiedener Erkrankungen oder Schädigungen, wie z.B. durch die hepatotropen Viren A-E, unerwünschte Arzneimittelwirkungen oder Vergiftungen, so ist eine Organtransplantation die Therapie der Wahl, um das Überleben des Patienten zu sichern. Laut Angaben der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) wurden im Jahr 2007 1590 Patienten zur Lebertransplantation angemeldet und 1088 Lebertransplantationen nach postmortaler Organspende durchgeführt. Die Suche nach alternativen Therapiemethoden versucht, das Missverhältnis von Organspende und Organbedarf zu vermindern. Da der Hepatozyt die kleinste funktionelle Einheit der Leber ist, kann man die Organtransplantation durch die Transplantation einzelner Leberzellen ersetzen. Die klinische Umsetzung dieser auch heute noch attraktiven Methode leidet allerdings an ihrer geringen therapeutischen Wirksamkeit sowie an der geringen Verfügbarkeit von marginalen Spenderlebern zur Isolierung von Hepatozyten in für die Zelltransplantation ausreichender Qualität und Quantität (33).

Eine weitere neuartige Methode zur Behandlung von Leberparenchymschäden stellt die Transplantation von hepatogen differenzierten humanen MSC dar. Petersen et al. beschrieben 1999 zum ersten Mal die Möglichkeit, dass Hepatozyten unter definierten

Bedingungen aus Knochenmarkstammzellen entstehen können (34). Nachfolgend wurden von anderen Arbeitsgruppen MSC aus dem Knochenmark der Ratte isoliert, die nach Kultur in Gegenwart spezifischer Cytokine und Wachstumsfaktoren leberspezifische Marker wie AFP und Albumin exprimierten und in der Lage waren, Harnstoff und Glykogen zu synthetisieren (35). Auch in aus Nabelschnurblut isolierten und hepatozytär differenzierten MSC konnte eine leberspezifische Expression von AFP, CK18 und Albumin nachgewiesen werden (36).

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass hepatogen vordifferenzierte MSC aus menschlichem Knochenmark leberspezifische Funktionen ausführten: die Synthese und Speicherung von Glykogen, die Harnstoffsynthese sowie die Expression von Albumin, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Connexin32 und des für Hepatozyten spezifischen Antigens HepPar1. Die Hepatozyten ähnlichen differenzierten MSC wurden über die Portalvene in die Lebern von immundefizienten Pfg/Rag2^{-/-} Mäusen nach einer 1/3 Hepatektomie infundiert. Die transplantierten menschlichen Zellen integrierten sich im Mausleberparenchym besonders im Bereich der periportalen Felder und exprimierten weiterhin hepatozytenspezifische Gene wie das humane HepPar1 und die PCK1 (7).

1.5. Der canonische und nicht-canonische/Ca²⁺-abhängige Wnt-Signalweg

Wnt-Proteine und die von ihnen initiierten Signalwege spielen eine bedeutende Rolle bei der embryonalen Entwicklung und bei der Entstehung von Krankheiten. Grundsätzlich lassen sich zwei Signalwege der Wnt-Proteine in der Zelle unterscheiden. Zum einen die nicht-canonische, Calcium-abhängige Signalkaskade und zum anderen der canonische Weg, bei dem das Protein β -Catenin eine zentrale Rolle einnimmt. Beide Signalkaskaden interagieren beim Wachstum und der Differenzierung der Zellen miteinander (37, 38).

Wnt-Proteine sind die Liganden der Frizzled-Rezeptoren. Sie werden von Zellen sezerniert und sind Cystein reiche, glycosylierte Proteinliganden mit Einfluss auf Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Zellzyklus (39).

Die Frizzled-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren Struktur aus 7 Transmembransegmenten besteht (40). Bisher wurden 10 verschiedene Frizzled-Rezeptoren entdeckt. Gut untersucht ist die Aktivierung des canonischen Wnt-Signalweges über Frizzled-1 (41). Die Aktivierung von Frizzled-2 spielt eine Rolle im nicht-canonischen Wnt/Calcium-Signalweg, in dem über die Aktivierung der Phospholipase C intrazelluläres Calcium mobilisiert wird (42). Von den mindestens 19 bei Säugern bekannten Wnt-Proteinen sind unter anderem die

Wnt-Proteine Wnt4 und Wnt5a dem nicht-canonischen und Wnt3a und 10a dem canonischen Signalweg zuzuordnen (43).

Neben seiner Rolle als Signalprotein im canonischen Wnt-Signalweg ist β -Catenin ein wichtiger Bestandteil von Adhäsionskomplexen der Zellmembran. Es ist hier mit Cadherinen assoziiert und stellt so eine Verbindung zwischen diesen und Komponenten des Zytoskeletts, z.B. α -Actin, her (44). Bei der canonischen Wnt-Signalkaskade bindet ein Wnt-Ligand an eine extrazelluläre Domäne eines Frizzled-Rezeptors und an einen Co-Rezeptor, das Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP). Es entstehen membranassoziierte heterooligomere Proteinkomplexe, in denen der intrazelluläre Anteil des Frizzled-Rezeptors mit dem Protein Disheveled interagiert. Der intrazelluläre Anteil des LRP geht eine Verbindung mit dem Protein Axin ein (45). In der Zelle wird der Komplex, welcher aus den Proteinen Gycogensynthasekinase-3 (GSK-3), Axin und dem Tumorsuppressor-Protein Adenomatosis Polyposis Coli (APC) besteht, inhibiert, so dass es nicht zur Phosphorylierung von β -Catenin kommt (Abb. 1.3, rechts). Nicht phosphoryliertes β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma, wandert in den Zellkern, geht dort einen Komplex mit einem Vertreter der T Cell-specific Transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor (TCF/Lef)-Familie von Transkriptionsfaktoren ein (46) und stimuliert die Transkription von spezifischen Wnt-Zielgenen (Abb. 1.3 rechts). Mehr als 50 verschiedene Zielgene sind bekannt, die vor allem der Regulation des Zellzyklus zuzuordnen sind. Dazu gehören zum Beispiel c-MYC (47), Cyclin D1 (48), VEGF (49) u.a..

In Säugern sind verschiedene Gene der TCF/Lef1-Familie bekannt, u.a. Lef1, TCF3 und TCF4. Allen TCF/Lef1-Proteinen ist eine nahezu identische DNA-Binde-Domäne, die HGM-box gemeinsam (50). Befindet sich kein β -Catenin im Zellkern, dann ist der TCF/Lef-Komplex an den Proteinkomplex Groucho/TLE gebunden, der als Repressor der Transkription von Zielgenen fungiert. Kommt es jedoch zur Translokation von β -Catenin in den Kern, so wird die Interaktion von TCF/Lef und Groucho/TLE aufgehoben (51).

Wird die Zelle nicht durch Wnt stimuliert, führt die Bildung des GSK-3-Axin-APC-Komplexes zum zytosolischen Abbau von β -Catenin (52). Dabei wird das β -Catenin zuerst durch die Caseinkinase 1a (CK1a) an Serin 45 phosphoryliert (53). Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die nachfolgende Phosphorylierung des β -Catenins durch die GSK-3 an den Serinen 33 und 37 sowie am Threonin 41 (54). Das phosphorylierte β -Catenin tritt mit dem F-box Protein beta-Transducin Repeat-Containing Protein (β -TrCP) in Interaktion. Dieses Protein ist Bestandteil des SCF-E3-

Ubiquitin-Ligase-Komplexes und markiert das β -Catenin für die Ubiquitinylierung und den folgenden Abbau im Proteasom (55) (Abb. 1.3, links).

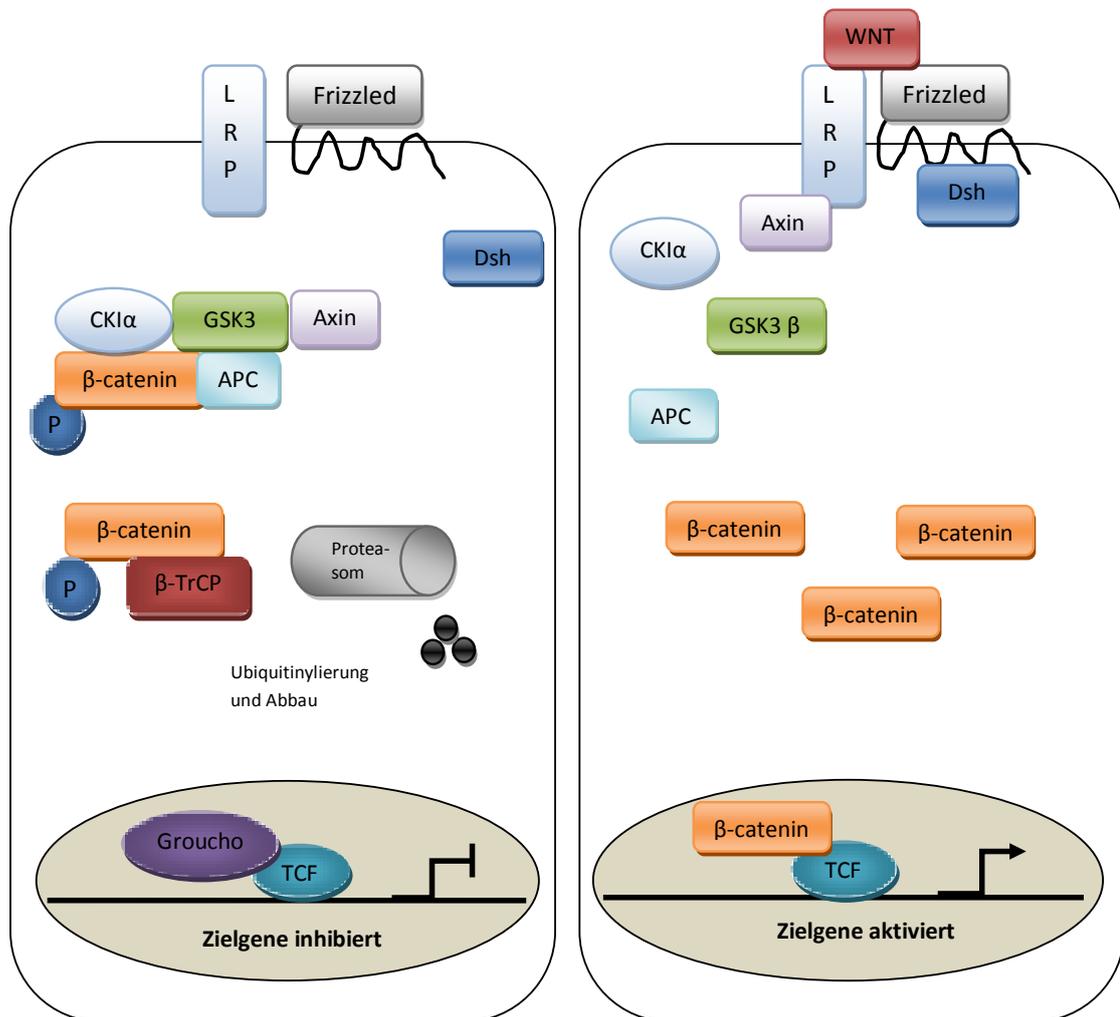


Abbildung 1.3: Darstellung des canonischen Wnt-Signalweges in inaktivierter (links) und aktivierter (rechts) Form. In Abwesenheit von Wnt kommt es zur GSK-3-abhängigen Phosphorylierung von β -Catenin und dessen Abbau in Proteasomen. Die Bindung eines Wnt-Liganden an einen Frizzled-Rezeptor verhindert den Abbau von β -Catenin und ermöglicht die Translokation von β -Catenin in den Kern, wo es zu einer TCF/Lef-vermittelten Aktivierung von β -Catenin-Zielgenen kommt. (nach David M. Eisenmann, 2005, http://www.wormbook.org/chapters/www_wntsignaling/wntsignaling.html)

1.6. Die Regulation des canonischen Wnt-Signalweges

Der Wnt-Signalweg wird auf verschiedenen Ebenen der Signalkaskade durch unterschiedliche Proteine reguliert. Die Interaktion der Proteine Dkk-, WIF- und der SFRP-Familie mit den Wnt-Liganden oder mit deren Rezeptoren erfolgt extrazellulär und hemmt die Signalübertragung in die Zelle (56). TCFs können im Zytoplasma durch die LIT-1/Nemo-like Kinase phosphoryliert und so ihre Bindung an die DNA reguliert werden (57). Die Aktivität des β -Catenin kann im Zellkern durch Interaktionen mit

verschiedenen Proteinen z.B. Pontin52 (58), Brg-1 (59) oder Pygopus (60) stimuliert werden. Die durch β -Catenin vermittelte Transkription kann durch die Proteine Reptin52 (58), einen Interaktionspartner und Antagonist vom Pontin52, durch ICAT über die Hemmung der Interaktion von β -Catenin und TCF4 (61) sowie durch XSox17a/b und XSox3, zwei HMG-box-Proteine (62), gehemmt werden.

Verschiedene andere Proteine stehen mit der TCF/Lef-Familie in Verbindung und modulieren ihre Funktion. Der Transkriptionsfaktor 7 (in der Literatur auch TCF1 genannt) ist in die Differenzierung von T-Lymphozyten involviert. Er spielt auch eine Rolle als Transkriptionsfaktor im canonischen Wnt-Signalweg im Sinne eines negativen Regulators von β -Catenin/TCF4-Zielgenen (63). Studien zeigten, dass TCF7-knockout-Mäuse Adenome im Darm und in den Brustdrüsen entwickelten (64). Darauf basierend wird dem TCF7 eine Funktion als „Rückkopplungsrepressor“ von β -Catenin/TCF4-Zielgenen zugeschrieben.

1.7. Die Glycogensynthase-Kinase 3

Vor mehr als 20 Jahren wurde die GSK-3 als eine Proteinkinase, die die Glycogensynthase phosphorylieren und inaktivieren kann, entdeckt (65). Sie ist eine in allen eukaryotischen Zellen vorkommende Serin-/Threoninkinase und spielt bei verschiedenen zellulären Prozessen von der insulinabhängigen Glycogensynthese bis hin zu Signalwegen der Differenzierung und des Wachstums von Zellen eine Schlüsselrolle (54). Die GSK-3 kommt in zwei Isoformen vor, die GSK-3 α mit einem Molekulargewicht von 51 kDa und die GSK-3 β mit 47 kDa. Beide Proteine zeigen eine 97 %-ige Übereinstimmung in ihrer katalytischen Kinasedomäne (66).

Im canonischen Wnt-Signalweg spielt die GSK-3 β eine zentrale Rolle, indem sie β -Catenin phosphoryliert und so zu dessen Abbau im Proteasom markiert. Die Inaktivierung der GSK-3 β führt zur Hemmung des Abbaus des β -Catenins und somit zur Aktivierung der Transkription von β -Catenin- und TCF/Lef-abhängigen Zielgenen. Verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren wie u.a. Insulin, EGF und PDGF können in vivo durch Phosphorylierung zur Inaktivierung der GSK-3 führen. Insulin inhibiert die GSK-3 über einen Phosphoinositol-3-Kinase-abhängigen Mechanismus. EGF und PDGF bewirken eine Hemmung der GSK-3 β über die MAP-Kinase- oder PKA-abhängige Phosphorylierung am Serin 9 und Serin 21 der GSK-3 (67).

1.8. Inaktivierung der Glycogensynthase-Kinase 3 durch den selektiven Inhibitor BIO

Eine pharmakologische selektive Hemmung der GSK-3 in der Zellkultur kann durch den Wirkstoff (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxim (BIO) erfolgen. Das Alkaloid Indirubin, ein rotvioletter Farbstoff, besitzt die Eigenschaft der Hemmung von GSK-3 und CDK. Verschiedene Spezies, wie einige Pflanzen oder Schneckenarten synthetisieren Vorläufersubstanzen des Indirubins, so dass durch deren enzymatischen Abbau oder durch saure Hydrolyse unter oxidativen Bedingungen Indirubin entsteht. Durch die Substitution von Brom an der Position 6 des Indirubin lässt sich eine Selektivität des Stoffes für die GSK-3 erreichen (68). BIO führt über die Besetzung einer ATP-Bindungsstelle der GSK-3 β zu deren Inaktivierung durch Phosphorylierung am Ser9 und verhindert so eine GSK-3 β abhängige Phosphorylierung des β -Catenins im Zytoplasma (69).

1.9. Der Wnt-Signalweg in Stammzellen

In der Literatur wird der Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Differenzierung von Stammzellen aus Untersuchungen an unterschiedlichen Stammzellarten und unterschiedlichen Differenzierungsprozessen heterogen beschrieben. Untersuchungen an embryonalen Stammzellen des Menschen und der Maus, die die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung unter dem Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO zum Gegenstand hatten, führten zu dem Ergebnis, dass die Differenzierung dieser Zellen unter Behandlung mit BIO verlangsamt war und der Abbruch der Behandlung zum Fortschreiten der Differenzierung führte (70). Der Einfluss von β -Catenin und Wnt3a auf mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe von Schweinen während der adipogenen und osteogenen Differenzierung wurde von Yang GS et al. näher untersucht. Es zeigte sich bei Aktivierung des β -Catenin-abhängigen Signalweges eine Hemmung der adipogenen und eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung (71). Studien an Herzmuskelzellen, welche mit dem GSK-3 Inhibitor BIO behandelt wurden, führten zu dem Ergebnis, dass in den behandelten Zellen die Proliferation durch Steigerung der Zellzyklusraten und die Anzahl der Mitosen im Vergleich zu Kontrollgruppen angeregt wurden (72). Aus verschiedenen Studien zur Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen wurde ersichtlich, dass die Behandlung der Zellen mit dem Wnt-Liganden 3a und somit die Aktivierung des canonischen Wnt-Signalweges wichtig für die Differenzierung der Zellen zu Hepatozyten ist (73, 74). Weitere Studien zur osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zeigten, dass eine

Aktivierung des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweges zu einer langsameren osteogenen Differenzierung dieser Zellen und zu einer stärkeren Proliferation der Zellen führte. Im Gegensatz dazu verstärkte die Stimulation des nicht-canonischen Wnt-Signalweges mit dem Wnt-Liganden 5a die osteogene Differenzierung von MSC (75).

1.10. Die Rolle des canonischen Wnt-Signalweges in der Leberentwicklung und der Leberregeneration

In Hepatozyten ist β -Catenin zum einen das zentrale Molekül im durch Wnt-Liganden aktivierten canonischen Wnt-Signalweg, zum anderen liegt es in Assoziation mit E-Cadherin oder mit c-Met, dem HGF-Rezeptor, als membranständiger Komplex vor. Zu Beginn der embryonalen Leberentwicklung ist die Menge an β -Catenin in Mauslebern am Tag E10 hochreguliert und wirkt stimulierend auf die Zellproliferation (76). Ab dem Stadium E15 sinkt die Menge des zytoplasmatischen β -Catenins in embryonalen Mauslebern und es kommt vermehrt zur Lokalisation des β -Catenins an die Zellmembran der Hepatozyten. Dieser Vorgang deutet auf eine Hepatozytenreifung und Polarisierung hin (77). Beta-Catenin scheint auch eine Rolle in der Entwicklung von Gallengangsepithelien zu spielen (76).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie die Menge an β -Catenin in Hepatozyten erhöht ist. Es kommt innerhalb von 24 h nach Hepatektomie zur Translokation des β -Catenins in den Zellkern. Außerdem spielt das Wachstumshormon HGF bei der Leberregeneration eine wichtige Rolle. Dessen Expression ist in der Frühphase nach Hepatektomie gesteigert (78). Durch diese Lokalisation von β -Catenin im Zellkern wird die Expression verschiedener nachgeschalteter Gene wie Cyclin D1, c-MYC, Matrix-Metalloproteinasen, Epidermal Growth Factor (EGF) und andere stimuliert (79).

1.11. Der HGF-Rezeptor

Das Zytokin Hepatocyte Growth Factor (HGF), auch Scatter factor (SF) genannt, wird von Zellen mit mesenchymalen Ursprung gebildet. Es spielt eine Rolle beim Zellwachstum, Zellmotilität und Zellmorphologie. HGF ist der einzige Ligand für seinen Tyrosinkinase-Rezeptor, den HGF-Rezeptor auch c-Met genannt (80). Der Rezeptor wird durch das Proto-oncogen Met (mesenchymal epithelial transition factor) in allen epithelialen Zellen codiert und besteht aus einer extrazellulären α -Einheit und einer β -Untereinheit mit einem extrazellulären Anteil, einem Transmembranabschnitt und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (81).

Beta-Catenin bildet einen Komplex mit E-Cadherin und α -Catenin an der Innenseite der Zellmembran. Die Stimulation von c-Met mit HGF bewirkt eine Wnt-unabhängige Phosphorylierung von β -Catenin durch die Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des c-Met (82), (83). Dadurch dissoziiert β -Catenin vom E-Cadherin und liegt frei im Zytoplasma vor. Es kann in den Zellkern einwandern und so die Transkription spezifischer Gene aktivieren (84) (Abb. 1.4). Über c-Met kann es neben der Wnt-unabhängigen Aktivierung des β -Catenin-Signalweges auch zur Aktivierung einer Vielzahl anderer Signalwege wie RAS-, PI3K-, STAT- und Notch-Signalweg (85) kommen.

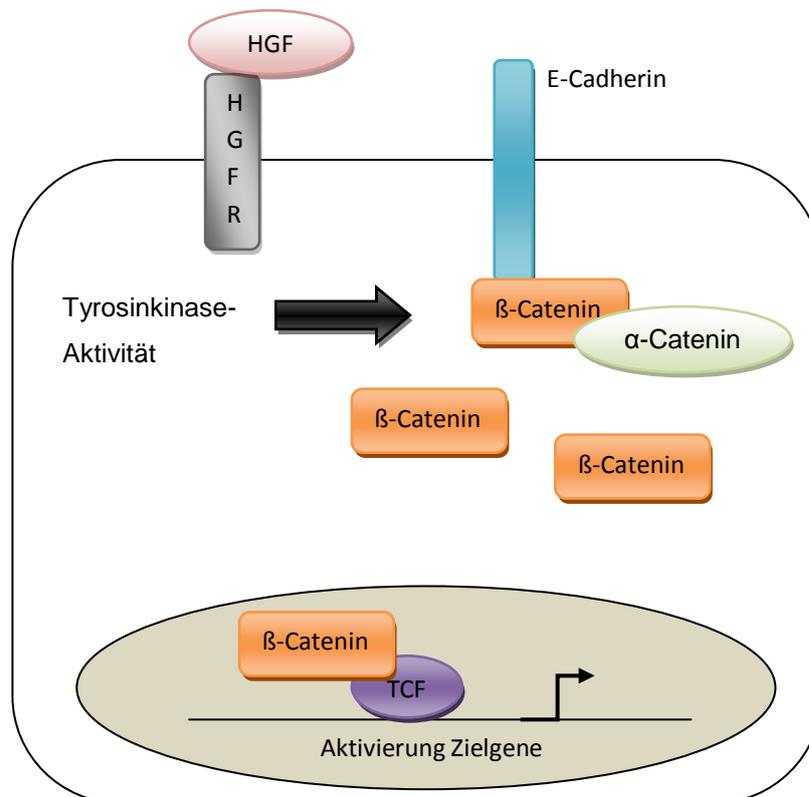


Abbildung 1.4: Die Rolle der HGFR/c-Met im β -Catenin-Signalweg. Die Aktivierung des HGFR durch HGF führt zu einer Tyrosylphosphorylierung des β -Catenins durch die c-Met- Tyrosinkinase. Es kommt zur Dissoziation des β -Catenins aus seinem Verband mit E-Cadherin in Zone Adhärens der Zellmembran. Das β -Catenin liegt frei im Zellplasma vor und kann, solange es nicht degradiert wird, in den Zellkern translozieren und dort die Aktivierung von Zielgenen initiieren. (nach:http://ccr.cancer.gov/news/frontiers/may2007/-bottaro_fig1.asp)

2. Zielstellung

Mesenchymale Stammzellen spielen in der regenerativen Medizin eine immer größere Rolle als neuartige Ressource für die Herstellung von Zell- und Gewebetransplantaten. Über die Beteiligung spezifischer Signalwege an Proliferation und Differenzierung dieser Zellen ist wenig bekannt.

