

ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE

PROF. DR. MICHAEL NERLICH

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Etablierung eines in-vitro-Modells zur gemischten Adipogenese und Osteogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen und der Einfluss von 17- β -Östradiol auf die gemischte Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Oliver Loose

2012

ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE

PROF. DR. MICHAEL NERLICH

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Etablierung eines in-vitro-Modells zur gemischten Adipogenese und Osteogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen und der Einfluss von 17- β -Östradiol auf die gemischte Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Oliver Loose

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Angele
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Tag der mündlichen Prüfung:	30.04.2013

Meiner Familie

1. EINLEITUNG	11
1.1. Die Mesenchymale Stammzelle – ein Einblick in ihre Entdeckungsgeschichte	11
1.2. Eigenschaften und Ursprung der MSCs	12
1.3. Differenzierungsverhalten der MSCs	13
1.6. Osteogenese der MSCs.....	16
1.7. Adipogenese der MSCs	19
1.7.1. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR γ)	20
1.7.2. Lipoproteinlipase (LPL)	22
1.8. Die Transdifferenzierung von humanen MSCs	22
1.9. Die Rolle der Transdifferenzierung im Zusammenhang mit der Osteoporose	23
1.10. Östrogen	25
1.10.1. Biochemie des Sexualhormons	25
1.10.2. Wirkung von Östrogen auf die Osteogenese/Knochenwachstum.....	27
1.10.3. Wirkung von Östrogen auf die Adipogenese	28
1.11. FRAGESTELLUNG	29
2. MATERIAL.....	30
2.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte	30
2.2. Kits	31

Inhaltsverzeichnis

2.3. Primer	32
2.4. Chemikalien und Reagenzien	32
2.5. Puffer und Lösungen.....	34
2.6. Medien, Medienzusätze und Seren	35
2.7. Wachstumsfaktoren	36
 3. METHODEN	 37
3.1. Zellkultur der humanen mesenchymalen Stammzellen	37
3.1.1. Zellisolation	37
3.1.4. Amplifikation.....	37
3.1.5. Differenzierung.....	38
3.1.6. Zellernte und Lyse der Zellen	39
3.2. Nasschemische Analyse der Zellen.....	39
3.2.1. Bestimmung der Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase Aktivität	39
3.2.2. Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase.....	41
3.2.3. Bestimmung der DNA Konzentration	41
3.2.3. Calcium-Bestimmung mittels Alizarin Red S Färbung	42
3.3. Histologie	42
3.3.1. Alizarin Red S Färbung.....	42
3.3.2. Oil Red O Färbung.....	43
3.4. Molekularbiologische Analyse der Zellen	43
3.4.1. Arbeiten mit RNA	43

Inhaltsverzeichnis

3.4.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus hMSC.....	43
3.4.1.2. DNase Verdau	44
3.4.1.3. Bestimmung der RNA-Konzentration	44
3.4.1.4. Gelelektrophoretische Überprüfung der Reinheit der RNA	45
3.4.1.5. Reverse Transkription	46
3.4.2. Semi-quantitative Real-Time PCR	47
3.6. Statistik	48
4. ERGEBNISSE	49
4.1. Etablierung der Methoden.....	49
4.1.1. Zellyseverfahren und GPDH-Assay	49
4.1.1.1. OBG-Puffer.....	49
4.1.1.2. Z2-Puffer	50
4.1.2. Modifikation der AP-Messung	50
4.1.3. Calcium-Quantifizierung mittels Alizarin Red Färbung	50
4.2. Etablierung eines in-vitro Modells zur gemischten Adipo- und Osteogenese.....	53
4.2.1 Ergebnisse Adipogenese	54
4.2.1.1. Einfluss von Insulin.....	54
4.2.1.1. Einfluss von IBMX	55
4.2.2. Ergebnisse Osteogenese.....	57
4.2.3. Ergebnisse gemischte Zellkultur	58
4.2.4. Zusammensetzung der Medien des in-vitro-Modells für gemischte Adipo-und Osteogenese.....	60

4.3. Einfluss von 17- β -Östradiol auf die adipogene und osteogene Differenzierung von hMSCs	61
4.3.1 Einfluss von Östrogen auf die Adipogenese	62
4.3.1.1. <i>Unter basalen Bedingungen</i>	62
4.3.1.2. <i>Unter adipogenen Bedingungen</i>	65
4.3.1.3. <i>Unter gemischten Bedingungen</i>	69
4.3.2. Einfluss von Östrogen auf die Osteogenese	74
4.3.2.1. <i>Unter basalen Bedingungen</i>	74
4.3.2.2. <i>Unter osteogenen Bedingungen</i>	76
4.3.2.3. <i>Unter gemischten Bedingungen</i>	81
 5. DISKUSSION	 86
5.1. Etablierung eines in-vitro Modells zur gemischten Adipo- und Osteogenese	86
5.2. Einfluss von 17- β -Östradiol auf die adipogene und osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen	86
5.2.1. Einfluss von Östrogen auf die Adipogenese	86
5.2.1.1. <i>Unter basalen Bedingungen</i>	86
5.2.1.2. <i>Unter adipogenen Bedingungen</i>	86
5.2.1.3. <i>Unter gemischten Bedingungen</i>	87
5.2.2 Einfluss auf die Osteogenese	88
5.2.2.1. <i>Unter basalen Bedingungen</i>	88
5.2.2.2. <i>Unter osteogenen Bedingungen</i>	89
5.2.2.3. <i>Unter gemischten Bedingungen</i>	90

6. ZUSAMMENFASSUNG.....	92
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
8. TABELLENVERZEICHNIS	98
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
10. LITERATURVERZEICHNIS	103
11. DANKSAGUNG	114
12. LEBENSLAUF	115
13. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	119

1. Einleitung

1.1. Die Mesenchymale Stammzelle – ein Einblick in ihre Entdeckungsgeschichte

Humane Mesenchymale Stammzellen und die Stammzelltherapie sind schon seit dem 19. Jahrhundert im Visier der Wissenschaftler. Verlockend ist der Gedanke, chronische Erkrankungen wie Diabetes [5] und Morbus Parkinson [6] zu heilen oder Schäden des Bewegungsapparates durch Tissue engineering zu beheben [7]. Erstmals äußerte der deutsche Pathologe Conheim 1867 die Vermutung, dass sich nicht nur hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark befinden. Im Rahmen seiner Studien zur Wundheilung injizierte er Mäusen intravenös einen Farbstoff. Die in dem Wundbereich sichtbaren gefärbten Zellen mussten seiner Meinung nach mit dem Blutstrom – und letztlich auch aus dem Knochenmark – gekommen sein und hatten teilweise eine Fibroblasten-ähnlichen Morphologie [8]. Im weiteren Verlauf wurde zwar die Herkunft dieser Zellen auf eher lokalen Ursprung zurückgeführt [9], der Gedanke der Existenz einer Vorläuferzelle im Knochenmark für Bindegewebe aber blieb erhalten. Im Jahre 1968 schließlich gelang es dem Forscher Friedenstein und seinem Team auf der Suche nach der Existenz von Vorläuferzellen für Knochen und fibröses Gewebe im Knochenmark der Nachweis von Kolonie-bildenden Zellen bei der Maus [10]: Nach Aussaat von Knochenmarkzellen in serumhaltigen Kulturen konnte er nach zweiwöchiger Kultur Kolonien adhärenter, nicht phagozytierender Zellen von fibroblastischer Erscheinung erkennen. Die Ursprungszelle dieser Kolonien nannte er colony-forming unit-fibroblasts (CFU-f). Desweiteren zeigte er in folgenden Arbeiten, dass manche dieser Kolonien imstande waren, eine Umgebung für die Ansiedelung von hämatopoetischen Stammzellen (hSC) zu schaffen und damit die Möglichkeit zur Hämatopoese gegeben war [11]. In den 80ern und 90ern konnte dann in Versuchen die Multipotenz dieser CFU-s nachgewiesen werden: In Differenzierungsversuchen wurde erfolgreich Adipogenese, Osteogenese und Chondrogenese induziert [9, 12-13]. Auch die Bildung von Myoblasten wurde beobachtet [14]. 1999 gelang Pittenger der Nachweis von multipotenten Zellen mit osteogenem, adipogenem und chondro-

1. Einleitung

genen Differenzierungspotential im menschlichen Knochenmark [15]. Bei der Analyse der membranösen Antigene fand er spezifische endotheliale und hämatopoetische Marker [15]. In späteren Studien wurde allerdings der deutliche Unterschied der Zellpopulation von der hämatopoetischen und endothelialen Zelllinie gezeigt [16]. Die Vielseitigkeit dieser Zellpopulation zeigt sich auch in der Namensgebung: Friedenstein benutzte den Begriff „*osteogenic stem cell*“ [12], Maureen Owen nannte sie „*marrow stromal stem cell*“, um die Fähigkeit zu beschreiben, in Langzeitkultur Bindegewebe zu bilden [17]. Zum ersten Mal verwendet wurde der Begriff „*mesenchymal stem cell*“ 1991 von Caplan [13], welcher auch bis heute Bestand hat. Auch der Ausdruck „*skeletal stem cell*“ ist in der Literatur beschrieben, um das Potential der Zellen zu unterstreichen, zu Komponenten des Skelettsystems zu differenzieren [18]. Aber der Begriff Stammzelle ist nicht ganz unumstritten, so dass auch die Bezeichnungen „*mesenchymal progenitor cell*“ [19] und „*multipotent mesenchymal stromal cell*“ [20] im Umlauf sind.

1.2. Eigenschaften und Ursprung der MSCs

Mesenchymale Stammzellen entwickeln sich aus dem Mesoderm [11]. Sie sind heterogene, undifferenzierte, sich selbst erneuernde Zellen mit drei großen Eigenschaften: Multipotenz, Immunmodulation und Ausbildung einer Stroma-Komponente [11]. Sie besitzen die Fähigkeit über einen langen Zeitraum identische Tochterzellen zu bilden oder auf einen bestimmten Reiz hin entsprechende Differenzierungslinien einzuschlagen. Auch können sie nicht nur ortsansässig aktiv werden, z.B. im Sinne einer Regeneration verletzten Gewebes [21], sondern auch von ihrem Ursprungsort aus emigrieren und im peripheren Blut zirkulieren [22]. MSCs lassen sich zum einen aus dem Knochenmark [23], dem Nabelschnurblut [24] und dem peripheren Blut [25] isolieren, Gewebe-abhängige MSCs finden unter anderem in Fettgewebe (*Adipose-derived MSC - AMSC*) [26]. Pittenger geht allerdings davon aus, dass lediglich 0,001 bis 0,01% der aus dem Mark isolierten Zellen Stammzellcharakter besitzen [15]. Desweiteren sind Zellen mit trilinearem Differenzierungspotential (adipogen, osteogen, chondrogen) unter bestimmten Kulturbedingungen in Knorpel- und Muskelgewebe entdeckt worden [27-28]. Mögliche weitere Lokalisationen sind Sehnen [29], Ge-

1. Einleitung

fäßschichten [30] sowie die Zahnpulpa [31] als auch diverses embryonales sowie fetales Gewebe [32].

Neben den Zellen mit mesodermen Ursprung sind auch Subpopulationen bei den MSCs entdeckt worden, welche auch andere Keimblätter als Ausgang haben. 2008 identifizierte Nagoshi und sein Team MSCs im Knochenmark mit neuroektodermaler Herkunft [33]. Eine weitere Untergruppe besitzt pluripotente Eigenschaften, beurteilt aufgrund ihres Differenzierungsverhaltens sowie Expressionsmusters. Diese Zellen, welche auch multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC) genannt werden, zeigen die Fähigkeit, mesodermale, neuroektodermale und endodermale Linien einzuschlagen [34].

1.3. Differenzierungsverhalten der MSCs

Im Rahmen ihrer Multipotenz differenzieren die mesenchymalen Stammzellen unter definierten Bedingungen ihrer Umgebung osteogen, adipogen und chondrogen [15]. Auch in glatte Gefäßmuskelzellen können sie sich entwickeln [35]. Genanalysen der undifferenzierten Stammzellen haben in diesem Zusammenhang den Begriff des „Lineage priming“ geprägt. Dieser beschreibt die Tatsache, dass die undifferenzierten Stammzellen verschiedene Untergruppen von Genen der Zelllinien exprimieren, in welche sie differenzieren können [36].

Vereinzelt ist auch die Bildung von Tenozyten bei in-vivo Studien beobachtet worden [37]. Desweiteren finden sich in der Literatur Berichte über die erfolgreiche Differenzierung von MSCs zu Endothelzellen [38], Skelett- und Herzmuskelzellen [14], Neuronen [39] sowie Hepatozyten [40] und Epithelzellen [41]. Der Weg der Differenzierung von der Stamm- zur Effektorzelle ist dabei noch nicht vollständig untersucht (vgl. Abb. 1).

1. Einleitung

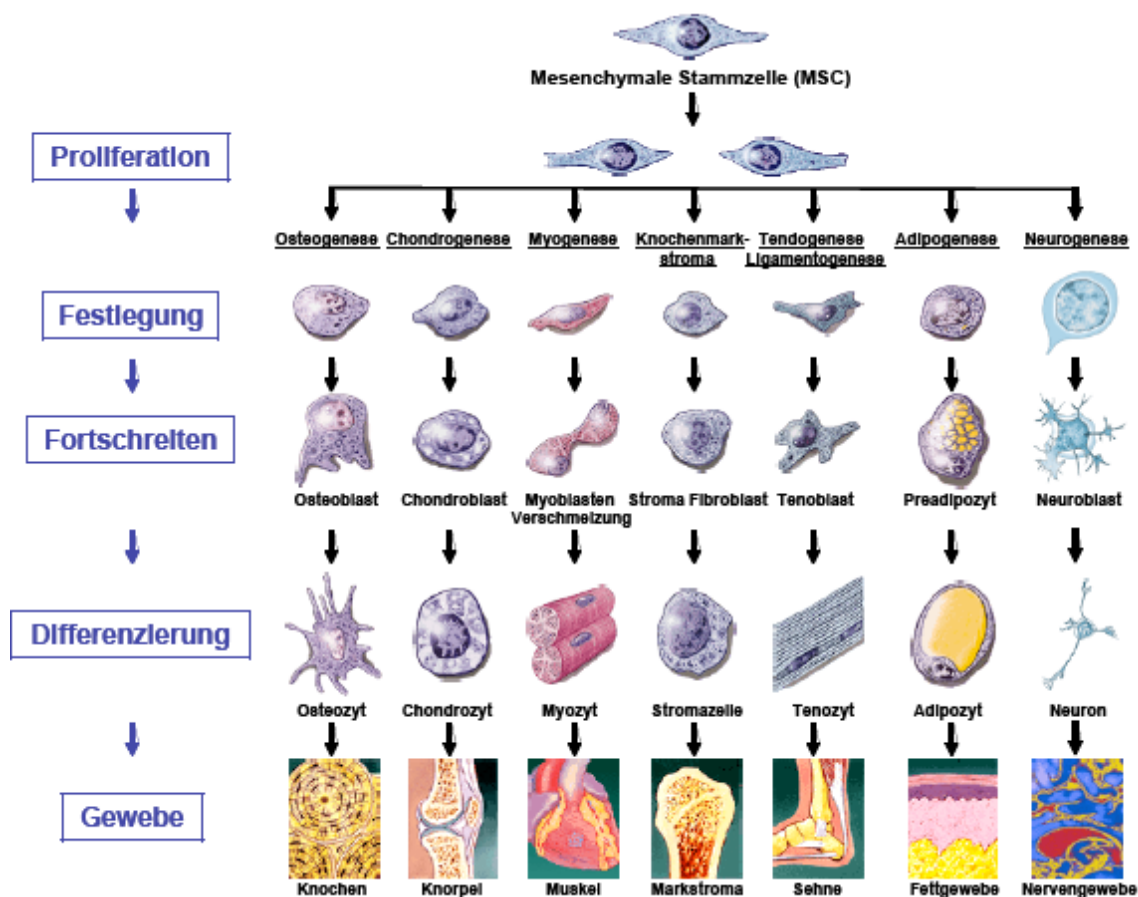


Abbildung 1 Darstellung der unterschiedlichen Differenzierungslinien von mesenchymalen Stammzellen: Sichtbar werden auch die einzelnen Entwicklungsschritte der Zellen; es handelt sich um ein vereinfachtes Schema [3].

Um das Differenzierungsverhalten und die Regulation der MSC-Zellpopulation zu untersuchen, sind schon eine Reihe von Arbeiten durchgeführt worden. Unter anderem ist 2000 bei in vitro Versuchen von Muraglia festgestellt worden, dass von einer MSC-Zellkultur nur ein Drittel die Fähigkeit hat unter Standardmedium-Bedingungen den Weg der Adipogenese, Osteogenese oder Chondrogenese einzuschlagen. Bei den verbleibenden Zellen wurde ein bipotentes (osteo-chondrogen) oder unipotentes Differenzierungspotential (adipogen, osteogen, chondrogen) beobachtet [42]. Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich die Hypothese, dass in der untersuchten Zellpopulation bereits prädestinierte Zellen vorhanden waren. Auch Baksh bestätigte 2004 diese Erkenntnisse und entwickelte ein Modell, welches das Differenzierungspotential und die Hierarchie der Zellpopulationen versucht darzustellen. Dabei werden zwei Kompartimente unterschieden: das *stem cell compartment*, in welchem die transkriptionale Modifizierung stattfindet, und das *committed cell*

1. Einleitung

compartment, in dem die phänotypische Entwicklung vonstatten geht. In Ruhe amplifiziert sich die mesenchymale Stammzelle und bildet identische Vorläuferzellen mit dem gleichen Erneuerungs- und Differenzierungspotential. Auf einen Reiz hin kommt es zur asymmetrischen Teilung der Zelle: Es entsteht zum einen ein identischer multipotenter Zellklon und zum anderen eine ebenfalls multipotente Vorläuferzelle. Diese teilt sich nun symmetrisch, wobei sie einen Teil ihrer Vielseitigkeit einbüßt und präterminierte tripotente sowie bipotente Zellen entstehen. Nun erfolgt der weitere Differenzierungsweg auf Ebene des committed cell compartments. Durch weitere symmetrische Teilungen entwickeln sie sich zu unipotenten Zellen, welche letztlich als vollständig differenzierte Effektorzellen sich nicht nur im Phänotyp, sondern auch in ihrer Funktion und Genexpression von den MSCs unterscheiden (vgl. Abb. 2).

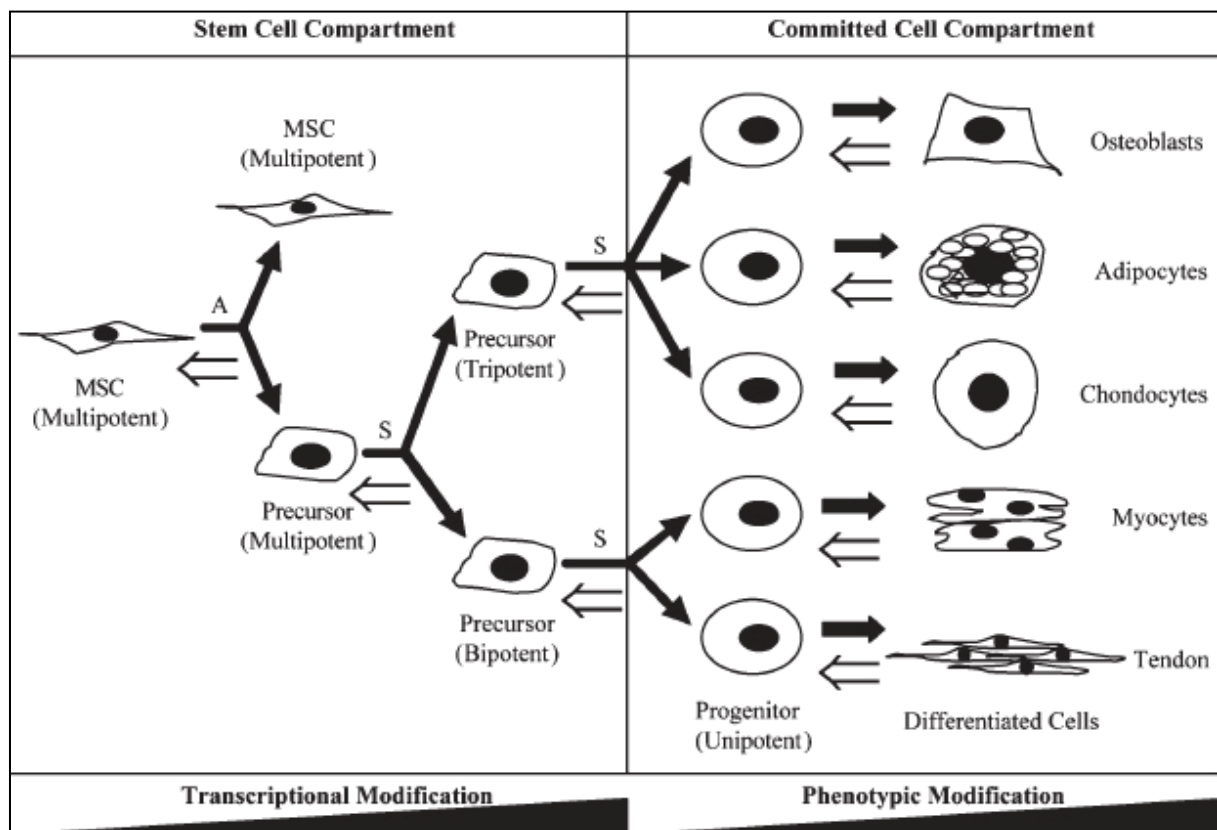


Abbildung 2 Modell zur Darstellung der Differenzierung von MSCs [2]

Desweiteren ist es ebenfalls möglich, dass bereits differenzierte Zellen wieder zu multipotenten Zellen dedifferenzieren [43]. Auch ist ein Wechsel einer bereits präterminierten Zelle von ihrer ursprünglichen Linie in eine andere innerhalb des mesenchymalen Systems möglich, beispielsweise von der adipogenen in die osteo-

1. Einleitung

gene Linie. Besonders interessant ist dabei auch im Rahmen des tissue engineering der shift von hypertrophem Chondrozyt zum Osteoblasten [36].

MSCs haben zwar ein Erneuerungspotential, allerdings sind sie nicht unsterblich. In Langzeit-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass humane MSCs ihr trilineares Differenzierungspotential mit steigenden Zellteilungszyklen verlieren. Zunächst bleibt das adipogene Potential auf der Strecke, bis schließlich nach Verlust der chondrogenen Differenzierungsmöglichkeit nur noch die osteogene Linie eingeschlagen werden kann. Dies Unipotential wurde bis zum 40. Zellzyklus nachgewiesen [44]. Spätestens dann gingen die Zellen in Richtung Seneszenz.

1.6. Osteogenese der MSCs

Damit humane mesenchymale Stammzellen osteogen differenzieren, müssen gewisse Stimuli vorhanden sein. Im Rahmen von in-vitro Versuchen sind drei wesentliche Faktoren identifiziert worden, welche für die in-vitro Knochenbildung von hMSC Grundvoraussetzung sind: Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure [15].

Der prinzipielle Ablauf der Knochenbildung durch desmale und chondrale Ossifikation ist zwar schon verstanden, die zugrundeliegenden Mechanismen der einzelnen Signalwege sowie der Transkriptionsnetzwerke der Osteogenese sind bisher nur teilweise erforscht. Zwei an der Knochenbildung besonders beteiligte Transkriptionsfaktoren sind runX2/cbfa1 und osterix. Runx2 gilt als frühester detektierbarer Marker der Osteoblastendifferenzierung sowie der beginnenden Ossifikation bei der enchondralen Knochenbildung [45]. Die Aktivierung kann über mehrere Signalwege ablaufen: Neben mechanischer Stimulation über extrazelluläre Matrix spielen unter anderem FGF, PTH und BMPs eine Rolle [46], (vgl. Abb. 3, 4). Die Im Laufe des Differenzierungsprozesses übt runx2 allerdings einen inhibierenden Effekt auf die Osteoblasten aus, so dass diese unreif bleiben. Erst eine Suppression dieses Transkriptionsfaktors lässt die Zellen zu reifen Osteoblasten werden [45].

1. Einleitung

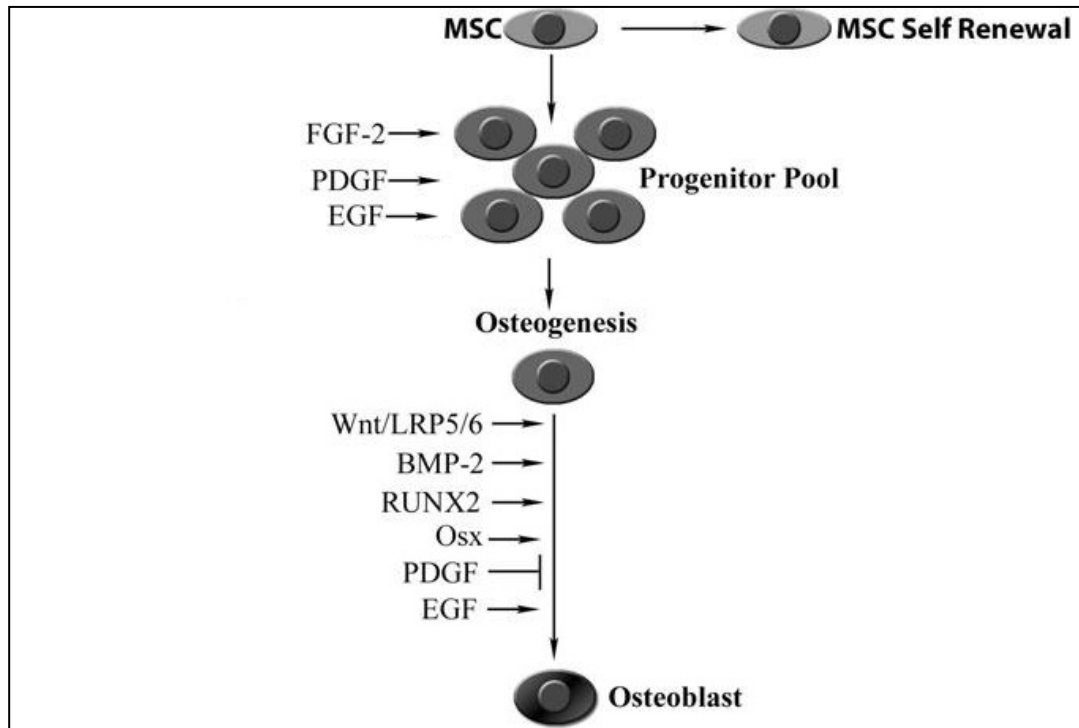


Abbildung 3 Schematische Darstellung der die Osteogenese beeinflussenden Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren (BMP-2, bone morphogenetic protein-2; EGF, epidermal growth factor; FGF-2, fibroblast growth factor-2; LRP5/6, low-density lipoprotein receptor-related protein-5/6; Osx, Osterix; PDGF, platelet-derived growth factor; RUNX2, runt-related transcription factor-2; TGF- β , transforming growth factor- β); modifiziert von [47]

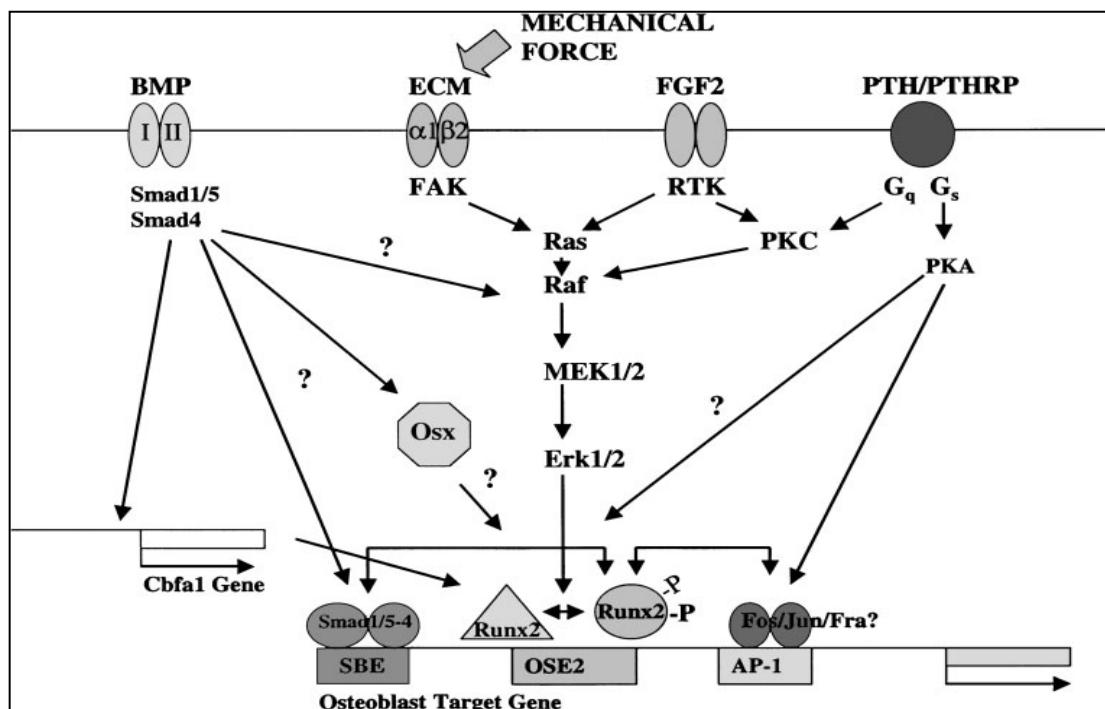


Abbildung 4 Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege und deren Zusammenhang mit runX2 im Rahmen der Osteogenese [46]

1. Einleitung

Als weiterer Osteogenesemarker dient das Gen für das Peptid osteocalcin. Seine Expression wird durch runx2 und Vitamin D3 induziert [48]. Es wird von Osteoblasten synthetisiert und ist somit ein Marker für spätere Differenzierungsstufen. Osteocalcin findet sich vorwiegend im Knochen und ist für die Bindung von Calcium im Knochen zuständig [49]. Desweiteren verhindert es eine überschießende Mineralisation des Knochens und ist so für die Homöostase des Knochenaufbaus verantwortlich. In osteocalcin-defizienten Mäusen kam es zu einer überschießenden Mineralisation und verminderten Bruchfestigkeit. Dies ist Kennzeichen der Osteopetrose. Auch kam es zu Veränderungen im Fettstoffwechsel: Es konnte eine vermehrte Akkumulation von viszeralem Fett und einer damit einhergehenden Insulinrestenz gezeigt werden [50]. Geringfügig lässt sich osteocalcin auch im peripheren Blut nachweisen: Ihm werden Blutzucker-senkende und Fettabbau-fördernde Wirkung zugeschrieben.

Das Gen osterix spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle. In osterix-defizienten Mäusen konnte keine Knochenbildung nachgewiesen werden. Die genaue Rolle von osterix und seine eventuelle Interaktion mit runx2 ist bisher nicht beschrieben [51].

Einen Überblick über die Einzelnen Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Signalwege geben Abbildung 3 und 4.