Der canonische Wnt-Signalweg scheint in der Embryogenese eine bedeutende Rolle bei der Morphogenese und Differenzierung zu spielen. Daher war das Ziel der Arbeit, die Beteiligung des canonischen Wnt-Signalweges bei der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark isoliert, expandiert und die hepatogene Differenzierung der MSC durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren induziert.

Die molekularen Komponenten des Wnt-Signalweges, β -Catenin, GSK-3 β und TCF/Lef1 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden untersucht. Experimentell erfolgte die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch den GSK-3 Inhibitor BIO.

Die hepatogene Differenzierung der MSC wurde anhand der Expression von typischen hepatozytären Markern wie PCK, CD26 und Albumin überprüft.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Standardgeräte einer Laborausstattung werden nicht separat aufgeführt. Folgende Geräte gehören nicht zur Standardlaborausrüstung:

Odyssey Infrared Imaging System – LI-COR GmbH (Bad Homburg, Deutschland)

MEV Slee Cryostat – Slee Medical GmbH (Mainz, Deutschland)

HM 325 Microm – GMI Inc. (Ramsey, USA)

Nikon Eclipse E600 Fluoreszenz -Mikroskop – Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Nikon Eclipse E4200 Fluoreszenz-Mikroskop – Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Konfokales Laserscanmikroskop Leica TCS SP5 – Leica Camera AG (Solms, Deutschland)

Glomax 96 Microplate Luminometer – Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)

FACS Calibur – BD Bioscience GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Syngene Bioimaging System – Synoptics LTD (Cambridge, UK)

3.2. Chemikalien

Biochrom, Berlin, Deutschland: Dulbecco's MEM mit 1,0 g/l D-Glucose mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃; Gentamycin,

BioRad, München, Deutschland: Rox Passive Reference Dye

Calbiochem, Darmstadt, Deutschland: GSK-3 Inhibitor IX (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxim

Cc pro, Oberdorla, Deutschland: Penicillin; Streptomycin

Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland: 2 x PCR Master Mix, M-MuLV Reverse Transcriptase, Random-Primer, RNase Out

Gibco-Invotrogen, Karlsruhe, Deutschland: Dulbecco's MEM ohne Glucose mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat; Dulbecco's MEM with 4,5 g/l Glucose mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat; foetales Kälberserum (FKS)

Merck, Darmstadt, Deutschland: CuSO₄ x 5 H₂O; MnSO₄; NaHCO₃, Sudan III,

PeproTech, Hamburg, Deutschland: EGF (Epidermal Growth Factor)

Promega, Mannheim, Deutschland: PCR-Master Mix, Luciferase Reporter Assay

Roche, Mannheim, Deutschland: ITS (Insulin-Transferrin-Selenit), complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Serva, Heidelberg, Deutschland: Galactose; L-Ornithin-HCl; L-Prolin; N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N`-(2-Ethan-Sulfonsäure) (Hepes), Acrylamid

Stratagene, Amsterdam, Niederlande: SYBR Green

Strathmann Biotec AG, Hamburg, Deutschland: HGF (Hepatocyte Growth Factor)

Sigma-Aldrich, München, Deutschland: Rinderserumalbumin (BSA); apo-Transferrin; Dexamethason, Selen; ZnSO₄ x 7H₂O, Glycerol-3-Phosphat, L-Ascorbinsäure, Insulin, Indomethacin, 3-iso-buthyl-1-Methylxanthine, Rosiglitazone, Alizarin, 5-Azacytidine, Linolsäure, MCDB 201 mit L-Glutamin, 30nM Hepes, ohne NaHCO₃

3.3. Puffer und Lösungen

APS:

1 g	Ammoniumperoxidsulfat
10 ml	H ₂ O

Blockierungslösung für SDS-Gele:

4,5 % (w/v)	Magermilchpulver
4 % (w/v)	BSA
0,2 % (v/v)	Tween in 1x TBS

DEPC-Lösung:

2 ml	DEPC
ad 500 ml	H ₂ O

Sterilisation: 20 min autoklavieren.

30 % DMSO:

30 ml	Dimethylsulfoxid
ad 100 ml	PBS

10x Laufpuffer für SDS-PAGE:

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycerin
1,0 % (w/v)	SDS
ad 1000 ml	H ₂ O

Probenauftragspuffer für SDS-PAGE (PAGE-Puffer 10 X):

0,127 mM	Tris-HCl pH 6,8
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
4 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerol
10 % (v/v)	Mercaptoethanol in H ₂ O

PBS (9 mM Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt):

130 ml	0,5 M Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
50 ml	0,5 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
72 g	NaCl
ad 10 Liter	H ₂ O
pH 7,2 - 7,4	

RIPA-Puffer:

150 mM	NaCl
1 % (v/v)	NP40
0,5 % (w/v)	Natriumdesoxycholat
0,1 % (w/v)	SDS
50 mM	Tris
pH 8	

10 % SDS:

20 g	SDS
ad 200 ml	H ₂ O

10 x Saccharosefarbmarker:

60 g	Saccharose
0,1 ml	Bromphenolblau
ad 100 ml	TAE

Stripping-Puffer für die Regeneration von Nitrozellulose-Membranen:

62,5 mM	Tris pH6,8
100 mM	2-Mercaptoethanol
2 % (w/v)	SDS
ad 100 ml	H ₂ O

5 x TAE-Puffer:

242 g	Tris-Base
57 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000 ml	H ₂ O

10 x TBE:

108 g	Tris-Base
55 g	Borsäure
9,3 g	Dinatrium-EDTA
<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O

10 x TBS:

56100 mM	Glycin HCl pH 3,0
50 mM	Tris HCl pH 8,9
3 M	NaCl
pH 7,6	

TBS-Tween:

100 ml	10 x TBS
10 ml	0,5 % Tween 20
<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O

5 x Transferpuffer:

30,29 g	Tris
35,66 g	Glycin
2,5 ml	10 % SDS
<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O

0,5 M Tris:

30,29 g	Tris
<i>ad</i> 500 ml	H ₂ O
pH 6,8	

1,5 M Tris:

90,86 g	Tris
<i>ad</i> 500 ml	H ₂ O
pH 8,8	

0,5 % Triton/PBS:

50 µl	Triton X-100
<i>ad</i> 9,95 ml	1 x PBS

3.4. Medien

3.4.1. Erhaltungsmedium mit 6 Faktoren

Ein Liter Dulbecco's MEM (mit 1,0 g/l D-Glucose, mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃) wird mit 3,7 g NaHCO₃ (0,042 M) vermischt und steril filtriert. Zusätzlich wird MCDB 201-Pulver in 1 Liter H₂O aufgelöst, steril filtriert und ein pH-Wert von 7,2 mit HCl- bzw. NaOH eingestellt. Beide Medien werden in einem Verhältnis von 60 % (D-MEM) und 40 % (MCDB 201) zusammengefügt. Sie bilden mit den folgenden 6 Zusätzen das EM6F: Selen 5 ng/ml, Transferrin 5 µg/ml, Linolsäure 4,7 µg/ml, Dexamethason 1 nM, Insulin 5 µg/ml, Ascorbinsäure 0,1 mM.

Vor Gebrauch wird dem Medium 1 % Penicillin/Streptomycin und 15 % foetales Kälberserum (zuvor 30 min bei 65°C inaktiviert) hinzugegeben.

3.4.2. hepatogenes Differenzierungsmedium

Zuerst werden 500 ml Dulbecco's MEM (ohne Glucose, mit L-Glutamin), 500ml Dulbecco's MEM (mit 4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin) und 1 l Minimum Essential Medium Eagle sowie 0,35 g NaHCO₃ vermischt. Zu den 2 l Medium werden 0,1 % Albumin, 5,55 mM Galaktose, 0,3 mM Ornithin, 0,13 mM Prolin, 4,99 mM HEPES, 1,25 mM Nicotinamid, 0,5 mM Glutamin sowie 2 mM ZnCl₂, 0,8 mM CuSO₄ x 5 H₂O, 2,6 mM ZnSO₄ x 7 H₂O, 14,8 mM MnSO₄ gegeben und alles steril filtriert. Vor Gebrauch des Mediums wird dieses mit 250 µg/l Insulin, 25 mg/l Gentamycin, 0,5 % Penicillin/Streptomycin, 25 nM Dexamethason und 0,025 % ITS vervollständigt.

Vor Gebrauch werden noch die Wachstumsfaktoren EGF (20 µg/l) und HGF (40 µg/l) in das Medium gegeben.

3.4.3. osteogenes Differenzierungsmedium

In 1 Liter Dulbecco's MEM (mit 1,0 g/l D-Glucose, mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃) werden 200 µM L-Ascorbinsäure, 1 µM Dexamethason und 10 mM Glycerin-3-Phosphat hinzugegeben und alles zusammen steril filtriert. Vor Gebrauch des Mediums werden diesem 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugegeben.

3.4.4. adipogenes Differenzierungsmedium

In 1 Liter Dulbecco's MEM (mit 1,0 g/l D-Glucose, mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃) werden 50 µM Dexamethason, 10 µg/ml Insulin, 100 µM Indomethacin, 500 µM 3-isobutyl-1-Methylxanthin, 5 µM Rosiglitazon zugegeben und steril filtriert. Vor Gebrauch des Mediums werden diesem 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugegeben.

3. 5. Antikörper

3.5.1. Primärantikörper

Tabelle 3.1: Primärantikörper für Western Blot (WB), Immunzytochemie (IZC) und FACS-Analysen

Antikörper	Herkunft Spezies	Firma	Verdünnung Anwendung Konjugat
anti-GFP	polyklonal; Kaninchen	Chemicon	1:800, WB
anti-human CD105	monoklonal; Maus	Serotec	1:100 FACS, FITC
anti-human CD13	monoklonal; Maus	BD Bioscience	1:100 FACS, PE
anti-human CD14	monoklonal; Maus	BD Bioscience	1:100 FACS, FITC
anti-human D166	monoklonal; Maus	BD Bioscience	1:100 FACS, PE
anti-human CD29	monoklonal; Maus	BD Bioscience	1:100 FACS, PE
anti-human CD34	monoklonal; Maus	BD Bioscience	1:100 FACS, FITC
anti-human CD44	monoklonal; Maus	BD Bioscience	1:100 FACS, PE
anti-human CD45	monoklonal; Maus	BD Bioscience	1:100 FACS, FITC
anti-human GSK- 3 β	polyklonal; Kaninchen	Cell Signalling	1:1000, WB, 1:50 IZC
anti-human Phospho-GSK-3 β	polyklonal, Kaninchen	Cell Signalling	1:1000, WB, 1:50 IZC
anti-human Phospho- β - Catenin	polyklonal; Kaninchen	Cell Signalling	1:1000, WB, 1:50 IZC
anti-human Vinculin	monoklonal; Maus	Sigma	1:1000, WB,
anti-human β - Catenin	monoklonal; Maus	Santa Cruz	1:1200, WB, 1:100 IZC

3.5.2. Sekundärantikörper

Tabelle 3.2: Sekundärantikörper für Western Blot (WB) und Immunzytochemie (IZC)

Antikörper	Herkunft Spezies	Firma	Verdünnung Anwendung Konjugat
anti-Maus	polyklonal; Ziege	Dianova	1:300, IZC, FITC
anti-Maus	polyklonal; Ziege	Dianova	1:400, IZC, Cy-3
anti-Kaninchen	polyklonal; Ziege	Dianova	1:400, IZC, Cy-3
anti-Maus Alexafluor488	polyklonal; Ziege	Invitrogen	1:100, IZC
anti-Kaninchen Alexafluor488	polyklonal; Ziege	Invitrogen	1:100, IZC
anti-Maus IRDye 800CW	polyklonal; Ziege	Li-Cor Biosciences	1:10.000, WB
anti-Maus IRDye 680	polyklonal; Ziege	Li-Cor Biosciences	1:10.000, WB
anti-Kaninchen IRDye 800CW	polyklonal; Ziege	Li-Cor Biosciences	1:10.000, WB
anti-Kaninchen IRDye 680	polyklonal; Ziege	Li-Cor Biosciences	1:10.000, WB

3.6. Oligonucleotide

Die in der nachfolgenden Liste aufgeführten Primer wurden mit der Software Primer 3 erstellt und von der Firma MWG synthetisiert. Die Datenbank von NCBI wurde zur Verwendung der mRNA-Sequenzen der einzelnen Gene benutzt (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Tabelle 3.3: Primersequenzen für die RT-PCR und die Real Time-PCR

Gen	Primersequenz	Annealing- Temperatur
Albumin	Fow: 5'-CGG ACC TTG CCA AGT ATA TC-3' Rev: 5'-GCA GCA CGA CAG AGT AAT CA-3'	56°
CD26	Fow: 5'-GGA GCT GTG AAT CCA ACT GT-3' Rev: 5'-GCC ACT AAG CAG TTC CAT CT-3'	54°
CK18	Fow: 5'-GAAGGAGACCATGCAAAGCCTG-3' Rev: 5'-CATGAAGAGCAGCTCCTCCTTG-3'	55°
c-MYC	Fow: 5'-CAG CTG CTT AGA CGC TGG ATT-3' Rev: 5'-GTA GAA ATA CGG CTG CAC CGA-3'	60°
Cx32	Fow: 5'-GGCGTGAACCGGCATTCTAC-3' Rev: 5'-ACAACAGCCGGAACACCACG-3'	54°

GAPDH	Fow: 5'-GACCCCTTCATTGACCTC-3' Rev: 5'-GCAATGCCAGCCCCAG-3'	52°
GSK-3 β	Fow: 5'-GGT GTG GAT CAG TTG GTA GA-3' Rev: 5'-AGC TTC CAG TGG TGT TAG TC-3'	60°
LPL	Fow: 5'-ATG GAG AGC AAA GCC CTG CTC-3' Rev: 5'-TAC AGG GCG GCC ACA AGT TTT-3'	56°
Osteonectin	Fow: 5'-GGG CTC TGC CTT AAA CAC AC-3' Rev: 5'-GCT CCC AAA AGT TTG AAC CA-3'	56°
PCK 1	Fow: 5'-AAG AGA CAC AGT GCC CAT CC -3' Rev: 5'-ACG TAG GGT GAA TCC GTC AG -3'	60°
PPAR γ	Fow: 5'-GCT GTT ATG GGT GAA ACT CTG-3' Rev: 5'-ATA AGG TGG AGA TGC AGG CTC-3'	56°
β -Actin	Fow: 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3' Rev: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'	60°
β -Catenin	Fow: 5'-GTT CGC CTT CAC TAT GGA CT-3' Rev: 5'-CTC CGG TAC AAC CTT CAA CT-3'	60°
TCF4	Fow: 5'-GGT TCC GGT TCC ACA GCT TC-3' Rev: 5'-ATC CTC CGC TCC TTC TCA CG-3'	56°
TCF7	Fow: 5'-GCT GCA CAA GGC CAA TCA GC-3' Rev: 5'-CTT CAG GTT GCG GTC GAA GG-3'	55°
TFN	Fow: 5'-GTGGCCTTTGTCAAGCA-3' Rev: 5'-CTCCATCCAAGCTCATG-3'	56°
Vinculin	Fow: 5'-TCT CGG CTG CTC GTA TCT TA-3' Rev: 5'-CAG CAT CTG AGG CTG AAT GT-3'	60°

3.7. Zellbiologische Methoden

3.7.1. Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem humanen Knochenmark

Die Entnahme des humanen Knochenmarks wurde unter sterilen operativen Bedingungen aus dem Femurknochen während der Implantation eines künstlichen Hüftgelenkes bzw. eines künstlichen Kniegelenkes durchgeführt. Die Zustimmung der Patienten für diese Entnahme und das Einverständnis der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität lagen vor. Bei Zugabe von isotonem 3,8 %-igem Natriumcitrat zum Knochenmark kommt es zur Hemmung der Blutgerinnung durch Entzug von Kalziumionen. Die Lagerung der Knochenmarkproben bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte auf Eis.

Das Knochenmark wurde durch ein Nylonnetz mit einer Maschengröße von 140 μ m gesiebt, das durchgesiebte Material in einem 50 ml Röhrchen mit eiskaltem PBS aufgefüllt (Aufreinigung Nr.1) und mit 1000 x g für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Waschschrift wurde 2-3 mal wiederholt. Das aufgefangene Material wurde anschließend in 15-25 ml D-MEM (low glucose) aufgenommen und mit 0,075 % Collagenase Typ I verdaut (Aufreinigung Nr.2). Nach 25 Minuten erfolgte das Abstoppen des Collagenase-Verdau durch die Zugabe von 5 % inaktiviertem FKS. Anschließend wurde die Suspension bei 1000 x g für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Das Pellet wurde in ca. 20-30 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Die Wiederholung des Waschschrilles erfolgte 2-3 Mal. Das letzte Pellet wurde in 1 ml PBS suspendiert. Zur Entfernung der letzten Fettzellen und Erythrozyten wird eine Percoll-Dichtezentrifugation durchgeföhrt. Dazu wurden 10 ml Percoll ($\delta=1,077$ g/ml) mit der suspendierten Zellsuspension überschichtet. Das Ganze wurde für 20 Minuten mit 1000 x g bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase enthielt mononukleäre Zellen. Diese wurden in 10 ml kaltem PBS gewaschen und mit 1000 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Bei starker Erythrozytenverunreinigung wurde die Percoll-Dichtezentrifugation wiederholt. Das Zellpellet wurde in rund 5 ml EM6F aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit rund 100 Zellen/cm² auf unbeschichteten 10 cm Kulturschalen oder in 75 cm² Kulturflaschen in EM6F. Die ausplattierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Da MSC auf Plastikoberflächen adhäreren, können nicht-adhärenente Zellen beim Medienwechsel entfernt werden. Ein Medienwechsel wurde je nach Ausmaß der Hämolyse der verbleibenden Erythrozyten nach ca. 24-48h durchgeföhrt. Dazu wurde das Medium von der Kulturschale abgenommen und die Platte 3 fach mit PBS gewaschen. Nach 3-5 Tagen wurden die Zellen zur Ablösung von der Kulturplatte oder -flasche trypsinisiert. Anschließend konnten die Zellen im Stickstoff gelagert oder direkt erneut ausplattiert werden.

3.7.2. Lentivirale Infektion von humanen mesenchymalen Stammzellen

Transgene wurden durch lentiviralen Gentransfer stabil in die Stammzellen eingebracht. Folgende Konstrukte waren in der Arbeitsgruppe vorhanden:

- lentiviraler FUGW-Vektor mit dem Transgen EGFP unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors und des humane PCK1-Promotorfragment hPCK -457/+65
- lentiviraler FUGW-Vektor mit einem 8 x TCF/LEF-Bindemotiv und einem mutierten, inaktiven 8 x TCF/LEF-Bindemotiv. Beide Konstrukte enthielten die Firefly Luciferase als Reporter gen.

Die Stammzellen wurden in einer Dichte von 300 Zellen/cm² in 150 cm² Kulturflaschen ausplattiert. Bei einer Zelldichte von 30 % wurden 18 ml EM6F mit 7,5 µg/ml Polybrene ca. 40 Viren/Zelle auf die Zellen gegeben und für 72 h bei 37° und 5% CO₂ kultiviert. Zur Überprüfung der Infektionsrate wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Für anschließende Untersuchungen der Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und erneut ausplattiert.

3.7.3. Fluorometrische Messung

Die Firefly Luciferase katalysiert die Oxidation von Luziferin unter der Verwendung von ATP-Mg²⁺ als Cosubstrat.

Es wurde ein in der Arbeitsgruppe konstruierter Lentivirus, der die *Firefly Luciferase (FFL)* als Reporter gen unter der Kontrolle einer achtfachen Wiederholung des TCF4/Lef-Bindemotivs besitzt, verwendet. Nach Infektion der MSC mit diesem Virus wurden die Zellen ohne BIO und unter Zugabe von 500 nM BIO für 12 Tage in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert und die *FFL*-Aktivität als Maß der Stimulation der TCF/Lef-vermittelten Genexpression drei Tage vor Beginn der Differenzierung und zu den angegebenen Tagen der Differenzierung luminometrisch bestimmt. Die Messung der Lumineszenz der *Firefly (Photinus pyralis) Luciferase* erfolgte mit dem Luciferase Assay System (Promega) nach Herstellerangaben.

3.7.4. Bestimmung der Zellzahl

Die mikroskopische Zellzählung wurde mit Hilfe einer Zählkammer durchgeführt. Eine Zählkammer ist ein Objektträger, in dessen Mitte sich ein Zählnetz und eine Vertiefung von 0,1 mm Höhe befindet. Die Zählkammer nach Neubauer besteht aus 9 großen Quadraten mit je einer Größe von 1 mm². Das mittlere Quadrat ist erneut in 16 Gruppenquadrate unterteilt und diese wiederum in 16 Kleinstquadrate.

Unter dem Mikroskop wird die Zellzahl in den 4 äußeren Großquadraten bestimmt und durch den Faktor 4 dividiert. Die ermittelte Zellzahl wird mit 10⁴ multipliziert. Dies entspricht der Zellzahl pro 1ml Zellsuspension.

3.7.5. Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse dient zur Untersuchung von Oberflächenmolekülen auf Zellen. Die zu untersuchenden Zellkomponenten werden dabei mittels an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern markiert. Für die Analyse werden die so markierten Zellen in einer Einzelzellsuspension aneinandergereiht und an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl wird dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter der Abgabe von Energie in Form von Photonen fällt dieser auf sein Ursprungsniveau zurück. Durch einen Photonendetektor wird die emittierte Photonenkonzentration registriert. Sie verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper pro Zelle.

Das Expressionsmuster der Oberflächenproteine von MSC wurde bei einer Konfluenz von ca. 50 % in der Zellkultur bestimmt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100.000 Zellen in 100 µl

PBS mit 1 % inaktiviertem FKS aufgenommen und mit 15 µl des jeweiligen Antikörpers für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Konzentration der Antikörperlösung ist Tabelle 3 zu entnehmen. Darauffolgend wurden die markierten MSC zweimal in 1 ml PBS gewaschen und in spezielle Röhrchen für das FACS-Messgerät überführt. Die Analyse erfolgte mit ca. 50.000 Zellen.

3.7.6. Kryokonservierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Zur Kryokonservierung wurden die MSC nach einmaligem Waschen in PBS gezählt. Ca. 5×10^6 Zellen wurden in 1 ml FKS mit 10 % DMSO überführt, in ein Kryoröhrchen umgefüllt und bei -20°C eingefroren. Nach 24 h konnte das Kryoröhrchen im Flüssigstickstoff gelagert werden.

Für das Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension im Kryoröhrchen für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um das DMSO zu entfernen und schließlich in EM6F ausplattiert.

3.7.7. Zellkultur von humanen mesenchymalen Stammzellen und deren hepatogene Differenzierung

Vor dem Ausplattieren der undifferenzierten MSC wurden die Zellkulturplatten mit Fibronectin beschichtet. Fibronectin ist ein im Blut und in der extrazellulären Matrix vorkommendes Protein, das die Zelladhäsion unterstützt. Es enthält Bindungsstellen für Rezeptoren in der Zellmembran (z. B. Integrine) sowie für Komponenten der extrazellulären Matrix.

Die undifferenzierten MSC wurden in einer Dichte von ca. 300 Zellen/cm² in EM6F ausgesät. Ein Medienwechsel wurde alle 4 Tage durchgeführt. Die Zugabe von 50 nM oder 500 nM BIO erfolgte alle zwei Tage.

Zur Demethylierung der DNA wurden die MSC bei einer Zelldichte von ca. 80 % Konfluenz, für 24 h mit 5'-Azacytidine in einer Endkonzentration von 20 µM behandelt. Danach erfolgten ein Medienwechsel und die Umstellung auf HGM als Wachstumsmedium. Die weiteren Medienwechsel wurden alle 4 Tage bei gleichzeitiger BIO-Zugabe nach jeweils 2 Tagen durchgeführt.

Zum Ablösen der MSC wurden die Zellen mit einer Trypsin/ EDTA-Lösung behandelt. Trypsin ist eine Endopeptidase mit katalytisch aktivem Serinrest. Es hydrolysiert Peptide substratspezifisch nach Arginin- und Lysinresten. Zum Ablösen der Zellen vom Plattenboden wurde das Medium zunächst vollständig abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA bedeckt und ca. 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Eine Kontrolle der Zellablösung erfolgte unter dem Mikroskop. Die abgelösten Zellen wurden in Medium oder PBS mit 10 %

hitzeinaktiviertem FKS überführt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. FKS beinhaltet Trypsininhibitoren, die eine weitere Hydrolyse der Zellen durch Trypsin verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit 1000 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und zur Protein- oder RNA-Isolierung in Trizol oder RIPA-Lösung aufgenommen. Sie wurden entweder bei -80°C gelagert (s.o.) oder ggf. erneut ausplattiert.

Alle Inkubationen der Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ ausgeführt.

3.7.8. Isolierung von mRNA mittels Phenol/ Chloroform

Messenger-Ribonukleinsäuremoleküle (mRNA) dienen als Matritze für die Proteinbiosynthese. Sie sind die Transportformen zur Übermittlung der Information auf der Kern-DNA ins Zytoplasma und werden zur Expression der in einer Zelle aktiven Gene benötigt. Die Herstellung der mRNA beginnt mit der Synthese einer heterogenen Kern-RNA (hnRNA) mit Hilfe der RNA-Polymerase II. Während der Transkription wird an das 5'-Ende der hnRNA eine Kopfgruppe aus einem 7-Methylguanosintriphosphat angefügt, welche als Signal für die kleine ribosomale Untereinheit, an die die mRNA andockt, dient. Außerdem schützt sie die mRNA vor hydrolysierenden Enzymen. Am 3'-Ende der hnRNA wird ein Poly(A)-Schwanz angeheftet. Der Poly(A)-Schwanz besteht aus ca. 200 Adenylresten, der die mRNA ebenfalls vor enzymatischen Abbau schützt. Durch den Spleißvorgang, bei dem nichtcodierende Abschnitte, Introns, herausgeschnitten werden, entsteht am Ende dieses Prozesses die mRNA. Die mRNA wird durch die Kernporen in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma bildet die mRNA mit den Ribosomen einen Komplex an dem die Proteinbiosynthese stattfindet.

Zu Beginn der RNA-Isolierung wurden die bei -80° gelagerten Zelllysate in Trizol (s. 3.6.4) auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe von Chloroform in einem Volumen, das ca. 1/5 des in der Probe verwendeten Trizols entsprechen sollte. Die Proben wurden kurz gevortext und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 Minuten mit 13 000 x g bei 4°C zentrifugiert. Dabei bildeten sich im Reaktionsgefäß 3 Phasen. Die wässrige Oberphase enthielt die RNA aus den Zellen. Die Interphase und die organische, phenolische Unterphase enthielten die DNA und die Proteine. Die Oberphase wurde mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe eines halben Volumens Isopropanol wurde die Lösung kurz gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde sie bei 13 000 x g und bei 4°C für 35 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde die RNA gefällt und während der Zentrifugation am Boden des Reaktionsgefäßes pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet mit mindestens 500 µl 70 %-igem Ethanol

gewaschen. Das RNA-Ethanol-Gemisch wurde kurz gevortext und mit 13 000 x g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur 5-10 Minuten getrocknet. Das nicht ganz getrocknete RNA-Pellet wurde in einem geeigneten Volumen an DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Lösung wurde anschließend für ca. 10 Minuten auf Eis gestellt, der RNA-Gehalt bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°Celsius gelagert.

3.7.9. Bestimmung des Gehalts der Gesamt-RNA

Zur Bestimmung des RNA-Gehalts wurde die gelöste Gesamt-RNA (s. 3.6.9.) im Photometer in einer Verdünnung von 1:50 vermessen. Über die optische Dichte (OD) bei 260 nm wurde die RNA quantifiziert (1 OD entspricht 40 µg RNA/ml). Als Indikator für die Reinheit der RNA wurde das Verhältnis $OD_{260nm}/OD_{280 nm}$ bestimmt. Es sollte zwischen 1,5 und 1,8 liegen. Als Referenzwert wurde das Lösungsmittel DEPC-Wasser verwendet.

3.7.10. DNase-Verdau

Bevor die RNA-Proben durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurden, ist ein Verdau mit DNase durchgeführt worden. Damit können Verunreinigungen der RNA-Proben mit genomischer DNA eliminiert werden. Im geeigneten Reaktionspuffer verdaut die dafür benutzte DNase I Doppel- und Einzelstrang-DNA in Oligo- und Mononukleotide bei Raumtemperatur. Um Verunreinigungen mit RNase zu inaktivieren, wurde bei der reversen Transkription RNase Out zugesetzt. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch kurzzeitiges Erhitzen auf 70°C und der Zugabe von EDTA. Das Erhitzen denaturiert zudem Haarnadelstrukturen in der RNA, so dass diese für die reverse Transkription zugänglich gemacht werden können. Um sicherzustellen, dass gleiche Mengen Gesamt-RNA eingesetzt wird, wurden die Proben anhand der Expression eines konstitutiv exprimierten Gens (z.B. Vinculin, GAPDH) normalisiert. Zur Kontrolle, dass die Proben frei von kontaminierender DNA waren, wurden Reaktionen ohne Zugabe von reverser Transkriptase (-RT) durchgeführt.

1 µg Gesamt-RNA wurde mit H₂O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zu jeder Probe wurde 1 µl DNase I, 1 µl 10 x Reaktionspuffer und 0,4 µl RNase Out hinzugegeben. Die RNA-Proben wurden bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, danach mit je 1 µl EDTA versetzt und zur Inaktivierung der DNase auf 70°C für 10 Minuten erhitzt.

3.7.11. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription handelt es sich um eine Methode bei der von einem mRNA-Strang ausgehend ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) synthetisiert wird. Die Reaktion wird von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, Reverse Transkriptase (M-MLV-RT), katalysiert. Als universeller Primer dient ein Oligo(dT)-Primer, der an die Poly(A)-Struktur des mRNA-Stranges hybridisiert sowie reverse Primer (z.B. Random-Primer) für die Amplifikation der Einzelstrang-cDNA.

1 bis 2 µg RNA wurden in 10 µl DEPC-H₂O gelöst und die so verdünnte RNA-Probe im Thermocycler 3 Minuten bei 70°C inkubiert. Ein Mastermix bestehend aus 6,2 µl DEPC-H₂O, 5 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl dNTP-Mix, 1 µl Random-Primer, 0,5 µl RNase Out und 0,3 µl M-MLV-RT wurde hergestellt. Der Ansatz wurde gründlich gevortext und 15 µl des Mastermixes zu jeder RNA-Probe pipettiert und vermischt. Die Proben wurden 45 Minuten bei 42°C und 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend konnte die cDNA in eine PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.7.12. Polymerase-Kettenreaktion

Die Beschreibung der Methode der Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) wurde im Jahre 1985 von Kary Mullis veröffentlicht. Die PCR dient der spezifischen Amplifizierung ausgewählter DNA-Sequenzen *in vitro*. Das ausgewählte DNA-Fragment wird mit Hilfe von genspezifischen Oligonucleotid-Primern, einem Enzym, der hitzestabilen Taq-Polymerase und Desoxyribonucleosidtriphosphaten in mehreren repetitiven Zyklen vervielfältigt.

Die PCR lässt sich in drei Hauptschritte einteilen: Denaturierung, Annealing, Elongation. Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA bei 95°C in ihre Einzelstränge getrennt. Senkt man die Temperatur ab, lagern sich die Primer, ihrer komplementären DNA-Sequenz entsprechend, an den jeweiligen DNA-Strang an, wobei das 3'-Hydroxylende des Primers zum zu amplifizierenden Zielfragment zeigt. Die Temperatur der Primer-Hybridisierung (Annealing) ist von der Schmelztemperatur des Primers und seiner Zielsequenz abhängig. Während der Elongationsphase verlängert die DNA-Polymerase den jeweiligen Primer, indem sie, komplementär zur DNA-Matrize, Des-oxynucleosidtriphosphate an das 3'-Ende des Primers anfügt. In der Regel amplifiziert die DNA-Polymerase 500-1000 Basenpaare pro Minute. Dieser Vorgang benötigt eine hohe Temperatur von ca. 70°C um unspezifische Hybridisierung von Primer und DNA-Sequenz sowie die Bildung von Primerdimeren zu vermeiden.

Die Zyklen werden mehrfach wiederholt, so dass sich eine exponentielle Zunahme der Ziel-DNA-Moleküle ergibt. Die Messung der Effizienz muss aufgrund des

Referenzgen der Probe, ergibt sich aus der Formel: $2^{-\Delta\Delta CP}$ und wird auch „Ratio“ genannt.

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Für die Real Time-PCR-Analyse wurde je 1 µl cDNA 1:5 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. 5 µl verdünnter cDNA der Proben wurden in 96-well-PCR-Platten pipettiert. Der Ansatz für die PCR setzte sich bei dem verwendeten Gerät (FA: Stratagene MX3000) aus 7,5 µl 2 x PCR-Mix, 0,3 µl Sybrgreen, 0,03 µl ROX, 2,2 µl Aqua dest. und je 0,03 µl Primer (100 µM) zusammen. Pro Reaktionsgefäß wurden 10 µl des Ansatzes zu der cDNA gegeben. Alle Sequenzen der Primerpaare, die in der Real Time-PCR benutzt worden sind, wurden so ausgewählt, dass eine Annealing-Temperatur von 59°C erforderlich war. Als Temperaturprofil wurden benutzt:

- Denaturierung: 95° 3:00 min

Pro Zyklus:

- Denaturierung: 94° 0:30 min

- Annealing: 59° 0:30 min

- Elongation: 72° 0:30 min

Schmelzkurve:

95°C 1:00 min

55°C 0:30 min

95°C 0:30 min

3.7.14. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe in einem Agarose-Gel. Die Größe eines Fragments kann im Vergleich zu einem DNA-Marker, der DNA-Stränge bekannter Größe aufweist, ermittelt werden. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld des Agarosegels von der Kathode zur Anode. DNA-Fragmente mit geringerer Größe wandern schneller im Gel als große Fragmente. Zum Sichtbarmachen der DNA-Fragmente wird das Gel in Ethidiumbromid gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die DNA ein und die DNA-Fragmente können unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zum DNA-Gehalt der Banden.

Zu 10 µl DNA-Probe wurden 3 µl 10 x-Ladungspuffer zugefügt und die Proben mit der Pipette anschließend in die Taschen des Agarose-Gels aufgetragen. Das Gel, bestehend aus 1,5 % Agarose in 1 x TBE, wurde an eine konstante Spannung von ca. 5 V/cm Gel angeschlossen. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel für 10 Minuten in einer verdünnten Ethidiumbromidlösung inkubiert und die DNA-Banden unter dem UV-Licht betrachtet und fotografiert.

3.7.15. Proteingewinnung aus Zelllysaten

Zur Proteinbestimmung wurden Zelllysate in RIPA-Puffer hergestellt. RIPA-Puffer besteht aus 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 50 mM Tris-HCl und 4 % complete Protease Inhibitor Cocktail und ist auf einen pH-Wert von pH 8,8 eingestellt. Der complete Protease Inhibitor inaktiviert endogene zelluläre Proteasen in den Proben. Zur Gewinnung der Zelllysate wurden die Proben trypsinisiert, im vierfachen Volumen RIPA-Puffer aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wurde bei -80°C gelagert oder direkt weiter verwendet.

3.7.16. Proteinbestimmung mit der BCA-Methode

Die BCA-Proteinbestimmung ist ein Proteinbestimmungs-Assay, der sich durch hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit auszeichnet. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch Proteine zu einwertigen Kupferionen. Bicinchoninsäure (BCA) reagiert im alkalischen Milieu mit den einwertigen Kupferionen zu einem Komplex mit violetter Farbe. Der violette Farbstoff ist stabil und nimmt proportional mit steigender Proteinkonzentration zu.

Die zu messenden Proben wurden 1:10 mit einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung verdünnt. Jeweils 10 µl der verdünnten Proben wurden zu 200 µl BCA-Reagenzlösung pipettiert. Die BCA-Reagenzlösung besteht aus 1 Teil Kupfer(II) und 49 Teilen Bicinonic Acid Solution. Eine Standardreihe mit einer Konzentration zwischen 0 µg/µl und 1 µg/µl BSA (Stammlösung: 1 mg/ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung) wurde mitgeführt. Die Proben wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert und 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben im Mikrotiterplatten-Reader bei 655 nm vermessen.

3.7.17. Western Blot

Für die Western Blot-Analyse werden Proteine in Zelllysaten zunächst anhand ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Übertragung der

Proteine auf eine Trägermembran. Spezifische Proteine werden mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht.

SDS-PAGE steht im englischen für sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid. Seine Wirkung auf Proteine basiert darauf, dass nichtkovalente Bindungen der Proteine unterbrochen und so deren Quartär- und Tertiärstruktur zerstört werden. Thiolverbindungen wie Mercaptoethanol, die dem Probenpuffer zugesetzt werden, spalten zusätzlich Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion.

In der Arbeit wurden ausschließlich 10 und 12 %-ige Trenngele verwendet. Eine Auflistung der Komponenten ist den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Sammelgel

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der verwendeten Sammelgele für anschließenden Western Blot

Gel	H₂O	Polyacrylamid	10 %SDS	0,5 M Tris	TEMED	10 % APS
7 %	2,5 ml	1,15ml	50 µl	1,25 ml	3 µl	25 µl
9 %	2,2 ml	1,5 ml	50 µl	1,25 ml	3 µl	25 µl

Trenngel

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele für anschließenden Western Blot

Gel	H₂O	Polyacrylamid	10 %SDS	1,5 MTris	TEMED	10 % APS
10 %	6,0 ml	5,0 ml	150 µl	3,75 ml	8 µl	75 µl
12 %	5,0 ml	6,0 ml	150 µl	3,75 ml	8 µl	75 µl

Nachdem die Gele polymerisiert sind, können die vorbereiteten Proteinproben in die Taschen der Gele gefüllt werden. Die Proben (25 µg) wurden dazu nach der Proteinbestimmung mit 5 µl 10 x SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min im Thermomixer bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Der anschließende Proteintransfer aus dem Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Blot-Kammer. Dazu wurde die Membran zunächst in Methanol aktiviert. Während des Blottens in der Blotkammer wandern die Proteine aus dem Gel entlang des elektrischen Feldes auf die PVDF-Membran. Dies erfolgte in einem Zeitraum von 2 h bei 180 mA. Anschließend wurde die Membran in 10 % Magermilch und 5 % BSA in PBS, pH 7,2 für 3 h blockiert. Die für ein Protein spezifischen primären Antikörper

wurden in PBS mit 3 % BSA entsprechend der Angaben in Tabelle 3.1 verdünnt und mit der Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die mit den Chromophoren konjugierten sekundären Antikörper wurden in PBS mit 2 % BSA entsprechend der Angaben in Tabelle 3.2 verdünnt und mit den Membranen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz der markierten Sekundärantikörper am Li-Cor Odyssey System gescannt.

3.8. Zytochemie

3.8.1. Sudan-III-Färbung

Sudan-III ist ein lipophiler Farbstoff und dient dem Nachweis von Fetteinschlüssen in der Zelle. Dieser Nachweis wurde zur Darstellung von Lipideinlagerungen während der adipogenen Differenzierung von MSC verwendet. Eine gesättigte Sudan-III-Lösung wurde in 70 % Ethanol hergestellt und filtriert. Dann wurde die Lösung auf die mit PBS gewaschenen MSC gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mikroskopisch analysiert.

3.8.2. Alizarin-Red-S Färbung

Alizarin ist ein natürlicher Farbstoff, der mit Metalloxiden und Metallsalzen farbige Komplexe bildet. Während der osteogenen Differenzierung von MSC können Kalziumphosphat-Präzipitate auf der Zelloberfläche mit Alizarin-Red-S Färbung nachgewiesen werden. Nach dem Waschen in PBS wurden die Zellen in einer 1 %-igen Alizarin-Red-S-Lösung in Aqua dest. für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, nachfolgend erneut mit PBS gewaschen und schließlich mikroskopisch analysiert.

3.9. Immunzytochemie

In der Immunzytochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern um die Verteilung von Antigenen in Zellkulturen darzustellen. Ein primärer Antikörper bindet an das Antigen. Ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie FITC- oder Cy3-markierter sekundärer Antikörper, welcher an den Primärantikörper bindet, macht die Markierung sichtbar. FITC ist der grün leuchtende Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat und Cy3 der rot leuchtende Farbstoff Carbocyanin 3.

Die zu färbenden Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Zur Färbung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und anschließend wurden die Zellen entweder mit 4 % PFA/PBS für 20 min oder mit Methanol fixiert. Zur Färbung von Proteinen innerhalb der Zelle, wurde die Zellmembran für 5 Minuten mit 0,5 % Triton/PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen 30-

60 min mit 1 % BSA/PBS blockiert und anschließend erneut gewaschen. Der Primärantikörper wurde in der geeigneten Konzentration in 1 % BSA/PBS oder in 10 mM NaCitrat/TBST aufgenommen, gut gemischt und 60 Minuten mit den Zellen inkubiert. Nach einem wiederholten Waschschrift wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper entsprechend Tabelle 3.6 in 1 % BSA/PBS für 30 - 60 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und für 5 Minuten mit DAPI zur Färbung der Zellkerne inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen 2 x in H₂O und 2 x in 98 % EtOH getaucht und getrocknet. Nach Einbetten in Mounting-Medium wurden sie für Stunden im Dunkeln getrocknet.

Tabelle 3.6: primäre und sekundäre Antikörper für die Immunzytochemie.

Primärer Antikörper	Herkunft	Fixierung	Verdünnung	Lösung
P-GSK-3 β	Kaninchen	PFA	1:50	10 mM NaCitrat/TBST
GSK-3 β	Kaninchen	PFA	1:100	10 mM NaCitrat/TBST
β-Catenin	Maus	PFA	1:50	10 mM NaCitrat/TBST
P-β-Catenin	Maus	Methanol	1:50	10 mM NaCitrat/TBST
CD26	Maus	Methanol	1:50	1 % BSA/PBS

Sekundärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Lösung
Cy3	anti mouse	1:100	1 % BSA/PBS
FITC	anti rabbit	1:250	1 % BSA/PBS
FITC	anti mouse	1:700	1 % BSA/PBS

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

4.1.1. Isolierung und Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Die Isolierung der humanen MSC aus Knochenmarkaspirat wurde mit Hilfe einer Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Nach dem Ausplattieren der gewonnenen Zellen wuchsen diese aufgrund ihrer Fähigkeit zur Plastikadhärenz auf den Kulturplatten an, während nicht-adhärenente Zellen im Kulturüberstand flottierten und bei den Medienwechseln entfernt wurden. Die Zellen zeigten mikroskopisch die typische Form von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen. Sie bildeten Kolonien und stellten sich als spindelförmige Zellen mit zum Teil verzweigten Ausläufern dar (Abb. 4.1).

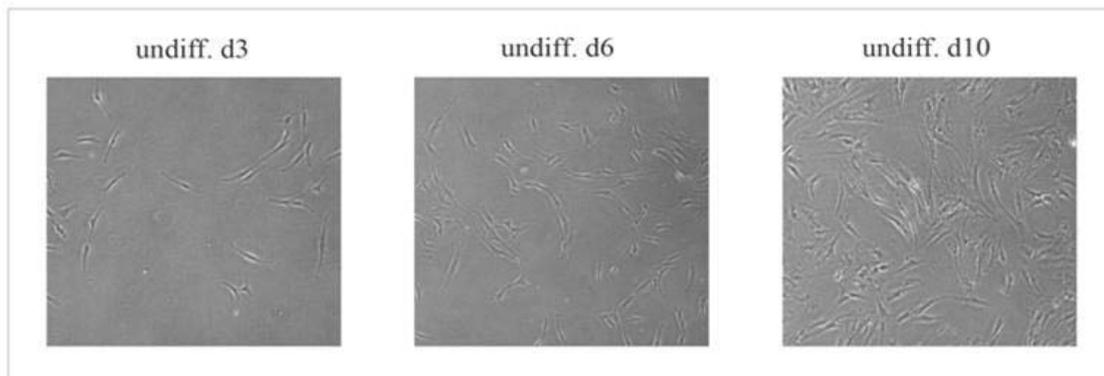


Abbildung 4.1: Expansion von mesenchymalen Stammzellen aus dem humanen Knochenmark in der Zellkultur. Aus dem Knochenmark isolierte Zellen wurden im undifferenzierten Zustand (undiff.) über den angegebenen Zeitraum bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Die Expansion der Zellen erfolgte im Medium „EM6F“.

4.1.2. Nachweis von typischen Oberflächenantigenen auf humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

Die Zellen wurden mittels FACS-Analysen untersucht. Sie exprimierten die typischen mesenchymalen Oberflächenantigene CD13, CD29, CD44, CD105 und CD106, nicht jedoch die hämatopoetischen Stammzellmarker CD14, CD34 und CD45 (Abb. 4.2).