Die Osteoblasten-Entwicklung und der damit verbundene Knochenbildungsprozess läuft in drei Phasen ab: Zellproliferation, Matrixreifung und Mineralisation [52]. Im Rahmen von Differenzierungsversuchen konnte Owen 1990 ein Model entwickeln, welches die Entwicklungsphasen im Zusammenhang mit den Genexpressionsmustern darstellt:

1. Einleitung

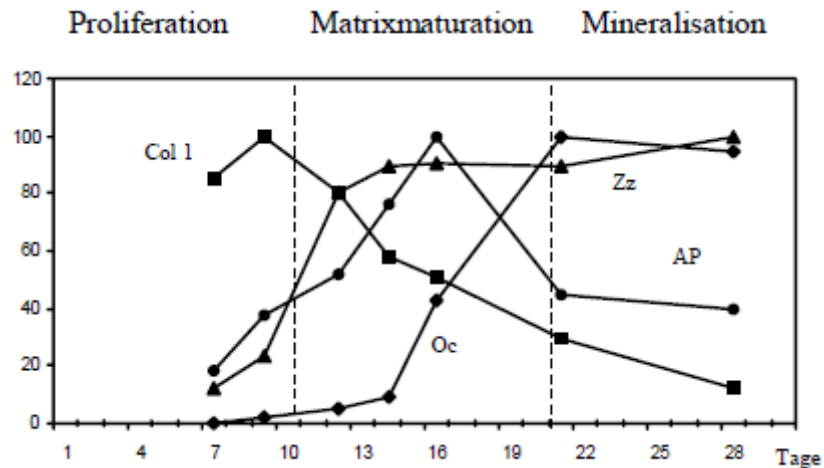


Abbildung 5 Ablauf der Proliferation und Differenzierung von Kulturen primärer Rattenosteoblasten und Darstellung der Genexpression osteoblasten-charakteristischer Proteine nach Owen. Abkürzungen: Col1: Kollagen 1, Oc: Osteocalcin, Zz: Zellzahl, AP: alkalische Phosphatase; die gestrichelten Linien stellen jeweils die Grenzen der jeweiligen Reifungsabschnitte dar [52]

1.7. Adipogenese der MSCs

Damit eine mesenchymale Stammzelle den Weg der Adipogenese (vgl. Abb. 6) einschlägt, sind bestimmte Wachstumsfaktoren nötig, um eine in-vitro-Adipogenese zu induzieren.

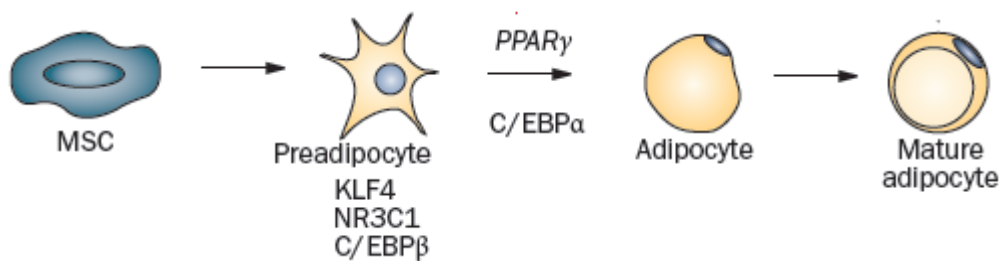


Abbildung 6 Adipogenese der MSCs und die schematische Darstellung der beteiligten Signalwege und Transkriptionsfaktoren; Abk.: KLF4 (Krüppel-like factor), NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1, PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor γ), C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein) [4]

Es werden als Induktoren zu einem Basalmedium Dexamethason, Insulin, IBMX und Indomethacin hinzugegeben [15]. Adipogenese konnte aber auch schon unter dem Zusatz von Dexamethason und Serum induziert werden [53-54]. Eine besonders wichtige Rolle im Rahmen der Differenzierung nehmen der Transkriptionsfaktor PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor) und das Enzym LPL (lipoprotein lipase) ein.

1. Einleitung

1.7.1. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR γ)

PPAR γ ist eine Subfamilie von intrazellulären Hormonrezeptoren, von welchem zwei Isoformen bekannt sind (PPAR γ 1 und -2) [55]. PPAR γ ist ein früher Marker der Adipogenese und führt zur Expression von Proteinen, welche für die Induktion und Aufrechterhaltung der Adipogenese wichtig sind [56-57], unter anderem LPL und adipocyte fatty acid protein (aP2) [58]. Dabei ist die Transkriptionsaktivität von PPAR γ abhängig zum einen von verschiedenen modifizierenden Co-Faktoren [59]. Desweiteren ist das Ausmaß der Transkription abhängig von der Interaktion mit anderen intrazellulären Signalwegen [60] (vgl. Abb. 7).

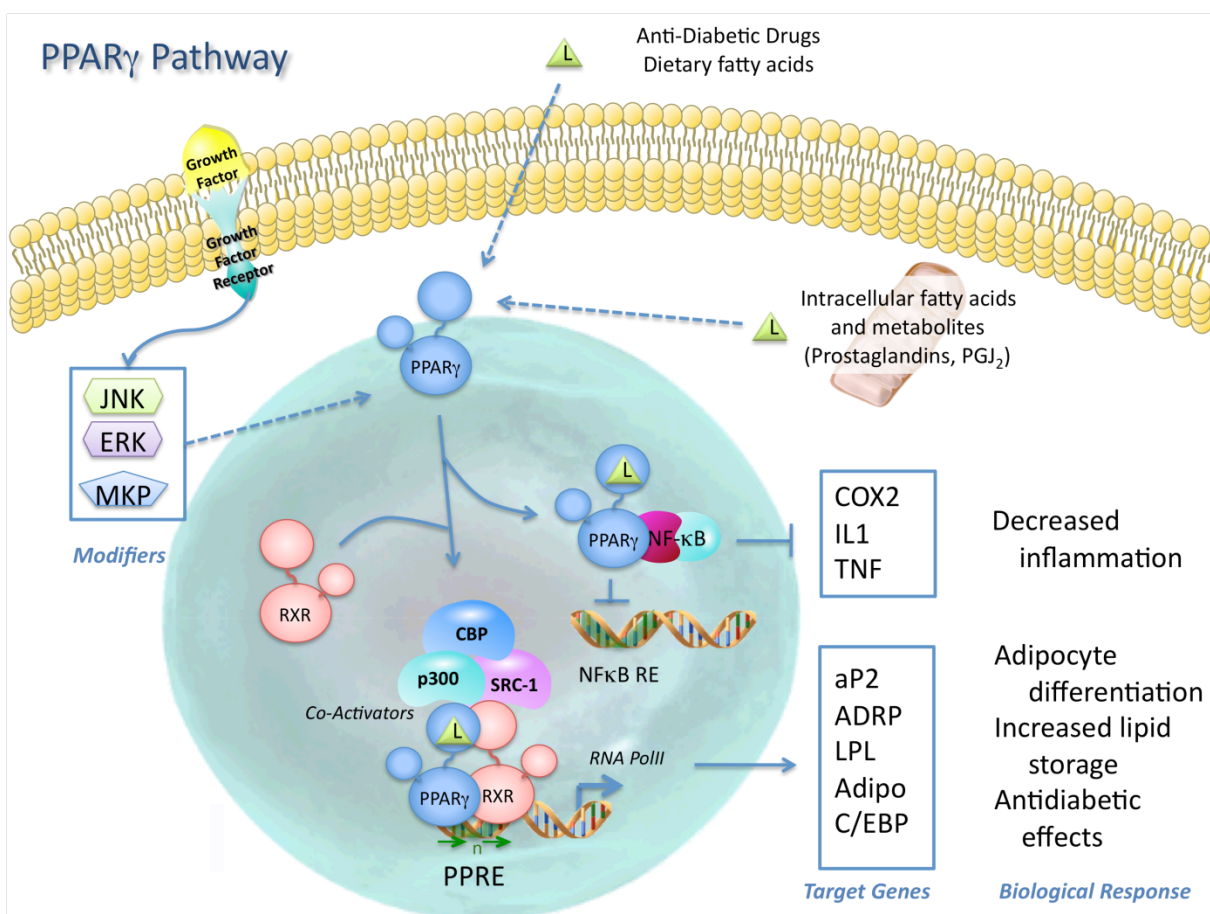


Abbildung 7 PPAR γ -pathway [1]

Neben seiner Rolle im Fettstoffwechsel besteht bei Expression von PPAR γ auch eine Wechselwirkung mit der Osteogenese: durch PPAR γ 2-Aktivierung wird die Adipogenese gefördert und die Osteogenese gehemmt [61]. Desweiteren werden hämatopoetische Stammzellen dazu veranlasst, zu Osteoklasten zu differenzieren. Es kommt

1. Einleitung

insgesamt zu einer vermehrten Adipogenese und einem erhöhten Knochenabbau, dargestellt in Abbildung 8 [62].

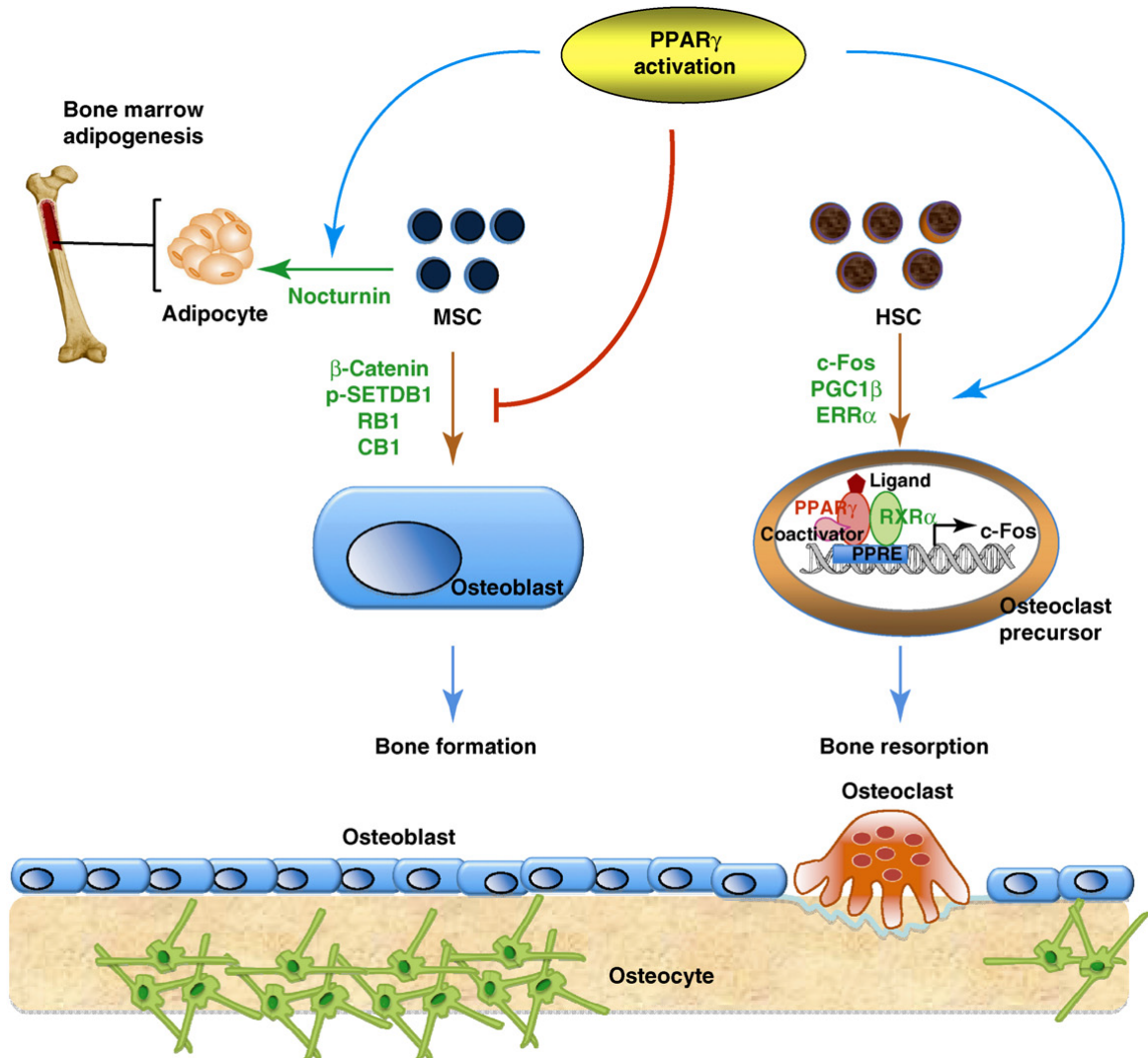


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Einflusses von PPAR γ auf die Regulation der Knochenzell-Differenzierung und Skelett-Homöostase: PPAR γ -Aktivierung bewirkt eine Differenzierung von HSCs in Osteoklasten mit konsekutivem Anstieg der Knochenresorption. Außerdem kommt es zu einer Hemmung der Osteogenese. Desweiteren kommt es zu einer Stimulierung der Adipogenese. Es resultiert eine zunehmender Verlust an Knochenmasse mit Zunahme der Adipogenese [62]

Auch lässt sich eine vermehrte Expression des Markers im Rahmen der Transdifferenzierung von Osteoblasten zu Adipocyten messen (vgl. 1.3.) [63].

1.7.2. Lipoproteinlipase (LPL)

Die Lipoproteinlipase (LPL) ist ein Enzym, welches die Hydrolyse von Lipoproteinen zu Triacylglyceriden und Lipoproteinen katalysiert. Seine Expression beginnt ebenfalls zu Beginn der Adipogenese. Dabei sind als Induktor der Expression die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und Glucocorticoide detektiert worden [64]. Analog zu PPAR γ ist ebenfalls eine Hochregulierung bei der LPL-Genexpression im Zusammenhang mit der Transdifferenzierung von Osteoblasten zu Adipocyten nachzuweisen [63].

1.8. Die Transdifferenzierung von humanen MSCs

Mesenchymale Stammzellen haben die Fähigkeit, in unterschiedliche Zelllinien zu differenzieren (vgl. 1.3.). Dabei entwickelt sich aus einer pluripotenten Stammzelle eine terminale differenzierte Effektorzelle entlang bestimmter Entwicklungsstufen. Neben dieser Fähigkeit ist allerdings auch eine Transdifferenzierung möglich: in verschiedenen Studien ist der Beweis erbracht worden, dass terminal differenzierte Zelltypen (z.B. Osteocalcin-synthetisierende Osteoblasten) den Phänotyp einer anderen (z.B. Adipozyten mit Lipidvakuolen) annehmen können, was sich auch durch entsprechende Genexpressions- und Enzymanalysen bestätigen lässt [4, 65]. Im Jahre 2004 veröffentlichte Versuche von Song und Tuan konnten zeigen, dass hMSCs nach ihrer Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten die beiden jeweiligen anderen Phänotypen ausbilden konnten, nachdem sie den entsprechenden Differenzierungsmedien ausgesetzt wurden [43].

1.9. Die Rolle der Transdifferenzierung im Zusammenhang mit der Osteoporose

Der Knochenstoffwechsel ist ein fein abgestimmtes Konstrukt. Eine Vielzahl von Faktoren nimmt Einfluss auf die Regulation des Gleichgewichts zwischen Knochenauf- und -abbau (vgl. Abb. 9)

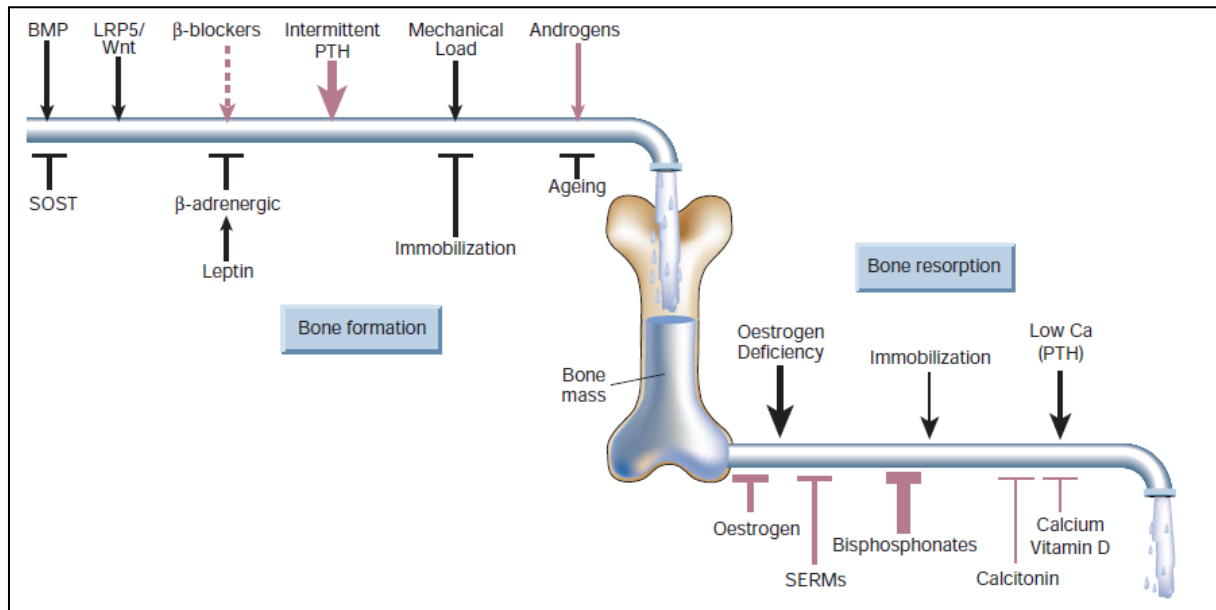


Abbildung 9 Skeletale Homöostase: Schematische Darstellung der physiologischen (schwarz) und pharmakologischen (rot) Einflussfaktoren; Relative Wichtigkeit dargestellt durch Dicke der Pfeile. durchgezogene Linien stellen aktuelle Therapieoptionen dar, gepunktete mögliche Interventionsformen. Abkürzungen: BMP: Bone morphogenetic protein; SOST: sclerostin; LRP5: low-density Lipoprotein (LDL)-receptor-related protein 5; PTH: Parathormon; SERM: selective oestrogen-receptor modulator [66]

Bei alternden und osteoporotischem Knochen ist dieses Verhältnis gestört, die Knochenmasse nimmt stetig ab. Im Gegensatz dazu nimmt der Anteil an Fettgewebe im Knochen zu, es liegt also eine inverse Beziehung zwischen Osteogenese und Adipogenese vor. Ähnliche Erkenntnisse konnten bereits vereinzelt in Zellkulturen gezeigt werden [67-68]. Verdeutlicht zeigt das die schematische Darstellung in Abbildung 10. Auch eine Ovariectomie und der damit verbundene Östrogenmangel [69], Immobilisation [70] oder Glucocorticoidtherapie [71] führen zu einem Verlust an Knochensubstanz.

1. Einleitung

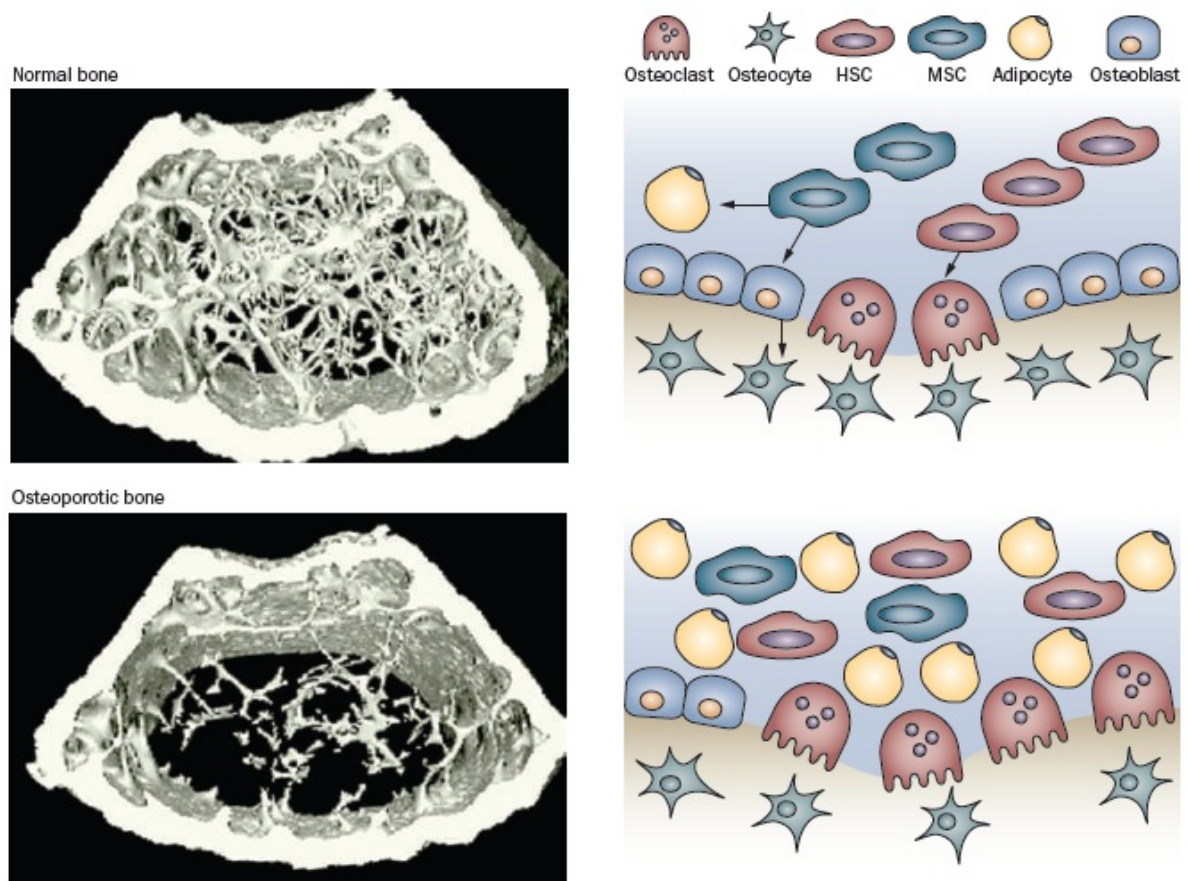


Abbildung 10 Darstellung der vermehrten Adipogenese in gealterten oder osteoporotischen Knochen [4]

Aufgrund dieser Tatsache wird in aktuellen Studien versucht, auf diese Beobachtung einzugehen und die Mechanismen zu untersuchen, welche die Stammzelle letztlich dazu bewegt, sich für eine Zelllinie zu entscheiden oder dazu führt, dass eine bereits eingeschlagene Differenzierungsrichtung verlassen wird. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem PPAR γ - und wnt-Signalweg: Die pharmakologische Stimulierung des Adipogenese-induzierenden Hormonrezeptors PPAR γ durch Thiazolidindione führte zu einer deutlichen Steigerung der Adipogenese auf Kosten der Osteogenese [72]. Ebenso stimulierend wirken langkettige Fettsäuren [65]. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Aktivierung des wnt-Signalweges eine Inhibition der Adipogenese zugunsten der Osteogenese [4] (vgl. Abbildung 11).

1. Einleitung

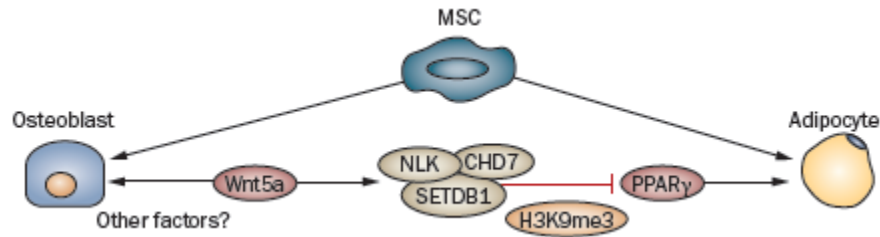


Abbildung 11 Der wnt-Ligand wnt5a hemmt die PPAR γ -induzierte Adipogenese und fördert somit die osteogene Differenzierung: Durch Aktivierung von NLK durch wnt5a wird SETDB1 phosphoryliert. Nun kommt es zur Komplexbildung zwischen NLK, CHD7, SETDB1 und PPAR γ und damit zur Hemmung der Adipogenese [4]

Aus diesen Erkenntnissen heraus resultiert die Hoffnung, in diese Signalwege pharmakologisch einzugreifen, um im Bereich des tissue engineering weitere Fortschritte zu machen. Ein vollständiges Verständnis der Mechanismen der Transdifferenzierung ist allerdings noch nicht vorhanden.

1.10. Östrogen

1.10.1. Biochemie des Sexualhormons

Das Steroidhormon Östrogen wird bei der Frau zum großen Teil in den Ovarien aus Cholesterin gebildet. Zwischenstufe sind dabei Androgene. Ein kleiner Teil wird auch in der Nebennierenrinde und im Fettgewebe synthetisiert. Auch im männlichen Organismus findet sich Östrogen: es hat seinen Ursprung ebenfalls in der Nebennierenrinde, auch in Hoden und Fettgewebe entstehen weibliche Geschlechtshormone mit Hilfe des Enzyms Aromatase.

Einen Teil seiner Effekte vermittelt das lipophile Hormon auf dem genomischen/klassischen Weg über die beiden intrazellulären Östrogenrezeptoren ER α und β [73]: Im inaktiven Status sind die Rezeptoren an Hitzeschock-Proteine gebunden. Durch Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung. Die Chaperone lösen sich und der Hormon-Rezeptor-Komplex diffundiert in den Nukleolus. Nach Dimerisierung kommt es zur Bindung an spezifische Promotorstellen auf der DNA oder Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und so zur anschließender Genexpression [74]. Dieser Vorgang dauert etwa 30-45 Minuten. Bis ausreichende Mengen an Proteinen synthetisiert sind, dauert es mehrere Stunden [75]. 1998 wurde dann zusätzlich zu den aktivierenden Rezeptoren ER α und β eine mögliche Splice-

1. Einleitung

Form des ER β bei Ratten entdeckt: bei Stimulation des Rezeptors mit Östrogen konnte keine Östrogen-abhängige Genexpression gemessen werden [76-77].

Es sind allerdings auch Wirkungen von Steroidhormonen bekannt, welche innerhalb von Sekunden oder Minuten eintreten [78]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Hormonwirkung auch über oberflächengebundene Proteine und intrazelluläre Signalkaskaden ablaufen muss. Schon 1977 wurden Östrogen-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endometriumzellen entdeckt [79]. Ende des letzten Jahrhunderts schließlich konnte auch ein Nicht-Steroid-Rezeptor als membrangebundene Bindungsstellen für Östrogen detektiert werden [80]. Dieser zur Familie der G-Proteine gehörige Rezeptor ist intrazellulär mit MAP-Kinasen assoziiert [81](vgl. Abb. 12).

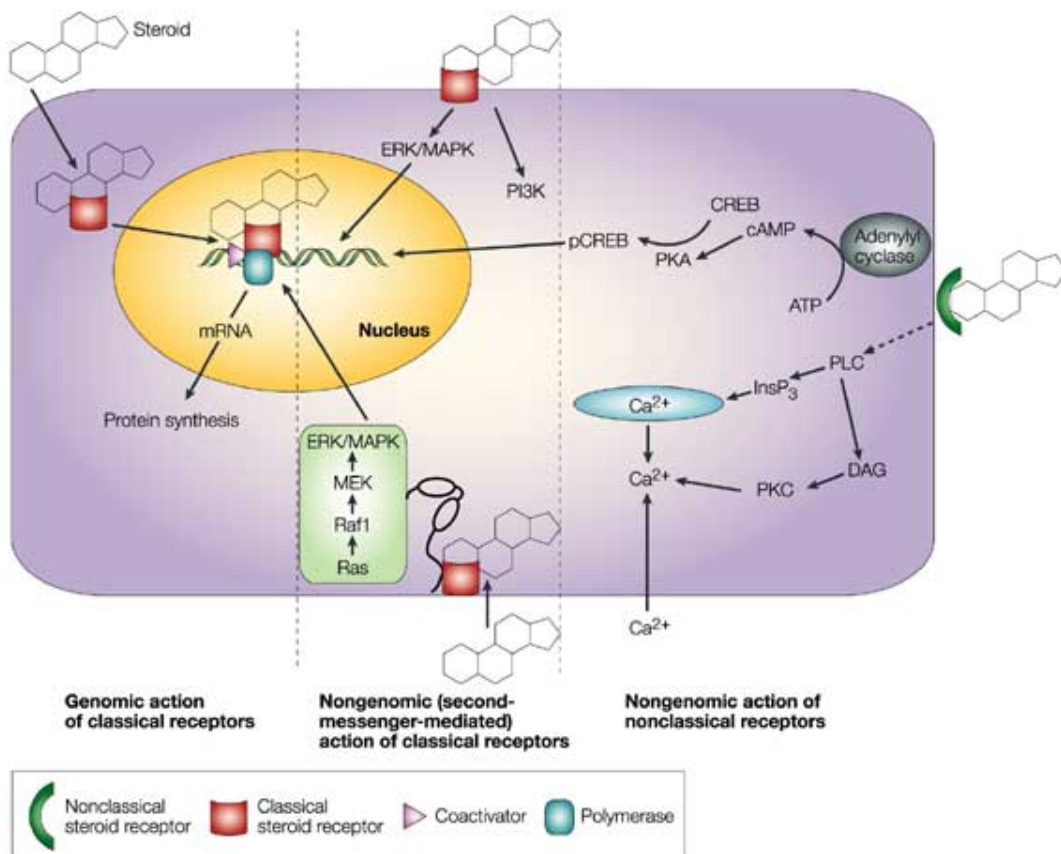


Abbildung 12 Schematische Darstellung der Signalwege der Steroidhormone [82]

1.10.2. Wirkung von Östrogen auf die Osteogenese/Knochenwachstum

Östrogen ist ein wichtiger Bestandteil des Knochenstoffwechsels: das Sexualhormon hat einen stimulatorischen Effekt auf die enchondrale Knochenbildung und ist für den Epiphysenschluss am Ende der Pubertät verantwortlich [83-85]. Diese Wirkung wird auf die Aktivierung des ER α zurückgeführt. Das periostale Wachstum ist nicht nur von Östrogen, sondern auch von Androgenen abhängig: Östrogen hat hier einen inhibitorischen Effekt, vermittelt über eine Stimulierung des ER β , wohingegen dem männlichen Geschlechtshormon die fördernde Wirkung nachgesagt wird [86].

Eine weitere Eigenschaft von Östrogen ist ein antiresorptiver Effekt auf die Osteoklasten: Durch die direkte und indirekte Wirkung des Hormons über Beeinflussung der Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt es zu einer Reduzierung der Anzahl und Aktivität der Osteoklasten. Außerdem wird die Apoptoserate der Osteoklasten erniedrigt [87-88] (vgl. Abb. 13).

Dieser Zusammenhang der Homöostase von Knochenauf- und -abbau mit dem Vorhandensein von Sexualhormonen hat die Konsequenz, dass bei postmenopausalen Frauen und hypogonadalen Männern aufgrund der Hormondefizienz ein Anstieg der Aktivität und Anzahl der Osteoblasten und Osteoklasten zu vermerken ist mit Vorteil auf Seiten der Osteoklasten. Dies resultiert in einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten des Knochenabbaus. Dies führt letztlich zu einem Verlust an Knochenmasse und -dichte [73].

Dieses Missverhältnis führt anatomisch zu einer geringeren periostalen Bildung neben einer erhöhten endokortikalen Resorption [89-90]. Die Knochenstruktur wird folglich verändert, wodurch Unterbrechungen im trabekulären Aufbau des Knochens entstehen. Insgesamt kommt es zu einem Verlust an Knochenmasse [91]. Dies führt zum Krankheitsbild der Osteoporose.

Um diesen Phänomenen entgegenzuwirken, werden als Therapie der postmenopausalen Osteoporose nicht-Steroidale Estrogen-Rezeptor-Modulatoren verwendet. Diese haben einen agonistischen Effekt an ER α und ER β und können so die knochenprotektive Wirkung des Östrogens ersetzen.