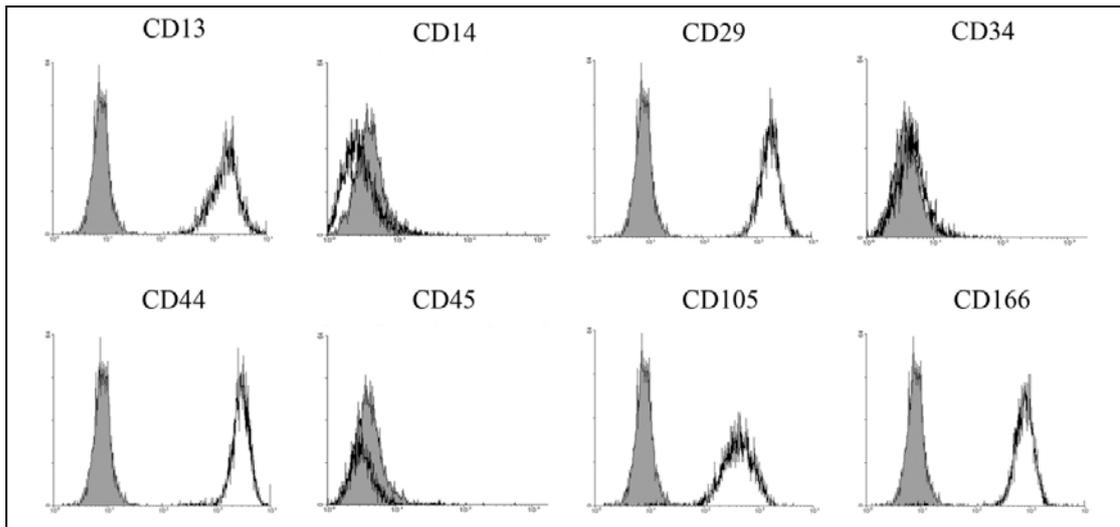


Abbildung 4.2: Nachweis von Oberflächenantigenen auf mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Aus dem Knochenmark isolierte Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50 % kultiviert und mittels FACS-Analyse untersucht. Die Expansion der Zellen erfolgte im Medium „EM6F“. Gezeigt sind repräsentative Histogramme von einer aus 6 unterschiedlichen Zellpräparationen, die identische Ergebnisse lieferten. Die FACS-Analyse erfolgte nach Markierung der Zellen mit FITC- oder PE-konjugierten Antikörpern gegen die entsprechenden Oberflächenproteine. Die grauen Kurven stellen die IgG-Isotypen-Kontrollen dar, die weißen Kurven die Expression des entsprechenden Oberflächenproteins. Für jede Analyse wurden jeweils 100.000 Zellen untersucht.

4.1.3. Nachweis der Multipotenz humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark anhand deren adipogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Definition mesenchymaler Stammzellen ist deren Eigenschaft zur multiplen Differenzierungsfähigkeit. Das bedeutet, dass MSC in der Lage sein sollten sich in Zellen von mindestens zwei Linien eines oder mehrerer Keimblätter zu entwickeln. Daher wurden MSC unter selektiven Bedingungen kultiviert, die entweder die adipogene oder osteogene Differenzierung der Zellen induzieren sollten.

Eine typische histologische Eigenschaft von Adipozyten ist der Einschluss von Lipidtröpfchen im Zytoplasma, die durch eine Färbung mit Sudan-III nachgewiesen werden können. Unter Kulturbedingungen, die die adipogene Differenzierung der MSC begünstigten, kam es mit zunehmender Kulturdauer zu einer Zunahme der Lipideinschlüsse (Abb. 4.3, links). Die Proteine LPL und PPAR γ sind typische Marker in Adipozyten. Durch RT-PCR wurde nachgewiesen, dass im Verlauf der adipogenen Differenzierung die Transkriptmenge der beiden Proteine zunahm (Abb. 4.4, links).

Unter selektiven Kulturbedingungen, die die osteogene Differenzierung begünstigen sollten, war mit zunehmendem Kulturverlauf eine zunehmende Calciumphosphat-Präzipitat-Bildung auf der Oberfläche der Zellen mit Alizarin-Red-S zytochemisch darstellbar (Abb. 4.3, rechts). In der RT-PCR-Analyse wurde die zunehmende Expression von Osteonectin, einem Gen, welches physiologischerweise in Osteoblasten exprimiert wird, beobachtet (Abb. 4.4, rechts). Die hier isolierten Zellen waren also zur Differenzierung in mindestens zwei unterschiedliche Zelllinien des Mesoderms befähigt. Das belegt weiterhin ihre Identität mit mesenchymalen Stammzellen.



Abbildung 4.3: Nachweis der adipogenen und osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark mittels Sudan-III-Färbung und Alizarin-Red-S-Färbung. Aus dem Knochenmark isolierte Stammzellen wurden in EM6F bis zu einer Konfluenz von 80 % expandiert. Anschließend wurden die Zellen in adipogenen oder osteogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Während der adipogenen Differenzierung wurde an den Tagen vier und acht eine Sudan-III-Färbung durchgeführt. Im Verlauf der osteogenen Differenzierung wurde eine Färbung mit Alizarin-Red-S an den Tagen fünf und zehn durchgeführt. Deutlich zu sehen sind Lipideinlagerung im Falle der adipogenen (links) und Calciumphosphatpräzipitate im Falle der osteogenen Differenzierung (rechts).

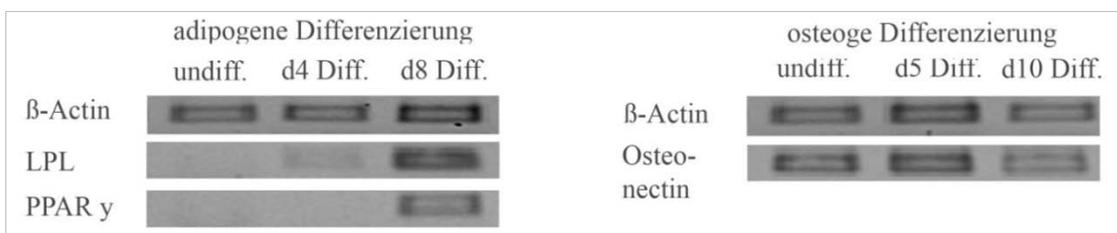


Abbildung 4.4: Nachweis der Expression von adipogenen (LPL, PPAR γ) und osteogenen (Osteonectin) Markern mittels PCR während der adipogenen und osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. Die adipogen und osteogen differenzierten MSC wurden an den jeweiligen Tagen der Differenzierung (adipogen: d4, d8; osteogen: d5 und d10) geerntet und die Expression der Markergene mit RT-PCR nachgewiesen. Zur Ladungskontrolle wurde β -Actin verwendet.

4.2. Die hepatogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen unter und ohne Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO

Der canonische Wnt-Signalweg scheint in der Morphogenese und Differenzierung von Zellen eine bedeutende Rolle zu spielen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung des canonischen Wnt-Signalweges bei der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* untersucht.

Die GSK-3 β ist eines der Hauptregulatorproteine des canonischen β -Catenin Wnt-Signalweges. Sie kennzeichnet das zytoplasmatische β -Catenin mittels Phosphorylierung zur proteosomalen Degradierung. Wird die GSK-3 β am Ser9 phosphoryliert, so ist diese inaktiviert. Die Inaktivierung wurde in dieser Arbeit gezielt durch den GSK-3 Inhibitor BIO hervorgerufen, der eine ATP-Bindungsstelle der GSK-3 β besetzt. Dadurch wird die Phosphorylierung von β -Catenin gehemmt und das nicht phosphorylierte β -Catenin kann in den Zellkern translozieren und dort auf die β -Catenin-TCF/Lef-vermittelte Genexpression einwirken. BIO imitiert also die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Wnt-Liganden am Frizzled-Rezeptor, so dass die Verwendung des Inhibitors Aufschluss über die Beteiligung des Wnt- β -Catenin-Signalweges an der hepatozytären Differenzierung von MSC geben kann.

In der Vorliegenden Arbeit wurde BIO kontinuierlich in der jeweiligen Zellreihen ab Beginn der Expansion der MSC in Kultur alle 2 Tage in der angegebenen Menge hinzugefügt um eine GSK-3 β Hemmung in den Zellen hervor zurufen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Schema der Zellkultur von MSC unter der Behandlung mit BIO.

MSC, welche mit BIO behandelt wurden, bekamen alle 2 Tage ab Beginn der Expansion zusätzlich zum Mediumwechsel alle 4 Tage, die angegebene BIO-Konzentration jeden 2. Tag.

	Expansion			Azacytidin	hepatogene Differenzierung		
Kulturtag	d1	d2	d3 + dn	24h	d1	d2	d3 + dn
BIO	x		x + 2d		x		x + 2d

4.2.1. Morphologie humaner mesenchymaler Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung

Während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen kommt es zu einer stetigen Zunahme der Zellzahl. Die Zellen wachsen zum Teil in mehreren Lagen übereinander und sind dicht gedrängt und langgestreckt. Es bilden sich „Straßen“ von Zellen, die gleich gerichtet sind und „Verwirbelungen“, an denen die Zellen geschwungen sind und in verschiedene Richtungen zeigen. Diese Abschnitte weisen eine höhere Konfluenz auf als andere.

Werden die MSC während der hepatogenen Differenzierung mit dem GSK-3 Inhibitor BIO behandelt, kommt es mit steigender Konzentration zu einer Veränderung der Zellmorphologie. Bei 50 nM BIO im Kulturmedium lassen sich kaum Unterschiede zu den unbehandelten Zellen erkennen. Die Zellen wirken zu Beginn der Differenzierung etwas weniger dicht gepackt im Vergleich zu unbehandelten MSC. Gibt man 500 nM BIO ins Kulturmedium, werden deutliche Veränderungen sichtbar. Undifferenzierte Zellen, die mit 500 nM BIO behandelt wurden, haben wesentlich länger gestreckte Zellkörper als nicht behandelte Zellen zum gleichen Zeitpunkt. Während der Differenzierung erscheinen „Straßen“ und „Verwirbelungen“ erst zu einem späteren Zeitpunkt als bei den unbehandelten Zellen. Zwischen Gebieten mit einem dichten Zellwachstum finden sich immer wieder Flächen mit einer sehr geringen Anzahl von Zellen, die auch morphologisch eher den undifferenzierten MSC ähneln (Abb. 4.5). Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass BIO in einer Konzentration von 500 nM die Proliferation von MSC *in vitro* hemmt.

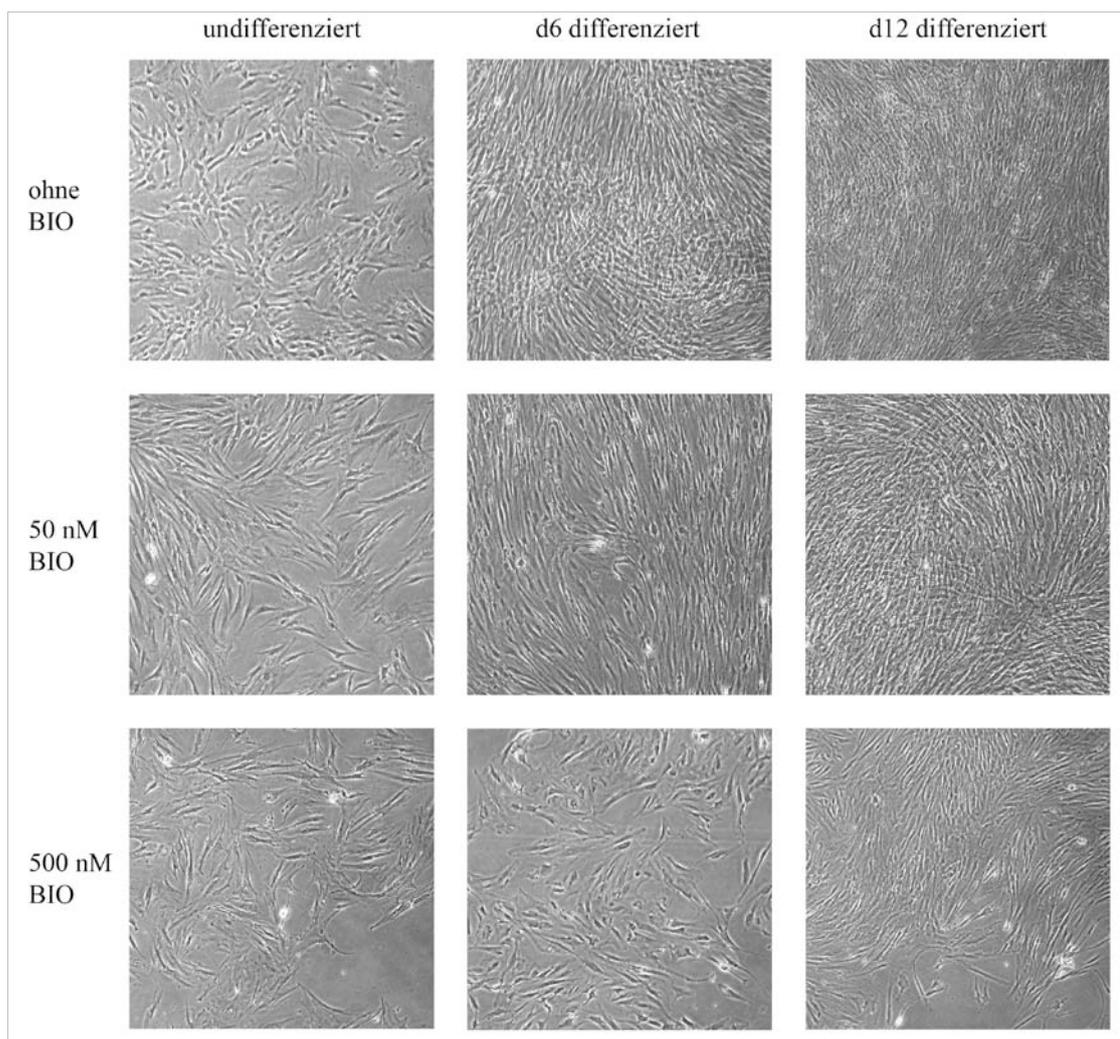


Abbildung 4.5: Morphologie der humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung ohne und mit Behandlung mit dem GSK-3 Inhibitor BIO. Zunächst wurden die MSC bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % im Expansionsmedium EM6F kultiviert (undifferenziert). Danach wurden die Zellen im hepatogenen Medium für 6 oder 12 Tage weiter kultiviert. Die Bilder zeigen phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Der GSK-3 Inhibitor BIO wurde den Kulturen alle 2 Tage in der Konzentration von 50 nM oder 500 nM zum Medium zugegeben.

4.2.2. Expression von hepatozytären Markergenen in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der hepatogenen Differenzierung

Die sekretorischen Proteine Transferrin (TFN) und Albumin, der epitheliale Marker Cytokeratin 18 (CK18), das hepatozytenspezifische Gap Junction Protein Connexin 32 (CX32) und die Ectopeptidase CD26 sind typische hepatozytäre Marker. Daher sollten diese zur Charakterisierung der hepatozytär differenzierten Stammzellen dienen. Zum Nachweis der Marker mittels RT-PCR in undifferenzierten MSC wurden Zellen des Kulturtages 10 untersucht und in differenzierten MSC an den Kulturtagen 6 und 12 (Abb.4.6).

TFN-Transkripte waren zu allen Zeitpunkten sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Zellen nachweisbar. In Gegenwart von BIO war die Expression konzentrationsabhängig erniedrigt, schien aber im Verlauf der hepatozytären Differenzierung deutlicher zuzunehmen als in nicht mit BIO behandelten Zellen. CK18 wird in undifferenzierten Zellen, außer bei Behandlung mit 500 nM BIO, nicht exprimiert. In unbehandelten MSC kommt es mit zunehmender Differenzierung zu einer Zunahme der Expression wie auch bei den mit 50 nM oder mit 500 nM BIO behandelten Zellen.

CX32-Transkripte wurden in undifferenzierten MSC gering exprimiert, nahmen aber mit der hepatozytären Differenzierung zu. In mit 50 nM BIO behandelten undifferenzierten MSC waren keine CX32-Transkripte nachweisbar. Im Verlauf der Differenzierung kam es zu einer zunehmenden Expression des CX32. Undifferenzierte Zellen, die mit 500 nM BIO behandelt wurden, exprimierten kein CX32. Am Tag 6 der Differenzierung stieg die Expression von CX32 transient an, sank aber bis zum Tag 12 wieder ab. Insgesamt war die Expression des CX32 in mit BIO behandelten Zellen niedriger als in unbehandelten.

CD26 nahm über den Kulturverlauf in den mit BIO behandelten und in den nicht behandelten Zellen stetig zu. Lediglich in den mit 50 nM BIO behandelten Zellen kam es am Tag 12 der Differenzierung zu einem Abfall der mRNA-Expression. Die Zunahme war in den mit 500 nM BIO behandelten Zellen am stärksten.

Die Expression von Albumin war in undifferenzierten MSC praktisch nicht nachweisbar. Im Verlauf der hepatogenen Differenzierung nahm die Expression sowohl in unbehandelten als auch in mit BIO behandelten Zellen zu.

Insgesamt war also im Vergleich zu unbehandelten Zellen unter BIO-Behandlung die Expression einiger Marker (CX32, TFN) tendenziell erniedrigt, während die anderer (CD26, CK18) erhöht war. Grundsätzlich hatte BIO aber keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression spezifischer Marker während der hepatozytären Differenzierung.

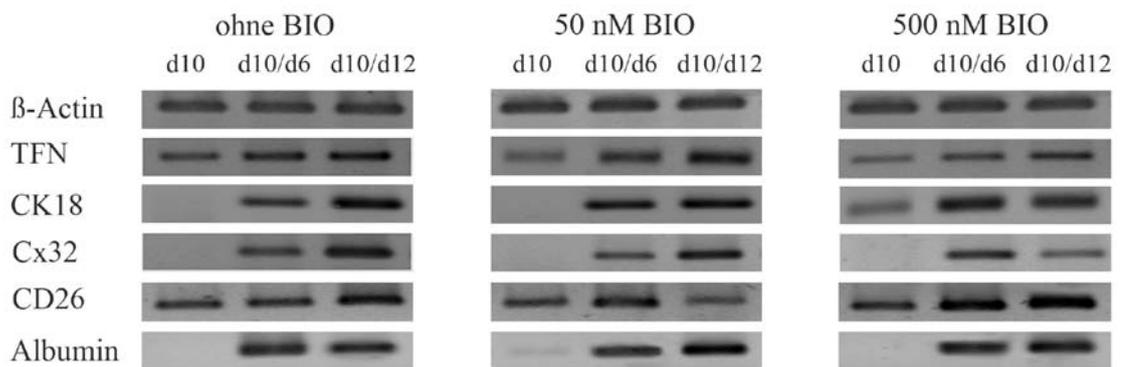


Abbildung 4.6: Nachweis der Expression (RT-PCR) hepatozytärer Marker in hepatogen differenzierten MSC unter dem Einfluss von BIO. Undifferenzierte MSC wurden am Tag 10 der Kultur im Expansionsmedium EM6F gewonnen (nd). Danach wurde die hepatogene Differenzierung bei rund 80 % Konfluenz begonnen. Differenzierte Zellen wurden an den Tagen 6 und 12 untersucht. Der GSK-3 Inhibitor BIO wurde den Kulturen alle 2 Tage in der Konzentration von 50 nM oder 500 nM zum Medium zugegeben. Als interne Ladungskontrolle wurde β-Actin verwendet.

4.2.3. Expression der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der hepatogenen Differenzierung

Die zytosolische Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK1) ist ein Enzym der Gluconeogenese und wird auch in anderen Zellen, aber vorwiegend in Hepatozyten, exprimiert. Sie katalysiert die Reaktion von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat.

Mit Hilfe der semiquantitativen Real Time-PCR wurde die mRNA-Expression der PCK1 im Verlauf der hepatogenen Differenzierung untersucht. Während der Differenzierung kommt es in den unbehandelten und in den mit 50 nM und 500 nM BIO behandelten Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Expression des PCK1-Gens. In unbehandelten Zellen stieg die Transkriptmenge gegenüber undifferenzierten Zellen am Tag 10 der Kultur zum Tag 6 der Differenzierung um das Vierfache an und nochmals um das Vierfache bis zum Tag 12 der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. In mit 50 nM BIO behandelten Zellen stieg die Transkriptmenge von undifferenzierten zu differenzierten Zellen am Tag 6 um das Dreifache und erneut um das Dreifache zum

Tag 12 der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Wurden die Zellen mit 500 nM BIO behandelt, war die PCK1-mRNA-Menge im Vergleich zu undifferenzierten Zellen am Tag 6 der Differenzierung etwa doppelt so hoch und stieg weiterhin bis zum Tag 12 der Differenzierung um das Dreifache an (Abb. 4.7). In Gegenwart von BIO war also die Expression der leberspezifischen PCK1 in den hepatozytär differenzierten MSC vermindert.

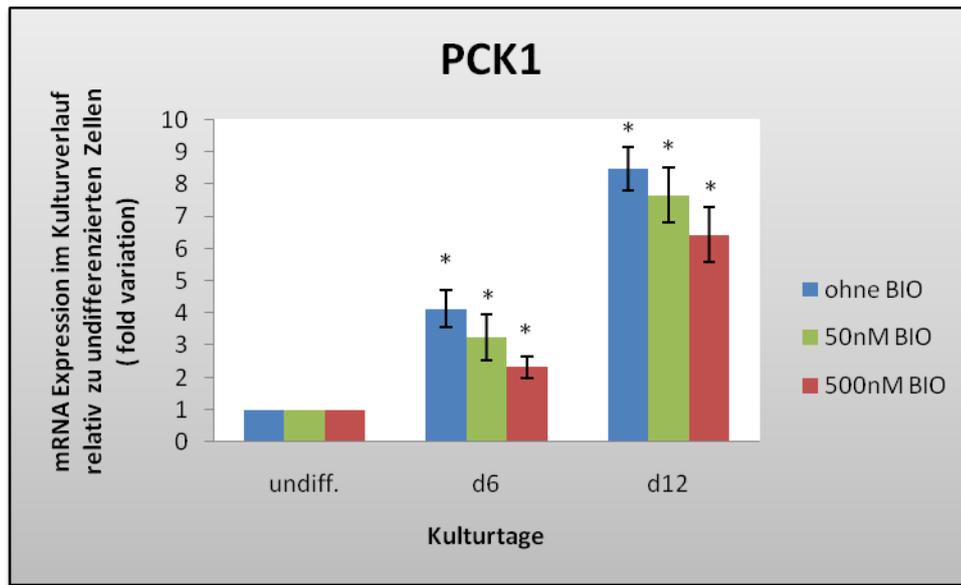


Abbildung 4.7: Expression der PCK1 in humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und der Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO. Die Bestimmung der Transkriptmenge wurde mit der Real Time-PCR-Methode durchgeführt. Als interner Standard wurde das konstitutiv exprimierte Gen des Vinculins benutzt. Die Auswertung erfolgte mittels der semiquantitativen delta delta CT-Methode. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je vier unabhängigen Versuchen (n =4). Die Messungen erfolgten am Tag 10 der Kultur im Expansionsmedium EM6F in undifferenzierten (undiff.) Zellen und nach 6 bzw. 12 Tagen der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Wo angegeben, wurden die Zellen in Gegenwart von 50 nM bzw. 500 nM BIO kultiviert, welches dem Differenzierungsmedium alle zwei Tage zugesetzt wurde. $p < 0.05$ bei dem Vergleich undiff. zu jeweils differenziert d6 bzw. d12 der Kultur.

Zur weiteren funktionellen Untersuchung der hepatozytär differenzierten mesenchymalen Stammzellen sollte die Aktivierung des PCK1-Promotors untersucht werden. Dazu wurden die Zellen lentiviral mit dem Reporter gen GFP unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotorfragments -457/+65 transduziert. Weiterhin wurden die Zellen mit GFP unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors transduziert. Der Ubiquitinpromotor ist in allen eukaryotischen Zellen aktiviert und dient in diesem Versuch als Kontrolle. Nach Infektion der undifferenzierten MSC wurden die Zellen

hepatogen differenziert. Die Zellen wurden entweder ohne oder in Gegenwart von 50 nM oder 500 nM BIO kultiviert.

Fluoreszenzmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass in allen drei Kulturansätzen die Expression der PCK1 über den Kulturverlauf von 12 Tagen zunahm. Die Expression des GFP unter Kontrolle des Ubiquitinpromotors war in undifferenzierten und hepatozytär differenzierten Zellen gleich. Die GFP-Expression unter der Kontrolle des PCK1-Promotors war abhängig von der Zelldichte in den Kulturen. Sie war stärker in Bereichen, in denen die Zellen dicht wuchsen und sich überlagerten und schwächer in Bereichen mit geringer Zelldichte (Abb. 4.8).

Die Befunde wurden durch Western Blot-Analysen bestätigt. Unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors war die Expression von GFP unter allen Kulturbedingungen gleich, während die GFP-Expression unter der Kontrolle des PCK1-Promotors im Verlauf der Kulturen unter hepatozytären Differenzierungsbedingungen zunahm. Die Zunahme war in den Zellen, die mit 500 nM BIO behandelt wurden, etwas weniger stark (Abb. 4.9). Dies bestätigte die Ergebnisse der Analysen mittels semiquantitativer Real Time-PCR (s. Abb. 4.7).

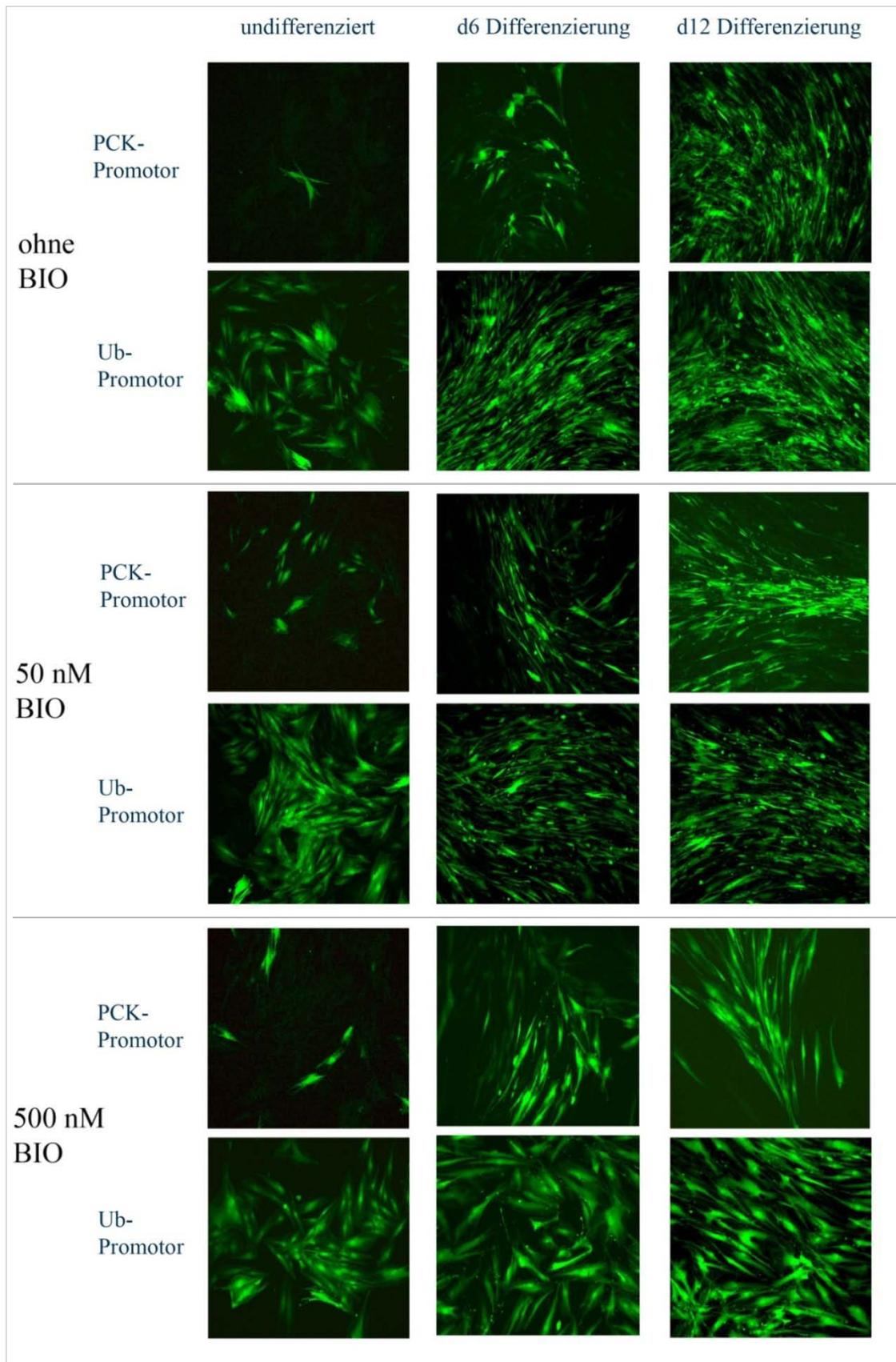


Abbildung 4.8: GFP-Expression während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nach lentiviraler Transduktion. Die mesenchymalen Stammzellen wurden lentiviral mit dem Transgen

GFP unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promoters (Ub-GFP) bzw. des PCK1-Promoters (PCK-GFP) infiziert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen erfolgte im undifferenzierten Zustand bei 80 % Konfluenz der Kulturen und nach 6 (d6) und 12 Tagen (d12) der hepatogenen Differenzierung. Wo angegeben, wurde den Kulturen 50 nM oder 500 nM BIO zugesetzt. Vergrößerung: 100-fach.

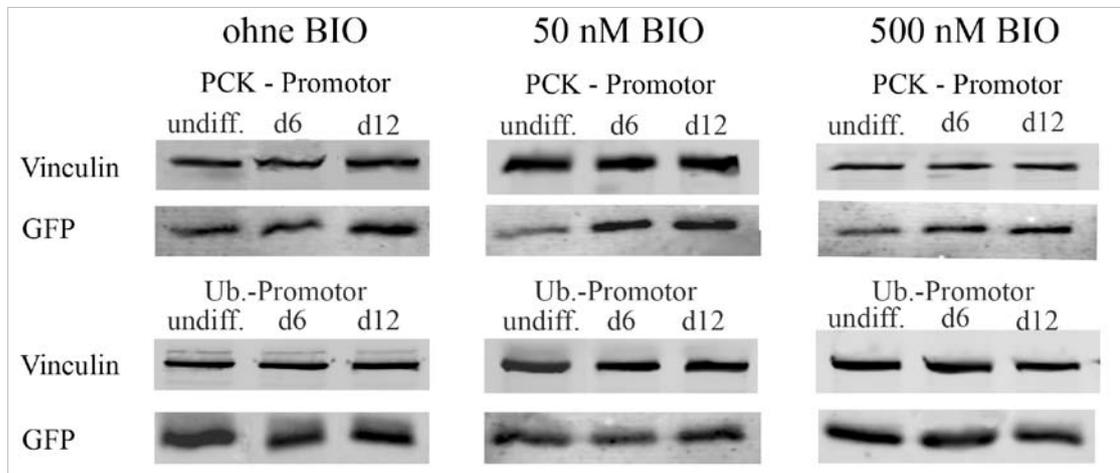


Abbildung 4.9: Western Blot-Analyse der transgenen GFP-Expression in humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark im Verlauf der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3-Inhibitors BIO. Die mesenchymalen Stammzellen wurden lentiviral mit dem Transgen GFP unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promoters (Ub.-Promotor) bzw. des PCK1-Promoters (PCK-Promotor) infiziert. Die GFP-Expression wurde mittels Western Blot in undifferenzierten Zellen bei 80 % Konfluenz der Kulturen (undiff.) und nach 6 (d6) und 12 Tagen (d12) der hepatogenen Differenzierung der Zellen analysiert. Wo angegeben, wurde den Kulturen 50 nM oder 500 nM BIO zugesetzt. Als interne Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet.

4.2.4. Expression von CD26 während der hepatogenen Differenzierung humaner mesenchymalen Stammzellen

CD26 ist eine Ectopeptidase, die in differenzierten Hepatozyten der Leber in der apikalen, canaliculären Membran lokalisiert ist. Ihre Expression zeigt die Fähigkeit zur funktionellen Integration ins Parenchym und zur Kommunikation mit benachbarten Hepatozyten an. Um die funktionellen Eigenschaften der hepatogen differenzierten MSC in Bezug auf die Expression von CD26 zu untersuchen, wurde das Protein durch immunzytochemische Färbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der hepatogenen Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen dargestellt.

In undifferenzierten Zellen war nur eine geringe Expression des CD26 nachweisbar, die im Laufe der hepatogenen Differenzierung zunahm. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war während der hepatogenen Differenzierung in MSC, die mit 50 nM BIO behandelt wurden, kein wesentlicher Unterschied der CD26-Expression pro Zelle zu

beobachten. Wurden die Zellen mit 500 nM BIO behandelt, zeigte sich im Verlauf der Differenzierung im Vergleich zu unbehandelten und mit 50 nM BIO behandelten Zellen die stärkste Zunahme der CD26-Färbung pro Zelle (Abb. 4.10).

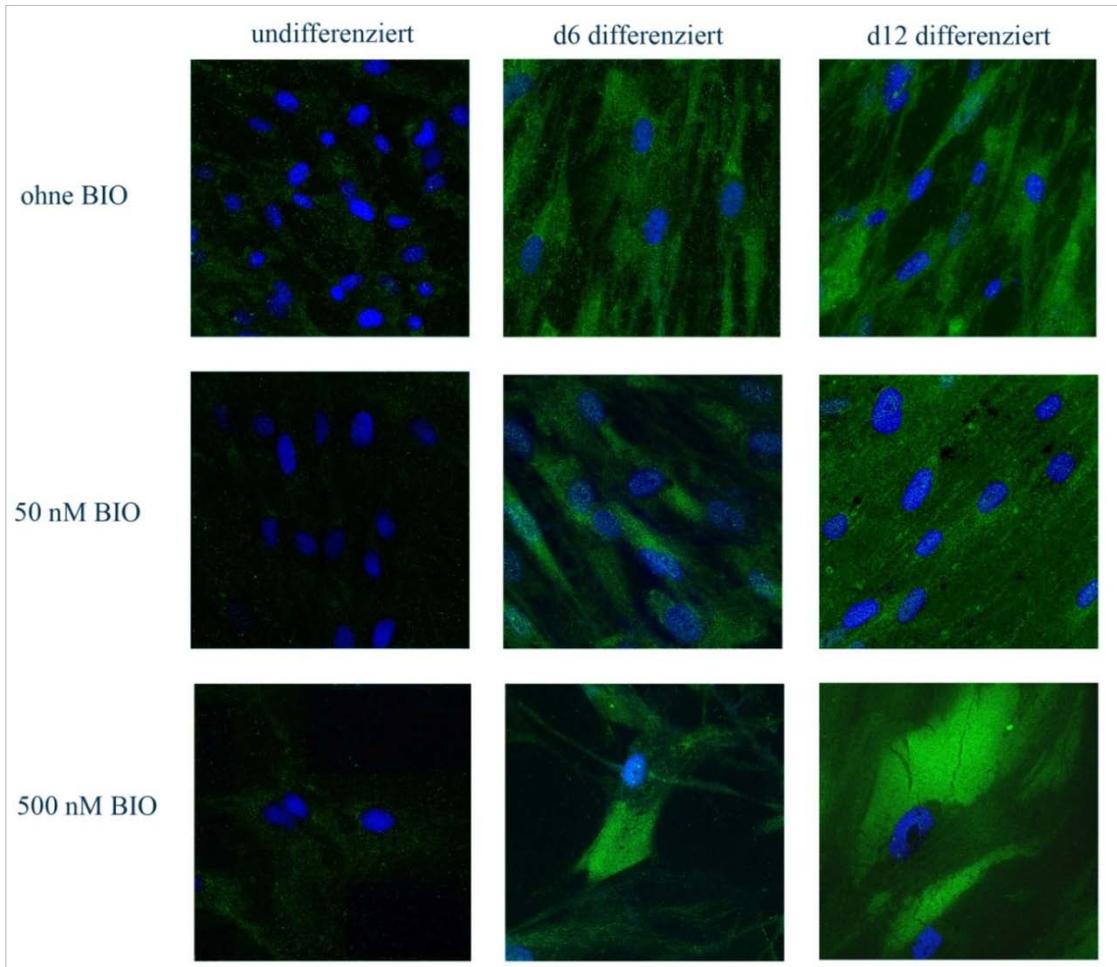


Abbildung 4.10: Immunzytochemischer Nachweis des Oberflächenantigens CD26 auf humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO. Die hepatogene Differenzierung der MSC wurde bei einer Konfluenz von ca. 80 % initiiert. Die immunzytochemische Färbung der Zellen erfolgte im undifferenzierten Zustand zu Beginn der Differenzierung und nach 6 (d10/d6) und 12 (d10/d12) Tagen während der hepatogenen Differenzierung. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen angefertigt. Vergrößerung: 200-fach.

4.4. Aktivierung des β -Catenin-abhängigen canonischen Wnt-Signalweges durch die Behandlung von humanen mesenchymalen Stammzellen mit dem GSK-3 Inhibitor BIO

4.4.1. Inaktivierung der GSK-3 β durch den selektiven Inhibitor BIO

Der GSK-3 Inhibitor BIO hemmt die Phosphorylierung des β -Catenin durch die GSK-3 β . Da phosphoryliertes β -Catenin im Proteasom dem Abbau zugeführt wird, führt die

Hemmung der GSK-3 β zur Zunahme nicht phosphorylierten β -Catenins, das in den Zellkern einwandern und die β -Catenin-abhängige Genexpression stimulieren kann. Die Hemmung der GSK-3 β simuliert so praktisch die Wnt-abhängigen Aktivierung der β -Catenin-vermittelten Genexpression.

Die durch BIO zu erwartende Inaktivierung der GSK-3 β wurde immunzytochemisch anhand der Verteilung der GSK-3 β und der inaktiven Phospho-GSK-3 β , welches am Ser 9 phosphoryliert ist, dargestellt und überprüft.

Sowohl in unbehandelten als auch mit 500 nM BIO behandelten MSC war im Verlauf der hepatogen Differenzierung eine Zunahme der GSK-3 β im Zytosol zu erkennen. In Abb. 4.11 ist in der Darstellung der unbehandelten mesenchymalen Stammzellen am Tag 10 eine stärkere Anfärbung der GSK-3 β in einer sich gerade teilenden Zelle zu erkennen. In allen anderen Zellen wurde eine gleichmäßige homogene Färbung der GSK-3 β im Zytoplasma beobachtet. Gelegentlich war sowohl in unbehandelten als auch in mit BIO behandelten Zellen, während der hepatogenen Differenzierung, eine perinukleär stärkere Anfärbung der GSK-3 β zu beobachten. Betrachtet man die Menge und Verteilung der inaktivierten Phospho-GSK-3 β in der Immunzytochemie, so erkennt man in undifferenzierten Zellen keinen Unterschied zwischen den unbehandelten MSC und den mit 500 nM BIO behandelten Zellen. In beiden Fällen war die Phospho-GSK-3 β perinukleär lokalisiert. Die Anordnung schien netzförmig und weit gefächert ringförmig um den Zellkern herum mit deutlich erkennbaren Zwischenräumen zu sein. Im Laufe der Differenzierung ging in unbehandelten MSC der netzförmige Aspekt verloren und es kam zu einer dem Zellkern einseitig anliegenden Konzentration der Phospho-GSK-3 β . In mit 500 nM BIO behandelten Zellen blieb im Verlauf der Differenzierung die netzförmige Struktur und auch die ringförmige, perinukleäre Lokalisation der Phospho-GSK-3 β weitgehend, wie im undifferenzierten Zustand, erhalten.

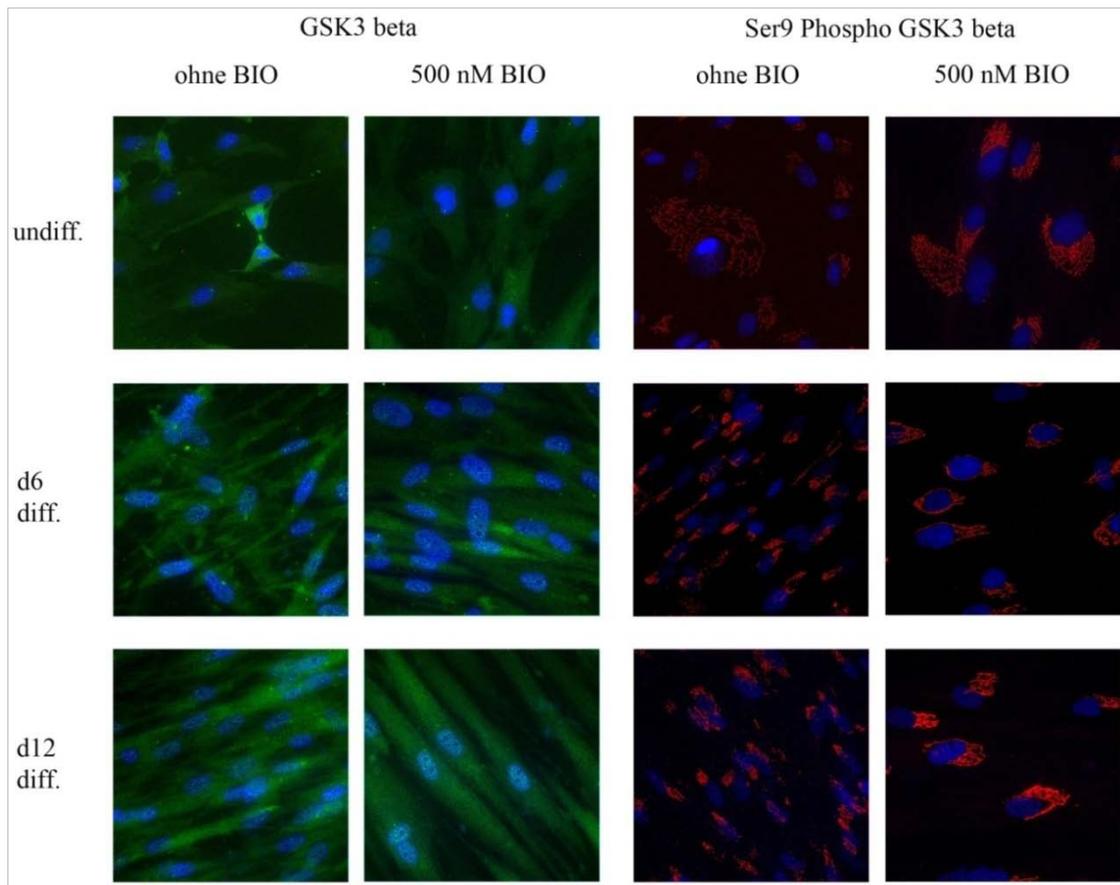


Abbildung 4.11: Zelluläre Verteilung von GSK-3 β und Ser9 Phospho-GSK-3 β während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen ohne und unter dem Einfluss des GSK-3 β -Inhibitors BIO. Immunzytochemische Darstellung der GSK-3 β (grüne Fluoreszenz) und der am Serin9 phosphorylierten GSK-3 β (rote Fluoreszenz) in undifferenzierten (undiff.) MSC und in MSC 6 (d6 diff.) und 12 (d12 diff.) Tage nach der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz). Vergrößerung: 200-fach

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Analysen zur zellulären Verteilung und Menge der GSK-3 β (Abb. 4.11) wurden weiter auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer Real Time-PCR und auf Proteinebene im Western Blot überprüft. In unbehandelten Zellen stieg die mRNA-Menge der GSK-3 β stetig an. Sie war gegenüber der Menge in undifferenzierten Zellen 12 Tage nach Differenzierung ca. 1,75-fach erhöht ($p < 0,05$). In mit 500 nM BIO behandelten Zellen war die Menge der GSK-3 β mRNA 6 Tage nach Differenzierung etwa doppelt so hoch wie in undifferenzierten Zellen, erreichte dann ein Plateau, so dass die Mengen am Tag 12 der Differenzierung in behandelten und unbehandelten Zellen gleich war (Abb. 4.12) ($p < 0,05$).

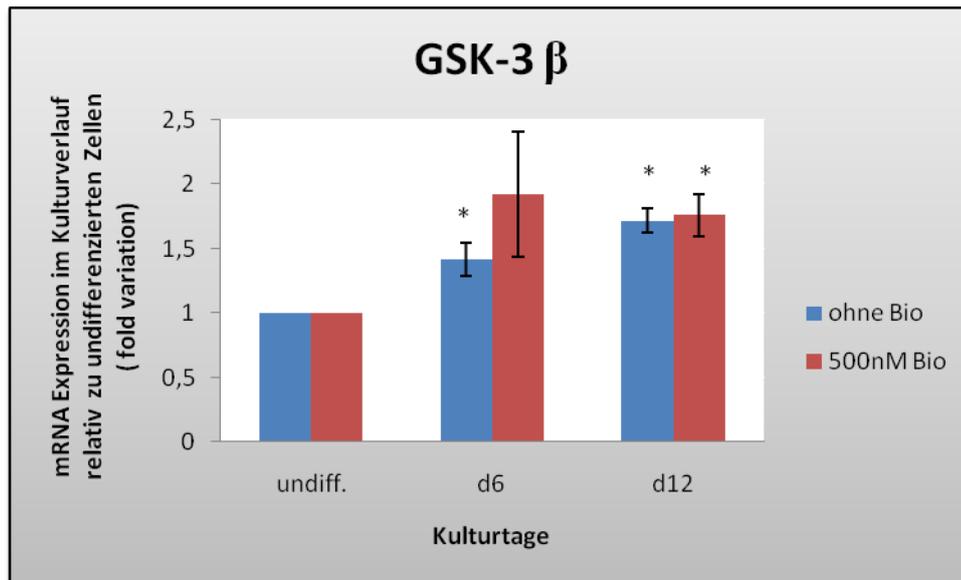


Abbildung 4.12: Expression der GSK-3 β in humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3-Inhibitors BIO.