1. Einleitung

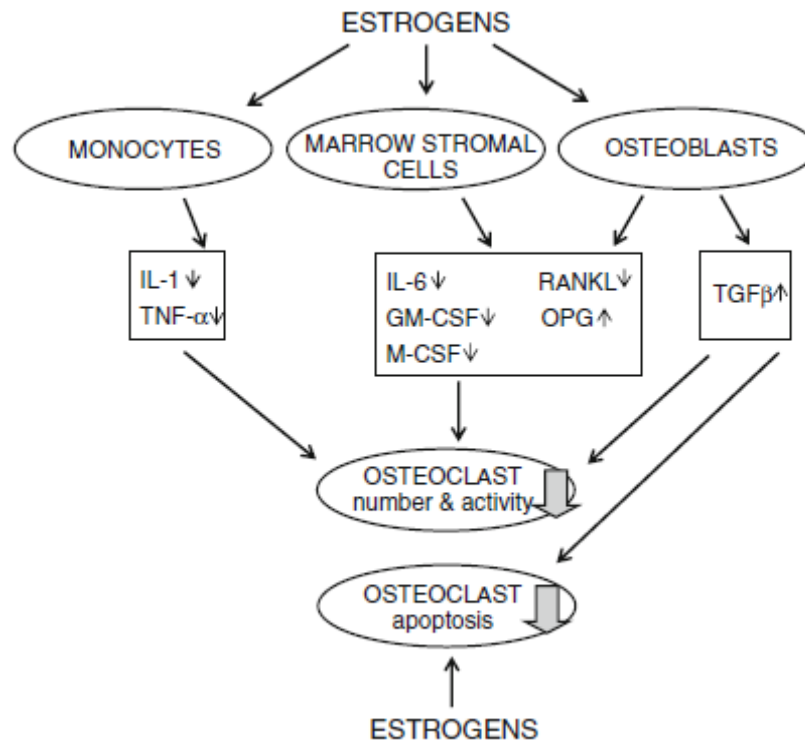


Abbildung 13 Schematische Darstellung der antiresorptiven Wirkung von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel [73]

Der Einfluss von Östrogen auf die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in rein osteogenen Differenzierungskulturen ist vor diesem Hintergrund bereits untersucht worden: die Zugabe von Östrogen bewirkte eine deutliche Steigerung der Osteogenese, gemessen an der Calcium-Deposition und der Expression der alkalischen Phosphatase. Dabei wurden allerdings deutliche interindividuelle Unterschiede im Bezug auf das Ausmaß der Reaktion gemessen. Dies wurde auf den im Bereich der Östrogenrezeptoren vorkommenden Polymorphismus zurückgeführt [92].

1.10.3. Wirkung von Östrogen auf die Adipogenese

Das Östrogen-Rezeptoren in der Adipogenese eine Rolle spielen, konnte in Versuchen von Nobuhiro et al. gezeigt werden: Nach Induktion von Adipogenese bei prä-differenzierten murinen Adipozyten kam es zu einer deutlichen Up-Regulation des Estrogen-related receptors α und vermehrter Expression adipogener Marker nach

1.11. Fragestellung

Stimulation mit Östrogen [93]. Dieser stimulierende Effekt wurde ebenfalls in Versuchen von Hong mit hMSCs 2007 bestätigt [94].

Bei Addition von 17- β -Östradiol zu 3T3-L1 differenzierten Adipozyten zeigte sich allerdings ein inhibitorischer Effekt: Behandlung von der Zellen mit dem Sexualhormon führte zu einer Downregulation der adipogenen Genexpression, zu einer Reduktion der Fettmasse und der Größe der Adipozyten [95].

Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen den Bedarf weiterer Klärung der der Adipogenese zugrundeliegenden Mechanismen.

1.11. Fragestellung

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines in-vitro-Models, in welchem eine parallele Adipo-und Osteogenese stattfindet. So sollte die Voraussetzung geschaffen werden, um in einem zweiten Schritt die Beeinflussung der Differenzierung der beiden Zelllinien durch Faktoren zu untersuchen.

Dazu wurde dann an dem entwickelten Model der Einfluss von 17- β -Östradiol auf die Differenzierungsrichtung untersucht. Die Analyse erfolgte histologisch, biochemisch und molekularbiologisch mittels Analyse der Genexpression.

2. Material

2.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Brutschrank	HERAcell 240	Heraeus, Hanau
Filter	Sterilfilter 40 µm	Falcon, Heidelberg
Gefäße	Zellkulturflaschen 75 cm²	Sarstedt, Newton, NC
	Falkon 15 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	Falkon 50 ml Röhrchen	Falcon, Heidelberg
	24-Well-Platten	Sarsted, Nümbrecht
	96-well-Platten	Kisker, Steinfurt
Kryobehälter	Arpege 170	Air Liquide
	Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Heizofen	Heraeus function line	Heraeus, Hanau
Kühlschrank	Premium	Liebherr
LightCycler (RealTimePCR)	PCR	Stratagen, Kirkland
Mikroskop	Fluovert, FU	Leitz
Mikroskopkamera	Eclipse, TE2000-U	Nikon
pH-Messgerät	Labor-pH-Meter 766	Knick, Berlin
Pipetten	Costar Stripette (5/10/25/50 ml)	Corning, Corning USA
	Pipettenspitzen epTips filter (10/100/1000µl)	Eppendorf, Hamburg
	SafeSeal-Tips (DNase-, RNase-, pyrogenfrei)	Biozym Diagnostic GmbH
Pipetten	Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
	Pipettierhilfe	Falcon, Heidelberg

2. Material

	Eppendorf Research (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reinraumwerkbank (Laminar Flow)	HeraSafe	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf comfort	Eppendorf, Hamburg
Tecan	Genios	Tecan, Austria
Ultraschallstab	UW2070	Bandelin, Berlin
Waage	Kern 770	Kern
Wärmeblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad		GFL, Hannover
Zellzählung	Neubauer-Zählkammer	Neubauer, Mariefeld
Zentrifugen	Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
	Vortex	Scientific Industries

2.2. Kits

DNA-free™ DNase-Kit	Ambion, Austin, USA
LightCycler FastStart DNA Master SYBER-Green II	Roche, Mannheim
PicoGreen dsDNA Quantification	Invitrogen, Carlsbad
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad

2. Material

2.3. Primer

Oligonukleotid	Sequenz	Hersteller
3'-Hprt	3'-CGAGATGTGATGAAGGAGATGG-5'	TIB MOLBIOL
5'-Hprt	5'-GCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC-3'	
3'-LPL	3'-CAAGAGAGAACCAGACTCCAATG-5'	TIB MOLBIOL
5'-LPL	5'-GGGCTCCAAGGCTGTATCC-3'	
3'-Osteocalcin	3'-AGGAGGGCAGCGAGGTAG-5'	TIB MOLBIOL
5'-Osteocalcin	5'-GAAAGCCGATGTGGTCAGC-3'	
3'-PPAR γ	3'-GTCGGTTTCAGAAATGCCTTGC-5'	TIB MOLBIOL
5'-PPAR γ	5'-GCCCTCGCCTTTGCTTTGG-3'	
3'-Runx2var3	3'-ATACCGAGTGACTTTAGGGATGC-5'	TIB MOLBIOL
5'-Runx2var3	5'-AGTGAGGGTGGAGGGAAGAAG-3'	

2.4. Chemikalien und Reagenzien

17- β -Östradiol	Sigma, Steinheim
2-Mercaptoethanol (5mM)	Sigma, Steinheim
Alizarin Red Farbstoff	Sigma, Steinheim
Ammoniumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ascorbinsäure	Sigma, Steinheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma, Steinheim

2. Material

Dexamethason	Sigma, Steinheim
Dihydroxyacetonphosphat (20 mM)	Sigma, Steinheim
DMSO	Sigma, Steinheim
dNTP	Roche, Mannheim
DPBS (pH 7,4)	PAA, Pasching, Austria
EDTA	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer
FCS	PAN, Aidenbach
Ficoll	Biochrom
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
HCl (37%)	Merck, Darmstadt
IBMX (Isobutylmethylxanthin)	Sigma, Steinheim
Insulin	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
MgCl	Sigma, Steinheim
NADH (12 mM)	Sigma, Steinheim
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
OBG (Octyl β-D-Glucopyranosid)	Sigma, Steinheim
Oil Red O Farbstoff	Sigma, Steinheim
Oligo(dt)	Roche, Mannheim

2. Material

Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen
p-Nitrophenyl phosphate, disodium	Sigma, Steinheim
RNAzol	Friendswood, Texas
β-Glycerophosphat	AppliChem, Darmstadt
TRIS-Acetat	Sigma, Steinheim
TRIS-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS-HCl	Merck-Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Steinheim
Trypsin	PAN, Aidenbach
Tyrodes-Salz	Sigma, Steinheim
Vitamin D3	Sigma, Steinheim
ZnCl	Sigma, Steinheim

2.5. Puffer und Lösungen

AP-Puffer	TRIS 1,5 M MgCl 5 mM ZnCl 1 Mm
DEPC H ₂ O	500 ml aqua bidest + 500 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)
Hepes-Puffer	Gibco, Karlsruhe
OBG-Puffer	10 mM TRIS pH 7,4 + 0,1 % OBG
Oil Red O Stammlösung	0,5 g Oil-Red-O Färbelösung 100 ml Isopropanol
PBS (pH 7,3)	150 mM NaCl

2. Material

	8 mM K_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4
Percoll-Lösung	Ficoll 22,05 ml 2,45 ml 1,5 M NaCl 10,50 ml Tyrodes-Lösung
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1,0 mM EDTA DEPC-Wasser
TRIS 0,2 M	24,228g Tris, 1000ml aqua.dest. (pH 7)
Tyrodes Lsg	9,73g Tyrodes Salz, 0,2g $NaHCO_3$, 10ml Streptomycin-Penicillin, 990ml H_2O
Z2-Puffer	50 mM TRIS-HCl, pH7,5 1 mM EDTA 1mM 2-Mercaptoethanol

2.6. Medien, Medienzusätze und Seren

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose	Gibco, Karlsruhe
Fetal Calf Serum	PAN, Aidenbach

Proliferationsmedium für MSCs (MSC-Medium):

DMEM Low Glucose + 10% FCS + 1% PenStrep + 1% Hepes-Puffer

Basalmedium für Differenzierung:

DMEM High Glucose + 10% FCS + 1% PenStrep

3. Methoden

2.7. Wachstumsfaktoren

Ascorbinsäure 20mM	0,1024 g Ascorbinsäure in 20 ml Tyrodes Lsg
Dexamethason Stock	0,00392 g Dexamethason in 10 ml 100% Ethanol
β-Glycerophosphat	1 M β-Glycerophosphat in PBS
Vitamin D3	10 µg Vitamin D3 in 240 µl EtOH (95%)
IBMX	In DMSO lösen (Konzentration Stock 0,5 M)
Insulin	20 ml H ₂ O (steril, filtriert) + 200 µl Essigsäure + 1 Tropfen HCl

3. Methoden

3.1. Zellkultur der humanen mesenchymalen Stammzellen

3.1.1. Zellisolation

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden durch Knochenmarkspunktion nach der Jamshidi-Methode von männlichen Spendern entnommen. Anschließend wurde das Knochenmarksaspirat mittels Percoll-Gradienten-Trennung aufgereinigt. Die dadurch erhaltene Fraktion von mononukleären Zellen mit einer Dichte von 1,077 g/ml wurde in serumhaltiges Medium aufgenommen. Die Qualität und die Anzahl der Zellen wurden durch die Bestimmung der Lebendzellzahl in der Neubauer-Zählkammer untersucht. Die isolierten mononukleären Zellen konnten nun mit einer Zellzahl von 2×10^6 auf eine 75 cm² Kulturflasche in 15 ml serumhaltigem MSC-Medium ausgesäht und in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ bebrütet werden. Durch ihre Fähigkeit zur Adhärenz an der Plastikoberfläche der Kulturflaschen kommt es nun zur Selektion der MSCs: die übrigen bei dem Percoll-Gradienten gewonnenen Zellen besitzen diese Fähigkeit nicht und werden durch die Medienwechsel entfernt. Der Medienwechsel wurde zweimal wöchentlich durchgeführt.

3.1.4. Amplifikation

Bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz (Zellbedeckung des Kulturflaschenbodens) wurde mittels Trypsin-Methode die Adhärenz der Zellen aufgehoben. Hierfür musste zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmalig mit sterilem PBS Puffer gespült werden. Zur Adhärenzlösung wurde nun 3 ml Trypsin/EDTA auf den Zellen verteilt und auf eine komplette Benetzung des Flaschenbodens geachtet. Nach 5 minütiger Inkubationszeit im Brutschrank und mehrmaliger Kontrolle der Zellen unter dem Invertmikroskop wurde bei vollständiger Lösung die Trypsinwirkung durch Zugabe von 5 ml serumhaltigem MSC-Medium abgestoppt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren zum Erhalten einer Einzelzellsuspension konnten die Zellen nun im Verhältnis 1:5 auf neue Kulturflaschen zur weiteren Amplifikation verteilt werden.

3. Methoden

Bei Erreichen einer ausreichenden Zellzahl für die Differenzierungsversuche wurden die Einzelzellsuspensionen der einzelnen Kulturflaschen in einem 50 ml Falcon Röhrchen gepoolt, bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend auf Vitalität getestet und in der Neubauerzählkammer ausgezählt.

3.1.5. Differenzierung

Bei Zugabe von definierten Zusätzen zu dem Differenzierungsmedium der MSCs beginnen die Zellen, sich entsprechend der Zusätze in gewisse Richtungen zu entwickeln. In der Literatur sind bisher Verfahren zur separaten osteogenen und adipogenen Differenzierung beschrieben. Bekannt ist, dass sich durch Zugabe bestimmter Konzentrationen von Dexamethason, Insulin und IBMX aus mesenchymalen Stammzellen Adipozyten entwickeln. Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbat hingegen lenken die Differenzierung in Richtung Osteogenese. Die Konzentration von Dexamethason zur adipogenen Differenzierung ist dabei höher (10^{-6}) als die zur Lenkung der Entwicklung der Zellen in die osteogene Richtung (10^{-8}).

Bei den genauen Mengen der Wachstumsfaktoren wurde in einem gewissen Rahmen variiert (vgl. 4.2.) Eine gemeinsame Adipo- und Osteogenese ist in der Literatur nicht beschrieben. Daher ist es Teil dieser Arbeit, die optimale Zusammensetzung des Mediums herauszufinden, welches die parallele, möglichst ausgeglichene sowie zeitgleiche adipo- und osteogene Differenzierung erlaubt.

Die Differenzierung der Zellen erfolgte in 24-well-Platten. Am Tag 0 wurde in jedes well 1 ml auf 37°C vorgewärmtes serumhaltiges Basalmedium vorgelegt. Pro well wurden dann 20 000 Zellen ausgesät und in einen Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gegeben. Ab Tag 1 wurde dann dreimal wöchentlich der Medienwechsel entsprechend des jeweiligen Versuchsplanes vollzogen (vgl. 4.2.). Die Versuchsdauer variierte zwischen 21 und 28 Tagen.

3. Methoden

3.1.6. Zellernte und Lyse der Zellen

Ab dem Zeitpunkt der Entnahme der Platten aus dem Brutschrank wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt und die Lysate auf Eis gestellt.

Am jeweiligen Entnahmetag wurde von den Platten für die nasschemischen Analysen zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit sterilem PBS wurden 300 µl des Z2-Puffers in jedes well pipettiert. Durch vorsichtiges Abkratzen mit einer sterilen Pipettenspitze konnten die Zellen dann vom Boden abgelöst werden. Nach Überführung der Suspension in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Cup wurde mit 100 µl Z2-Puffer pro well nachgespült und dieser ebenfalls in die entsprechenden Eppendorf Cups hinzugefügt. Eine vollständige Aufnahme der Zellen in die Suspension konnte durch mikroskopische Kontrolle der wells gewährleistet werden. Nach Lyse der Zellen mittels eines Ultraschallstabes und Zentrifugation der Lysate (13 000 rpm, 5 Minuten, 4°C) konnte der Überstand zur Analyse herangezogen werden. Die Lysate wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.2. Nasschemische Analyse der Zellen

Sämtliche Analyseverfahren und Methoden wurden auf Eis pipettiert.

3.2.1. Bestimmung der Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase Aktivität

Die Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase existiert in zwei Isoformen und ist ein Enzym, welches im Bereich der Lipid-Biosynthese eine große Rolle spielt: durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat durch die zytosolische Isoform entsteht das Zwischenprodukt Glycerol-3-Phosphat, welches durch spontane Dephosphorylierung in Glycerol übergeht. Dieses ist das Grundgerüst der Triglyceride. Die mitochondriale membranöse Isoform des Enzyms ist an der Aufrechterhaltung des Redoxpotentials über der inneren Mitochondrienmembran beteiligt [96]:

3. Methoden

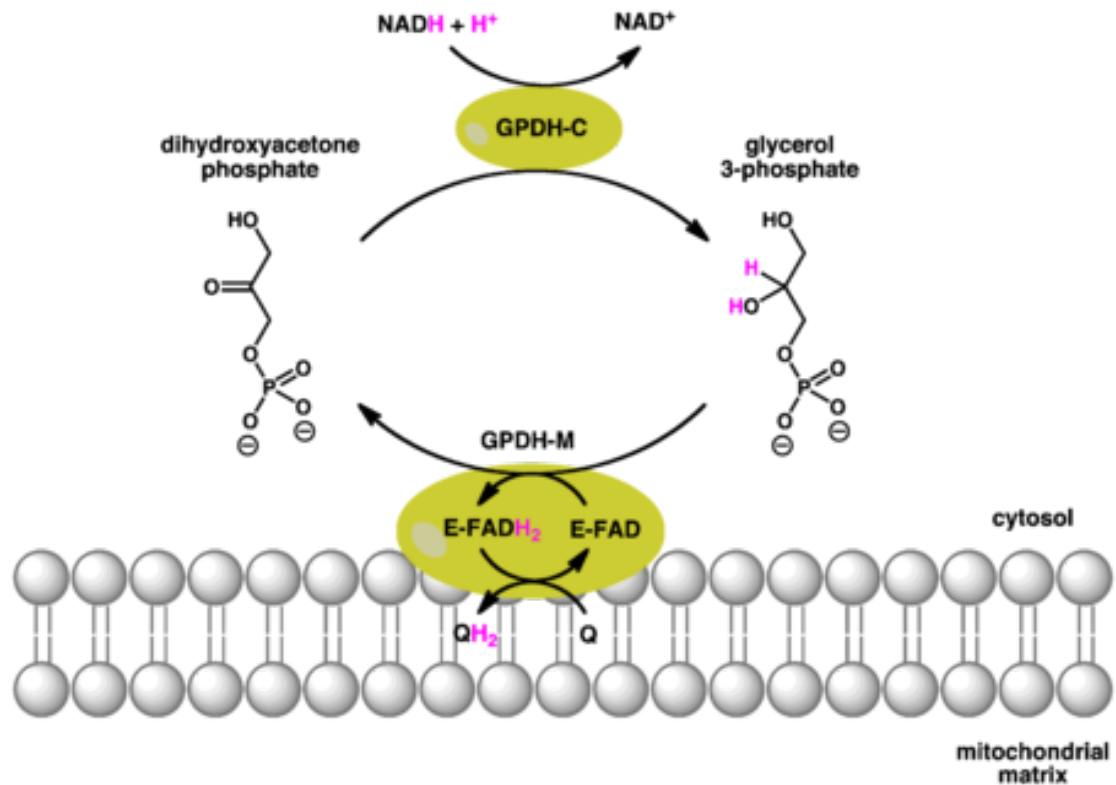


Abbildung 14 Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion: Durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerol-3-Phosphat wird NADH zu NAD oxidiert. Die dabei messbare Absorptionsabnahme bei 340 nm kann photometrisch bestimmt werden [97].

Die Bestimmung der Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase Aktivität beruht auf der Messung der Absorptionsabnahme der Probe bei 340 nm durch Oxidation von NADH zu NAD im Verlauf der Reaktion.

Dies wurde anhand eines modifizierten Protokolls (vgl. 4.1.1.2.) nach Kozak und Jensen [98] durchgeführt. Dazu wurden nacheinander folgende Reagenzien pro well einer 24-well Platte pipettiert:

50 µl	Z2-Puffer
330 µl	ddH ₂ O
5 µl	NADH
10 µl	2-Mercaptoethanol
100 µl	Zelllysate

3. Methoden

Nach Start der Reaktion mit 5 µl DHAP und vorsichtigem Durchrühren des Ansatzes wurde die Abnahme der Absorption bei 340 nm mittels eines automatischen Readers (Tecan) gemessen. Z2-Puffer wurde als Leerwert zur Hintergrundmessung benutzt.

3.2.2. Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase mit ihren 15 Isoenzymen katalysiert beim Menschen die Hydrolyse von Phosphorsäureestern. Um die Aktivität des Enzyms in einem Assay zu bestimmen, wird der Probe als chromogenes Substrat p-Nitrophenylphosphat (pNPP) hinzugefügt. Der Phosphatrest des farblosen Nitrophenylphosphats wird durch das Enzym abgespalten und es entsteht p-Nitrophenol, das schwach gelb ist. Diese Reaktion kann photometrisch verfolgt werden. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des entstandenen Nitrophenols

Um die Aktivität der alkalischen Phosphatase der Proben zu bestimmen, wurden zunächst die Reaktionslösung hergestellt: Dazu wurde das Substrat pNPP in AP-Puffer derart aufgelöst, dass sich die Endkonzentration 2 mg/ml ergeben hat. Dabei musste auf die Lichtempfindlichkeit des Substrates geachtet werden. Nachdem jeweils 50 µl der Probe in eine 96-well Platte auf Eis pipettiert wurden, konnte die Reaktion durch Zugabe von 150 µl Reagenz pro well gestartet und der Verlauf der Absorptionzunahme bei 405 nm kinetisch gemessen werden. Z2-Puffer wurde als Blank zur Hintergrundmessung benutzt.

3.2.3. Bestimmung der DNA Konzentration

Die Quantifizierung des DNA-Gehalts der Proben wurde mittels eines PicoGreen DNA Kits durchgeführt. Hierfür wurde zunächst mit Hilfe des Standardstocks (Lambda DNA standard, 100 µg/ml in TE) eine Verdünnungsreihe (2/1/0,5/0,25/0,125/0,0625/0,03125 µg/ml) in TE-Puffer Arbeitslösung (TE-Puffer, Verdünnung 1:20) zur Erstellung einer Standardkurve pipettiert. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit TE-Puffer AL verdünnt (50 µl Probe mit 50 µl TE-Puffer AL). Zur Bestimmung der Konzentration der DNA konnten nun 100 µl Probe bzw. Standard mit 100 µl der Re-

3. Methoden

aktionslösung (PicoGreen Reagenz 1:200 mit TE-Puffer AL) gemischt und die Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen. Die Proben und der Standard wurden jeweils einer Doppelbestimmung unterzogen. Z2-Puffer wurde als Blank zur Hintergrundmessung verwendet.

3.2.3. Calcium-Bestimmung mittels Alizarin Red S Färbung

Die Bestimmung der Calcium-Konzentration der mit Alizarin Red S gefärbten Platten beruht auf der Messung der Absorption des aus den Proben mit Essigsäure herausgelösten Farbstoffes. Die Absorption bei A_{405} nm ist dabei proportional zur Höhe der Calcium-Depletion im histologischen Präparat, so dass sich qualitative Aussagen zur Konzentration machen lassen. Im Rahmen von Modifikationen (vgl. 4.1.3.) der Methode von Gregory und Gunn [99] konnte folgendes Vorgehen etabliert werden:

- 300 µl Essigsäure pro well hinzugeben
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 100 µl abnehmen und bei 405 nm messen

3.3. Histologie

3.3.1. Alizarin Red S Färbung

Die Färbung der Zellen mit Alizarin Red S und die anschließende Bestimmung der Calcium-Konzentration des histologischen Präparates erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (vgl. 4.1.3.) von Gregory und Gunn et al.[99].

Um die Zellen mit Alizarin Red S anfärben zu können, mussten diese zunächst fixiert werden. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit dH_2O für 10 Minuten mit Standardfixans (10% Formalin in Phosphat-Puffer) bedeckt. Nach Abtragung des Fixans und dreimaligem Waschen mit dH_2O erfolgte die Färbung mit Alizarin Red S (40 mM, pH 4,1) für 30 Minuten. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen der Zellen mit dH_2O konnten die Zellen unter dem Lichtmikroskop fotografiert werden.

3. Methoden

3.3.2. Oil Red O Färbung

Die Oil Red O Färbung ist eine Färbung zur Darstellung von Lipidvakuolen. Zellen, die Fett eingelagert haben, erscheinen rot im Lichtmikroskop.

Die Färbung wurde anhand eines modifizierten Protokolls von Xu [100] durchgeführt.

Absaugen des Mediums

1x Waschen mit PBS

Fixierung für 10 min mit Standardfixans

1x Waschen mit PBS

Waschen mit 60% Isopropanol für 5 Minuten

Färbung mit gefilterter Oil Red O Arbeitslösung für 10 Minuten

Abschütten der Färbelösung

Ausdifferenzieren mit 60% Isopropanol für 15 Sekunden

1x Waschen mit dH₂O

Bedecken der Zellen mit dH₂O

Photographieren der Zellen unter dem Lichtmikroskop

3.4. Molekularbiologische Analyse der Zellen

3.4.1. Arbeiten mit RNA

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Arbeiten mit Handschuhen und nach sorgfältiger Reinigung der Arbeitsflächen mit RNase ZAP durchgeführt.

3.4.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus hMSC

Zur Isolierung der RNA aus der Monolayer Zellkultur wurde die im Labor etablierte RNazol-Methode verwendet. Nach dem Absaugen des Mediums wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und die Lösung anschließend sorgfältig entfernt. Anschließend wurden 250 µl RNazol in jedes well pipettiert und die entsprechenden Proben vollständig miteinander in RNase freien Eppendorf Cups gepoolt, so dass bei vier Wiederholungen pro Bedingung ein Volumen von 1 ml entstanden ist. Zur Extraktion der RNA aus dem Gemisch wurden pro Cup 100 µl Chloroform, entspre-

3. Methoden

chend 1/10 des Gesamtvolumens, hinzupipettiert und durch Schütteln der Cups für 15 Sekunden in der Hand ein Vermischen erreicht. Nach 5-minütiger Inkubation der Cups bei 4°C wurden die Proben für 15 Minuten bei 12000g zentrifugiert. So werden zwei Phasen gebildet, eine untere blaue organische Phenol-Chloroform-Phase und eine obere farblose wässrige Phase, in der die RNA gelöst ist. Getrennt werden die Phasen durch ein dünne weiße Bande, welche DNA und Proteine enthält. Zur RNA-Präzipitation wurde die RNA-Phase in ein neues Eppendorf Cup pipettiert, das gleiche Volumen Isopropanol (= 1 Volumenanteil; 400 µl definiert bei geringeren Mengen RNA-Phase) hinzugefügt und die Lösung solange vorsichtig auf-und abpipettiert, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren. Nach 45-minütiger Inkubation der Proben bei 4°C wurden die Cups 15 Minuten lang bei 12000g bei 4°C zentrifugiert. Zur RNA-Reinigung musste nun der Überstand entfernt und 1 ml Ethanol (75% V/V) zu den Pellets gegeben werden. Auf das anschließende Vortexen der Cups folgte eine Zentrifugation der Pellets für 8 Minuten bei 7500g bei 4°C. Die Überstände wurden danach vollständig entfernt, die RNA 90 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

3.4.1.2. DNase Verdau

Der DNase-Verdau ist eine Methode, um etwaige Verunreinigungen der RNA mit DNA zu beseitigen. Dazu wurde zu den Cups mit den 20 µl RNA 3µl 10xPuffer und 3µl DNase hinzugefügt, das Volumen mit DEPC-Wasser auf 30 µl aufgefüllt und bei 37°C für 30 Minuten verdaut. Durch Zugabe von 3 µl des Inactivation Reagent und Inkubation für 2 Minuten bei Raumtemperatur wurde ein Abstoppen der Reaktion erreicht. Nach Zentrifugation der Proben für 1,5 Minuten bei 10000g und 4°C konnte der Überstand in ein neues Cup überführt werden.

3.4.1.3. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Menge an RNA wurde spektralphotometrisch durch die Messung der Extinktion der jeweiligen Probe bei 260 nm bestimmt. Da die Absorptionsspektrometrie lediglich in einem Bereich von 0,1 und 1 OD (optischer Dichte) zuverlässige Werte liefert,

3. Methoden

mussten vereinzelt Proben 1:10 mit TRIS (50 mmol/l) verdünnt werden. Die RNA-Konzentration wurde dann folgendermaßen nach Sambrook et al. [101] berechnet:
$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = 40 \times E_{260}$$

Durch eine zusätzliche Messung der Probe bei 280 nm konnte eine Kontrolle der Reinheit erfolgen. Extinktionen in diesem Bereich werden durch Proteine hervorgerufen. Bei reinen RNA-Lösungen liegt der Quotient von $E_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0 [101]. Desweiteren wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben durchgeführt, wobei die charakteristischen 18s und 28s Banden dargestellt wurden.

3.4.1.4. Gelelektrophoretische Überprüfung der Reinheit der RNA

Zur Überprüfung der Reinheit der RNA-Probe wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der einzelnen Proben durchgeführt. Zur Erstellung des 1%igen Agarosegels in 1xTBE-Puffer musste zunächst die Agarose in dem Puffer mindestens dreimal bis zum Verschwinden der Schlieren in der Mikrowelle aufgekocht werden. Nach kurzer Abkühlungszeit auf etwa 50°C wurden 2 µl Ethidiumbromid pro 100 µl Agarosegel hinzugefügt. Anschließend konnte das Gel vorsichtig in die vorbereitete, mit DEPC-Wasser ausgewaschene Gelkammer gegossen werden. Nach Auskühlung des Gels wurde dieses vollständig mit DEPC-Wasser überschichtet.

Zur Vermeidung der Bildung von Sekundärstrukturen wurden die Proben (2µl RNA+8µl DEPC) 10 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis für 2 Minuten gekühlt. Nach Zugabe von 1,5 µl Formaldehyd-haltigem RNA-Sample-Loading-Buffer zu den Proben wurden davon 10 µl in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte daraufhin bei 100 V für 60-90 Minuten. Im Anschluss daran konnte die RNA sichtbar gemacht werden, da der zwischen CG-Basenpaaren interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid durch die Beleuchtung mit UV-Licht ($\lambda=302$ nm zur Emission von Licht ($\lambda=500-590$ nm) veranlasst wird. Die Darstellung der charakteristischen Banden bei 18s und 28s konnte innerhalb der UV-Kammer fotografiert werden.

3. Methoden

3.4.1.5. Reverse Transkription

Um die Genexpression darstellen zu können, untersucht man das Maß der Transkription eines Gens. Um die mRNA dabei der PCR zuzuführen, muss diese zunächst in cDNA (complementary DNA) umgewandelt werden. Das wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) bewerkstelligt, welche DNA-Kopien eines mRNA-Moleküls synthetisiert. Diese bindet an Oligo(dT)-Primer, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und als Startpunkt für die Reaktion dienen. Entsprechend der mRNA-Sequenz wird dann eine komplementäre DNA gebildet.

Die cDNA-Synthese wurde mittels des Kits SuperScript™ II RNase H⁻ durchgeführt. Dabei wurden immer zwei Ansätze pro Probe hergestellt. Die Menge der eingesetzten RNA betrug wenn möglich 1 µg, ansonsten 10 µl reine RNA.

Vorbereitung:

dNTP-AL:

Je 10 µl 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP

+ 60 µl	DEPC Wasser
100 µl	100 mM dNTP

Anschließend wurden Aliquots der dNTPs erstellt.

Durchführung:

Annealing	1 µl Oligo(dT)
	1 µl dNTP-AL
	1 µg RNA (bei geringerer RNA-Menge der Probe Einsatz von 10 µl reiner RNA)
	Auffüllen des Ansatzes 12 µl mit DEPC
	5 min 65°C
	Kühlen auf Eis
	Kurze Zentrifugation

3. Methoden

	4 µl 5xFirst-Strand Buffer
	2 µl 0,1 M DTT
Reverse Transkription	2 min bei 42°C
	1 µl SuperScript™ II RNase
	Vorsichtiges Verrühren und kurzes Zentrifugieren
	60 min bei 42°C
Reaktionstop	15 min bei 70°C
	Poolen der entsprechenden Proben
	(Endvolumen 38 µl)

Bis zur Verwendung wurden die Proben bei - 80°C gelagert.