Die Bestimmung der Transkriptmenge wurde mittels semiquantitativer Real Time PCR-Methode durchgeführt. Als interner Standard wurde das konstitutiv exprimierte Vinculin benutzt. Die Auswertung erfolgte mittels der semiquantitativen delta delta CT-Methode. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je vier unabhängigen Versuchen (n =4). Sie sind dargestellt als die relative mRNA-Menge der GSK-3 β in differenzierten Zellen im Verhältnis zur Menge in undifferenzierten MSC, die in der jeweiligen Messreihe =1 gesetzt wurde. Die Messungen erfolgten am Tag 10 der Kultur im Propagationsmedium EM6F in undifferenzierten (undiff.) und nach 6 bzw. 12 Tagen der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Wo angegeben wurden die Zellen in Gegenwart von 500 nM BIO kultiviert, welches dem Differenzierungsmedium alle zwei Tage zugesetzt wurde. * $p < 0,05$ im Vergleich des jeweiligen hepatogenen Kulturtag zum undifferenzierten Zeitpunkt.

Im Western Blot war die GSK-3 β -Proteinmenge über den Kulturverlauf in unbehandelten und in mit 500 nM BIO behandelten mesenchymalen Stammzellen nahezu gleichbleibend (Abb. 4.13).

Insgesamt schien also die hepatozytäre Differenzierung mit einer Zunahme der GSK-3 β auf mRNA- nicht aber auf Proteinebene verbunden zu sein. In Gegenwart von BIO blieb die Phospho-GSK-3 β Proteinexpression gleich.

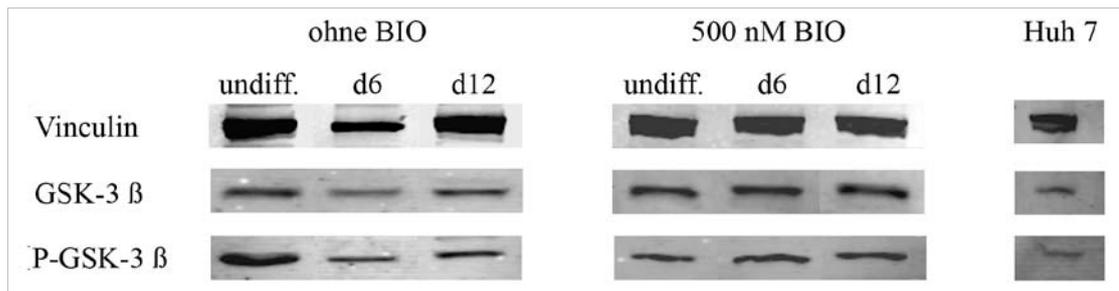


Abbildung 4.13: Bestimmung der Expression der Proteine GSK-3 β und Ser9 Phospho-GSK-3 β während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen mittels Western Blot und der Einfluss von BIO. Nach elektrophoretischer Auftrennung von 25 µg Gesamtprotein aus undifferenzierten Zellen (undiff.) bzw. aus Zellen, die entweder 6 (d6) oder 12 (d12) Tage im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert worden waren, wurden die Gele geblottet und die Proteine GSK-3 β und Ser9 Phospho-GSK-3 β mit_entsprechenden Antikörpern detektiert. Als interne Ladungskontrolle wurde die Expression des konstitutiv exprimierten Proteins Vinculin bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms Huh7.

4.4.2. Zelluläre Verteilung von Gesamt-β-Catenin und phosphorylierten β-Catenin im Verlauf der hepatogenen Differenzierung unter dem Einfluss von BIO

Nicht phosphoryliertes aktives β-Catenin befindet sich im Zytoplasma und kann in den Zellkern zur Aktivierung von Zielgenen gelangen. Daher wurde anhand der Menge und der Verteilung der Proteine β-Catenin und Phospho-β-Catenin unter dem Einfluss von BIO untersucht, ob der canonische β-Catenin-abhängige-Wnt-Signalweg an der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beteiligt ist. Die zytoplasmatische und nukleäre Verteilung von β-Catenin wurde in undifferenzierten und in differenzierten MSC zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium immunzytochemisch dargestellt.

Sowohl in undifferenzierten als auch in hepatogen differenzierten MSC war β-Catenin zytoplasmatisch und/oder membranständig lokalisiert. Zwischen unbehandelten und mit 500 nM BIO behandelten Zellen waren in diesen Aufnahmen weder Unterschiede in der Lokalisation zu sehen, noch waren signifikante Änderungen der β-Catenin-Menge über den Kulturverlauf festzustellen. In den konfokalen Schichtaufnahmen des Zellkerns erkennt man allerdings, dass β-Catenin in nicht mit BIO behandelten Zellen während der hepatogenen Differenzierung zunehmend kernlokalisiert war. Während zu Beginn der Differenzierung wenig β-Catenin im Zellkern sichtbar wurde, war am Tag 12 der Differenzierung eine deutlichen Ansammlung von β-Catenin intranukleär zu erkennen. Wurden die Zellen mit 500 nM BIO behandelt, kam es bereits in den undifferenzierten MSC zu einer Translokation von β-Catenin in den Zellkern, die sich

während der hepatogenen Differenzierung unverändert stark darstellte. Bei den unbehandelten Zellen schien β -Catenin stärker in einem perinukleären Saum im Verlauf der Differenzierung lokalisiert zu sein, aber auch intranukleär als bei den mit BIO behandelten Zellen, die deutlich im Verlauf der Differenzierung intranukleäres β -Catenin aufweisen (Abb. 4.14, unten). Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ein zweites Experiment, in dem die Zellen für 20 Tage im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert wurden, durchgeführt. Deutlich ist eine Zunahme des β -Catenin im Zellkern mit zunehmender Differenzierungsdauer zu beobachten (Abb. 4.15).

Insgesamt scheint also mit der hepatogenen Differenzierung die Translokation des β -Catenin in den Zellkern zuzunehmen. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch BIO führte bereits in undifferenzierten MSC zur nukleären Lokalisation des β -Catenin.

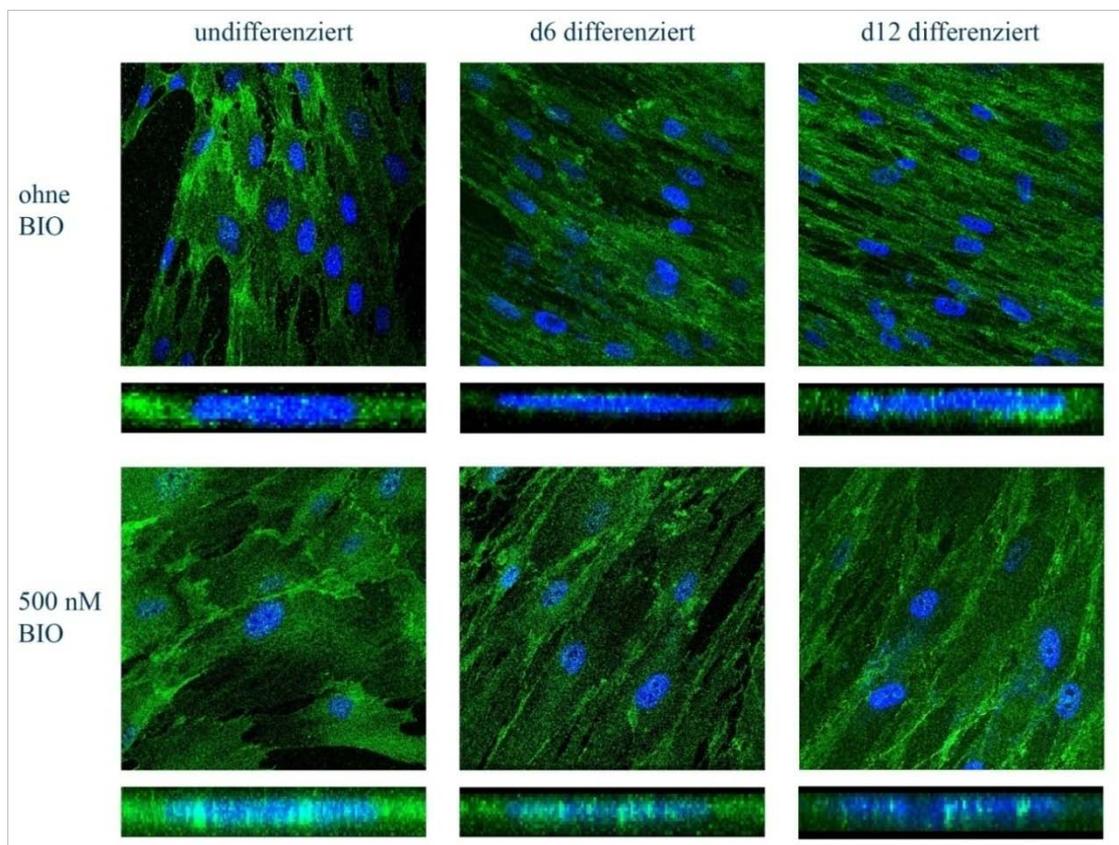


Abbildung 4.14: Zelluläre Verteilung von β -Catenin während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und der Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO. Immunzytochemische Darstellung von β -Catenin (grüne Fluoreszenz) in undifferenzierten MSC und in MSC 6 und 12 Tage nach der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. In den jeweils oberen Reihen (quadratische Abbildungen) sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen im Zellverband in Aufsicht gezeigt. Die darunter liegenden rechteckigen Abbildungen zeigen konfokale Schichtaufnahmen durch den Zellkern, die die Lokalisation des β -Catenins im Zellkern verdeutlichen. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit Dapi angefärbt (blaue Fluoreszenz).

Wo angegeben, wurden die Zellen mit 500 nM BIO im Kulturmedium behandelt. Vergrößerung: 200-fach und 600-fach.

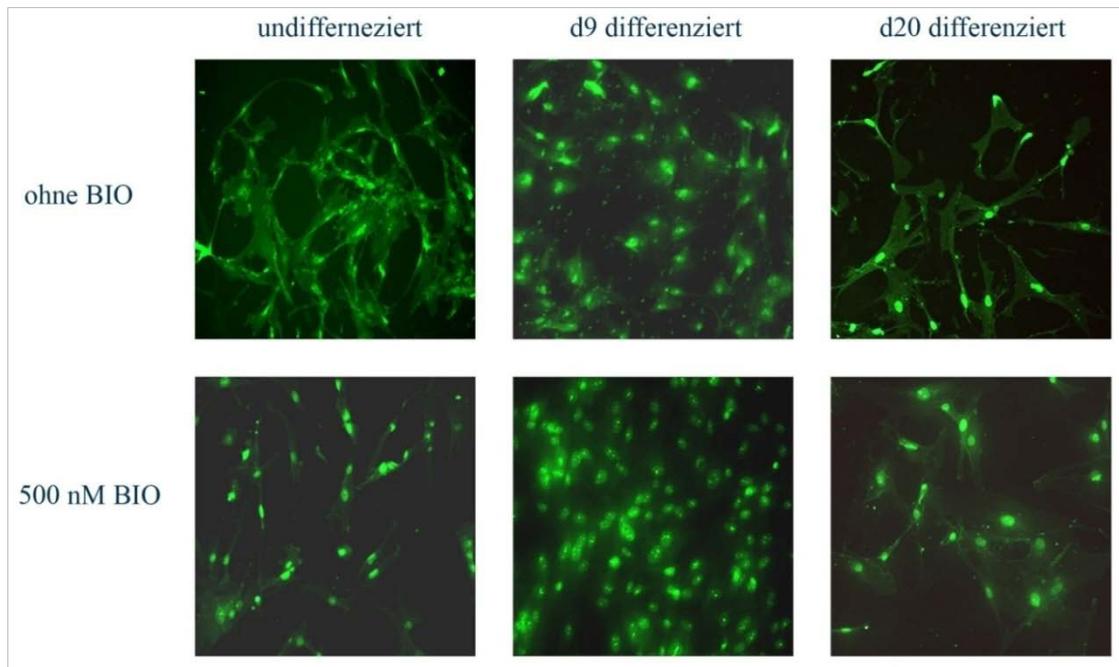


Abbildung 4.15: Zelluläre Verteilung von β -Catenin während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und der Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO in der Langzeitkultur. Immunzytochemische Darstellung von β -Catenin (grüne Fluoreszenz) in undifferenzierten MSC und in MSC 9 und 20 Tage nach der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Wo angegeben, wurden die Zellen mit 500 nM BIO im Kulturmedium behandelt. Vergrößerung: 100-fach.

Der immunzytochemische Nachweis von Phospho- β -Catenin in undifferenzierten MSC und in MSC während der hepatogenen Differenzierung ergab dessen zytoplasmatische Lokalisation in undifferenzierten Zellen, die im Verlauf der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium intensiv angefärbt zu sein schien. In Zellen, die mit BIO behandelt worden sind, zeigte sich im gesamten Kulturverlauf nur eine minimale Anfärbung von Phospho- β -Catenin im Zytoplasma (Abb.4.16).

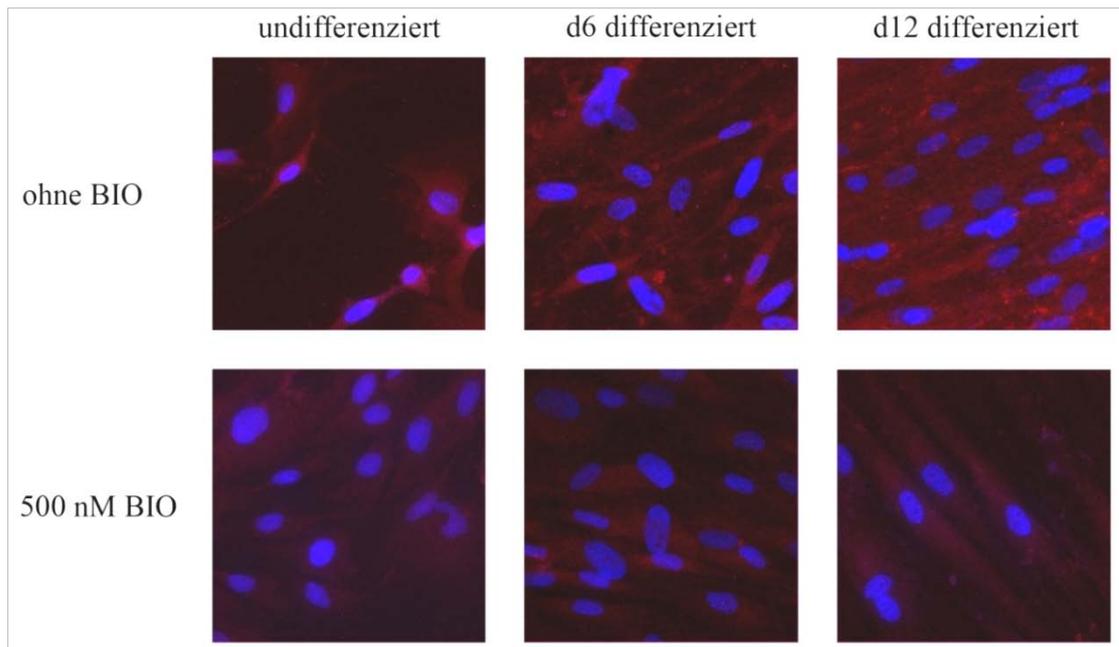


Abbildung 4.16: Zelluläre Verteilung von Phospho- β -Catenin während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und der Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO. Immunzytochemische Darstellung von Phospho- β -Catenin (rote Fluoreszenz) in undifferenzierten MSC und in MSC 6 und 12 Tage nach der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz). Wo angegeben, wurden die Zellen mit 500 nM BIO im Kulturmedium behandelt. Vergrößerung: 200-fach

Die Expression der β -Catenin-mRNA wurde mittels Real Time-PCR in undifferenzierten MSC und in hepatogen differenzierten sowie unter dem Einfluss von BIO untersucht. In MSC, die nicht mit BIO behandelt wurden, war die β -Catenin-mRNA-Menge in undifferenzierten Zellen und in Zellen bis zum Tag 6 der Differenzierung konstant und nahm während der hepatogenen Differenzierung vom Tag 6 bis zum Tag 12 um 50 % zu. Wurden die Zellen mit 500 nM BIO behandelt nahm die mRNA-Menge in den ersten 6 Tagen der Differenzierung um 50 % und im Zeitraum zwischen Tag 6 und Tag 12 der Differenzierung um weitere 50 % zu. An allen Kulturtagen im hepatogenen Differenzierungsmedium war die β -Catenin-mRNA-Menge in unbehandelten und in mit 500 nM BIO behandelten MSC nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 4.17).

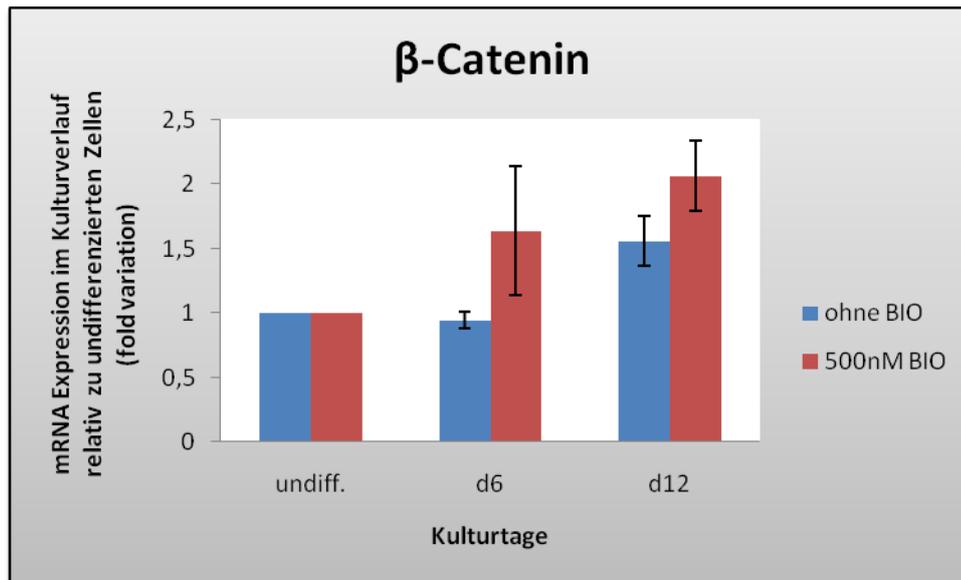


Abbildung 4.17: Expression des β -Catenins in humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und der Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO. Die Bestimmung der Transkriptmenge wurde mittels semiquantitativer Real Time PCR Methode durchgeführt. Als interner Standard wurde das konstitutiv exprimierte Vinculin benutzt. Die Auswertung erfolgte mittels der semiquantitativen delta delta CT-Methode. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je vier unabhängigen Versuchen (n =4). Sie sind dargestellt als die relative mRNA-Menge des β -Catenin in differenzierten Zellen im Verhältnis zur Menge in undifferenzierten MSC, die in der jeweiligen Messreihe =1 gesetzt wurde. Die Messungen erfolgten am Tag 10 der Kultur im Propagationsmedium EM6F in undifferenzierten (undiff.) und nach 6 (d6) bzw. 12 (d12) Tagen der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Wo angegeben, wurden die Zellen in Gegenwart von 500 nM BIO kultiviert, welches dem Differenzierungsmedium alle zwei Tage zugesetzt wurde. $p > 0,05$

Die Ergebnisse der Real Time-PCR-Analysen sollten auch im Western Blot auf Proteinebene untersucht werden. Sowohl in Zellen, die mit BIO behandelt wurden, als auch in unbehandelten MSC war die Expression des β -Catenins nahezu gleich in undifferenzierten und hepatogen differenzierten MSC (Abb. 4.18, 4.19).

Zusätzlich wurde im Western Blot die Proteinmenge des Phospho- β -Catenins in MSC während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss von BIO untersucht. In Zellen ohne BIO-Zugabe war die Proteinmenge an Phospho- β -Catenin während der hepatogenen Differenzierung nahe zu konstant. Wohingegen in den mit 500 nM BIO behandelten Zellen eine geringe Expression des Phospho- β -Catenin gegenüber den nicht behandelten Zellen zu sehen war (Abb. 4.18, 4.20).

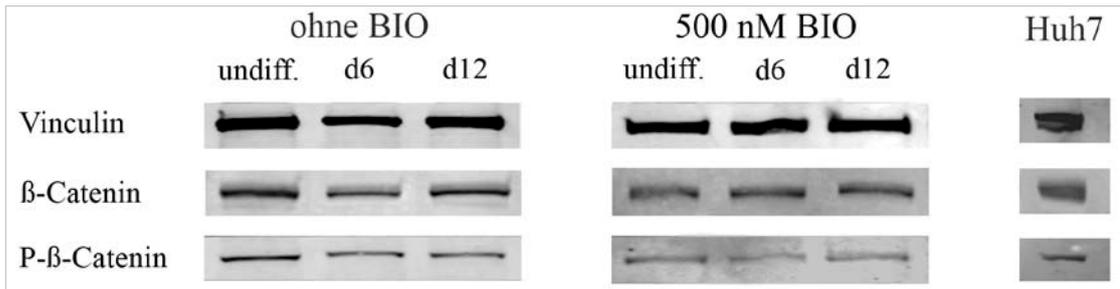


Abbildung 4.18: Bestimmung der Expression der Proteine β-Catenin und Phospho-β-Catenin während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen mittels Western Blot. Nach elektrophoretischer Auftrennung von 25 µg Gesamtprotein aus undifferenzierten Zellen (undiff.) bzw. aus Zellen, die entweder 6 oder 12 Tage im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert worden waren, wurden die Gele geblottet und β-Catenin und Phospho-β-Catenin mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Als interne Ladungskontrolle wurde die Expression des konstitutiv exprimierten Proteins Vinculin bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms - Huh7.

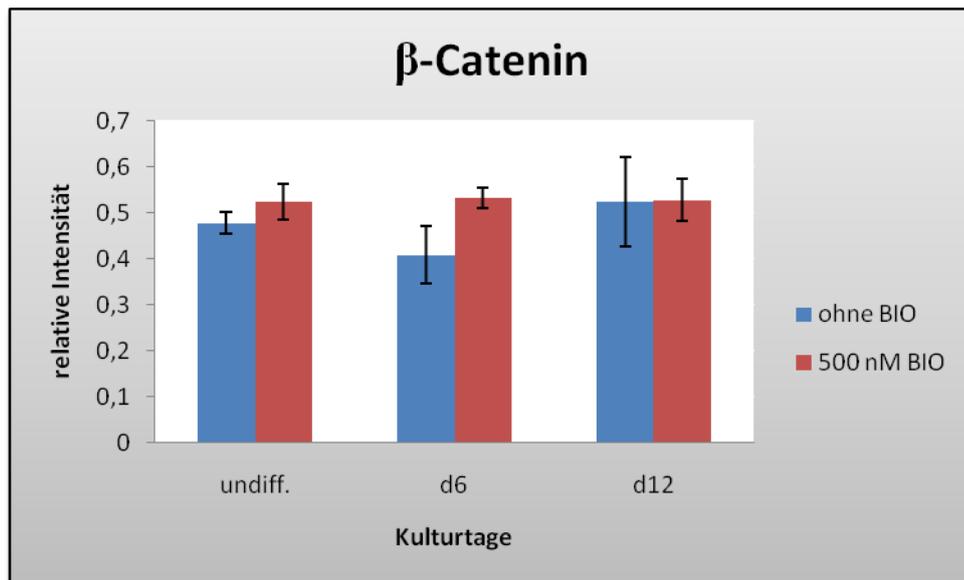


Abbildung 4.19: Bestimmung der Expression des β-Catenin während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen mittels Western Blot. Für die Datenanalyse der relativen Intensität der Western Blot Banden wurden Western Blots von dem Protein β-Catenin von 4 unterschiedlichen Patienten anhand der internen Ladungskontrolle Vinculin ausgewertet und ihr jeweiliger Mittelwert dargestellt. Die statistische Auswertung der einzelnen Kulturstage zueinander ergibt jeweils $p > 0,05$.

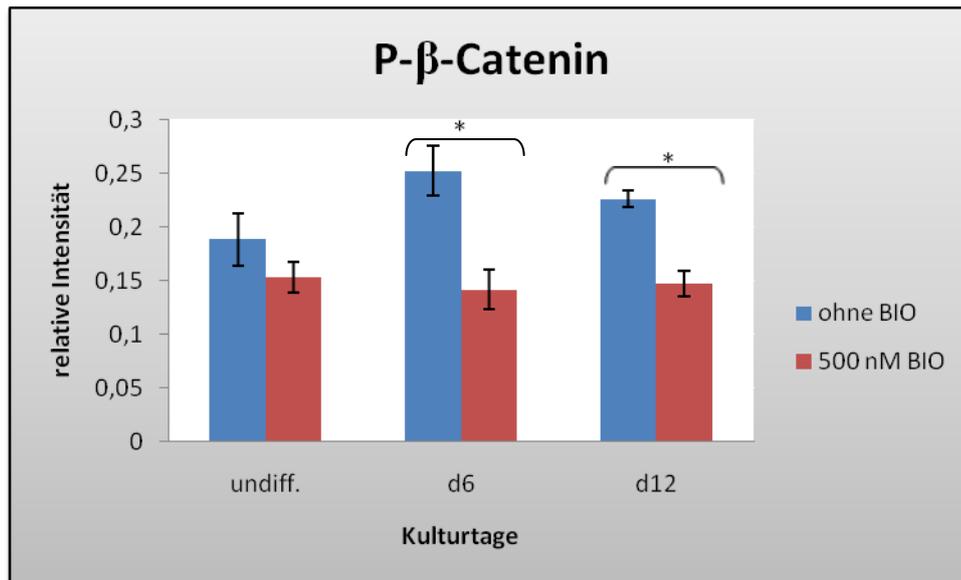


Abbildung 4.20: Bestimmung der Expression des Phospho-β-Catenin während der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen mittels Western Blot. Für die Datenanalyse der relativen Intensität der Western Blot Banden wurden Western Blots von dem Protein Phospho-β-Catenin von 4 unterschiedlichen Patienten anhand der internen Ladungskontrolle Vinculin ausgewertet und ihr jeweiliger Mittelwert dargestellt. Die statistische Auswertung der Kulturstage d6 und d12 der ohne BIO behandelte Zellen und mit 500 nM BIO behandelte Zellen zueinander ergibt jeweils * $p < 0,05$.

Insgesamt scheint also mit der hepatogenen Differenzierung die Translokation des β-Catenin in den Zellkern zuzunehmen (Abb. 4.14, 4.15). Dies war konsistent mit einer nahezu gleichbleibenden Expression des zytoplasmatischen Phospho-β-Catenin im Western Blot (Abb. 4.18, 4.20) und in der Immunzytochemie (Abb. 4.16) mit einer geringeren Expression unter der Behandlung mit BIO. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch BIO führte bereits in undifferenzierten MSC zur nukleären Lokalisation des β-Catenin (Abb. 4.14).

4.4.3. Beta-Catenin-abhängigen Aktivierung der TCF/Lef-vermittelten Genexpression in humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3 β Inhibitors BIO

Durch die Aktivierung des canonischen Wnt-Signalweges kommt es zur Translokation von β-Catenin in den Zellkern. Hier bindet es an Proteine der TCF/Lef-Familie und führt zur Bindung dieses Komplexes an TCF/Lef-Bindemotive in Promotoren von β-Catenin-Zielgenen. Die vorherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass der Übergang von undifferenzierten zu hepatogen differenzierten MSC mit der Translokation von β-Catenin in den Zellkern einhergeht. Um die mögliche Aktivierung von TCF/Lef-

Bindemotiven zu untersuchen, wurden humane mesenchymale Stammzellen mit einem Lentivirus transduziert, der die Firefly Luciferase (FFL) als Reporter gen unter der Kontrolle einer 8-fachen Wiederholung des TCF4/Lef1 Bindemotives besaß. Dieser Lentivirus war in der Arbeitsgruppe vorhanden. Es sollte untersucht werden, ob die hepatogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zur Zunahme der TCF4/Lef1-vermittelten Genexpression führte und ob diese unter Behandlung der Zellen mit dem GSK-3 β Inhibitor BIO im Laufe der hepatogenen Differenzierung weiter stimulierbar war. Als Maß für die Stimulation der TCF4/Lef1 vermittelten Genexpression wurde die FFL-Aktivität luminometrisch gemessen.

Beim Übergang von undifferenzierten MSC zu hepatogen differenzierten Zellen am 6 Tag nach Beginn der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium, welche mit 500 nM BIO behandelt worden sind, nahm die relative Fluoreszenz der FFL zunächst um die Hälfte ab, stieg dann aber zum Tag 10 der Kultur auf das Vierfache und fiel bis zum Tag 12 der Differenzierung erneut auf die Hälfte ab. Zu jedem Zeitpunkt der Kultur ließ sich die FFL-Aktivität durch die Behandlung der MSC mit 500 nM BIO signifikant steigern; am stärksten nach 10 Tagen Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Insgesamt war der Verlauf der FFL-Expression über den Kulturverlauf dem in unbehandelten Zellen ähnlich: Zunächst 50 % Abfall der Expression im Zeitraum vom undifferenzierten Zustand der Zellen bis zum differenzierten am Tag 6, 5-facher Anstieg vom Tag 6 bis zum Tag 10 der Differenzierung und erneuter Abfall zum Tag 12 der hepatogenen Differenzierung auf ein Viertel der Aktivität am Tag 10 (Abb. 4.21). Insgesamt schien also der Übergang vom undifferenzierten zum hepatogen differenzierten Zustand der MSC mit der Abnahme der TCF/Lef-vermittelten Genexpression einherzugehen, die Ausprägung des hepatozytären Phänotyps aber den erneuten Anstieg zu erfordern.

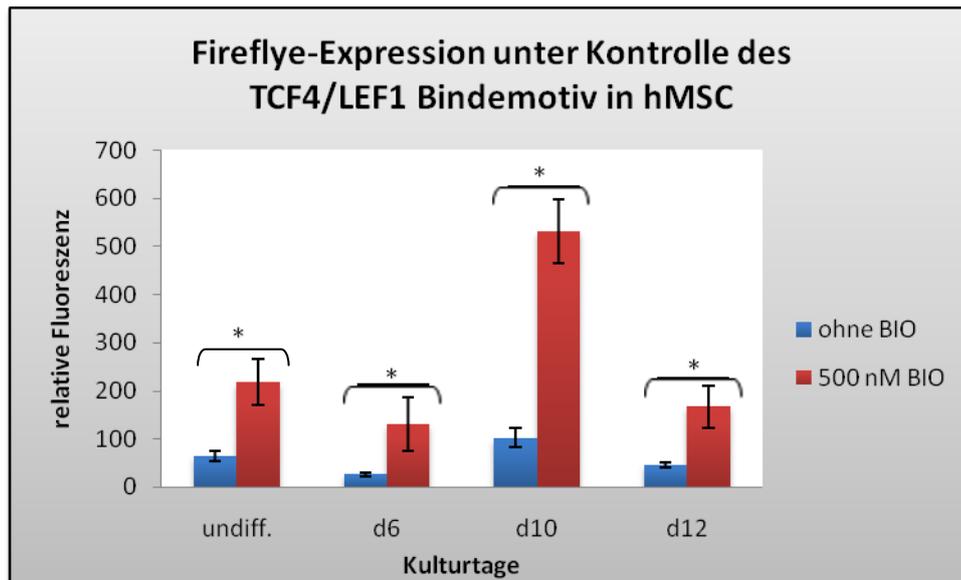


Abbildung 4.21: Expression der Firefly Luciferase unter der Kontrolle des TCF4/Lef1 Bindemotivs in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der hepatogenen Differenzierung und der Einfluss des GSK-3 β Inhibitors. MSC wurden mit dem Reporter gen transduziert und die Luciferaseaktivität in undifferenzierten (undiff.) Zellen bei 80 % Konfluenz der Kultur im Propagationsmedium EM6F und an den Tagen 6, 10 und 12 der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium bestimmt. Der GSK-3 Inhibitor BIO wurde den Kulturen alle 2 Tage in der Konzentration von 500 nM zum Medium zugegeben. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus unabhängigen Versuchen (n=9). *p<0,05

4.4.4. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren TCF4 und TCF7 in Abhängigkeit der Stimulation des canonischen Wnt-Signalweges

Veränderungen der β -Catenin-abhängigen Genaktivierung könnten mit Veränderungen der Bindungspartner des β -Catenins einhergehen. Im Zellkern geht β -Catenin eine Verbindung unter anderem mit dem Transkriptionsfaktor 4 (TCF4) ein und stimuliert so die Expression von Wnt-spezifischen Zielgenen. Der Transkriptionsfaktor 7 (TCF7) wirkt unter anderem als ein negativer Regulator auf β -Catenin/TCF4-Zielgene. Deshalb wurde die Expression von TCF4 und TCF7 auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht.

Eine deutliche Zunahme der TCF4-mRNA-Menge war über den Kulturverlauf vom undifferenzierten Zustand der Zellen bis zum Tag 12 der Differenzierung, sowohl in den unbehandelten als auch in den mit 500 nM BIO behandelten Zellen, zu beobachten. In unbehandelten Zellen war die stärkste Zunahme während der Differenzierung zwischen Tag 6 und 12 festzustellen. Insgesamt war die TCF4-mRNA-Menge in den mit 500 nM BIO behandelten Zellen höher im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die mRNA von TCF7 war in unbehandelten mesenchymalen Stammzellen nur am Tag 12 der hepatogenen Differenzierung nachweisbar; in mit 500 nM BIO behandelten

Zellen jedoch zu jedem Zeitpunkt über den gesamten Kulturverlauf. Die TCF7-mRNA-Menge stieg zum Tag 12 der Differenzierung deutlich an (Abb. 4.22).

Schlussfolgernd kann man beobachten, dass zwar die TCF4-mRNA-Menge während der hepatogenen Differenzierung zunahm, gleichzeitig aber zu späteren Zeitpunkten die des negativen Regulators TCF7. Dieser Verlauf könnte für den Anstieg der FFL-Expression während der hepatogenen Differenzierung und den erneuten Abfall zu späten Zeitpunkten der Differenzierung verantwortlich sein (Abb. 4.21).

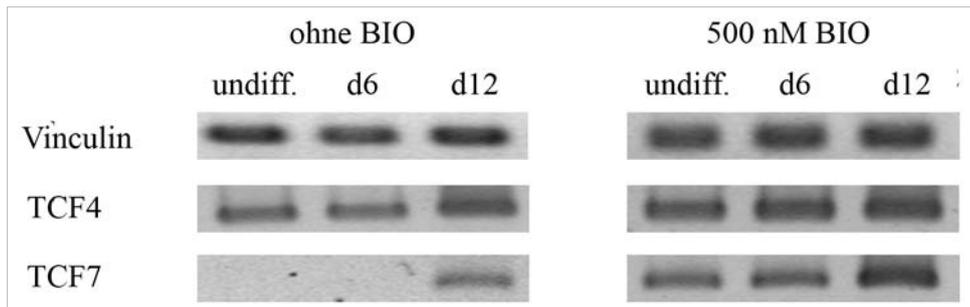


Abbildung 4.22: Nachweis der Expression (RT-PCR) von TCF4 und TCF7 im Verlauf der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und unter dem Einfluss von BIO. Undifferenzierte MSC wurden bei rund 80% Konfluenz im Propagationsmedium EM6F gewonnen (undiff.). Anschließend wurde die hepatogene Differenzierung begonnen. Differenzierte Zellen wurden an den Tagen 6 und 12 untersucht. Der GSK-3 Inhibitor BIO wurde den Kulturen alle 2 Tage in der Konzentration von 500 nM zum Medium zugegeben. Als interne Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet.

4.4.5. Expression des Proliferationsmarkers c-MYC in humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO

Als β -Catenin Zielgen wurde das Protooncogen cellular MYC (c-Myc), ein Proliferationsmarker, das als ein DNA-Bindungsprotein die Transkription von Zielgenen aktiviert oder inaktiviert untersucht. Die Zielgene des c-myc sind unter anderem in die Zellproliferation und in den Zellzyklus involviert. Zusätzlich wird eine verstärkte Expression von c-MYC in verschiedenen soliden Tumoren gefunden (86).

Cellular-Myc wurde mittels semiquantitativer Real Time-PCR in unbehandelten und in mit 500 nM BIO behandelten MSC während der hepatogenen Differenzierung untersucht. In unbehandelten Zellen wie in den mit 500 nM BIO behandelten Zellen stieg die c-MYC mRNA Expression im Zeitraum vom Tag 10 im undifferenzierten Zustand bis zum Tag 6 nach Beginn der hepatogenen Differenzierung signifikant an ($p < 0,05$). Während die mRNA-Menge vom Tag 6 bis zum Tag 12 in den unbehandelten Zellen nicht signifikant weiter anstieg ($p > 0,05$), verdoppelte sie sich in den mit BIO

behandelten Zellen in diesem Zeitraum ($p < 0,05$) (Abb. 4.23). Da c-MYC ein Zielgen des Wnt-Signalweges ist, könnten diese Befunde auf die durch BIO aktivierte Wnt-Wirkung hinweisen.

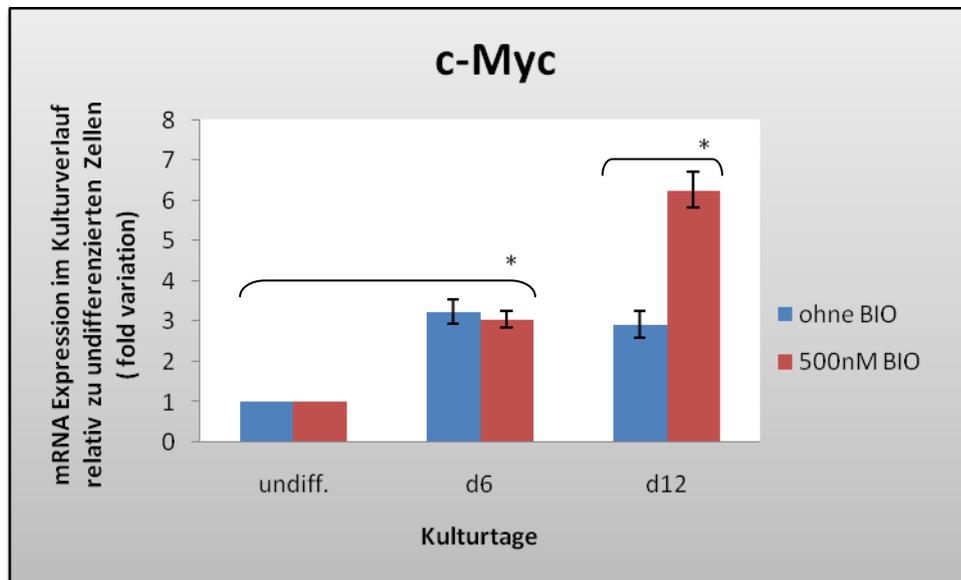


Abbildung 4.23: Expression des c-MYC in humanen mesenchymalen Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung und unter dem Einfluss des GSK-3 Inhibitors BIO. Die Bestimmung der Transkriptmenge wurde mit der semiquantitativen Real Time-PCR-Methode durchgeführt. Als interner Standard wurde das konstitutiv exprimierte Vinculin benutzt. Die Auswertung erfolgte mittels der semiquantitativen delta delta CT-Methode. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je vier unabhängigen Versuchen ($n = 4$). Sie sind dargestellt als die relative mRNA-Menge von c-MYC in differenzierten Zellen im Verhältnis zur Menge in undifferenzierten MSC, die in der jeweiligen Messreihe =1 gesetzt wurde. Die Messungen erfolgten am Tag 10 der Kultur im Expansionsmedium EM6F in undifferenzierten (undiff.) Zellen und nach 6 bzw. 12 Tagen der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium. Wo angegeben, wurden die Zellen in Gegenwart von 500 nM BIO kultiviert, welches dem Differenzierungsmedium alle zwei Tage zugesetzt wurde. * $p < 0,05$.

5. Diskussion

5.1. Humanes Knochenmark aus dem Femur enthält mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) haben in den letzten Jahren zunehmend Bedeutung für die regenerative Medizin gewonnen, weil sie potentiell Zellen in erkrankten Geweben ersetzen und so zur Geweberegeneration beitragen können. Die Erschließung neuartiger Zellquellen zur Gewinnung von MSC ist sowohl für Forschungszwecke als auch für die potentielle therapeutische Nutzung erforderlich. MSC wurden bisher in unterschiedlichen Geweben gefunden z.B. im Knochenmark, im Fettgewebe, Herzmuskel, Synovia u.a. und lassen sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Plastikadhärenz leicht isolieren (22).

In der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen aus dem humanen Knochenmark des Femur über einen Dichtegradienten isoliert, durch ihre Eigenschaft zur Plastikadhärenz selektioniert und anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD13, CD29, CD44, CD105 und CD166 mittels FACS-Analyse typisiert. Verunreinigungen der Kultur mit hämatopoetischen Stammzellen konnten durch die Abwesenheit der für diese Zellen typischen Oberflächenantigene CD14, CD34 und CD45 ausgeschlossen werden (Abb. 4.2). Die Expression von CD29 auf den isolierten Zellen zeigt unter anderem auch, dass die Population keine Epithelzellen oder Fibroblasten enthielt, da diese das Oberflächenmolekül nicht exprimieren (87).

Ein weiterer Nachweis zur Identifizierung von Stammzellen ist ihre Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen mit adipogenem und osteogenem Charakter in Abhängigkeit vom jeweiligen Kulturmedium. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die isolierten Zellen im entsprechenden Kulturmedium adipogene und osteogene Eigenschaften wie die Einlagerung von Lipiden oder die Bildung von Calciumphosphat-Präzipitaten erlangten (Abb.4.3).

Da die in der Arbeit isolierten Zellen allen Kriterien entsprachen, welche laut der International Society for Cellular Therapy zur Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen erfüllt sein müssen, kann man annehmen, dass es sich bei der isolierten Zellpopulation um mesenchymale Stammzellen handelt.

5.2. Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark lassen sich *in vitro* hepatogen differenzieren

In verschiedenen Studien wurde die Differenzierung von MSC zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen aus unterschiedlichen Geweben wie aus Fettgewebe(88) und aus dem Knochenmark (7) *in vitro* nachgewiesen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte der

Nachweis zur hepatogenen Differenzierung von MSC aus dem humanen Knochenmark *in vitro* gezeigt werden.

Die isolierten Zellen exprimierten im Verlauf der Kultur zunehmend hepatogene Marker wie TFN, Albumin, CD26, CX32 und CK18 (Abb. 4.6). Die Marker TFN, CX32 und CD26 traten schon im undifferenzierten Zustand der Zellen auf. Das lässt vermuten, dass mesenchymale Stammzellen zur spontanen Entwicklung in Vorläuferzellen befähigt sind. Auslöser dafür könnte das Erreichen einer gewissen Zelldichte in der Kultur sein.

Auch die Expression der zytosolischen Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese, nahm während der hepatogenen Differenzierung zu. Besonders starke Expressionen von GFP unter Kontrolle des PCK1-Genpromotors ließ sich in Arealen mit hoher Zelldichte nachweisen (Abb.4.8). Diese Beobachtung lässt annehmen, dass für die Differenzierung der Zellen nicht nur die entsprechenden Wachstumsfaktoren im Medium sondern auch Zell-Zell-Interaktionen notwendig sind.

Studien innerhalb der Arbeitsgruppe konnten nachweisen, dass ohne die Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und HGF im Differenzierungsmedium die o.g. hepatogenen Marker nicht oder nur gering exprimiert wurden. Dass jedoch einige hepatogene Marker in undifferenzierten MSC exprimiert wurden, lässt sich auf die spontane Ausbildung von Vorläuferzellen unterschiedlicher Gewebearten, welche wieder de-differenzieren können, zurückführen. Dieses Phänomen wurde auch von Song et al. beobachtet. Sie beschrieben die Fähigkeit von mesenchymalen Stammzellen zur Transdifferenzierung und die erneute De-Differenzierung von MSC in der Zellkultur (89).

Allen Spendern wurde das Knochenmark während einer Operation zur Implantation einer Hüft-Endoprothese bei ausgeprägter Arthrose entnommen. In der Literatur wird beschrieben, dass MSC, die aus dem proximalen Femur bei Patienten mit Arthrose isoliert wurden, eine höhere Expression des Wachstumsfaktors TGF β aufwiesen als MSC von Patienten ohne Arthrose (90). Scharstuhl et al. beschreiben, dass der Arthrosegrad keinen direkten Einfluss auf die Proliferation bzw. chondrogene Differenzierung von MSC hatte (91). Es ist aber anzunehmen, dass die Variabilität im Spenderalter, das Körpergewicht des Spenders oder Stoffwechsel-grunderkrankungen wie Diabetes mellitus durchaus Einfluss auf die Differenzierung und damit auf die Ausbildung von spezifischen Merkmalen hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass MSC aus dem Knochenmark des Femur zu hepatozyten-ähnlichen Zellen differenzieren können.