3.4.2. Semi-quantitative Real-Time PCR

Im Rahmen der PCR-Analyse mittels des Brilliant Cyber Green Kits wurde die Expression von osteocalcin, PPARY, runx2var3 und LPL (Primer-Sequenzen siehe Tab. 2). Die Normalisierung erfolgte im Bezug auf die Expression von hprt als house keeping Gen. Sämtliche Proben inklusive Standard wurden dreifach bestimmt (Endvolumen 15 µl). Zur Hintergrundmessung wurde DEPC-Wasser eingesetzt. Die Reaktion wurde als Two-step-PCR durchgeführt. Diese begann mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten, anschließend folgten 45 Zyklen gemäß folgendem Reaktionsschema:

	Zeit	Temperatur
Denaturierung	30 sec	95°C
Annealing/Elongation	1 min	Vgl. Tab.1

Die Erstellung der Dissoziationskurve schloss sich an den letzten Zyklus an.

3. Methoden

Gen	Annealing temp.	Primer final conc (nM)	Probe (ng)
Hprt	60°C	150	2
LPL	60°C	150	5
Osteocalcin	60°C	100	5
PPAR γ	63°C	100	5
Runx2var3	60°C	100	5

Tabelle 1 Annealing Temperatur sowie Konzentration der verwendeten Primer und Menge der eingesetzten Probe

Oligonukleotid	Sequenz
3'-Hprt	3'-CGAGATGTGATGAAGGAGATGG-5'
5'-Hprt	5'-GCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC-3'
3'-LPL	3'-CAAGAGAGAACCAGACTCCAATG-5'
5'-LPL	5'-GGGCTCCAAGGCTGTATCC-3'
3'-Osteocalcin	3'-AGGAGGGCAGCGAGGTAG-5'
5'-Osteocalcin	5'-GAAAGCCGATGTGGTCAGC-3'
3'-PPAR γ	3'-GTCGGTTTCAGAAATGCCTTGC-5'
5'-PPAR γ	5'-GCCCTCGCCTTTGCTTTGG-3'
3'-Runx2var3	3'-ATACCGAGTGACTTTAGGGATGC-5'
5'-Runx2var3	5'-AGTGAGGGTGGAGGGAAGAAG-3'

Tabelle 2 Oligonukleotid-Sequenzen der eingesetzten Primer

3.6. Statistik

Bei der statistischen Auswertung wurde der student-t-Test verwendet. Signifikanz wurde für Werte $p < 0,05$ angenommen. Die Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Methoden

Zur Vereinfachung der Messung der Aktivitäten der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase sowie der alkalischen Phosphatase und der DNA-Bestimmung sollte ein Verfahren gefunden werden, um die einzelnen Methoden zu vereinen. Nach Etablierung eines geeigneten Lyseverfahrens für den GPDH-Assay wurden die Lysate ebenfalls erfolgreich für die DNA-Quantifizierung sowie die Messung der AP-Aktivität verwendet.

4.1.1. Zellyseverfahren und GPDH-Assay

Zur Evaluation eines geeigneten Lyseverfahrens wurden adipogene Differenzierungsversuche angesetzt. Dabei wurden in 24 well Platten 20 000 Zellen pro well ausgesät und jeweils zur Hälfte unter basalen und adipogenen Bedingungen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für 28 Tage kultiviert. Am Entnahmetag wurde das Medium unter dem laminar flow abgesaugt und der Zellrasen einmalig mit sterilem PBS gewaschen.

4.1.1.1. OBG-Puffer

Der Versuch ein Zelllysat herzustellen wurde zunächst mit einem OBG-haltigen Puffer unternommen. Nach erneutem Waschen der Zellen mit dH₂O wurden 250 µl des Puffers in die wells pipettiert. Nun mussten die Zellen mittels einer sterilen Pipettenspitze abgekratzt und die Platten insgesamt zweimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut werden. Anschließend konnte das Lysat in Eppendorf-Cups überführt und gevortext werden. Nach der Zentrifugation bei 13000g und 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand für den AP-Assay (vgl. 3.2.2.), die Bestimmung der DNA-Konzentration (vgl. 3.2.3.) sowie den GPDH-Assay (vgl. 3.2.1.) eingesetzt.

Dabei konnten der DNA-Assay und die Bestimmung der AP-Aktivität Ergebnisse liefern. Die Messung der Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität blieb mit diesem Puffer auch bei einem erneut angesetzten Differenzierungsversuch und wiederholten Messungen erfolglos.

4. Ergebnisse

4.1.1.2. Z2-Puffer

In einem weiteren adipogenen Differenzierungsversuch über 28 Tage wurde dann der Z2-Lysepuffer eingesetzt. Die Lyse der Zellen (vgl. 3.1.6.) und eine Analyse des Lysats hinsichtlich der AP-Aktivität und des DNA-Gehalts konnte damit erreicht werden. Dabei wurde ebenfalls eine Modifikation des AP-Puffers vorgenommen (vgl. 4.1.2.). Auch die Messung der GPDH-Aktivitätsabnahme (vgl. 3.2.1.) war erfolgreich.

4.1.2. Modifikation der AP-Messung

Messung der AP-Aktivität aus dem Medium:

Die Probe zur Messung der AP-Aktivität wurde bei den Medientests aus dem Überstand des Differenzierungsmediums entnommen. Dabei wurden 100 µl Probe und 100 µl Substrat-Reagenz eingesetzt.

Messung der AP-Aktivität aus dem Lysat

Im Rahmen der Hormonstress-Versuche erfolgte die Messung der Enzymaktivität aus dem Lysat (vgl. 3.2.2.) der jeweiligen Probe. Die Verwendbarkeit des Lysats für diesen Assay wurde in einem adipogenen Differenzierungsversuch bestätigt.

Modifikation des AP-Puffers

Eine Erhöhung der Magnesium-Konzentration von 1 mM auf 5 mM als Co-Substrat im AP-Puffer konnte die Höhe der Enzymaktivität und eine ausreichende Messbarkeit gewährleisten.

4.1.3. Calcium-Quantifizierung mittels Alizarin Red Färbung

Zur Analyse der Calcium-Menge in den Monolayer-Zellkulturen stand die Methode von Gregory et al. [99] zur Verfügung. Um deren Anwendbarkeit auf die hier durchgeführten Differenzierungsversuche zu untersuchen und deren einzelne Schritte anzupassen, wurden Zellen über 21 Tage unter basalen, adipogenen, osteogenen und gemischten Bedingungen differenziert (vgl. 4.2.4.).

4. Ergebnisse

An Tag 14 und 21 erfolgte jeweils die Entnahme, Fixierung sowie Färbung der Zellkultur und Quantifizierung der Calcium-Menge entsprechend des folgenden Protokolls. Dabei wurde an verschiedenen Behandlungsabschnitten die Absorption des gelösten Farbstoffes gemessen und so die Methode evaluiert.

Protokoll zur Evaluation der Calcium-Quantifizierung mittels Alizarin-Red-Assay:

Entnahme, Fixierung und Färbung der Zellen (3.3.1. Alizarin Red S Färbung)

Trocknung der wells

Inkubation der wells für 30 Minuten mit 300 µl 10% Essigsäure (v/v)

Abkratzen der Zellen und des Überstandes in Eppendorf Cups

Messung 1: Vor weiterer Bearbeitung

Erhitzen der Cups für 10 Minuten bei 85°C

Kurzes Kühlen auf Eis

Zentrifugation für 15 min

Messung 2: Nach Bearbeitung

Neutralisation von 200 µl Überstand mit 60 µl 10%Ammoniumhydroxid (v/v),

Ziel-pH: 4,1-4,4

4. Ergebnisse

Messung 3: Nach Neutralisation

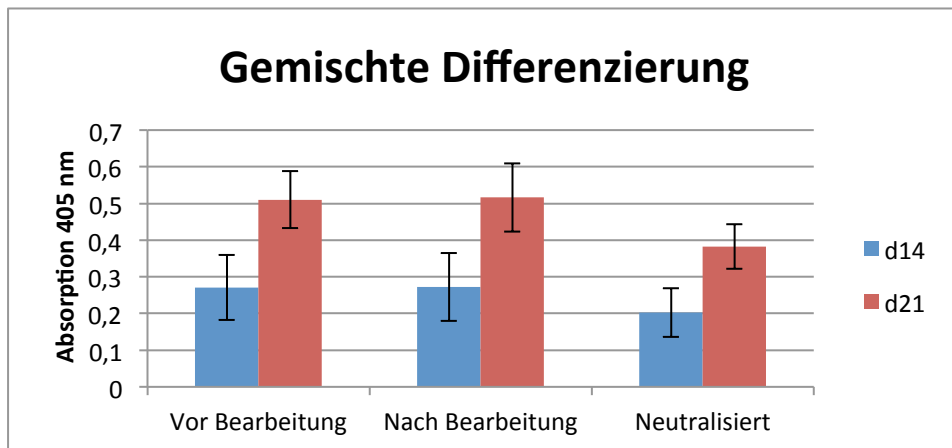


Abbildung 15 Calcium-Quantifizierung mittels Alizarin-Assay: Evaluation des Quanti-fizierungsverfahrens bei gemischten Bedingungen; error bars = Standardabweichung

Aufgrund der Tatsache, dass eine Messung der Absorption vor der Bearbeitung (Messung 1) die höchsten Werte lieferte, wurde die Bestimmung der Calcium- Depletion in den Monolayern ohne Bearbeitung und Neutralisation durchgeführt.

4.2. Etablierung eines in-vitro Modells zur gemischten Adipo- und Osteogenese

Zur Entwicklung des in-vitro Modells wurden insgesamt fünf Medientests angesetzt. Ziel dieser Versuche war es, die optimale Konzentration der Wachstumsfaktoren in den Differenzierungsmedien festzustellen, um ein ausgewogenes Verhältnis von adipogener, osteogener und gemischter Differenzierung zu erhalten. Es wurden jeweils 20 000 Zellen pro well in 24 Well-Platte ausgesät, die Versuchsdauer betrug 4 Wochen.

Versuch	Dauer	Entnahmetag	Readout
Medientest 1	28 d	28	<i>Histologie:</i> Alizarin Red, Oil Red <i>Biochemie:</i> AP aus Medium
Medientest 2	28 d	28	<i>Histologie:</i> Alizarin Red, Oil Red <i>Biochemie:</i> Resazurin
Medientest 3	28 d	14, 21, 28	<i>Histologie:</i> Alizarin Red, Oil Red <i>Biochemie:</i> Resazurin, AP aus Medium
Medientest 4	28 d	14, 21, 28	<i>Histologie:</i> Alizarin Red
Medientest 5	28 d	14, 21, 28	<i>Histologie:</i> Alizarin Red

Tabelle 3 Versuchsübersicht der Medientests

Die Differenzierungsmedien enthielten die für die Adipo-und Osteogenese typischen Konzentrationen an Dexamethason (Adipogen: 10^{-6} M; Osteogen 10^{-8} M) [99], [15]. Bei der Osteogenese und gemischten Differenzierung wurde durch Zugabe von Ascorbat (50 µg/ml) und β -Glycerophosphat (5 mM) die Möglichkeit zur Bildung von Osteoid geschaffen [102]. Im Rahmen der Osteogenese wurde der Einfluss von Vitamin D₃ (0/10 nM) untersucht. Bei der Adipogenese wurde der Einfluss von IBMX (0/0,5 mM) und Insulin (1/5 µg/ml) betrachtet.

4. Ergebnisse

Um eine gemischte Differenzierung zu erhalten, wurde der Mittelwert der beiden Dexamethason-Konzentrationen eingesetzt (10^{-7} M). Ebenfalls als Voraussetzung für die Osteogenese wurden entsprechende Konzentrationen an Ascorbat (50 µg/ml) und β -Glycerophosphat (5 mM) hinzugegeben. IBMX, Insulin und Vitamin D₃ wurden variiert (siehe Tabelle).

	Adipogen	Osteogen	Mixed
Basalmedium*	x	x	x
Dexamethason	10^{-6} M	10^{-8} M	10^{-7} M
β -Glycerophosphat	-	5 mM	5 mM
Ascorbat	-	50 µg/ml	50 µg/ml
Vitamin D ₃	-	0/10 nM	0/10 nM
IBMX	0/0,5 mM	-	0/0,5 mM
Insulin	1/5 µg/ml	-	1/5 µg/ml

Tabelle 4 Übersicht der Wachstumsfaktoren für die Differenzierungsmedien der Medientests

* Basalmedium: DMEM High Glucose, 10% FCS, 1% P/S

Im Folgenden werden nun die im Rahmen der Medientests gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der adipogenen, osteogenen und gemischten Differenzierung dargestellt. Es werden repräsentative Histologien abgebildet.

4.2.1 Ergebnisse Adipogenese

4.2.1.1. Einfluss von Insulin

Die alleinige Zugabe von Dexamethason (10^{-6} M) und Insulin sowohl in niedriger (1 µg/ml) als auch in hoher Konzentration (5 µg/ml) können Adipogenese induzieren. Ein histologisch signifikant sichtbarer Unterschied ist nicht zu erkennen.

4. Ergebnisse

4.2.1.1. Einfluss von IBMX

Durch den Zusatz des Phosphodiesterase-Inhibitors 3-Isobutyl-1-methylxanthin (0,5 mM) kommt es zu einer verstärkten Adipogenese [103]. Dieses Phänomen war bei beiden Insulin-Konzentrationen zu beobachten.

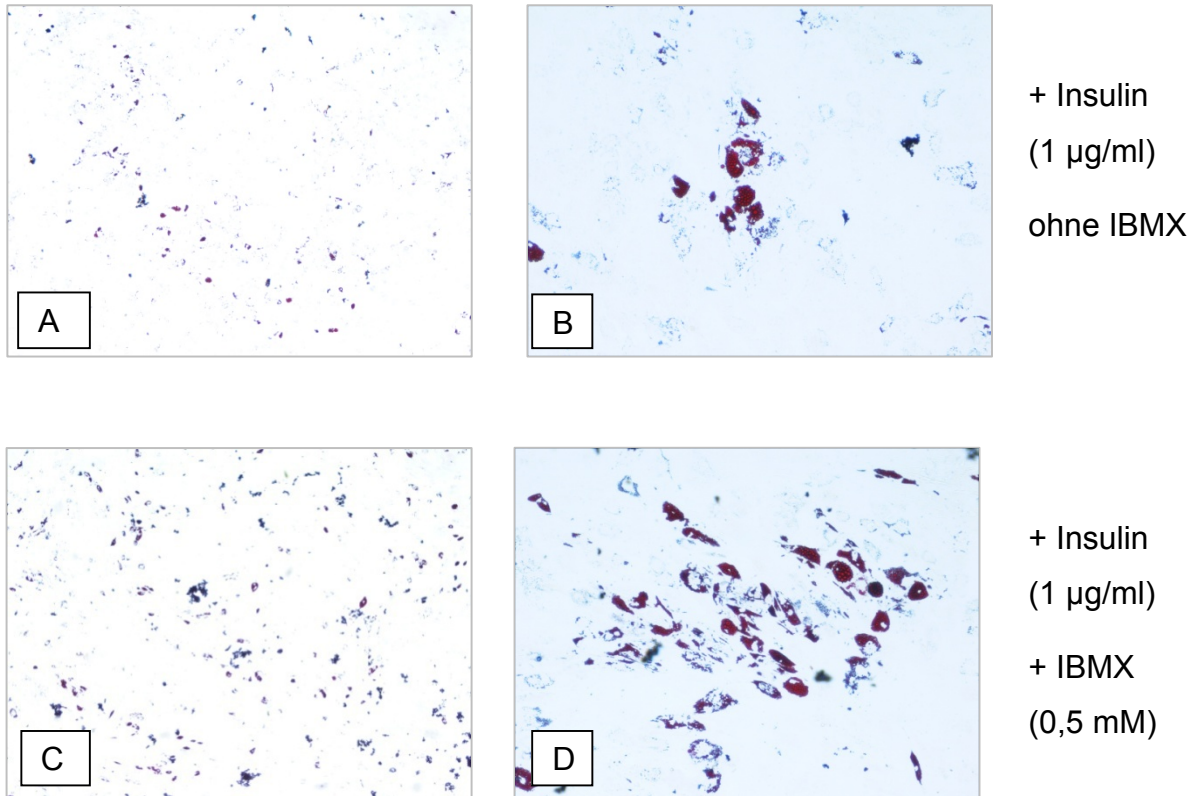
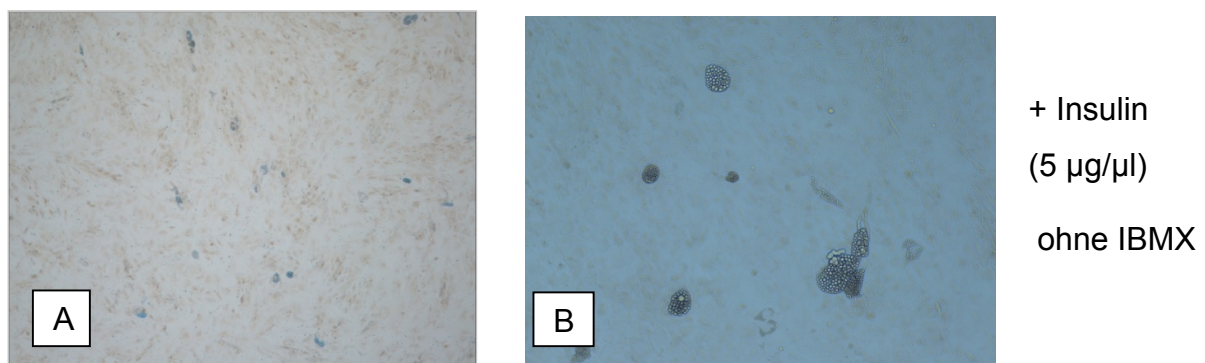
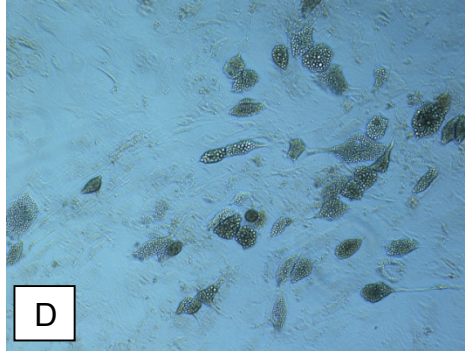
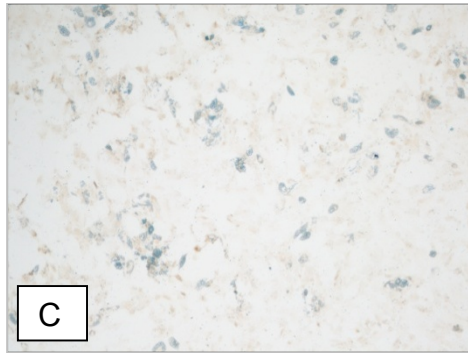


Abbildung 16 A-D: Einfluss von Insulin und IBMX auf die Adipogenese von hMSC; Kulturdauer 28 d; Wachstumsfaktoren: Dexamethason 10^{-6} M, Insulin 1µg/ml, +/- IBMX 0,5 mM; Oil Red O-Färbung; Vergrößerung 2x und 10x



4. Ergebnisse



+ Insulin
(5 µg/ml)

+ IBMX
(0,5 mM)

Abbildung 17 Einfluss von Insulin und IBMX auf die Adipogenese von hMSC; Kulturdauer 28 d; Wachstumsfaktoren: Dexamethason 10^{-6} M, Insulin 5 µg/ml, +/- IBMX 0,5 mM; Alizarin Red Färbung; Vergrößerung 2x, 10x

Als Anforderungen an eine ausreichende adipogene Differenzierung wurden als Medienbedingungen die Zugabe von Dexamethason (10^{-6} M), Insulin (5 µg/ml) und IBMX (0,5 µg/ml) definiert.

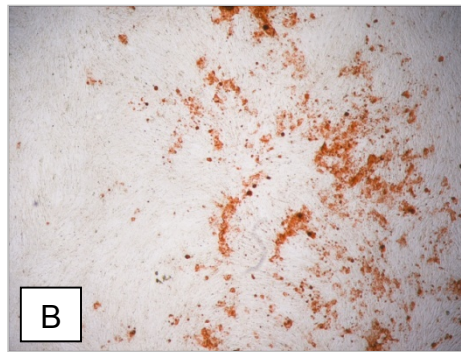
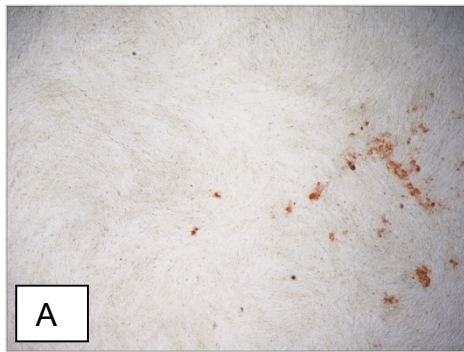
4. Ergebnisse

4.2.2. Ergebnisse Osteogenese

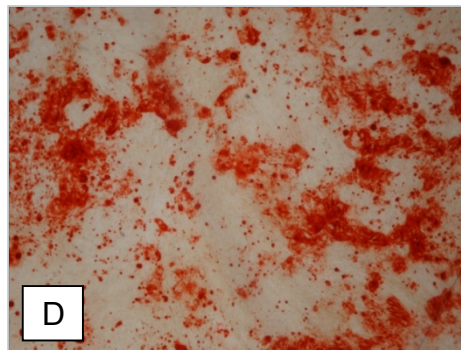
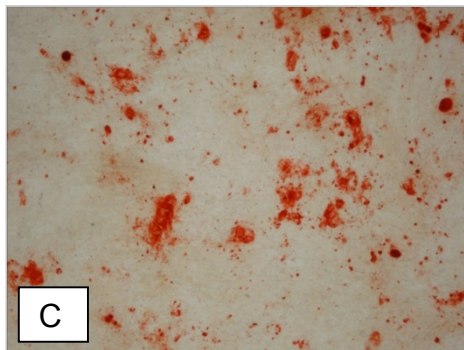
Im Rahmen der osteogenen Differenzierung der hMSC wurde der Einfluss von Vitamin D3 (0/10 nM) untersucht. Hierbei konnte eine deutliche Steigerung der Osteogenese durch Zugabe des Vitamins erreicht werden.

Ohne Vitamin D3

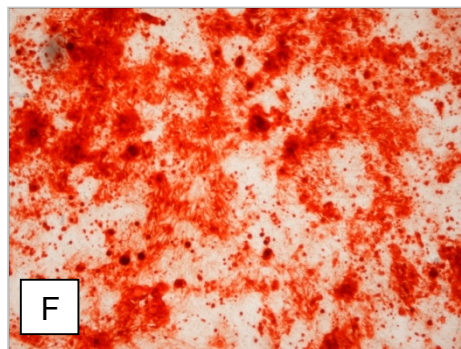
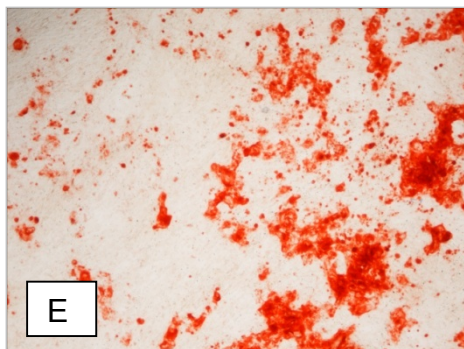
10 nM Vitamin D3



d14



d21



d28

Abbildung 18 A-F: Einfluss von Vitamin D3 auf die Osteogenese von hMSC; Kulturdauer 28 d, Wachstumsfaktoren Dexamethason 10^{-8} M, Ascorbat $50 \mu\text{g/ml}$, β -Glycerophosphat 5 mM, Vitamin D3 0/10 nM; Färbung Alizarin Red, Vergrößerung 4x: Vitamin D3 führt zu einer Verstärkung der Osteogenese an Tag 7,14 und 21

4. Ergebnisse

4.2.3. Ergebnisse gemischte Zellkultur

Die durchgeführten Medientests zur Untersuchung der Frage, ob eine gemischte Differenzierung von hMSC erreichbar ist, lieferten ein positives Ergebnis. Die gleichzeitige adipogene und osteogene Differenzierung innerhalb einer Zellkultur ist möglich.

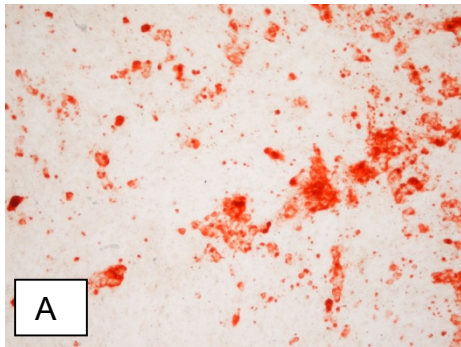
Als grundlegende Supplemente zum Basalmedium wurde Dexamethason (10^{-7} M), Ascorbat und β -Glycerolphosphat hinzugefügt (Grundmedium für gemischte Differenzierung). Diese Kombination alleine konnte lediglich eine osteogene Entwicklung der Zellen provozieren (Abbildung 19; A, B). Der Osteogenese-verstärkende Effekt (vgl. 4.2.2.) von Vitamin D3 wurde sowohl in dieser Medienzusammensetzung, als auch in den jeweils folgenden Variationen beobachtet.

Die Addition von IBMX zum Grundmedium bewirkte eine zusätzliche Induktion von Adipogenese (Abbildung 19; C, D). Die alleinige Zugabe von Insulin in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ war nicht ausreichend, um eine vergleichbare adipogene Differenzierung zu bewirken, lediglich eine vereinzelte Ausbildung von Fett-Vakuolen war zu erkennen (Abbildung 19; E, F).

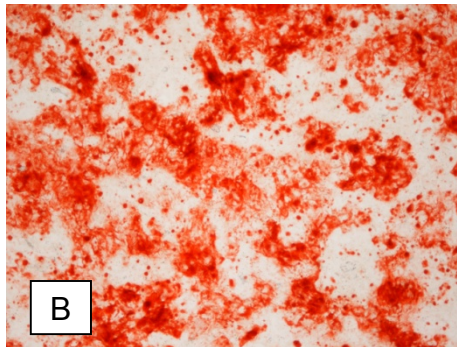
Durch die Zugabe beider adipogenen Wachstumsfaktoren zum Grundmedium ohne Beifügung von Vitamin D3 wurde eine ausgewogene Adipo-und Osteogenese erreicht (Abbildung 19; G). Auch hier führte der zusätzliche Einfluss von Vitamin D₃ zu einer Verstärkung der Knochenbildung im Sinne einer überschießenden Osteogenese (Abbildung 19; H). Eine ausgewogene Adipo-und Osteogenese wurde nach Auswertung der Histologie durch Zugabe von IBMX (0,5 mM) und Insulin (5 $\mu\text{g/ml}$) zum Grundmedium für gemischte Differenzierung (vgl. oben) erreicht (Abbildung 19; G). Auf den Zusatz von Vitamin D3 wurde aufgrund der übermäßigen Osteogenese verzichtet.

4. Ergebnisse

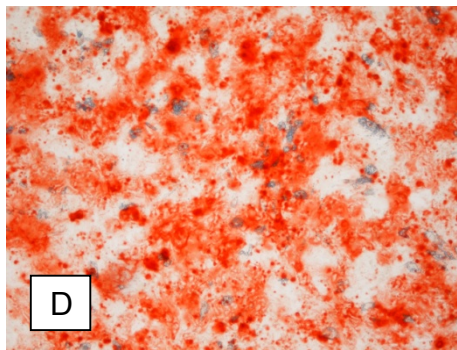
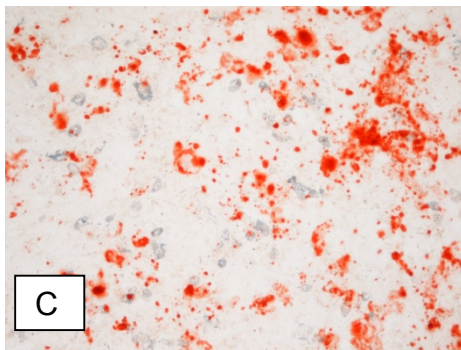
Ohne Vitamin D3



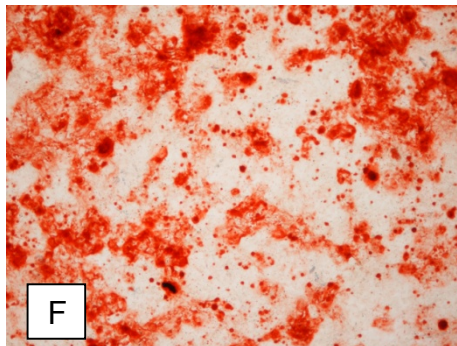
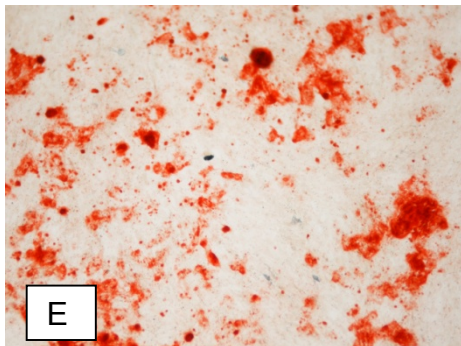
Mit Vitamin D3



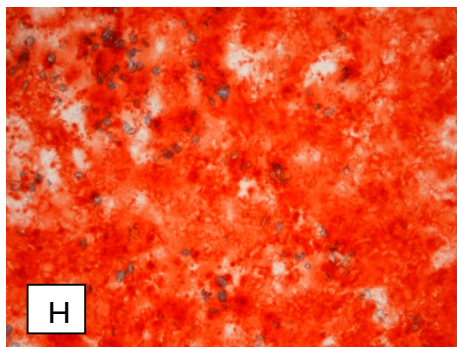
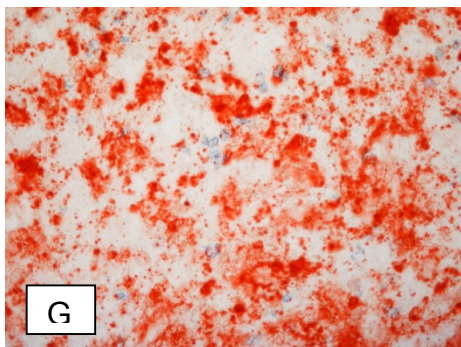
ohne weiteren
Zusatz



+ IBMX
(0,5 mM)



+ Insulin
(5 µg/ml)



+ IBMX
(0,5 mM)
+ Insulin
(5 µg/ml)

Abbildung 19 A-H: Gemischte Differenzierung (Dexamethason 10-7M, Ascorbat 50 µg/ml, β -Glycerophosphat 5 mM) von hMSC: Einfluss und Variation der Wachstumsfaktoren Vitamin D3 (0/10 nM), IBMX (0/0,5 mM) und Insulin (0/5 µg/ml); Kulturdauer 28 d, Färbung Alizarin Red, Vergrößerung 4x

4. Ergebnisse

4.2.4. Zusammensetzung der Medien des in-vitro-Modells für gemischte Adipo- und Osteogenese

Als Ergebnis der Medientests wurden nun folgende Supplemente zu dem Basalmedium für die Adipogenese, Osteogenese und gemischte Differenzierung definiert:

	Adipogen	Osteogen	Mixed
Basalmedium*	x	x	x
Dexamethason	10^{-6} M	10^{-8} M	10^{-7} M
β -Glycerophosphat	-	5 mM	5 mM
Ascorbat	-	50 μ g/ml	50 μ g/ml
Vitamin D ₃	-	0 nM	0 nM
IBMX	0,5 mM	-	0,5 mM
Insulin	5 μ g/ml	-	5 μ g/ml

Tabelle 5 Zusammensetzung der Medien des in-vitro-Modells für gemischte Adipo- und Osteogenese

* Basalmedium: DMEM High Glucose, 10% FCS, 1% P/S

4. Ergebnisse

4.3. Einfluss von 17- β -Östradiol auf die adipogene und osteogene Differenzierung von hMSCs

Im Rahmen von drei Versuchen wurde der Einfluss des Hormons auf das in-vitro Modell untersucht. Die Versuchsdauer betrug dabei jeweils 21 Tage. Die praktische Durchführung erfolgte gemäß der im Methodenteil beschriebenen Weise.