5.3. Der GSK-3-Inhibitor BIO aktiviert den β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg in humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

Der canonische Wnt-Signalweg, in dem β -Catenin eine wichtige Rolle als zentrales Molekül der intrazellulären Signalübertragung spielt, ist beteiligt an der Proliferation, der Differenzierung und Kanzerogenese von Zellen (92). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Aktivierung des canonischen Wnt-Signalweges zur Steigerung der Proliferation und somit zur verstärkten Selbsterneuerung von Stammzellen führt (70, 75).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss der Wnt-Signalweg auf die Proliferation und die hepatogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem humanen Knochenmark hat. Voraussetzung dafür war die Möglichkeit zur gezielten Aktivierung des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweges, die in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung des GSK-3 Hemmstoffs (2',3'-O-Isopropylidene-5 α -E- β -D-ribofuranose-2,3-diphosphat) (BIO) erzielt wurde. BIO wurde dem Kulturmedium während der Expansions- und der Differenzierungsphase zugegeben. Die Hemmung der GSK-3 führte zur geringeren Degradation von β -Catenin im Zytoplasma und zur Akkumulation von β -Catenin im Zellkern wie in der Immunzytochemie gezeigt wurde (Abb. 4.14, 4.15). Entsprechend ließ sich in unbehandelten Zellen eine stärkere Bildung von phosphoryliertem β -Catenin als in den behandelten Zellen darstellen (Abb. 4.16, 4.18, 4.20) wobei die Gesamtmenge des β -Catenins in behandelten und unbehandelten Zellen konstant blieb (Abb. 4.19, 4.21). In konfokalen Schichtaufnahmen des Zellkerns lies sich in unbehandelten MSC im Verlauf der hepatogenen Differenzierung eine deutliche Zunahme der β -Catenin-Menge nachweisen. Während in undifferenzierten unbehandelten Zellen kaum β -Catenin im Zellkern war, konnte man es in den mit BIO behandelten Zellen bereits in undifferenzierten Zellen im Zellkern deutlich nachweisen. Die Translokation von β -Catenin in den Zellkern war hier auch während der hepatogenen Differenzierung stärker ausgeprägt (Abb. 4.14). Diese Daten belegen deutlich, dass die Aktivierung des Wnt-Signalweges während der hepatogenen Differenzierung von MSC zur Translokation von β -Catenin in den Zellkern führt.

Um zu überprüfen, ob die Kerntranslokation des β -Catenins zur Aktivierung von Wnt-abhängigen Zielgenen führte, wurde das Transgen *Firefly Luciferase* (FFL) unter Kontrolle des TCF4/Lef1-Bindemotivs durch lentivirale Infektion stabil in die MSC transfiziert. In unbehandelten Zellen nahm die FFL-Expression zum Beginn der

hepatogenen Differenzierung ab, zu späteren Zeitpunkten wieder zu. Durch die Zugabe von BIO war die TCF/Lef-abhängige Expression der FFL zu jedem Zeitpunkt, im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen, erhöht (Abb.4.21). Auch bei den mit BIO behandelten Zellen zeigte sich ein biphasischer Verlauf der TCF/Lef-abhängige Expression der FFL.

Weitere Regulationsmechanismen müssen auf die Expression von Wnt-abhängigen Zielgenen während der hepatogenen Differenzierung vom MSC einwirken. Um diesen Sachverhalt näher zu betrachten wurde die Expression von TCF4 und TCF7 untersucht. TCF7 ist ein Gegenregulator der Wnt-Signalkaskade. Sowohl in unbehandelten als auch in mit BIO behandelten Zellen stieg die Expression von TCF4 und TCF7 im Verlauf der hepatogenen Differenzierung an. Auffällig war insbesondere die Zunahme der Expression von TCF7 zu späteren Zeitpunkten der hepatogenen Differenzierung, die die Hemmung der TCF/Lef-vermittelten FFL-Expression erklären würde (Abb. 4.21). Diese Daten sind konsistent mit der Hypothese, dass in MSC der Übergang vom undifferenzierten zum hepatogen differenzierten Zustand die Verminderung der β -Catenin-Signalwirkung erfordert, die jedoch zur Ausbildung eines spezifischen hepatozytären Phänotyps wieder hochreguliert wird. Dafür scheinen Mechanismen wie die Regulation der Expression von TCF4 und die des negativen Regulators der β -Catenin-abhängigen Genexpression, TCF7, eine bedeutende Rolle zu spielen.

Ein weiterer Mechanismus, der die Expression der β -Catenin-abhängigen Genexpression hemmen könnte, ist die Hochregulation von β -TRCP, einem unter dem TCF/Lef-Bindemotiv stehenden Gegenregulator. Beta-TRCP führt zum Anstieg der Expression der E3-Untereinheit der Ubiquitin-Ligase und somit zum verstärktem Abbau von phosphorylierten β -Catenin (55). Weitere Regulationsmechanismen bestehen in der Phosphorylierung der einzelnen TCFs z.B. durch die, die die DNA-Bindungsaffinität des TCF/Lef-Komplexes verändert (93) und der Beeinflussung der Aktivität des β -Catenins im Zellkern durch Faktoren wie z.B. Pontin52 (58), Pygopus (60), Brg-1(59). Einhergehend mit der Aktivierung des Transgen FFL unter Kontrolle des TCF4/Lef1-Bindemotives kam es zu einer verstärkten Expression von c-MYC in MSC unter der Behandlung von BIO. Der Zusammenhang der Expression von c-MYC durch aktiviertes β -Catenin wurde erstmal von He TC beschrieben (47).

Diese Daten zeigen einen weiteren Hinweis, dass durch die Zugabe von BIO eine β -Catenin abhängige Aktivierung von Zielgenen in Gang gesetzt wird.

Anhand der oben gelisteten Ergebnisse kann man annehmen, dass die Behandlung von MSC mit BIO zu einer Aktivierung der β -Catenin abhängigen Signalkaskade führt.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten unterstützen die Hypothese, dass der Übergang von undifferenzierten zu differenzierten Stammzellen die Verminderung der β -Catenin Aktivität, umgekehrt die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters aktive Wnt-Signalübertragung erfordert.

5.4. Der Einfluss des GSK-3-Inhibitor BIO auf die hepatogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass die Differenzierung von Stammzellen die Verminderung der β -Catenin-Signalwirkung erfordert, wurde hier nachgewiesen, dass die TCF/Lef-vermittelte FFL-Expression in undifferenzierten MSC hoch war und mit dem Übergang zur hepatozytären Differenzierung abnahm (Abb. 4.20). Die Tatsache aber, dass mit der Differenzierung β -Catenin in den Kern transloziert und die Expression von β -Catenin-Zielgenen wie c-MYC (Abb. 4.23) oder FFL unter TCF4/Lef 1-Kontrolle (Abb. 4.21) ansteigt, lässt auf eine duale Rolle der β -Catenin-Wirkung schließen. Diese Annahme wird auch unterstützt durch die Befunde, dass BIO die hepatogene Differenzierung von MSC nicht hemmte (Abb. 4.6-4.10), wie man erwartet hätte, wenn die Aktivierung des Wnt-Signalweges zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters führen sollte. Alle untersuchten Marker (Albumin, TFN, PCK1, CX32, CD26, CK18) wurden in einem ähnlichen Maße während der hepatogenen Differenzierung exprimiert, unabhängig ob die MSC mit dem GSK 3- β Inhibitor BIO behandelt worden sind oder nicht.

Eher muss man annehmen, dass die Wnt/ β -Catenin-Signalwirkung für die Ausprägung eines spezifischen hepatozytären Phänotyps erforderlich ist.

Erste Anhaltspunkt für die Annahme, dass β -Catenin eine wichtige Rolle in der Regulation eines spezifischen hepatozytären Phänotyps spielt, wurden in Studien des hepatozellulären Karzinoms festgestellt. In perivenösen Hepatozyten kam es zu einer verstärkten Expression von β -Catenin und der Gluthaminsynthetase, ein Schlüsselenzym im Stickstoff-Stoffwechsel (94).

Desweiteren stellten Hailfinger et al. fest, dass eine Wnt/ β -Catenin Aktivierung durch den GSK-3 β Inhibitor SB-216763 oder durch Wnt-conditioniertes Medium die Expression von perivenösen Markern in isolierten Hepatozyten steigert (95).

Knock out Versuche des adenomatous poliposis coli protein (APC) führten zu einer, durch β -Catenin verursachten, Entstehung von hepatozellulären Karzinomen (96). In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass APC die Bildung von perivenösen

Proteinen in Hepatozyten hemmt und die Bildung von periportal Proteinen in Hepatozyten fördert (97).

Schlussfolgernd lässt sich somit zusammenfassen, dass der Wnt-Signalweg ein wichtiger Regulator für die hepatogene Differenzierung von MSC ist. Aufgrund der Komplexität der Signalkaskade lässt sich aber kein einfaches Dosis-Wirkungsprinzip aufstellen. Mehr β -Catenin, welches in den Zellkern transloziert und dort spezifische Zielgene aktiviert, bedeutet nicht: eine stärkere oder schwächere hepatogene Differenzierung der MSC. Weitere Untersuchungen z.B. zur Überexpression oder zum Knock-out von β -Catenin in den MSC während ihrer hepatogenen Differenzierung könnten möglicherweise weiteren Aufschluss über den Einfluss des Wnt-Signalweges aufzeigen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des canonischen β -Catenin abhängigen Wnt-Signalweges bei der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. Es ist bekannt, dass dieser Signalweg in der embryonalen Leberentwicklung eine Rolle spielt. Ebenso zeigten andere Autoren, dass die Aktivierung dieses Signalweges zu einer Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von MSC während der adipogenen und osteogenen Differenzierung führt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des β -Catenin abhängigen Wnt-Signalweges keine inhibitorische Rolle während der hepatogenen Differenzierung von MSC spielt.

Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus Knochenmark des Femur während einer Hüft-Totalendoprothesenoperation entnommen und mittels Dichtegradienten und ihrer Fähigkeit zur Plastikadhäsion gewonnen. Die Charakterisierung der isolierten Zellen erfolgte mittels FACS-Analyse. Hierbei wurden typisch mesenchymale Oberflächenantigene nachgewiesen und es wurde ausgeschlossen, dass hämatopoetische Oberflächenantigene auf den Zellen vorhanden waren. Ihre Multipotenz konnte mittels adipogener bzw. osteogener Differenzierung sicher gestellt werden.

Die hepatogene Differenzierung erfolgte durch die Zugabe von hepatogenem Wachstumsmedium.

Die Induktion des canonischen Wnt-Signalweges in den MSC erfolgte durch die Zugabe des GSK-3 Inhibitors BIO.

Zum Nachweis der hepatogenen Differenzierung wurden die hepatozytären Markergene TFN, Albumin, CD26, CX32, CK18, CD26 und PCK1 untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme aller untersuchten Marker im Verlauf, unabhängig von einer Behandlung der Zellen mit BIO. Somit ließ sich nachweisen, dass eine Induktion des canonischen Wnt-Signalweges während der hepatogenen Differenzierung von MSC nicht zu einer Aufrechterhaltung ihres Stammzellcharakters führt.

Die Aktivierung des canonischen Wnt-Signalweges durch BIO konnte mittels unterschiedlicher Methoden nachgewiesen werden.

Immunzytochemisch ließ sich in mit BIO behandelten MSC vermehrt β -Catenin im Zellkern darstellen. Zusätzlich konnte mittels Western Blot und immunzytochemisch eine verminderte Konzentration von Phospho- β -Catenin im Zytoplasma gezeigt werden, welches für einen verminderten Abbau von β -Catenin spricht.

Eine gesteigerte Aktivierung von β -Catenin-abhängigen Zielgenen im Zellkern konnte luminometrisch sowie mittels semiquantitativer Realtime PCR bzw. RT-PCR gezeigt werden.

Diese Untersuchungsmethoden zeigen eine signifikante Aktivierung des canonischen Wnt-Signalweges in mit 500 nM BIO behandelten MSC.

Insgesamt betrachtet scheint der canonische Wnt-Signalweg somit eine essentielle Rolle in der hepatogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zu spielen. Sicherlich sind weitere Untersuchungen zur Klärung ablaufender Interaktionen notwendig um möglicherweise die komplexen Abläufe der Differenzierung auf biochemischer Ebene begreifen zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67-73.
2. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-74.
3. Benayahu D, Akavia UD, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. *Curr Med Chem* 2007;14:173-179.
4. Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1:365-369.
5. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8932-8937.
6. Picinich SC, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell- & tissue-based therapy. Expert Opin Biol Ther* 2007;7:965-973.
7. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-415.
8. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:39-49.
9. Dezawa M, Hoshino M, Nabeshima Y, Ide C. Marrow stromal cells: implications in health and disease in the nervous system. *Curr Mol Med* 2005;5:723-732.
10. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 2005;309:314-317.
11. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, Floege J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2202-2212.

12. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:145-152.
13. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:263-272.
14. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-247.
15. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999;65:22-26.
16. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-228.
17. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-242.
18. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 2001;44:85-95.
19. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-13630.
20. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002;30:870-878.
21. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396-2402.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.

23. Lange C, Mix E, Rateitschak K, Rolfs A. Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegener Dis* 2006;3:76-86.
24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
25. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002;69:908-917.
26. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med* 2007;140:67-81.
27. Opie LH, Newsholme EA. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem J* 1967;103:391-399.
28. Leonberg BL, Crosby LO, Buzby GP. A rapid, accurate, precise assay for determination of plasma transferrin. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987;11:74-76.
29. Ku NO, Michie S, Oshima RG, Omary MB. Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *J Cell Biol* 1995;131:1303-1314.
30. Sohl G, Nielsen PA, Eiberger J, Willecke K. Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues. *Cell Commun Adhes* 2003;10:27-36.
31. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 1993;261:466-469.
32. Adair GS, Robinson ME. The analysis of the osmotic pressures of the serum proteins, and the molecular weights of albumins and globulins. *Biochem J* 1930;24:1864-1889.
33. Gilgenkrantz H. Mesenchymal stem cells: an alternative source of hepatocytes? *Hepatology* 2004;40:1256-1259.
34. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.

35. Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005;11:3479-3484.
36. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:1153-1161.
37. Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15436-15441.
38. Baksh D, Tuan RS. Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007;212:817-826.
39. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002;3:REVIEWS3001.
40. Malbon CC. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci* 2004;9:1048-1058.
41. Liu T, Liu X, Wang H, Moon RT, Malbon CC. Activation of rat frizzled-1 promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via pathways that require Galpha(q) and Galpha(o) function. *J Biol Chem* 1999;274:33539-33544.
42. Wang HY. WNT-frizzled signaling via cyclic GMP. *Front Biosci* 2004;9:1043-1047.
43. Cheng JH, She H, Han YP, Wang J, Xiong S, Asahina K, Tsukamoto H. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G39-49.
44. Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993;9:317-321.
45. Cong F, Schweizer L, Varmus H. Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* 2004;131:5103-5115.
46. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, et al. XTcf-3 transcription factor

- mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996;86:391-399.
47. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-1512.
 48. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426.
 49. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001;61:6050-6054.
 50. Clevers H, van de Wetering M. TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet* 1997;13:485-489.
 51. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:364-371.
 52. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006;281:22429-22433.
 53. Hagen T, Vidal-Puig A. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:324-328.
 54. Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1930-1944.
 55. van Kerkhof P, Putters J, Strous GJ. The ubiquitin ligase SCF(betaTrCP) regulates the degradation of the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 2007;282:20475-20483.
 56. Valenta T, Lukas J, Korinek V. HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2369-2380.
 57. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 1999;399:798-802.

58. Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbacher U, Aragnol D, Kemler R, et al. Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *Embo J* 2000;19:6121-6130.
59. Barker N, Hurlstone A, Muisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H. The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *Embo J* 2001;20:4935-4943.
60. Parker DS, Jemison J, Cadigan KM. Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wntless signaling in *Drosophila*. *Development* 2002;129:2565-2576.
61. Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* 2000;14:1741-1749.
62. Zorn AM, Barish GD, Williams BO, Lavender P, Klymkowsky MW, Varmus HE. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol Cell* 1999;4:487-498.
63. Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, et al. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 1999;285:1923-1926.
64. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-1851.
65. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 1980;107:519-527.
66. Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 1990;9:2431-2438.
67. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003;116:1175-1186.
68. Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, et al. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* 2003;10:1255-1266.
69. Polychronopoulos P, Magiatis P, Skaltsounis AL, Myrianthopoulos V, Mikros E, Tarricone A, Musacchio A, et al. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen

- synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* 2004;47:935-946.
70. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004;10:55-63.
 71. Li HX, Luo X, Liu RX, Yang YJ, Yang GS. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008;291:116-124.
 72. Tseng AS, Engel FB, Keating MT. The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chem Biol* 2006;13:957-963.
 73. Fletcher J, Cui W, Samuel K, Black JR, Hannoun Z, Currie IS, Terrace JD, et al. The Inhibitory Role of Stromal Cell Mesenchyme on Human Embryonic Stem Cell Hepatocyte Differentiation is Overcome by Wnt3a Treatment. *Cloning Stem Cells* 2008.
 74. Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, Black JR, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008.
 75. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004;93:1210-1230.
 76. Monga SP, Monga HK, Tan X, Mule K, Pediaditakis P, Michalopoulos GK. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* 2003;124:202-216.
 77. Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 2004;126:1134-1146.
 78. Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001;34:688-693.

79. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
80. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4477-4482.
81. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6379-6383.
82. Peruzzi B, Bottaro DP. Beta-catenin signaling: linking renal cell carcinoma and polycystic kidney disease. *Cell Cycle* 2006;5:2839-2841.
83. Monga SP, Mars WM, Padiaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, Wang X, et al. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 2002;62:2064-2071.
84. Zeng G, Apte U, Micsenyi A, Bell A, Monga SP. Tyrosine residues 654 and 670 in beta-catenin are crucial in regulation of Met-beta-catenin interactions. *Exp Cell Res* 2006;312:3620-3630.
85. Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 1998;391:285-288.
86. Yokota J, Tsunetsugu-Yokota Y, Battifora H, Le Fevre C, Cline MJ. Alterations of myc, myb, and rasHa proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* 1986;231:261-265.
87. Brooke G, Tong H, Levesque JP, Atkinson K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev* 2008;17:929-940.
88. Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, Brulport M, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 2009;58:570-581.
89. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 2004;18:980-982.

90. Rollin R, Alvarez-Lafuente R, Marco F, Garcia-Asenjo JA, Jover JA, Rodriguez L, Lopez-Duran L, et al. Abnormal transforming growth factor-beta expression in mesenchymal stem cells from patients with osteoarthritis. *J Rheumatol* 2008;35:904-906.
91. Scharstuhl A, Schewe B, Benz K, Gaissmaier C, Buhning HJ, Stoop R. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells* 2007;25:3244-3251.
92. Verzi MP, Shivdasani RA. Wnt signaling in gut organogenesis. *Organogenesis* 2008;4:87-91.
93. Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H. Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem* 2004;279:17232-17240.
94. Gebhardt R, Baldysiak-Figiel A, Krugel V, Ueberham E, Gaunitz F. Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem* 2007;41:201-266.
95. Hailfinger S, Jaworski M, Braeuning A, Buchmann A, Schwarz M. Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology* 2006;43:407-414.
96. Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, Giovannini M, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17216-17221.
97. Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, Vasseur-Cognet M, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 2006;10:759-770.

8. Thesen

1. Mesenchymale Stammzellen lassen sich aus dem humanen Knochenmark des Femur isolieren
2. Mesenchymale Stammzellen isoliert aus dem humane Knochenmark besitzen die Eigenschaft zur multiplen Differenzierungsfähigkeit.
3. Mesenchymale Stammzellen lassen sich zu hepatozyten-ähnlichen Zellen differenzieren mit dem Nachweis der Transkription von typischen hepatozytären Markern (TFN, Albumin, CK18, CX32, CD26, PCK1).
4. Die Aktivierung des canonischen Wnt-Signalweges durch den GSK-3 Inhibitor BIO im Zuge der hepatogenen Differenzierung führt nicht zu einer Aufrechterhaltung des undifferenzierten Charakters von mesenchymalen Stammzellen.
5. Im Rahmen der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen kommt es zu einer perinukleären Anlagerung von β -Catenin sowie zu dessen Translokation in den Zellkern.
6. Der GSK-3 Inhibitor BIO hemmt die Phosphorylierung des β -Catenin durch die GSK-3 β und steigert die Kerntranslokation von β -Catenin während der hepatogenen Differenzierung im Vergleich zu nicht behandelten Zellen.
7. Die Expression von β -Catenin in mesenchymalen Stammzellen bleibt unabhängig von der Behandlung mit BIO während der hepatogenen Differenzierung konstant.
8. Der GSK-3 Inhibitor BIO steigert die β -Catenin-abhängige Aktivierung der TCF4/Lef1 vermittelten Genexpression in mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der hepatogenen Differenzierung.
9. GSK-3 Inhibitor BIO steigert die Transkription des Transkriptionsfaktors TCF4.
10. Der Transkriptionsfaktor TCF7 wird in mesenchymalen Stammzellen unter der Behandlung mit dem GSK-3 Inhibitor BIO vermehrt exprimiert und lässt eine Gegenregulation der Zellen auf den aktivierten canonischen Wnt-Signalweg vermuten.
11. Die gesteigerte Expression von c-Myc im Verlauf der hepatogenen Differenzierung weist auf eine Aktivierung von Zielgenen des canonischen Wnt-Signalweges durch die Behandlung der mesenchymalen Stammzellen mit dem GSK-3 Inhibitor BIO hin.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

- Name: Anna Völker
- Geburtsdatum: 30.12.1981
- Geburtsort: Berlin
- Familienstand: ledig
- Kinder: keine
- Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

- 1987-1993 7. Grundschule Berlin-Mitte
- 1993-2001 Max-Planck-Oberschule Berlin-Mitte
- Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife

Studium

- 2001 - 2008: Studium der Humanmedizin
- Besuchte Hochschule: Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

Famulaturen

- 2005: Innere Medizin/ Gastroenterologie
Universitätsklinikum Halle/Saale
Orthopädie Universitätsklinikum Halle/Saale
- 2006: Allgemein- und Viszeralchirurgie Klinikum am
Urban/ Berlin
Praxis für Allgemeinmedizin Berlin/ Pankow
Department of Orthopaedic Surgery Denver
Health, Denver, CO

Praktisches Jahr

- 2007-2008: 1. Terial: Klinik für Neurochirurgie
Universitätsklinikum Halle/Saale (Prof. C. Strauß)
2. Terial: Department of Surgery Baylor College of
Medicine Houston, TX
3. Terial Innere Medizin/ Klinik für Kardiologie
Universitätsklinikum Halle/Saale (Prof. K. Werdan)

Berufliche Tätigkeit

- Seit 07/2008 Assistenzärztin an der Klinik für Unfall- und
Wiederherstellungschirurgie mit dem
Arbeitsbereich Orthopädie, Charite CBF, Berlin

Berlin, den

Unterschrift:

Erklärung

Hiermit erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und alle wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht habe.

Dies ist der erste von mir eingereichte Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens und es wurde keinen Antrag an einer anderen Universität oder Hochschule gestellt.

Berlin, den _____

Anna Völker _____

Veröffentlichungen

- Poster: Untersuchungen zur Differenzierung humaner mesenchymaler Knochenmarkstammzellen; *DGVS*; (2006)
Anna Völker, Malte Sgodda, Ines Aurich, Hendryk Aurich, Bruno Christ
- Publikation: Hepatocytes derived from adult stem cells.
Stock P, Staeger MS, Müller LP, Sgodda M, Völker A, Volkmer I, Lützkendorf J, Christ B. *Transplant Proc.* 2008 Mar;40(2):620-3

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Bruno Christ für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Hendrik Aurich, Herrn Dr. Malte Sgodda und Frau Dr. Ines Aurich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Zudem gilt mein Dank meiner gesamten Familie, die mir während der ganzen Zeit zur Seite stand und diese Ausbildung ermöglicht hat.