Die Zusammensetzung der Medien gestaltete sich wie folgt:

Bed.	Medium	Dex	Insulin	IBMX	Asc	β GP	17 β Östradiol
1	Basal	-	-	-	-	-	-
2	Basal	-	-	-	-	-	10E-12 M
3	Basal	-	-	-	-	-	10E-10 M
4	Basal	-	-	-	-	-	10E-8 M
5	Adipogen	10E-6	5 μ g/ml	0,5 mM	-	-	-
6	Adipogen	10E-6	5 μ g/ml	0,5 mM	-	-	10E-12 M
7	Adipogen	10E-6	5 μ g/ml	0,5 mM	-	-	10E-10 M
8	Adipogen	10E-6	5 μ g/ml	0,5 mM	-	-	10E-8 M
9	Osteogen	10E-8	-	-	50 μ g/ml	5 mM	-
10	Osteogen	10E-8	-	-	50 μ g/ml	5 mM	10E-12 M
11	Osteogen	10E-8	-	-	50 μ g/ml	5 mM	10E-10 M
12	Osteogen	10E-8	-	-	50 μ g/ml	5 mM	10E-8 M
13	Mixed	10E-7	5 μ g/ml	0,5 mM	50 μ g/ml	5 mM	-
14	Mixed	10E-7	5 μ g/ml	0,5 mM	50 μ g/ml	5 mM	10E-12 M
15	Mixed	10E-7	5 μ g/ml	0,5 mM	50 μ g/ml	5 mM	10E-10 M
16	Mixed	10E-7	5 μ g/ml	0,5 mM	50 μ g/ml	5 mM	10E-8 M

Tabelle 6 Zusammensetzung der Differenzierungsmedien der einzelnen Bedingungen

4. Ergebnisse

Am Tag 7, 14 und 21 wurden jeweils Platten zur Histologie sowie zur nasschemischen und molekularbiologischen Analyse entnommen.

4.3.1 Einfluss von Östrogen auf die Adipogenese

4.3.1.1. *Unter basalen Bedingungen*

Östrogeneinfluss bei basalen Medienbedingungen ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren konnte histologisch keine Adipogenese induzieren. Sowohl an Tag 7, 14 und 21 waren keine Fettvakuolen zu erkennen. Erkennbar ist die typische Form der mesenchymalen Stammzellen mit ihren länglichen Zellausläufern. Von Tag 7 bis Tag 14 ist eine deutliche Zunahme der Zellanzahl im Sinne einer Proliferation zu erkennen, messbar durch eine Erhöhung der DNA-Konzentration in den Lysaten (Abbildung 21). Dabei kam es jeweils mindestens zu einer Verdopplung der DNA-Menge. Eine fettspezifische Enzymaktivität war nicht zu verzeichnen. Bei 10^{-10} M kommt es an Tag 21 zu einer signifikanten Vermehrung der DNA-Menge durch Östrogen.

4. Ergebnisse

d7

d14

d21

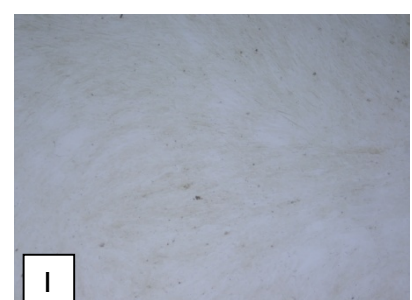
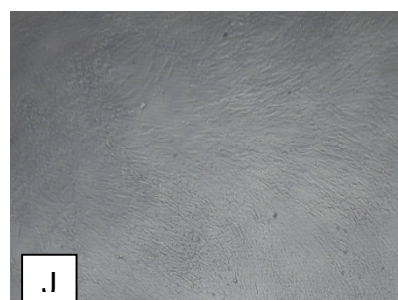
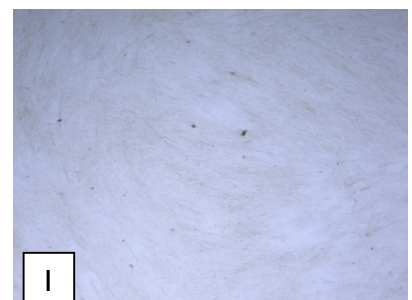
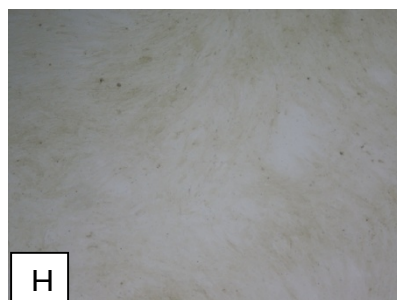
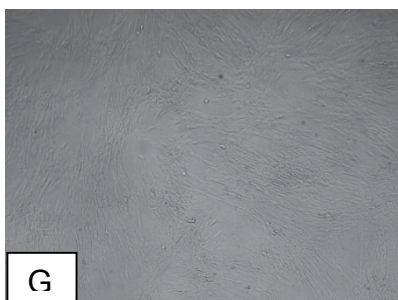
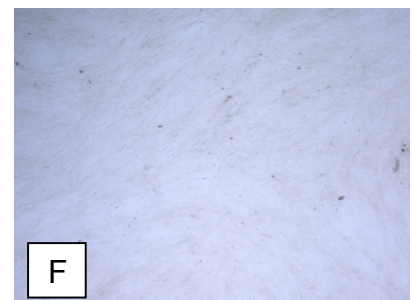
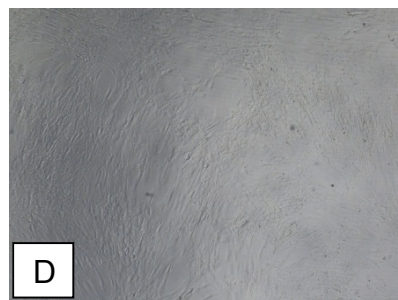
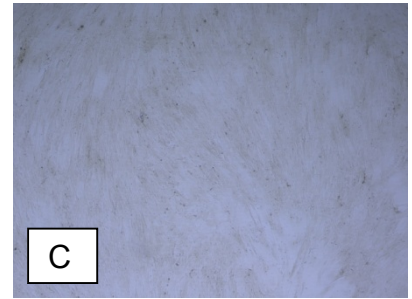
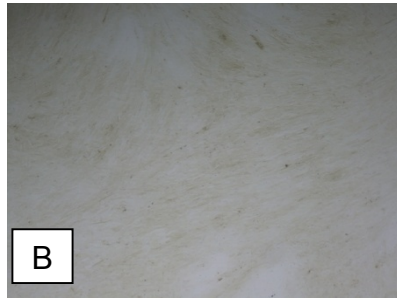
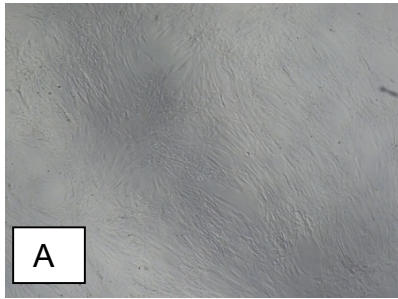


Abbildung 20 A-L: Einfluss von Östrogen (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) im Rahmen der adipogenen Differenzierung unter basalen Bedingung bei hMSC; Alizarin Red Färbung, Vergrößerung 2x: Es ist unter basalen Bedingungen keine Adipogenese mit zusätzlichem Einfluss von Östrogen zu erkennen.

4. Ergebnisse

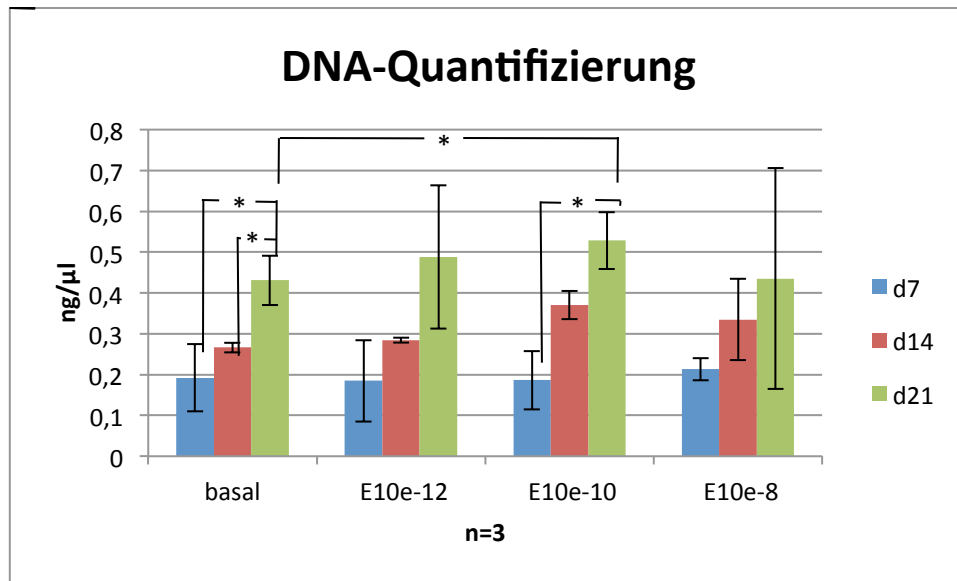


Abbildung 21 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: DNA-Quantifizierung; Error bars=Standardabweichung

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase zeigte eine der Zellanzahl proportionale Zunahme, allerdings keine signifikante Hormonabhängigkeit bei basalen Bedingungen.

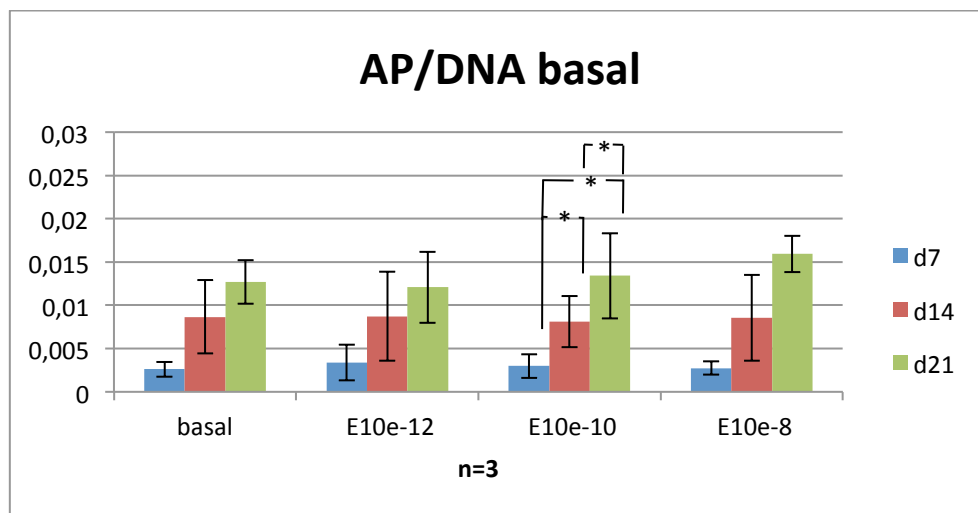


Abbildung 22 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase normiert zur DNA-Menge; (Error bars=Standardabweichung)

Eine Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase war nicht nachweisbar. Bezüglich der Genexpression wurden die Gene von PPAR γ und LPL untersucht. Dabei wurde eine geringfügige Transkription des frühen Adipogenese-Markers PPAR γ fest-

4. Ergebnisse

gestellt. Der Einfluss von Östrogen zeigte dabei sowohl keine tendenzielle als auch signifikante Veränderung in der Expression. Der Nachweis des späten Markers LPL konnte nicht erbracht werden.

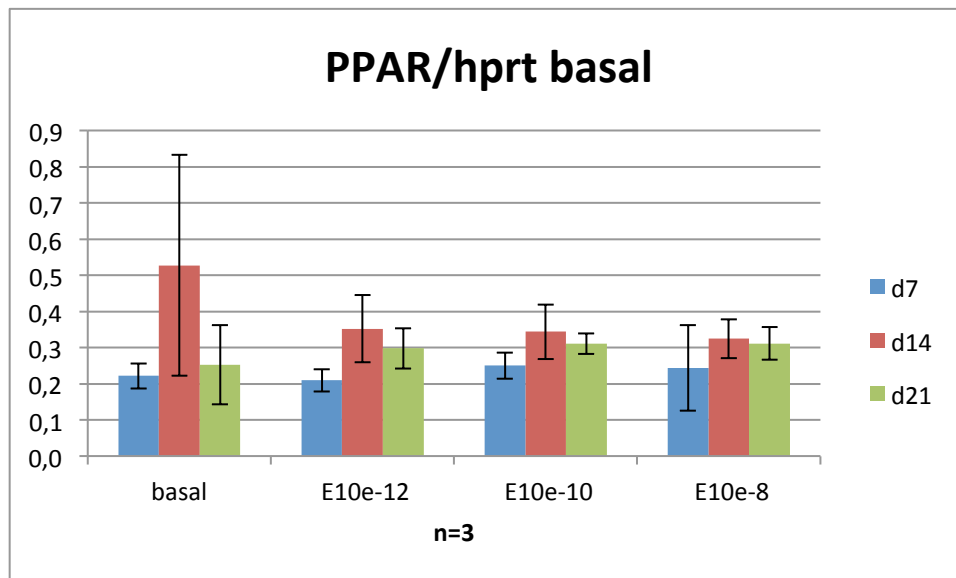


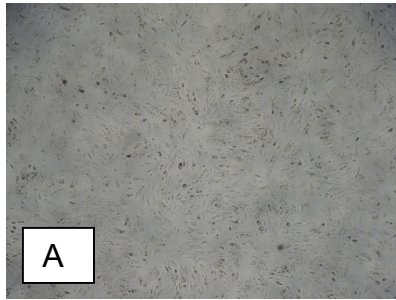
Abbildung 23 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: Expression von PPAR γ normalisiert zu hprt; (Error bars =Standardabweichung)

4.3.1.2. Unter adipogenen Bedingungen

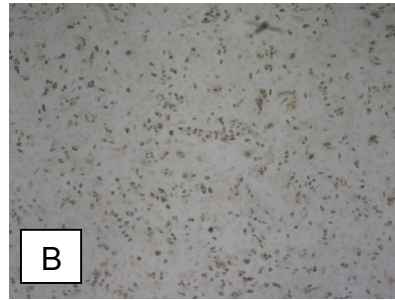
Unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol konnten in den durchgeführten Untersuchungen teils Hinweise auf eine Steigerung der Adipogenese gefunden werden. Dieser Trend ist tendenziell phänotypisch sowie an einer erhöhten Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität erkennbar. Molekularbiologisch werden mit ansteigender Östrogenkonzentration vermehrt die adipogenese-relevanten Proteine PPAR γ und LPL exprimiert. Bemerkbar machen sich diese Effekte ab einer Östrogen-Konzentration von 10^{-10} M.

4. Ergebnisse

d7



d14



d21

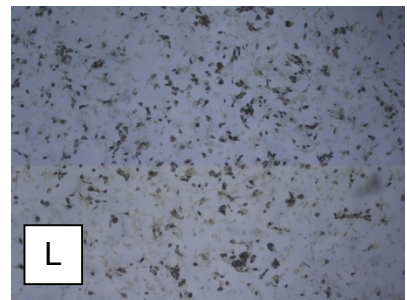
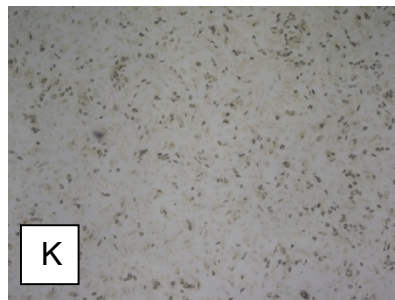
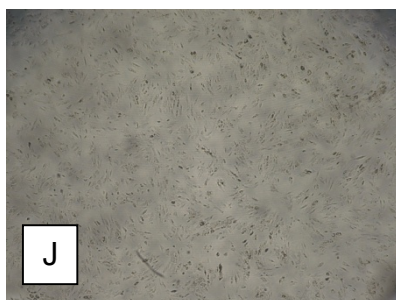
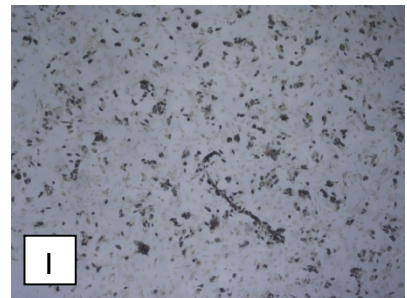
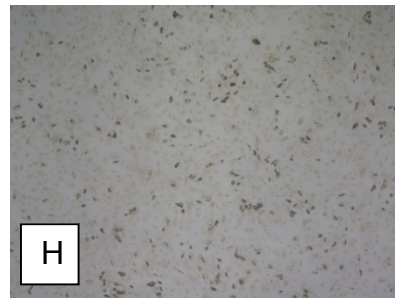
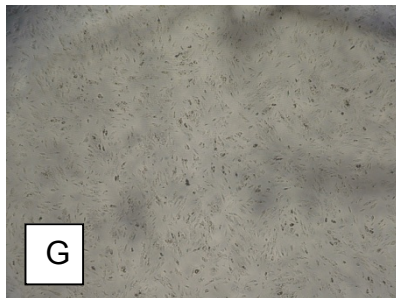
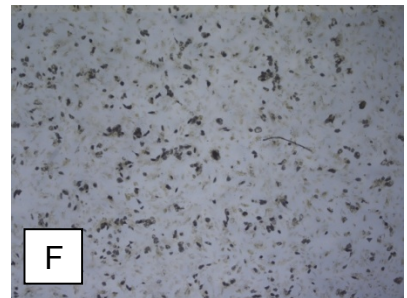
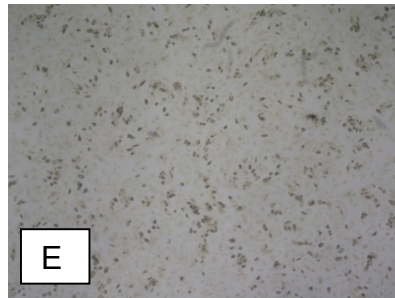
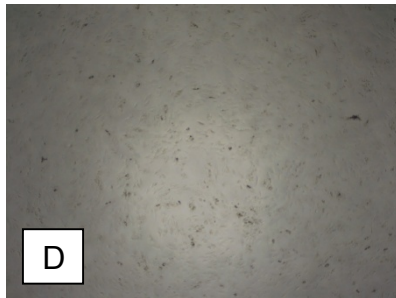
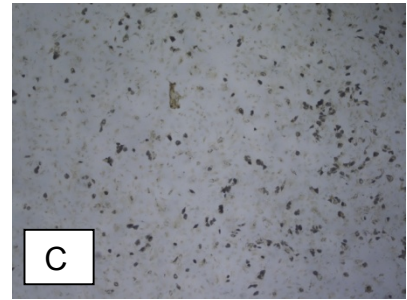


Abbildung 24 A-L: Einfluss von 17- β -Östradiol (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) auf die Adipogenese von hMSC unter adipogenen Bedingungen; Alizarin Red Färbung; Vergrößerung 2x

4. Ergebnisse

Die histologische Auswertung des Einflusses von Östrogen auf die Adipogenese unter adipogenen Bedingungen zeigt eine dezente tendenzielle konzentrationsabhängige Verstärkung der Fettbildung. In der Histologie ist an Tag 7 sowohl unter rein adipogenen Bedingungen als auch bei den mit Östrogen versetzten Medien eine beginnende Adipogenese zu erkennen. Von Tag 7 zu Tag 14 ist die Vermehrung der Anzahl der Adipozyten am stärksten. Eine Hormonabhängigkeit ist nach zweiwöchiger Kulturdauer histologisch nicht nachweisbar. Die Anzahl der Fettzellen nimmt von Tag 14 zu Tag 21 nicht derart ausgeprägt zu wie innerhalb der ersten beiden Wochen. Nach dreiwöchiger Kultur ist eine tendenzielle östrogenabhängige Verstärkung der Adipogenese zu sehen, allerdings ist diese Zunahme nicht signifikant.

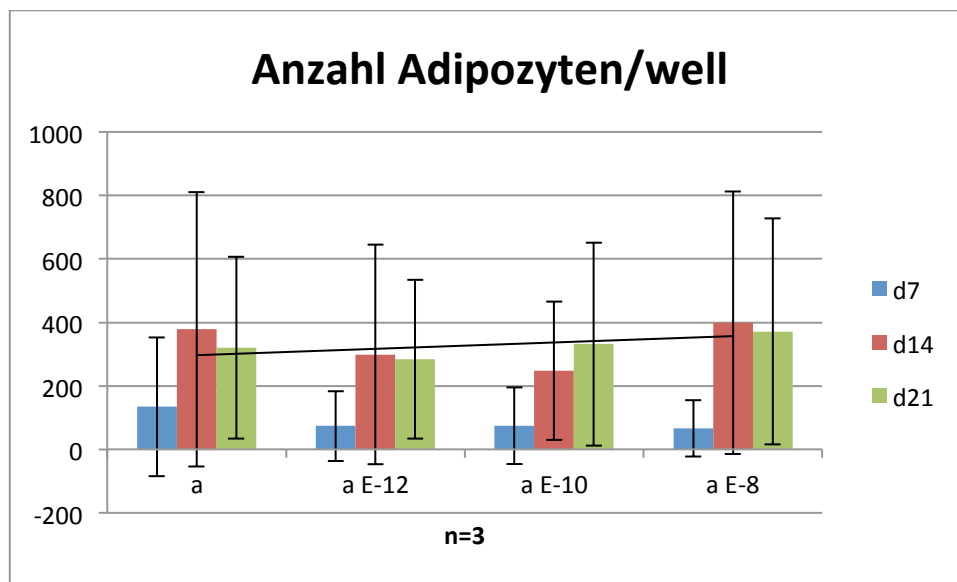


Abbildung 25 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: Anzahl der Zellen pro well; (Error bars: Standardabweichung)

Einen Nachweis für die histologische Beobachtung kann auch auf enzymatischer Ebene erbracht werden. Die Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase zeigt eine Entwicklung analog zu der in der Histologie gesehenen Verstärkung der Adipogenese. Tendenzen bezüglich der Hormonabhängigkeit sind hierbei allerdings schon an Tag 14 messbar. Bei einer Östrogenkonzentration von 10^{-12} M ist an d14 nahezu eine Verdreifachung der Absorptionsänderung auf 0,0028 im Vergleich zur Kontrolle (0,0010) zu messen, an Tag 21 ist dieser Unterschied nicht mehr vorhanden (0,0039 vs. 0,0040). Erhöhungen der Hormonzugabe auf 10^{-10} M sowie 10^{-8} M führen ebenfalls zu einem Enzymaktivitätsanstieg an Tag 14 (0,0034 und 0,0036)

4. Ergebnisse

und zusätzlich zu einer Steigerung auch an Tag 21 (0,0049 und 0,0051) im Vergleich zur Kontrolle (0,0039). Signifikant ist dabei allerdings lediglich der Anstieg bei der Konzentration von 10^{-10} M, sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21.

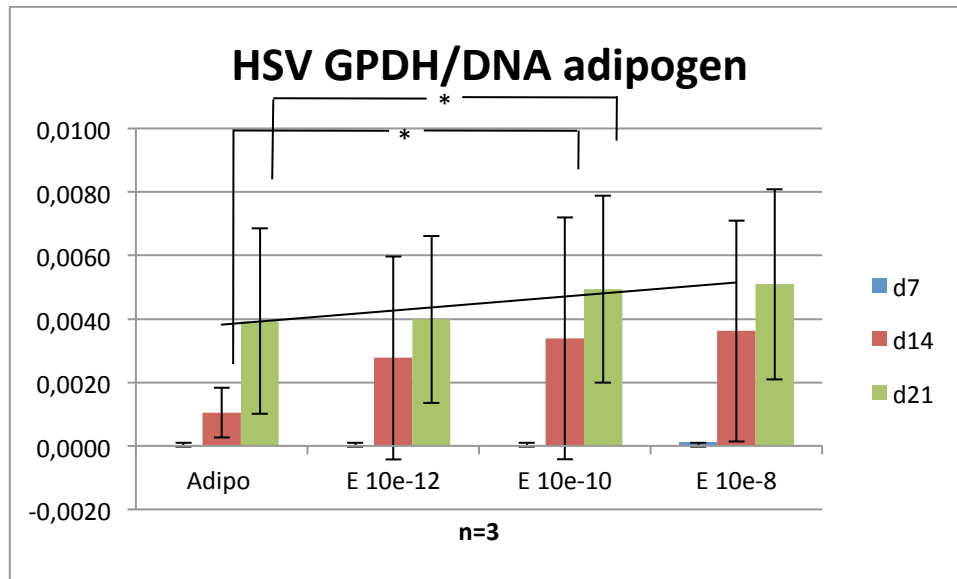


Abbildung 26 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase normiert zur DNA-Menge pro Bedingung; (Error bars =Standardabweichung)

Auch in der Expression der adipogenen Marker spiegelt sich das histologische Ergebnis wieder: Es lässt sich in der PPAR γ -Analyse eine vermehrte, allerdings nicht signifikant erhöhte Expression an Tag 21 bei den Östrogen-Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-8} M im Bezug zu der rein adipogenen Bedingung sowie der Östrogen-Konzentration 10^{-12} M verzeichnen. Weitere Auffälligkeiten liegen nicht vor.

Die Beeinflussung der Adipogenese durch 17- β -Östradiol zeigt sich ebenfalls, allerdings nicht signifikant bei der LPL-Expression. Auch hier bewirkt die Zugabe der beiden hohen Östrogen-Konzentrationen eine Steigerung der Expression des Proteins. Bei 10^{-10} M ist dies erst am Tag 21 zu erkennen, bei 10^{-8} M zeigte sich dieser Effekt schon an Tag 14. Die niedrige Östrogenkonzentration zeigt im Vergleich zur adipogenen Bedingung keine Auswirkung auf die Expression von LPL.

4. Ergebnisse

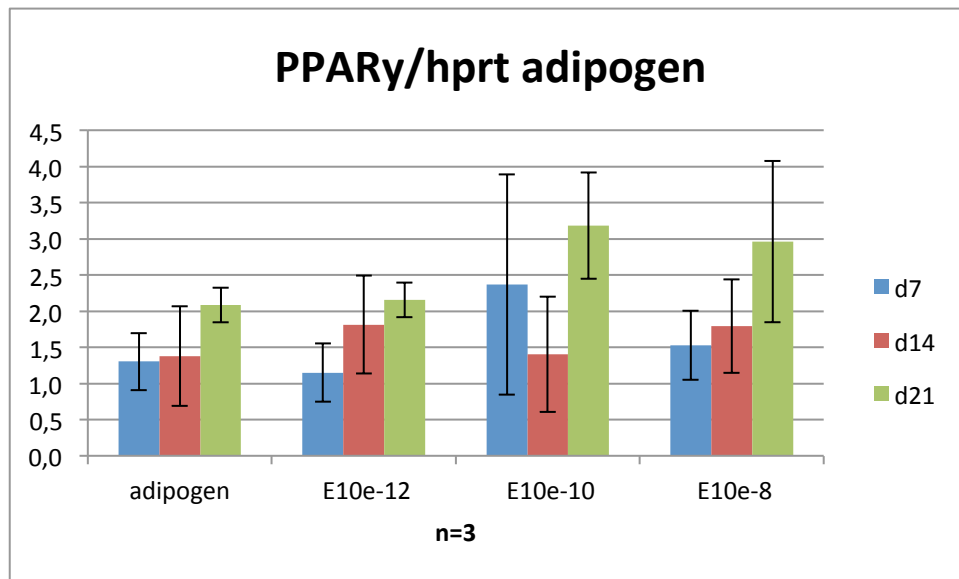


Abbildung 27 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: PPAR γ normiert zu hprt; (Error bars =Standardabweichung)

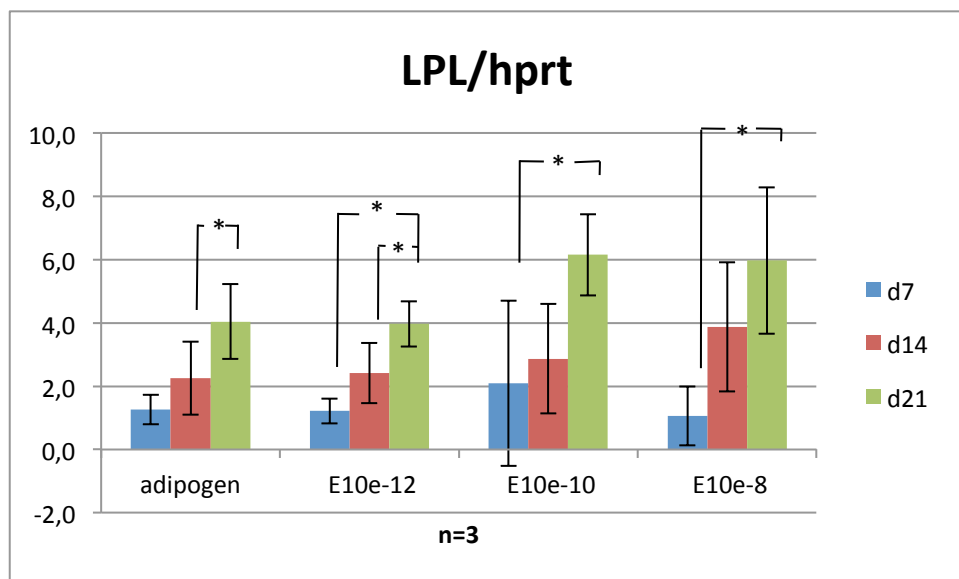


Abbildung 28 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: LPL normiert zu hprt; (Error bars =Standardabweichung)

4.3.1.3. Unter gemischten Bedingungen

Zunächst ist bei Betrachtung der gemischten Bedingungen festzustellen, dass Adipogenese unter gemischt adipogen-osteogenen Bedingungen möglich ist. Generell fällt bei der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase eine geringere Aktivität als bei rein adipogenen Bedingungen auf, die Expression der Adipogenese-spezifischen Protei-

4. Ergebnisse

ne ist im Vergleich zu den adipogenen Bedingungen reduziert. Ein hormonabhängiger Effekt lässt sich enzymatisch nicht feststellen, auf genetischer Ebene nimmt die Adipogenese tendenziell konzentrationsabhängig ab.

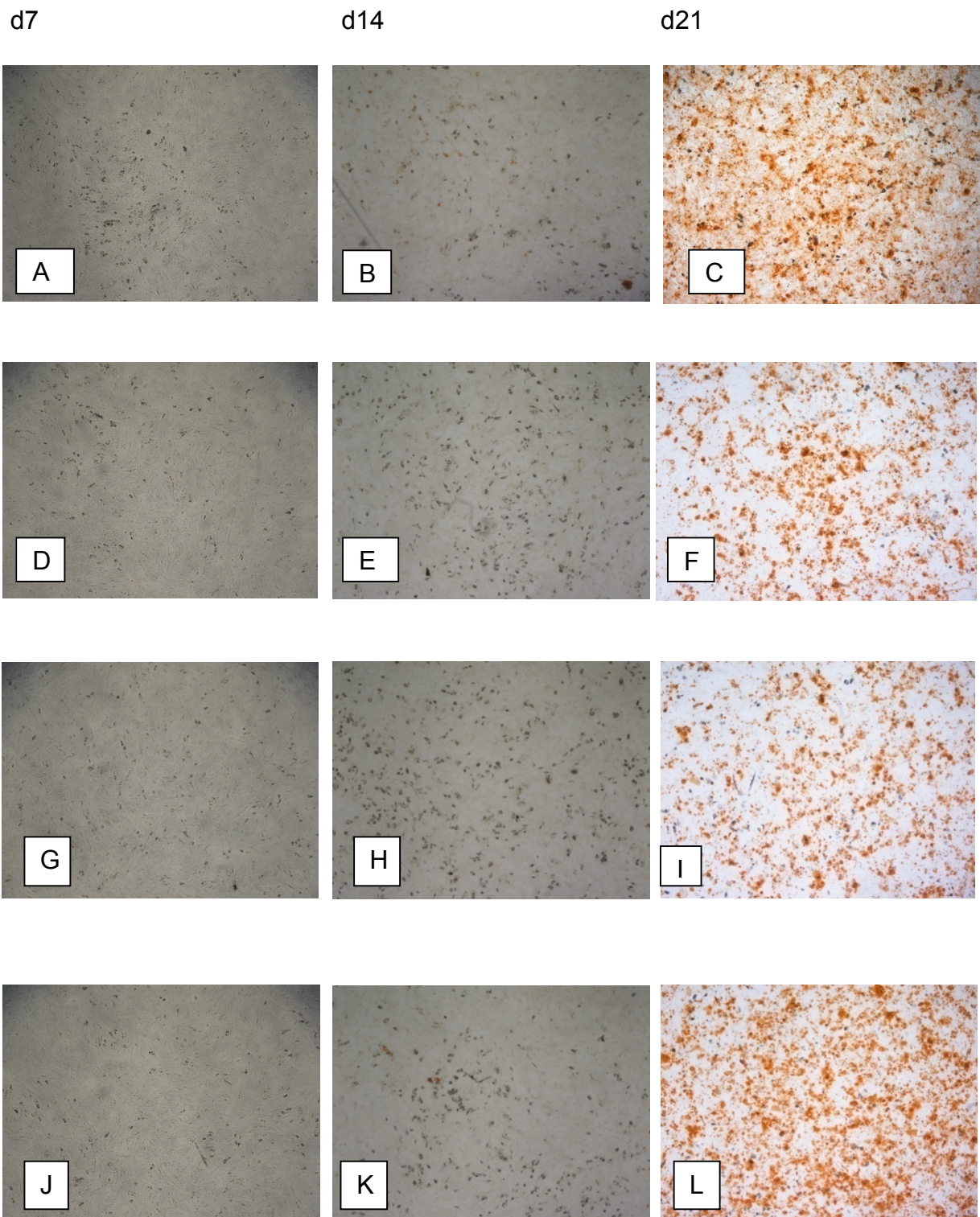


Abbildung 29 A-L: Einfluss von 17- β -Östradiol (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) auf die Adipogenese von hMSC unter gemischten Bedingungen; Alizarin Red Färbung; Vergrößerung 2x

4. Ergebnisse

In der Histologie ist ab Tag 7 Adipogenese zu beobachten. An Tag 14 hat die Anzahl an Fettzellen weiter zugenommen, eine eindeutige Hormonabhängigkeit innerhalb der ersten beiden Wochen ist nicht zu erkennen. Eine leicht verstärkte Adipogenese ist an Tag 14 bei der Konzentration 10^{-10} M (Abbildung 29, H) zu verzeichnen. Auch nach 21 Tagen Kulturdauer ist phänotypisch kein eindeutiger Einfluss des Hormons auf das Ausmaß der Adipogenese festzustellen. Insgesamt gesehen entscheiden sich bei gemischter Differenzierung weniger Zellen als bei reiner Adipogenese in Richtung Fettzelle (vgl. Abb. 25 und 30).

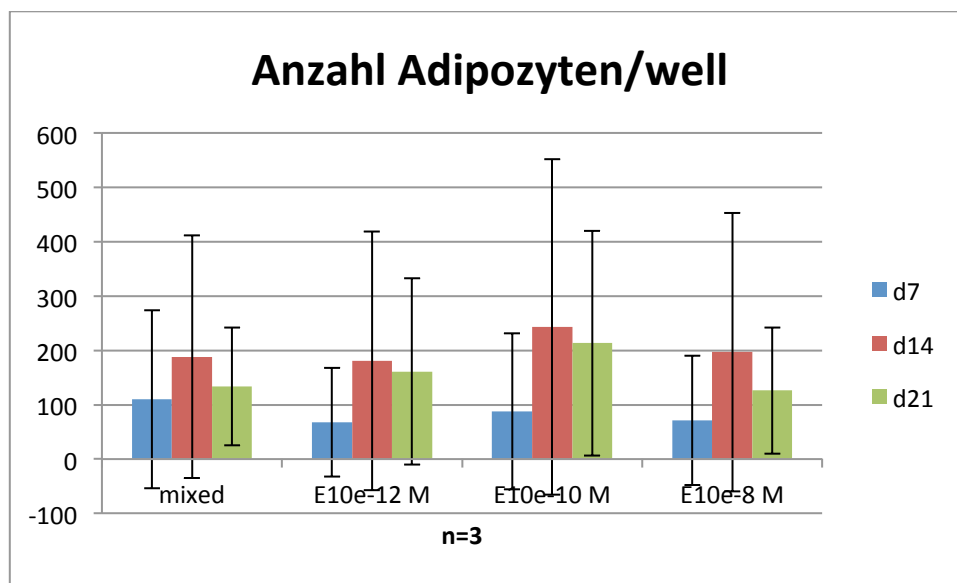


Abbildung 30 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: Anzahl der Zellen pro well; (Error bars: Standardabweichung)

4. Ergebnisse

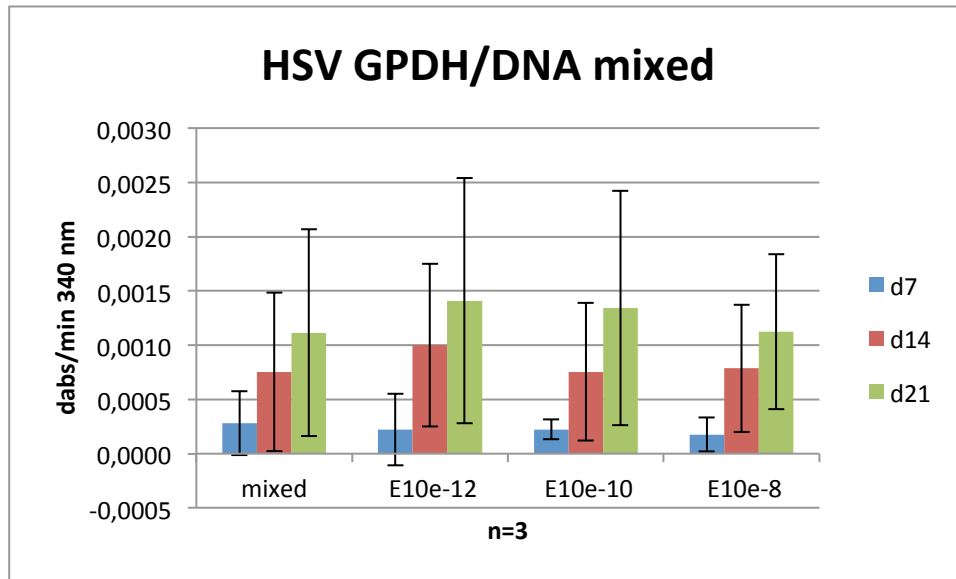


Abbildung 31 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Aktivität der GPDH normiert zur DNA-Menge; (Error bars =Standardabweichung)

Bei der Betrachtung der auf die DNA-Menge normalisierten GPDH-Aktivität fällt im Vergleich zur Adipogenese unter rein adipogenen Bedingung die deutlich geringere Enzymtätigkeit auf (vgl.4.3.1.2.). Die Zugabe von Östrogen in den Konzentrationen 10^{-12} M, 10^{-10} M und 10^{-8} M zeigte keine enzymatisch messbaren Auswirkungen auf die Fettbildung.

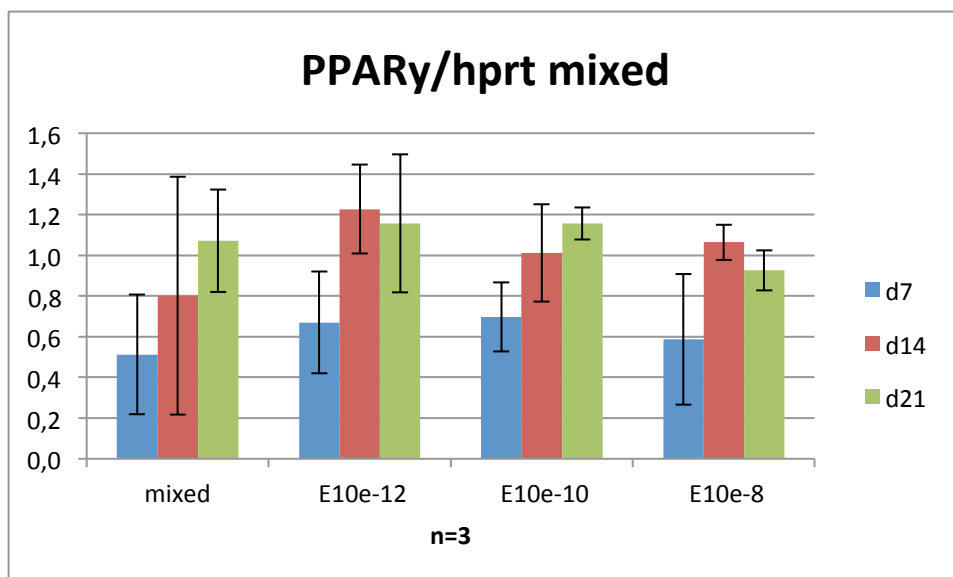


Abbildung 32 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: PPARy normiert zu hprt; (Error bars =Standardabweichung)

4. Ergebnisse

Auf genetischer Ebene zeigt die Expression des frühen Adipogenese-Markers PPAR γ (vgl. Abb. 32) an Tag 7 keine hormonbedingten Veränderungen bei den einzelnen Bedingungen. An Tag 14 lässt sich allerdings durch den Einfluss des Östrogens der Trend zu einer Erhöhung der Transkription von PPAR γ erkennen.

Bei Betrachtung des Markers LPL ist die das Gen schon an Tag 7 bei den Konzentrationen 10^{-12} M und 10^{-10} M verstärkt exprimiert (jeweils 0,45) im Vergleich zur basalen Bedingung, dort ergibt sich ein Wert von 0,27. Bei 10^{-8} M entspricht der gemessene Wert nahezu der Kontrolle. An Tag 14 kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Expression in allen Bedingungen. Der stärkste Anstieg ist analog zu der PPAR γ -Expression an Tag 14 bei der Konzentration 10^{-12} M zu verzeichnen. Ein signifikanter Einfluss durch das Hormon ist nicht vorhanden. An Tag 21 kommt es zu einem Abfall der Expression in den einzelnen Bedingungen. In der Kontrolle wird ein Wert von 0,55 gemessen, bei 10^{-12} M (0,84) und 10^{-10} M (0,71) etwas vermehrt. Bei der höchsten Östrogenkonzentration 10^{-8} M hat der Wert nahezu den der Kontrolle: 0,57.

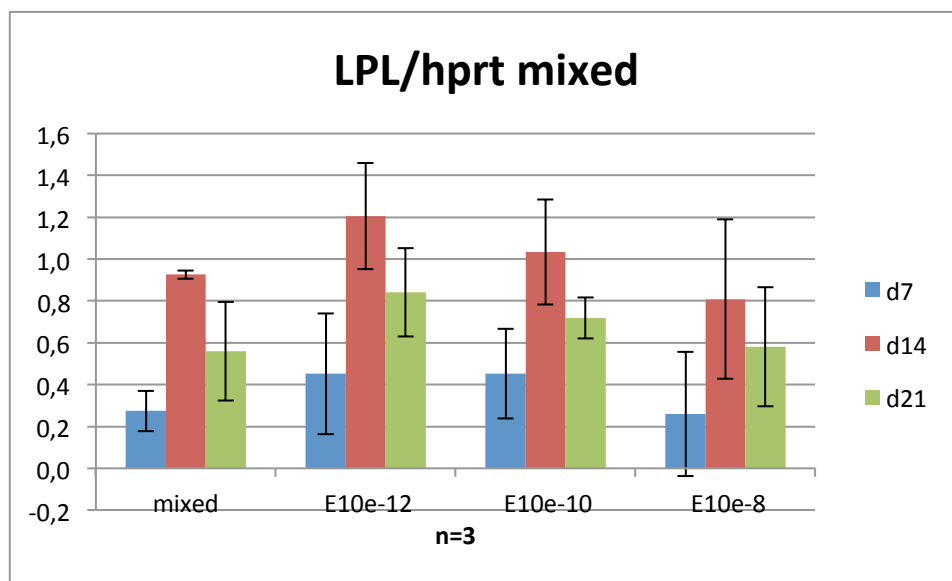


Abbildung 33 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: LPL normiert zu LPL; (Error bars =Standardabweichung)

4. Ergebnisse

4.3.2. Einfluss von Östrogen auf die Osteogenese

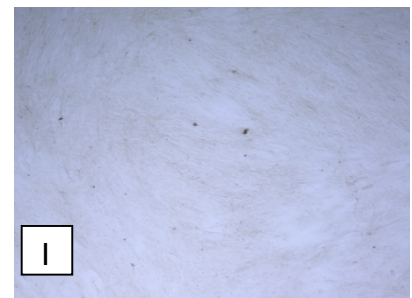
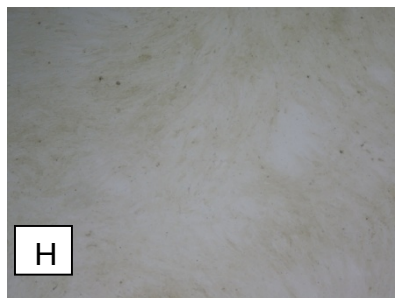
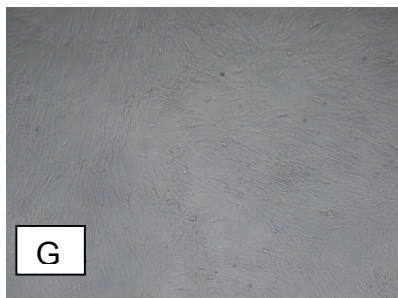
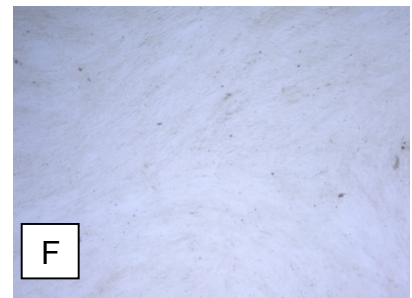
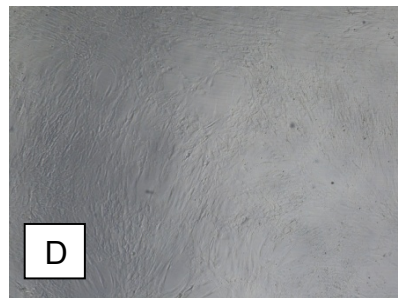
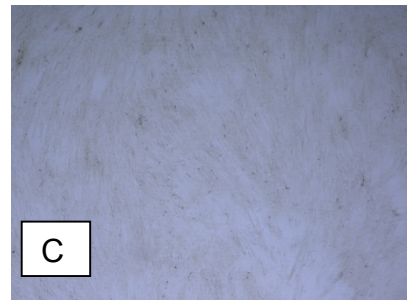
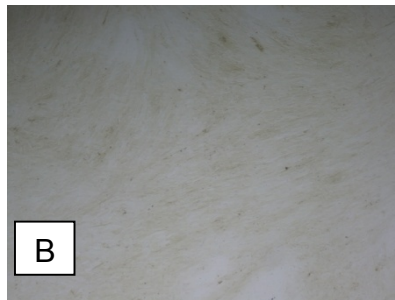
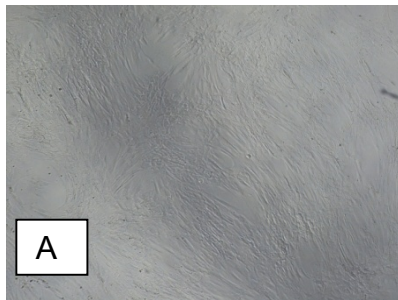
4.3.2.1. Unter basalen Bedingungen

Osteogenese kann unter rein basalen Bedingungen zu keinem Zeitpunkt der Zellkultur sowohl ohne als auch nach Zugabe von Östrogen induziert werden. Dies wird in der Histologie deutlich: Nach Färbung mit Alizarin Red zeigen sich keine angefärbten Bereiche.

d7

d14

d21



4. Ergebnisse

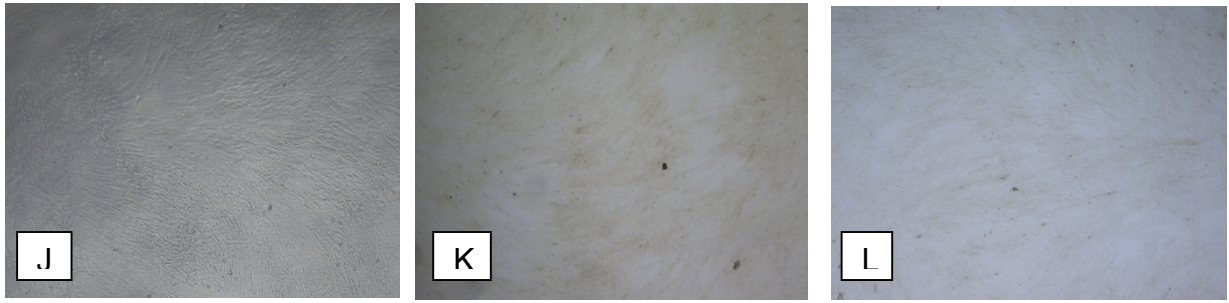


Abbildung 34 A-L: Einfluss von Östrogen (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) im Rahmen der osteogenen Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen; Alizarin Red Färbung, Vergrößerung 2x: Es ist unter basalen Bedingungen keine Osteogenese induzierbar.

Sichtbar sind lediglich humane mesenchymale Stammzellen mit ihren länglichen Zellausläufern. Die Konfluenz der Zellen nimmt durch Amplifikation von Tag 7 bis Tag 21 deutlich zu, was auch in der Quantifizierung der DNA deutlich wird. Bei 10^{-10} M kommt es an Tag 21 zu einer signifikanten Vermehrung der DNA-Menge durch Östrogen.

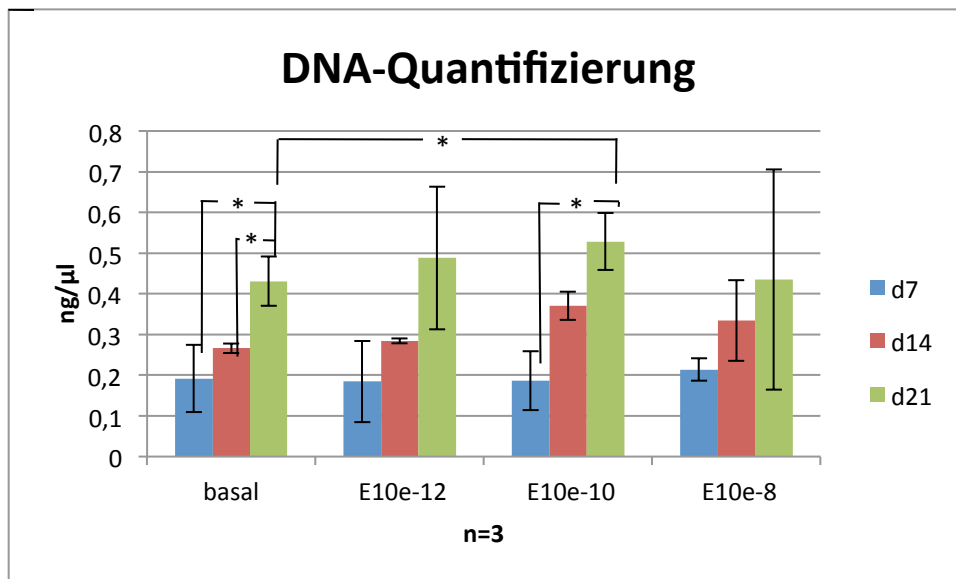


Abbildung 35 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: DNA-Quantifizierung; (Error bars =Standardabweichung)

Bei der Aktivität der alkalischen Phosphatase, welche unter anderem ein Indikator für das Ausmaß der Osteogenese ist, bewirkt Östrogen keine Veränderungen in der Umsetzung des Substrates unter osteogenen Bedingungen.

4. Ergebnisse

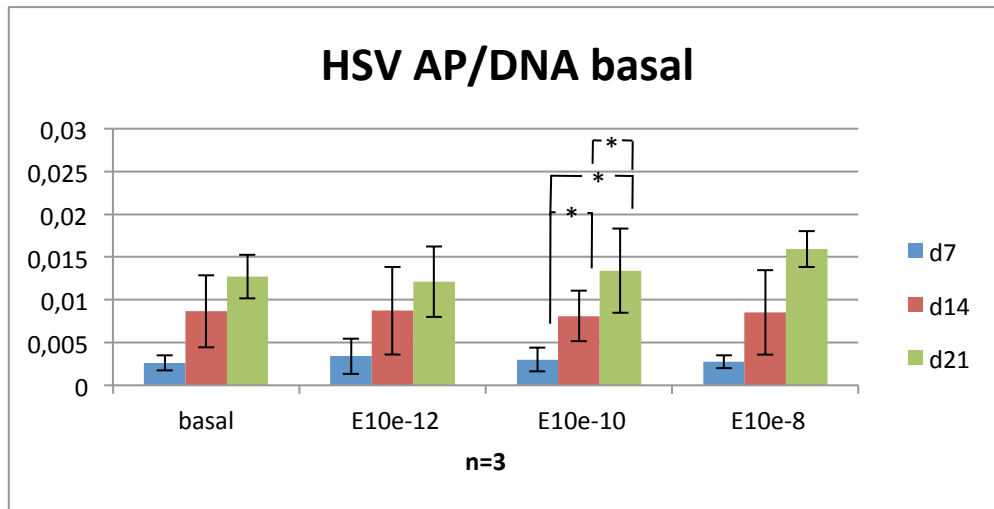


Abbildung 36 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase; (Error bars =Standardabweichung)

4.3.2.2. Unter osteogenen Bedingungen

Eine Hormonabhängigkeit ist sowohl phänotypisch als auch bei der Analyse der Enzymaktivität nicht vorhanden. Die Untersuchung der Expression der Differenzierungsmarker zeigt tendenzielle Veränderungen unter Hormoneinfluss im Sinne einer Steigerung der Osteogenese unter 17- β -Östradiol-Zusatz.

4. Ergebnisse

d7

d14

d21

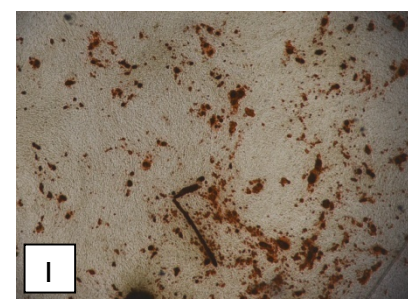
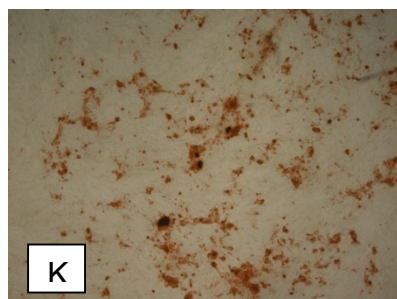
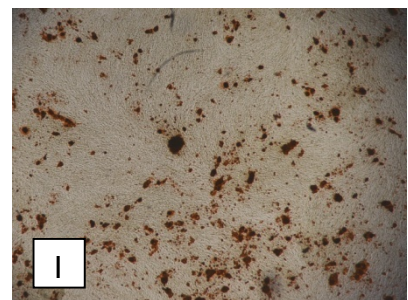
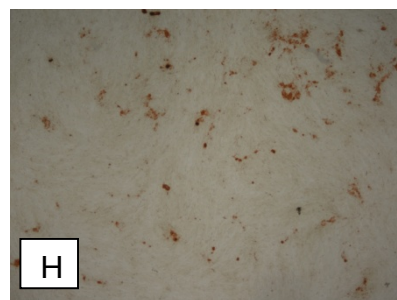
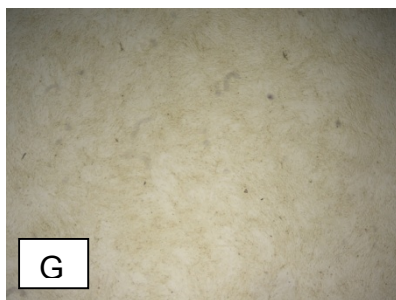
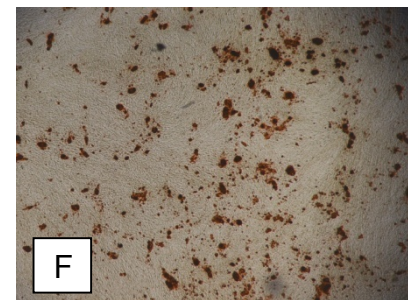
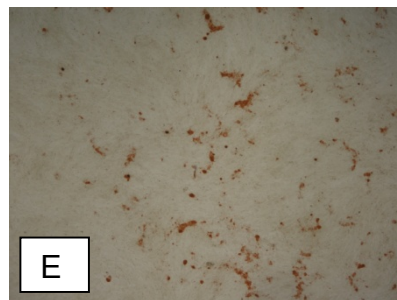
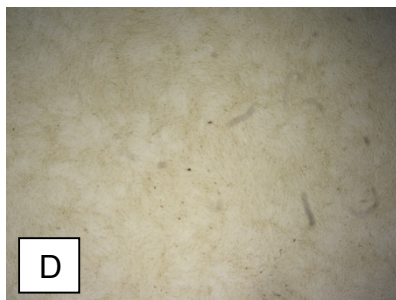
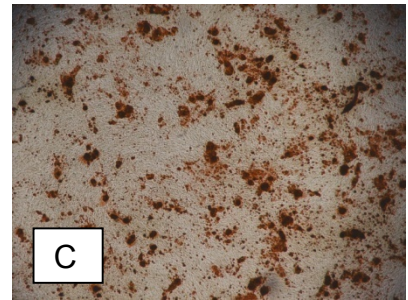
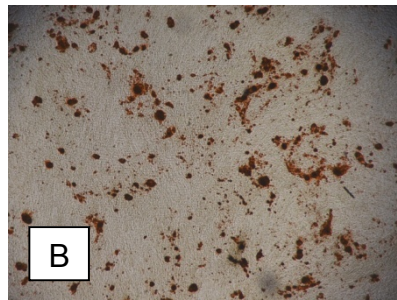
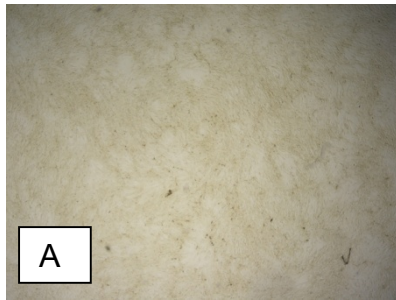


Abbildung 37 A-L: Einfluss von Östrogen (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) im Rahmen der osteogenen Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingung; Alizarin Red Färbung, Vergrößerung 2x

Am Tag 7 ist noch keine mineralisierte Matrix zu sehen. Am Tag 14 kann Mineralisation mit der Alizarin Red-Färbung detektiert werden. Dabei ist sowohl bei rein osteo-

4. Ergebnisse

gener Differenzierung (Abbildung 37, B) als auch bei einer Östrogen-Konzentration von 10^{-8} M (Abbildung 37, K) eine etwas stärkere Anfärbung vorhanden. An Tag 21 hebt sich die rein osteogene Bedingung (Abbildung 37, C) bezüglich der Calcium-Färbung hervor, die mit Östrogen versetzten Medien zeigen keine Differenzen (Abbildung 37, F, I, L).

Bei Auswertung der Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigt sich in allen vier Bedingungen ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivität. Die Werte an Tag 7 liegen dabei nahezu identisch zwischen 0,011 und 0,015 und zeigen dann eine simultane Progredienz bis zu Tag 21 ohne Abweichungen aufgrund der Hormonzugabe.

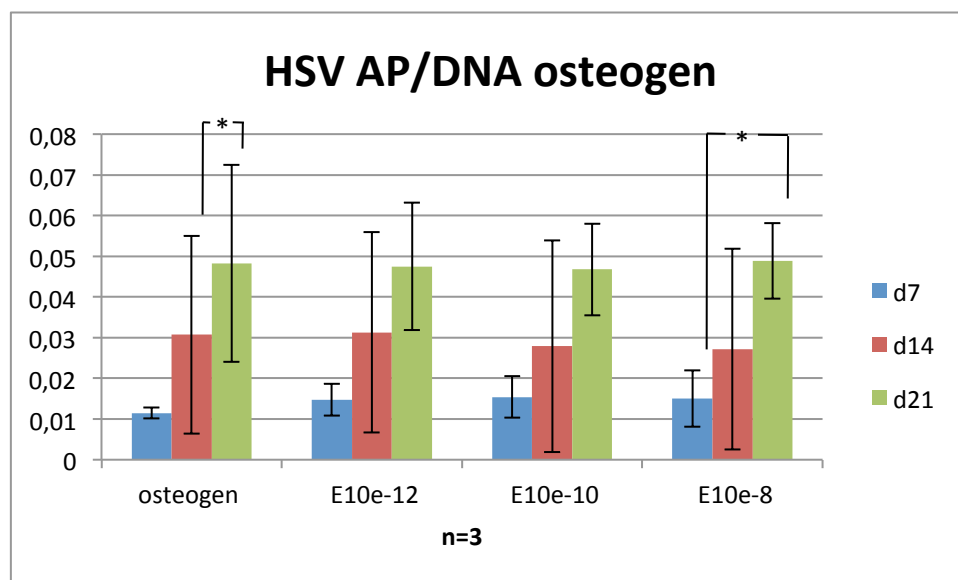


Abbildung 38 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase; (Error bars =Standardabweichung)

Bei Betrachtung der osteogenen Marker zeigt die Expression von runX2v3 an Tag 7 keine signifikanten Unterschiede für alle Bedingungen. Am Tag 14 werden für die hormonsupplementierten Bedingungen höhere Werte im Vergleich zur rein osteogenen Bedingung gemessen. Eine Konzentrationsabhängigkeit besteht dabei nicht. Diese nicht signifikante Beobachtung setzt sich gleichermaßen an Tag 21 fort.

4. Ergebnisse

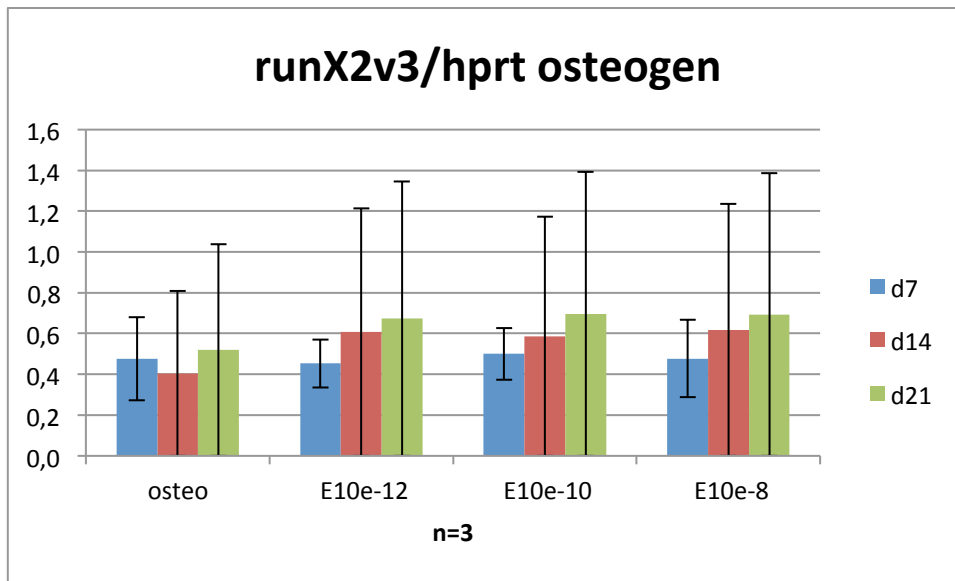


Abbildung 39 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Expression von runX2v3 normiert auf hprt; (Error bars =Standardabweichung)

Die Transkription des osteocalcin-Gens wird in der folgenden Tabelle sichtbar:

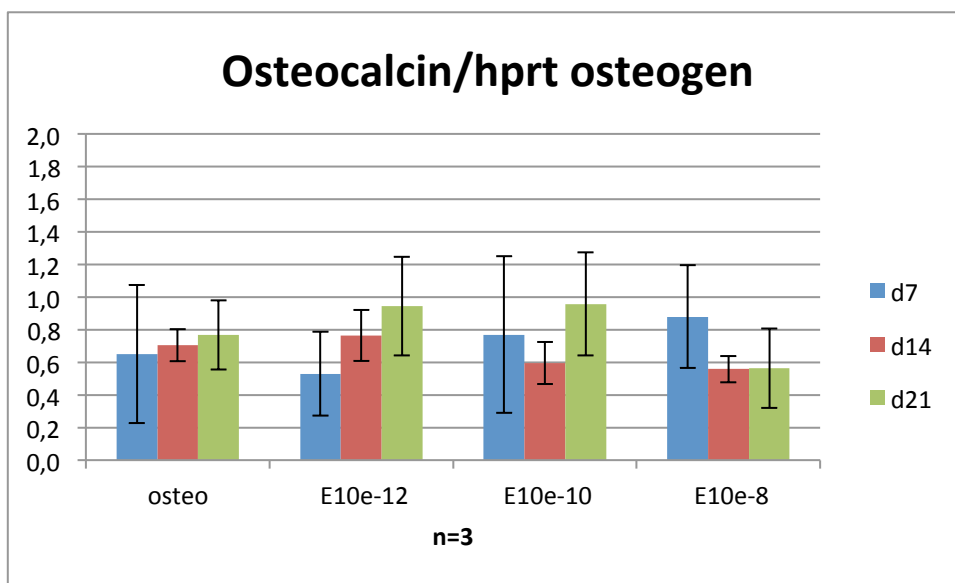


Abbildung 40 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Osteocalcin-Expression normiert auf hprt; (Error bars =Standardabweichung)

Östrogeneinfluss führt an Tag 7 zu einer tendenziellen Erhöhung der osteocalcin-Expression bei 10^{-10} M und 10^{-8} M. An Tag 14 ist eine hormonabhängige Veränderung der Expression nicht zu erkennen. Nach dreiwöchiger Kultur werden bei einer Östrogenkonzentration von 10^{-12} M und 10^{-10} M erhöhte Werte im Vergleich zur rein osteogenen Bedingung gemessen. Bei 10^{-8} M dagegen liegt der Wert unter dem von Tag 7.

4. Ergebnisse

Mineralisation und damit Calcium-Messung mittels des Alizarin-Essays kann entsprechend der Histologie an Tag 7 nicht erfolgen. Ab Tag 14 kann der Nachweis einer Osteoid-Bildung erbracht werden.

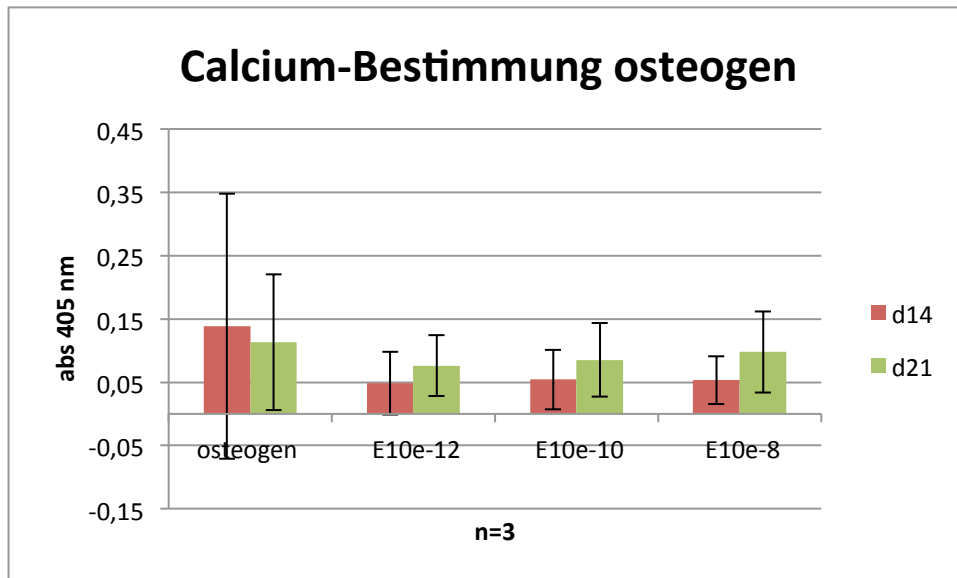


Abbildung 41 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Quantifizierung der Mineralisation mittels Alizarin-Red-Assay; (Error bars =Standardabweichung)

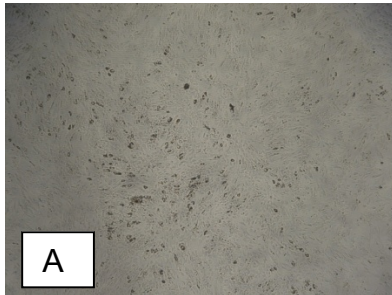
Bei rein osteogenen Medienbedingungen wird nach zweiwöchiger Kultur eine Absorption von 0,13 bei 405 nm bei hoher Standardabweichung gemessen, an Tag 21 liegt der Wert bei 0,11. Die Absorption in den mit Östrogen versetzten Medien zeigt konzentrationsunabhängige nahezu identische Werte sowohl an Tag 14 (0,048; 0,054; 0,053) als auch an Tag 21 (0,076; 0,085; 0,097). Signifikante Absorptionsveränderungen treten nicht auf.

4. Ergebnisse

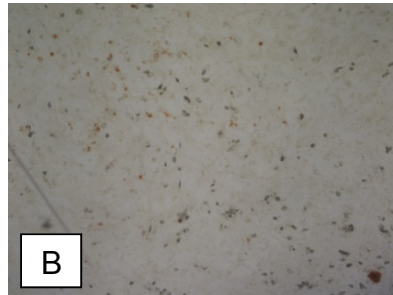
4.3.2.3. Unter gemischten Bedingungen

In der histologischen Untersuchung zeigt sich folgender Einfluss von Östrogen auf die Differenzierung:

d7



d14



d21

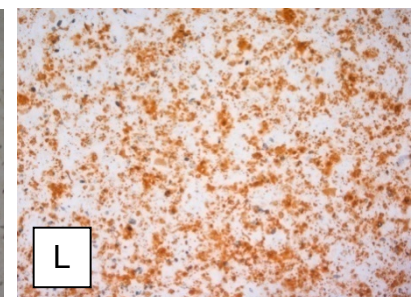
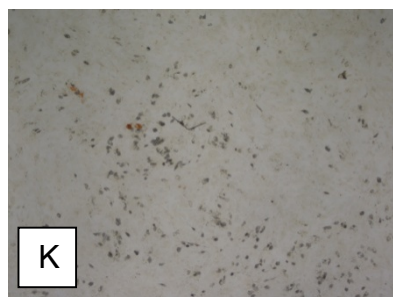
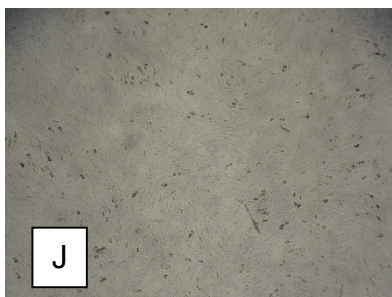
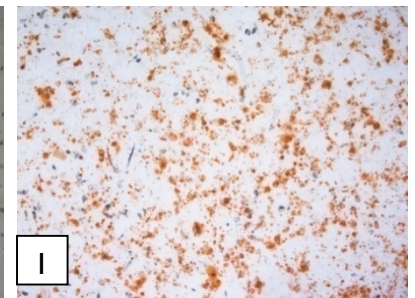
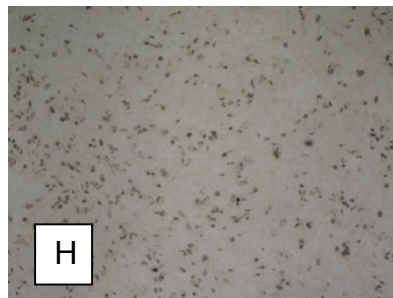
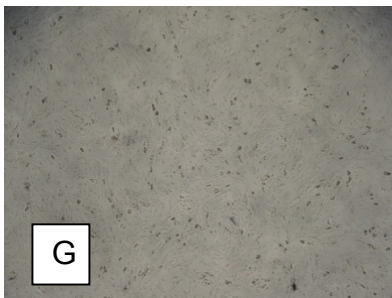
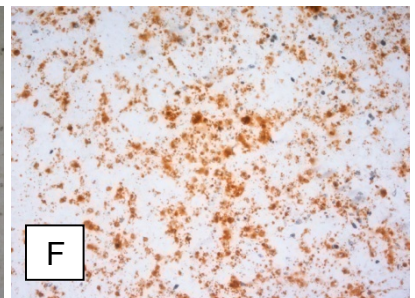
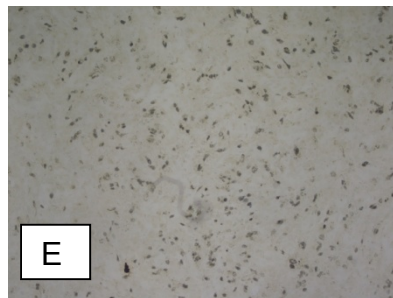
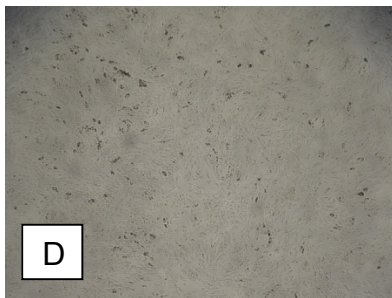
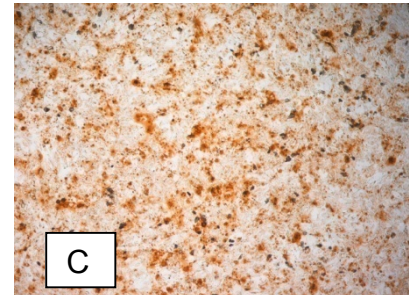


Abbildung 42 A-L: Einfluss von 17- β -Östradiol (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) auf die Osteogenese von hMSC unter gemischten Bedingungen; Alizarin Red Färbung; Vergrößerung 2x; An Tag 7 ist noch keine Osteogenese zu erkennen. Nach zweiwöchiger Kultur haben sich sowohl in der rein osteogenen Bedingung (B) und bei einer Östrogenkonzentration von 10^{-8} M (K) vereinzelt Osteoidnester gebildet. An Tag 21 findet in allen Bedingungen Osteogenese statt. Dabei ist in der rein osteogenen Bedingung (B) und bei einer Östrogenkonzentration von 10^{-8} M (K) die Anfärbung stärker als bei 10^{-12} M (F) und 10^{-10} M (I).

4. Ergebnisse

An Tag 7 ist in keiner Bedingung die Bildung von Osteoid nachweisbar. Nach zweiwöchiger Kultur haben sich sowohl in der rein osteogenen Bedingung (Abbildung 42, B) und bei einer Östrogenkonzentration von 10^{-8} M (Abbildung 42, K) vereinzelt Osteoidnester gebildet. An Tag 21 findet in allen Bedingungen Osteogenese statt. Dabei ist in der rein osteogenen Bedingung (Abbildung 42, C) und bei einer Östrogenkonzentration von 10^{-8} M (Abbildung 42, L) die Anfärbung stärker als bei 10^{-12} M (Abbildung 42, F) und 10^{-10} M (Abbildung 42, I).

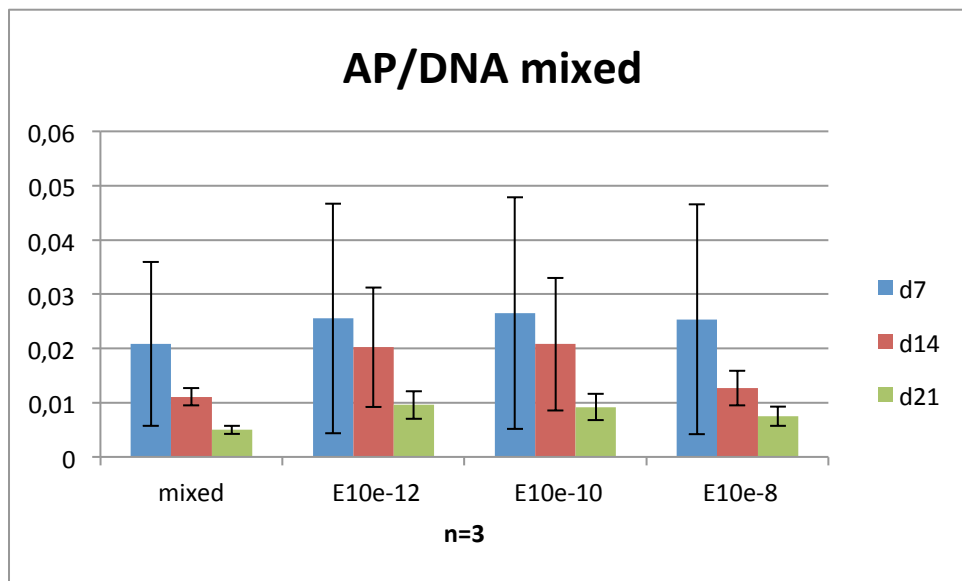


Abbildung 43 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase; (Error bars =Standardabweichung)

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist generell im Vergleich zur Differenzierung unter osteogenen Bedingungen reduziert (vgl. 4.3.2.2.). Desweiteren fällt auf, dass der höchste Wert jeweils an Tag 7 gemessen wird. Die mit Östrogen versetzten Kulturen haben dabei einen höheren Ausgangswert (vgl. Abb. 43). An Tag 14 ist die Aktivität des Enzyms jeweils herabgesetzt im Vergleich zur Vormessung. 10^{-12} M und 10^{-10} M Östrogenzusatz zeigen dabei deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zur rein gemischten Differenzierung an Tag 14 sowie 21. Die mit einer Konzentration von 10^{-8} M versetzte Bedingung zeigt ein ähnliches Verhalten wie die Kontroll-Bedingung bezüglich der Enzymaktivität. Die Veränderungen sind nicht signifikant.

Die Betrachtung des frühen genetischen Osteogenesemarkers runX2v3 zeigt eine nahezu gleichmäßige Expression aller Bedingungen an Tag 7. Bei Analyse von Tag 14 fällt bei den hormonabhängigen Bedingungen eine erhöhte Expression konzentra-

4. Ergebnisse

tionsunabhängig im Vergleich zur Kontrollkultur auf. Diese ist nicht signifikant. An Tag 21 ist noch bei 10^{-12} M eine höhere Transkription des Gens zu messen. Bei 10^{-10} M ist Der Wert auf dem Niveau der Kontrolle, 10^{-8} M führt zu einer leicht verminderten Expression.

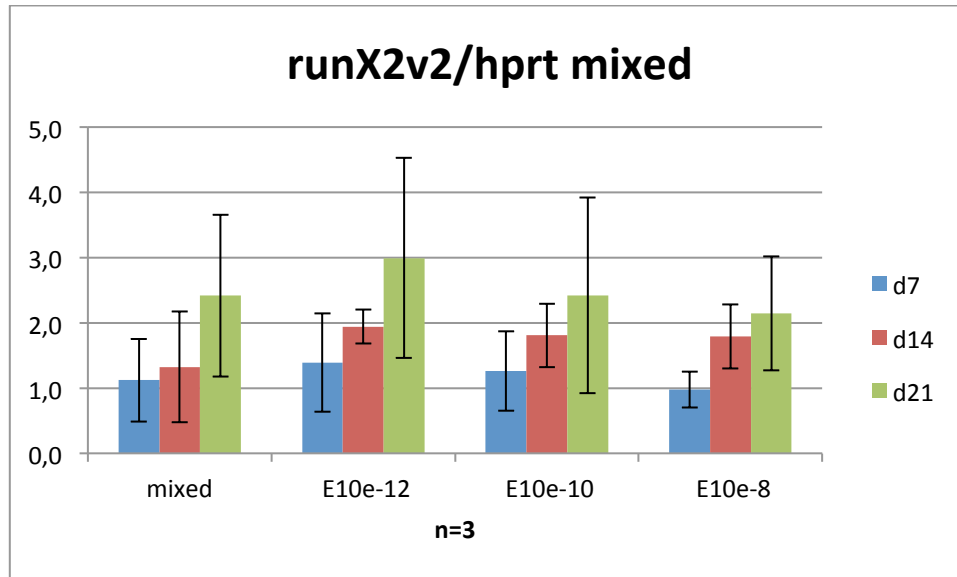


Abbildung 44 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: runX2v3-Expression normiert auf hprt; (Error bars =Standardabweichung)

Die osteocalcin-Expression erfährt an Tag 7 keine signifikanten interindividuellen Schwankungen. Nach zweiwöchiger Kulturdauer ist bei Hormonzusatz eine leichte Steigerungstendenz der Expression im Vergleich zur rein gemischten Kultur zu verzeichnen. Dieser Anstieg ist nicht konzentrationsabhängig. An Tag 21 finden sich keine deutlichen Veränderungen im Bezug auf die Kontrolle.

4. Ergebnisse

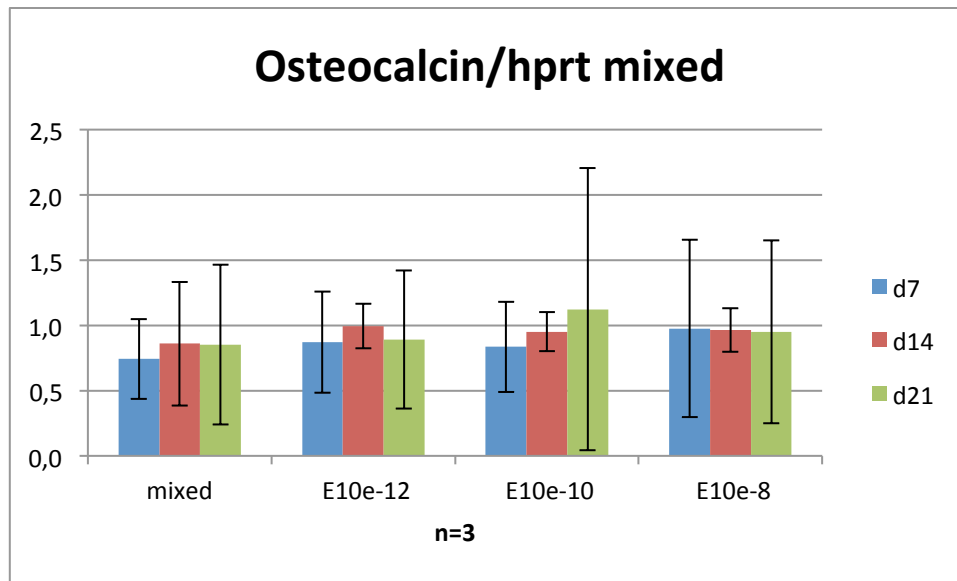


Abbildung 45 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Osteocalcin-Expression normiert auf hprt; (Error bars =Standardabweichung)

Im Rahmen der Calcium-Quantifizierung fällt auf, dass unter gemischten Bedingungen die Osteogenese stärker ist als bei rein osteogenen Bedingung (vgl. 4.3.2.2) Dies ist erkennbar an den höheren Absorptionswerten beim Calcium-Nachweis.

An Tag 7 kann keine Absorption bei 405 nm nachgewiesen werden. Nach 14-tägiger Kultur waren geringe Mengen messbar: In der rein gemischten Zellkultur als Kontrolle betrug die Absorption 0,026, bei 10^{-12} M und 10^{-10} M lagen die Werte darunter (0,019) beziehungsweise waren nahezu gleichwertig (0,027). Die Messung bei 10^{-8} M an Tag 14 ergab einen leicht höheren Wert bei 0,039. Nach dreiwöchiger Zellkultur zeigte die Kontrollbedingung einen deutlich erhöhten Wert von 0,226 bei hoher Standardabweichung. Die mit einer Konzentration von 10^{-12} M und 10^{-10} M versetzten Kulturen hatten eine gleichwertige Calcium-Bildung mit einer Absorption von 0,15. Den höchsten Wert zeigte die gemischte Bedingung mit einem Östrogen-Zusatz von 10^{-8} M. Dieser lag bei 0,246. Ein signifikanter Einfluss des Östrogens konnte allerdings nicht erbracht werden.

4. Ergebnisse

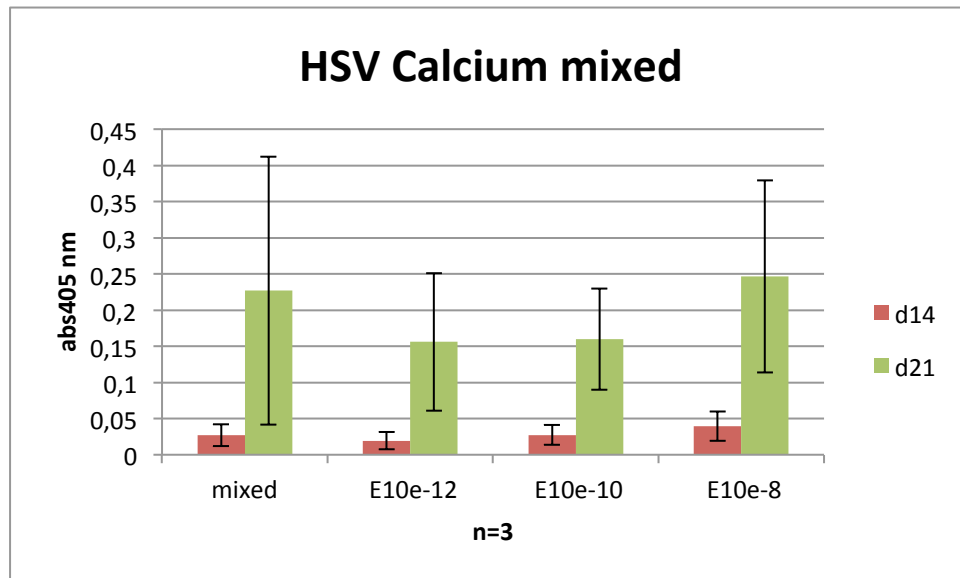


Abbildung 46 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Calcium-Quantifizierung mittels Alizarin-Red Assay; (Error bars =Standardabweichung)

5. Diskussion

5.1. Etablierung eines in-vitro Modells zur gemischten Adipo- und Osteogenese

Modelle zur Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in osteogene, adipogene oder chondrogene Zellen sind bereits gut etabliert (vgl. 1.3. Differenzierungsverhalten der MSCs). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Modell zur Kultur von MSCs unter Medienbedingungen entwickelt werden, welche eine parallel ablaufende Adipo- und Osteogenese ermöglichen. Somit bietet sich die Gelegenheit, die Wechselwirkung zwischen den beiden Differenzierungslinien zu untersuchen.

5.2. Einfluss von 17- β -Östradiol auf die adipogene und osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

5.2.1. Einfluss von Östrogen auf die Adipogenese

5.2.1.1. Unter basalen Bedingungen

Bei Kultivierung von hMSCs unter basalen Bedingungen ohne Zugabe der entsprechenden adipogenen Differenzierungsinduktoren war wie erwartet keine Adipogenese zu erkennen. Histologisch entsprachen die Zellen sowohl nach sieben Tagen als auch nach zwei und drei Wochen Kulturdauer phänotypisch hMSCs. Die fehlende fettspezifische Enzymaktivität unterstreicht die histologische Beobachtung. Die gemessene Zunahme der DNA-Menge für jede Bedingung wird auf die Zellproliferation zurückgeführt. Bei 10^{-10} M kommt es an Tag 21 zu einer signifikanten Vermehrung der DNA-Menge durch Östrogen.

5.2.1.2. Unter adipogenen Bedingungen

Unter dem Einfluss von 17- β -Östradiol kommt es unter rein adipogenen Bedingungen konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der Adipogenese von hMSCs. Dies ist sowohl histologisch, als auch bei der Enzymaktivität und auf Genexpressionsebene nachzuweisen: Bei der Enzymaktivität kommt es bei 10^{-10} M zu einer signifikanten

5. Diskussion

Steigerung der Adipogenese im Vergleich zur Kontrolle. Die übrigen Ergebnisse unterstreichen dies, sind allerdings nicht signifikant.

Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Ijichi et al., die bei Versuchen mit Präadipozyten und pluripotenten mesenchymalen Zellen von Mäusen eine hormonabhängige Steigerung der Adipogenese zeigen konnten. Eine bedeutende Rolle in der Vermittlung dieses Effektes spielt wohl der Estrogen-related receptor α : Seine Stimulierung führt zu einer deutlichen Steigerung der Adipogenese [93]. Dies verdeutlicht auch die Tatsache, dass in ERR α -Knock-out-Mäusen eine deutlich verminderte adipogene Differenzierung beobachtet wurde [104]. Der Einfluss von Östrogen auf die Adipogenese wird dadurch deutlich.

Im Gegensatz dazu allerdings wurde bei der Untersuchung des Einflusses von Östrogen auf differenzierte 3T3-L1 Adipozyten eine Hemmung der Adipogenese durch das Sexualhormon gezeigt [95]. Auch Dang et al. zeigten 2002 bei ihren Versuchen mit klonalen Mauszellen einen inhibitorischen Effekt von Östrogen auf die Adipogenese [77].

Diese widersprüchlichen Erkenntnisse mögen zum einen von den unterschiedlichen Zellkulturen herrühren. Zum anderen sind die genauen Signalwege und das Zusammenspiel von Östrogenen und entsprechenden Rezeptoren mit der Adipogenese noch nicht genau verstanden. Es sind sowohl stimulierende Antworten auf die Aktivierung von Östrogenrezeptoren als auch inhibitorische Reaktionen beschrieben (siehe oben sowie 1.10.).

5.2.1.3. Unter gemischten Bedingungen

Die Adipogenese unter gemischten Bedingungen läuft im Vergleich zu rein adipogenen Bedingungen vermindert ab: Die Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase zeigt eine deutlich geringere Aktivität, auch werden adipogene Marker geringer exprimiert. Auf enzymatischer Ebene ist keine Hormonabhängigkeit messbar. Bei Analyse der Differenzierungsmarker fällt bei einer Hormonkonzentration von 10^{-12} M eine tendenzielle Steigerung der mRNA-Expression bei PPAR γ und LPL im Vergleich zur Kontrolle auf. Diese ist bei 10^{-10} M etwas regredient, bis die

5. Diskussion

Werte bei 10^{-8} M wieder auf dem Level der Kontrolle sind. Es ist folglich nach initialen Anstieg ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Expression zu beobachten. Analoge Daten wurden von Dang et al. 2002 veröffentlicht: Der Einfluss von Östrogen auf die gemischte adipogene und osteogene Differenzierung von klonalen Zellen aus dem Schädeldach der Maus sowie deren Knochenmark zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der Fettbildung. Reziprok dazu wurde eine Steigerung der Osteogenese beobachtet [77].

Dem Einfluss von Östrogen auf die Adipogenese werden, wie bereits beschrieben, sowohl stimulierende als auch inhibitorische Effekte nachgesagt. Als mögliche Erklärung für den Anstieg der Genexpression bei 10^{-12} M könnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der einzelnen Östrogenrezeptor-Subtypen (vgl. 1.10.) in Frage kommen. ER α und β werden erwiesenermaßen in hMSCs exprimiert [92]. Bezüglich seiner Funktion konnte gezeigt werden, dass ER β als Modulator von ER α wirken kann: bei niedrigen E2-Konzentrationen fungiert er als Aktivator, bei höheren Konzentrationen als Inhibitor von ER α [105-106]. Analog dazu könnte die Abnahme der Genexpression von PPAR γ und LPL bei den Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-8} M interpretiert werden.

Desweiteren sind auch splice-Varianten des ER β bekannt. Deren Funktion und Beteiligung an der Adipogenese sind bisher nicht untersucht [77].

5.2.2 Einfluss auf die Osteogenese

5.2.2.1. Unter basalen Bedingungen

Bei dreiwöchiger Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen unter basalen Bedingungen ohne Zusatz der osteogenen Wachstumsfaktoren war keine osteogene Differenzierung nachzuweisen. Auch der Zusatz von Östrogen führte nicht zur Knochenbildung.

Histologisch war eine Zunahme der Zellzahl im Sinne einer Proliferation zu erkennen. Dies zeigte sich an der konstanten Zunahme der DNA-Menge pro Bedingung. Bei 10^{-10} M kommt es an Tag 21 zu einer signifikanten Vermehrung der DNA-Menge

5. Diskussion

durch Östrogen. Ein konzentrationsabhängiger stimulierender Effekt von Östrogen wurde auch von Di Silvio et al. beschrieben [107].

Die Zunahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase wird auf die Vermehrung der Zellzahl zurückgeführt, eine Hormonabhängigkeit war nicht erkennbar.

5.2.2.2. Unter osteogenen Bedingungen

In der Literatur ist ein eindeutiger Einfluss von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel beschrieben (vgl. 1.10.) Die Modulation der Osteogenese von Osteoblasten-Vorläuferzellen zeigte gegensätzliche Erkenntnisse: durch Östrogeneinfluss kam es nur teilweise zu einer Zunahme der Proliferation der Zellen [108-109].

Bei Untersuchungen des Einflusses auf die Differenzierung von MSCs der Maus konnte ein Anstieg von BMP-2 gemessen werden, moduliert über ER α und β [110]. Dieses Protein ist wichtig für die osteogene Differenzierung [111]. Desweiteren ist ein Anstieg der Expression der mRNA des ER α -Rezeptors zu Beginn der Differenzierung bei gleichzeitigem Abfall der mRNA des ER β -Rezeptors nachgewiesen worden. Die Aktivierung von ER α scheint so in frühen Entwicklungsstadien der Skelettentwicklung wichtig zu sein, wobei über den β -Rezeptor die Mineralisation beeinflusst wird. Östrogen hat somit vermutlich abhängig von der Reifung der Zelle unterschiedliche Effekte [107]. Erstmals wurden 2006 Daten veröffentlicht, welche einen proliferativen Effekt dosisabhängig auch bei humanen mesenchymalen Stammzellen nachweisen konnten [107]. Im gleichen Jahr konnten Hong et. al ebenfalls einen stimulatorischen Effekt von Östrogen auf die Osteogenese von hMSCs darstellen: es kam zu einem deutlichen Anstieg der Expression von osteocalcin und der Calcium-Deposition. Einfluss auf die AP-Aktivität wurde nicht erbracht [94]. Die fehlende Eindeutigkeit in den Ergebnissen bezüglich des Einflusses von Östrogen auf die Osteogenese führen Autoren auf die Unterschiede in den Zelllinien (Mauszelllinie, humane Zelllinie), den Differenzierungsstadien, der Zellkultur und den Versuchsbedingungen zurück.

Dabei unterscheiden sich die hier verwendeten Bedingungen zum einen in den Konzentrationen der verwendeten Zusätze, zum anderen variiert der Zeitpunkt der Zugabe der Supplemente: In dieser Arbeit wurden die vollständigen Differenzierungsme-

5. Diskussion

dien vom Tag der Aussaat an hinzugegeben. Bei anderen Autoren wurden diese erst ab einer bestimmten Konfluenz (70%) der Zellen im well verabreicht [94].

Diese Daten bezüglich der Enzymaktivität stimmen mit denen dieser Arbeit überein. Eine Verstärkung der Osteogenese in der Histologie konnte hier nicht erbracht werden. Diese steht im Widerspruch zu Ergebnissen, welche bei der Osteogenese von Knochenmarkzellen der Maus eine phänotypische Verstärkung der Knochenbildung zeigen konnten [111-112].

In dieser Arbeit kommt es auf Genexpressionsebene konzentrationsunabhängig zu einem tendenziellen Anstieg des Osteogenesemarkers runX2v3 im Vergleich zur Kontrolle. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit der Modulation der Osteogenese bei humanen Osteoblasten durch ER α -vermittelte Aktivierung von runX2v3 [113].

Auch bei der osteocalcin-Expression ist keine eindeutige Steigerung durch Östrogen zu verzeichnen: lediglich bei den Konzentrationen 10^{-12} M und 10^{-10} M kommt es an Tag 21 zu einer nicht signifikanten Steigerung der Expression im Vergleich zur Kontrolle, bei 10^{-8} M fällt die Expression geringer aus. Diese Veränderung könnte verursacht sein durch eine konzentrationsabhängige aktivierende und inhibierende Wirkung von ER α und β (vgl. 5.2.1.).

In Zusammenschau der Literatur und der Ergebnisse dieser Arbeit kann man tendenziell Östrogen einen stimulierenden Einfluss auf die Osteogenese zuschreiben.

5.2.2.3. Unter gemischten Bedingungen

Bei der gemischten Differenzierung kommt es primär östrogenunabhängig zu einer Verschiebung des Differenzierungsgleichgewichtes in Richtung der Osteogenese. Sichtbar wird das vor allem an der verminderten Expression des frühen adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ bei gleichzeitig verstärkter Expression von runX2v3 bei gemischter Differenzierung im jeweiligen Verhältnis zu den rein adipogenen oder osteogenen Linien. Desweiteren konnte histologisch eine verstärkte Mineralisation und damit Calcium-Deposition mittels des Alizarin-Assays unter gemischten Bedingungen im Vergleich zur rein osteogenen Bedingung ermittelt werden. Zudem kommt

5. Diskussion

es zu einer verhältnismäßig stärkeren Reduktion der fettspezifischen Enzymaktivität im Vergleich zur verminderten Umsatzrate der alkalischen Phosphatase.

Unter zusätzlichem Hormoneinfluss kommt es tendenziell zu einer zusätzlichen Verstärkung der Expression von runX2v3 an Tag 14, vor allem bei 10^{-12} M (vgl. 4.3.2.3.). Nach dreiwöchiger Kulturdauer ist dieser Hormoneinfluss nur noch bei der geringsten Östrogenkonzentration vorhanden.

Eine mögliche Erklärung für die Bevorzugung der Osteogenese ist eine stärkere Aktivierung des wnt-Signalweges und der damit verbundenen Inhibierung der PPAR γ -induzierten Adipogenese (vgl. 1.9.). Wnts sind Glycoproteine, welche die Zellproliferation, -differenzierung und -funktion auf autokrine und parakrine Weise beeinflussen [114].

Die in diesem Modell verstärkte Expression von runX2v3 kann ein Nachweis für verstärkte Osteogenese sein. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors und der daran beteiligten Mechanismen ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Bisher konnte ein Einfluss von mechanischer Kraft über extrazellulärer Matrix, BMPs, FGF2 und PTH nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4). Es kommt zur Phosphorylierung von runX2 und zu dessen Aktivierung. Eine positive Korrelation der Quantität der Expression und des daraus resultierenden Effektes der Zielgene konnte allerdings nicht gezeigt werden [46].

Aufgrund der Tatsache, dass erstmals in dieser Arbeit ein Modell für gemischte Adipo- und Osteogenese verwendet wurde, sind für eine Fortsetzung der Diskussion dieser Erkenntnisse Versuche zu den grundlegenden Mechanismen notwendig.

6. Zusammenfassung

Um mesenchymale Stammzellen als sichere Therapieoption in verschiedenen Bereichen der Medizin einsetzen zu können, muss zunächst deren Biologie vollständig verstanden sein. Seit mehreren Jahrzehnten arbeiten Forscher daran, Schritt für Schritt die Funktionsweise der Zellen besser kennen zu lernen. Schon heute bietet sich die Möglichkeit, humane mesenchymale Stammzellen im Rahmen von Studien zur Bekämpfung der Graft versus Host Disease einzusetzen. Vor allem aber bieten sie eine Vielzahl an Möglichkeiten im Bereich des Tissue engineering.

Um das Differenzierungsverhalten der Stammzellen zu untersuchen, wurden bisher nur Monokulturen verwendet. Einflüsse, welchen die Zellen im Körper ausgesetzt sind, konnten so nicht berücksichtigt werden. Daher war es zunächst Ziel dieser Arbeit, eine Umgebung zu schaffen, welche eine parallele und ausgewogene Adipo- und Osteogenese erlaubt.

So ist es erstmals im Rahmen dieser Arbeit gelungen ein Modell zu entwickeln, in welchem Adipo- und Osteogenese von hMSCs parallel stattfindet. Dies bietet die Möglichkeit, grundlegende zellbiologische Mechanismen in der parallelen Differenzierung der beiden Zelllinien zu untersuchen. Zudem bietet sich auf diese Weise die Chance, der gegenseitigen Beeinflussung von Fett- und Knochenzelldifferenzierung auf den Grund gehen. Auch könnte die Frage untersucht werden, welche Auslöser dafür verantwortlich sind, dass sich die Stammzelle für die adipogene oder osteogene Zelllinie entscheidet. Weitere Fragestellungen sind denkbar.

In einem zweiten Schritt wurde dieses Modell dazu benutzt, um den Einfluss von 17- β -Östradiol auf die gemischte Differenzierung hin zu untersuchen.

Dabei führte Östrogen unter basalen Bedingungen konzentrationsabhängig zu einer tendenziellen Steigerung der Proliferation der hMSCs. Bei reiner Adipogenese von hMSCs kam es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Fettbildung sowohl auf enzymatischer als auch auf Genexpressionsebene. Unter rein osteogenen Bedingungen konnte der in der Literatur beschriebene stimulierende Effekt nur auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden. Ein histologisches oder biochemisches Äquivalent war in dieser Arbeit nicht vorhanden.

6. Zusammenfassung

Unter gemischten Bedingungen bleibt das Ausmaß der Osteogenese nahezu auf dem Niveau der rein osteogenen Differenzierung. Die Quantität der Adipogenese reduziert sich im Vergleich zur rein adipogenen Bedingungen. Dies ist sowohl phänotypisch, enzymatisch als auch auf Genexpressionsebene nachweisbar. Konsekutiv lässt dies auf eine Bevorzugung der osteogenen Differenzierungslinie schließen. Eine Hormonabhängigkeit ist nicht nachweisbar.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung der unterschiedlichen Differenzierungslinien von mesenchymalen Stammzellen.....	14
Abbildung 2 Modell zur Darstellung der Differenzierung von MSCs.....	15
Abbildung 3 Schematische Darstellung der die Osteogenese beeinflussenden Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren.....	17
Abbildung 4 Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege und deren Zusammenhang mit runX2 im Rahmen der Osteogenese	17
Abbildung 5 Ablauf der Proliferation und Differenzierung von Kulturen primärer Rattenosteoblasten und Darstellung der Genexpression osteoblastencharakteristischer Proteine nach Owen.....	19
Abbildung 6 Adipogenese der MSCs und die schematische Darstellung der beteiligten Signalwege und Transkriptionsfaktoren	19
Abbildung 7 PPAR γ -pathway	20
Abbildung 8 Schematische Darstellung des Einflusses von PPAR γ auf die Regulation der Knochenzell-Differenzierung und Skelett-Homöostase.....	21
Abbildung 9 Skeletale Homöostase: Schematische Darstellung der physiologischen und pharmakologischen Einflussfaktoren.....	23
Abbildung 10 Darstellung der vermehrten Adipogenese in gealterten oder osteoporotischen Knochen	24
Abbildung 11 Der wnt-Ligand wnt5a hemmt die PPAR γ -induzierte Adipogenese und fördert somit die osteogene Differenzierung.....	25
Abbildung 12 Schematische Darstellung der Signalwege der Steroidhormone	26
Abbildung 13 Schematische Darstellung der antiresorptiven Wirkung von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel.....	28
Abbildung 14 Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion.....	40

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15 Calcium-Quantifizierung mittels Alizarin-Assay: Evaluation des Quantifizierungsverfahrens bei gemischten Bedingungen.....	52
Abbildung 16 A-D: Einfluss von Insulin und IBMX auf die Adipogenese von hMSC .	55
Abbildung 17 Einfluss von Insulin und IBMX auf die Adipogenese von hMSC	56
Abbildung 18 A-F: Einfluss von Vitamin D3 auf die Osteogenese von hMSC.....	57
Abbildung 19 A-H: Gemischte Differenzierung von hMSC: Einfluss und Variation der Wachstumsfaktoren Vitamin D3 (0/10 nM), IBMX (0/0,5 mM) und Insulin (0/5 µg/ml)	59
Abbildung 20 A-L: Einfluss von Östrogen (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) im Rahmen der adipogenen Differenzierung unter basalen Bedingung bei hMSC.....	63
Abbildung 21 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: DNA-Quantifizierung	64
Abbildung 22 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase normiert zur DNA-Menge.....	64
Abbildung 23 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: Expression von PPAR γ normalisiert zu hprt.....	65
Abbildung 24 A-L: Einfluss von 17- β -Östradiol (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) auf die Adipogenese von hMSC unter adipogenen Bedingungen .	66
Abbildung 25 Einflus von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: Anzahl der Zellen pro well	67
Abbildung 26 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase normiert zur DNA-Menge pro Bedingung	68
Abbildung 27 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: PPAR γ normiert zu hprt.....	69

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 28 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: LPL normiert zu hprt.....	69
Abbildung 29 A-L: Einfluss von 17- β -Östradiol (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) auf die Adipogenese von hMSC unter gemischten Bedingungen..	70
Abbildung 30 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter adipogenen Bedingungen: Anzahl der Zellen pro well	71
Abbildung 31 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Aktivität der GPDH normiert zur DNA-Menge.....	72
Abbildung 32 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: PPAR γ normiert zu hprt	72
Abbildung 33 Einfluss von Östrogen auf die adipogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: LPL normiert zu LPL	73
Abbildung 34 A-L: Einfluss von Östrogen (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) im Rahmen der osteogenen Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingung	75
Abbildung 35 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: DNA-Quantifizierung.....	75
Abbildung 36 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter basalen Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase	76
Abbildung 37 A-L: Einfluss von Östrogen (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) im Rahmen der osteogenen Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingung	77
Abbildung 38 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase	78
Abbildung 39 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Expression von runX2v3 normiert auf hprt	79
Abbildung 40 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Osteocalcin-Expression normiert auf hprt	79

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 41 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter osteogenen Bedingungen: Quantifizierung der Mineralisation mittels Alizarin-Red-Assay	80
Abbildung 42 A-L: Einfluss von 17- β -Östradiol (Konz: A-C kein E, D-F 10^{-12} M, G-I 10^{-10} M, J-L 10^{-8} M) auf die Osteogenese von hMSC unter gemischten Bedingungen .	81
Abbildung 43 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Aktivität der alkalischen Phosphatase	82
Abbildung 44 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: runX2v3-Expression normiert auf hprt	83
Abbildung 45 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Osteocalcin-Expression normiert auf hprt.....	84
Abbildung 46 Einfluss von Östrogen auf die osteogene Differenzierung von hMSC unter gemischten Bedingungen: Calcium-Quantifizierung mittels Alizarin-Red Assay	85

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Annealing Temperatur sowie Konzentration der verwendeten Primer und Menge der eingesetzten Probe	48
Tabelle 2 Oligonukleotid-Sequenzen der eingesetzten Primer	48
Tabelle 3 Versuchsübersicht der Medientests.....	53
Tabelle 4 Übersicht der Wachstumsfaktoren für die Differenzierungsmedien der Medientests	54
Tabelle 5 Zusammensetzung der Medien des in-vitro-Modells für gemischte Adipo- und Osteogenese	60
Tabelle 6 Zusammensetzung der Differenzierungsmedien der einzelnen Bedingungen	61

9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb	Abbildung
AL	Arbeitslösung
aMSC	adipose-derived MSC
AP	Alkalische Phosphatase
aP2	adipocyte fatty acid protein 2
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein
C	Cytosin
cbfa1	core-binding factor subunit alpha-1
cDNA	complementary DNA
CFU-f	colony-forming unit fibroblast
cm	Zentimeter
Cm ²	Quadratzentimeter
CO ²	Kohlenstoffdioxid
Conc	Concentration
CTP	Cytidintriphosphat
D	Day
DEPC	Diethyldicarbonat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

9. Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Dinukleotidphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogene Receptor
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle
hSC	Hämatopoetische Stammzelle
Hprt	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
LPL	Lipoproteinlipase
M	Molar

9. Abkürzungsverzeichnis

MAPC	Multipotente adulte Progenitorzellen
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OBG	Octyl β -D-Glucopyranosid
OD	Optische Dichte
P	Wahrscheinlichkeit
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PTH	Parathormon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

9. Abkürzungsverzeichnis

Rpm	Rounds per minute
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SERM	Selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
uv	Ultraviolett
V/V	Volume/Volume
vgl.	Vergleiche
Wnt	Wingless Int-1
zb	Zum Beispiel
ZnCl	Zinkchlorid
λ	Wellenlänge
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

10. Literaturverzeichnis

1. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (NR1C3)*. Available from: http://nrresource.org/nr_page_collection/farnesoid_x_receptor_nr1h4.html.
2. Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. J Cell Mol Med, 2004. 8(3): p. 301-16.
3. Caplan, A.I., *The mesengenic process*. Clin Plast Surg, 1994. 21(3): p. 429-35.
4. Takada, I., A.P. Kouzmenko, and S. Kato, *Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis*. Nat Rev Rheumatol, 2009. 5(8): p. 442-7.
5. Aguayo-Mazzucato, C. and S. Bonner-Weir, *Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Endocrinol, 2010. 6(3): p. 139-48.
6. Danielyan, L., et al., *Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease*. Rejuvenation Res, 2011. 14(1): p. 3-16.
7. Chanda, D., S. Kumar, and S. Ponnazhagan, *Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton*. J Cell Biochem, 2010. 111(2): p. 249-57.
8. Conheim, *Über Entzündung und Eiterung*. Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med, 1867. 40: p. 1-79.
9. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. 276(5309): p. 71-4.
10. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. 3(4): p. 393-403.
11. Charbord, P., *Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts*. Hum Gene Ther, 2010. 21(9): p. 1045-56.

10. Literaturverzeichnis

12. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Tissue Kinet, 1987. 20(3): p. 263-72.
13. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. 9(5): p. 641-50.
14. Wakitani, S., T. Saito, and A.I. Caplan, *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*. Muscle Nerve, 1995. 18(12): p. 1417-26.
15. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. 284(5411): p. 143-7.
16. Delorme, B., et al., *Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells*. Blood, 2008. 111(5): p. 2631-5.
17. Owen, M.E., J. Cave, and C.J. Joyner, *Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F*. J Cell Sci, 1987. 87 (Pt 5): p. 731-8.
18. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. Cell Stem Cell, 2008. 2(4): p. 313-9.
19. Dennis, J.E., et al., *A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse*. J Bone Miner Res, 1999. 14(5): p. 700-9.
20. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. 7(5): p. 393-5.
21. Tavassoli, M. and W.H. Crosby, *Transplantation of marrow to extramedullary sites*. Science, 1968. 161(836): p. 54-6.
22. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. Br J Haematol, 2000. 109(1): p. 235-42.
23. Conget, P.A. and J.J. Minguell, *Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells*. J Cell Physiol, 1999. 181(1): p. 67-73.

10. Literaturverzeichnis

24. Mareschi, K., et al., *Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood*. Haematologica, 2001. 86(10): p. 1099-100.
25. Zvaifler, N.J., et al., *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*. Arthritis Res, 2000. 2(6): p. 477-88.
26. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. 7(2): p. 211-28.
27. Tallheden, T., et al., *Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes*. J Bone Joint Surg Am, 2003. 85-A Suppl 2: p. 93-100.
28. Williams, J.T., et al., *Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes*. Am Surg, 1999. 65(1): p. 22-6.
29. Bernard-Beaubois, K., et al., *Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes*. Cell Biol Toxicol, 1997. 13(2): p. 103-13.
30. Charbord, P., et al., *Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues*. Exp Hematol, 2002. 30(10): p. 1202-10.
31. Gronthos, S., et al., *Stem cell properties of human dental pulp stem cells*. J Dent Res, 2002. 81(8): p. 531-5.
32. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood, 2001. 98(8): p. 2396-402.
33. Nagoshi, N., et al., *Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad*. Cell Stem Cell, 2008. 2(4): p. 392-403.
34. Greco, S.J., K. Liu, and P. Rameshwar, *Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells*. Stem Cells, 2007. 25(12): p. 3143-54.
35. Kashiwakura, Y., et al., *Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of*

10. Literaturverzeichnis

- putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow*. Circulation, 2003. 107(16): p. 2078-81.
36. Delorme, B., et al., *Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity*. Stem Cells, 2009. 27(5): p. 1142-51.
37. Hoffmann, A., et al., *Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells*. J Clin Invest, 2006. 116(4): p. 940-52.
38. Oswald, J., et al., *Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro*. Stem Cells, 2004. 22(3): p. 377-84.
39. Cho, K.J., et al., *Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha*. Stem Cells, 2005. 23(3): p. 383-91.
40. Prindull, G. and D. Zipori, *Environmental guidance of normal and tumor cell plasticity: epithelial mesenchymal transitions as a paradigm*. Blood, 2004. 103(8): p. 2892-9.
41. Spees, J.L., et al., *Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(5): p. 2397-402.
42. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. J Cell Sci, 2000. 113 (Pt 7): p. 1161-6.
43. Song, L. and R.S. Tuan, *Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow*. FASEB J, 2004. 18(9): p. 980-2.
44. Bruder, S.P., N. Jaiswal, and S.E. Haynesworth, *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J Cell Biochem, 1997. 64(2): p. 278-94.

10. Literaturverzeichnis

45. Heino, T.J. and T.A. Hentunen, *Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2008. 3(2): p. 131-45.
46. Franceschi, R.T. and G. Xiao, *Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways*. J Cell Biochem, 2003. 88(3): p. 446-54.
47. Augello, A. and C. De Bari, *The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells*. Hum Gene Ther, 2010. 21(10): p. 1226-38.
48. Paredes, R., et al., *The Runx2 transcription factor plays a key role in the 1alpha,25-dihydroxy Vitamin D3-dependent upregulation of the rat osteocalcin (OC) gene expression in osteoblastic cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. 89-90(1-5): p. 269-71.
49. Lian, J.B. and C.M. Gundberg, *Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications*. Clin Orthop Relat Res, 1988(226): p. 267-91.
50. Lieben, L., F. Callewaert, and R. Bouillon, *Bone and metabolism: a complex crosstalk*. Horm Res, 2009. 71 Suppl 1: p. 134-8.
51. Nakashima, K., et al., *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. Cell, 2002. 108(1): p. 17-29.
52. Owen, T.A., et al., *Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix*. J Cell Physiol, 1990. 143(3): p. 420-30.
53. Mori, M., Y. Sadahira, and M. Awai, *Characteristics of bone marrow fibroblastic colonies (CFU-F) formed in collagen gel*. Exp Hematol, 1987. 15(11): p. 1115-20.
54. Mori, M., et al., *Formation of capillary networks from bone marrow cultured in collagen gel*. Cell Struct Funct, 1989. 14(4): p. 393-8.

10. Literaturverzeichnis

55. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell, 1994. 79(7): p. 1147-56.
56. Tontonoz, P., et al., *ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation*. Mol Cell Biol, 1993. 13(8): p. 4753-9.
57. Imai, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(13): p. 4543-7.
58. Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli, *Roles of PPARs in health and disease*. Nature, 2000. 405(6785): p. 421-4.
59. Rosenfeld, M.G., V.V. Lunyak, and C.K. Glass, *Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response*. Genes Dev, 2006. 20(11): p. 1405-28.
60. Suzawa, M., et al., *Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade*. Nat Cell Biol, 2003. 5(3): p. 224-30.
61. Ahdjoudj, S., et al., *Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells*. J Cell Biochem, 2001. 81(1): p. 23-38.
62. Wan, Y., *PPARgamma in bone homeostasis*. Trends Endocrinol Metab, 2010. 21(12): p. 722-8.
63. Nuttall, M.E., et al., *Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders*. J Bone Miner Res, 1998. 13(3): p. 371-82.
64. Schoonjans, K., et al., *PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene*. EMBO J, 1996. 15(19): p. 5336-48.

10. Literaturverzeichnis

65. Nuttall, M.E. and J.M. Gimble, *Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications*. Curr Opin Pharmacol, 2004. 4(3): p. 290-4.
66. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature, 2003. 423(6937): p. 349-55.
67. Beresford, J.N., et al., *Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures*. J Cell Sci, 1992. 102 (Pt 2): p. 341-51.
68. Dorheim, M.A., et al., *Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells*. J Cell Physiol, 1993. 154(2): p. 317-28.
69. Wronski, T.J., C.C. Walsh, and L.A. Ignaszewski, *Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats*. Bone, 1986. 7(2): p. 119-23.
70. Minaire, P., et al., *Quantitative histological data on disuse osteoporosis: comparison with biological data*. Calcif Tissue Res, 1974. 17(1): p. 57-73.
71. Wang, G.J., et al., *Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits*. J Bone Joint Surg Am, 1977. 59(6): p. 729-35.
72. Schwartz, A.V., et al., *Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(9): p. 3349-54.
73. Venken, K., et al., *Sex hormones, their receptors and bone health*. Osteoporos Int, 2008. 19(11): p. 1517-25.
74. Tsai, M.J. and B.W. O'Malley, *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu Rev Biochem, 1994. 63: p. 451-86.
75. Shang, Y., M. Myers, and M. Brown, *Formation of the androgen receptor transcription complex*. Mol Cell, 2002. 9(3): p. 601-10.

10. Literaturverzeichnis

76. Maruyama, K., et al., *A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 246(1): p. 142-7.
77. Dang, Z.C., et al., *Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis*. J Bone Miner Res, 2002. 17(3): p. 394-405.
78. Falkenstein, E., et al., *Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects*. Pharmacol Rev, 2000. 52(4): p. 513-56.
79. Pietras, R.J. and C.M. Szego, *Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells*. Nature, 1977. 265(5589): p. 69-72.
80. Carmeci, C., et al., *Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer*. Genomics, 1997. 45(3): p. 607-17.
81. Song, R.X., et al., *Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation*. Mol Endocrinol, 2002. 16(1): p. 116-27.
82. Losel, R. and M. Wehling, *Nongenomic actions of steroid hormones*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(1): p. 46-56.
83. Vanderschueren, D., et al., *Androgens and bone*. Endocr Rev, 2004. 25(3): p. 389-425.
84. Smith, E.P., et al., *Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man*. N Engl J Med, 1994. 331(16): p. 1056-61.
85. Gennari, L., R. Nuti, and J.P. Bilezikian, *Aromatase activity and bone homeostasis in men*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(12): p. 5898-907.
86. Windahl, S.H., et al., *Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice*. J Clin Invest, 1999. 104(7): p. 895-901.

10. Literaturverzeichnis

87. Riggs, B.L., *The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption*. J Clin Invest, 2000. 106(10): p. 1203-4.
88. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev, 2000. 21(2): p. 115-37.
89. Seeman, E., *Pathogenesis of bone fragility in women and men*. Lancet, 2002. 359(9320): p. 1841-50.
90. Seeman, E., *Periosteal bone formation--a neglected determinant of bone strength*. N Engl J Med, 2003. 349(4): p. 320-3.
91. Riggs, B.L. and A.M. Parfitt, *Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling*. J Bone Miner Res, 2005. 20(2): p. 177-84.
92. Leskela, H.V., et al., *Estrogen receptor alpha genotype confers interindividual variability of response to estrogen and testosterone in mesenchymal-stem-cell-derived osteoblasts*. Bone, 2006. 39(5): p. 1026-34.
93. Ijichi, N., et al., *Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 358(3): p. 813-8.
94. Hong, L., A. Colpan, and I.A. Peptan, *Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells*. Tissue Eng, 2006. 12(10): p. 2747-53.
95. Jeong, S. and M. Yoon, *17beta-Estradiol inhibition of PPARgamma-induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression*. Acta Pharmacol Sin, 2011. 32(2): p. 230-8.
96. *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase*. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol-3-phosphate_dehydrogenase.
97. *GPDH-Reaktion* Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/File:GPDH_shuttle.png.

10. Literaturverzeichnis

98. Kozak, L.P. and J.T. Jensen, *Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase*. J Biol Chem, 1974. 249(24): p. 7775-81.
99. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. Anal Biochem, 2004. 329(1): p. 77-84.
100. Xu, S., et al., *Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and Dil-oxLDL uptake*. Cytotechnology, 2010. 62(5): p. 473-81.
101. Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
102. Jaiswal, N., et al., *Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro*. J Cell Biochem, 1997. 64(2): p. 295-312.
103. Yang, D.C., et al., *cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin*. PLoS One, 2008. 3(2): p. e1540.
104. Rajalin, A.M., H. Pollock, and P. Aarnisalo, *ERRalpha regulates osteoblastic and adipogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 396(2): p. 477-82.
105. Pettersson, K., F. Delaunay, and J.A. Gustafsson, *Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling*. Oncogene, 2000. 19(43): p. 4970-8.
106. Hall, J.M. and D.P. McDonnell, *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*. Endocrinology, 1999. 140(12): p. 5566-78.
107. DiSilvio, L., et al., *In vitro evaluation of the direct effect of estradiol on human osteoblasts (HOB) and human mesenchymal stem cells (h-MSCs)*. Injury, 2006. 37 Suppl 3: p. S33-42.

10. Literaturverzeichnis

108. Chen, F.P., et al., *Effect of estrogen and 1alpha,25(OH)₂- vitamin D₃ on the activity and growth of human primary osteoblast-like cells in vitro*. Fertil Steril, 2002. 77(5): p. 1038-43.
109. Shamay, A., V. Knopov, and D. Benayahu, *The expression of estrogen receptor and estrogen effect in MBA-15 marrow stromal osteoblasts*. Cell Biol Int, 1996. 20(6): p. 401-5.
110. Zhou, S., et al., *Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells*. Mol Endocrinol, 2003. 17(1): p. 56-66.
111. Okazaki, R., et al., *Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta*. Endocrinology, 2002. 143(6): p. 2349-56.
112. Qu, Q., et al., *Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture*. Bone, 1998. 22(3): p. 201-9.
113. McCarthy, T.L., et al., *Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts*. J Biol Chem, 2003. 278(44): p. 43121-9.
114. Krishnan, V., H.U. Bryant, and O.A. Macdougald, *Regulation of bone mass by Wnt signaling*. J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1202-9.

11. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Nerlich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Schaffung der Voraussetzungen zur wissenschaftlichen Tätigkeit in der Unfallchirurgie sowie für die stetige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Angele danke ich für sein stetig gezeigtes Interesse an dieser Arbeit, für die Unterstützung bei sämtlichen Fragen sowie die konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Dr. Michael Müller für die ausdauernde, stetige und hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Daniela Drenkard bedanken, ohne deren unermüdlichen Einsatz, Unterstützung und aufbauende Worte ein erfolgreicher Abschluss dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dank gebührt ebenfalls Herrn Dr. Kujat für konstruktive Kritik und Diskussion des Themas sowie für die Unterstützung bei der Etablierung der Methoden.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name

Oliver Loose

Email

OliverLoose@web.de



Berufliche Tätigkeit

Seit April 2011

Assistenzarzt in der Klinik für Kinderchirurgie, Barmherzige Brüder, Klinik St. Hedwig, Regensburg

Februar 2011-April 2011

Gastarzt in der Klinik für Plastische, Hand- und wiederherstellende Chirurgie, Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg

Hochschulausbildung

November 2010

Erteilung der Ärztlichen Approbation

Oktober/November 2010

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April – Juli 2010

3. PJ-Tertial: Chirurgie, Barmherzige Brüder, Regensburg

Dezember 2009 – April 2010

2. PJ-Tertial: Innere Medizin, Universitätsspital Zürich

August – Dezember 2009

1. PJ-Tertial: Kinderchirurgie, Kinderurologie und Pädiatrie, Klinik St. Hedwig, Regensburg

August / September 2006

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Oktober 2004 – September 2006

Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg im vorklinischen Studienabschnitt

Grundwehrdienst

Juli 2003 – März 2004

Sanitätssoldat in Feldkirchen und Penzing

12. Lebenslauf

Schulausbildung

September 1994 – Juni 2003

Rhabanus – Maurus Gymnasium, St. Ottilien

September 1990 – Juli 1994

Carl – Orff Schule, Dießen

Praktische Erfahrung

Juli 2008 – September 2009

OP – Assistent, Klinik und Poliklinik für Gefäßchirurgie,
Barmherzige Brüder, Regensburg

März 2009

Allgemeinmedizinische Lehrpraxis, Dr. med. Kehrer, Re-
gensburg

Februar/März 2009

Kinderchirurgie, Dr. v. Haunersches Kinderspital, München

März 2008

Pädiatrie, Klinik St. Hedwig, Regensburg

August 2007

Notaufnahme, Barmherzige Brüder, Regensburg

März 2007

Unfallchirurgie, BG Unfallklinik, Murnau

November 2006

Internistischen Gemeinschaftspraxis Dr. Osman, Dießen

Promotion

Oktober 2007

Beginn der Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Unfall –
chirurgie der Universität Regensburg

Thema: „Etablierung eines in-vitro Modells für gemischte
Adipo- und Osteogenese und der Einfluss von
17- β -Östradiol“ (Betreuung: Prof. Dr. med. Angele)

Lehrtätigkeit

Oktober 2007 – Juli 2009

Dozent für das Nebenfach „Medizin für Pädagogen“,
Lehrstuhl für Pädagogik, Regensburg

Oktober 2005 – Februar 2006

Assistent im Präparierkurs, Lehrstuhl für Anatomie, Re-
gensburg

Zusatzqualifikationen

Juni 2012	Prüferkurs, Universität, Regensburg
Juni 2012	Lila-Kurs „Komplikationen obere Extremität“, Bayreuth
April 2012	Kindertraumatologie-Symposium, Herne
Februar 2012	Workshop „Unfallchirurgische Notfalleingriffe“, Graz
Februar 2012	AO-Kurs „Osteosynthesen im Kindesalter“, Graz
Januar 2012	Workshop „Anorectal Malformations“, Rotterdam
November 2011	DEGUM-Aufbaukurs pädiatrische Sonographie, Leoben
Juli 2011	Workshop „Chirurgische Therapie von Verbrennungen im Kindesalter“, Zürich
Mai 2011	DEGUM-Grundkurs pädiatrische Sonographie, Blaubeuren
Oktober 2007	Tutorschulung, Zentrum für Hochschul- und Wissenschaftsdidaktik, Regensburg
Oktober 2006 - Februar 2007	Wahlfach Sportmedizin

Vorträge

Mai 2012	SGKJM-Kongress, München und
April 2012	Kindertraumatologie-Symposium Herne: Das akute Kalksalzdepot der Hand im Kindesalter

Sportmedizinische Betreuung

Seit Juni 2012	Betreuung von Auswahlmannschaften des Bayerischen Fußballverbandes im Jugendnachwuchsbereich
----------------	--

Poster

Serum procalcitonin concentration as a negative predictor of serious bacterial infection in acute sickle cell crisis (Preiswerk B., Loose O., Schneemann M.; SGIM 2010)

Veröffentlichung

Das akute Kalksalzdepot der Hand im Kindesalter (Loose, Krauß, Reingruber, Ebert, Spieß;
Handchir Mikrochir Plast Chir 2012; 44: 184-186)

Wissenschaftliche Interessen

Sportmedizin im Kindesalter im Rahmen des FIFA-Zentrums Regensburg

13. Erklärung zur Dissertation

Herr Prof. Dr. med. Peter Angele und Herr Dr. med. Michael Müller haben die Dissertation angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift