

Untersuchung des Wnt-Signalweges in
nicht-hämatopoetischen Stammzellen aus humanem
Nabelschnurblut zur Charakterisierung von
Subpopulationen: Analyse einzelner Signalmoleküle in
in vitro Differenzierungen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Amelie P. Houben
aus Mönchengladbach

Düsseldorf, November 2011

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. G. Kögler
Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2012

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACAN	<i>Aggrecan</i>
ACTB	<i>Actin beta</i>
Adam17	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain 17</i>
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovines serum albumin</i>
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
CB-H	aus dem Nabelschnurblut unter 5% O ₂ gewonnene Vorläuferzellen
CB-MSC	<i>Cord blood-derived mesenchymal stromal cells</i>
CCND2	<i>Cyclin-D2</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementärer DNS-Einzelstrang
CIP	Alkalische Phosphatase
CO ₂	Kohlendioxid
COL10A1	<i>Collagen Type 10 alpha 1</i>
COMP	<i>Cartilage oligomeric protein</i>
CPD	kumulative Populationsverdopplungen
CT	Zyklus der Schwellenwertüberschreitung
CTBP1	<i>C-terminal-binding protein 1</i>
d	Tag (e)
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
DLK1	<i>Delta-like homolog 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP300	<i>E1A binding protein p300</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FOSL	<i>Fos-related antigen</i>
FZD	<i>Frizzled family receptor</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Stunde(n)
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HOX	<i>Homeobox</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1</i>
HSA	<i>Humanes serum albumin</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxantin
IGF1	<i>Insulin-Like growth factor 1</i>
IHC	Immunhistochemie
iPS	induziert pluripotente Stammzelle
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
ITZ	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
JUN	<i>V-Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog</i>
kb	Kilobasen

kbp	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
KM-H	aus dem Knochenmark unter 5% O ₂ gewonnene Vorläuferzellen
KM-MSc	aus dem Knochenmark gewonnene mesenchymale Stromazellen
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
M	Mol
Min.	Minute (n)
MLC	<i>mesenchymal like cells</i>
MNC	Mononukleäre Zellen
MPC	<i>mesenchymal progenitor cells</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	Mesenchymale Stromazellen
MSX2	<i>Muscle segment homeobox, drosophila, homolog of, 2</i>
MYC	<i>V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	Anzahl
NANOG	<i>Homeobox transcription factor Nanog</i>
NHDF	humane Hautfibroblasten
NKD1	<i>homolog of Drosophila Naked cuticle 1</i>
nm	Nanometer
NSB	Nabelschnurblut
O ₂	Sauerstoff
OC	<i>Osteocalcin</i>
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OSX	<i>Osterix</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline -Tween20</i>
pCL6	pCL6IEGwo
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Populationsverdopplungen
PITX2	<i>Paired-like homeodomain transcription factor 2</i>

POU5F1	<i>POU domain, class 5, transcription factor 1</i>
PTH1H	<i>Parathyroid hormone-like hormone</i>
RHOA	<i>ras homolog gene family, member U</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13A	<i>Ribosomal protein L13a</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>
sFRP	<i>secreted Frizzled-related protein</i>
SOX	<i>SRY-related HMG -box Gene</i>
Tab.	Tabelle
TCF	<i>Transcription factor</i>
TERC	<i>Telomerase RNA component</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TRF	terminale Restriktionsfragmente
USSC	Unrestringierte somatische Stammzelle
WB	Western Blot
WIF1	<i>Wnt inhibitory factor 1</i>
WISP1	<i>WNT1 -inducible signaling pathway protein</i>
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -Galactosid

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	11
1.1 Stammzellen in Klinik und Forschung.....	11
1.1.1 Pluripotente Stammzellen	13
1.1.2 Adulte Stammzellen	14
1.2 Genexpression in der embryonalen Entwicklung und Differenzierung	16
1.2.1 <i>Homeobox</i> -Gene	17
1.2.2 Wnt-Signalwege	18
1.3 Knorpel- und Knochenbildung	21
1.4 Ziele der Arbeit	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Materialien	26
2.1.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien	26
2.1.2 Zellkultur.....	27
2.1.3 Zell- und Molekularbiologische Analysen	29
2.1.4 Geräte und Software	31
2.2 Methoden.....	32
2.2.1. Zellkultur eukaryotischer Zellen	32
2.2.2 Wachstumsverhalten und Differenzierung	34
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.4 Affymetrix Arrays	41
2.2.5 Telomerlängenbestimmung.....	41
2.2.6 Stabile Überexpression	42
2.2.7 Durchflusszytometrie.....	44

3. Ergebnisse	45
3.1 Charakterisierungen der verwendeten Zellpopulationen	45
3.1.1 Morphologie und Immunphänotyp.....	45
3.1.2 Wachstumskinetik	46
3.1.3 Seneszenz und Telomerlängen	48
3.1.4 Genexpression	51
3.1.5 Differenzierungspotential	52
3.2 Genexpressionsanalysen	60
3.2.1 Einfluss physiologischer Zellgenerierung auf die Expression mit Differenzierung assoziierten Gene in undifferenzierten Zellen.....	60
3.2.2 <i>Affymetrix Arrays</i>	63
3.2.3 Homeobox Genexpressionsmuster.....	64
3.2.4 Direkte Ko-Kultur.....	69
3.2.5 Wnt-Genexpressionsmuster.....	71
3.2.6 <i>Ingenuity Pathways Analysis</i>	78
3.2.7 Genexpression vor und nach der Differenzierung.....	79
3.3 Überexpression von Schlüsselgenen	88
3.3.1 <i>Wif1</i> Überexpression.....	89
3.3.2 BMP4 Überexpression	91
3.3.3 Funktionelle Charakterisierung der Überexpression	93
3.3.4 Einfluss der Überexpression auf die quantitative Genexpression	94
3.3.5 Einfluss der Überexpression auf das Differenzierungspotential.....	96
3.3.6 Genexpression nach der Differenzierung pCL6 <i>WIF1</i> und pCL6 <i>BMP4</i> überexprimierender Zellen	103
4. Diskussion	109
4.1 Charakterisierungen der verwendeten Zellpopulationen	109
4.1.1 Die verwendeten Zellpopulationen zeigten keine morphologischen oder immunphänotypischen Unterschiede	109
4.1.2 Verwendete Zellpopulationen die aus Nabelschnurblut generiert wurden zeigten <i>in</i> <i>vitro</i> ein höheres Wachstumspotential als Zellpopulationen aus Knochenmark	110

4.1.3 KM-MSC zeigten <i>in vitro</i> früher replikative Seneszenz als USSC und CB-MSC und wiesen kürzere Telomere auf.....	110
4.1.4 Die verwendeten Progenitorzellen exprimierten keine Stammzellmarker und keine Telomerase	112
4.1.5 <i>DLK1</i> -Expression kann als Unterscheidungsmerkmal zwischen verschiedenen Zellpopulationen aus Nabelschnurblut herangezogen werden	113
4.1.6 Differenzierungspotential	114
4.2 HOX-Genexpression.....	117
4.2.1 Die <i>HOX</i> -Genexpression in USSC, CB-MSC und KM-MSC	118
4.2.2 Die Generierung und Kultivierung unter 5% O ₂ hatte Einfluss auf die <i>HOX</i> -Genexpression	119
4.2.3 Die <i>in vitro</i> Differenzierung hatte keinen einheitlichen Einfluss auf die <i>HOX</i> -Genexpression	120
4.2.4 HOX-Genexpression ist induzierbar.....	121
4.2.5 Veränderungen im <i>HOX</i> -Code durch Sauerstoffkonzentration und Ko-Kultur	121
4.3 Wnt-Genexpression	123
4.3.1 USSC, CB-MSC und KM-MSC zeigten individuelle Unterschiede im Wnt-Genexpressionsmuster.....	123
4.3.2 Kultivierung von USSC in 5% O ₂ führte zu einer Angleichung des Wnt-Genexpressionsmusters an das der CB-H Linien	123
4.3.3 Analyse der Genexpression vor und nach chondrogener und osteogener Differenzierung.....	124
4.4 Überexpression von Schlüsselgenen	126
4.4.1 Die mit <i>WIF1</i> , <i>BMP4</i> oder <i>WNT3A</i> Überexpression einhergehenden Veränderungen in der Genexpression	127
4.4.2 Die Überexpression von <i>WIF1</i> , <i>BMP4</i> oder <i>WNT3A</i> hatte Einfluss auf das adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungspotential.....	127
4.5 Fazit.....	130
5. Zusammenfassung.....	131
6. Abstract	132
7. Literaturverzeichnis	133

8. Anhang	147
8.1 Anhang	147
8.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	165
8.3 Lebenslauf	168
8.4 Referenzen	169
9. Danksagung	170
10. Erklärung	171

1. Einleitung

1.1 Stammzellen in Klinik und Forschung

Die Stammzelle ist eine Zelle, die gemäß Definition sowohl zu Selbsterhalt als auch zu Differenzierung fähig ist. Die Selbsterneuerung erfolgt durch mitotische Teilung in identische Tochterzellen und die Differenzierung ist, wenn erst begonnen, nicht reversibel. Das Stadium der Progenitor- oder Vorläuferzelle wird von einer Zelle als Vorstufe zur differenzierten Zelle durchlaufen. Dabei nimmt das Differenzierungspotential einer Zelle mit fortschreitender Spezialisierung ab. Die Existenz der Stammzelle und die damit einhergehenden Möglichkeiten sind in der Naturwissenschaft und Medizin der heutigen Zeit ein viel diskutiertes Thema. Sie wecken naturwissenschaftliche Interessen, kommerzielle Überlegungen, ethische Diskussionen und nicht zuletzt medizinische Hoffnungen. Mehr als 99.000 wissenschaftliche Artikel wurden alleine in den letzten zehn Jahren zum Thema "Stammzelle" publiziert ¹.

Allogene (verwandte oder nicht verwandte) Transplantationen mit adulten Stamm- und Vorläuferzellen, zum Beispiel aus Knochenmark (KM) und Nabelschnurblut (NSB), zur Behandlung von Leukämien sind mittlerweile anerkannte und etablierte Methoden ². Im Fokus der biomedizinischen Stammzellforschung steht zurzeit die Untersuchung weiterer Einsatzmöglichkeiten von Stammzellen. Ein möglicher Bereich ist die regenerative Medizin ³. Dabei ist die klinische Anwendung der Stamm- und Vorläuferzellen das Ziel der Grundlagenforschung („*from Bench to Bedside*“). Das regenerative Potential der verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen aufzuklären, ist eine wichtige Voraussetzung für deren möglichen therapeutischen Einsatz in der Unterstützung der Geweberegeneration. Wie realistisch embryonale, adulte oder neonatale Stammzellen an das jeweilige Therapieziel heranführen können, wird die Forschung in Zukunft zeigen ⁴.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Stamm- und Progenitorzellen ist ihre Nutzung als Modellsystem. Sie dienen dabei der Erforschung von molekularen Mechanismen während der Embryogenese, im adulten Organismus oder bei der Entstehung von Krankheiten. Sie können kultiviert und analysiert werden, um Erkenntnisse über die Rolle verschiedener Gene beziehungsweise Proteine bei Entwicklungsprozessen zu erlangen und ermöglichen eine gezielte Analyse ausgewählter Einzelaspekte. Die Forschung an entwicklungsbiologischen Vorläuferzellen aus einer kontrollierten Stammzelldifferenzierung gibt Aufschluss über mögliche, der Differenzierung zugrundeliegende Abläufe.

Weiterhin können kultivierte Stamm- und Vorläuferzellen verwendet werden, um die pharmakologische und toxikologische Wirkung verschiedener Medikamente, Hormone oder Toxine *in vitro* zu untersuchen. Dies ist vor allem für das humane System von Interesse, da Tierversuche die menschliche Physiologie nur eingeschränkt widerspiegeln und Modellsysteme mit humanen Zellen die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus erhöhen könnten. Der Ansatz *in vitro* kultivierte Stamm- und Vorläuferzellen als Modellsystem für die Grundlagenforschung zu verwenden, birgt jedoch auch Probleme. Potentielle Erkenntnisse könnten auf Kulturartefakte zurück zu führen sein. Folglich besteht die Herausforderung darin, die Zellen in einer, der physiologische Umgebung angenäherten Situation zu kultivieren.

Zellen stehen in permanentem Austausch mit ihrer Umgebung und registrieren dabei unzählige Parameter, wie beispielsweise den lokalen Sauerstoffgehalt. Im menschlichen Körper variiert die Sauerstoffkonzentration abhängig davon, wie stark das Gewebe von Blutgefäßen durchzogen ist. Menschliche Zellen sind unter natürlichen Bedingungen durchschnittlich 2-9% Sauerstoff ausgesetzt. Für das Lungenparenchym sind Werte bis zu 14% O₂ beschrieben, im Herz 5% O₂ und einige Bereiche des Knochenmarks sind mit 1% O₂ nahezu anoxisch⁵⁻⁹. Der Sauerstoffgehalt in der Nabelschnurvene beträgt zwischen 4,5 - 6% O₂^{10,11}.

Aus NSB oder KM gewonnene humane Vorläuferzellen werden üblicherweise bei 37 °C mit 21% O₂ und 5% CO₂ kultiviert, obwohl das nicht der Sauerstoffkonzentration des Ursprungsgewebes entspricht. Unter dem Gesichtspunkt, dass Stamm- und Vorläuferzellen, die im Bereich der regenerativen Medizin eingesetzt werden sollen, aus sauerstoffarmen Geweben isoliert und nach ausreichender Expansion oder Differenzierung in Kultur wieder in mehr oder weniger sauerstoffarmes Gewebe zurückgeführt werden sollen, ist die zwischenzeitliche Kultivierung unter physiologischen Bedingungen sinnvoll. Auch bei der Nutzung von Stamm- und Vorläuferzellen als Modellsystem sollten diese Überlegungen berücksichtigt werden, um in Kultur künstlich erzeugte Phänomene zu minimieren. Für einige Stamm- und Vorläuferzellen konnte bereits eine Verbesserung der Generierungsfrequenz, der Proliferation und der Expression von Stammzellmarkern durch Kultivierung unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden¹²⁻¹⁶.

1.1.1 Pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen können in Zelltypen aller Gewebe und Organe, mit Ausnahme des extraembryonalen Gewebes, differenzieren. Zu den pluripotenten Stammzellen gehören die embryonalen Stammzellen und die induziert pluripotenten Stammzellen. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse von Embryonen gewonnen. Es wurde gezeigt, dass die Zellen nach längerer Zeit in Kultur Veränderungen im Erbgut aufweisen^{17,18}. Versuche, embryonale Stammzellen zu transplantieren, führten bislang stets zur Tumorbildung¹⁹⁻²². Im zweiten Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes steht: „Transplantate für den klinischen Einsatz am Menschen dürfen keine undifferenzierten humanen ES-Zellen mehr enthalten, da diese Tumore bilden können“²³. Darüber hinaus ist der Einsatz von humanen embryonalen Stammzellen ethisch umstritten.

Im Jahr 2006 gelang es den japanischen Forschern Yamanaka und Takahashi, murine Fibroblasten in Zellen umzuwandeln, die Eigenschaften von embryonalen Stammzellen aufweisen. Ein Jahr später wurde das Verfahren auch auf humane adulte Fibroblasten übertragen²⁴⁻²⁸. Zellen, die auf diese Art künstlich embryonale Stammzeleigenschaften wiedererlangen, werden als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) bezeichnet. Ob iPS-Zellen zukünftig therapeutisch nutzbar sind, ist aufgrund der bisher beobachteten Bildung von Teratomen (Tumore mit Organkomponenten bestehend aus Zellen aller drei Keimblätter) und genetischer Instabilität der Zellen nach Reprogrammierung fraglich^{29,30}. Auch die geringe Reprogrammierungsfrequenz der bisherigen Methoden^{31,32} und die Neigung von humanen iPS-Zellen in Kultur spontan zu differenzieren, spricht gegen eine baldige Anwendung im klinischen Umfeld. Ihre Verwendung als Modellsystem findet bereits statt. Sie dienen als *in vitro* Modell, um pathologische Mechanismen bei der Krankheitsentstehung zu untersuchen und neue beteiligte Moleküle zu identifizieren und können so zur Entwicklung neuer Behandlungen beitragen³³⁻³⁵.

1.1.2 Adulte Stammzellen

Zu den adulten Stammzellen gehören beispielsweise aus dem Knochenmark gewonnene hämatopoetische Stammzellen (HSC), die die Fähigkeit haben, sich in alle Blutzelltypen entwickeln zu können und demgemäß multipotent sind. Nabelschnurblut als Quelle hämatopoetischer Stammzellen wird seit über 20 Jahren sehr erfolgreich zur Behandlung von bösartigen Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems eingesetzt ³⁶⁻³⁸.

Neben den hämatopoetischen Stammzellen sind auch adulte, nicht-hämatopoetische, multipotente, mesenchymale Stromazellen (MSC) im Knochenmark und Nabelschnurblut vorhanden ^{39,40}. Das Konzept der MSC stammt ursprünglich aus Studien zum Differenzierungspotential von Zellen aus dem Knochenmark ⁴¹⁻⁴⁴ und wird heute auch auf Stromazellen anderer Gewebe (Fettgewebe, peripheres Blut, Nabelschnurblut etc.) übertragen ⁴⁵⁻⁴⁹. Die Definitionskriterien des Begriffs „MSC“ werden aufgrund der vielen beschriebenen MSC-Quellen derzeit kritisch diskutiert ⁵⁰. *The International Society for Cellular Therapy* definierte 2006 Plastikadhärenz in Zellkultur, die Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 und die fehlende Expression von HLA-DR und hämatopoetischen und endothelialen Oberflächenmarkern, wie CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 sowie adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential *in vitro* als essentielle Eigenschaften von MSC ⁵¹.

Im Jahr 2000 wurden den Knochenmark-MSC ähnliche Zellen MLC (*mesenchymal-like cells*), später auch *mesenchymal progenitor cells* (MPC) in NSB identifiziert ⁴⁰. Die unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) wurden 2004 im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Nabelschnurblut nachgewiesen und beschrieben ⁵². *Cord blood-derived mesenchymal stromal cells* (CB-MSC) und USSC sind nicht-hämatopoetische Zellpopulationen, welche im NSB nur in einer sehr geringen Zahl vertreten sind, *in vitro* jedoch auf bis zu $1 \cdot 10^9$ Zellen in 4 - 5 Passagen vermehrt werden können ⁵³. USSC und CB-MSC werden aus der Fraktion der mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes generiert und sind an Plastik adhärent wachsende, neonatale, multipotente Stromazellen ^{54,55}.

Die Unterscheidung der Stromazellen in zwei Populationen findet *ex vivo* anhand des adipogenen Differenzierungspotentials und der Expression des Gens *delta-like 1 homolog (DLK1)* statt, die invers zueinander korrelieren ⁵⁴. USSC verfügen *in vitro* über ein hohes osteogenes und hepatogenes Differenzierungspotential ⁵⁶, sind jedoch nicht zur adipogenen Differenzierung fähig. CB-MSC sind durch ihre Fähigkeit zur adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung und damit einhergehender geringer bis nicht detektierbarer *DLK1* Expression *in vitro* charakterisiert.

Aufgrund ihrer neonatalen Herkunft proliferieren die Zellen gut, obwohl sie keine Eigenschaften von embryonalen Stammzellen aufweisen. Im Vergleich zu embryonalen Stammzellen konnte kein *OCT4*, *NANOG* oder *SOX2* in Stamm- oder Vorläuferzellen aus NSB detektiert werden ⁵⁷. Es wurden bis heute bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen keine tumorösen Entartungen beobachtet ^{52,58}. Ein stabiler Karyotyp über lange Zeiträume der *in vitro* Kultivierung wurde sowohl für MSC aus KM als auch aus NSB beschrieben ^{59,60}. Da die Gewinnung von Nabelschnurblut unproblematisch und risikoarm ist, ist es im Vergleich zum Knochenmark eine unbedenkliche Alternative als Quelle von MSC ⁴⁵.

Humane MSC sind für die therapeutische Regeneration skelettaler Gewebe vielversprechende Zellen, da sie ein großes Proliferationspotential sowie die Fähigkeit zur chondrogenen und osteogenen Differenzierung besitzen. Der klinische Einsatz dieser Zellen erfordert die vorhergehende, intensive Erforschung der Zellen *in vitro* und in Tiermodellen *in vivo*, um potentielle Risiken für Patienten zu beseitigen. Auch die Verwendung der Zellen als Modellsystem findet statt. HSC und MSC aus KM werden genutzt, um die Interaktionen von adulten Stammzellen mit ihrer Nische näher zu untersuchen, für *in vitro*-Modelle zur Erforschung molekularer Krankheitsmechanismen und in *in vitro*-Differenzierungsmodellen. Diese Stamm- und Vorläuferzellen finden ebenfalls Verwendung in der pharmazeutischen Medikamentenentwicklung, bei Substanztestungen und Wirkstoffscreenings.

1.2 Genexpression in der embryonalen Entwicklung und Differenzierung

Die interzelluläre Kommunikation, welche so entscheidende Prozesse wie Morphogenese, Proliferation und Differenzierung im Embryo reguliert, wird von etwa einem halben Dutzend grundlegender Signalwege – dem Tgf- β /Bmp-, dem Rezeptor-Tyrosinkinase-, dem Kernrezeptor, dem Jak/Stat-, dem Notch- und nicht zuletzt dem Hedgehog- und dem Wnt-Signalweg – kontrolliert⁶¹⁻⁶³. Jeder dieser Signalwege ist wiederholt während der frühen Embryonalentwicklung, aber auch bei der Genese aller Organe aktiv. Dabei kommt dem Zusammenspiel aller, sowie der Aktivierung und Repression einzelner Signalwege eine entscheidende Rolle zu.

Medizinisch haben die genannten Signalwege eine besondere Bedeutung erlangt, da die Fehlregulationen jedes einzelnen im adulten Organismus zur Entstehung verschiedener Krankheiten, wie Krebs, führen kann oder während der Embryonalentwicklung bereits letal ist⁶⁴⁻⁶⁸. Viele dieser Signalwege sind in homologer Art in verschiedenen Organismen vertreten. Dabei zeigt sich eine Zunahme der Komplexität von einfacheren Organismen zu den Vertebraten. Erfolgreiche Embryogenese erfordert eine Vielzahl an streng kontrolliert und zeitlich koordiniert ablaufenden Prozessen. Zellen müssen gemäß ihrer Position im sich entwickelnden Embryo spezifische Signale erhalten, die ihr Zellschicksal determinieren. Die Einteilung über identitätszuweisende Gene verschafft übergeordnete Struktur und ist gleichermaßen Bestandteil der Embryonalentwicklung vieler Organismen.

1.2.1 Homeobox-Gene

Die 1978 durch E.B. Lewis⁶⁹ erstmalig in *Drosophila* beschriebene Familie der Homeobox-Gene (*Hox*-Gene) konnte in den darauffolgenden Jahren in vielen weiteren eukaryotischen Organismen nachgewiesen werden⁷⁰⁻⁷³. *Hox*-Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, die eine stark konservierte Proteindomäne, die Homeodomäne gemeinsam haben⁷⁴. Die aus 60 Aminosäuren bestehende Domäne ist funktioneller Teil jedes *Hox*-Proteins, der durch Anlagerung an proteinkodierende DNA-Sequenzen die Transkription aktiviert oder unterdrückt⁷⁵.

Säugetiere

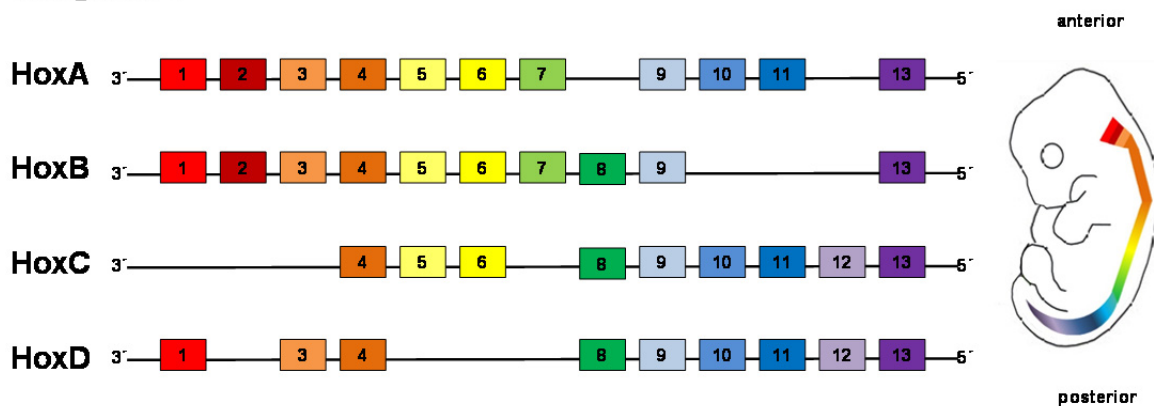


Abb.1: *Hox*-Gene in Säugetieren. Die 39 Gene der 4 Cluster Hox A, B, C und D von Säugetieren sind schematisch dargestellt. Paraloge *Hox*-Gene liegen in der Abbildung senkrecht zueinander. Die Teilabbildung rechts zeigt schematisch die räumlich-kollineare Verteilung der Genexpression im murinen Embryo. Abbildung in Anlehnung an Swalla *et al.*⁷⁶.

Im humanen System sind 39 *HOX*-Gene beschrieben, die in vier Gruppen/ Cluster (HoxA - HoxD) zusammengefasst werden (Abb.1)⁷⁷. Vermutlich gingen die vier in Säugetieren vorhandenen Gruppen aus zwei Genomduplikationen während der Evolution hervor^{78,79}. Mit nur wenigen Ausnahmen werden *Hox*-Gene kolinear zur Körperachse von anterior zu posterior und zeitlich aufeinanderfolgend exprimiert, wobei solche, die näher am 3'-Ende liegen zeitlich und lokal früher in der Entwicklung exprimiert werden als solche am 5'-Ende (Räumliche Kolinearität) (Abb.1)⁸⁰. Paraloge *Hox*-Gene weisen eine hohe Redundanz auf, so dass einige Mutationen erst phänotypisch in Erscheinung treten, wenn das *Hox*-Gen in allen vier Clustern inaktiviert ist⁸¹. Anderen Krankheitsbildern liegt nur eine einzige Mutation zugrunde, die nicht von Paralogen ausgeglichen wird⁸².

Die zeitliche und räumliche Abfolge der *Hox*-Genexpression ist maßgeblich an der Achsenfestlegung, aber auch der Entwicklung der Extremitäten während der Embryogenese beteiligt und ist somit von essentieller Bedeutung für die Entwicklung eines Lebewesens⁸³. Es wird eine Vielzahl von potentiellen Zielgenen der *Hox*-Gene als Transkriptionsfaktoren vermutet⁸⁴. Ektopische Expression eines *Hox*-Genes kann schwerwiegende Missbildungen bis hin zum Identitätstausch ganzer Körpersegmente zur Folge haben (Homöotische Mutation)⁶⁹ und ist im Allgemeinen letal.

1.2.2 Wnt-Signalwege

Traditionell wird der Wnt-Signalweg in einen kanonischen-, über β -Catenin vermittelten Signalweg und mehrere nicht kanonische Signalwege unterteilt. Die Signalwege sind nach ihren Liganden, den Wnt-Proteinen, benannt. "Wnt" ist ein Akronym aus den Anfangsbuchstaben des Wingless-Proteins der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und des homologen murinen Protoonkogens *Int-1*. Wnt-Proteine sind Cystein-reiche, sezernierte Glykoproteine. Die posttranslationale Palmitoylierung der Proteine ist wichtig für ihre Funktion^{85,86}. Bei der Palmitoylierung werden posttranslational Fettsäuregruppen zur Modifikation von Cysteinresten in Proteinen genutzt.

Es wurden bislang 19 humane WNT-Proteine identifiziert (vergl. Wnt-Homepage⁸⁷). Eine Einteilung der *Wnt*-Gene in kanonische und nicht kanonische⁸⁸ Gene ist mittlerweile veraltet, da auch ursprünglich als nicht kanonisch definierte Wnt-Proteine bei der Bindung an einen entsprechenden Rezeptor eine Akkumulation von β -Catenin hervorrufen können. Es kommt auf die Kombination von Rezeptor, Ko-Rezeptor und Wnt-Protein an⁸⁹.

Wnt-Proteine interagieren im kanonischen wie auch in den nicht kanonischen Wnt-Signalwegen mit mehreren (Ko-)Rezeptoren, um verschiedene Signale auszulösen. Dazu zählen transmembrane Rezeptoren der Frizzled Familie⁹⁰, *low density lipoprotein receptor-related* Proteine 5 und 6 (Lrp5 und Lrp6)⁹¹, *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2* (Ror2)⁸⁹ und *receptor-like tyrosine kinase* (Ryk)⁹². Die Interaktion geht teilweise auch mit der Endozytose der Oberflächenrezeptoren einher⁹³⁻⁹⁵.

Nicht kanonische Wnt-Signalwege sind beispielsweise der kalziumabhängige Wnt/ Kalzium-Signalweg oder der planare Zellpolaritätssignalweg⁹⁶⁻⁹⁸. Der Wnt/ Kalzium-Signalweg steht in Verbindung mit der Aktivierung der *nemo-like kinase* (Nlk), die über Phosphorylierung der Tcf Transkriptionsfaktoren den kanonischen Wnt-Signalweg inhibieren kann⁹⁹.

Die Forschung steht erst am Anfang der Entschlüsselung weiterer nicht kanonischer Signalwege, welche über Wnt-Proteine aktiviert werden. Der am besten untersuchte, über Wnt-Proteine aktivierte Signalweg ist der β -Catenin-abhängige, kanonische Signalweg, der im Folgenden näher erläutert wird.

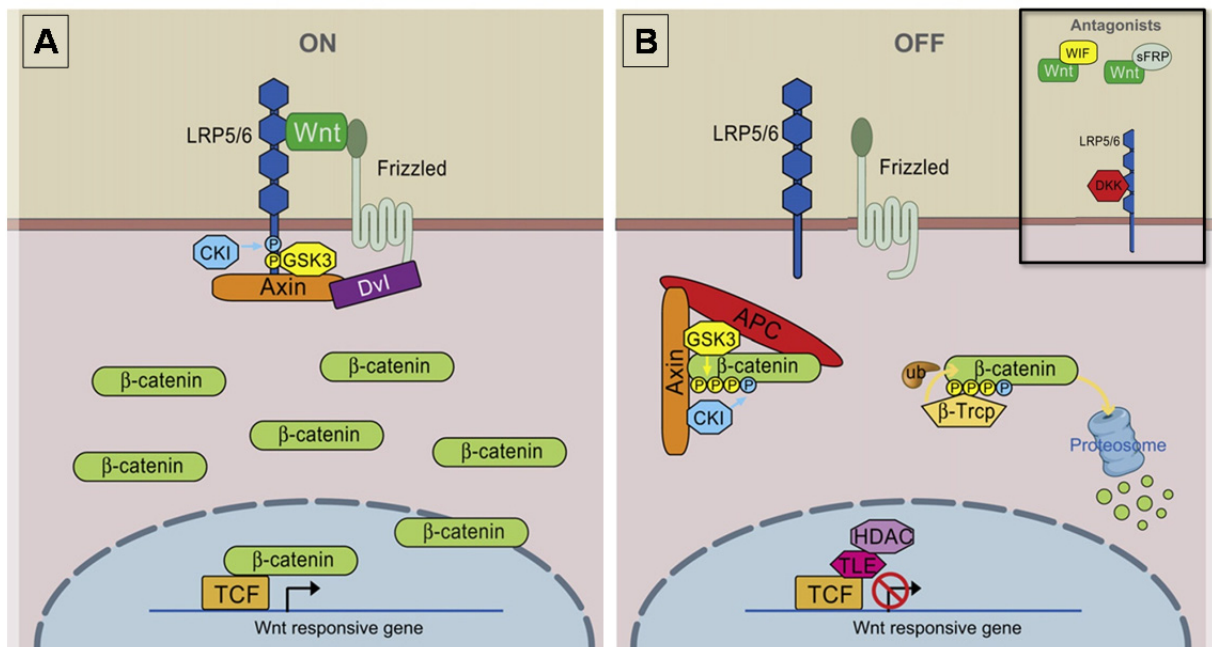


Abb.2: Kanonischer Wnt-Signalweg. Abbildung A: Aktiver kanonischer Wnt-Signalweg. Abbildung B: Ohne Wnt-Signale wird β -Catenin im Zytosol phosphoryliert, ubiquitiniert und abgebaut. Antagonisten verhindern die Initiierung des Signalweges (Kasten). Abbildung modifiziert nach MacDonald *et al.* ¹⁰⁰.

Die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges findet über die Bindung eines Wnt-Proteins an einen Rezeptorkomplex aus dem Transmembranprotein *Frizzled* (Fzd) und den *low density lipoprotein receptor-related* Proteinen 5 oder 6 (Lrp5 oder Lrp6) statt ¹⁰¹⁻¹⁰⁴ (Abb.2 A). Die Bindung des Wnt-Proteins an den Rezeptor führt zur intrazellulären Inhibition des Komplexes, der für die Initiierung des Abbauprozesses von β -Catenin im Zytosol verantwortlich ist ¹⁰⁵⁻¹¹². Infolgedessen kommt es zur Anreicherung von β -Catenin im Zytosol. β -Catenin gelangt in den Zellkern, wo es an die Transkriptionsfaktoren der Gruppe *T-Cell factor* und *lymphoid-enhancer binding factor* (Tcf/ Lef1) bindet und so die Zielgenexpression des Wnt/ β -Catenin-Signalweges reguliert ¹¹³⁻¹¹⁵.

Eine Hemmung des Wnt-Signalweges kann auf viele Arten geschehen und das Zusammenspiel von aktivem und gehemmtm kanonischen Wnt-Signalweg ist, auch im Zusammenspiel mit anderen Signalen, an fundamentalen Entwicklungsprozessen beteiligt ^{90,113,116-121}. Ohne Wnt-Proteine die an *Frizzled* binden, wird β -Catenin im Zytosol phosphoryliert, ubiquitiniert und abgebaut ¹²². Es findet keine Zielgenexpression statt (Abb.2 B).

Antagonisten wie *Wnt inhibitory factor 1* (Wif1)^{123,124}, *secreted Frizzled-related proteins* (sfrp)^{125,126} oder *Dickkopf-related proteins* (Dkk)^{127,128} binden freie Wnt-Proteine respektive Teile des Rezeptorkomplexes und verhindern auf diese Weise die Initiierung des Signalweges, auch wenn Wnt-Proteine zur Verfügung stehen (Abb.2 B Kasten). Da sie extrazellulär die Bindung von Wnt an den Rezeptorkomplex verhindern, beeinflussen Wif1 und sfrp1-5 auch die nicht kanonischen Signalwege während Dkk1 an den Ko-Rezeptor Lrp5/6 bindet, seine Internalisation unterstützt¹²⁹ und somit nur Signalwege beeinflusst, für deren Aktivierung Lrp5/6 zur Verfügung stehen muss¹³⁰. *Nkd1* ist ein Zielgen des Wnt-Signalweges und agiert intrazellulär als negativer *Feedback*-Regulator¹³¹. Es bindet Dvl und verhindert die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern^{132,133}. XCtBP bindet im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) als Ko-Repressor an Mitglieder der *Family of T-cell factors* (Tcf) und inhibiert das Ablesen der Zielgene¹³⁴.

Der Wnt-Signalweg und die *Hox*-Gene sind sehr früh in der Evolution entstanden und ihre starke Konservierung unterstreicht ihre Wichtigkeit. Die beteiligten Gene sind in der fortwährenden Aufrechterhaltung und Erneuerung von beanspruchten Geweben des adulten Organismus von entscheidender Bedeutung. Das Gleichgewicht zwischen Stammzellerhalt und Differenzierung in Geweben, wie dem Darmepithel oder dem hämatopoetischen System, ist essentiell für einen gesunden Organismus¹³⁵⁻¹⁴⁰. Über die Kontrolle der Zielgenexpression kann der Wnt-Signalweg die Proliferation und Differenzierung regulieren und ist somit auch für adulte Stamm- und Vorläuferzellen bei der Entscheidung über das Zellschicksal von großer Bedeutung. *Wnt*- und *Hox*-Gene sind ebenfalls elementare Faktoren während der Embryogenese. Die Entwicklung der Gliedmaßen in Wirbeltieren beispielsweise ist ein komplexer Prozess, der auf dem Zusammenspiel verschiedener Signalwege, Proteine und Gene, einschließlich des Wnt-Signalweges und den *Hox*-Genen, beruht¹⁴¹.

1.3 Knorpel- und Knochenbildung

Alle Vertebraten nutzten Knorpel- und Knorpelgewebe als Grundlage für ihr inneres Stützgewebe - das Skelett. Zellen, die während der humanen Embryogenese das Skelett bilden, sind verschiedenen Ursprungs. Zellen des paraxialen Mesoderms bilden mit Zellen des Notochord Strukturen des axialen Skeletts, ectodermale Zellen der Neuralleiste bilden Schädelstrukturen. Zellen des Seitenplattenmesoderms sind an beiden genannten Prozessen beteiligt und bilden zudem Strukturen der Extremitäten^{142,143}. Die Knochenbildung (Ossifikation) selbst kann auf verschiedene Arten erfolgen. Sie findet entweder durch direkte Verknöcherung (desmal) oder indirekt durch den Ersatz von zuvor gebildetem knorpeligem Gewebe durch Knochen (chondral) statt¹⁴⁴.

Zu den desmal gebildeten Strukturen zählen zum Beispiel der Schädelknochen sowie das Schlüsselbein. Die überwiegende Mehrzahl der Knochen, wie die Knochen des axialen Skeletts und der Extremitäten, werden durch chondrale Ossifikation gebildet¹⁴¹.

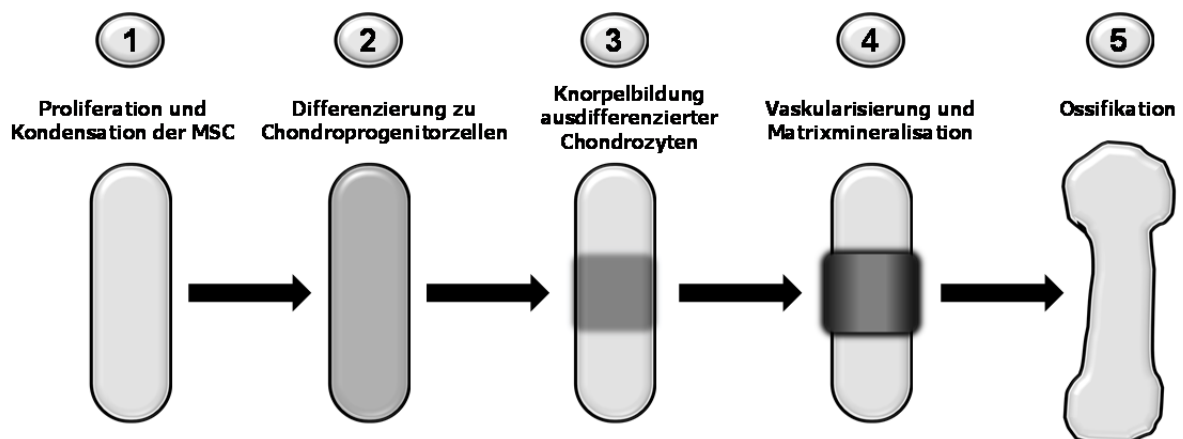


Abb.3: Ablauf der chondralen Ossifikation während der Entwicklung von Röhrenknochen. Die unterschiedlichen Stadien der Chondrogenese sind schematisch dargestellt. Abbildung in Anlehnung an Goldring *et al.*¹⁴⁵

In der Embryonalentwicklung lässt sich die Skelettogenese in fünf Abschnitte unterteilen: die Proliferation und Kondensation der mesenchymalen Stromazellen (1), deren Differenzierung zu Chondroprogenitorzellen (2), die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten über prä-hypertrophe und hypertrophe Chondrozyten zu ausdifferenzierten Chondrozyten (3), die Einwanderung von Zellen zur Vaskularisierung des Gewebes sowie die Matrixmineralisation (4) und abschließend die Bildung von Knochengewebe (5). Dabei wird das gebildete Knorpelgewebe mit Hilfe von Chondroklasten und Osteoblasten durch Knochen ersetzt (Abb.3).

Wichtige mesenchymale Zelltypen die an der Knorpel- und Knochenbildung beteiligt sind, sind Chondroblasten, die die Komponenten der extrazelluläre Matrix (EZM) des Knorpels bilden und zu Chondrozyten differenzieren sowie Osteoblasten, die Komponenten der Knochenmatrix (Osteoid) an die Umgebung abgeben und zu Osteozyten differenzieren. Die Knorpelmatrix besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen, wie Aggrecan (Acan) und kollagenen Fasern (Kollagen II). Die Knochenmatrix ist ebenfalls vorwiegend aus Kollagenen (Kollagen I) und zudem aus Proteoglykanen, *Bone Sialoprotein* (BSP), *Osteonectin*, *Osteopontin* und *Osteocalcin* (OC) zusammengesetzt. Chondroklasten sind zum Abbau der verkalkten Knorpelgrundsubstanz fähig, Osteoklasten sind die Gegenspieler der knochenbildenden Zelltypen und zum Abbau von Knochen- und Knorpelgewebe fähig ¹⁴⁵.

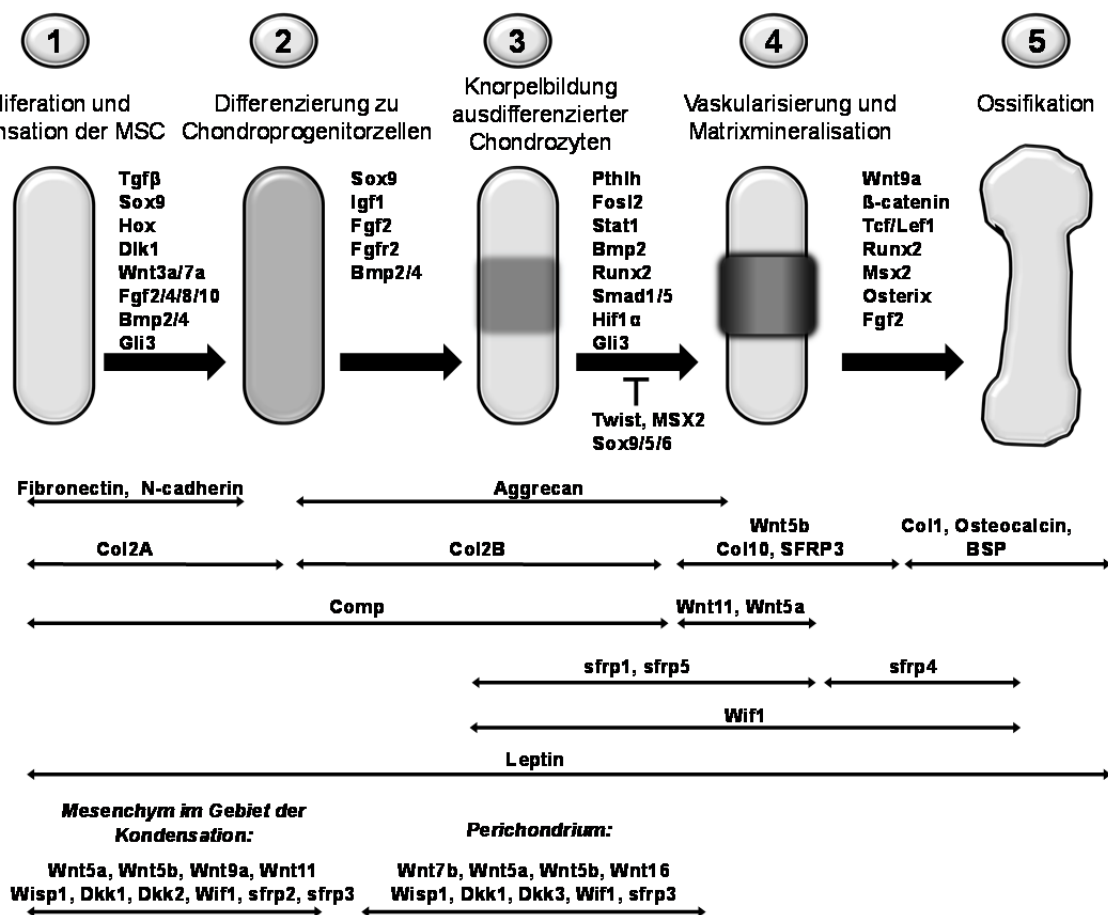


Abb.4: Chronologisch-schematische Übersicht der an der chondralen Ossifikation beteiligten Faktoren. Die Genexpressionszeiträume einiger Faktoren in verschiedenen Stadien der Differenzierung sind dargestellt. Abbildung modifiziert nach Goldring *et al.* ¹⁴⁵ und Witte *et al.* ¹⁴⁶.

Zu Beginn der Skelettentwicklung migrieren mesenchymale Stromazellen (MSC) an die Orte der späteren Knochenstrukturen und durchlaufen dort die fünf Abschnitte der Skelettogenese. Abbildung 4 zeigt diese fünf Differenzierungsstadien, unterlegt mit Expressionszeiten einzelner Gene, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Die Kondensation der MSC wird durch verschiedene Faktoren, wie **transforming growth factor beta (Tgf- β)**, initiiert, die unter anderem *Fibronectin* und *neural cadherin (N-cadherin)* hochregulieren können. Voraussetzung für die Kondensation sind spezifische Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen, die über Zelladhäsionsmoleküle vermittelt werden ^{141,147}. Es kommt zur Ausbildung eines dichteren, kompakten Zellverbands ¹⁴⁸. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die chondrogene Differenzierung ist **Sry-box 9 (Sox9)**.

Sox9 ist einer der ersten Marker, der von kondensierenden MSC vor und während der Chondrogenese exprimiert wird und seine Expression korreliert bei *In-situ*-Hybridisierung an Mausembryonen auffällig mit der von Kollagen II, einem Hauptbestandteil der Knorpelmatrix ¹⁴⁹. Frühe Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie das **cartilage oligomeric protein (Comp)**, interagieren mit Adhäsionsmolekülen und aktivieren eine interzelluläre Signaltransduktion, welche zur Reifung der Chondroprogenitorzellen zu Chondrozyten führt ¹⁴¹.

Insulin like growth factor 1 (Igf1) begünstigt die Umwandlung von mesenchymalen Stromazellen zu Chondroblasten und erhöht die Synthese von Proteoglykanen und Kollagenen ^{150,151}. Kondensierte Chondroprogenitorzellen/ Chondroblasten *in vivo* beginnen wieder zu proliferieren und sekretieren die extrazelluläre Knorpelmatrix. In differenzierten Chondrozyten werden *N-cadherin* und *N-CAM* nicht mehr exprimiert.

Collagen type 10 alpha 1 (Col10A1) ist ein Marker für prä-hypertrophe Chondrozyten, der in ausdifferenzierten Chondrozyten nicht mehr exprimiert wird ¹⁴³. Sowohl Sox9 als auch Col2A1 werden stark in Bereichen der Kondensation und später auch von proliferierenden Chondrozyten synthetisiert, nicht mehr jedoch in hypertrophen Chondrozyten.

Kanonische Wnt-Signale über **β -Catenin** fördern die Hypertrophie der Chondrozyten ¹⁵² und sind essentiell für die Osteoblasten-Entwicklung ¹⁵³. Auf die Knorpelbildung folgen die Einwanderung von Zellen aus dem Perichondrium in den hypertrophen Knorpel zur Vaskularisierung des Gewebes sowie die Matrixmineralisation mit Hilfe von Osteoblasten, Chondroklasten und Osteoklasten.

Frühe Osteoblasten geben zu Beginn die Knochenmatrix an ihre Umgebung ab, die von den reifenden Osteoblasten mineralisiert wird. Dabei exprimieren sie anfänglich vor allem *Kollagen I* und *Alkaline Phosphatase*, später auch ***Osteocalcin (Oc)*** und ***Bone Sialoprotein (Bsp)***. Vorherrschende Transkriptionsfaktoren zu dieser Zeit sind ***runx-related transcription factor 2 (Runx2)*** und ***Osterix (Osx)*** ^{143,154}.

Runx2, ein Transkriptionsfaktor, der an den *Osteocalcin* Promotor binden kann, wird im Anschluss an die Kondensation in osteogenen (Vorläufer-) Zellen exprimiert ^{148,155}. Runx2 bindet und aktiviert Col10A1, Bsp und Oc ¹⁵⁶. *Osterix* wird nur von Osteoblasten exprimiert und ist relevant für deren weitere osteogene Reifung ¹⁵⁷. Die anschließende terminale Differenzierung von Osteoklasten wird über die Hauptkomponente des kanonischen Wnt-Signalweges β -Catenin reguliert. *Osteoprotegrin*, ein Zielgene des kanonischen Wnt-Signalweges, inhibiert die Differenzierung der Osteoklasten. Wnt-Signale nehmen über die Regulation der Osteoklastendifferenzierung Einfluss auf die Knochenresorption ^{158,159}.

Im adulten Organismus dient Knorpelgewebe als Stützgewebe und wird vor allem durch die Diffusion von Nährstoffen aus dem Perichondrium und der Synovia (Gelenkflüssigkeit) versorgt. Es zeichnet sich durch hohe Elastizität aus. Knochen- und Knorpelstrukturen dienen der Ausbildung von Gelenken zur Erweiterung des Bewegungsradius der Gliedmaßen ¹⁴³. Verlust des nicht-regenerationsfähigen Knorpelgewebes ist vielfach Ursache von Gelenkerkrankungen im Alter. Die Frakturheilung von Knochen im adulten Organismus findet durch Neubildung von Knochengewebe statt ¹⁶⁰. Diesem Prozess liegt vermutlich die Reaktivierung von komplexen, molekularen Signalwegen zugrunde, die schon während der fötalen Entwicklung für die Skelettogenese zuständig waren ^{161,162}.

1.4 Ziele der Arbeit

Neben den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) enthält Nabelschnurblut (NSB) auch multipotente mesenchymalen Stromazellen (CB-MSC) und unrestringierte somatische Stammzellen (USSC)⁵⁴. Diese aus dem NSB generierbaren nicht-hämatopoetischen Vorläuferzellen unterschieden sich in ihrem Differenzierungspotential *in vitro* und *in vivo*. Die molekularen Ursachen dafür sind erst ansatzweise erforscht und welche Faktoren für die Regulation von Selbsterhalt, Proliferation und Differenzierung verantwortlich sind, ist weiterhin von großem Interesse für die spätere Anwendung der Zellen in Modellsystemen oder der regenerativen Medizin.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut auf Grundlage der bisher bekannten Unterscheidungsmerkmale und im Vergleich zu mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark (KM-MSC) auch auf klonaler Ebene *in vitro* charakterisiert werden.

Die im menschlichen Körper vorhandene Sauerstoffkonzentration variiert je nach Vaskularisierung des Gewebes und beträgt im Ursprungsgewebe von USSC, CB-MSC und KM-MSC weniger als die üblicherweise zur *ex-vivo* Kultivierung genutzten 21% O₂. Es wurden Vorläuferzellen unter physiologischer Sauerstoffkonzentration (37 °C, 5% O₂, 5% CO₂) aus Nabelschnurblut (CB-H) und Knochenmark (KM-H) generiert und kultiviert. Ob ihre Generierung und Kultivierung unter 5% O₂ Einfluss auf die Genexpression oder das Differenzierungspotential der Zellen hat, sollte analysiert werden.

Die Untersuchung verschiedener, an der Embryonalentwicklung maßgeblich beteiligter Signale in den neonatalen Zellpopulationen aus NSB und ihr mutmaßlicher Einfluss auf Zelleigenschaften *in vitro* war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Die *Homeobox*-Genexpression und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg sind an der Steuerung vieler elementarer Prozesse während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus beteiligt. Es wurden Analysen durchgeführt, um die vor kurzem entdeckten Unterschiede im Expressionsmuster der *Homeobox*-Gengruppe verschiedener Vorläuferzellen aus NSB zu verifizieren und eventuelle Ursachen zu ermitteln. Von besonderem Interesse war zudem die Analyse einzelner, am Wnt-Signalweg beteiligter Gene in undifferenzierten und in *in vitro* differenzierten Zellen. Spiegelt sich das Differenzierungspotential in der Genexpression wider und kann es durch die Überexpression einzelner Gene beeinflusst werden?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Tab.1: Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Material:	Hersteller/ Bezogen von:
Agarose (Select Agar; gelöst zu 12 g/ L in H ₂ O)	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose <i>Molecular biology grade</i>	Eurogentec, Köln
Agarose MP	AppliChem, Darmstadt
Alizarin Rot (2%, pH 4.1 - 4.3)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin (Pulver, gelöst zu 50 mg/ ml in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Aquatex wässriges Eindeckmittel für Mikroskopie	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure (50 µg/ ml in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATX <i>Ponceau S red staining solution</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Glycerophosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol (98%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau, Pulver	Roth, Karlsruhe
BSA (Pulver, fatty acid free, gelöst in DMEM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Chamberslide Lab Tek II, Glass slides sterile</i>	Nalgene, Thermo Fisher Scientific Inc.
Cryoröhrchen, 2ml	Greiner BioOne, Frickenhausen
<i>Cytofix/Cytoperm solution</i>	Becton Dickinson Biosciences, Bedford, USA
<i>Dexamethasone-soluble water cell culture tested</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>DMEM with 1 g/l glucose; without L-Glutamine</i>	Lonza, Verviers Belgien
<i>DMEM with 4,5 g/l glucose; without L-Glutamine</i>	Lonza, Verviers Belgien
DMSO (Dimethylsulfoxid, flüssig)	WAK-Chemie, Steinbach
Echt Grün	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat) Titrierkomplex III	Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten (2 mm Spaltbreite)	Bio-Rad Laboratories,
Entellan Schnelleindeckmittel	Merck, Darmstadt
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth, Karlsruhe
<i>Ficoll Separating solution</i>	Biochrom AG, Berlin
Fötales Kälber Serum (FCS)	Perbio, HyClone; Gibco; Lonza
Humanes serum albumin (HSA) (20%)	Octapharma, Langenfeld
IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-xanthine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indomethacin (Pulver, gelöst zu 50 mM in Ethanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin, Transferrin, Sodium-Selenit (ITS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Insuline solution from bovine pancreas 10 mg/ ml, 25 mM</i>	Sigma-Aldrich (Fluka), Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Greiner BioOne, Frickenhausen
LB-Broth Base (Lenox L Broth; gelöst zu 20 g/ L in H ₂ O)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamine	Lonza, Verviers Belgien
Low MW DNA Leiter	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main

Material:	Hersteller/ Bezogen von:
Methanol (flüssig, ≥ 98%)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
<i>Nuclear fast red</i>	Merck, Darmstadt
<i>Oil Red-O</i> (0,3% gelöst in Isopropanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd Lösung (4% in PBS)	Fischar, Saarbrücken
Penicillin/ Streptomycin Lösung (Pen/ Strep) (100X)	Lonza, Basel Switzerland
Petrischalen (100x20 mm)	Greiner BioOne, Frickenhausen
<i>Phosphat-buffered saline</i> pH 7.3 (PBS)	Serag Wiessner, Naila
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg
Polyacrylamidgel NuPAGE 4-12% Bis Tris 1,5 mm 15 Well	Invitrogen, Karlsruhe
Polyethylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner BioOne, Frickenhausen
Potassium Ferricyanide	Merck, Darmstadt
Potassium Ferrocyanide	Merck, Darmstadt
<i>ProLong Gold antifade reagent with DAPI</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail (<i>complete mini</i>)	Roche, Mannheim
<i>QIAshredder</i>	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
<i>Reprobe</i> Nylon, Positiv-geladene Transfermembran	AppliChem, Darmstadt
Röhrchen (50 ml)	Becton Dickinson Biosciences, Bedford, USA
Safranin O	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Spritzenfilter/ Sterilfilter (0,45 µm Porengröße)	Nalgene, Thermo Fisher Scientific Inc.
Stickstoff (flüssig)	Linde Gas, Linde AG Düsseldorf
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning/ Costar, Bodenheim
Superfrost Plus Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Tissue Freezing Medium	Nussloch
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin (2,5%, 10X)	Lonza, Verviers Belgien
Trypsin-EDTA Lösung (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA; 10X)	PAA Laboratories, Pasching Österreich
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β-Galactosid)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zellkulturflaschen (T25, T75, T225, Cellstack)	Corning/ Costar, Bodenheim
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Well)	Corning/ Costar, Bodenheim
Zellschaber, 180 mm Blattlänge	Corning/ Costar, Bodenheim

2.1.2 Zellkultur

2.1.2.1 Verwendete Zelllinien

Im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika werden Stammzelltransplantate aus NSB unter qualifizierten GMP-Bedingungen hergestellt. Entspricht das gewonnene NSB nicht den Richtlinien kann es mit Einverständnis der Mutter zu Forschungszwecken verwendet werden. Alle aus NSB und KM generierten, verwendeten Zellen wurden im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) generiert und kultiviert^{52,53,163,164}.

Humane Vorhautfibroblasten (NHDF812) wurden freundlicherweise von der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Zellen der Zelllinie HEK293T, die einer menschlichen embryonalen Nierenzelle entstammt, wurden freundlicherweise vom Institut für Humangenetik und Anthropologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bereitgestellt. NHDF812 und HEK293T Zellen wurden im ITZ als Kontrollen verwendet. HEK293T Zellen dienten der Herstellung von Viruspartikeln und wurden im ITZ kultiviert. Weitere in dieser Arbeit verwendete Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Für mikrobiologische Arbeiten wurden *Escherichia coli* (*E.coli*) Top10 von Invitrogen verwendet.

Zur Vereinfachung wurden die in dieser Arbeit verwendeten USSC-, CB-MSC- und KM-MSC-Zelllinien durchnummeriert (vergleiche Tab.I Anhang).

2.1.2.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Die Zellkulturmedien wurden zeitnah angesetzt und nicht länger als eine Woche verwendet.

Kulturmedium für USSC und MSC:

DMEM (*low glucose*: 1 g/ l), FCS (30%), Penicillin/ Streptomycin (1%), L-Glutamin (1%)

Chondrogene Differenzierung:

DMEM (*high glucose*: 4,5 g/ l), Penicillin/ Streptomycin (1%), Dexamethason (10^{-7} M),

TGF- β 1 (0,01 ng/ ml), Sodium Pyruvat (0,1 mM), 1x ITS,

Ascorbinsäure-2-Phosphat (0,35 μ g/ ml)

Osteogene Differenzierung:

DMEM (*low glucose*: 1 g/ l), FCS (30%), Penicillin/Streptomycin (1%), L-Glutamin (1%),

Ascorbinsäure (50 μ g/ ml), β -Glycerophosphate disodium salt hydrate (10 mM),

Dexamethason (10^{-7} M)

Adipogene Differenzierung:

Induktionsmedium: DMEM (*high glucose*: 4,5 g/ l), FCS (10%), Penicillin/ Streptomycin (1%),

L-Glutamin (1%), Dexamethason (10^{-6} M), Indomethacin (0,2 mM), Insulin (0,1 mg/ ml),

IBMX (1 mM)

Kultivierungsmedium: DMEM (*high glucose*: 4,5 g/ l), FCS (10%),

Penicillin/ Streptomycin (1%), L-Glutamin (1%), Insulin (0,01 mg/ ml)

2.1.3 Zell- und Molekularbiologische Analysen

2.1.3.1 Primer

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen (0,02 µM, HPCL gereinigt). Zur Analyse der Expression des chondrogenen Markers SOX9 wurde die SOX9 spezifische TaqMan®-Sonde von Applied Biosystems verwendet. Die Primersequenzen zur Bestimmung der HOX-Genexpression wurden aus Liedtke *et. al* entnommen ¹⁶⁵.

Tab. 2: Primerübersicht

Genname	Primer Sequenz (5' - 3')	Primer Sequenz (5' - 3')	Tm [°C]	Produktgröße
ACAN	CCAGTGCACAGAGGGGTTTG	TCCGAGGGTGCCGTGAG	60°C	146 bp
BMP4	CCACCACGAAGAACATCTGG	ACCTCGTTCTCAGGGATGC	60°C	96 bp
BSP	GGGCAGTAGTGACTCATCCG	AAGCTGGATTGCAGCTAACCC	60°C	214 bp
COL10A1	ACGCTGAACGATACCAATG	CTTGCTCTCCTCTTACTGCT	60°C	117 bp
COMP	AACACGGTGATGGAGTGTGAC	TCTCCGTCTGGATGCAGG	55°C	130 bp
CTBP1	GCTTGGCGTCCGACCTC	CTTCAGGATGGGCATCTCC	60°C	103 bp
DKK1	ATGCGTCACGCTATGTGCT	CCACAGTAACAACGCTGGAA	60°C	356 bp
DLK1	AGAACCCTATGGGGCTGAAT	GTCACGCACTGGCACAAAG	60°C	119 bp
FGF2	TGTACTGCAAAAACGGGGG	TCCTTCATAGCCAGGTAACGG	55°C	166 bp
FGF5	GGATGGCAAAGTCAATGGATC	GAGTTTTCCTTTTTTGACATCGC	60°C	135 bp
FOSL1	CAGCAGAAGTTCCACCTGGT	GGGCTGATCTGTTCAACAAGG	60°C	212 bp
FOSL2	GGCTCAGGCAGTGCATTCT	ACGCTTCTCCTCCTCTTCAGG	55°C	258 bp
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	60°C	228 bp
GSK3β	CTGGTCGCCATCAAGAAAGT	ATCACAGGGAGCGTCTGTTT	55°C	227 bp
TERC	TCTAACCCCTAACTGAGAAGG	CCAGCAGCTGACATTTTTTG	60°C	145 bp
TERT	GCCTGAGCTGTACTTTGTCAA	CGCAACAGCTTGTCTCCA	55°C	457 & 421 & 275 & 239 bp
IGF1	CCTCCTCGCATCTCTTCTA	AAGCAGCACTCATCCACG	60°C	208 bp
LRP5	ATCCATGCAGTGAGGAAGTC	TGGGCGGCTCTCCACAGGTC	55°C	172 bp
LRP6	GATTCAGATCTCCGGCGAATT	GGCTGCAAGATATTGGAGTCTTCT	55°C	83 bp
MSX2	AATTCAGAGATGGAGCGGCGTG	CGAGGAGCTGGGATGTGGTAAAG	65°C	145 bp
MYC	GCTGCTTAGACGCTGGATTT	TGCTGCTGCTGCTGGTAGAAGTT	60°C	167 bp
NANOG	TGAGATGCCTCACACGGAG	TTGCTCCAGGTTGAATTGTTT	60°C	495 bp
OC	CCTCACACTCCTCGCCCTATT	CCCTCCTGCTTGGACACAAA	60°C	117 bp
OSX	TGCTTGAGGAGGAAGTTCAC	CTGAAAGGTCAGTGCCTCAC	60°C	153 bp
POU5F1/ OCT4	AGCCCTCATTTACCAAGGCC	TGGGACTCCCTCCGGGTTTTG	60°C	456 bp
PTHLH	GTGTTCTGCTGAGCTACGC	GCTGTGTGGATTTCTGCGATCA	60°C	172 bp
RPL13A	GAGGTATGCTGCCCCACAAA	TTGAGACGCACGACCTTGAG	60°C	136 bp
RUNX2	GAGTGGACGAGGCAAGAG	GGACACCTACTCTCATACTG	60°C	215 bp
sFRP3	GGAGCTGATTTTCTATGGATTC	TCCGGAATAGGTCTTCTGTG	60 °C	106 bp
sFRP4	CTCGCCTGAAGCCATCGTC	TCCTGTACCATCATGTCTGGTGTG	60 °C	78 bp
sFRP5	CGCCTCCAGTGACCAAGAT	CTGGGCTCCAATCAGCTTC	55°C	152 bp
SOX2*	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	60°C	151 bp
TWIST1	GACCTAGATGTCAATTGTTCC	GCCCTGTTCTTTGAATTTG	55°C	140 bp
WIF1	CTCCCTGGATAAAGGCATCATGGC	CACTCGCAGATGCGTCTTTTATTA	65°C	279 bp
WNT3A	GCCCCACTCGGATACTTCTTACT	GAGGAATACTGTGGCCCAACA	60°C	98 bp
WNT5A	CATGAAGAAGTCCATTGGA	ACTTCTGACATCTGAACAG	55°C	180 bp
WNT9A	CCTGGAGAACCCTGAGGCCCT	TCTCCACCCAGCCTTGAT	65°C	170 bp
WNT10B	GCGCCAGGTGGTAACTGAA	GAATTGCGGTTGTGGGTATC	55°C	171 bp

* entnommen aus Takahashi *et. al* ²⁵.

2.1.3.2 Antikörper

Tab.3: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie, IHC und WB

Antikörper Durchflusszytometrie	Quelle	Antikörper IHC und WB	Quelle
CD 13 PE (Klon L138)	BDBioscience	mouse anti-WIF1 (Klon MM0602-6D27)	Abcam Inc.
CD 29 FITC (Klon K20)	Immunotech	mouse anti-BMP4 (Klon 66119.11)	Thermo Fisher Scientific
CD 31 FITC (Klon 3.6E)	Immunotech	rabbit anti-WNT3A (Klon C64F2)	Cell Signaling
CD 34 FITC (Klon 581)	Immunotech	mouse monoclonal anti β -Actin (Klon AC-74)	Sigma Aldrich
CD 44 FITC (Klon J.173)	Immunotech	goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz
CD 45 FITC (Klon 2D1)	BDBioscience	goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz
CD 73 PE (Klon AD2)	BDBioscience	goat anti-mouse IgG rhodamine red	Jackson ImmunoResearch
CD 90 FITC (Klon F15-42-1-5)	Immunotech		
CD 105 PE (Klon 166707)	R&D Systems		
HLA-ABC FITC (Klon B9.12.1)	Immunotech		
HLA-DR PE (Klon G46-6)	BDBioscience		
IgG1 FITC	Immunotech		
IgG1 PE	Immunotech		

2.1.3.3 Kits, Enzyme und Puffer für molekularbiologische Analysen

Tab.4: Kits, Enzyme und Puffer für molekularbiologische Analysen

Material:	Hersteller/ Bezogen von:
1 kb Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Leiter	NEB, Frankfurt am Main
10X PCR Puffer	Qiagen, Hilden
5X <i>High Fidelity</i> PCR Puffer	NEB/ Finzymes, Frankfurt am Main
Alkalische Phosphatase (<i>Calf Intestine Phosphatase/ CIP</i>)	NEB, Frankfurt am Main
<i>BAMH1 (FastDigest)</i>	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Big Dye Sequencing</i> Puffer	Applied Biosystems, Foster City Kalifornien
<i>BigDye Ready Reaction Premix</i>	Applied Biosystems, Foster City Kalifornien
<i>Cellular Senescence Assay Kit (SA-β-gal Staining)</i>	Cell Biolabs, San Diego Kalifornien USA
DNase I	Qiagen, Hilden
<i>DNeasy Blood & Tissue</i> Kit	Qiagen, Hilden
dNTP (je 10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>ECOR1 (FastDigest)</i>	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>FastDigest</i> -Puffer (10X)	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc.
Fugene Transfektions Reagenz	Roche, Mannheim
HotStar-Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
<i>Micro BCA Protein Assay</i> Kit	Pierce, Rockford Illinois
<i>NHE1 (FastDigest)</i>	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc.
Oligonukleotide/ Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham
Phusion <i>High-Fidelity</i> Polymerase	NEB/ Finzymes, Frankfurt am Main
Plasmid pALF-GALV	Prof. Dr. Klaus Cichutek
Plasmid pCD/ NL-BH	Prof. Dr. Jakob Reiser
Plasmid pCL6IEGwo	Constanze Wiek
Plasmid <i>Preparation</i> Kit	Qiagen, Hilden
<i>Qiaquick Gel Extraction</i> Kit	Qiagen, Hilden
RIPA Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
<i>RNase-Free DNase</i> Set	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Micro</i> Kit	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini</i> Kit	Qiagen, Hilden
<i>RT² First Strand</i> Kit	SABioscience, Frederick Maryland USA
<i>RT² SYBR Green / ROX qPCR Master Mix</i>	SABioscience, Frederick Maryland USA
<i>SeeBluePlus2 Pre-Stained Protein Standard (1x)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Super Script III First Strand Synthesis</i> System	Invitrogen, Karlsruhe
<i>SYBR Green Mastermix</i>	Applied Biosystems, Foster City Kalifornien
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt am Main
T4 DNA Ligase Puffer (10X)	NEB, Frankfurt am Main
<i>Telo TAGGG Telomere Length Assay</i> Kit	Roche, Mannheim
<i>Wnt Signaling Pathway PCR Array (PAHS-04)</i>	SABioscience, Frederick Maryland USA
<i>XHO1 (FastDigest)</i>	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc.

2.1.4 Geräte und Software

Tab.5: Verwendete Geräte und Software mit Angabe des Herstellers oder der Quelle

Gerät:	Hersteller:
Autoklav	Systec, Wettenberg
Aviso CellCelector	Aviso, Greiz
CO ₂ Inkubator HERAccl 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Einkanal Pipetten (variabel)	Eppendorf, Hamburg
FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Genepulser-2 Electroporation System	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Hochgeschwindigkeitssorter MoFlo XDP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Inkubator Hepa Class 100	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<i>Intelligent Dark Box</i> (LAS 3000 Lite)	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf
Kryostat Leica CM1850	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikroskop Axioplan2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop CKX 41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PCR-Cycler (MasterCycler proS)	Eppendorf, Hamburg
Photodokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Pipettierhilfe StarPet Pro	StarLab, Ahrensburg
Spannungsgeber für Elektrophoreseapparatur PoxerPac3000	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Schüttelwasserbad SW20	JULABO Labortechnik, Seelbach
<i>Sequence Detector</i> 7700	Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
StepOnePlus	Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Sterile Werkbank ANTARES	Biohit, Helsinki, Finnland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge MIKRO 22 R	Hettich Instruments, Massachusetts, USA
Zentrifuge ROTIXA 50 RS	Hettich Instruments, Massachusetts, USA
Software:	Entwickler/ Quelle:
<i>ApE A plasmid editor</i>	M. Wayne Davis, Freeware
<i>Axio Vision</i>	Zeiss, Jena
<i>Clone Program</i>	MFC Application
<i>Cluster/ TreeView</i>	Michael Eisen, Freeware
<i>DAVID Bioinformatics Resources 6.7</i>	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
<i>FACS DIVA 6.0</i>	Becton Dickinson
<i>geNorm calculation tool</i>	Center for Medical Genetics of the University Hospital Ghent
<i>ImageJ</i>	Wayne Rasband, Open Source
<i>ImageQuant TL</i>	GE Healthcare Europe, Freiburg
<i>Ingenuity Pathways Analysis (IPA)</i>	Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, Kalifornien
<i>LAS-3000 Software 2.1.5</i>	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf
<i>Prism 5.0</i>	Graph Pad, San Diego, Kalifornien
<i>SDS2.3 StepOne Software</i>	Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
<i>Sequence Scanner Software v1.0</i>	Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
<i>TELORUN</i>	C. Harley, R. Allsopp, H.Vaziri, Geron Corporation
<i>WinMDI Version 2.8.</i>	Joe Trotter

2.2 Methoden

2.2.1. Zellkultur eukaryotischer Zellen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten an einer Sterilbank mit sterilen Materialien und Reagenzien. Kultivierung unter Standard-Zellkulturbedingungen entspricht in dieser Arbeit 37 °C mit 21% O₂ und 5% CO₂, wohingegen 37 °C, 5% O₂ und 5% CO₂ physiologische Konditionen widerspiegeln sollten. Der Zustand der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert.

2.2.1.1 Zellzahlbestimmung und Viabilität

10 µl Zellsuspension wurden 1:1 (v:v) mit Trypanblau (0,4%) verdünnt und die lebenden, nicht angefärbten Zellen in 10 µl der Verdünnung in vier Großquadraten einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Anzahl Zellen wird durch die Anzahl ausgezählter Quadrate geteilt und mit dem Verdünnungsfaktor 2 und Kammerfaktor 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu berechnen. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Zellzahl pro ml multipliziert mit dem Gesamtvolumen.

2.2.1.2 Generierung und Kultur von Stromazellen aus Nabelschnurblut

Zur Generierung der hier verwendeten Zelllinien wurden nur Nabelschnurblutspenden verwendet, die zur Herstellung von allogenen Transplantaten nicht geeignet waren. Die Generierung der Zelllinien aus NSB erfolgte wie bereits 2004 beschrieben¹⁶⁶. Zusammenfassend dargestellt wurden die mononukleären Zellen (MNC) mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert, mit PBS gewaschen und das Präzipitat zur Erythrozyten-Lyse in Ammoniumchlorid inkubiert. Das erneut mit PBS gewaschene Präzipitat wurde in Generierungsmedium resuspendiert und ausplattiert. Für die Generierung unter physiologischen Bedingungen wurden die MNC eines Nabelschnurblutes aufgeteilt und unter 21% O₂ sowie 5% O₂ kultiviert. Nach sieben Tagen wurde das Medium erneuert. Das Generierungsmedium wurde durch Kulturmedium ersetzt, sobald sich Zellkolonien gebildet hatten.

2.2.1.3 Generierung und Kultur von Stromazellen aus Knochenmark

Für die Generierung der als Kontrollen genutzten KM-MSC wurde Apheresat verwendet. Es enthält Stromazellen, welche durch vorherige Mobilisierung aus dem Knochenmark ins periphere Blut gelangt sind. Apheresat von gesunden Spendern wurde von der Apherese des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) bereitgestellt. Zur Isolierung von MNC aus Knochenmark wurde dieses 1:2 mit PBS verdünnt und einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde die Zellzahl bestimmt und die MNC in Medium für KM-MSC ausplattiert. Für die Generierung unter physiologischen Bedingungen wurden die MNC eines Spenders aufgeteilt und unter 21% O₂ sowie 5% O₂ kultiviert. Nach vier Tagen wurde das Medium der Zellen erneuert.

2.2.1.4 Klonale Zelllinien aus dem Nabelschnurblut

Mit Hilfe von *Cloning*-Ringen wurden einzelne Kolonien einer Primärkultur getrennt trypsinisiert und weiterkultiviert. Dafür wurden die Zellen lichtmikroskopisch betrachtet und klar abgegrenzte einzelne Kolonien auf dem Zellkulturflaschenboden markiert. Der Deckel der Kulturflasche wurde unter Zuhilfenahme eines Lötkolbens entfernt, das Medium abgenommen und ein *Cloning*-Ring um eine zuvor markierte Kolonie geklebt. Durch die räumliche Isolierung konnten einzelne Kolonien einer Primärkultur getrennt trypsinisiert und weiterkultiviert werden. Verbleibende Kolonien wurden zusammen als Ursprungszelllinie weitergeführt. Eine weitere Möglichkeit ist die Einzelzellentnahme aus einer vorhandenen Zelllinie. Dazu wurden adhärent wachsende Zellen einer Zelllinie mit Hilfe des AVISO *CellCelector*[™] aus einer 6-Well-Platte entnommen und vereinzelt in einer 96-Well-Platte abgelegt. Die Kultivierung erfolgte zu Beginn in konditioniertem, steril filtriertem Medium der Ursprungszelllinie. Mit dieser Methode konnten klonale Linien aus bereits kultivierten Zelllinien etabliert werden.

2.2.1.5 Kultivierung adulter nicht-hämatopoetischer Stromazellen

Die adhärent wachsenden Stromazellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und bei 80% Konfluenz passagiert. Stromazellen aus NSB wurden mit 0,25% Trypsin Lösung, Stromazellen aus Knochenmark mit 0,25% Trypsin-EDTA Lösung vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Medium wurde zur Zellsuspension gegeben, um die enzymatische Reaktion des Trypsins zu verlangsamen, gefolgt von einer Zentrifugation für 7 Min. bei 550 g und 4 °C. Die Zellzahl wurde bestimmt und das Präzipitat in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Versuchsabhängig wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung oder Differenzierung ausplattiert, kryokonserviert, zur Isolierung von Nukleinsäuren bei -80 °C eingefroren oder in Puffer zur Proteinisolierung aufgenommen.

2.2.1.6 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in einer Zellzahl von $2-6 \times 10^6$ pro ml in 80% FCS in DMEM aufgenommen. Je 500 μ l der Zellsuspension wurden 1:1 (v:v) mit 20% DMSO gemischt, bei -80°C eingefroren und nach zwei bis drei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. 2 ml 50% FCS in DMEM wurden vor dem vollständigen Auftauen zur Zellsuspension gegeben. 12 ml 15% FCS in DMEM wurden hinzugefügt und nach einer Zentrifugation für 7 Min. bei 550 g und 4°C wurde das Präzipitat in Kulturmedium resuspendiert. Um die genaue Zahl lebender Zellen zu bestimmen, wurde nach dem Auftauen eine Zellzahlbestimmung mit Trypanblau durchgeführt (vergleiche 2.2.1.1).

2.2.2 Wachstumsverhalten und Differenzierung

2.2.2.1 Wachstumskinetik

Die einzelnen Populationsverdopplungen (*population doublings*, PD) einer Kultur wurden berechnet und addiert, um die kumulative Anzahl an Populationsverdopplungen (*cumulative population doublings*, CPD) zu bestimmen. Die Kolonienzahl nach der Generierung einer Zelllinie entspricht der ersten Anzahl ausplattierter Progenitorzellen. PD und CPD wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{PD} = \frac{\log(X_1) - \log(X_0)}{\log(2)}$$

X_0 = Anzahl ausplattierter Zellen

X_1 = Anzahl geernteter Zellen

$$\text{CPD}_N = \sum \text{PD (bis zum Zeitpunkt N)}$$

Die Zellen wurden nicht erneut in Kultur genommen, wenn die PD über mehrere Passagen stagnierten, abnahmen oder die Zellen morphologische Auffälligkeiten aufwiesen.

2.2.2.2 Osteogene Differenzierung *in vitro*

Für die osteogene Differenzierung wurden 1×10^4 Zellen/ cm^2 in Kulturmedium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium ersetzt. Während der 14-tägigen Kultur wurde das Differenzierungsmedium zweimal wöchentlich erneuert. Zur Kontrolle wurden Zellen der gleichen Zelllinie mit DMEM *low glucose* + 10% FCS ohne weitere Zusätze kultiviert.

2.2.2.3 Alizarin-Rot-, von Kossa-Färbung und Alizarin-Quantifizierung

Die osteogene Differenzierung der Zellen wurde nach 14 Tagen durch von Kossa- und/ oder Alizarin-Rot-Färbung überprüft.

Für die von Kossa-Färbung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 70% eiskaltem Ethanol für 10 Min., gefolgt von einem Waschschrift mit Aqua dest. und einer 30-minütigen Inkubation mit 5% Silbernitrat-Lösung unter Lichteinfluss. Nach einem erneuten Waschen mit Aqua dest. und einer Inkubation mit 1% Natriumthiosulfat für eine Minute wurden die Zellen 30 Minuten mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Färbung der gewaschenen und mit PBS überschichteten Zellen wurden noch am selben Tag fotografisch dokumentiert.

Der Farbstoff Alizarin färbt Kalziumeinlagerungen an. Für die Alizarin-Färbung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung mit -20 °C kalten 70% Ethanol für 20 Min. wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen und 10 Min. mit 2% Alizarin-Rot Lösung (pH 4.1-4.3) bedeckt. Die Zellen wurden fünfmal mit Aqua dest. gewaschen, anschließend mit PBS überschichtet und fotografiert. Die Färbungen wurden getrocknet und für die spätere Quantifizierung bei -20 °C gelagert.

Die Quantifizierung des Alizarin-Farbstoffes erfolgte nach Gregory *et. al*¹⁶⁷. Dazu wurden 800 µL 10% Essigsäure je *Well* einer 6-Well-Platte zugegeben und die Platten für 30 Min. schüttelnd bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und mit der verbleibenden Flüssigkeit in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 30 Sekunden vortexen wurden die Proben für 10 Min. auf 85 °C erhitzt und im Anschluss für 5 Min. auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden für 15 Min. bei 24500 g zentrifugiert und 500 µL des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 200 µL 10% Ammoniumhydroxid wurden hinzugegeben und die Absorption bei 405 nm photometrisch gemessen. Werte der jeweiligen Negativkontrolle wurden von differenzierten Zellen subtrahiert.

2.2.2.4 Adipogene Differenzierung *in vitro*

Für die adipogene Differenzierung wurden 1×10^4 Zellen/ cm² in Kulturmedium ausplattiert. Die Induktion erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen durch Zugabe des Induktionsmediums. Die Differenzierung verlief über 21 Tage. Ein Wechsel des Mediums erfolgte zweimal wöchentlich, wobei alternierend Induktionsmedium und Kulturmedium verwendet wurde. Zur Kontrolle wurden Zellen der gleichen Zelllinie mit DMEM *high glucose* + 10% FCS + PSG ohne weitere Zusätze kultiviert.

2.2.2.5 Öl-Rot Färbung und Quantifizierung

Die adipogene Differenzierung wurde nach 21 Tagen durch Öl-Rot Färbung überprüft. Das Medium der Zellen wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung durch 4% Formalin bei -20 °C für 2 Min. wurden die Zellen mit 50% Ethanol gewaschen und 20 Min. mit 0,2% Öl-Rot Lösung bedeckt. Öl-Rot ist ein fettlöslicher Farbstoff, der die Lipide in den Vakuolen der Zellen anfärbt. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschung mit 50% Ethanol entfernt, die Zellen mit PBS bedeckt und fotografiert.

Zur Quantifizierung der angefärbten Lipidvakuolen wurden je Differenzierungsansatz mindestens drei lichtmikroskopische Fotos der gefärbten Zellen analysiert. Bei der *ImageJ* gestützten Auswertung der Öl-Rot Färbungen wurden die Fotos mit der *ImageJ Javabased image processing* Software für Windows ausgewertet. Die Fotos wurden binär dargestellt und der Anteil an positiver Fläche in Prozent berechnet. Die Werte der Fotos der nicht induzierten Kontrollzellen wurden von den Werten der Zellen derselben Zelllinie, die mit Differenzierungsmedium behandelt worden waren, subtrahiert, um unspezifische Färbungen zu nivellieren.

2.2.2.6 Chondrogene Differenzierung *in vitro*

Die chondrogene Differenzierung erfolgte in dreidimensionaler Pelletkultur. Dazu wurden 2×10^5 Zellen in einem 15 ml Polyethylenröhrchen für 7 Min. bei 550 g und 4 °C in 350 µl Differenzierungsmedium zentrifugiert. Die Kultivierung erfolgte mit leicht geöffnetem Deckel, um einen Luftaustausch zu ermöglichen. Durchmesser und Flächen der Pellets wurden nach 7, 14 und 21 Tagen am AVISO *CellCelector*™ ermittelt. Während der 21 Tage andauernden Differenzierung wurde das Medium dreimal wöchentlich gewechselt. Um eine ausreichende Menge RNA isolieren zu können, wurden mehrere Pelletkulturen parallel angesetzt und die Pellets am Ende der Differenzierung vereint.

Ein Pellet wurde in *Tissue freezing Medium* eingebettet und bei -30 °C gelagert. Am Kryostat wurden bei -25 °C 6 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Superfrost Plus Objektträger gebettet und mit *Safranin-O/ Fast Green* gefärbt.

2.2.2.7 Histologische Analysen der chondrogen differenzierten Zellen

Zur histologischen Analyse der Pelletkultur wurden die Schnitte mit *Safranin-O/ Fast Green* gefärbt. Der kationische *Safranin-O* Farbstoff färbt selektiv die Proteoglykane in Knorpelgewebe orange-rot. Proteoglykane sind Moleküle die aus einem Protein und einem oder mehreren kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen bestehen. Die Farbintensität steigt proportional zur Menge der Glykosaminoglykane. Die Schnitte wurden mit 70% eiskaltem Ethanol fixiert und auf einem Heizblock bei 37 °C getrocknet. Es folgte ein Waschschriff mit Aqua dest. für 5 Min. und eine 30-minütige Färbung mit 0,3% *Safranin-O*. Die Präparate wurden erneut mit Aqua dest. gewaschen und für 10 Sekunden mit *Fast Green*-Lösung (0,004%) gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit demineralisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Entwässerung erfolgte über kurzes Eintauchen der Schnitte in 96% Ethanol gefolgt von zweimal 2 Minuten Inkubation in Xylol. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Entellan Schnelleindeckmittel eingedeckt und fotografiert.

2.2.2.8 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Analysen wurden Zellen in *Chamberslides*™ kultiviert, im Anschluss mit PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehydlösung für 15 Min. fixiert. Die Zellen wurden dreimal je 10 Min. mit PBST (PBS + 1% Tween 20) inkubiert. Die Blockierung erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% *Normal Goat Serum* in PBST. Die Primärantikörper wurden in 2% *Normal Goat Serum* in PBST verdünnt (vergleiche 2.1.3.2 Tabelle 3 Antikörper). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C oder alternativ 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen dreimal 10 Min. mit PBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in einer 1:200 Verdünnung eingesetzt. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen abschließend dreimal mit PBS gewaschen, mit *ProLong Gold antifade reagent with DAPI* eingedeckt und fotografiert.

2.2.2.9 Seneszenz Assay

Der prozentuale Anteil an alternden Zellen einer Zellpopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde mit dem *Cellular Senescence Assay Kit (SA-β-gal Staining)* CBA-230 von *Cell Biolabs inc.* ermittelt. Der Assay beruht auf dem histochemischen Nachweis der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase. Das Aktivitätsmaximum der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase liegt bei pH 6,0, wohingegen sich das Optimum der lysosomalen β-Galaktosidase bei pH 4,0-4,5 befindet. Somit kann zwischen den Aktivitäten der verschiedenen β-Galaktosidasen differenziert werden, wenn der Test bei dem pH-Wert für das jeweilige Aktivitätsmaximum durchgeführt wird. Für die quantitative Bestimmung der seneszenten Zellen einer Zelllinie wurden insgesamt 2×10^4 Zellen auf die zwei Kammern eines zweikammerigen Objektträgers (*Chamberslides*™) ausplattiert.

Nach 3 Tagen wurden das Kultivierungsmedium abgenommen und die Zellen, wie im Herstellerprotokoll vorgegeben, mit PBS gewaschen, mit Fixierlösung fixiert und über Nacht mit hergestellter Färbelösung bei 37 °C inkubiert. Die Färbelösung für die Positivkontrolle wurde selbst angesetzt. Sie entspricht der Färbelösung im Kit mit einem pH Wert von pH 4 statt pH 6. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut nach Protokoll mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit Aquatex® eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop der prozentuale Anteil an seneszenten Zellen bestimmt.

Positivkontrolle Färbelösung	
500 mM Potassium Ferrocyanide	10 µl
500 mM Potassium Ferricyanide	10 µl
0,14 M Citrate-Na ₂ HPO ₄ Puffer, pH 4	285 µl
5 M NaCl ₂	30 µl
2 M MgCl ₂	1 µl
40 mg /ml	25 µl
Aqua dest.	639 µl
Gesamtvolumen	1000 µl

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA Isolierung und reverse Transkription

RNA undifferenzierter Zellen wurde mit dem *RNeasy*® Kit von Qiagen isoliert. Bei der Isolierung wurde das Herstellerprotokoll inklusive des optionalen DNA Verdaus befolgt. RNA aus differenzierten Zellen und entsprechenden Kontrollzellen wurde mittels Phenol-Chloroform-Fällung unter Verwendung des TRI Reagent® isoliert. Die Isolierung erfolgte gemäß Herstellerangaben und wurde mit einem nachträglichen DNA Verdaus abgeschlossen. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch am Nanodrop™. Bei Bedarf fand eine Reinigung der RNA mit Hilfe des *RNeasy*® Micro Kits statt. Das Umschreiben der RNA zu cDNA erfolgte mit oligo-dT Primern und dem Super Script® III *First Strand Synthesis System for RT-PCR* Kit von Invitrogen.

2.2.3.2 Polymerase Kettenreaktion

Um die optimalen Bedingungen für die sequenzspezifischen Primerpaare zu definieren, wurde zunächst eine PCR bei drei verschiedenen Temperaturen (55 °C, 60 °C, 65 °C) und mit verschiedenen Mg₂Cl-Konzentrationen durchgeführt. Bei den optimalen Reaktionsbedingungen liefert die PCR ein spezifisches Produkt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare haben ihr Optimum zwischen 55 °C- 65 °C und bei 1,5 mM MgCl₂. (Tabelle 2 Primer 2.1.3.1).

2.2.3.3 *Real-time* PCR

Für den semiquantitativen Nachweis von Genen wurden die relativen Expressionsraten der Gene mittels *real-time* PCR bestimmt. Die Expression des Gens wird hierbei auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens bezogen. Um eine präzise Quantifizierung der Gene mittels *real-time* PCR unter verschiedenen Bedingungen zu gewährleisten, muss ein stabiler Referenzwert zur Normalisierung herangezogen werden. Um die Spezifität des amplifizierten Produkts zu überprüfen, wurde im Anschluss an jede *real-time* PCR eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen. Es wurde der SYBR® *Green Mastermix* von Applied Biosystems verwendet. Alle Reaktionen wurden in Triplikat-Ansätzen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Unter idealen Voraussetzungen zeigt sich eine exponentielle Zunahme des PCR-Produktes mit jedem Zyklus. Der *cycle threshold* (CtWert) ist der Zyklus, der senkrecht zu dem Punkt liegt, an dem der gesetzte *Threshold* die exponentielle Phase der Fluoreszenzkurve trifft. Nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode werden Probe und Kontrolle zueinander in Relation gesetzt:

$$\frac{2^{(CtWert\ Probe\ Referenzgen - CtWert\ Probe\ Testgen)}}{2^{(CtWert\ Kontrolle\ Referenzgen - CtWert\ Kontrolle\ Testgen)}}$$

Danach ist eine Aussage über die Genexpression in der Probe in Relation zur Kontrolle möglich: Das Testgen ist n-fach so stark in der Probe wie in der Kontrolle exprimiert.

2.2.3.4 Ermittlung des stabilsten Referenzgens

Für einen semiquantitativen Nachweis mittels *real-time* PCR wurde ein passendes Referenzgen ermittelt. Mit Hilfe der geNorm VBA-Anwendung für Microsoft Excel wird das stabilste Referenzgen aus einer Reihe von untersuchten Genen ermittelt (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPL13A, *18S ribosomal RNA*). Die Analyse bezieht dabei die Expressionswerten mehrerer Referenzgenen aus einer Auswahl von zu untersuchenden Proben ein¹⁶⁸. Die Software erstellt auf der Grundlage der Expressionsstabilität eine Rangliste dieser Referenzgene.

2.2.3.5 WNT-Array

Der humane Wnt-Signalweg wurde durch PCR-Arrays näher untersucht. Das *Human Wnt Signaling PCR Array* Kit von SABiosciences ermöglicht es, die Expression von 84 Genen, die mit der Signalweiterleitung im Wnt Signalweg in Verbindung stehen, über *real-time* PCR zu quantifizieren. Die cDNA-Synthese wurde mit dem *RT2 First Strand* Kit von SABiosciences, wie im Protokoll angegeben, durchgeführt. Die *real-time* PCR wurde nach Angaben des Herstellers für das *RT2 Profiler™ PCR Array System* angesetzt. Die Auswertung der Arrays erfolgte webbasiert auf der Homepage der Herstellerfirma SABiosciences¹⁶⁹.

2.2.3.6 Proteinbestimmungen

Die Zellen wurden in RIPA Puffer mit Zusatz von Protease-Inhibitor lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels *Mikro BCA Protein Assay* Kit nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Messung der optischen Dichte der Proben wurde bei 562 nm durchgeführt.

2.2.3.7 Western Blot

Für den Nachweis von Proteinen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Durch Zugabe von RIPA Puffer mit Protease-Inhibitor zu den mit PBS gewaschenen Zellen wurden diese lysiert und das Gesamtzelllysat isoliert. Die Kammern der Elektrophorese-Apparatur wurden mit MES-Laufpuffer gefüllt, 500 µl Antioxidant hinzugefügt und ein 4 – 12% Polyacrylamidgel eingebracht. Die Proteinkonzentration des Gesamtzelllysats wurde mittels *Mikro BCA Protein Assay* Kit bestimmt (vergleiche 2.2.3.6) und 15 µg Protein mit Puffer und SDS/ *Reducing agent* versetzt, denaturiert (10 Min. bei 70 C°) und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl des Molekulargewichtsmarkers *SeeBlue® Plus Pre-Stained Protein Standard* aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld. Die der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mit dem *Semi Dry Blot System* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Erfolg der elektrophoretischen Übertragung wurde mit Ponceau-Rot Färbung kontrolliert. Unspezifische Bindungsstellen wurden bei der folgenden, einstündigen Inkubation der Membran mit 5% *Bovine serum albumin (BSA)* in *Phosphate buffered saline-Tween20 (PBS-T)* gebunden. Die Membran wurde mit dem jeweiligen verdünnten Antikörper (Tabelle 3 Antikörper) versetzt und mindestens zwei Stunden bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für 10 Min. mit PBS-T, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, bevor der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper *goat-anti-mouse* in der Verdünnung 1:20000 zugegeben wurde. Die Membran wurde eine Stunde bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 Min. mit PBS-T gewaschen und mit frisch angesetzter Detektionslösung des *Western Blotting Detection*

Reagents versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur fand die Detektion der Chemilumineszenz am LAS 3000 Lite statt.

2.2.4 Affymetrix Arrays

Die drei USSC (USSC 2, USSC 4 und USSC 5) und zwei CB-MSC (CB-MSC 1 und CB-MSC 4) die mittels Affymetrix Arrays analysiert wurden, wurden im ITZ generiert, kultiviert und die RNA wurde isoliert. cDNA Synthese, Hybridisierung und Auswertung wurden vom Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen unter Anleitung von Dr. Ludger Klein-Hitpass nach *Affymetrix Expression manual und GeneChip protocol* (Affymetrix, Santa Clara CA, USA Version2) durchgeführt. Die *Microarrays* wurden am GC Scanner 3000 mit G7 Update gescannt. Die Daten wurden mit Hilfe der Genespring 10.1 Software (Agilent) analysiert und Datensätze erstellt mit Genen, die mindestens zweifach stärker in USSC oder CB-MSC exprimiert wurden. Da bei der Analyse des Microarrays sehr viele Hypothesen parallel getestet werden mussten, wurde ein ungepaarter t-Test mit FDR (*False discovery rate*) nach Benjamini-Hochberg durchgeführt, wobei eine FDR von 10% akzeptiert wurde, um eine Liste der regulierten Kandidatengene zu erstellen.

2.2.5 Telomerlängenbestimmung

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Telomerlängen wurde die genomische DNA aus Zellen isoliert. Die Isolierung erfolgte mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit wie im Protokoll vorgegeben. Es wurden jeweils $0,5-2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte photometrisch am Nanodrop™. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert. Die isolierte genomische DNA wurde im *Telo TAGGG Telomere Length Assay* eingesetzt, um die durchschnittliche Länge der terminalen Restriktionsfragmente zu ermitteln. Dazu wurden mit spezifischen Restriktionsenzymen die Teile der genomischen DNA verdaut, die nicht zu den Telomeren und der subtelomerischen Region zählen. Anschließend wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Hybridisiert wurden die terminalen Restriktionsfragmente (TRF) auf der Membran mit einer DIG spezifischen Sonde. Nach Inkubation mit einem an eine alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper gegen DIG wurde Chemilumineszenzsubstrat hinzugegeben. Die Chemilumineszenz konnte anschließend in der *Intelligent Dark Box* der LAS-3000 mit Hilfe des Programms *ImageReader* LAS-3000 Version 2.1. detektiert und digitalisiert werden. Es folgte eine computerbasierte Auswertung der TRF Längen mit *ImageQuant* TL und *TELORUN* für Microsoft® Excel. Dazu wurde die Version 1.4 für die Analyse der durchschnittlichen TRF Länge von Calvin Harley, Rich Allsopp und Homayoun Vaziri (copyright, 1995: Geron Corporation) genutzt. Änderungen zum Herstellerprotokoll wurden in Schritt 3 bei der Inkubation zur Prehybridisierung

vorgenommen, die für 3-4 Stunden statt 30-60 Min. erfolgte. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht.

2.2.6 Stabile Überexpression

Humane Stromazellen wurden mit drei definierten DNA Sequenzen (humaner WNT3A-DNA, WIF1-DNA und BMP4-DNA) lentiviral transduziert. Dazu wurden die durch Sequenzierungen verifizierte DNA Sequenzen in Plasmide kloniert und diese mittels Lipofektion in HEK293T Zellen eingebracht. Der viruspartikelhaltige Überstand der HEK293T Zellen wurden zur Infektion humaner Stromazellen aus NSB und KM verwendet. Eine stabile Transduktion führt zu einer dauerhaften Integration der Fremd-DNA ins Genom der Zielzellen. Es wurde der Expressionsvektor pCL6IEGwo (pCL6) verwendet (Abb.5).

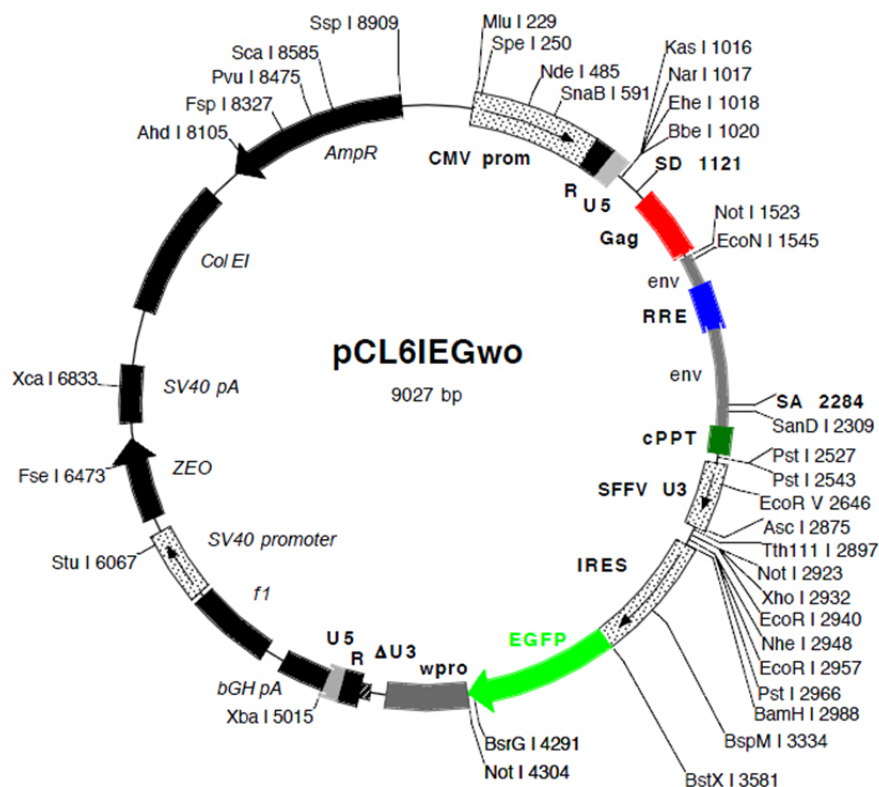


Abb.5: Karte des lentiviralen Plasmids pCL6IEGwo. Das Plasmid wurde von Prof. Dr. Helmut Hanenberg zur Verfügung gestellt. Es wurde für die WNT3A Klonierung mit *EcoRI* und *XhoI*, für die WIF1 Klonierung mit *XhoI* und *NheI* und für die BMP4 Klonierungen mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI*, geschnitten.

2.2.6.1 Klonierung

Die Amplifikation der definierten DNA Sequenzen erfolgte mittels PCR unter Verwendung von Phusion® *High-Fidelity* Polymerase und sequenzspezifischer Klonierungs-Primern, die eine Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende aufwiesen. Der *forward* Primer enthielt zudem eine Kozak-Sequenz (GCCACC) vor dem Startcodon¹⁷⁰. Für die Klonierung von *WNT3A* wurde cDNA der Zelllinie HEK293 verwendet, für die Klonierung von *WIF1* cDNA einer CB-MSK und als Template für die Klonierung von *Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)* diente cDNA einer KM-MSK. Die Reaktionsprodukte wurden gelelektrophoretisch in einem 1% Agarosegel separiert und mittels *Qiaquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel isoliert. Expressionsvektor (pCL6IEGwo) und Produkt wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen für 20 Min. bei 37 °C verdaut. Es wurde für die *WNT3A* Klonierung mit *EcoRI* und *XhoI*, für die *WIF1* Klonierung mit *XhoI* und *NheI* und für die *BMP4* Klonierungen mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI*, geschnitten. Die Reaktionen wurden für 5 Min. auf 85 °C erhitzt. Der geschnittene Expressionsvektor wurde mit Alkalischer Phosphatase (*Calf Intestine Phosphatase /CIP*) behandelt. Geschnittenes Produkt und geschnittener, dephosphorylierter Vektor wurden mit Hilfe der T4-Ligase miteinander ligiert. 2 µl des Ligationsansatzes wurden bei der Transformation von elektrokompenten *E.coliTOP10* eingesetzt.

Die Elektroporation wurde in Elektroporationsküvetten (2 mm Spaltbreite) vorgenommen und erfolgte bei 2500 V, 25 µF und 200 Ω am Genepulser-2. Die *E.coliTOP10* wurden in 250 µl S.O.C. Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 50- 150 µl der Bakteriensuspension wurden auf selektiven Agarplatten (Endkonzentration 100µg/ ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschank inkubiert. Nach mindestens 16 Stunden wurden je Agarplatte 8-10 Bakterienkolonien gepickt und in jeweils 3 ml selektivem LB-Medium (Endkonzentration 100 µg/ ml Ampicillin) für 8 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Plasmid-DNA wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des *Plasmid Purification Kit* aus den Bakterien isoliert. Zur Kontrolle der Plasmide wurden diese mit Restriktionsenzymen geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Produktgrößen analysiert. Die eingebrachten definierten DNA Sequenzen wurden zudem durch Sequenzierungen überprüft. Die Sequenzierungen erfolgten unter Einhaltung des Protokoll des *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits* für doppelsträngige DNA im HLA-Labor des ITZ. Die Auswertung erfolgte mit der *Sequence Scanner Software* v1.0.

2.2.6.2 Transfektion und Transduktion

Die adhärent wachsenden HEK293T Zellen wurden in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ cm^2 in DMEM *high glucose* + PSG mit 10% FCS ausplattiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden durch DMEM *high glucose* mit 5% FCS ersetzt. 5 μg je Helferplasmid (pCD/ NL-BH, pALF-GALV TM) und 5 μg des jeweiligen Plasmids (pCL6IEGwo-*BMP4*, pCL6IEGwo-*WIF1* oder pCL6IEGwo-*WNT3A*) wurden mit 45 μl FuGENE® 6 für 20 Min. bei Raumtemperatur in 400 μl DMEM *high glucose* inkubiert und anschließend zur Lipofektion der HEK293T Zellen der Zellkultur zugesetzt. Das Medium wurde nach 24 Stunden durch DMEM *high glucose* mit 5% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin ausgetauscht. Von den zu transfizierenden Zielzellen wurden 24 Stunden vor Infektion 1×10^5 Zellen auf einer 6-Well-Platte verteilt. 48 Stunden nach Transfektion der HEK293T Zellen wurde das Medium mit enthaltenem extrazellulären Virusüberstand steril filtriert (0,45 μm Spritzenfilter) und zur Infektion auf die Zielzellen gegeben.

Die Transduktion wurde mit unverdünntem bis sechsfach verdünntem Virusüberstand durchgeführt. Die Transduktionseffizienz wurde durch Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analysen überprüft. Dies war möglich, da der eingebrachte Expressionsvektor die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (Gfp) in den transduzierten Zielzellen zur Folge hatte. Um eine höchstmögliche Reinheit transduzierter Zellen zu erreichen, wurden Gfp-positive – und damit erfolgreich transduzierte – Zellen in der *Core Flow Cytometry Facility* des ITZ gesortet. Parallel zu den Versuchen wurden HEK293T Zellen mit dem Expressionsvektor pCL6IEGwo transfiziert und ihr Virusüberstand zur Infektion von Zielzellen genutzt. Um auszuschließen, dass beobachtete Veränderungen auf den Vektor und nicht die klonierte Gensequenz zurückzuführen sind, dienten die mit Leervektor transduzierten Zellen als Kontrolle. Bei jedem Versuch wurden die Zielzellen vor der Transduktion aufgeteilt und ein Teil Zellen gleicher Passage, die mit gleichen Reagenzien behandelt wurden, wurden nicht infiziert und parallel als Mock-Kontrollzellen weitergeführt.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des Immunphänotyps wurden 1×10^5 Zellen in 100 μl PBS mit 4 μl Antikörperlösung versetzt und 25 Min. bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln um den Fluoreszenzaktivitätsverlust so gering wie möglich zu halten. Die Zellen wurden mit 3 ml PBS + 0,5% HSA gewaschen und für 7 Min. bei 550 g und 4 °C zentrifugiert. Nachdem die Zellen mit PBS + 0,5% HSA gewaschen und in 100 μl PBS resuspendiert wurden, wurde die Zellsuspension am FACS Canto™ durchflusszytometrisch analysiert. Zur Analyse intrazellulär vorliegender Marker erfolgte vorab eine Permeabilisierung der Zellen mit Hilfe des *Cytoperm* Kits nach Angaben des Herstellers. Für alle Färbungen erfolgten entsprechende Isotypkontrollen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierungen der verwendeten Zellpopulationen

3.1.1 Morphologie und Immunphänotyp

Die Kultivierung unter Standard-Zellkulturbedingungen entspricht in dieser Arbeit 37 °C mit 21% O₂ und 5% CO₂, wohingegen 37 °C, 5% O₂ und 5% CO₂ physiologische Konditionen widerspiegeln sollten. Unter 5% O₂ aus Nabelschnurblut (NSB) generierte Zelllinien werden als CB-H, solche aus Knochenmark als KM-H Linien bezeichnet. Klonale Linien sind Zelllinien, die aus einer Kolonie hervorgegangen sind oder durch Einzelzellentnahme generiert wurden (vergleiche 2.2.1.4).

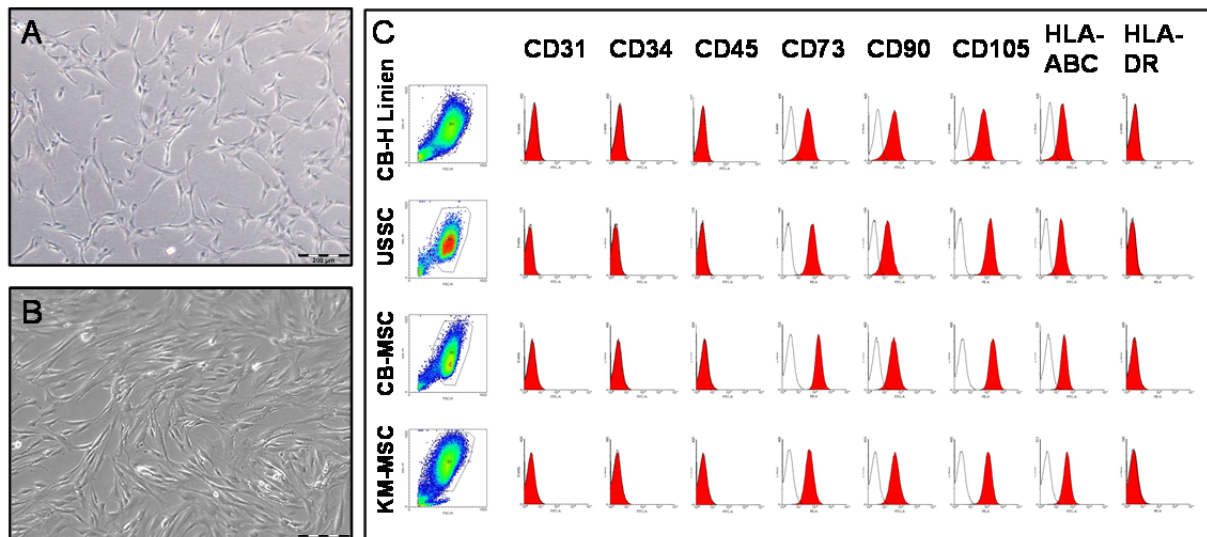


Abb.6: Morphologie und Immunphänotyp von plastikadhärenten Zellpopulationen generiert aus Nabelschnurblut und Knochenmark *in vitro*. Repräsentative lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen der spindelförmigen Zellmorphologie von Zelllinien aus dem Nabelschnurblut (A) und dem Knochenmark (B). Durchflusszytometrische Ergebnisse zur Bestimmung des Immunphänotyps aus Nabelschnurblut generierter Populationen und KM-MSC (C). Die Morphologie und der Immunphänotyp klonaler Zelllinien unterschieden sich nicht von denen der Ursprungspopulation.

Alle verwendeten, aus NSB generierten Populationen (USSC, CB-MSC, klonale Linien der USSC und CB-MSC, CB-H Linien) wuchsen in der Zellkultur plastikadhärent mit spindelförmiger Morphologie (Abb.6 A). Abbildung 6 B zeigt die Morphologie von KM-MSC in Zellkultur. Immunphänotypische Oberflächenmoleküle werden im Folgenden, wie international einheitlich üblich, nach der CD Nomenklatur (*Cluster of Differentiation*) benannt. Die Phänotypisierung der Zellen wurde mit ausgewählten Antikörpern gegen Oberflächenantigene durchgeführt (siehe Tabelle 2 unter 2.1.3.2).

Alle verwendeten Zellpopulationen wurden immunphänotypisch charakterisiert und die durchflusszytometrischen Messungen ergaben keine Expression der hämatopoetischen Antigene CD34, CD45 oder des für Endothelzellen charakteristischen Antigens CD31. Die Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105 und HLA-ABC wurden von allen in dieser Arbeit verwendeten Zellpopulationen exprimiert (Abb.6 C).

Es wurden keine morphologischen oder immunphänotypischen Unterschiede festgestellt, weder zwischen klonalen Zellen und ihren korrespondierenden Ursprungszelllinien noch zwischen Zellpopulationen aus NSB und KM. Auch die Generierung unter physiologischen Bedingungen hatte keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenantigene oder die Morphologie der Zellen.

3.1.2 Wachstumskinetik

Um die Wachstumskinetik der Zellpopulationen zu untersuchen, wurden Ausgangszellzahl und Endzellzahl jeder Passage ermittelt. Die Kultur der Zellen wurde eingestellt, wenn die Populationsverdopplungen (PD) über mehrere Passagen stagnierten oder abnahmen.

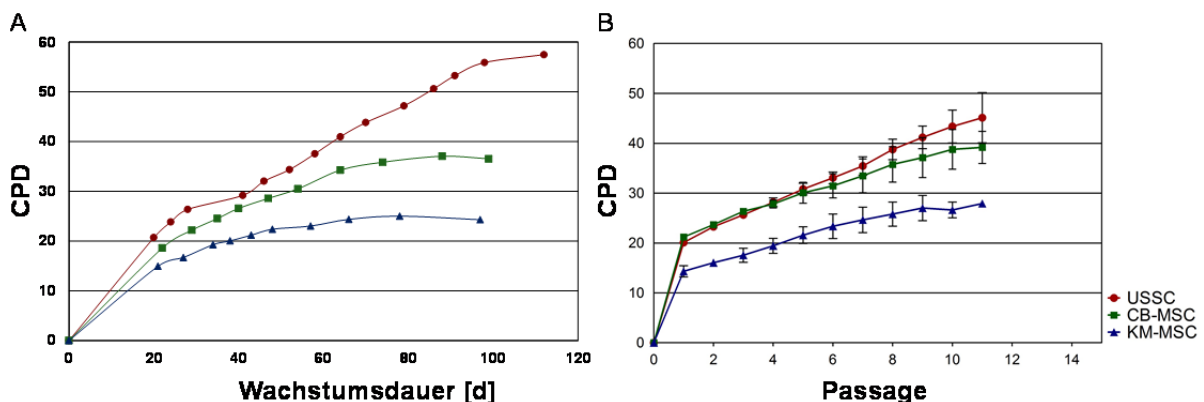


Abb.7: Wachstumskinetik von USSC, CB-MSC und KM-MSC. Grafik A zeigt den typischen Wachstumsverlauf einer USSC, einer CB-MSC und einer KM-MSC. B zeigt die durchlaufenen kumulativen Populationsverdopplungen (*cumulative population doublings*, CPD) über elf Wachstumspassagen von jeweils drei USSC, CB-MSC und KM-MSC mit Standardabweichungen je Passage.

Abbildung 7 A zeigt repräsentativ den Wachstumsverlauf jeweils der USSC 1, CB-MSC 1 und KM-MSC 1 Zelllinie *in vitro*. Abbildung 7 B stellt die Wachstumskinetik von USSC, CB-MSC und KM-MSC (n=3) dar. Der Verlauf der Wachstumskurven ist ähnlich, aber für USSC und CB-MSC im Vergleich zu KM-MSC von Passage 1 an auf der Y-Achse nach oben versetzt.

Die von KM-MSC über die Passagen erreichten kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) lagen unter denen, die die Stromazellen aus Nabelschnurblut bis zur entsprechenden Passagen durchliefen.

Das Wachstumsverhalten von klonalen Linien im Vergleich zu ihren Ursprungszelllinien wurde ebenfalls untersucht. Das Wachstumspotential etablierter klonaler Zellpopulationen variierte im Vergleich zur Ursprungszelllinie und innerhalb der Klone (vergleiche Abb. I Anhang).

Des Weiteren wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration bei Generierung und Kultivierung auf die Wachstumskinetik und die maximal erreichten kumulative Populationsverdopplungen der Zellpopulationen untersucht.

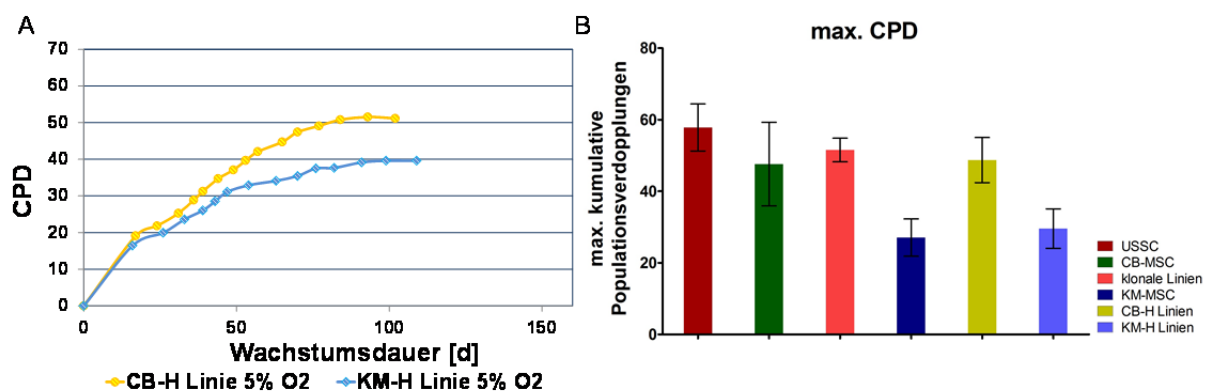


Abb.8: Wachstumskapazitäten der Stromazellen *in vitro*. Grafik A stellt beispielhaft die Wachstumskinetik einer CB-H und einer KM-H Linie dar. In Diagramm B angegeben sind die maximalen CPD die die Populationen durchschnittlich erreichten mit jeweiliger Standardabweichung.

Für die Generierung unter physiologischen Bedingungen wurden MNC aus Nabelschnurblut und Knochenmark aufgeteilt und unter 21% sowie 5% Sauerstoff kultiviert. Aus allen Knochenmarkspenden konnten Kolonien unter 5% und 21% O₂ generiert werden. Dies entspricht einer Generierungsfrequenz von 100%. Von einem NSB konnten sowohl unter 5% als auch unter 21% O₂ Kolonien etabliert werden. Unter 5% O₂ konnten vier CB-H Linien und drei KM-H Linien generiert werden. Die Grafik in Abbildung 8 A zeigt repräsentativ die Wachstumskinetik einer aus NSB (CB-H 4) und KM (KM-H 1) unter 5% O₂ generierten und kultivierten Linie. KM-H Linien zeigten eine langsamere Zunahme der CPD als CB-H Linien.

USSC durchliefen durchschnittlich maximal 57,83 CPD (+/- 6,58; n=6), CB-MSC maximal 47,6 CDP (+/- 11,67; n=5) und klonale Populationen maximal 51,54 CPD (+/- 3,29; n=11). CB-H Linien wurden durchschnittlich 119 Tage kultiviert und erreichten maximale CPD Werte von 48,71 (+/- 12,6; n=4). KM-MSC wurden zwischen 71 und 125 Tagen kultiviert und durchliefen in dieser Zeit maximal 27,05 CPD (+/- 5,21; n=15), KM-H Linien erreichten in 70 bis 109 Tagen Zellkultur (Ø 91 Tage) maximal 29,55 CPD (+/- 9,54 n=3) (Abb.8 B).

Aus Nabelschnurblut generierte Populationen erreichten ähnliche maximale CPD Werte und zeigten eine analoge Wachstumskinetik. KM-MSC und KM-H Linien wiesen eine längere Populationsverdopplungszeit auf, durchliefen durchschnittlich weniger Passagen und erreichten dadurch insgesamt geringere maximale CPD Werte im Vergleich zu Populationen aus Nabelschnurblut.

Der Wachstumsverlauf von drei USSC, drei CB-MSC, vier CB-H Linien, drei KM-MSC und drei KM-H Linien unter verschiedenen Kulturbedingungen wurde untersucht. Wie die umgebende Sauerstoffkonzentration die Wachstumskinetik von USSC 2, CB-MSC 1, CB-H 1-4, KM-MSC 4 und KM-H 1 beeinflusst, ist in Abbildung II Anhang dargestellt.

Insgesamt zeigte sich kein Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Wachstumskinetik von USSC und CB-MSC. CB-H Linien proliferierten unter beiden Bedingungen stark, die durchlaufenen maximalen CPD bei der Kultivierung unter 5% Sauerstoff betrugen durchschnittlich 3 (+/- 0,4) CPD mehr als unter 21% O₂ (vergleiche Abb.II B Anhang). Wurde eine KM-MSC spätestens ab Passage 4 unter 5% O₂ kultiviert, so verlängerte sich ihre Wachstumsdauer um mindestens 1 Passage (Ø 2,5 CPD) im Vergleich zur Kultivierung unter 21% O₂. KM-MSC und KM-H Linien, die parallel unter 5% und 21% O₂ generiert und kultiviert werden konnten, zeigten einen ähnlichen Wachstumsverlauf (vergleiche Abb.II C Anhang).

3.1.3 Seneszenz und Telomerlängen

Um die progrediente replikative Seneszenz der Zellen zu ermitteln, wurden diese fixiert und mit X-Gal inkubiert. Bei seneszenten Zellen setzte das Seneszenz-assoziierte Enzym *senescence associated beta-gal* (SA-β-Galaktosidase) sein künstliches Substrat X-Gal zu einem Indigo-Komplex um, der diese Zellen blau erscheinen ließ. Der pH-Wert der Färbelösung der Positivkontrolle (pH 4) bewirkte den Umsatz von X-Gal durch die lysosomale β-Galaktosidase in allen Zellen. Unter dem Lichtmikroskop wurde der Anteil seneszenten Zellen ausgezählt und dokumentiert.

Zur Untersuchung der Telomerlängen wurde die isolierte, verdaute und elektrophoretisch aufgetrennte DNA auf eine Membran übertragen und mit Hilfe von Chemilumineszenz detektiert. Die interne Kontroll-DNA des Assays (L und H) und die Verwendung einer DNA-Leiter für kleine Molekulargewichte (M) ermöglichten die einheitliche densitometrische Auswertung am Computer.

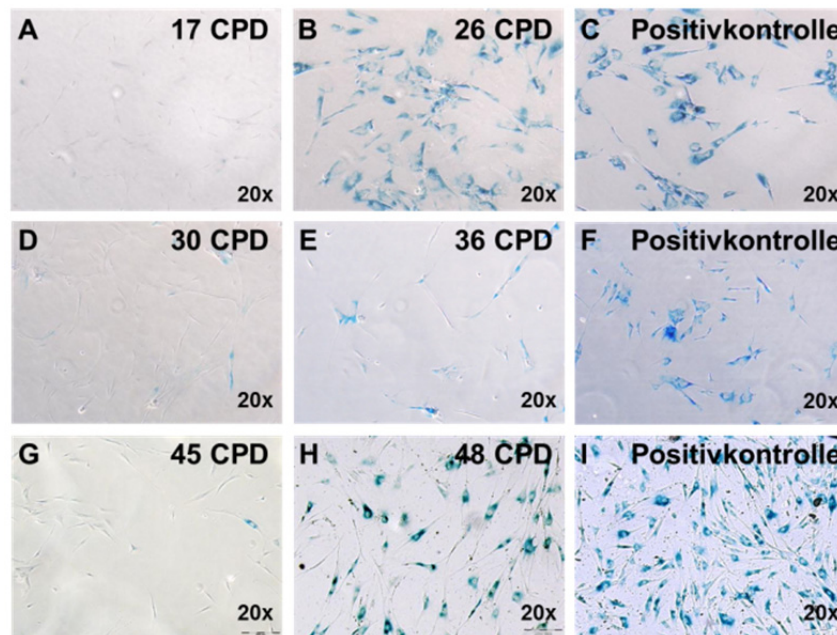


Abb.9: Replikative Seneszenz der Stromazellen *in vitro*. Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit X-Gal-inkubierten Zellen. MSC aus Knochenmark (A, B), Nabelschnurblut (D, E) und klonale Zellen aus Nabelschnurblut (G, H) wurden fixiert und die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase durch X-Gal visualisiert. Abbildungen 9 (C, F, I) zeigen die jeweiligen Positivkontrollen.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 9 einer aus Knochenmark, einer aus Nabelschnurblut generierten Zelllinie und einer klonalen USSC nach X-Gal Inkubation sind charakteristisch. Der Anteil an seneszenten Zellen nahm bei allen getesteten Zelllinien (USSC n=5, CB-MSC n=6 und KM-MSC n=6) mit der Anzahl der Passagen zu.

In Passage 2 (17 CPD) betrug der Anteil an seneszenten Zellen der gezeigten KM-MSC 10%. Der Prozentsatz seneszenten Zellen stieg in Passage 7 (26 CPD) auf 80% an. Abbildung 9 C zeigt die Positivkontrolle der KM-MSC. Von 100 Zellen der USSC wiesen nach 30 CPD (Abb.9 D) 23 Zellen Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase auf. Nach 36 CPD (Abb.9 E) stieg der Anteil seneszenten Zellen auf 33%. Abbildung 9 F zeigt die Positivkontrolle der USSC. Die Zellen der getesteten klonalen Linie zeigten nach 45 CPD und neun Passagen nur geringe Anzeichen von replikativer Seneszenz, wohingegen nach weiteren 3 CPD in Passage 11 in fast 100% der Zellen das Seneszenz-assoziierte Enzym SA- β -Galaktosidase aktiv war. Andere Arbeiten unserer Gruppe konnten zeigen, dass klonale Zellpopulationen im Vergleich zur Ursprungszelllinie in der gleichen Passage durchschnittlich mehr CPD durchlaufen hatten. Korrelierend dazu war der prozentuale Anteil seneszenten Zellen in klonalen Zellpopulationen höher, als in der Ursprungszelllinie in der gleichen Passage^{54,171}.

Alle Zellpopulationen zeigten eine progrediente replikative Seneszenz. Obgleich KM-MSC geringere CPD durchlaufen hatten, wiesen sie durchschnittlich eine prozentual höhere Anzahl seneszenten Zellen auf als USSC und CB-MSC, sowie deren klonale Populationen.

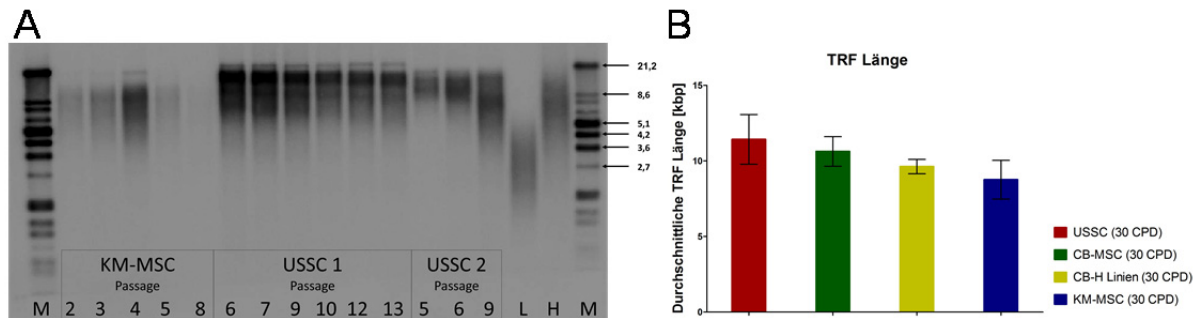


Abb.10: Auswertung des Telomerlängen-Assays. In Abbildung A ist die Southern Blot Membran der densitometrischen Auswertung einer KM-MSC und zwei USSC dargestellt. (L: *Low molecular weight DNA Control*, H: *High molecular weight DNA Control*, M: *Low molecular weight ladder*). Abbildung B zeigt die durchschnittlichen terminale Restriktionsfragmentlängen von USSC (n=3), CB-MSC (n=3), CB-H Linien (n=4) und KM-MSC (n=5) nach 30 durchlaufenen CPD mit jeweiliger Standardabweichung.

Von drei USSC, drei CB-MSC, vier CB-H Linien und fünf KM-MSC wurden in verschiedenen Passagen die durchschnittlichen terminalen Restriktionsfragment (TRF) Längen [kbp] bestimmt (vergleiche Abb.III Anhang). Abbildung 10 A zeigt eine Southern Blot Membran, die zur densitometrischen Auswertung verwendet wurde. USSC und CB-MSC zeigten nach 30 durchlaufenen CPD durchschnittliche TRF Längen von 11,43 beziehungsweise 10,63 kbp. CB-H Linien zeigten TRF Längen von 9,62 kbp. KM-MSC hatten nach 20 CPD eine durchschnittliche TRF Länge von 9,90 kbp, die nach weiteren 10 CPD um 1,14 kbp auf 8,76 kbp abnahm (Abb.10 B). USSC zeigten auch nach doppelt so vielen CPD (40 CPD) noch längere TRF Längen (10,98 kbp) als die KM-MSC nach 20 durchlaufenen CPD. Zusätzlich wurden von vier klonalen Zelllinien einer USSC in jeweils einem Wachstumsstadium die durchschnittliche TRF Länge ermittelt (vergleiche Abb.III Anhang). Die durchschnittlichen TRF Längen variierten innerhalb der klonalen Linien und im Vergleich zur Ursprungszelllinie gering. Sie nahmen mit zunehmenden durchlaufenen CPD ab.

Von zwei USSC, zwei CB-MSC, vier CB-H Linien und einer KM-MSC Zelllinie, die spätestens ab Passage vier unter 5% O₂ und 21% O₂ kultiviert wurden, wurde die durchschnittlichen TRF Längen an mindestens drei Zeitpunkten zwischen Passage vier bis 15 ermittelt. Die durchschnittliche Abnahme der TRF Länge variierte zwischen 0,010 und 0,381 kbp/ PD. USSC zeigten unter 21% O₂ eine Abnahme von 0,159 kbp (+/- 0,076 kbp) und unter 5% O₂ von 0,150 kbp (+/- 0,016 kbp) pro PD, während sich die Abnahme pro PD bei CB-MSC unter 21% O₂ auf 0,145 kbp (+/- 0,02 kbp) respektive unter 5% O₂ auf 0,146 kbp (+/- 0,033 kbp) belief. Auch CB-H Linien zeigten unter 5% O₂ eine ähnliche Abnahme der TRF Länge pro PD (0,111 +/- 0,072 kbp) wie unter 21% O₂ (0,129 +/- 0,056 kbp). In der KM-MSC reduzierten sich die TRF Längen pro PD um durchschnittlich 0,136 kbp in 21% O₂ und 0,102 kbp in 5% O₂.

Über die Passagen zeigte sich in allen Populationen unter 5% und 21% O₂ eine terminale Abnahme der TRF Längen. Die durchschnittliche Abnahme der TRF Länge variierte zwischen den Populationen, aber nur geringfügig innerhalb einer Population unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.

3.1.4 Genexpression

Die Einteilung der Zellpopulationen aus Nabelschnurblut fand aufgrund der Expression von *DLK1* statt, da sich die Populationen morphologisch und immunphänotypisch nicht voneinander unterscheiden⁵⁴. USSC zeigten eine *DLK1*-Expression, wohingegen in CB-MSC kaum eine *DLK1*-Expression detektiert werden konnte (vergleich Abb.IV A Anhang). Klonale Linien der *DLK1*-positiven USSC zeigten eine uneinheitliche *DLK1* Expressionsstärke. Die getesteten KM-MSC zeigten unterschiedlich starke Expressionen für *DLK1*. In den Populationen, die unter physiologischen Bedingungen bei 5% Sauerstoff generiert werden konnten, variierte die Genexpression von negativ (CB-H 3) bis leicht positiv (CB-H 1, CB-H 2 und CB-H 4).

USSC, CB-MSC, und CB-H Linien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Expression von Stammzellmarkern, *TERC* und *TERT* untersucht. Alle untersuchten Zelllinien waren positiv für die konstitutiv exprimierte Untereinheit der Telomerase und *MYC*. In keiner der untersuchten Zellen konnte eine Expression von *NANOG*, *POU5F1*, *SOX2* oder *TERT* gemessen werden (vergleich Abb.IV B Anhang). Dies stimmte mit vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein. Weder in USSC und CB-MSC Linien noch in primären Kolonien, klonalen Populationen oder unter 5% O₂ kultivierten Zellen konnten die embryonalen Stammzellmarker *NANOG*, *POU5F1*, *SOX2* oder *TERT* detektiert werden¹⁷²⁻¹⁷⁴. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden außer der RT-PCR Analyse für die *TERT* Expression auch *real-time* PCR durchgeführt, die die vorherigen Ergebnisse bestätigten (vergleich Abb.IV D Anhang).

3.1.5 Differenzierungspotential

Um das adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungspotential der Zellen zu testen, wurden spezifische Differenzierungsprotokolle angewandt und durch gewebetypische Färbungen ausgewertet (siehe Kapitel 2.2.2).

Die adipogene Differenzierung wurde nach 21 Tagen durch Öl-Rot Färbung überprüft. Der Farbstoff färbt Fette in Lipidvakuolen rot an.

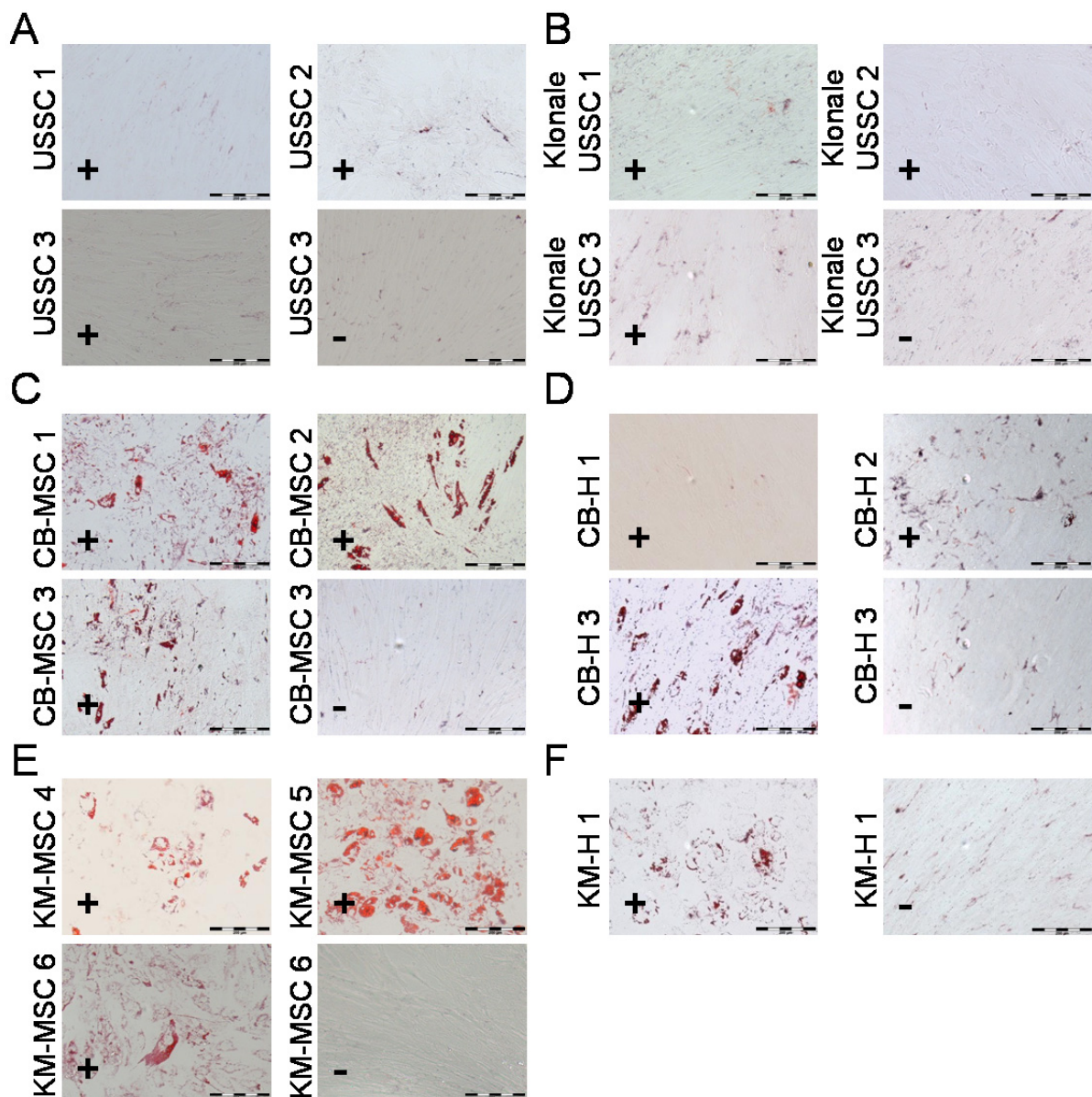


Abb.11: Adipogene Differenzierung. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Öl-Rot gefärbten Zellen nach 21-tägiger adipogener Differenzierung (+) und nicht induziert (-). Der Maßstab beträgt 200 µm.

Abbildungen 11 A-D zeigen je drei Linien der NSB-Zellpopulationen USSC (A), CB-MSC (B), klonale USSC (C) und CB-H Linien (D) nach adipogener Induktion (+) und je Zellpopulation beispielhaft eine Linie nicht induziert (-) nach Öl-Rot Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien KM-MSC 4, KM-MSC 5, KM-MSC 6 und KM-H 1 nach adipogener Differenzierung und Öl-Rot Färbung sind in Abbildung 11 E und F zu sehen.

USSC zeigten keine Bildung von Fettvakuolen. CB-MSC variierten zwar in der Ausprägungsstärke ihrer Differenzierbarkeit, bildeten jedoch alle Lipidvakuolen, wie die Öl-Rot Färbung zeigte. Klonale USSC wiesen kein adipogenes Potential auf. Untersuchungen des adipogenen Differenzierungspotentials klonaler CB-MSC zeigten, dass ihr Differenzierungspotential im Vergleich zur Ursprungszelllinien heterogen ist ^{54,171}. Ein ubiquitäres, adipogenes Potential der getesteten KM-MSC *in vitro* ließ sich durch positive Öl-Rot Färbungen nach Differenzierung nachweisen. Nur eine der vier getesteten CB-H Linien (CB-H 3) besaß ein durch Öl-Rot Färbung nachweisbares, adipogenes Differenzierungspotential. KM-H Linien zeigten eine starke Differenzierung.

Im Verlauf der positiven osteogenen Differenzierung bilden die Zellen eine kalzium- und phosphathaltige extrazelluläre Matrix. Der Nachweis erfolgte mit Alizarin-Rot, welches Kalziumeinlagerungen rot anfärbt, und Silbernitrat in der von Kossa-Färbung, das dem Nachweis von extrazellulärem Phosphat dient. Ein Teil der Zellen wurde parallel in Negativmedium kultiviert und ebenfalls gefärbt.

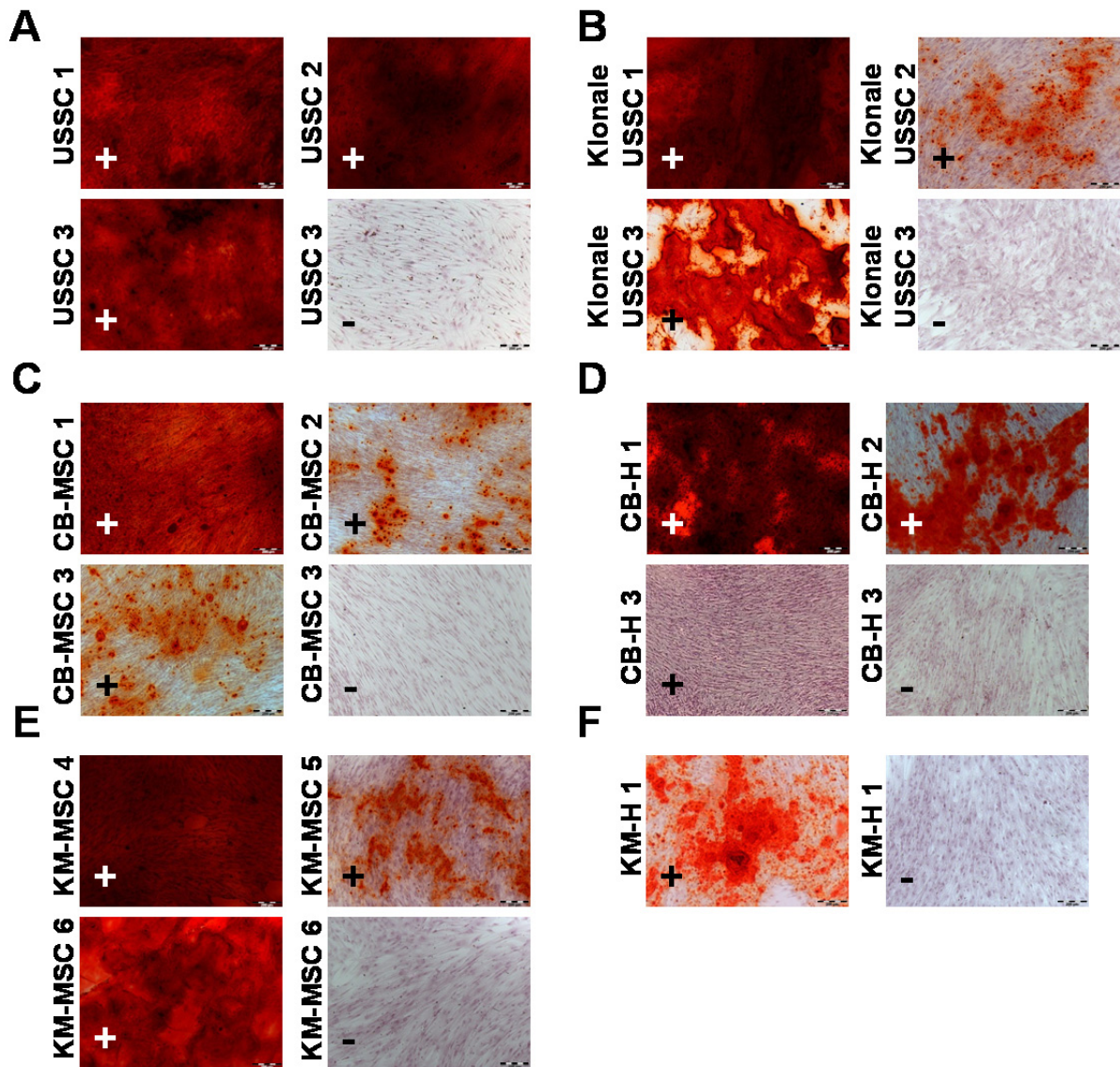


Abb.12: Osteogene Differenzierung. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Alizarin gefärbten Zellen nach 14-tägiger osteogener Differenzierung (+) und nicht induziert (-). Der Maßstab beträgt 200 µm.

Abbildung 12 A-D zeigen die NSB-Zellpopulationen USSC 1-3 (A), klonale USSC 1-3 (B) CB-MSC 1-3 (C) und CB-H Linien 1-3 (D) osteogen differenziert (+) und je Zellpopulation beispielhaft eine Linie nicht induziert (-) nach Alizarin-Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von KM-MSC 4-6 und KM-H 1 nach osteogener Differenzierung und Alizarin-Färbung sind in Abbildung 12 E und F zu sehen.

Alle untersuchten USSC wiesen eine starke Alizarin-Färbung auf und zeigten durchgehend eine starke von Kossa-Färbung (vergleiche Abb.V Anhang). CB-MSC variierten in ihrer Differenzierbarkeit, was sich sowohl durch Alizarin-Färbung als auch durch von Kossa-Färbung zeigte.

Das osteogene Differenzierungspotential klonaler Populationen variierte ebenfalls. Mehrere klonale Linien einer USSC wiesen ein starkes osteogenes Potential auf, während andere Klone der gleichen Ursprungszelllinie geringeres Potential aufwiesen. Das osteogene Potential der KM-MSC *in vitro* ließ sich in allen getesteten Linien durch positive Färbungen nachweisen. Insgesamt konnten alle unter Standard-Zellkulturbedingungen (21% O₂) generierten Populationen *in vitro* osteogen differenziert werden.

Eine der vier getesteten CB-H Linien (CB-H 3) durchlief wiederholt keine durch Färbung nachweisbare osteogene Differenzierung. Die KM-H 1 Linie zeigte osteogenes Differenzierungspotential.

Aufgrund der Differenzierungsunterschiede innerhalb der unter 5% O₂ generierten Zellpopulationen wurde diese näher untersucht. Die Differenzierungen wurde unter 5% O₂ wiederholt (5% O₂ -> 5% O₂). Des Weiteren erfolgten auch Differenzierungen nach vier Tagen Präkonditionierung (5% O₂ -> 21% O₂ bzw. 21% O₂ -> 5% O₂) und durchgehend unter Standard-Zellkulturbedingungen (21% O₂ -> 21% O₂).

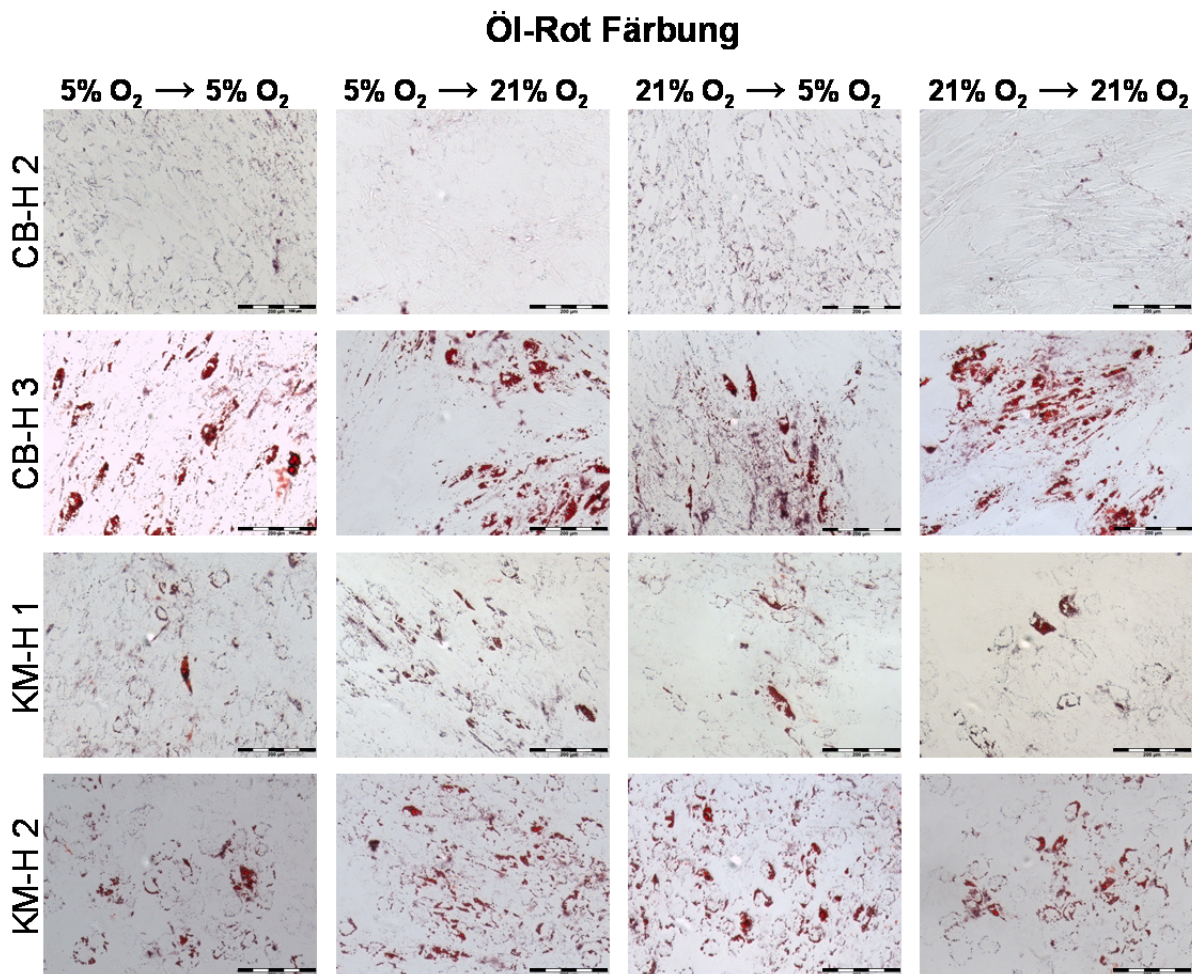


Abb.13: Adipogene Differenzierung der physiologisch generierten Zellpopulationen. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Öl-Rot gefärbten Zellen nach 21-tägiger adipogener Differenzierung unter verschiedenen Bedingungen. Der Maßstab beträgt 200 µm.

Eine der vier, unter physiologischen Bedingungen generierten Linien aus Nabelschnurblut (CB-H 3), war in der Lage unter allen Bedingungen Fettvakuolen auszubilden. Die anderen drei Linien (CB-H 1,2 und 4) wiesen kein adipogenes Differenzierungspotential auf. Abbildung 13 zeigt beispielhaft CB-H 2. Die KM-H Linien zeigten alle ein unterschiedlich starkes, aber unter den verschiedenen Bedingungen gleichbleibendes adipogenes Differenzierungspotenzial (Abb.13).

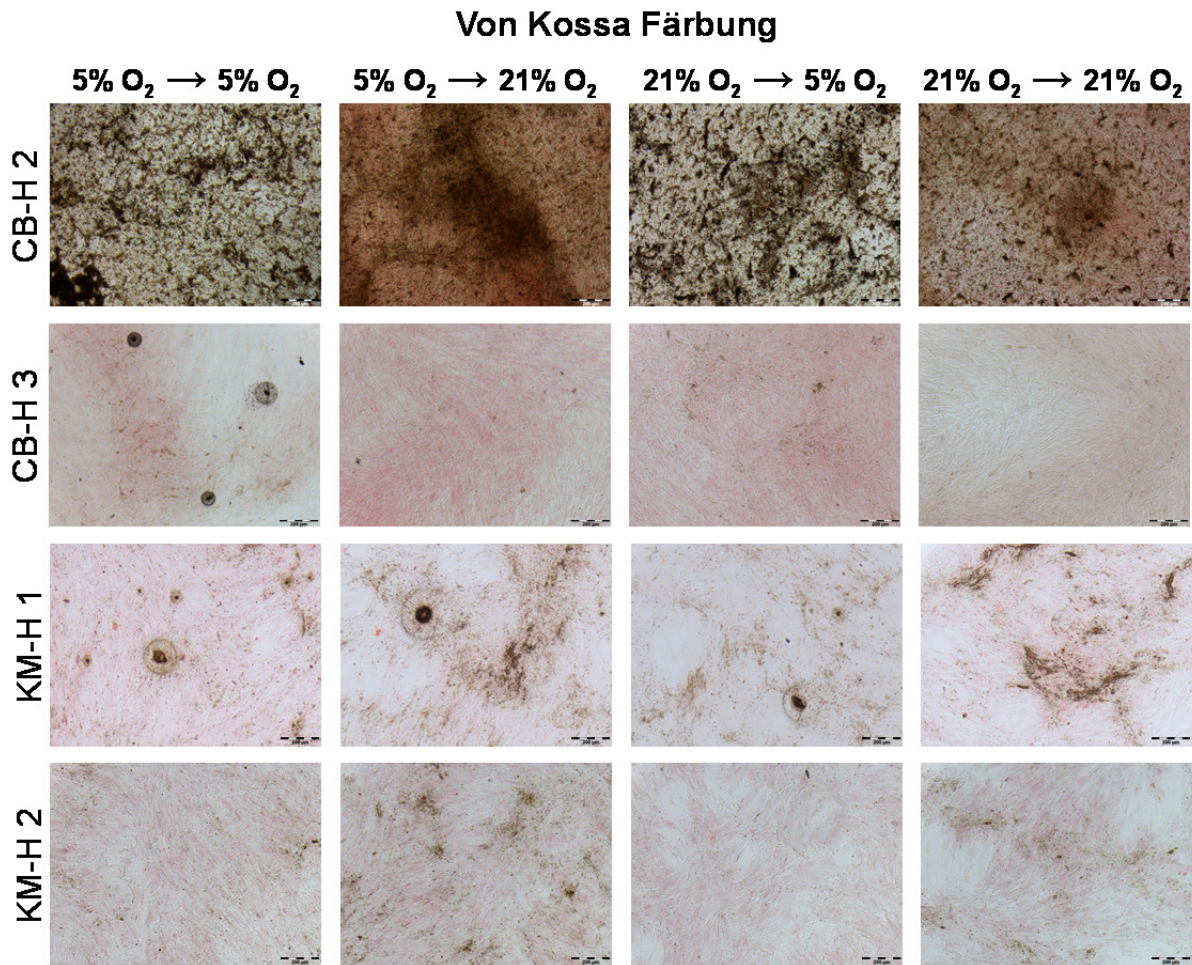


Abb.14: Osteogene Differenzierung der physiologisch generierten Zellpopulationen. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Silbernitrat gefärbten Zellen nach 14-tägiger osteogener Differenzierung unter verschiedenen Bedingungen. Der Maßstab beträgt 200 µm.

CB-H 1,2 und 4 waren in der Lage unter allen Bedingungen osteogen zu differenzieren. Abbildung 14 zeigt beispielhaft CB-H 2. CB-H 3 zeigte kaum osteogenes Differenzierungspotential. KM-H Linien zeigten ein sehr schwaches, aber unter den verschiedenen Bedingungen konstantes Potential zur osteogenen Differenzierung (Abb.14).

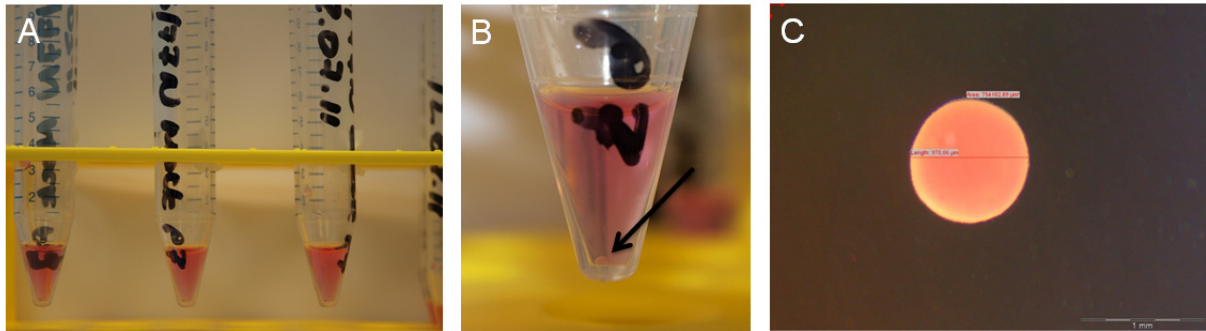


Abb.15: Pelletkultur der Zellen in 15 ml Polyethylenröhrchen. 2×10^5 Zellen wurden in 350 μ l Differenzierungsmedium zentrifugiert und kultiviert (A). Die Zellen bildeten dabei Pellets (B, Pfeil), die an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung vermessen wurden (C).

Vorangegangene Resultate unserer Gruppe zeigten, dass der *transforming growth factor* β 1 (TGF- β 1) eine wichtige Rolle während der chondrogenen Differenzierung von USSC, CB-MSC und KM-MSC *in vitro* spielt. Wenngleich TGF- β 1 von CB-MSC und KM-MSC bereits nativ stark exprimiert wurde, konnten nach chondrogener Differenzierung ohne externe Zugabe von TGF- β 1 nur sehr wenige und nach Differenzierungen mit TGF- β 1-Inhibitor keine Proteoglykane nachgewiesen werden. Der Vergleich von Differenzierungen mit Zugabe von TGF- β 1 und TGF- β 3 ergab, dass Zellen in Differenzierungen mit TGF- β 1 deutlich besser kondensierten ¹⁷⁵.

Die im Monolayer expandierten MSC wurden unter dem Einfluss von TGF- β 1 im dreidimensionalen Zellverband (Pelletkultur) *in vitro* chondrogen induziert (Abb.15 A). Es wurden n=3 USSC (USSC 1-3), CB-MSC (CB-MSC 1-3), KM-MSC (KM-MSC 1-3) und n=4 CB-H Linien (CB-H Linie 1-3) zur chondrogenen Differenzierung eingesetzt. Von jeder Zelllinie wurden 21 Pellets mit insgesamt 42×10^5 Zellen zeitgleich induziert. Von klonalen Linien konnte aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Zellzahl keine Pelletkultur durchgeführt werden. Alle Zellpopulationen bildeten innerhalb von 24 Stunden stabile Pellets (Abb.15 B und C).

Die Pellets wurden 7, 14 und 21 Tage nach Beginn der Differenzierung am AVISO *CellCelector*™ vermessen. Dabei wurden Fläche und Durchmesser bestimmt um den Verlauf der Kondensation nachzuvollziehen (vergleiche Abb.VI Anhang).

2×10^5 Zellen wurden je Pellet für die dreidimensionale Kultur während der chondrogenen Differenzierung eingesetzt. Nach 21 Tagen Differenzierung wurden 6 μm dünne Schnitte angefertigt. Die Zellen lagen im Zellverband dicht beieinander und die Schnitte ließen wenige Hohlräume erkennen. Der histochemische Nachweis von Proteoglykanen der extrazellulären Matrix erfolgte durch *Safranin-O/ Fast Green* Färbung der Schnitte. Proteoglykane erscheinen nach Färbung rot-orange (vergleiche Pfeile Abb.16). Die Farbintensität ist dabei proportional zum Proteoglykangehalt.

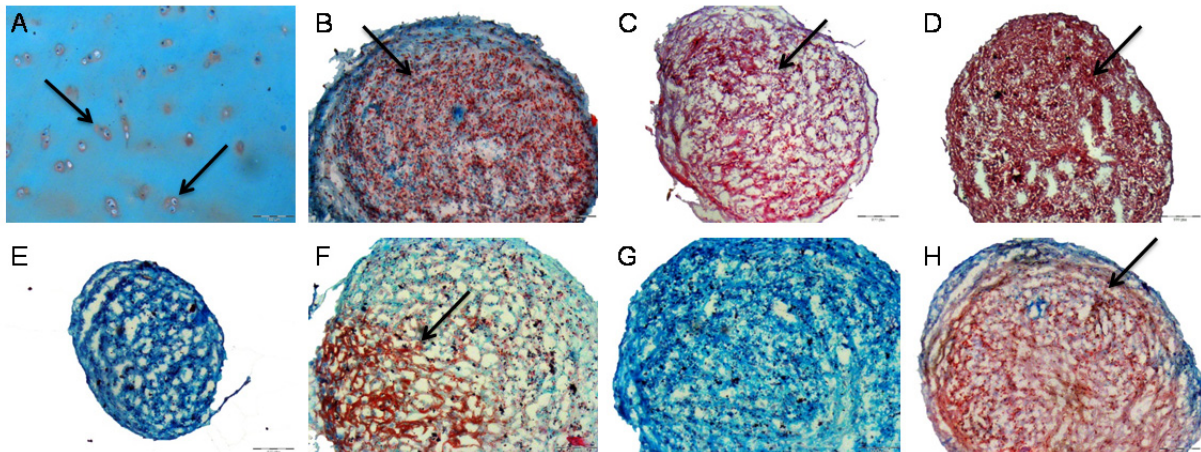


Abb.16: Chondrogene Differenzierung. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen *Safranin-O/ Fast Green* gefärbter Schnitte. Als Kontrolle wurde humaner hyaliner Knorpel gefärbt (A). USSC 2 (B), CB-MSC 1 (C), KM-MSC 3 (D) und die vier CB-H Linien CB-H 1 (E), CB-H 2 (F), CB-H 3 (G), CB-H 4 (H) wurden nach 21 Tagen dreidimensionaler Pelletkultur geschnitten, gefärbt und dokumentiert. Der Maßstab beträgt 100 μm .

In Abbildung 16 B-D ist zu erkennen, dass USSC, CB-MSC und KM-MSC nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung Proteoglykane sezernierten (rote Färbung/ Pfeile). Die Bilder der USSC 2, CB-MSC 1 und KM-MSC 3 sind repräsentativ für jeweils drei getestete USSC, CB-MSC und KM-MSC Linien. Diese Ergebnisse bestätigten frühere Resultate unserer Gruppe, die gezeigt haben, dass alle drei Zelltypen in Differenzierungen mit TGF- β 1 in der Lage sind chondrogen zu differenzieren ¹⁷⁵.

Auch vier CB-H Linien (CB-H 1 – CB-H 4) wurden chondrogen induziert. Mit den Ergebnissen aus Abbildung VI E und F (siehe Anhang) übereinstimmend waren die Pellets der CB-H 1 kleiner als die der anderen drei CB-H Linien. Beim Vergleich der Abbildungen 16 E-H ist ersichtlich, dass die Pelletschnitte von zwei der CB-H Linien, CB-H 2 (Abb.16 F) und CB-H 4 (Abb.16 H) rote Färbung aufwiesen (Pfeile). Weniger Zellen der Linie CB-H 2 sezernierten Proteoglykane als Zellen der Linie CB-H 4. CB-H Linien zeigten kein einheitliches chondrogenes Differenzierungspotential.

3.2 Genexpressionsanalysen

3.2.1 Einfluss physiologischer Zellgenerierung auf die Expression mit Differenzierung assoziierter Gene in undifferenzierten Zellen

Da die Zellpopulationen Unterschiede in ihrem Differenzierungspotential aufwiesen (vergleiche Kapitel 3.1.4 Differenzierungspotential und Abb.11-14,16), wurde die Expression der mit chondrogener und osteogener Differenzierung assoziierten Gene von **DKK1**, **WIF1** und **BMP4** sowie **FOSL1**, **FOSL2**, **FGF2**, **FGF5**, **IGF1**, **SOX9**, **RUNX2**, **TWIST1**, **MSX2**, **PTH1H** und die Expression von **COMP** und **COL10A1** in undifferenzierten USSC (n=2) und CB-MSC (n=2) im Vergleich zu undifferenzierten CB-H Linien (n=4) und KM-MSC (n=1) untersucht. Hierfür wurden *real-time* Analysen an USSC 1 und 2, CB-MSC 1 und 2 und den CB-H Linien 1-4 durchgeführt. Die undifferenzierte KM-MSC 4 diente als Kontrolle.

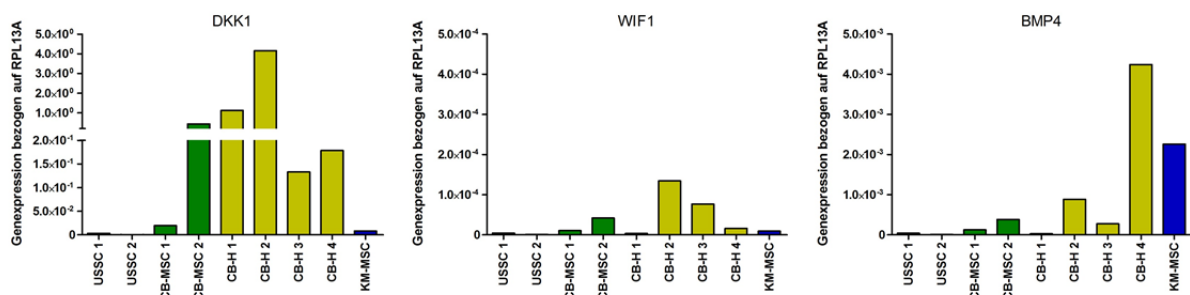


Abb.17: Gene deren Expression mit dem chondrogenen und osteogenen Differenzierungspotential von Vorläuferzellen verbunden sind. Real-time PCR Analysen. Dargestellt sind die relativen Genexpressionen.

Die Expression von **Dickkopf-related protein 1 (DKK1)** wurde in USSC kaum detektiert, während die einzelnen CB-MSC, ähnlich wie die CB-H Linien, DKK1 unterschiedlich stark exprimierten.

Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) wurde gering von CB-MSC und sehr unterschiedlich stark von CB-H Linien exprimiert.

Bone morphogenetic protein 4 (Bmp4) wird von proliferierenden, differenzierenden und hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Seine Expression wurde in einer CB-H Linie (CB-H 4) stark detektiert (> 1,8-fach im Vergleich zur KM-MSC), die Expression in den anderen Linien und Zellpopulationen war im Vergleich zur KM-MSC geringer (Abb.17).

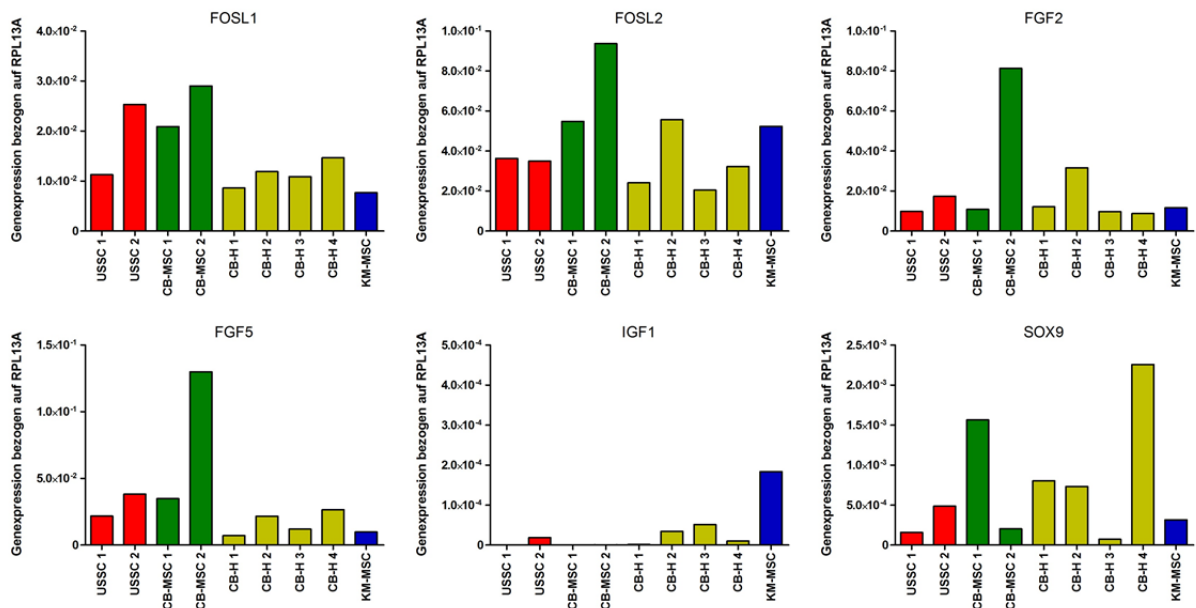


Abb.18: Gene deren Expression Proliferation und Kondensation der MSC sowie deren Differenzierung zu Chondroprogenitorzellen steuern. *Real-time* PCR Analysen. Dargestellt sind die relativen Genexpressionen.

Die für eine effiziente Knorpelentwicklung essentiellen Gene ***Fos-like-Antigene 1 und 2*** (***FOSL1*** und ***FOSL2***) wurden von allen Zellpopulationen exprimiert (0,4- 3,8-fach so stark wie in KM-MSC).

Fibroblast growth factors 2 und 5 (***FGF2***, ***FGF5***), welche wichtig sind für den Prozess der Proliferation und Reifungen von Chondrozyten ¹⁷⁶, wurden in allen getesteten Linien detektiert, auffallend stark in CB-MSC 2. Sie zeigte eine mehr als 7- beziehungsweise 13-fach stärkere Expression von ***FGF2*** respektive ***FGF5*** als KM-MSC.

Der ***Insulin-Like Growth Factor 1*** (***Igf1***) ist zu Beginn der Knorpelbildung wichtig für die Reifung der Chondroblasten, deren Proliferation und das Sekretieren der extrazelluläre Knorpelmatrix im Anschluss an die Kondensation. USSC, CB-MSC und CB-H Linien exprimierten ***IGF1*** im undifferenzierten Zustand gering.

Einer der ersten Marker, der von kondensierenden MSC vor und während der Chondrogenese exprimiert wird, ist ***Sry-box 9*** (***SOX9***). Die ***SOX9***-Expression schwankte innerhalb der Populationen stark. USSC wiesen eher geringe Expressionswerte auf (0,5- 1,5-fach im Vergleich zu KM-MSC), während die ***SOX9***-Expression einer CB-MSC und einer CB-H Linie (CB-MSC 1 und CB-H 4) die der KM-MSC um mehr als das 4-fache überstieg (Abb.18).

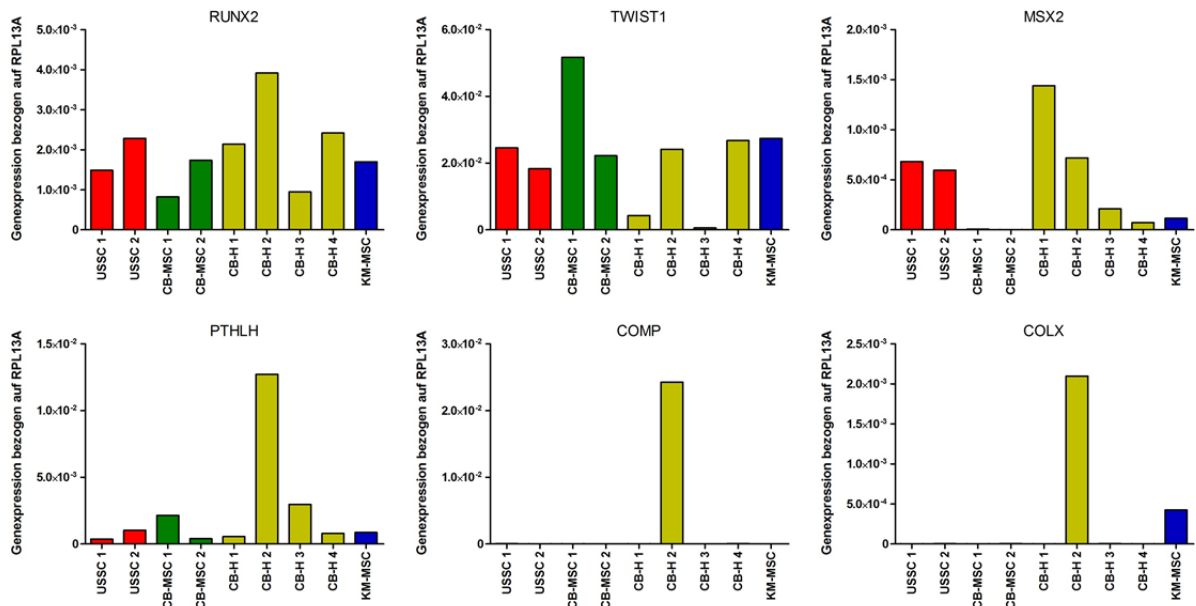


Abb.19: Gene die bei der Differenzierung der Chondrozyten über prä-hypertrophe und hypertrophe Chondrozyten zu ausdifferenzierten Chondrozyten von Bedeutung sind. Real-time PCR Analysen. Dargestellt sind die relativen Genexpressionen.

Runx2 wird in Chondrozyten exprimiert und initiiert die Hypertrophie. *RUNX2* wurde von allen Populationen exprimiert.

Die Expression der *RUNX2* Inhibitoren **homolog of Drosophila twist 1 (TWIST1)** und **homolog of Drosophila muscle segment homeobox 2 (MSX2)**^{177,178} wurde ebenfalls bestimmt (Abb.19).

Beim Vergleich der Expressionswerte ist eine inverse Korrelation zwischen den Werten für *RUNX2* und *TWIST1* bei USSC und CB-MSC, nicht jedoch bei den CB-H Linien zu erkennen.

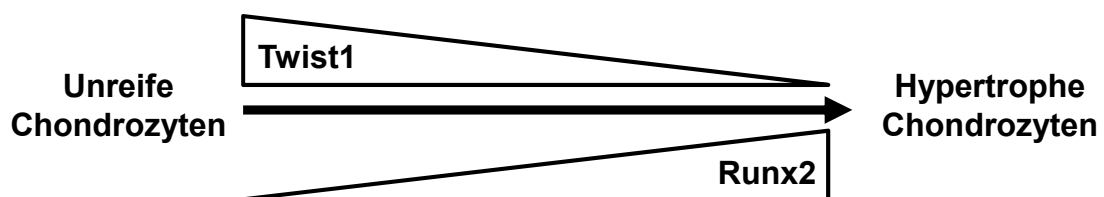


Abb.20: Model zur Reifung von Chondrozyten. Abbildung modifiziert nach Dong *et al.*¹⁷⁹.

In der Chondrozytenreifung geht das Ansteigen der *Runx2*-Genexpression mit einer abnehmenden *Twist1*-Expression einher (Abb.20)¹⁷⁹. *MSX2* wurde 5- 6-mal stärker in USSC als in KM-MSC exprimiert, nur sehr schwach in CB-MSC (< 0,06-fach im Vergleich zu KM-MSC) und stark verschieden in den CB-H Linien. Hier variierte die Expressionsstärke von 0,6- 12,5-fach so stark wie in KM-MSC.

CB-H 2 zeigte die stärkste Expression des Genes ***parathyroid hormone-like hormone (PTH LH)***, welches vorwiegend in prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird.

Runx2 bindet und aktiviert ***Collagen type 10 alpha 1 (Col10A1)***. ***Cartilage oligomeric protein (COMP)*** (Bestandteil der extrazellulären Matrix von Chondrozyten) und ***COL10A1*** (Marker der Hypertrophie) wurden nur von der Linie CB-H 2 exprimiert, welche auch die höchste ***RUNX2*** Expression von allen getesteten Linien aufwies.

Die Normalisierung zu einem willkürlich festgelegten Referenzgen kann zu signifikanten Fehlern bei der Analyse und so zu Falschaussagen über die Genexpression führen. Für einen semiquantitativen Nachweis mittels *real-time* PCR wurde mit Hilfe der geNorm VBA-Anwendung für Microsoft Excel ein passendes Referenzgen ermittelt, um methodenbedingte Schwankungen, welche durch Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge sowie Unterschiede in der Effizienz der reversen Transkription entstehen können, auszuschließen. Das stabilste Gen war ***RPL13A***.

3.2.2 Affymetrix Arrays

Erste Erkenntnisse grundlegender Genexpressionsmuster wurden aus *Microarray*-Analysen mittels *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array*, die das RNA-Expressionsmuster von drei USSC (USSC 2, USSC 4 und USSC 5) und zwei CB-MSK (CB-MSK 1 und CB-MSK 4) erfassten, gezogen. Hierbei wurden über Sonden mehr als 54.500 Werte ermittelt. Beim Vergleich von USSC zu CB-MSK zweifach unterschiedlich exprimierte Gene wurden durch einen ungepaarten t-Test mit einer FDR (*False discovery rate*) von 10% in einer Liste der regulierten Kandidatengene zusammengefasst. Beim Vergleich von USSC zu CB-MSK zeigten sich 271 Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert. 158 wurden stärker in USSC exprimiert, CB-MSK exprimierten 113 Gene stärker. Die Daten der 271 unterschiedlich exprimierten Gene der Affymetrix Arrays dienten als Grundlage für eine *DAVID Functional Annotation Chart* Analyse (*DAVID Bioinformatics Resources* 6.7). Die DAVID Analyse ergab eine Einordnung der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene zwischen USSC und CB-MSK in *Gene Ontology* (GO) *Terms*¹⁸¹ für entwicklungsbiologische Prozesse und Transkriptionsfaktoren. Bei der Analyse werden Gene, die dieselbe Funktion ausüben oder am selben Signalweg beteiligt sind und dabei vermehrt in der Liste von Interesse vorkommen, in *GO Terms* zusammengefasst.

In den 10 *GO Terms* mit den geringsten Überschreitungswahrscheinlichkeiten (Tab.6 *p-value* $4,1 \times 10^{-4}$ bis $6,27 \times 10^{-9}$) fanden sich mehr als 15 *HOX*-Gene. Unter anderem *HOXA3*, *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11*, *HOXB6*, *HOXB7*, *HOXC6*, *HOXC9*, *HOXC10* und *HOXD8*. Dies wurde zum Anlass genommen, die Genexpression der 39 humanen *HOX*-Gene mittels RT-PCR in USSC und CB-MSC zu untersuchen ¹⁶⁵.

Tab.6: TOP10 GO Terms der DAVID Analyse. Aufgelistet sind die 10 *GO Terms* mit den geringsten *p-value* Werten beim Vergleich der Microarray-Analysen von USSC und CB-MSC.

	ID:	Name:	Ontologie:
1	GO:0043565	<i>sequence-specific DNA binding</i>	<i>Molecular Function</i>
2	GO:0003700	<i>sequence-specific DNA binding transcription factor activity</i>	<i>Molecular Function</i>
3	GO:0030528	<i>transcription regulator activity</i>	<i>Molecular Function</i>
4	GO:0007275	<i>multicellular organismal development</i>	<i>Biological Process</i>
5	GO:0032502	<i>developmental process</i>	<i>Biological Process</i>
6	GO:0032501	<i>multicellular organismal process</i>	<i>Biological Process</i>
7	GO:0009653	<i>anatomical structure morphogenesis</i>	<i>Biological Process</i>
8	GO:0048856	<i>anatomical structure development</i>	<i>Biological Process</i>
9	GO:0009887	<i>organ morphogenesis</i>	<i>Biological Process</i>
10	GO:0001501	<i>skeletal system development</i>	<i>Biological Process</i>

3.2.3 Homeobox Genexpressionsmuster

Die durch *Hox*-Gene kodierten Transkriptionsfaktoren sind sowohl bei der Embryogenese ⁸³, als auch im adulten Organismus bei der Zuweisung von Position und Identität neugebildeter Zellen von Bedeutung ¹⁸². Zur Untersuchung der *HOX*-Genexpression wurden RT-Analysen mit Primern für alle 39 humanen *HOX*-Gene durchgeführt ¹⁶⁵.

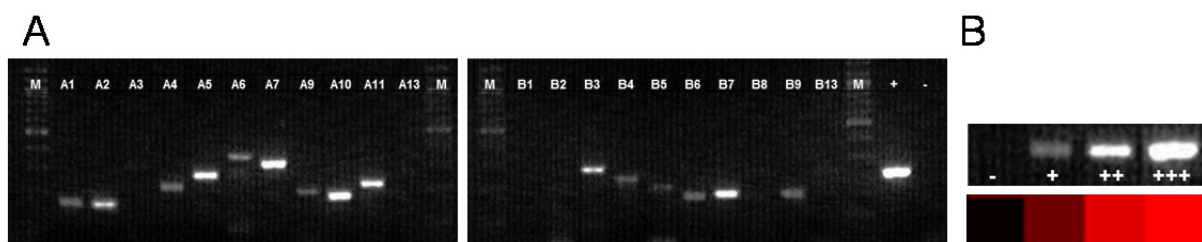


Abb.21: HOX-Genexpressionsmuster. (A) Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate für das HOX A- und B-Cluster am Beispiel einer KM-MSC. Die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) Genexpression wurde zur Kontrolle und zur Vergleichbarkeit der Proben ermittelt. (B) Zuteilung von Expressionsstärken zu Bandenstärken in der RT-PCR.

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse einer RT-PCR Analyse beispielhaft für das HOX A- und B-Cluster einer KM-MSC. Den nach RT-PCR durch Agarose-Gel Elektrophorese ermittelten Banden wurden Expressionsstärken zugeordnet, um einen übersichtlichen Vergleich der Proben zu ermöglichen.

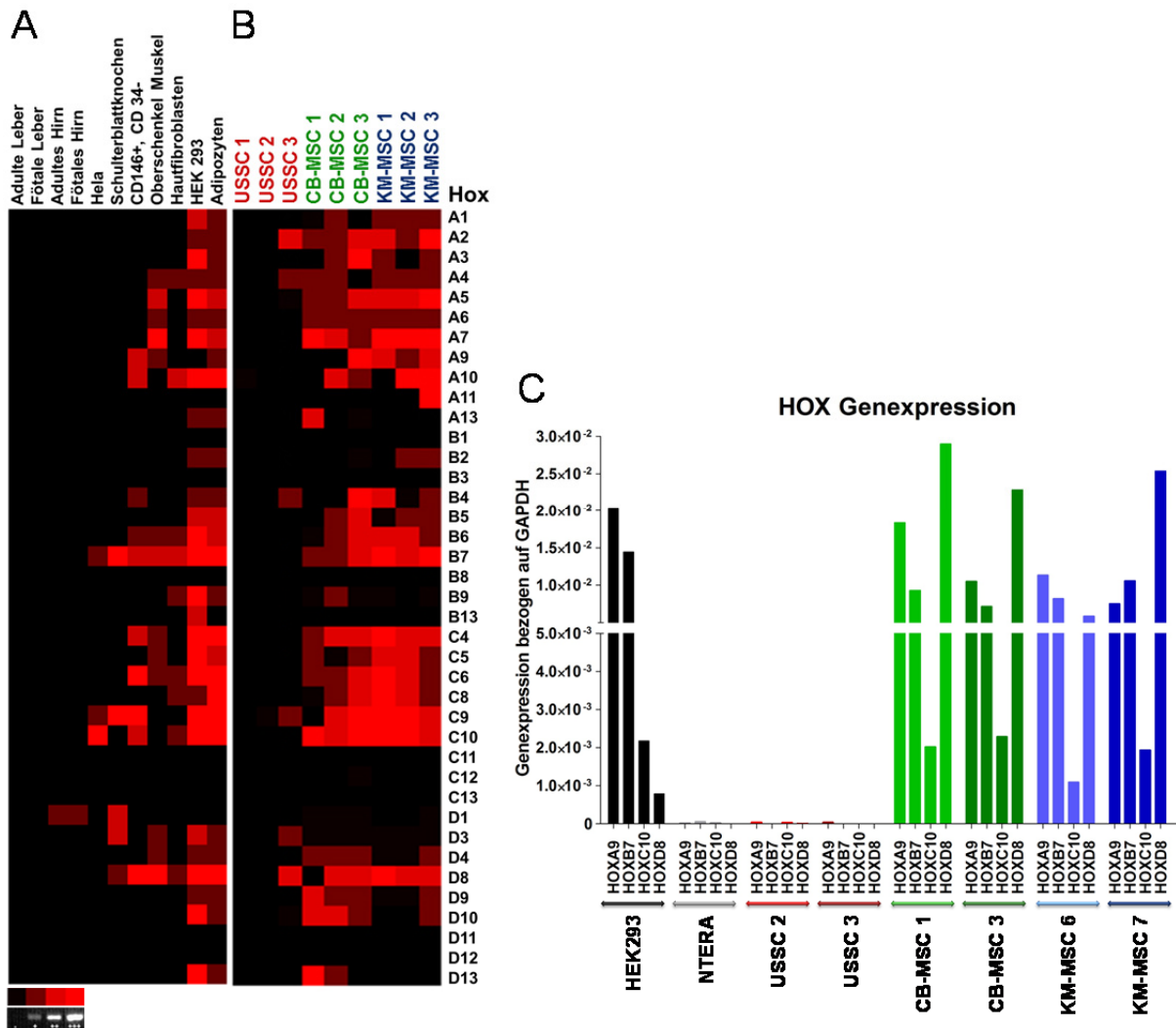


Abb.22: Stromazellen aus Nabelschnurblut zeigten eine differentielle *HOX*-Genexpression. (A) *HOX*-Genexpression in Geweben (Leber, Hirn, Muskel, Knochen) und Zelllinien (Hela, HEK293) oder Zellfraktionen (CD146⁺, CD34⁻) sowie in differenzierten Zellen (Adipozyten, Fibroblasten). (B) *HOX*-Genexpression in kultivierten, undifferenzierten MSC aus dem Nabelschnurblut und Knochenmark. (C) *Real-time* PCR zur quantitativen Bestimmung der Genexpression. Die Expression von *HOXA9*, *HOXB7*, *HOXC10* und *HOXD8* wurde in USSC, CB-MSC und KM-MSC ermittelt. NTERA und HEK293 RNA diente als Kontrolle.

Es wurden RT-PCR Analysen von 11 Zell- und Gewebeproben zum Vergleich und zur Kontrolle der Primer durchgeführt (Abb.22 A). Sie geben einen Einblick in die Vielfalt der *Hox*-Genexpression ausdifferenzierter Gewebe und Zellen. Insgesamt wurden n=17 USSC, n=9 CB-MSC und n=17 KM-MSC getestet. Für die Primer der *HOX*-Gene *B3*, *B8*, *C13* und *D12* konnten in keinem Versuch und bei keiner Kontrolle positive Ergebnisse erreicht werden, sodass ihre Funktionstüchtigkeit fraglich ist. Sowohl CB-MSC als auch KM-MSC zeigten eine *HOX*-Genexpression, USSC hingegen waren vorwiegend negativ (Abb.22 B). Für eine quantitative Bestimmung wurde zusätzlich die Expression der vier Gene *HOXA9*, *HOXB7*, *HOXC10* und *HOXD8* mittels *real-time* PCR in USSC 2 und 3, CB-MSC 1 und 3 und KM-MSC 6 und 7 untersucht (Abb.22 C). Die *real-time* PCR bestätigte die bisherigen Ergebnisse.

Die in Abbildung 22 gezeigte Tendenz der *HOX*-Genexpression ist charakteristisch für alle getesteten Linien der drei Zellpopulationen. CB-MSC und KM-MSC waren positiv für die getesteten Gene, wohingegen die Genexpression von USSC mit der, der NTERA Kontrollzellen, übereinstimmte. Die *HOX*-positiven Populationen sind in sich uneinheitlich und weisen ähnliche, aber nicht identische Muster auf.

Zusätzlich wurden insgesamt acht klonale Zelllinien von vier verschiedenen USSC, drei klonale Linien einer CB-MSC und insgesamt sechs klonale Zelllinien von zwei KM-MSC mittels RT-PCR Analysen überprüft.

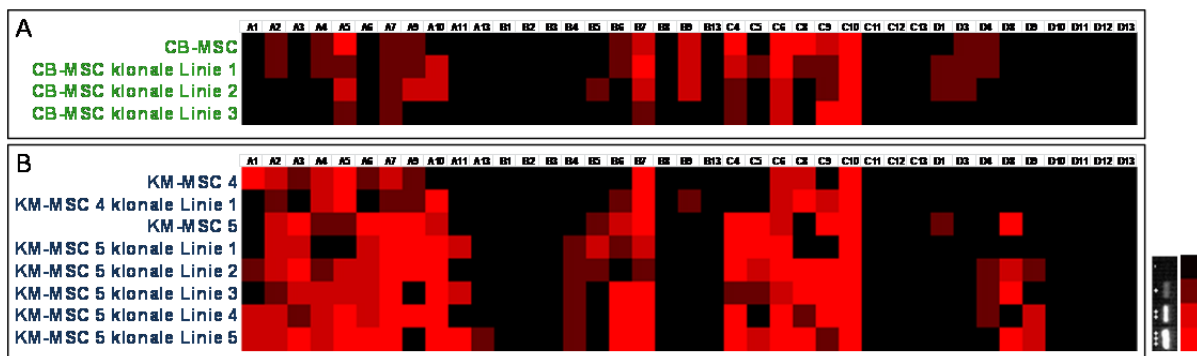


Abb.23: *HOX*-Genexpression in klonalen Linien. (A) *HOX*-Cluster einer CB-MSC sowie drei ihrer klonalen Linien. (B) *HOX*-Cluster von zwei KM-MSC und dazugehörigen klonalen Linien.

Alle acht klonalen Linien der vier *HOX*-negativen USSC wiesen ebenfalls keine *HOX*-Genexpression auf (Daten nicht gezeigt). Die *HOX*-Genexpressionsmuster der drei klonalen Linien einer CB-MSC ähnelten dem Muster der Ursprungslinie (Abb.23). Einige Gene wurden nicht in allen Linien exprimiert (vergleiche Abb.23 Gene *HOXB5* nur in Klon2, *HOXC5* nur in Klon1, *HOXA10* und *HOXD1* in Klon1 und Klon2). Die getesteten KM-MSC und deren klonale Linien wiesen alle eine *HOX*-Genexpression auf. Bei den KM-MSC wurden ebenfalls verschiedene Gene nur in einzelnen Linien exprimiert (*HOXA13* in Klon5, *HOXD1* in KM-MSC5).

Insgesamt waren die Muster der Linien und ihrer jeweiligen Klone ähnlich. USSC und deren klonale Linien waren vorwiegend *HOX*-negativ, CB-MSC und KM-MSC sowie klonale Linien dieser Populationen waren *HOX*-positiv mit individuellen Unterschieden.

Mit dem Ziel *HOX*-Gene zu identifizieren, die auch während der Differenzierung *in vitro* reguliert werden, wurden *HOX*-Cluster von Zelllinien vor und nach *in vitro* Differenzierung verglichen.

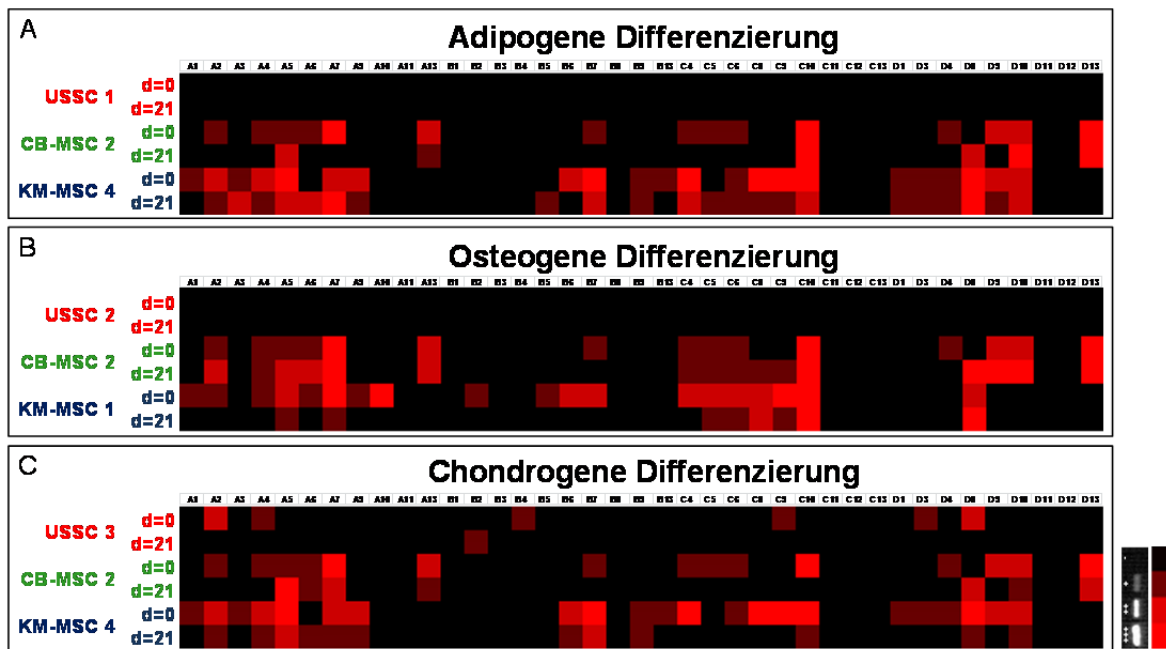


Abb.24: Veränderungen der *HOX*-Genexpression durch *in vitro* Differenzierung. *HOX*-Cluster in undifferenzierten im Vergleich zu *in vitro* adipogen (A), osteogen (B) und chondrogen (C) differenzierten Zellen. Dargestellt ist exemplarisch eine Linie je Zellpopulation.

HOX-negative USSC 1 und USSC 2 zeigten nach *in vitro* Differenzierung weiterhin keine Expression der *HOX*-Gene (Abb.24 A und B). USSC 3, die an Tag 0 eine schwache *HOX*-Genexpression aufwies, reduzierte diese deutlich von sechs exprimierten *HOX*-Genen im Verlauf der osteogenen Differenzierung auf zwei verbleibende (*HOXA4*, *B4*; Daten nicht gezeigt). In der chondrogenen Differenzierung wurde in USSC 3 die *HOXB2* Expression initiiert, während die Expression der anderen *HOX*-Gene eingestellt wurde (Abb.24 C).

CB-MSC 2 exprimierte nach adipogener Differenzierung *HOXA5*, *A13*, *D8*, *C10*, *D10*, *D13* (Abb.24 A). Während der osteogenen Differenzierung wurde die Expression der Gene *HOXA4-7*, *HOXC4-6*, *HOXD8-9* in CB-MSC 1-3 aufrechterhalten oder hochreguliert. Abbildung 23 B zeigt exemplarisch die Genexpression von CB-MSC 2.

KM-MSC 4 exprimierte nach adipogener Differenzierung kein *HOXA1*, *B6* und *B13* mehr, aber *HOXA6*, *B5* und *C5* (Abb.24 A). KM-MSC 1 exprimierte von ursprünglich 19 verschiedenen *HOX*-Genen an Tag 0 nach osteogener Differenzierung noch acht (*HOXA5*, *A7*, *C5-C10* und *D8*), keines davon aus dem B-Cluster.

Die Gene *HOXA5-7*, *D8* und *D10* wurden nach chondrogener Differenzierung noch in allen getesteten CB-MSC und KM-MSC exprimiert, während die Expression ausnahmslos aller Gene des B- und C-Clusters runterreguliert oder eingestellt wurde (Abb.24 C).

HOX-positive Zellpopulationen (CB-MSC und KM-MSC) exprimierten nach adipogener Differenzierung einheitlich *HOXA5*, *D8*, *C10* und *D10*. Insgesamt wurde die Expression der *HOX*-Gene 4-10 der vier Cluster A-D in der osteogenen Differenzierung ubiquitär eher stabilisiert, während die Gene 1-3 und 11-13 der Hox-Cluster zelllinienabhängig reguliert wurden. In der chondrogenen Differenzierung kam es zu einer Abnahme der Expression der Gene des B- und C-Clusters.

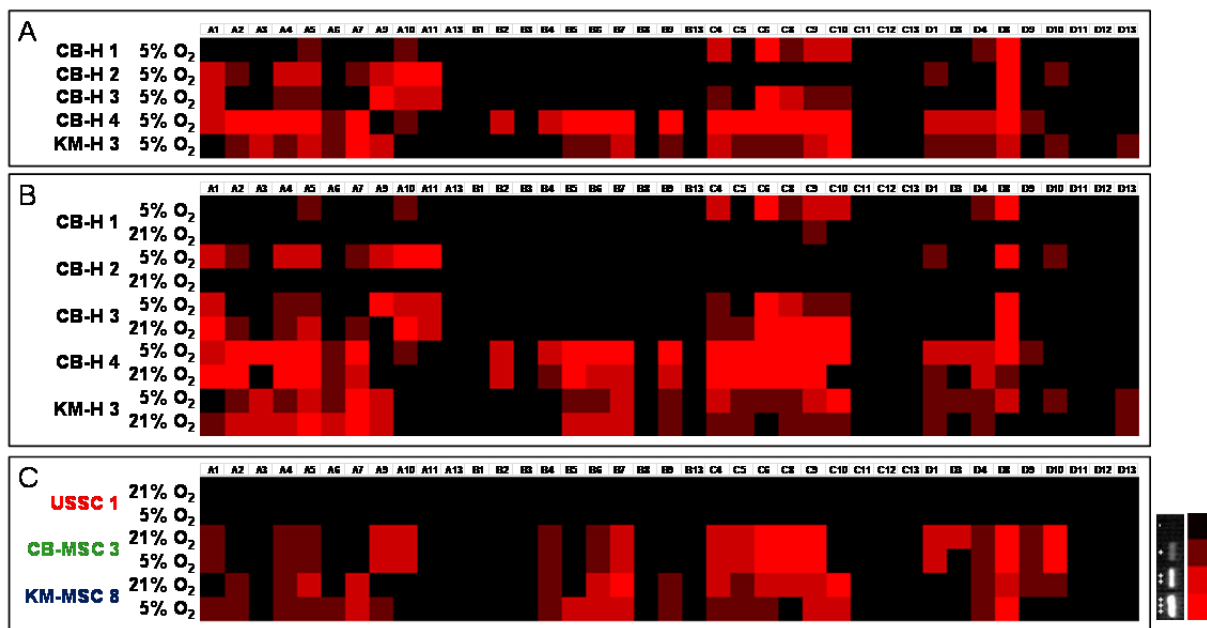


Abb.25: Der Einfluss des Sauerstoffgehalts auf die *HOX*-Genexpression. *HOX*-Cluster von Zelllinien die unter physiologischen Bedingungen generiert wurden (A) und die korrespondierenden *HOX*-Genexpressionsmuster der Zelllinien nach 21-tägiger Kultivierung in 21% Sauerstoff (B). Abbildung C zeigt die Expressionsmuster der *HOX*-Gene einer in 21% und 21 Tage in 5% O₂ kultivierten USSC, CB-MSC und KM-MSC.

Alle getesteten unter **5% O₂ generierten** Zelllinien exprimierten diverse Gene des A- und D-Clusters (CB-H 1-4, KM-H 3). Gene des B-Cluster wurden von drei der CB-H Linien (CB-H 1-3) in **5% O₂** nicht exprimiert, CB-H 2 exprimiert zudem keine Gene des C-Clusters (Abb.25 A). Zwei der vier CB-H Linien (CB-H 1 und CB-H 2) stellten die *HOX*-Genexpression nach 21-tägiger **Kultivierung unter 21% O₂** fast vollständig ein. CB-H 4 exprimiert unter **21% O₂** fünf Gene nicht mehr und regulierte sieben weitere runter.

Die Expression der *HOX*-Gene A2, A7 und C5 wurde von CB-H 3 bei der **Kultivierung unter 21% O₂** initiiert und sechs weitere Gene stärker exprimiert, während ausschließlich die Expression von *HOXA9* eingestellt wurde.

Die unter **5% O₂ generierte** KM-H 3 Linie initiierte nach 21-tägiger **Kultur in 21% O₂** die Expression von *HOXA1*, regulierte sechs weitere Gene des A- und B-Clusters hoch (*HOXA2*, A4-A6, B5 und B6) und senkte parallel die Expression von sieben Genen des C- und D-Clusters (Abb.25 B).

Die Expression der *HOX*-Gene in den getesteten Zelllinien die unter **21% O₂** generiert wurden (USSC 1, CB-MSC 3 und KM-MSC 8), blieb annähernd konstant nach **Kultivierung unter 5% O₂** (Abb.25 C).

3.2.4 Direkte Ko-Kultur

Es wurde der Einfluss der Ko-Kultur von *HOX*-positiven mit *HOX*-negativen Zelllinien auf die *HOX*-Genexpression der *HOX*-negativen Zelllinien untersucht. Eine Ko-Kultur mittels Transwells wurde durchgeführt, führte aber zu keiner Veränderung der *HOX*-Genexpression in *HOX*-negativen Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Die direkte Ko-Kultur wurde etabliert, um den Zellen Zell-Zellkontakte zu ermöglichen.

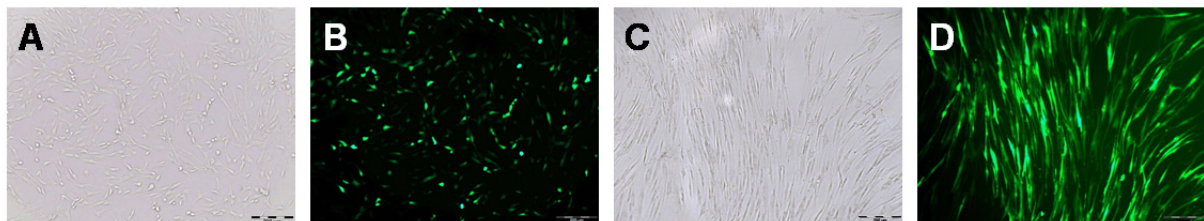


Abb.26: Direkte Ko-Kultur einer *Gfp*-exprimierenden USSC mit einer CB-MSC. Repräsentative lichtmikroskopische (A+C) und entsprechende fluoreszenzmikroskopische (B+D) Aufnahmen der direkten Ko-Kultur 4 Stunden (A+B) und 6 Tage (C+D) nach Zusammenführung. Der Maßstab beträgt 200 µm.

Die Linie USSC 2 pCL6IEGwo, die lentiviral vermittelt eine *Gfp*-Expression aufwies, exprimierte vor der direkten Ko-Kultur keine *HOX*-Gene. Die *HOX*-Genexpression der *HOX*-positiven CB-MSC 1 und KM-MSC 4 wurde vor Ko-Kultur bestimmt (CB-MSC 1_1 und KM-MSC 4-1). Die Zellen wurden aufgeteilt und ein Teil der Zellen jeder Zelllinie separat kultiviert (CB-MSC 1_2 und KM-MSC 4_2) und zu einem anderen Zeitpunkt erneut auf ihre *HOX*-Genexpression getestet. CB-MSC 1 zeigte keine Genexpression mehr von 5 *HOX*-Genen (*HOXA4*, *A11*, *B9*, *D1* und *D3*) initiierte aber die Expression von *HOXA9*, *D4* und *D9*. KM-MSC 4 exprimierte kein *HOXA6*, *A10*, *B5* mehr, initiierte die Expression von *HOXA1*, *A9*, *B13*, *C8*, *D1* und *D8*. Der andere Teil der CB-MSC 1 (Abb.26 A-D) oder KM-MSC 4 wurde 6 Tage mit USSC 2 pCL6IEGwo zusammen ko-kultiviert.

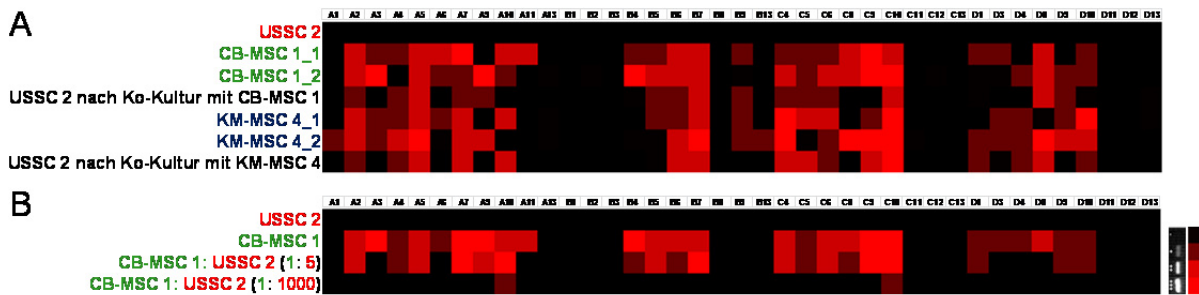


Abb.27: HOX-Genexpression vor und nach Ko-Kultur. Die Zelllinien wurden vor der direkten Ko-Kultur auf ihre *HOX*-Genexpression getestet. *HOX*-positive Zelllinien wurden wiederholt getestet. Nach Ko-Kultur wurde der *HOX*-Code der *Gfp*-positiven Fraktion untersucht (A). Abbildung B zeigt Auswertungen der Titrationsreihen mit USSC 2 und CB-MSC 1 zur Bestimmung der Sensitivität der PCR.

Sechs Tage nach Zusammenführung wurden die Zellen im Durchflusszytometrie-Labor des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika Uniklinik Düsseldorf nach *Gfp*-Expression sortiert. Die *Gfp*-positive USSC-Fraktion (Reinheit > 99%) wurde auf ihre *HOX*-Genexpression untersucht.

Nach Ko-Kultur mit CB-MSC 1 beziehungsweise KM-MSC 4 wurde die Expression von 15 respektive 16 *HOX*-Genen mittels RT-PCR in der *Gfp*-positiven USSC-Fraktion nachgewiesen. Die Expression der elf Gene *HOXA2*, *A4*, *A5*, *A7*, *B6-7*, *C4-6*, *C10* und *D8* wurde nach beiden Ko-Kulturen detektiert. Nach der Ko-Kultur mit CB-MSC 1 wurden zudem *HOXA9*, *B5*, *B9* und *D9* detektiert. Die Ko-Kultur mit KM-MSC 4 hatte eine Detektion der Gene *HOXA10*, *C9*, *D1*, *D4* und *D10* zur Folge (Abb.27). Es wurden keine Expression von *HOX*-Gene detektiert, die nicht zuvor auch in den *HOX*-positiven CB-MSC 1 oder KM-MSC 4 gemessen wurde.

Um eine Verunreinigung der *Gfp*-positiven Fraktion mit CB-MSC oder KM-MSC als Ursache für die Detektion von *HOX*-Genen auszuschließen, wurde die Sensitivität in der RT-PCR bestimmt. Dazu wurden Titrationsreihen mit USSC 2 und CB-MSC 1 durchgeführt. Bei einer 1:5 Verdünnung der CB-MSC 1 mit USSC 2 Zellen wurde die Expression von 19 der 21 in CB-MSC 1 exprimierten *HOX*-Gene mittels RT-PCR Analysen nachgewiesen. Eine CB-MSC Zelle unter 1000 USSC Zellen führt zur Detektion von zwei verbleibenden *HOX*-Gene *HOXA10* und *C10* (Abb.27 B).

HOX-positive Zelllinien variierten in Auswahl und Anzahl an *HOX*-Genen in *in vitro* Kultur. Nach der direkten Ko-Kultur der *HOX*-positiven Zellpopulationen mit *HOX*-negativen USSC 2 wurden eine *HOX*-Genexpression in der zu über 99% aus USSC 2 bestehenden *Gfp*-positiven Fraktion detektiert.

3.2.5 Wnt-Genexpressionsmuster

Wnt Proteine (16)	• WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT9A, WNT10A, WNT11, WNT16
(Ko-) Rezeptoren (10)	• FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, LRP5, LRP6
Mitwirkende im Signalweg (31)	• APC, CCND1, CCND2, CCND3, FGF4, PPP2CA, PPP2R1A, WISP1, SENP2, AXIN1, DIXDC1, CTNNB1, SOX17, TLE1, TLE2, CSNK1A1, CSNK1D, CSNK1G1, CSNK2A1, GSK3A (GSK3alpha), GSK3B (GSK3beta), BTRC (b-TrCP), FBXW11, FBXW2, FBXW4, BCL9, DAAM1, KREMEN1, PORCN, RHO, SLC9A3R1
negative Regulatoren (13)	• CXXC4, DKK1, sFRP1, FRZB (sFRP-3), sFRP4, FSHB, NLK, WIF, AES, CTBP1, CTBP2, CTNNBIP1 (ICAT), NKD1
positive Regulatoren (6)	• FRAT1, TCF7, DVL1, DVL2, LEF1, PYGO1
Transkriptionsfaktoren (8)	• EP300, FOSL1 (Fra-1), FOXN1, JUN, MYC, PITX2, T (Brachyury), TCF7L1

Abb.28: Funktionelle Einteilung der 84 Gene des Arrays. Es wurden die offiziellen Abkürzungen der Gennamen verwendet (komplette Liste siehe Anhang Tabelle II).

USSC 1-3, CB-MSC 1-3, CB-H 1-4, KM-MSC 1, KM-MSC 6 und KM-MSC 9 wurden mittels *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler* PCR Array auf die Expression von *WNT*- und Wnt-Signalweg assoziierten Genen getestet. Des Weiteren wurde die Genexpression unter Standard-Zellkulturbedingungen im Vergleich zu physiologischen Bedingungen in USSC 2, USSC 3, CB-H 2 und CB-H 3 ermittelt. Die 84 Gene, die mit dem Array untersucht wurden, stehen im Bezug zur Wnt-assoziierten Signalweiterleitung und können in sechs Gruppen eingeteilt werden (Abb.28). Darunter befinden sich Oberflächenrezeptoren für Wnt, Wnt Regulatoren, Wnt Antagonisten, intrazelluläre Signalmoleküle und Zielgene des Wnt-Signalweges. Die Expression der Gene, die mit dem Wnt-Signalweg in Verbindung stehen, wurde über *real-time* PCR quantifiziert und nach Anpassung anhand der Haushaltsgenexpression von *RPL13A* zueinander in Relation gesetzt. Die Auswertung erfolgte webbasierte auf der Homepage der Herstellerfirma SABiosciences.

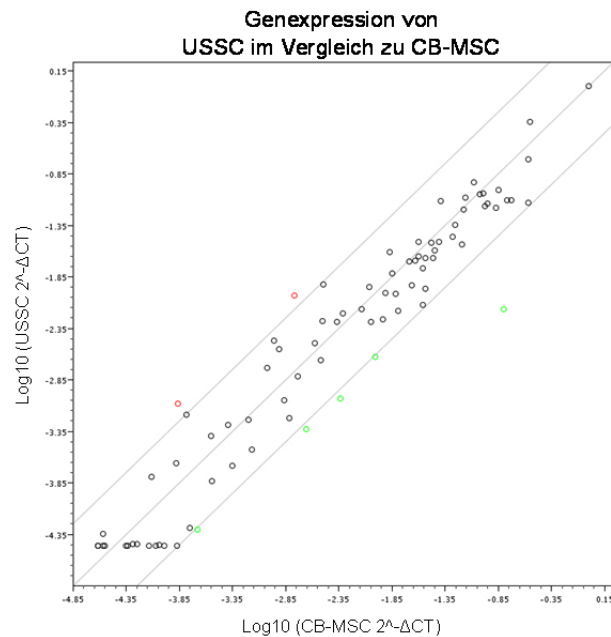


Abb.29: Genexpressionsmuster von USSC 1-3 und CB-MSC 1-3 im Vergleich. Das Ergebnis der Wnt-Arrayauswertung wurde in einem Streudiagramm dargestellt. Der Schwellwert wurde auf 4 festgelegt. Von USSC stärker exprimierte Gene wurden rot dargestellt, geringer exprimierte grün.

Der Schwellwert aller Auswertungen lag bei vier, so dass Gene die mehr als vierfach so stark in USSC 1-3 wie in CB-MSC 1-3 exprimiert wurden (rot) und Gene die weniger als ein Viertel so stark exprimiert wurden (grün) als unterschiedlich exprimiert galten (Abb.29). Beim Vergleich der Genexpression von USSC und CB-MSC zeigten sich insgesamt sieben Gene als differentiell exprimiert. USSC zeigten höhere Expressionswerte für den extrazellulären Inhibitor ***secreted Frizzled-related protein 4 (sFRP4)*** sowie eine um mehr als das 23-fach geringere Expression des extrazellulären Inhibitors ***Dickkopf-related protein 1 (DKK1)*** im Vergleich zu CB-MSC. Weitere in CB-MSC geringfügig stärker exprimierte Gene waren ***Paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2)*** sowie die Gene ***SRY-related HMG-box Gene 17 (SOX17)*** und ***wingless-type MMTV integration site family member 16 (WNT16)***.

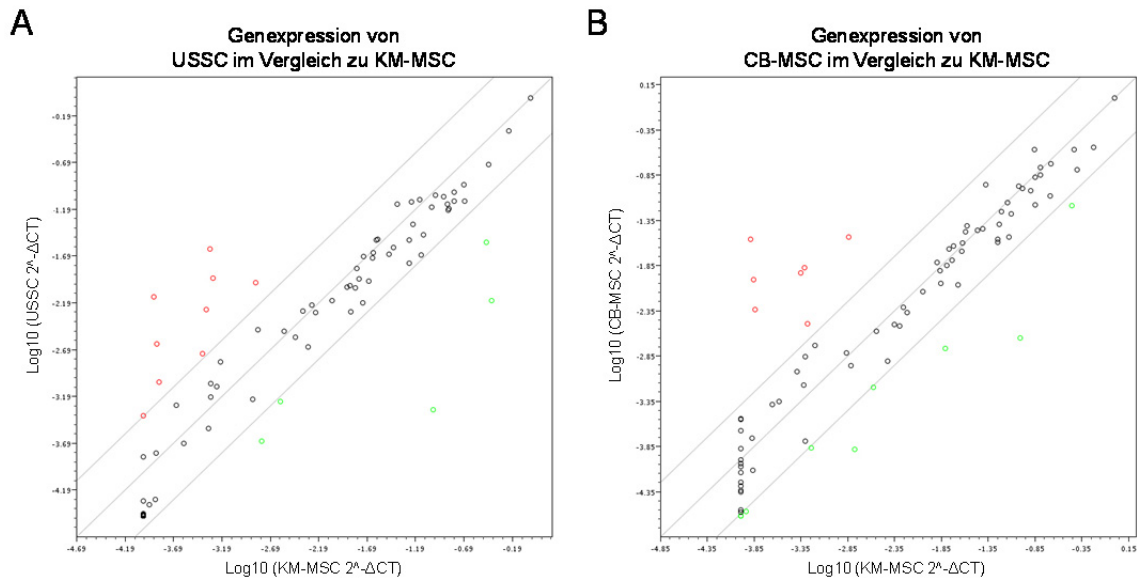


Abb.30: Genexpressionsmuster von USSC und CB-MSC im Vergleich zu KM-MSC. Die Ergebnisse der Wnt-Arrayauswertung wurden in Streudiagrammen dargestellt. Der Schwellwert wurde auf 4 festgelegt. Von USSC beziehungsweise CB-MSC stärker exprimierte Gene wurden rot, geringer exprimierte grün dargestellt.

Die als Streudiagramme dargestellten Vergleiche der USSC 1-3 oder CB-MSC 1-3 mit KM-MSC 1, KM-MSC 6 und KM-MSC 9 zeigten jeweils 14 differentiell exprimierte Gene (Abb.30).

Neun Gene wurden in USSC stärker exprimiert als in KM-MSC (Abb.30 A). Darunter die inhibierend wirkenden Gene **secreted Frizzled-related protein 1 (sFRP1)** und **c-terminal-binding protein 1 (CTBP1)** sowie das Zielgen **cyclin-D2 (CCND2)** und die Transkriptionsfaktoren **MYC** und **V-Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog (JUN)**. Die Expression der Inhibitoren **sFRP1** und **CTBP1** war um mehr als das 12-fache beziehungsweise 59-fache höher in USSC im Vergleich zu KM-MSC. Fünf Gene wurden von KM-MSC stärker exprimiert. Große Unterschiede zeigten sich dabei vor allem für den, durch den kanonischen Wnt-Signalweg induzierbaren Transkriptionsfaktor **PITX2**, der in KM-MSC mehr als 200-fach stärker vorlag als in USSC.

CB-MSC exprimierten sieben Gene, unter anderem **sFRP1**, **CTBP1**, **CCND2**, **MYC** und **JUN** mehr als 6-fach stärker als KM-MSC. Ebenfalls sieben Gene wurden von den KM-MSC höher exprimiert im Vergleich zu CB-MSC (Abb.30 B).

Zu den Genen, die in USSC und CB-MSC einheitlich stärker exprimiert wurden als in KM-MSC, zählten **WNT5A**, **WNT16**, **CCND2**, **sFRP1**, **CTBP1** sowie die Zielgene des Wnt-Signalweges **MYC** und **JUN**. Die Expression von **PITX2**, **WNT5B** und **FZD5** war beim Vergleich von KM-MSC mit Zellpopulationen aus dem Nabelschnurblut stets in KM-MSC mehr als vierfach höher.

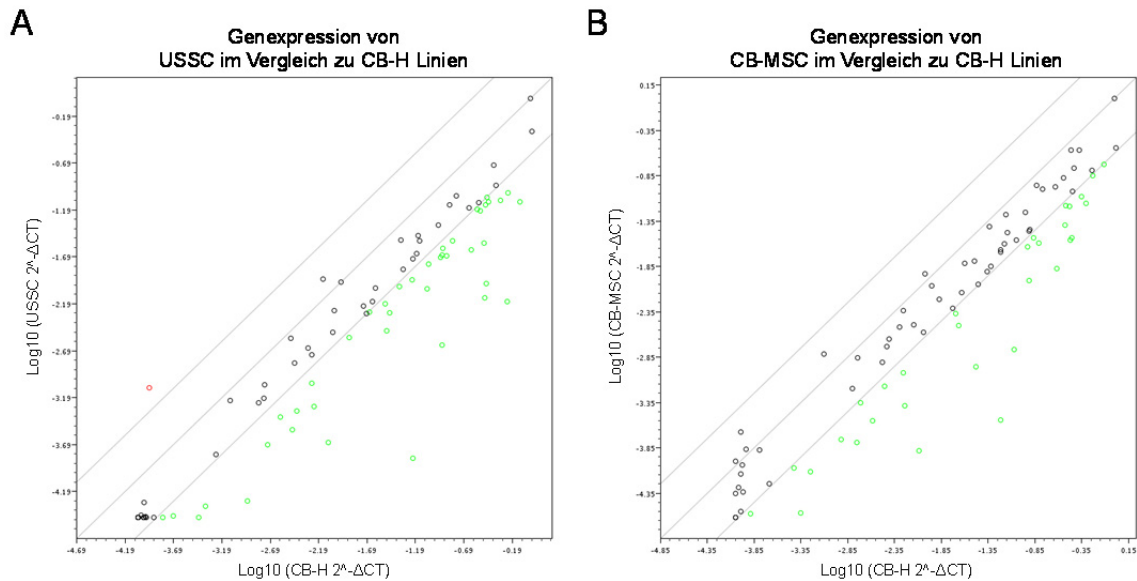


Abb.31: Genexpressionsmuster von USSC und CB-MSK im Vergleich zu CB-H Linien. Die Ergebnisse der Wnt-Arrayauswertung wurden in Streudiagrammen dargestellt. Der Schwellwert wurde auf 4 festgelegt. Von USSC beziehungsweise CB-MSK stärker exprimierte Gene wurden rot, geringer exprimierte grün dargestellt.

CB-H Linien (n=4) zeigten im Vergleich zu USSC (n=3) für 40 Gene eine mehr als 4-fach höhere Genexpression (siehe Tab.III Anhang) (Abb.31 A). CB-H Linien exprimierten sieben *WNT*-Gene und fünf Inhibitoren, unter anderem ***CTBP1***, ***DKK1*** und ***Wnt inhibitory factor 1 (WIF1)*** um mehr als das 4,2-fache höher als USSC. Gene aus der Gruppe der Rezeptoren sowie Ko-Rezeptoren wurden stärker als 6-fach in CB-H Linien im Vergleich zu USSC exprimiert. Eine im Vergleich höhere Genexpression zeigten USSC nur für den Wnt-Antagonisten ***sFRP4*** (6,2fach) (Abb.31 A).

26 Gene wurden in CB-H Linien stärker exprimiert als in CB-MSK (n=3) (Abb.31 B). Fünf der sieben *WNT*-Gene, deren Expression in CB-H Linien höher ausfiel als in USSC, wurden beim Vergleich von CB-H Linien zu CB-MSK ebenfalls höher in CB-H Linien exprimiert. Kein Gen wurde in CB-MSK mehr als 4-fach stärker exprimiert als in den CB-H Linien.

Die Expression ausgewählter, im Vergleich der Zellpopulationen (USSC 1-3, CB-MSK 1-3, CB-H 1-4 und KM-MSK 1, KM-MSK 6 und KM-MSK 9) zueinander differentiell exprimierter Gene wird im Folgenden im Detail dargestellt.

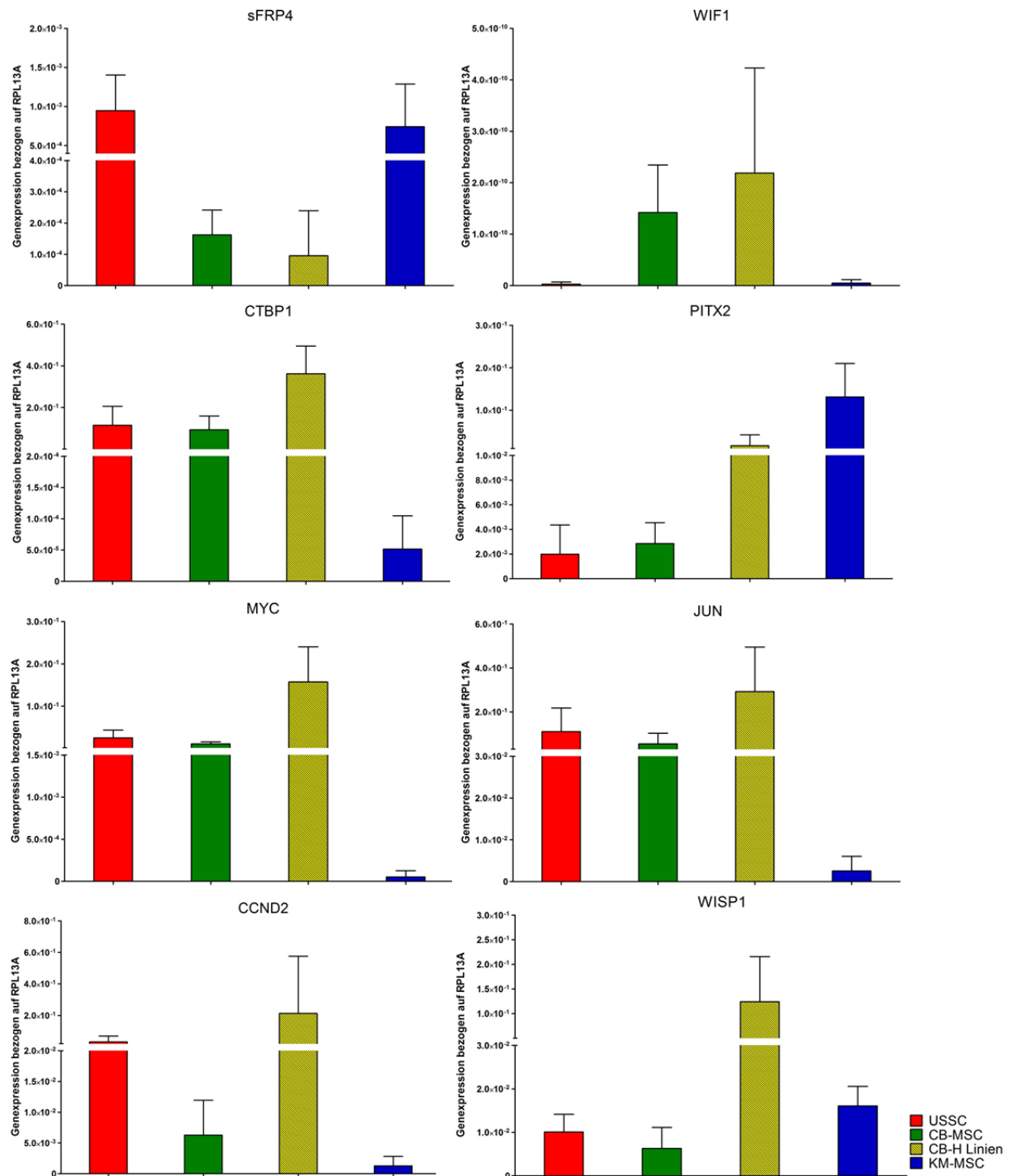


Abb.32: Die Zellpopulationen exprimierten diverse Gene des Wnt-Signalweges differentiell. Quantitative Genexpression von *sFRP4*, *WIF1*, *CTBP1*, *PITX2*, *MYC*, *JUN*, *CCND2* und *WISP1*. Ermittelt mit Wnt-Arrayanalysen von USSC (n=3), CB-MSC (n=3), CB-H Linien (n=4) und KM-MSC (n=3). Dargestellt sind die relativen Genexpressionen mit jeweiliger Standardabweichung.

Abbildung 32 zeigt eine Auswahl an Genen, die beim Vergleich der Wnt-Genexpressionsmuster der verschiedenen Zellpopulationen unterschiedlich exprimiert wurden. Dazu zählten die Gene der extrazellulären Wnt-Antagonisten ***sFRP4***, ***WIF1*** sowie ***CTBP1*** (Ko-Repressor intrazellulär), die Transkriptionsfaktoren ***PITX2***, ***MYC***, ***JUN*** sowie die Zielgene des Wnt-Signalweges ***CCND2*** und ***WISP1***.

Um den Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpressionsmuster zu untersuchen wurden CB-H Linien (CB-H 2 und CB-H 3) und USSC (USSC 2 und USSC 3) unter 21% O₂ beziehungsweise 5% O₂ kultiviert und WNT Arrayanalysen durchgeführt.

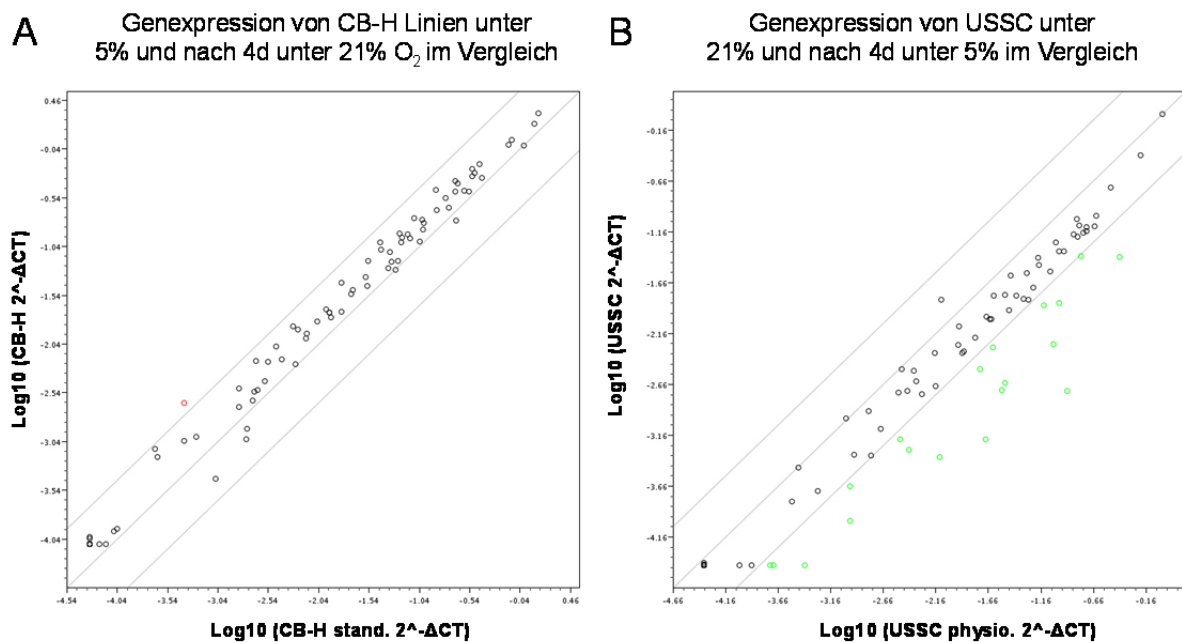


Abb.33: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpressionsmuster. WNT-Arrayanalysen von zwei CB-H Linien unter 5% O₂ und 21% O₂ im Vergleich (A). Abbildung B zeigt WNT-Arrayanalysen von zwei USSC unter 21% O₂ und 5% O₂ im Vergleich. Die Ergebnisse der Auswertung wurden in Streudiagrammen dargestellt. Der Schwellwert wurde auf 4 festgelegt. Von den Linien stärker exprimierte Gene in der Sauerstoffkonzentration in der die Linien generiert wurden (CB-H 5% O₂ und USSC 21% O₂) wurden rot, geringer exprimierte grün dargestellt.

Die CB-H Linien CB-H 2 und CB-H 3 zeigten nach vier Tagen Zellkultur unter **21% O₂** eine um mehr als das 4-fache abweichende Expression von einem Gen (Abb.33 A). Sie exprimierten den Rezeptor **FZD3** 5,4-fach stärker in **5% O₂** als in **21% O₂**.

USSC 2 und USSC 3 zeigten nach vier Tagen Kultur unter **5% O₂** eine erhöhte Expression von 19 Genen (Abb.33 B). Sie exprimierten fünf *WNT*-Gene, die Inhibitoren **CTBP1** und **DKK1** sowie **JUN** und **MYC** stärker. Zudem wurden nach vier Tagen unter **5% O₂** der Ko-Rezeptor **LRP5** aus der Gruppe der Rezeptoren mehr als 5-mal stärker exprimiert. Kein Gen wurde in USSC unter **21% O₂** mehr als 4-fach stärker exprimiert.

Die erhöhte Sauerstoffkonzentration bei der 4-tägigen Kultivierung unter 21% O₂ hatte kaum Einfluss auf die Genexpression der CB-H Linien. USSC zeigten nach 4-tägiger Kultivierung in 5% O₂ eine deutliche Steigerung der Genexpression.

Ob die Kultivierung von USSC in 5% O₂ zu einem ähnlichen Genexpressionsmuster wie in den CB-H Linien führte, wurde untersucht.

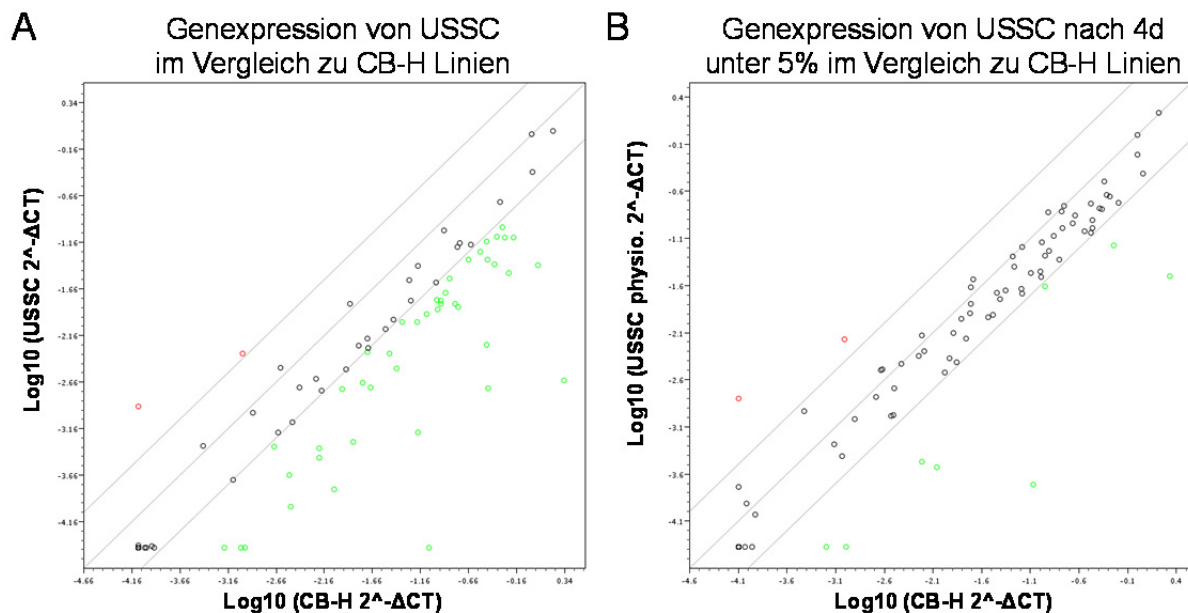


Abb.34: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpressionsmuster. Genexpression von USSC im Vergleich zu CB-H Linien (jeweils n=2) (A). Abbildung B zeigt die Genexpression von USSC nach vier Tagen in 5% O₂ im Vergleich zu CB-H Linien (jeweils n=2). Die Ergebnisse der Auswertung wurden in Streudiagrammen dargestellt. Der Schwellwert wurde auf 4 festgelegt. Von der jeweils ersten Proben-Gruppe stärker exprimierte Gene wurden rot, geringer exprimierte grün dargestellt.

Beim Vergleich von USSC 2 und USSC 3 zu CB-H 2 und CB-H 3 zeigten die CB-H Linien für 44 Gene eine mehr als 4-fach höhere Genexpression (Abb.34 A). USSC exprimierten **CCND2** (4,5-fach) und **sFRP4** (14,7-fach) stärker.

CB-H Linien exprimierten im Vergleich zu USSC nach **vierstündiger Kultivierung unter 5% O₂** noch acht Gene mehr als 4-fach höher. USSC übertrafen CB-H Linien in keiner der getesteten Genexpressionen mehr um mehr als das 4-fache (vergleiche Abb.VII Anhang)

Beim Vergleich der USSC nach **viertägiger Kultivierung in 5% O₂** mit CB-H Linien zeigten sich zehn Gene mehr als 4-fach differentiell exprimiert, acht davon weiterhin stärker in CB-H Linien und zwei in USSC (Abb.34 B). Zu den Genen, die in CB-H Linien nach wie vor stärker exprimiert wurden, zählten die *WNT*-Gene **WNT5B** und **WNT7B**, die extrazellulären Inhibitoren **DKK1** und **WIF1** sowie der intrazelluläre Inhibitor **NKD1**. USSC zeigten erneut eine stärker Expression der Gene **CCND2** (6,9-fach) und **sFRP4** (19,4-fach) als CB-H Linien.

Das Genexpressionsmuster der USSC näherte sich nach Kultivierung unter 5% O₂ dem der CB-H Linien an. Die erhöhte Expression einzelner Gene wie sFRP4 und CCND2 in USSC und DKK1 und WIF1 in CB-H Linien blieb bestehen oder stellte sich spätestens nach 4 Tagen erneut ein.

3.2.6 Ingenuity Pathways Analysis

Ingenuity Pathways Analysis (IPA) ist eine webbasierte Softwareanwendung¹⁸³. Sie greift auf die Ingenuity-interne Datenbank (*Ingenuity Knowledge Base*) zu, in der publizierte biologische, chemische und funktionelle Interaktionen zwischen Genen gespeichert sind. Mit Hilfe der funktionellen Analyse (*Functional analysis*) können diese publizierten Informationen über direkte Interaktionen und indirekte Zusammenhänge auf eigene Daten angewendet werden. Die funktionelle Analyse nutzt die Informationen aus der *Ingenuity Knowledge Base* zur Einteilung von ausgewählten Daten in funktionelle Kategorien. Über die Funktion *Functional analysis* wurden die 84 Gene des *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler* PCR Array ausgewertet. Es wurden biologische Funktionen ermittelt, bei denen diese Gene eine wesentliche Rolle spielen. Tabelle 7 zeigt eine Auswahl der Ergebnisse.

Tab.7: Auf *Functional analysis* beruhende Einteilung der 84 Gene des *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler* PCR Array. Kategorien und Funktionen in denen die ausgewählten Gene von Bedeutung sind (p-value < 0,002).

© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Category	Function Annotation	p-value	Molecules
"Chondro"			
Embryonic Development	chondrogenesis of embryonic cell lines	8.72E-05	GSK3B, WNT3A
Cellular Development	chondrogenesis of fibroblast cell lines	4.37E-05	GSK3B, WNT3A
Cellular Development	chondrogenesis of embryonic cell lines	8.72E-05	GSK3B, WNT3A
Connective Tissue Development and Function	zone transition of chondrocytes	1.46E-05	WNT5A, WNT5B
Developmental Disorder	dedifferentiation of chondrocytes	3.03E-04	JUN, WNT7A
Developmental Disorder	dedifferentiation of cells	4.19E-04	CTNNB1, JUN, WNT7A
"Osteo"			
Cellular Development	developmental process of osteoblasts	4.82E-18	APC, CTNNB1, DKK1, FOSL1, FRZB, MYC, PITX2, SFRP1, SFRP4, WIF1, WNT1, WNT11, WNT3A, WNT5A, WNT7B
Cellular Development	differentiation of osteoblasts	1.08E-15	APC, CTNNB1, DKK1, FOSL1, FRZB, MYC, PITX2, SFRP1, SFRP4, WIF1, WNT3A, WNT5A, WNT7B
Cellular Development	differentiation of osteocytes	1.42E-13	APC, CTNNB1, DKK1, FOSL1, FRZB, JUN, MYC, PITX2, SFRP1, SFRP4, WIF1, WNT3A, WNT5A, WNT7B
Cellular Development	differentiation of osteoclasts	1.23E-03	APC, CTNNB1, FOSL1, JUN
Cellular Development	osteogenesis of osteoblasts	8.72E-05	WNT1, WNT3A
Cellular Growth and Proliferation	formation of osteoblasts	6.13E-09	DKK1, FRZB, SFRP1, SFRP4, WIF1
Cell Death	cell death of osteoblasts	1.01E-06	DKK1, FRZB, SFRP1, SFRP4, WIF1
Genetic Disorder	osteoarthritis	1.88E-05	FRZB, LRP5, WNT11, WNT3A, WNT5B, WNT7B, WNT9B
"Bone"			
Tissue Development	formation of bone	1.05E-03	CTNNBIP1, DKK1, FZD1, KREMEN1
Connective Tissue Development and Function	formation of bone	1.05E-03	CTNNBIP1, DKK1, FZD1, KREMEN1

Die Ergebnisse der funktionellen Analyse der 84 Gene des *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler* PCR Array wiesen auf eine bedeutende Rolle der getesteten, teilweise stark unterschiedlich exprimierten Gene in der Embryonalentwicklung, der Differenzierung von Zellen und der Ausbildung von Geweben hin. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Entwicklung von Knorpel- und Knochenzellen. Dies wurde zum Anlass genommen, Expression von humanen *WNT*- und *Wnt*-Signalweges-Genen und von mit chondrogener und osteogener Differenzierung assoziierten Genen mittels *real-time* PCR in USSC und CB-MSK zu untersuchen. KM-MSK dienten bei der osteogenen Differenzierung als Positivkontrolle.

3.2.7 Genexpression vor und nach der Differenzierung

USSC 2 und CB-MSC 2 wurden erfolgreich chondrogen differenziert (vergleiche Abb.16).

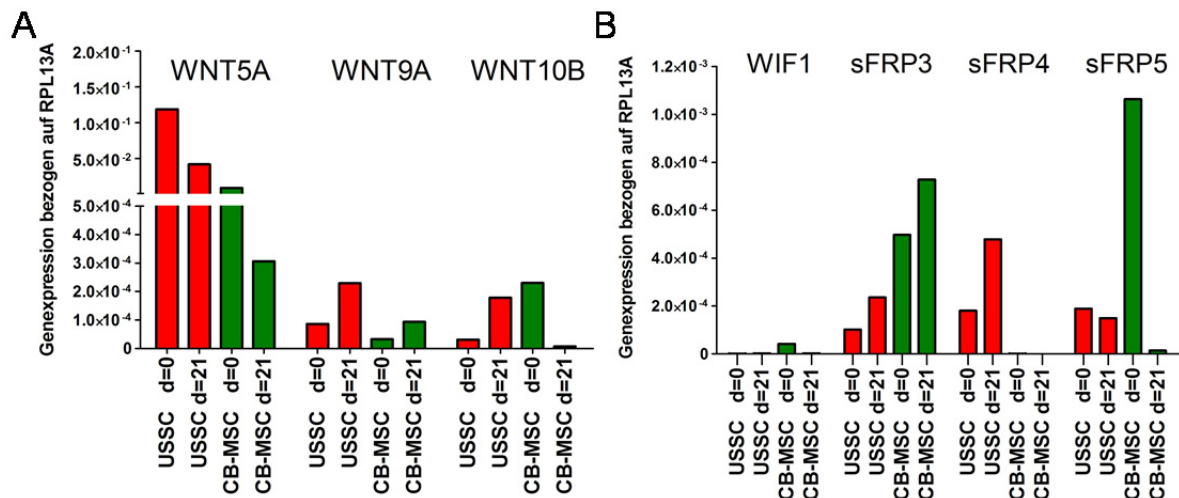


Abb.35: Quantitative Expression von WNT-Genen und Inhibitoren vor und nach chondrogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression verschiedener WNT-Gene (A) und den extrazellulären Inhibitoren (B) in undifferenzierten und 21 Tage chondrogen differenzierten USSC 2 und CB-MSC 2. Die Differenzierung erfolgte im dreidimensionalen Zellverband. Die Genexpression ist in Relation zu RPL13A dargestellt.

Die Expression der WNT-Gene *WNT5A*, *WNT9A* und *WNT10B* wurde vor und nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung im dreidimensionalen Zellverband *in vitro* von USSC 2 und CB-MSC 2 bestimmt (Abb.35 A). **WNT5A** wurde an Tag 0 stark von beiden Zelllinien exprimiert und die Expression nahm nach chondrogener Differenzierung ab. Beide Zelllinien zeigten eine Zunahme der **WNT9A**-Genexpression um mehr als das Doppelte, während die Expression von **WNT10B** nur in USSC zunahm.

Die Expression der extrazellulären Wnt-Inhibitoren *WIF1* und *sFRP3-5* wurde ebenfalls untersucht (Abb.35 B). Eine geringe Expression von **WIF1** wurde in undifferenzierten CB-MSC detektiert. Die Genexpression von **sFRP3** war in beiden Zelllinien an Tag 0 vorhanden und nahm nach chondrogener Differenzierung zu. Das Gen **sFRP4** wurde nur in USSC detektiert und stieg mit der Differenzierung um das 2,6-fache an. USSC exprimierten **sFRP5** an Tag 0 deutlich schwächer als CB-MSC und ihre Expression von *sFRP5* vor und nach der Differenzierung war wenig unterschiedlich. In CB-MSC, die den Inhibitor *sFRP5* undifferenziert stark exprimierten, wurde nach der Differenzierung eine geringere Genexpression detektiert.

Die Expression einzelner WNT-Gene wurde durch die chondrogene Differenzierung beeinflusst. Die Expression der Inhibitoren *WIF1* und *sFRP5* zeigte keine einheitliche Regulation, während die Expression von *sFRP3* und *sFRP4* an Tag 21 in USSC 2 und CB-MSC 2 höher war.

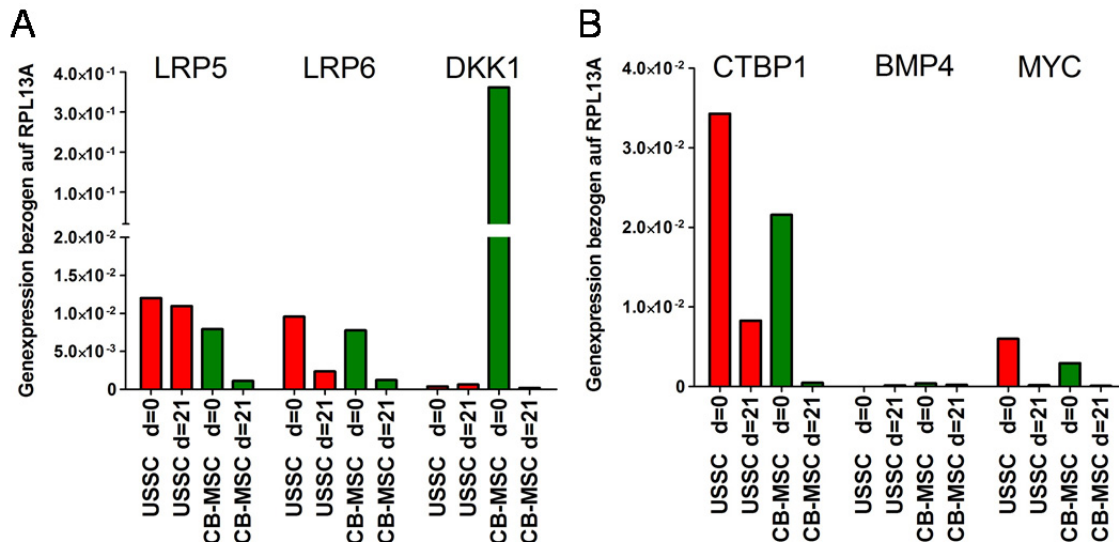


Abb.36: Quantitative Genexpression vor und nach chondrogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression der Ko-Rezeptoren *LRP5/6* und des extrazellulären Inhibitors *DKK1* (A) sowie des intrazellulären Inhibitors *CTBP1*, *BMP4* und *MYC* (B) in undifferenzierten und 21 Tage chondrogen differenzierten USSC 2 und CB-MSC 2. Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

Die Expression der Ko-Rezeptoren *LRP5* und *LRP6* sowie des extrazellulären Inhibitors *DKK1* wurde vor und nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung *in vitro* von USSC 2 und CB-MSC 2 bestimmt (Abb.36 A). Die Ko-Rezeptoren *LRP5* und *LRP6* wurden nativ von beiden Zellpopulationen exprimiert und ihre Expression war nach chondrogener Differenzierung geringer. *DKK1* ist Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges und inhibiert diesen durch Bindung an die Ko-Rezeptoren. Es wurde an Tag 0 stark von CB-MSC exprimiert.

Die Expression von *CTBP1*, *bone morphogenetic protein 4* (*BMP4*) und des Zielgenes *MYC* wurde in der chondrogenen Differenzierung untersucht (Abb.36 B). *CTBP1* agiert als Ko-Repressor und verhindert das Ablesen der Zielgene des kanonischen Signalweges und die *Bone morphogenetic protein*-induzierte Transkription. Die Expression von *CTBP1* war nativ in USSC 2 und CB-MSC 2 vorhanden und verringerte sich mit chondrogener Differenzierung. *BMP4* wurde geringfügig bis nicht nachweisbar exprimiert. Die Expression des Zielgenes *MYC* war an Tag 0 gering und nach der Differenzierung nicht mehr zu detektieren.

Die Expression der Ko-Rezeptoren und des Inhibitors *DKK1*, welcher durch Bindung an diese Ko-Rezeptoren die Wnt-Signalweiterleitung inhibieren kann, war an Tag 21 in beiden Zelllinien geringer. Die Expression der Zielgene *CTBP1* und *MYC* verringerte sich ebenfalls.

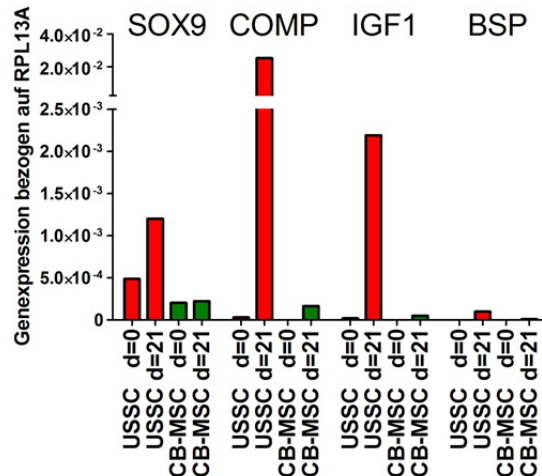


Abb.37: Quantitative Genexpression von Markergenen vor und nach chondrogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression der chondro-assoziierten Genen *SOX9*, *COMP* und *IGF1* sowie des früh in der osteogenen Differenzierung exprimierten Genes *Bone Sialoprotein* (*BSP*). Die Expression wurde in undifferenzierten und 21 Tage chondrogen differenzierten USSC (n=1) und CB-MSC (n=1) untersucht. Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

Aktuelle Arbeiten unserer Gruppe geben Hinweise darauf, dass zusätzlich zu *SOX9* als Markergen die Expression von *COMP* und *IGF1* als Zeichen einer positiven, chondrogenen Differenzierung herangezogen werden kann ¹⁷⁵. USSC 2 und CB-MSC 2 wurden vor und nach chondrogener Differenzierung auf die Expression dieser Gene getestet. *Bone Sialoprotein* (*BSP*) ist Bestandteil der Knochenmatrix und ein früher Marker der osteogenen Differenzierung. Die *BSP*-Expression wurde ebenfalls untersucht (Abb.37).

USSC 2 und CB-MSC 2 exprimierten nativ ***SOX9*** und USSC 2 zeigte nach chondrogener Differenzierung eine mehr als doppelt so starke Expression. Die *SOX9* Expression in CB-MSC blieb nahezu unverändert. 21 Tage chondrogen differenzierte USSC 2 zeigte eine starke ***COMP*** und ***IGF1*** und eine schwache *BSP* Expression, obgleich diese Gene in nativen USSC mittels *real-time* PCR nur sehr gering beziehungsweise nicht nachweisbar waren. CB-MSC wiesen an Tag 21 eine schwache *COMP* und kaum detektierbare *IGF1* und ***BSP*** Expressionen auf.

USSC 2 exprimierte Markergene der chondrogenen Differenzierung an Tag 21 stark, CB-MSC 2 geringer.

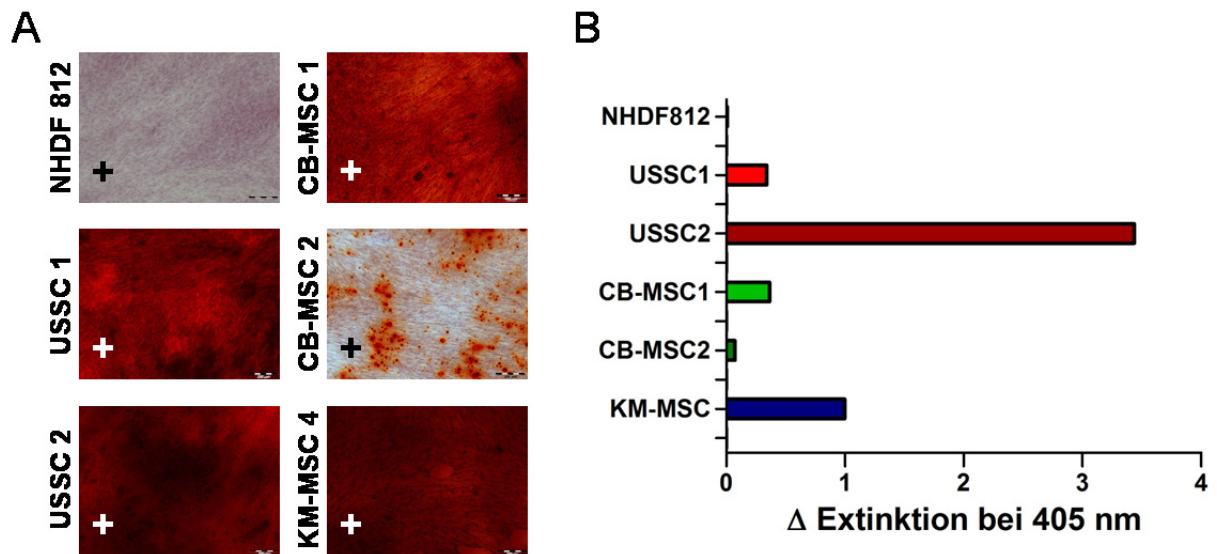


Abb.38: Quantifizierung der Alizarin-Färbung. USSC (n=2), CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1) wurden nach osteogener Differenzierung Alizarin-Rot gefärbt (A) und der gebundene Alizarin-Farbstoff quantifiziert. NHDF812 dienten als biologische Negativkontrolle. Von der gemessenen Extinktion wurde die Extinktion der entsprechenden Negativkontrolle bei 405 nm subtrahiert (B).

Für die Analyse der osteogenen Differenzierung wurde die Expression von humanen *WNT*-Genen und von mit osteogener Differenzierung assoziierten Genen in 2 USSC (USSC 1 und USSC 2) und 2 CB-MSC (CB-MSC 1 und CB-MSC 2) im Vergleich zu KM-MSC 4 untersucht.

Die osteogen differenzierten Zellen wurden mit Alizarin-Rot gefärbt (Abb.38 A) und die Färbung quantifiziert (Abb.38 B), um die Genexpression in Relation zum Differenzierungsgrad zu betrachten. Die gefärbten und quantifizierten Proben der USSC 1 und CB-MSC 1 zeigten Δ Extinktionswerte von 0,34 beziehungsweise 0,36 und damit etwa ein Drittel des Wertes den die Positivkontrolle KM-MSC 4 (0,99) erreichte. Die Δ Extinktion der USSC 2 Probe war mit einem Wert von 3,44 etwa 10-mal so stark wie die der USSC 1 und CB-MSC 1. Die Probe der CB-MSC 2 zeigte eine sehr geringe Δ Extinktion von 0,01.

USSC 1 und CB-MSC 1 zeigten geringe, USSC 2 starke und CB-MSC 2 kaum osteogene Differenzierung im Vergleich zu KM-MSC 4.

Die Expression der *WNT*-Gene *WNT5A* und *WNT10B* sowie der Inhibitoren *WIF1* und *sFRP3-5* wurde vor und nach 14-tägiger osteogener Differenzierung *in vitro* von USSC 1, USSC 2, CB-MSC 1, CB-MSC 2 und KM-MSC 4 bestimmt (Abb.39 und 40).

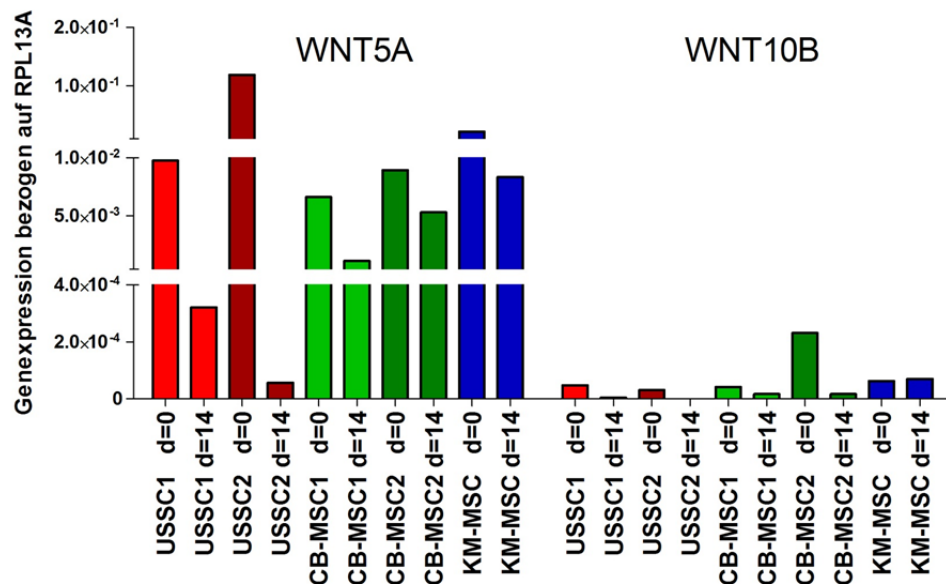


Abb.39: Quantitative Expression von *WNT*-Genen vor und nach osteogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression der *WNT*-Gene *WNT5A* und *WNT10B* in undifferenzierten und 14 Tage *in vitro* osteogen differenzierten USSC, CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1). Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

WNT5A wurde vor der Differenzierung stark und im Anschluss an die Differenzierung im Verhältnis in allen Populationen geringer exprimiert (Abb.39). Es gibt eine negative Korrelation zwischen *WNT5A* Genexpressionsabnahme und osteogenem Differenzierungspotential. Die Expression von ***WNT10B*** nahm in beiden USSC und CB-MSC mit der Differenzierung ab.

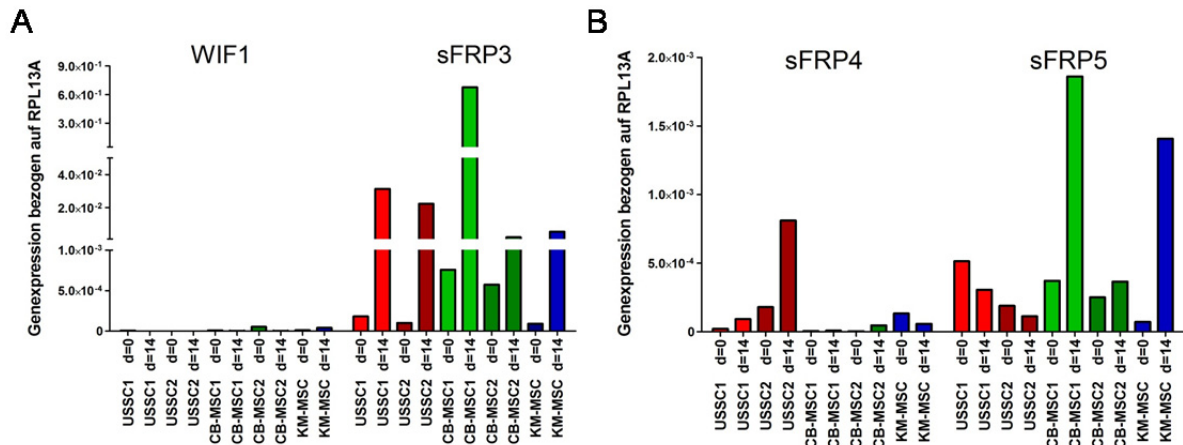


Abb.40: Quantitative Expression von Inhibitoren vor und nach osteogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression der extrazellulären Inhibitoren *WIF1*, *sFRP3* (A), *sFRP4* und *sFRP5* (B) in undifferenzierten und 14 Tage *in vitro* osteogen differenzierten USSC, CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1). Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

Eine geringe Expression von **WIF1** wurde in undifferenzierten CB-MSC und differenzierten KM-MSC detektiert. Die Expression von **sFRP3** war in allen undifferenzierten Populationen vorhanden und nahm mit osteogener Differenzierung wesentlich zu (Abb.40 A). Differenzierte USSC 1 und USSC 2 zeigten eine Steigerung auf mehr als das 170-fache. CB-MSC 1 steigerte die Expression auf das 893-fache.

Das Gen **sFRP4** wurde in USSC, KM-MSC und schwach in CB-MSC 2 detektiert. In USSC stieg die Expression mit der Differenzierung an, in KM-MSC 4 nahm sie ab. Der extrazelluläre Inhibitor **sFRP5** wurde in allen undifferenzierten Zellpopulationen exprimiert. Während in USSC eine Abnahme der Expression nach der Differenzierung gemessen wurde, verstärkte sie sich in CB-MSC und KM-MSC (Abb.40 B).

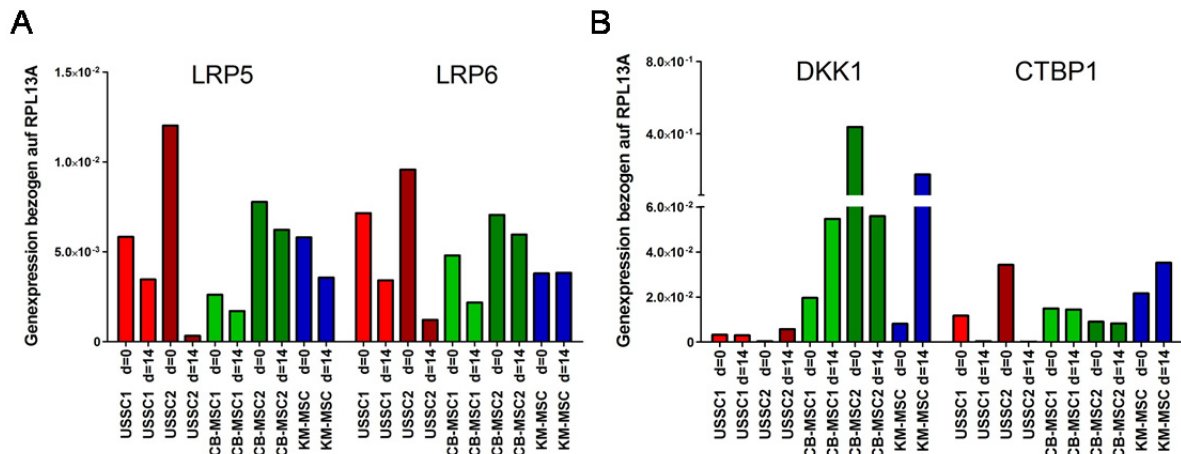


Abb.41: Quantitative Expression vor und nach osteogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression der Ko-Rezeptoren *LRP5/6* (A) und der Inhibitoren *DKK1* und *CTBP1* (B) in undifferenzierten und 14 Tage *in vitro* osteogen differenzierten USSC, CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1). Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

Die Expression der Ko-Rezeptoren *LRP5*, *LRP6* und der Inhibitoren *DKK1* und *CTBP1* wurde vor und nach 14-tägiger osteogener Differenzierung *in vitro* bestimmt (Abb.41). Beide Ko-Rezeptoren *LRP5* und *LRP6* sowie die Inhibitoren *DKK1* und *CTBP1* wurden nativ von allen Populationen exprimiert.

LRP5 und ***LRP6*** wurden in allen Nabelschnurblutpopulationen nach der Differenzierung im Verhältnis zu undifferenzierten Zellen geringer exprimiert (Abb.41 A). Die Expression von *LRP6* in KM-MSC war stabil.

Zelllinien mit hohem osteogenen Differenzierungspotential zeigten an Tag 0 eine geringe ***DKK1*** Expression. Die Expression von *DKK1* näherte sich an Tag 14 innerhalb der einzelnen Zellpopulationen einem Level an. Die relative Genexpression in der Zellpopulation der USSC betrug 4×10^{-3} (+/- 0,001), während CB-MSC eine relative Genexpression von $5,5 \times 10^{-2}$ (+/- 0,001) zeigten. Insgesamt exprimierten USSC *DKK1* geringer als CB-MSC und KM-MSC.

Die Expression von ***CTBP1*** nahm in USSC mit der Differenzierung ab. CB-MSC zeigten keine veränderte *CTBP1*-Genexpression. KM-MSC wiesen einen Anstieg der *CTBP1*-Genexpression auf (Abb.41 B).

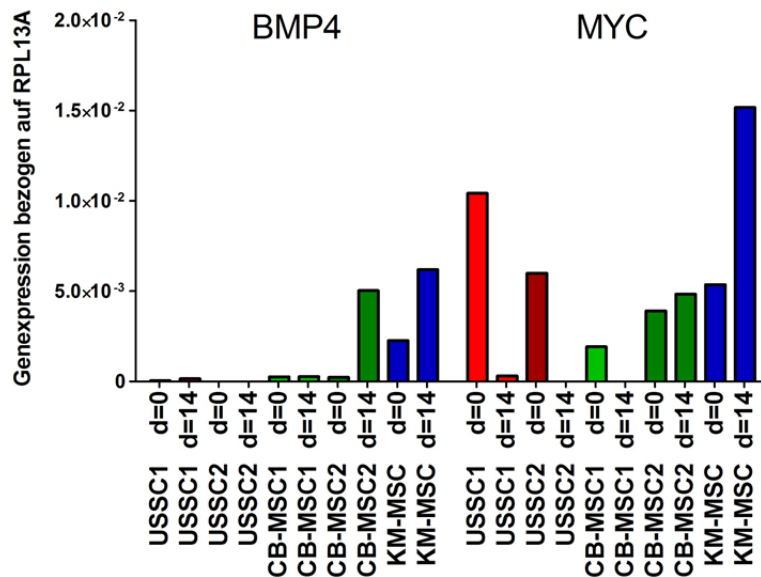


Abb.42: Quantitative Genexpression vor und nach osteogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression von *BMP4* und *MYC* in undifferenzierten und 14 Tage *in vitro* osteogen differenzierten USSC 1, USSC 2, CB-MSC 1 und CB-MSC 2 im Vergleich zu KM-MSC 4. Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

BMP4 wurde in undifferenzierten USSC und CB-MSC geringfügig bis nicht nachweisbar exprimiert (Abb.42). CB-MSC 2 zeigte nach 14 Tagen osteogener Differenzierung einen Anstieg der *BMP4*-Expression. Nativ *BMP4* exprimierende KM-MSC wiesen nach Differenzierung eine um mehr als das doppelte erhöhte Expression auf.

Die Expression des Zielgenes **MYC** war nach Differenzierung in beiden USSC und CB-MSC 1 kaum bis nicht mehr zu detektieren. CB-MSC 2 und KM-MSC 4 wiesen einen Anstieg der *MYC*-Expression im Vergleich von undifferenzierten zu differenzierten Zellen auf.

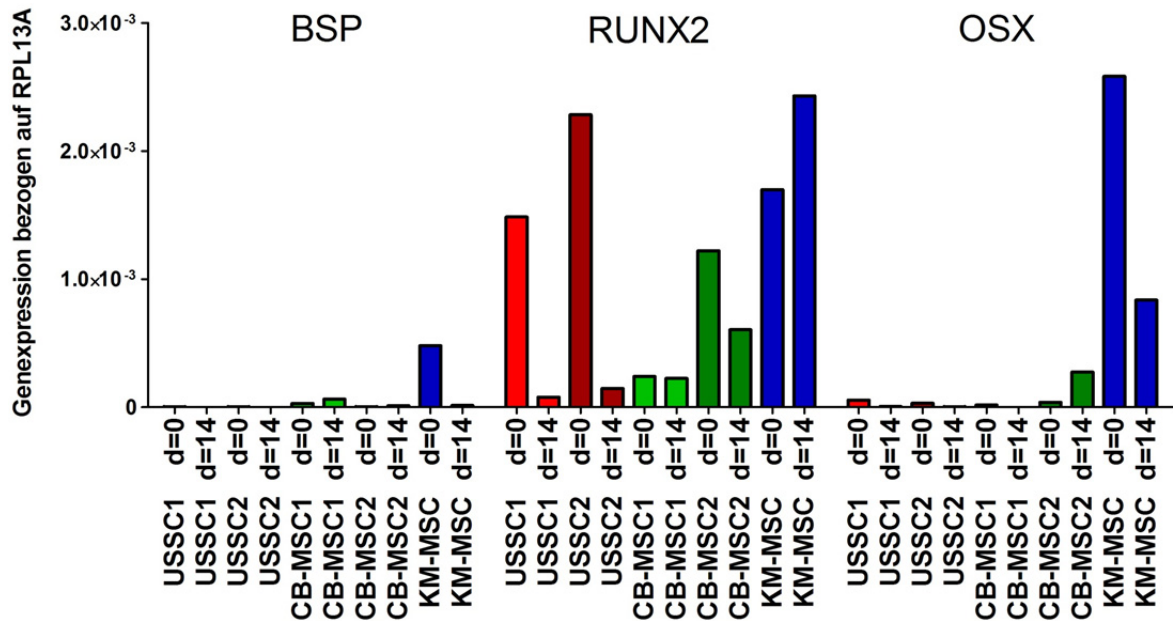


Abb.43: Quantitative Expression von Markergenen vor und nach osteogener Differenzierung. Mit *real-time* PCR ermittelte Daten zur Expression der Markergene *BSP*, *Runx2* und *Osterix* (*OSX*) in undifferenzierten und 14 Tage *in vitro* osteogen differenzierten USSC, CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1). Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

BSP wurde geringfügig erhöht in der differenzierten CB-MSC 1 exprimiert. Die anderen aus Nabelschnurblut generierten Zelllinien wiesen keine *BSP*-Expression auf. KM-MSC regulierten die *BSP*-Expression nach osteogener Differenzierung runter (Abb.43).

Die **RUNX2**-Expression wurde von USSC 1 und USSC 2 stark, von CB-MSC 1 und CB-MSC 2 geringer runterreguliert. KM-MSC 4 zeigten einen Anstieg von *RUNX2* nach 14-tägiger Differenzierung.

Der Osteoblasten-spezifische Transkriptionsfaktor **Osterix (OSX)** wurde von CB-MSC 2 und der KM-MSC 4 an Tag 14 exprimiert.

3.3 Überexpression von Schlüsselgenen

Um mögliche Zusammenhänge zwischen spezifischen Genexpressionsmustern und dem Differenzierungspotential der Zellen aufzuklären, wurden ausgewählte Gene in verschiedenen Populationen überexprimiert. Der verwendete Expressionsvektor pCL6IEGwo (pCL6) kodiert auch die Genesequenz des Grün fluoreszierenden Proteins (Gfp), welche von transduzierten Zellen in Kultur transkribiert und translatiert wird.

Zur Überprüfung der Transduktionseffizienz wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Fluoreszenzeigenschaften von Gfp ermöglichten eine durchflusszytometrische Quantifizierung der Zellen. Die Transduktion wurde mit unverdünntem bis sechsfach verdünntem Virusüberstand durchgeführt und die ermittelte Effizienz betrug zwischen 10% und 99%. Wenn die Transduktionseffizienz einen Grenzwert unterschritt (< 80%) wurden die Zelllinien in der *Core Flow Cytometry Facility* des ITZ nach *Gfp*-Expression sortiert. Alle verwendeten transduzierten Zelllinien wiesen mindestens 80% *Gfp*-positive Zellen auf.

Vor jeder Überexpression wurden die Zielzellen aufgeteilt und ein Teil der Zellen gleicher Passage, die mit gleichen Reagenzien behandelt wurden, wurden nicht transduziert. Sie wurden parallel als Mock-Kontrollzellen weitergeführt.

Untersucht wurden die Auswirkungen der Überexpression der Kandidatengene *WIF1* und *BMP4* auf die Genexpression und das Differenzierungspotential der Zellen. Humanes *WNT3A* wurde in USSC 1 und CB-MSC 1 überexprimiert. Die Arbeiten mit *WNT3A* wurden im Rahmen einer Masterarbeit im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt ¹⁸⁴.

3.3.1 *Wif1* Überexpression

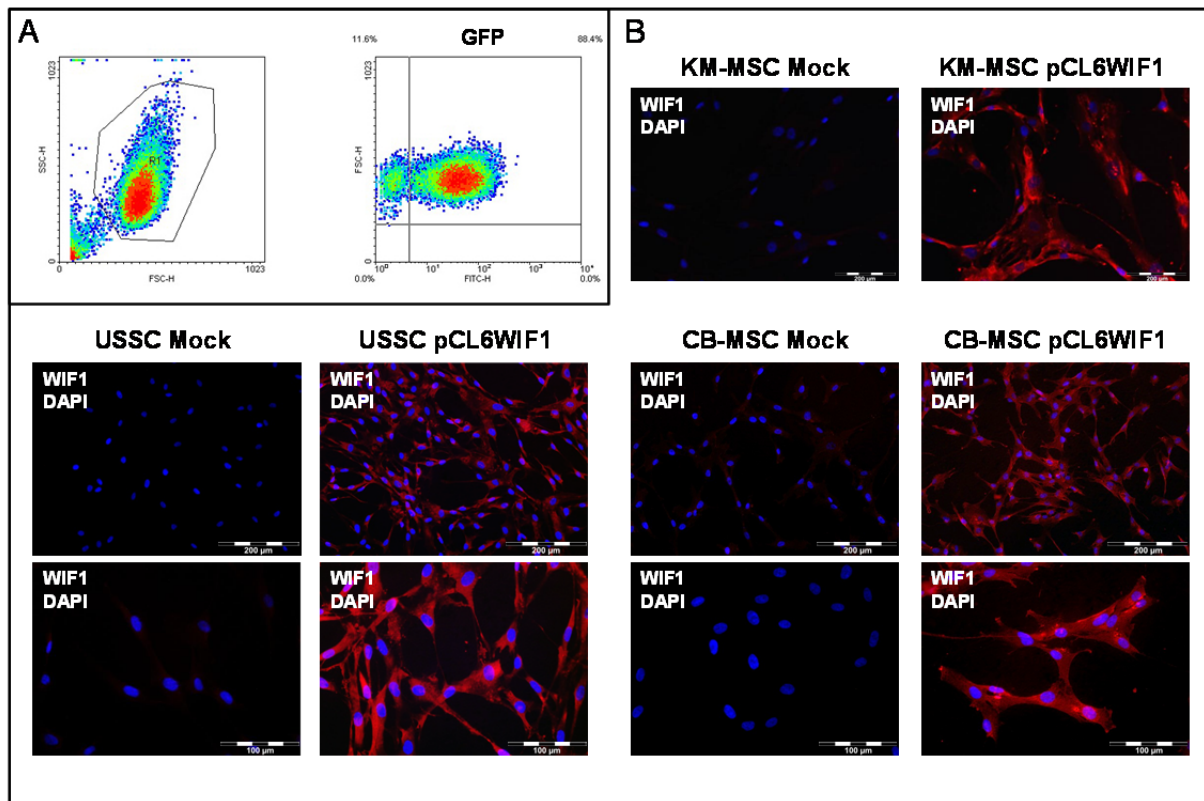


Abb.44: Lentivirale Transduktion von USSC, CB-MSC und KM-MSC mit *WIF1*. Abbildung A zeigt repräsentativ ein Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung pCL6*WIF1*-transduzierter Zelllinien. Die prozentuale Anzahl Gfp-positiver Zellen wurde bestimmt. Abbildung B zeigt immunzytochemische Analysen transduzierter Zellen zum Nachweis des eingebrachten Gens *WIF1* nach Überexpression. Der Maßstab beträgt 50 µm respektive 100 µm. rot: Rhodamin Signal; Bau: DAPI-Färbung der Zellkerne

USSC 1, USSC 2, CB-MSC 1, CB-MSC 2 und KM-MSC 4 wurden mit humanem *WIF1* transduziert und analysiert. Durchflusszytometrische Messungen bestätigten die erfolgreiche Transduktion der Zellen (Abb.44 A). Mit immunzytochemischen Färbungen gegen *WIF1* wurde die Expression des eingebrachten Gens in USSC, CB-MSC und KM-MSC erwiesen. Abbildung 44 zeigt repräsentativ USSC 1, CB-MSC 1 und KM-MSC 4.

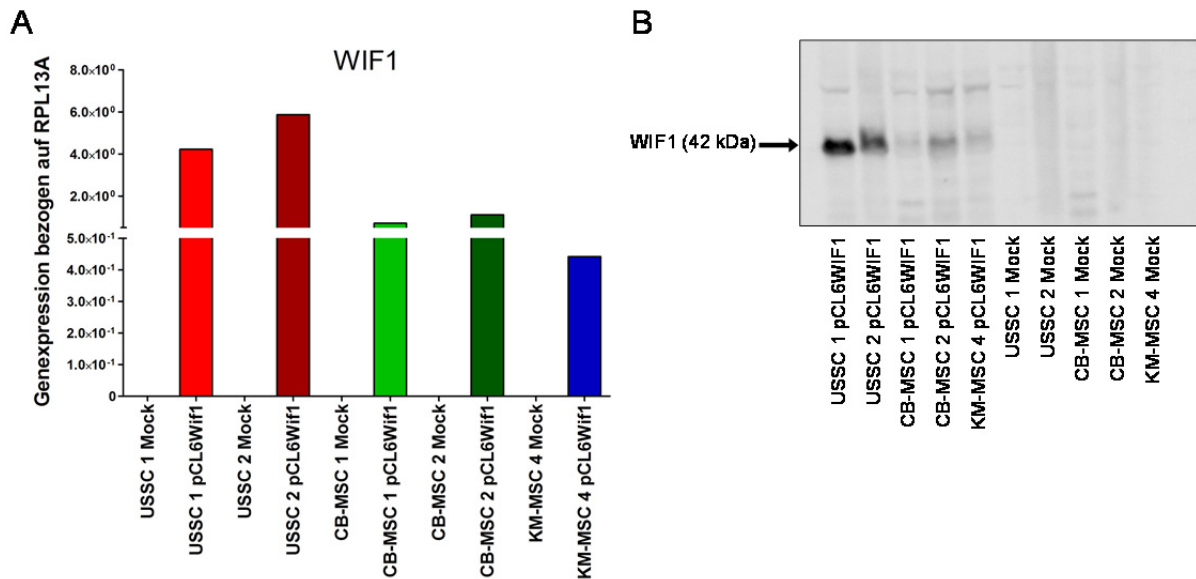


Abb.45: Analyse der mit *WIF1* transduzierten Zellen. Die *WIF1*-Expression wurde mittels *real-time* PCR in transduzierten und Mock-Kontrollzellen der USSC, CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1) untersucht (A). Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt. Für die Western Blot Analyse der *WIF1*-Proteinmenge in Abbildung B wurden je 15 µg Gesamtprotein von Mock-Kontrollzellen und überexprimierenden Zellen verwendet.

Neben dem Nachweis in der Immunzytochemie (vergleiche Abb.44 B) und auf mRNA Ebene (Abb.45 A) wurden ergänzend Western Blot Analysen durchgeführt (Abb.45 B).

Die *real-time* PCR zeigte einen Anstieg der Expression von *WIF1* nach Überexpression in allen Zellpopulationen. USSC zeigten stärkere Expression von *WIF1* als CB-MSC und KM-MSC.

Auch auf Proteinebene war *WIF1* im Western Blot am stärksten in USSC nach Überexpression nachweisbar. CB-MSC 1 pCL6*WIF1* zeigte die geringste *WIF1* Proteinmenge der transduzierten Zelllinien.

3.3.2 BMP4 Überexpression

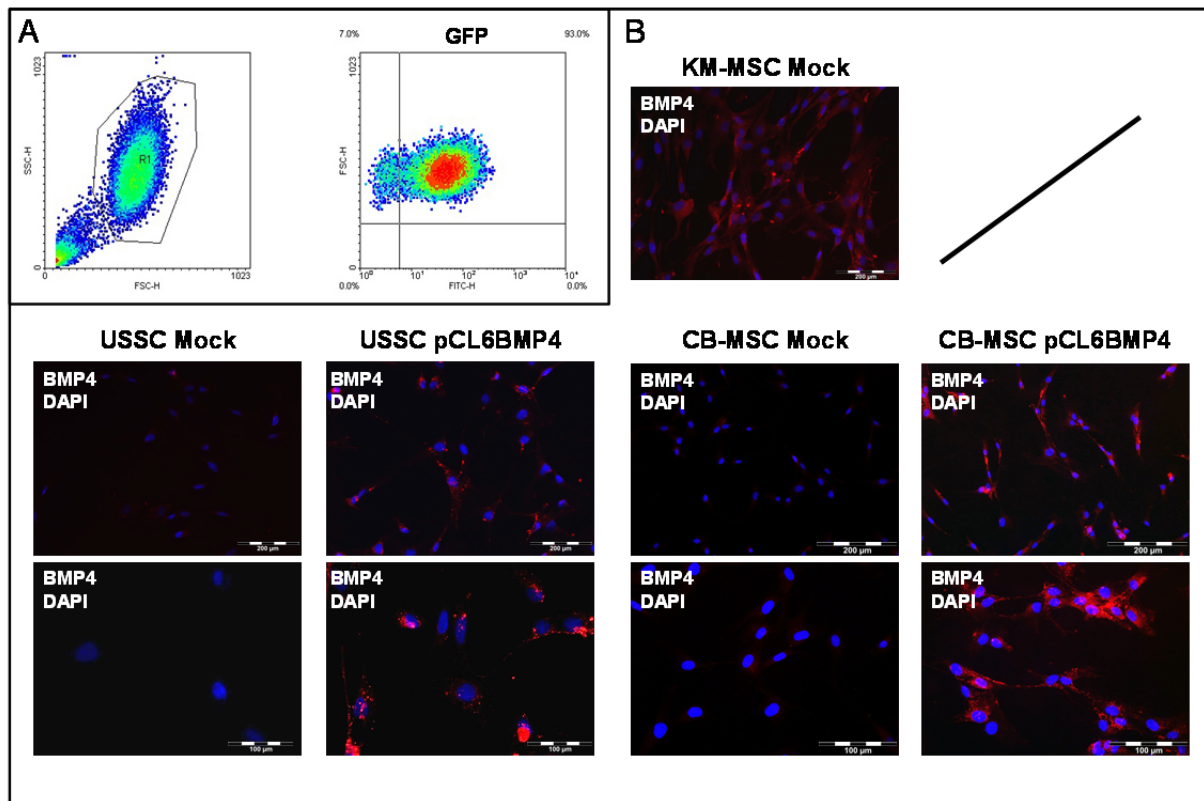


Abb.46: Lentivirale Transduktion von USSC und CB-MSC mit BMP4. Abbildung A zeigt repräsentativ ein Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung pCL6BMP4-transduzierter Zelllinien. Die prozentuale Anzahl Gfp-positiver Zellen wurde bestimmt. Abbildung B zeigt immunzytochemische Analysen transduzierter Zellen zum Nachweis des eingebrachten BMP4 nach Überexpression. Der Maßstab beträgt 50 µm respektive 100 µm. rot: Rhodamine Signal; Bau: DAPI Färbung der Zellkerne

Abbildung 46 A zeigt beispielhaft eine durchflusszytometrische Messung von pCL6BMP4 transduzierten Zellen. Abbildung 46 B zeigt die zelluläre Verteilung von BMP4 in nativen und pCL6BMP4 transduzierten Zellen beispielhaft in einer USSC und CB-MSC.

Die immunzytochemischen Färbungen gegen humanes BMP4 in USSC und CB-MSC zeigte keine Proteine. Überexprimierende Zellen (USSC pCL6BMP4 und CB-MSC pCL6BMP4) wiesen BMP4 im Zytosol auf. KM-MSC exprimieren *BMP4* nativ und zeigen auch in Mock-Kontrollzellen schwach BMP4 Protein in der Zelle (Abb.46 B).

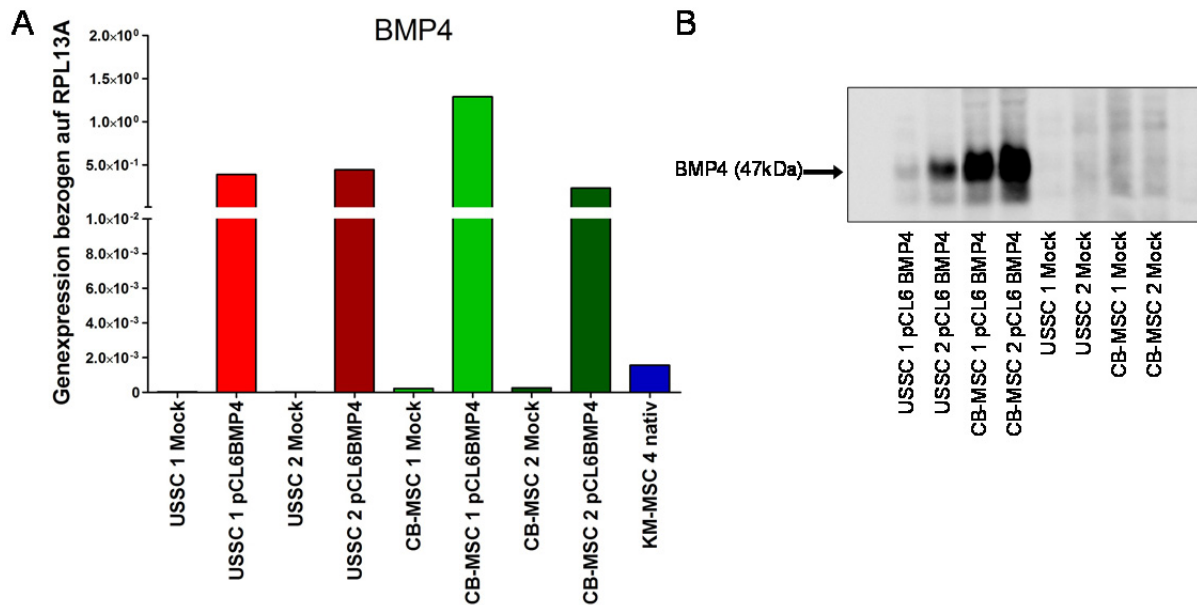


Abb.47: Analyse der mit *BMP4* transduzierten Zellen. Die *BMP4*-Expression wurde mittels *real-time* PCR in transduzierten und Mock-Kontrollzellen der USSC und CB-MSC (n=2) und in nativen KM-MSC untersucht (A). Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt. Für die Western Blot Analyse der *BMP4*-Proteinmenge in Abbildung B wurden je 15 µg Gesamtprotein von Mock-Kontrollzellen und überexprimierenden Zellen verwendet.

Neben dem Nachweis in der Immunzytochemie (vergleiche Abb.46 B) und auf mRNA Ebene (Abb.47 A) wurden ergänzend Western Blot Analysen durchgeführt (Abb.47 B).

Die *real-time* PCR zeigte einen Anstieg der Expression von *BMP4* nach Überexpression in allen Zellpopulationen. CB-MSC 2 zeigte die stärkste Expression von *BMP4*, während USSC 1, USSC 2 und CB-MSC 2 ähnliche relative Genexpressionswerte zeigten. KM-MSC 4 zeigte nativ eine geringe *BMP4* Expression.

Im Western Blot zeigte sich eine höhere *BMP4*-Proteinmenge in CB-MSC als USSC. CB-MSC 2 zeigte die höchste *BMP4*-Proteinmenge.

3.3.3 Funktionelle Charakterisierung der Überexpression

Die Morphologie der Zellen wurde durch das Einbringen der Gene nicht verändert (vergleiche Abb.VIII Anhang). USSC und CB-MSC wurden unter anderem anhand ihrer *DLK1*-Expression unterschieden. Die Transduktion hatten keinen einheitlichen Einfluss auf die *DLK1*-Expression der Zellen (Abb.48).

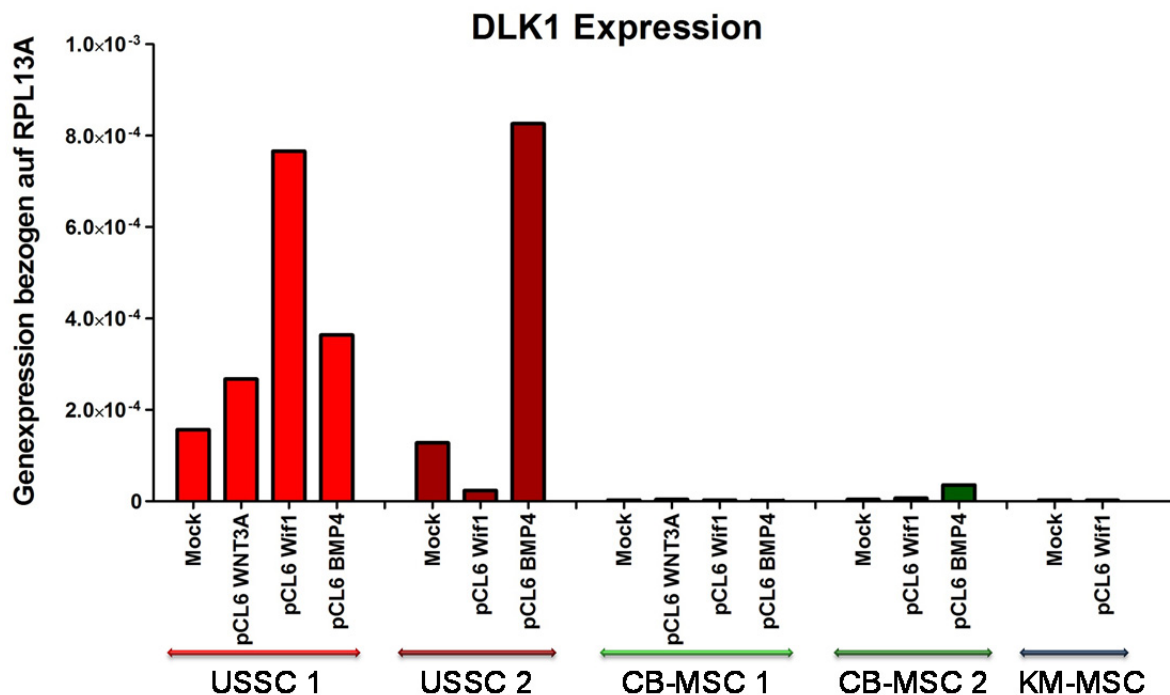


Abb.48: Einfluss der *WIF1*, *BMP4* oder *WNT3A* Überexpression auf die *DLK1*-Expression. Real-time PCR Daten zur *DLK1*-Expression *WIF1*, *BMP4* und *WNT3A* transduzierter Zelllinien. Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* dargestellt.

Ein Anstieg der *DLK1*-Expression, um das 1,7-fache, zeigte sich durch die Überexpression von ***WNT3A*** in USSC 1. CB-MSC 1 zeigte auch nach 1,5-facher Steigerung der *DLK1*-Expression durch *WNT3A* Überexpression noch sehr geringe Expressionswerte.

Mit ***WIF1*** transduzierte USSC zeigten gegensätzliche Veränderungen. USSC 1 wies nach *WIF1* Überexpression eine 4,8-fache Expression von *DLK1* auf, unterdessen USSC 2 pCL6WIF1 nur noch ein Fünftel der *DLK1*-Expression der Mock-Kontrollzellen aufwies. Auf die Expression von *DLK1* in CB-MSC hatte die Überexpression von *WIF1* keinen entscheidenden Einfluss (Abb.48).

Die ***BMP4*** Überexpression führte in drei der vier Zelllinien zu einem Anstieg der *DLK1*-Expression (USSC 1, USSC 2, CB-MSC 2).

3.3.4 Einfluss der Überexpression auf die quantitative Genexpression

Der Einfluss der *WIF1* und *BMP4* Überexpression auf die quantitative Genexpression wurde untersucht. Aus Nabelschnurblut generierte Zelllinien zeigten vor und nach Überexpression von *WIF1* oder *BMP4* eine relative Genexpression von weniger als 6×10^{-4} für *WNT9A*, *WNT10B*, *COMP*, *IGF1*, *Osteocalcin*, *sFRP3*, *sFRP4*, *Osterix* und *BSP* (Daten nicht gezeigt).

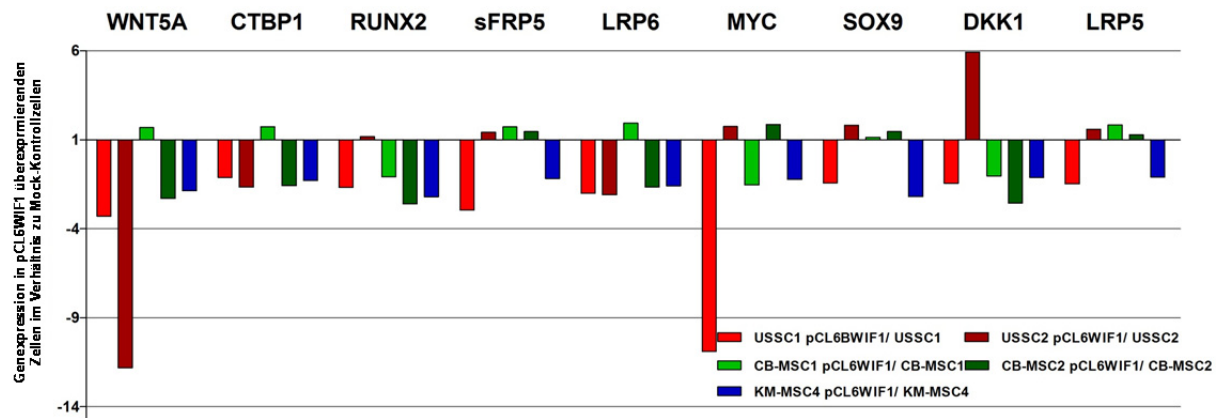


Abb.49: Einfluss der *WIF1* Überexpression auf die Genexpression. Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* ermittelt worden. In der Abbildung sind *WIF1* überexprimierende Zellen im Verhältnis zu Mock-Kontrollzellen dargestellt.

USSC 1 zeigt nach *WIF1* Überexpression eine geringere Expression der Gene *WNT5A*, *CTBP1*, *RUNX2*, *sFRP5*, *LRP6*, *MYC*, *SOX9*, *DKK1* und *LRP5* im Vergleich zu den Mock-Kontrollzellen. USSC 2 zeigte durch die *WIF1* Überexpression eine mehr als 10-fach geringere *WNT5A* Expression. Das Gene *DKK1* wurden in USSC 2 pCL6WIF1 höher exprimiert im Vergleich zu den Mock-Kontrollzellen.

CB-MSC 1 pCL6WIF1 zeigte einen höheren Expressionslevel für *WNT5A*, die Ko-Rezeptoren *LRP5* und *LRP6*, den intrazellulären Repressor *CTBP1* und das Zielgen des Wnt-Signalweges *MYC* im Vergleich zu den Mock-Kontrollzellen. CB-MSC 2 zeigte nach *WIF1* Überexpression geringere Expressionslevel von *WNT5A*, *LRP6*, *CTBP1* und *DKK1*, während die Expression von *sFRP5*, *MYC* und *LRP5* leicht anstieg.

Die Expression des, für osteogene Differenzierung essentiellen Transkriptionsfaktor *RUNX2* wurden geringfügig weniger nach *WIF1* Überexpression in CB-MSC 1 und CB-MSC 2 detektiert, während die *SOX9*-Expression stabil blieb (Abb.49).

KM-MSC 4 zeigte für die neun dargestellten Gene nach *WIF1* Überexpression noch 45-91% der Genexpression im Vergleich zu den Mock-Kontrollzellen. KM-MSC 4 zeigte zudem einen leichten Anstieg der *BMP4* und einen Rückgang der *IGF1*, *Osterix* und *BSP* Genexpression nach *WIF1* Überexpression (vergleiche Abb.IX Anhang).

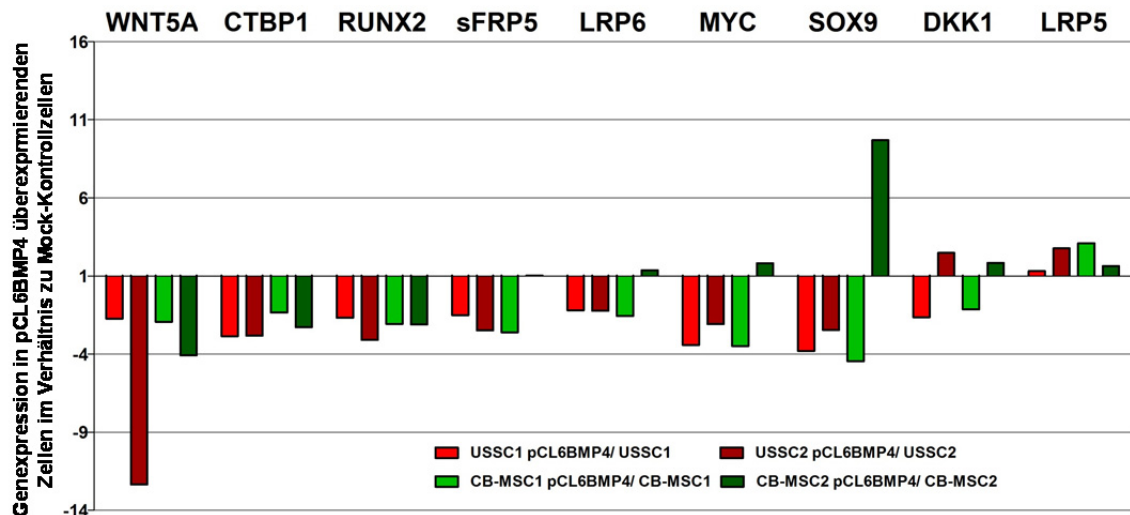


Abb.50: Einfluss der *BMP4* Überexpression auf die Genexpression. Die Genexpression ist in Relation zu *RPL13A* ermittelt worden. In der Abbildung ist die relative Genexpression von pCL6*BMP4* überexprimierenden Zellen im Verhältnis zur den jeweiligen Mock-Kontrollzellen dargestellt.

In Zellpopulationen aus dem Nabelschnurblut mit *BMP4* Überexpression wurde *WNT5A*, *CTBP1* und *RUNX2* geringer exprimiert als in Mock-Kontrollzellen. Für die Gene *sFRP5*, *LRP6*, *MYC* und *SOX9* zeigte sich eine Abnahme der Expression nach *BMP4* Überexpression in USSC 1, USSC 2 und CB-MSC 1. CB-MSC 2 hielt die Genexpression dieser Gene stabil beziehungsweise erhöhte sie sogar, wie beispielsweise für *SOX9* auf das 10-fache. Die *DKK1* Expression wurde in den Zellpopulationen durch die Überexpression unterschiedlich beeinflusst. Die Expression von *LRP5* stieg in allen getesteten Zelllinien leicht an (Abb.50).

USSC und KM-MSC 4 regulierten die Genexpression durch *WIF1* Überexpression überwiegend runter, mit Ausnahme von *DKK1* in USSC 2 pCL6*WIF1* und *BMP4* in KM-MSC 4 pCL6*WIF1*. CB-MSC wiesen insgesamt geringfügigere Genexpressionsveränderungen durch *WIF1* Überexpression auf als USSC und KM-MSC. Die *BMP4* Überexpression führte überwiegend zu einer Abnahme der Genexpression mit Ausnahme von *SOX9* in CB-MSC 2.

Humanes *WNT3A* wurde in USSC 1 und CB-MSC 1 überexprimiert und die Effekte der Überexpressionen auf die Genexpression in undifferenzierten Zellen analysiert. Diese Versuche wurden im Rahmen einer Masterarbeit im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Mit Hilfe von *real-time* PCR wurde die Expression der zwölf Gene *ACAN*, *BMP4*, *BSP*, *COL10A1*, *COMP*, *IGF1*, *LRP5*, *LRP6*, *OC*, *OSX*, *SOX9* und *WIF1* bestimmt.

SOX9 und *ACAN* wurden nach Überexpression schwächer exprimiert. Der Wnt-Inhibitor *WIF1* sowie das strukturenbende Glykoprotein der extrazellulären Matrix *COMP* (*cartilage oligomeric protein*) und *BMP4* wurden nach Überexpression stärker exprimiert. Durch das Einbringen von *WNT3A* wurde *LRP5* geringfügig weniger und *LRP6* geringfügig mehr von beiden Zelllinien exprimiert. *BSP*, *OC* und *IGF1* Expression war unverändert durch die Überexpression kaum detektierbar. Osterix wurde geringfügig höher exprimiert nach *WNT3A* Überexpression. CB-MSC pCL6*WNT3A* wies zudem einen geringen Anstieg der *COL10A1* Expression auf¹⁸⁴.

3.3.5 Einfluss der Überexpression auf das Differenzierungspotential

Um den Einfluss der *WIF1* und *BMP4* Überexpression auf das adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungspotential der Zellen zu testen, wurden Mock-Kontrollzellen (ein Teil der Zellen gleicher Passage die mit gleichen Reagenzien behandelt, aber nicht transduziert wurden) und mit pCL6*WIF1* und pCL6*BMP4* transduzierte Zellen differenziert. Das Potential wurde durch gewebetypische Färbungen überprüft (siehe 2.2.2).

3.3.5.1 Adipogene Differenzierung

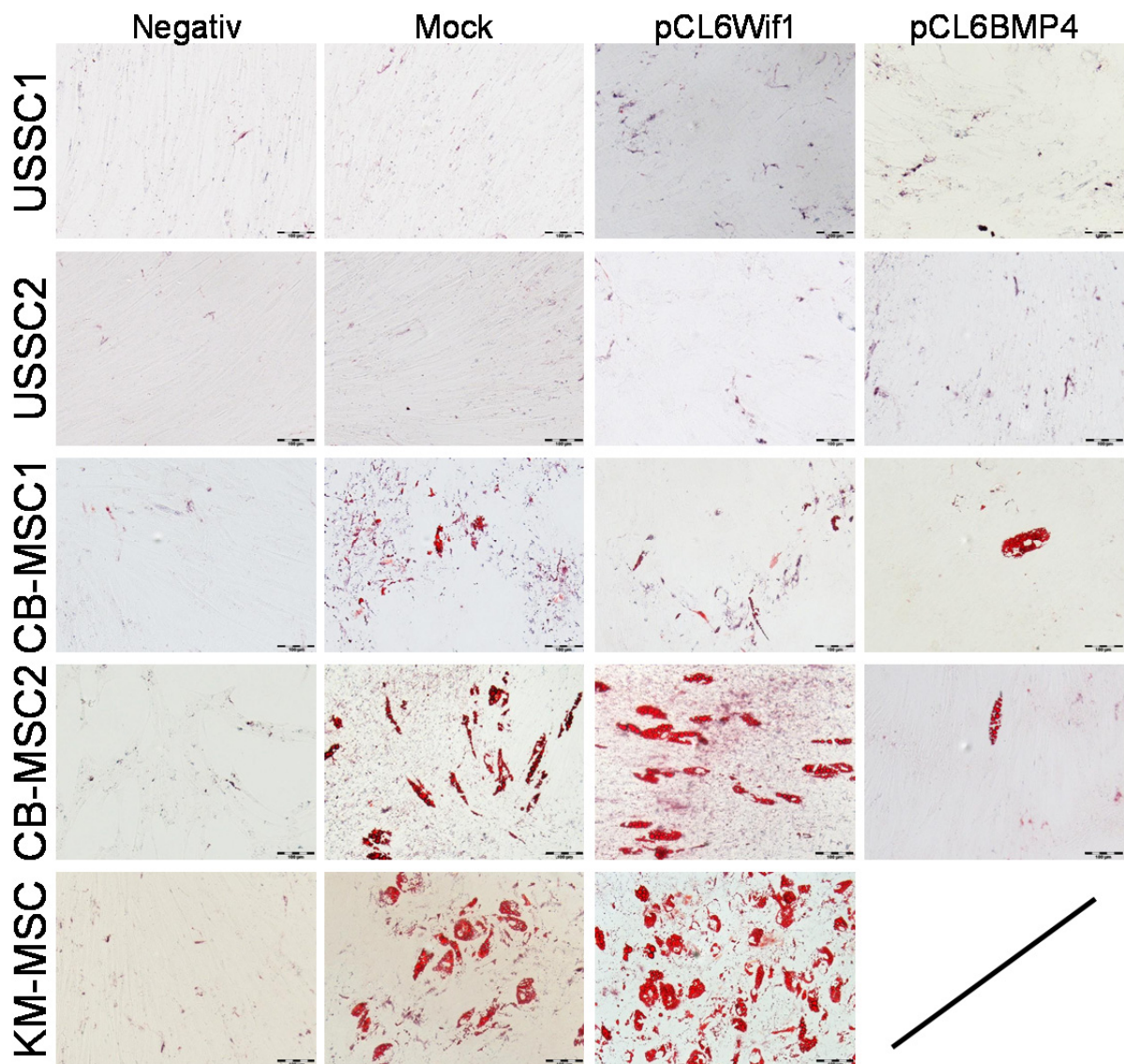


Abb.51: Einfluss der Überexpressionen auf das adipogene Differenzierungspotential. Mock-Kontrollzellen, USSC/ CB-MSC/ KM-MSC pCL6WIF1 und USSC/ CB-MSC pCL6BMP4 adipogen differenziert. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Öl-Rot gefärbten Zellen nach 21-tägiger adipogener Differenzierung und nicht induziert (Negativ). Der Maßstab beträgt 100 µm.

USSC zeigten nach adipogener Differenzierung und Öl-Rot Färbung keine gefärbten Areale. CB-MSC und KM-MSC bildeten Lipidvakuolen. Die Menge und Größe an Lipidvakuolen variierte zwischen Mock-Kontrollzellen, *WIF1* und *BMP4* überexprimierenden Zellen innerhalb der CB-MSC. Nach Überexpression von WIF1 bildeten mehr Zellen der KM-MSC Lipidvakuolen (Abb.51).

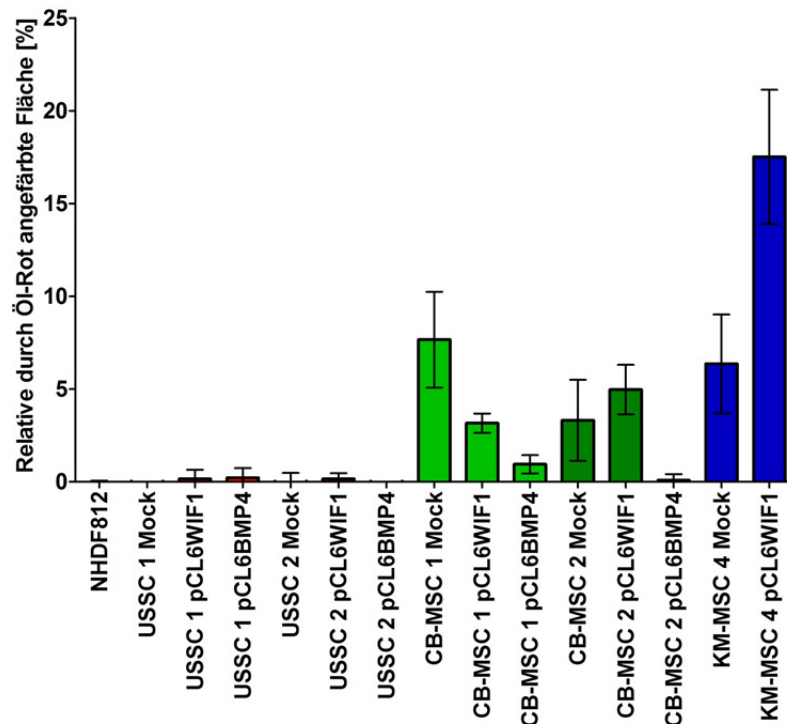


Abb.52: Quantifizierung der Öl-Rot Färbung. Mock-Kontrollzellen und überexprimierende Zellen wurden nach adipogener Differenzierung Öl-Rot gefärbt und die lichtmikroskopischen Fotos der gefärbten Zellen mit Hilfe der *ImageJ* Software analysiert. Die farbige Fläche wurde prozentual zur Gesamtfläche quantifiziert und Werte der jeweiligen Negativkontrollen subtrahiert. NHDF812 dienten als biologische Negativkontrolle.

USSC 1 und USSC 2 Mock-Kontrollzellen zeigten kein adipogenes Differenzierungspotential. Auch die Überexpression von *WIF1* oder *BMP4* führte zu keiner Bildung von Lipiden in USSC.

CB-MSC 1 und CB-MSC 2 Mock-Kontrollzellen zeigten die für die erfolgreiche adipogene Differenzierung typische Bildung von Lipidvakuolen. Mit *WIF1* transduzierte CB-MSC und Mock-Kontrollzellen wiesen ein starkes Differenzierungspotential auf. Die Überexpression von *BMP4* hatte einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von Lipiden.

Die Zellen der KM-MSC 4 bildeten nach 21 Tagen adipogener Differenzierung mit Öl-Rot anfärbbare Lipide in Vakuolen. Die Überexpression von *WIF1* in KM-MSC 4 erhöhte ihr adipogenes Differenzierungspotential deutlich (Abb.52).

3.3.5.2 Osteogene Differenzierung

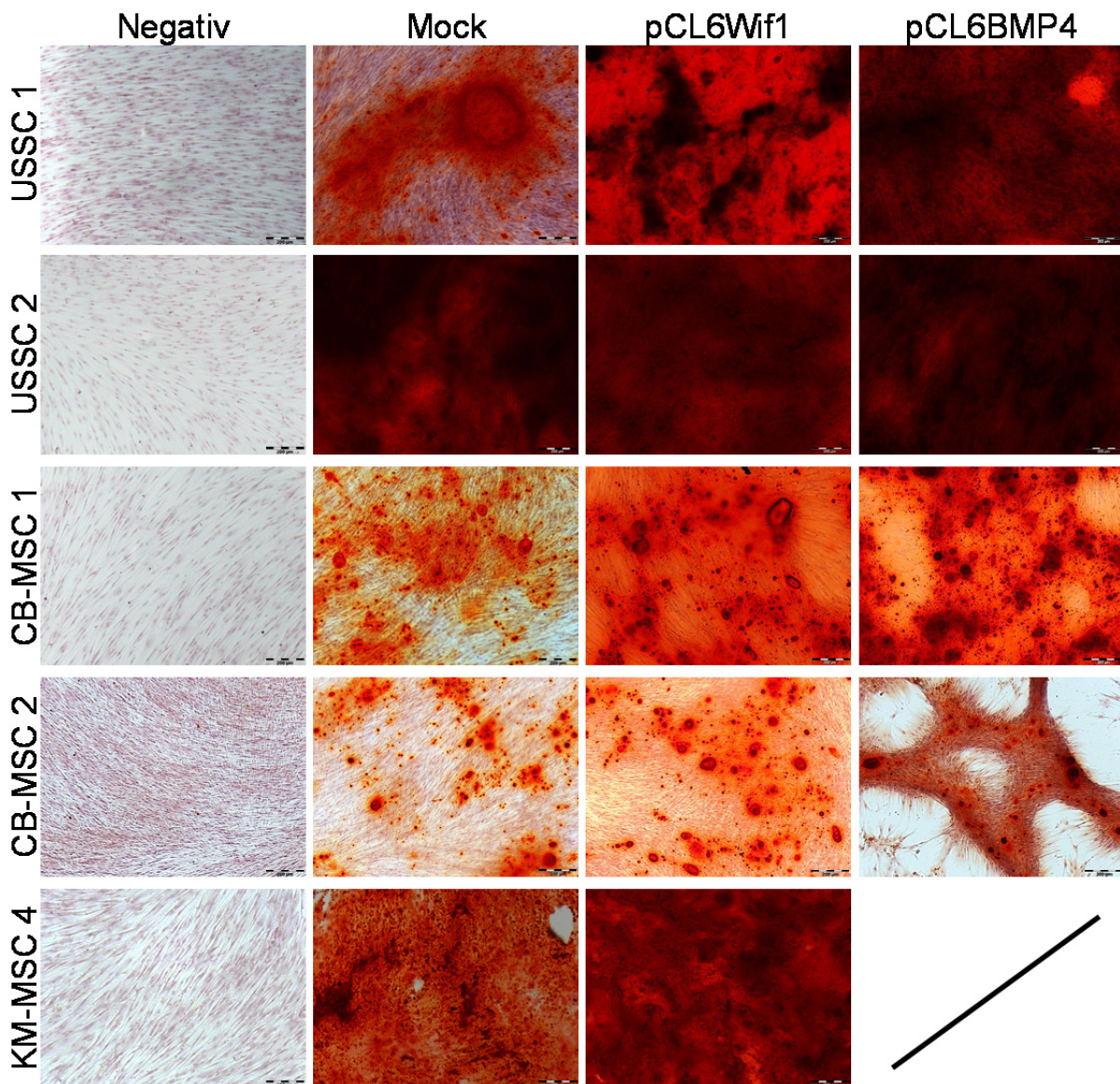


Abb.53: Einfluss der Überexpressionen auf das osteogene Differenzierungspotential. Mock-Kontrollzellen, USSC/ CB-MSC/ KM-MSC pCL6WIF1 und USSC/ CB-MSC pCL6BMP4 osteogen differenziert. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Alizarin-Rot gefärbten Zellen nach 14-tägiger osteogener Differenzierung und nicht induziert (Negativ). Der Maßstab beträgt 200 µm.

Alle Zelllinien zeigten nach osteogener Differenzierung und Färbung Alizarin-Rot gefärbte Areale. Die gefärbte Fläche variierte innerhalb der Zelllinien und nahm bei USSC 1 mit *WIF1* Überexpression geringfügig und mit BMP4 Überexpression stark zu. CB-MSC 2 pCL6BMP4 zeigte wiederholt ein „sternförmiges“ Wachstum in der Differenzierung (Abb.53).

Aus den nach Differenzierung mit Alizarin-Rot gefärbten Zellen wurde der gebundene Alizarin-Farbstoff gelöst und quantifiziert um eine vergleichbar Aussage über die Menge des gebildeten Kalziums und so indirekt über die Stärke der Differenzierung machen zu können. Abbildung 54 zeigt die Extinktionsdifferenz bei 405 nm von Mock-Kontrollzellen, pCL6WIF1 und pCL6BMP4 Zellen im Vergleich.

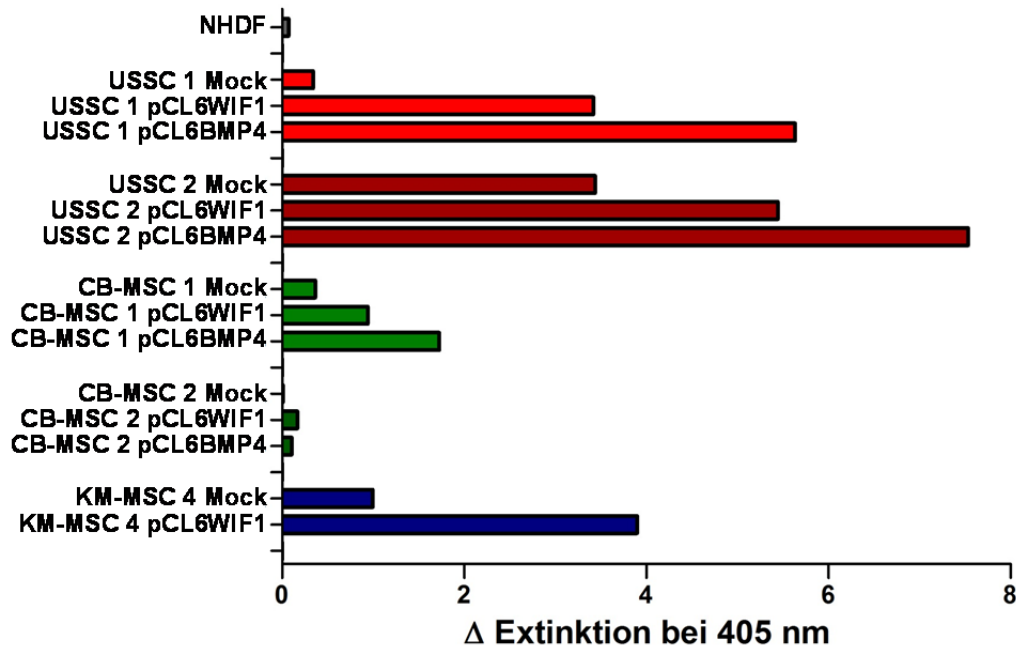


Abb.54: Quantifizierung der Alizarin-Rot Färbung. Mock-Kontrollzellen und überexprimierende Zellen wurden nach osteogener Differenzierung Alizarin-Rot gefärbt und der gebundene Alizarin-Farbstoff quantifiziert. NHDF812 dienten als biologische Negativkontrolle. Von der gemessenen Extinktion wurde die Extinktion der entsprechenden Negativkontrolle bei 405 nm subtrahiert.

Osteogen differenzierte USSC 1 und CB-MSC 1 Mock-Kontrollzellen zeigten ähnliche Δ Extinktionswerte. USSC 2 Mock-Kontrollzellen wiesen einen Δ Extinktionswert von 3,4 auf. In CB-MSC 2 waren kaum Farbstoffeinlagerungen messbar.

USSC 1 pCL6WIF1 zeigte eine 10-fach so hohe Differenzextinktion im Vergleich zu Mock-Kontrollzellen. Auch in USSC 2 und CB-MSC 1 führte die WIF1 Überexpression zu einer höheren Δ Extinktion. CB-MSC 2 zeigte insgesamt eine sehr geringe Δ Extinktion die in CB-MSC 2 pCL6WIF1 leicht erhöht war. Die KM-MSC 4 steigerte ihre Δ Extinktion nach WIF1 Überexpression auf nahezu das 4-fache.

Die pCL6BMP4 Überexpression führte in allen Zelllinien zu einer Steigerung der Δ Extinktion im Vergleich zu den jeweiligen Mock-Kontrollzellen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abb.53) wurde von osteogen differenzierten WIF1 und BMP4 überexprimierenden Zellen mehr Alizarin gebunden als in den jeweiligen Mock-Kontrollzellen (Abb.54).

3.3.5.3 Chondrogene Differenzierung

Es wurden USSC 1 und CB-MSC 1 pCL6*WNT3A*, pCL6*WIF1*, pCL6*BMP4* und Mock-Kontrollzellen in der dreidimensionalen Pelletkultur zur chondrogenen Differenzierung eingesetzt.

Die Arbeiten mit *WNT3A* überexprimierenden Zellen erfolgten im Rahmen einer Masterarbeit im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika. Die Pellets der *WNT3A* überexprimierenden USSC 1 und CB-MSC 1 lösten sich wiederholt nach spätestens 10 Tagen in kleinere Zellverbände oder Einzelzellen auf (vergleiche Abb.XI A Anhang) ¹⁸⁴.

USSC 1 und CB-MSC 1 Mock-Kontrollzellen, pCL6*WIF1* und pCL6*BMP4* Zellen konnten im dreidimensionalen Zellverband differenziert werden und die Pellets wurden 7, 14 und 21 Tage nach Beginn der Differenzierung am AVISO *CellCelector*TM vermessen. Fläche und Durchmesser der chondrogenen Pellets wurden bestimmt, um den Verlauf der Kondensation nachzuvollziehen (vergleiche Abb.XI B Anhang). Mock-Kontrollzellen, *WIF1* und *BMP4* überexprimierende USSC 1 zeigten einen leichten Anstieg der Pelletfläche nach 14 und 21 Tagen, während Mock-Kontrollzellen, *WIF1* und *BMP4* überexprimierende CB-MSC 1 annähernd gleiche Pelletflächenwerte im Verlauf der Differenzierung zeigten.

Nach 21 Tagen Differenzierung wurden 6 µm dünne Schnitte angefertigt und Proteoglykane histochemisch durch *Safranin-O*/ *Fast Green* Färbung der Schnitte nachgewiesen.

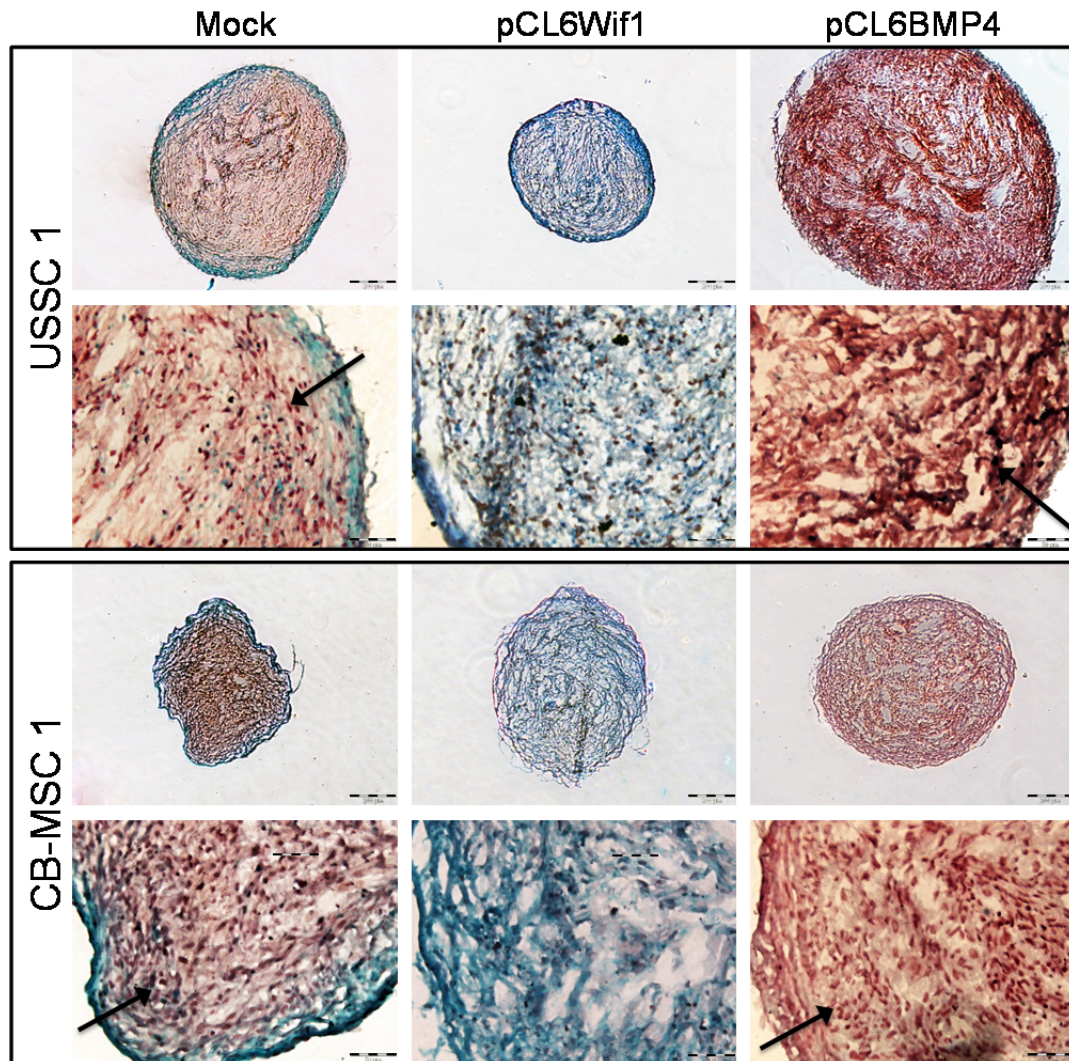


Abb.55: Einfluss der Überexpression auf das chondrogene Differenzierungspotential. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen *Safranin-O/ Fast Green* gefärbter Schnitte. Es wurden Pelletschnitte von Mock-Kontrollzellen, *WIF1* oder *BMP4* überexprimierenden Zellen von USSC 1 und CB-MSC 1 nach 21 Tagen dreidimensionaler Pelletkultur gefärbt und dokumentiert. Der Maßstab beträgt 200 µm respektive 50 µm.

In Abbildung 55 ist zu erkennen, dass USSC 1 und CB-MSC 1 Mock-Kontrollzellen nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung Proteoglykane sezernierten (Pfeile) (vergleiche auch Abb.16 B und C).

Zellen, die mit pCL6*WIF1* transduziert wurden, wiesen kaum rote Färbung der Pelletschnitte auf und die Pellets der USSC 1 pCL6*WIF1* waren kleiner als die jeweiligen Mock-Kontrollzellen (vergleiche Abb.XI B Anhang).

BMP4 überexprimierende Zellen zeigte eine starke Bildung von Proteoglykanen angefärbt durch *Safranin-O/ Fast Green*. USSC 1 pCL6*BMP4* bildete die Pellets mit den größten Durchmessern. Insgesamt waren die Pellets der USSC abgerundet und gleichmäßig, wohingegen die der CB-MSC ungleichmäßig abschlossen waren.

3.3.6 Genexpression nach der Differenzierung pCL6WIF1 und pCL6BMP4 überexprimierender Zellen

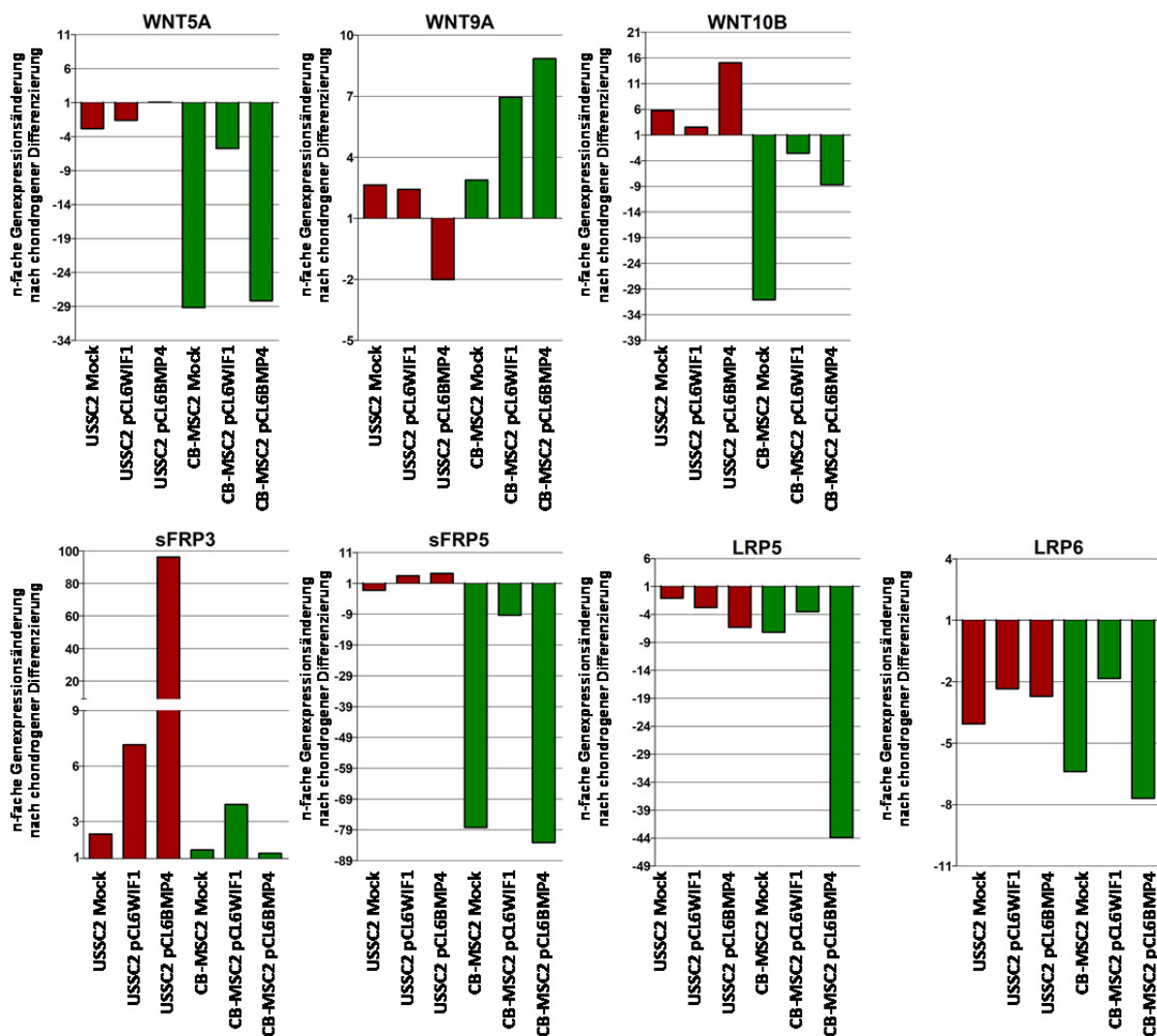


Abb.56: Genexpressionsveränderung nach chondrogener Differenzierung. Regulation der Expression der WNT-Gene *WNT5A*, *WNT9A*, *WNT10B* und der extrazellulären Inhibitoren *sFRP3*, *sFRP5* sowie der Ko-Rezeptoren *LRP5* und *LRP6* durch chondrogene Differenzierung in USSC 2 (n=1) und CB-MS2 2 (n=1).

WNT5A wurde an Tag 0 stark von beiden Mock-Kontrollzelllinien exprimiert und die Expression nahm nach chondrogener Differenzierung ab. pCL6WIF1 und pCL6BMP4 überexprimierende Zellen zeigten eine geringere Runterregulation der *WNT5A*-Genexpression im Vergleich zu den jeweiligen Mock-Kontrollzellen. USSC 2 pCL6BMP4 ausgenommen regulierten allen getesteten Zellen **WNT9A** mit der chondrogenen Differenzierung hoch. Die **WNT10B**-Genexpression stieg in der chondrogenen Differenzierung der USSC 2 Mock-Kontrollzellen, pCL6WIF1 und pCL6BMP4 an und sankt bei der chondrogenen Differenzierung der CB-MS2 Mock-Kontrollzellen, pCL6BMP4 und pCL6WIF1 (Abb.56).

Die Expression der extrazellulären Wnt-Inhibitoren *sFRP3-5*, *WIF1* und *DKK1* wurde ebenfalls untersucht. Die Genexpression von ***sFRP3*** nahm, einheitlich in allen getesteten Populationen, nach chondrogener Differenzierung zu (Abb.56). Während die Expression von ***sFRP5*** in USSC 2 nativ deutlich schwächer ist, als in CB-MSC 2, und USSC 2 nach chondrogener Differenzierung nur geringfügig veränderte Expressionslevel aufwies, zeigten die Populationen der CB-MSC 2 im Anschluss an die Differenzierung eine starke Runterregulation der Genexpression (Abb.56).

Die Ko-Rezeptoren ***LRP5*** und ***LRP6*** wurden undifferenziert von USSC 2 und CB-MSC 2 (Mock-Kontrollzellen, pCL6*WIF1*, pCL6*BMP4*) exprimiert und ihre Expression war in allen Zellen nach chondrogener Differenzierung schwächer (Abb.56).

DKK1 ist Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges und inhibiert diesen durch Bindung an die Ko-Rezeptoren *LRP5/6*. USSC 2 zeigte vor und nach der chondrogenen Differenzierung kaum *DKK1* Expression, während CB-MSC 2 Mock-Kontrollzellen, pCL6*WIF1*, pCL6*BMP4* vor Differenzierung *DKK1* stark exprimierten und im Anschluss an die Differenzierung eine deutliche Runterregulation zeigten (vergleiche Abb.XIII Anhang). Das Gen ***sFRP4*** wurde nur in USSC 2 und nicht in CB-MSC 2 detektiert. Seine Expression stieg mit der Differenzierung der USSC an (Mock-Kontrollzellen, pCL6*BMP4*) oder blieb unverändert hoch (USSC pCL6*WIF1*). ***WIF1*** überexprimierende USSC 2 und CB-MSC 2 zeigten im Anschluss an die chondrogene Differenzierung eine Runterregulation der *WIF1* Expression um mehr als das 6- respektive 18-fache (vergleiche Abb.XIII Anhang).

Die Expression von ***CTBP1*** war in undifferenzierten USSC 2 und CB-MSC 2 detektierbar und verringerte sich mit chondrogener Differenzierung. Eine Ausnahme bildete die USSC 2 pCL6*BMP4*, welche sogar einen leichten Anstieg der *CTBP1* Expression zeigte. ***BMP4*** überexprimierende USSC 2 und CB-MSC 2 zeigten im Anschluss an die chondrogene Differenzierung eine Runterregulation der *BMP4* Expression um mehr als das 1,5- respektive 74-fache. Die Expression des Zielgenes ***MYC*** in USSC 2 und CB-MSC 2 (Mock-Kontrollzellen, pCL6*WIF1*, pCL6*BMP4*) war an Tag 0 unterschiedlich stark und nach der Differenzierung auf ein einheitliches, sehr geringes Level, verringert (vergleiche Abb.XIII Anhang).

Während der chondrogenen Differenzierung von Mock-Kontrollzellen und pCL6*BMP4* Zellen der USSC 2 und CB-MS2 unterlag die **SOX9**-Expression keiner starken Regulation. pCL6*WIF1* überexprimierende USSC 2 regulierten SOX9 im Anschluss an die chondrogene Differenzierung hoch, während sich die SOX9-Expression in CB-MS2 pCL6*WIF1* durch die Differenzierung verminderte. 21 Tage chondrogen differenzierte USSC (Mock-Kontrollzellen, pCL6*BMP4*, pCL6*WIF1*) zeigte eine starke **COMP Expression**, CB-MS2 (Mock-Kontrollzellen, pCL6*BMP4*, pCL6*WIF1*) eine geringe. Die Expression von **IGF1** konnte in allen getesteten Linien nach Differenzierung nachgewiesen werden (vergleiche Abb.XIII Anhang).

Differenzierte USSC 2 Mock-Kontrollzellen und differenzierte, pCL6*BMP4* überexprimierende USSC 2 zeigten **BSP** Expression, obgleich dieses Gen vor Differenzierung in USSC 2 mittels *real-time* PCR nur sehr gering beziehungsweise nicht nachweisbar war (vergleiche Abb.XIII Anhang).

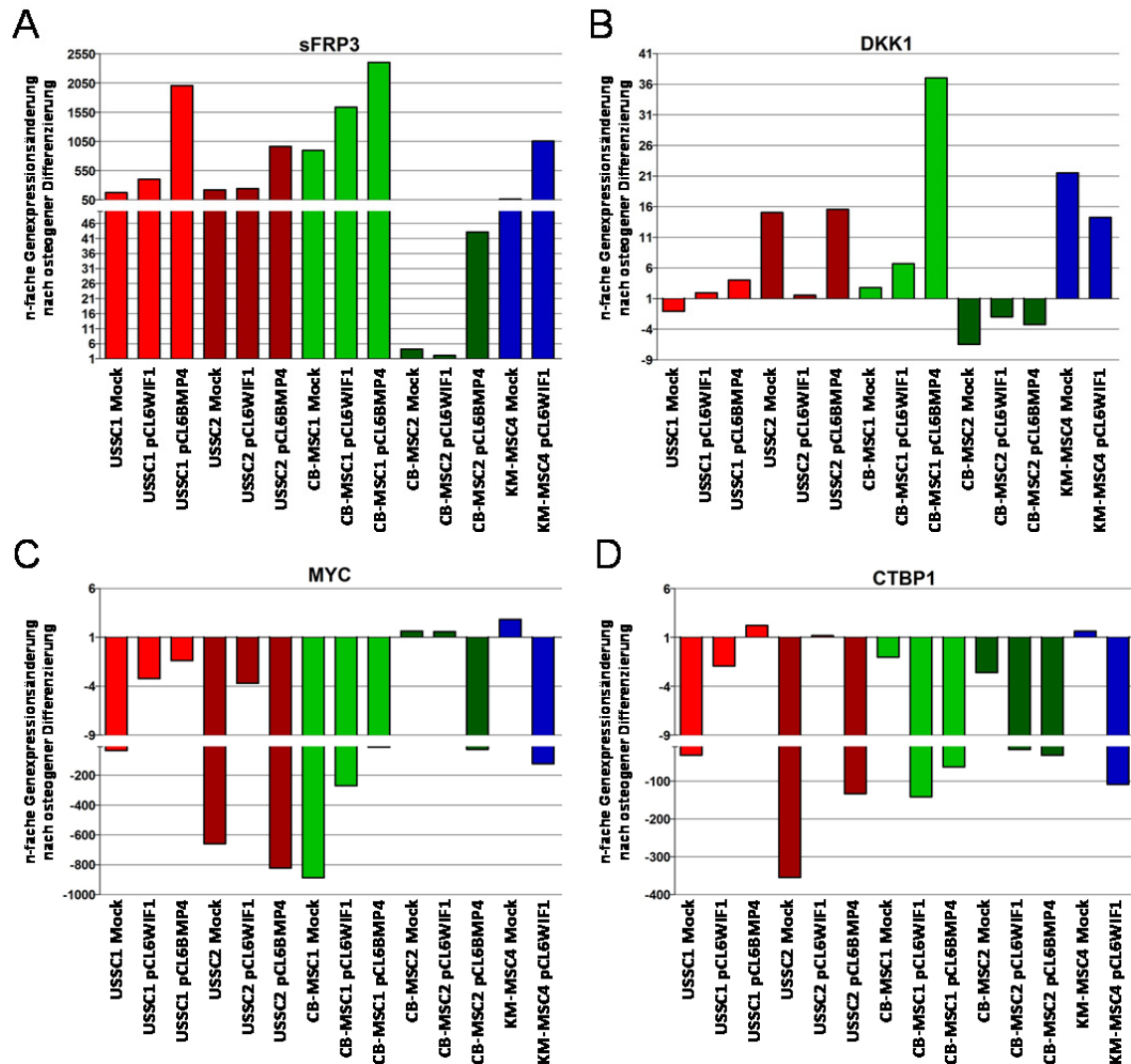


Abb.57: Genexpressionsveränderung nach osteogener Differenzierung. Regulation der Expression der Gene *sFRP3*, *DKK1*, *MYC* und *CTBP1* durch osteogene Differenzierung in USSC (n=2), CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1).

sFRP3 wurde von undifferenzierten Mock-Kontrollzellen, pCL6WIF1 und pCL6BMP4 Zellen exprimiert und die Expression nahm mit osteogener Differenzierung in allen Zellpopulationen stark zu. Die Expression von *DKK1* stieg mit osteogener Differenzierung an oder blieb konstant. Eine Ausnahme hierfür bildete die Linie CB-MS2, die den geringsten Anstieg der *sFRP3*-Genexpression zeigte und in der die *DKK1*-Expression durch Differenzierung leicht abnahm (Abb.57 A,B). Die Expression von *MYC* in den verschiedenen Populationen war nach osteogener Differenzierung teilweise stark verringert und zeigte eine, der *CTBP1* Genexpressionsänderung ähnliche Regulation (Abb.57 C,D).

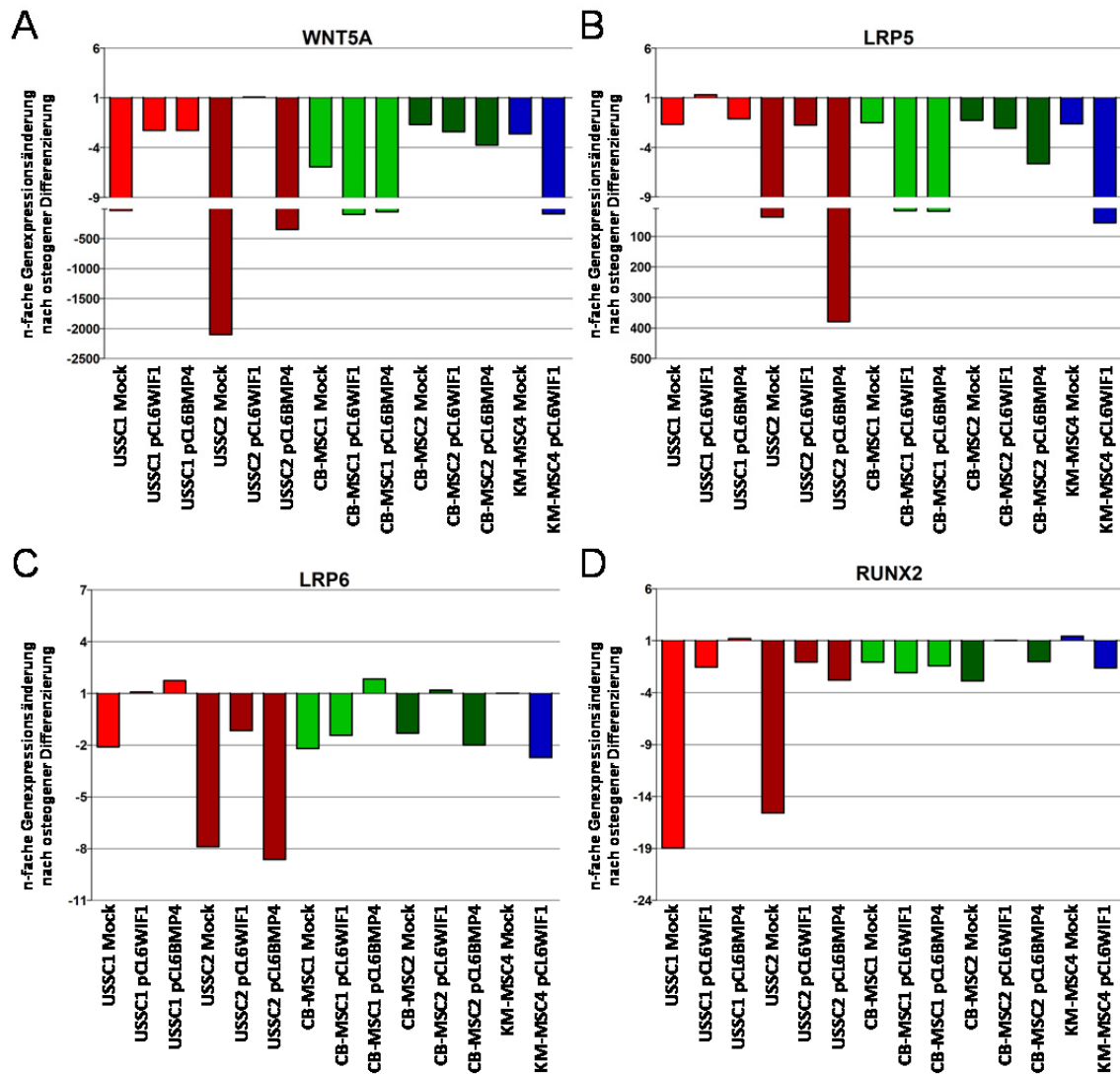


Abb.58: Genexpressionsveränderung nach osteogener Differenzierung. Regulation der Expression der Gene *WNT5A*, *LRP5*, *LRP6* und *RUNX2* durch osteogene Differenzierung in USSC (n=2), CB-MSC (n=2) und KM-MSC (n=1).

In undifferenzierten Zellen wurde **WNT5A** stark und im Anschluss an die Differenzierung im Verhältnis in allen Populationen geringer oder gleichbleibend exprimiert. Die Expression von **LRP5** in den verschiedenen Populationen war nach osteogener Differenzierung teilweise stark verringert und zeigte eine, der *WNT5A*-Genexpressionsänderung ähnliche Regulation (Abb.58 A,B). Der Ko-Rezeptor **LRP6** wurde ebenfalls von einigen Populationen nach osteogener Differenzierung geringer exprimiert. pCL6BMP4 exprimierende USSC 1 und CB-MSC 1 zeigten einen leichten Anstieg der *LRP6* Expression. Die **RUNX2** Expression wurde durch osteogene Differenzierung runterreguliert oder blieb konstant (Abb.58 C,D).

Die **WIF1**-Expression war nach osteogener Differenzierung in **WIF1** überexprimierenden USSC 1 und USSC 2 höher, im Vergleich zu den jeweils undifferenzierten Zellen. Sie nahm in CB-MSC 1 pCL6**WIF1**, CB-MSC 2 pCL6**WIF1** und KM-MSC 4 pCL6**WIF1** leicht ab. Mock-Kontrollzellen und **BMP4** überexprimierende Zellen zeigten keine Veränderung der **WIF1** Expression (vergleiche Abb.XII A Anhang).

Das Gen **sFRP4** wurde grundsätzlich stärker von USSC als CB-MSC exprimiert und unterschiedlich reguliert. Mock-Kontrollzellen der USSC und CB-MSC zeigten einen Anstieg der Genexpression nach Differenzierung, während die pCL6**BMP4** Überexpression zu einer Abnahme der **sFRP4** Expression nach osteogener Differenzierung führte. KM-MSC 4 Mock-Kontrollzellen exprimieren nativ schon geringe Mengen **BMP4** und zeigten eine leichte Verringerung der **sFRP4** Expression im Anschluss an die Differenzierung. Mit pCL6**WIF1** oder pCL6**BMP4** transfizierte CB-MSC 2 Mock-Kontrollzellen stellte die **sFRP4** Expression im Anschluss an die Differenzierung vollständig ein (vergleiche Abb.XII B Anhang).

Der extrazelluläre Inhibitor **sFRP5** wurde in allen undifferenzierten Zellpopulationen exprimiert und zeigte nach osteogener Differenzierung eine stärkere Regulation in CB-MSC 1, CB-MSC 2 und KM-MSC 4 als in USSC 1 und USSC 2 (vergleiche Abb.XII C Anhang).

BMP4 überexprimierende Zellen, mit Ausnahme von USSC 1 pCL6**BMP4**, zeigten nach osteogener Differenzierung eine Abnahme der **BMP4** Expression. CB-MSC und KM-MSC Mock-Kontrollzellen und pCL6**WIF1** überexprimierende Zellen hingegen regulierten die **BMP4** Expression mit osteogener Differenzierung rauf (vergleiche Abb.XII D Anhang).

BSP wurde geringfügig erhöht in der differenzierten CB-MSC 1 Mock-Kontrollzellen und **WIF1** exprimiert. Die anderen aus Nabelschnurblut generierten Zelllinien wiesen kaum **BSP** Expression auf. KM-MSC regulierten die **BSP** Expression nach osteogener Differenzierung runter (vergleiche Abb.XII E Anhang).

4. Diskussion

4.1 Charakterisierungen der verwendeten Zellpopulationen

Es wurden nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut auf Grundlage der bisher bekannten Unterscheidungsmerkmale (adipogenes Differenzierungspotential, *DLK1*- und *HOX*-Genexpression) und im Vergleich zu mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark (KM-MSc) auch auf klonaler Ebene *in vitro* charakterisiert. Des Weiteren wurden Zelllinien untersucht, die unter 5% O₂ aus Nabelschnurblut (CB-H) und Knochenmark (KM-H) generiert und expandiert wurden.

4.1.1 Die verwendeten Zellpopulationen zeigten keine morphologischen oder immunphänotypischen Unterschiede

Nicht-hämatopoetische Progenitorzellen aus dem Nabelschnurblut sind in Zellkultur plastikadhärent wachsende Zellen mit spindelförmiger Morphologie ⁵². Die von der *International Society for Cellular Therapy* aufgestellten Anforderungen an MSC wie Plastikadhärenz in Zellkultur, Expression bestimmter Oberflächenmarker und adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential *in vitro* ⁵¹ wurden von CB-MSc und KM-MSc erfüllt.

Die physiologische Umgebung, einschließlich des Sauerstoffgehaltes spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Selbsterhalts und der Differenzierung sowohl embryonaler als auch adulter Stammzellen ¹⁸⁵. Die unter 5% O₂ aus Nabelschnurblut (CB-H) und Knochenmark (KM-H) generierten Zelllinien zeigten keine morphologischen oder immunphänotypischen Unterschiede zu Progenitorzellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark, die unter 21% O₂ generiert wurden (vergleiche Kapitel 3.1.1).

4.1.2 Verwendete Zellpopulationen die aus Nabelschnurblut generiert wurden zeigten *in vitro* ein höheres Wachstumspotential als Zellpopulationen aus Knochenmark

USSC, CB-MSK, klonale Linien und CB-H Linien zeigten ein schnelles Wachstum und insgesamt höhere maximale CPD Werte als Zellpopulationen aus Knochenmark (KM-MSK und KM-H Linien) (vergleiche Abb. 7 und 8). Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Forscher überein. So wurde beispielsweise von Kern *et al.* beschrieben, dass aus NSB generierte MSK eine höhere Proliferationskapazität zeigten und längere Zeit kultiviert werden konnten, im Vergleich zu MSK aus KM und Fettgewebe ⁴⁵. Bei den von Kern *et al.* beschriebenen MSK aus NSB handelt es sich nach den in dieser Arbeit angeführten Kriterien um USSC, da diese nicht adipogen differenzierten. Im Durchschnitt erreichten unrestringierte somatische Stammzellen höhere maximale CPD Werte als CB-MSK, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Klonale Zellpopulationen zeigten ein heterogenes Expansions- und Wachstumspotential, welches auch im Vergleich zu ihrer Ursprungslinie variierte.

Aus einem Nabelschnurblut können durch *in vitro* Kultivierung in 5 Passagen durchschnittlich $8,7 \times 10^8$ ($\pm 1,86 \times 10^8$) Vorläuferzellen generiert werden, ohne dass diese ihr multipotentes Potential verlieren oder genetische Instabilität aufweisen ⁵³. Dass dies auch unter GMP-Bedingungen möglich ist, erfüllt eine grundlegende Voraussetzung für den späteren klinischen Einsatz der Zellen ⁵³.

4.1.3 KM-MSK zeigten *in vitro* früher replikative Seneszenz als USSC und CB-MSK und wiesen kürzere Telomere auf

Das in Kapitel 3.1.1 festgestellte geringere Wachstumspotential der KM-MSK könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese *in vitro* schneller ihr Teilungsmaximum erreichen. Wenn die Telomere einer Zelle eine kritische Länge unterschreiten, verringert sich das Teilungsvermögen der Zelle bis hin zum irreversiblen Wachstumsarrest. Diesen Status, in dem keine Teilung der Zelle mehr stattfindet, nennt man replikative Seneszenz ¹⁸⁶. Das Stadium und der Fortschritt der replikativen Seneszenz in 5 USSC, 6 CB-MSK und 6 KM-MSK wurden *in vitro* ermittelt. Zwischen den durchlaufenen CPD der humanen Zellen und dem Gehalt an β -Galaktosidase im Zytosol konnte *in vitro* eine negative Korrelation festgestellt werden (vergleiche Kapitel 3.1.2).

Insgesamt zeigten KM-MSC eine schnellere Zunahme der Seneszenz als USSC, CB-MSC und deren korrespondierende klonale Zellpopulationen. Die neonatalen Progenitorzellen fötalen Ursprungs aus dem NSB wurden später seneszent, da sie *in vivo* noch nicht viele Zellteilungen durchlaufen haben und auch keinen direkten Umwelteinflüssen ausgesetzt waren. Der fötale Ursprung der Vorläuferzellen aus NSB (CB-MSC) wurde von Zhang *et al.* durch Untersuchungen des Karyotyps der Zellen festgestellt. Der Karyotyp von Stammzellen aus dem NSB von männlichen Neugeborenen wies mit einer Wahrscheinlichkeit von über 98% einen XY Phänotyp auf⁶⁰. Dies zeigte, dass die Zellen vom männlichen Fötus und nicht von der Mutter entstammten. Im Vergleich dazu stammen KM-MSC aus dem KM erwachsener Spender, so dass diese mesenchymalen Vorläuferzellen *in vivo* mehr Zellteilungen durchlaufen haben und die Möglichkeit besteht, dass sie über einen längeren Zeitraum Umwelteinflüssen ausgesetzt waren.

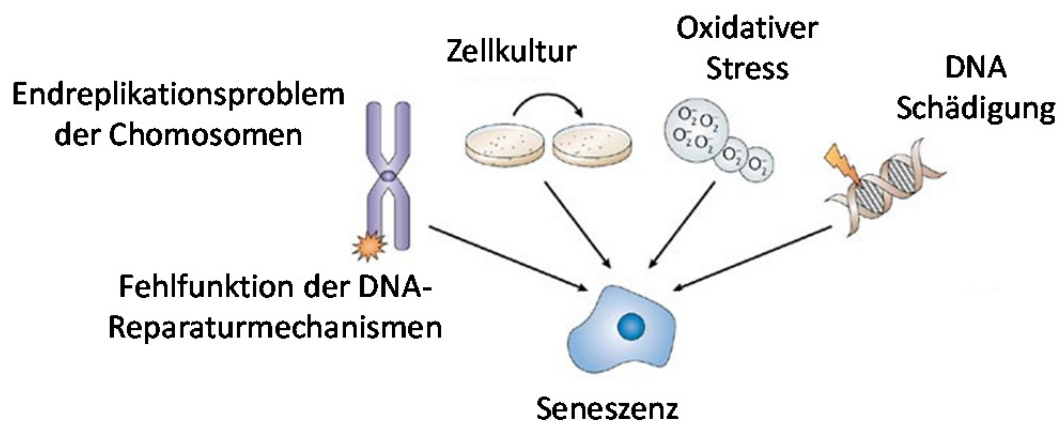


Abb.59: Mögliche Ursachen von Seneszenz in Zellen. Verschiedene Ursachen können zu der Entstehung von Seneszenz in Zellen beitragen. Seneszenz fungiert dabei als Mechanismus, um die Teilung von potenziell geschädigten Zellen zu verhindern. Abbildung modifiziert nach Collado *et al.*¹⁸⁷.

Oxidativer Stress kann ursächlich für die erhöhte Seneszenz in KM-MSC sein (Abb. 59). USSC, CB-MSC und KM-MSC entstammen aus Bereichen mit sehr geringem Sauerstoffpartialdruck und wurden *in vitro* in 21% O₂ kultiviert. Fehrer *et al.* vermuten, dass die replikative Seneszenz in MSC unter dem Einfluss von oxidativem Stress schneller erreicht wird und geringe Sauerstoffkonzentrationen die Zellen, trotz Proliferation, in einem undifferenzierten Zustand halten¹⁸⁸. Weitere Untersuchungen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten KM-H Linien bezüglich ihrer replikativen Seneszenz unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen könnten Aufschluss darüber geben. Alle klonalen Zelllinien zeigten aufgrund der hohen durchlaufenen Teilungsanzahl in Zellkultur in gleicher Passage ein schnelleres Eintreten der replikativen Seneszenz als ihre Ursprungszelllinien. Die mit der Verkürzung der Telomere einhergehende replikative Seneszenz von Zellen ist ein Schutzmechanismus gegen die Entartung der Zellen¹⁸⁹.

Andere Gruppen konnten zeigen, dass die Telomerlänge Rückschlüsse auf die bisherige Proliferation einer Zelle *in vivo* und *in vitro* zulässt^{190,191}. Telomere in somatischen Zellen sind mit durchschnittlich 8 kbp bis 10 kbp sehr heterogen in ihrer Länge. USSC und CB-MSC zeigten nach 30 durchlaufenen CPD durchschnittliche TRF Längen von 11,43 beziehungsweise 10,63 kbp. KM-MSC hatten nach 30 CPD eine durchschnittliche TRF Länge 8,76 kbp (vergleiche Abb.10B). Die von Zhang *et al.* gemessenen TRF Längen sind mit 11,73 (+/- 0,32 kbp) in CB-MSC und 9,6 (+/- 0,86) in KM-MSC nach jeweils 4 Passagen mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten vergleichbar⁶⁰. Die kürzeren Telomerlängen der mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark erwachsener Spender (KM-MSC) geben ebenfalls Grund zu der Annahme, dass diese Zellen *in vivo* bereits eine gewisse Anzahl an Zellteilungen durchlaufen haben. Neonatal gewonnene USSC und CB-MSC hingegen zeigten auch über einen längeren Kultivierungszeitraum noch lange Telomerlängen (vergleiche Abb.III Anhang). Bei Analysen klonaler Zellpopulationen konnte beobachtet werden, dass die durchschnittlichen terminalen Restriktionsfragmente (TRF) aufgrund der höheren CPD im Vergleich zur Ausgangslinie in der gleichen Passage kürzer waren⁵⁴.

4.1.4 Die verwendeten Progenitorzellen exprimierten keine Stammzellmarker und keine Telomerase

In immortalisierten Zelllinien wird der Verlust an telomerischer DNA, der durch DNA-Abbau oder Replikation entsteht, wieder ausgeglichen. Verantwortlich dafür kann die Telomerase (*telomere terminal transferase*) sein, die zur *de novo* Synthese der Telomere fähig ist^{192,193}. In den meisten humanen, somatischen Zellen ist keine Telomeraseaktivität nachweisbar, allerdings zeigen viele humane, immortalisierte Zelllinien und ungefähr 85% aller humanen Tumorzellen Aktivität der humanen Telomerase¹⁹⁴. Zudem zeichnen sich embryonale Stammzellen und iPS durch Telomeraseaktivität aus¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, zeigten die getesteten Progenitorzellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark zu keinem Zeitpunkt mit RT-PCR oder *real-time* PCR *TERT* Expression. Auch die Ergebnisse aktueller Forschungen der Gruppe Zhang *et al.* zeigten keine Telomerase in Progenitorzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut⁶⁰.

Die konstitutiv exprimierte Untereinheit der Telomerase *TERC* sowie *MYC*-Genexpression wurden in allen getesteten Linien nachgewiesen, während keine aus NSB oder KM generierte Zelllinie die Stammzellmarker *NANOG*, *POU5F1* und *SOX2* exprimierte (vergleiche Abb.IV). Dies unterstützt die Annahme, dass Progenitorzellen aus Nabelschnurblut multipotente, aber keine embryonalen Eigenschaften aufweisen.

4.1.5 *DLK1*-Expression kann als Unterscheidungsmerkmal zwischen verschiedenen Zellpopulationen aus Nabelschnurblut herangezogen werden

Die Einteilung der Zellpopulationen, welche unter 21% O₂ aus NSB generiert wurden, fand unter anderem aufgrund der Expression von *DLK1* (*delta-like 1 homolog, Drosophila*) statt. Dlk1 ist ein Transmembranprotein, welches nach proteolytischer Spaltung durch Adam17 (*a disintegrin and metalloproteinase domain 17*) Adipogenese inhibiert. Während der humanen Embryogenese wird *DLK1* von unreifen Zellen, wie beispielsweise Hepatoblasten, exprimiert und während der fetalen Entwicklung runter reguliert ¹⁹⁸. Nach der Geburt ist die Expression in Säugetieren unter anderem auf Präadipozyten, Inselzellen der Bauchspeicheldrüse, Thymus-Stroma-Zellen und Zellen der Hypophyse und Nebenniere beschränkt ¹⁹⁹⁻²⁰⁴. *DLK1* wird stark von Präadipozyten exprimiert und während ihrer adipogenen Differenzierung runter reguliert ^{199,205,206}.

USSC zeigten *DLK1*-Expression, wohingegen in CB-MSC keine bis sehr geringe *DLK1*-Expression detektiert werden konnte. Klonale Linien der *DLK1*-positiven USSC zeigten eine uneinheitliche *DLK1*-Expressionsstärke. KM-MSC zeigten ebenfalls unterschiedlich starke Expressionen für *DLK1*. In den Zelllinien, die aus NSB unter physiologischen Bedingungen bei 5% Sauerstoff generiert werden konnten, variierte die Genexpression von negativ in CB-H 3 bis positiv in CB-H 1, CB-H 2 und CB-H 4. Starke *DLK1*-Expression in Zelllinien, die aus NSB generiert wurden, ging mit der nicht vorhandenen Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung einher (vergleiche Abb.IV A und Abb.11). Dies stimmt mit der, in der Literatur beschriebenen, Adipogenese-inhibierenden Funktion von Dlk1 überein ¹⁹⁹.

4.1.6 Differenzierungspotential

4.1.6.1 Progenitorzellen aus Nabelschnurblut mit starker *DLK1*-Expression waren nicht zur adipogenen Differenzierung *in vitro* fähig

Die verschiedenen nicht-hämatopoetischen Progenitorzellen, die aus NSB isoliert werden können, unterscheiden sich in ihrem Differenzierungspotential *in vitro* und *in vivo* ^{52,54,207}. USSC zeigten keine Fähigkeit zur adipogenen, jedoch zur osteogenen und chondrogenen Differenzierung. Mesenchymale Stromazellen aus dem NSB und KM zeigten sowohl adipogenes, als auch osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential (vergleiche Kapitel 3.1.4). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen über das Differenzierungspotential von CB-MSC und KM-MSC überein ^{44,208-210}.

Zwischen den verschiedenen, unter 21% O₂ generierten Populationen aus NSB (USSC und CB-MSC) und KM (KM-MSC), gab es keinen eindeutigen Unterschied im osteogenen Differenzierungspotential *in vitro*, wie aus Abbildung 12 hervorgeht. Das osteogene Differenzierungspotential schwankte innerhalb aller Populationen. KM-MSC und CB-MSC mit hohem adipogenen Differenzierungspotential schienen häufig ein geringes Potential zur osteogenen Differenzierung zu zeigen, und umgekehrt (vergleiche Abb.11 und Abb.12).

4.1.6.2 Klonale Zelllinien zeigten ein heterogenes Wachstumsverhalten und Differenzierungspotential im Vergleich zu ihrer Ursprungszelllinie

Stamm- und Progenitorzelllinien, die in Kultur expandiert werden, erscheinen homogen. Sehr dünn ausgesäte KM-MSC und daraus isolierte klonale Linien zeigten bei Ylostalo *et al.* jedoch ein sehr heterogenes Differenzierungspotential, welches teilweise auch von der Position der Zellen in der Kolonie abhängig war. Zellen im Inneren der Kolonien schienen determinierter zu sein als solche am Rand, wenngleich dies bei erneutem klonalen Wachstum (Klone von Klonen) reversibel war und alle Zellen eine ähnliche Proliferation aufwiesen ²¹¹. Solche Beobachtungen zeigen, welchen erheblichen Einfluss die Kultivierung der Zellen auf ihr Potential haben könnte.

Um das Wachstumsverhalten und Differenzierungspotential der USSC auf Einzelzellebene zu betrachten, wurden etablierte klonale Zelllinien differenziert. Die aus NSB generierten, klonalen Linien zeigten ein heterogenes Wachstumsverhalten und Differenzierungspotential. Klonale USSC zeigten dabei weiterhin kein adipogenes, jedoch teilweise ein, im Vergleich zur Ursprungszelllinie stärkeres oder schwächeres, osteogenes Differenzierungspotenzial. Von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe vorgenommene Analysen klonaler Linien von CB-MSC zeigten ebenfalls ein variierendes Differenzierungspotential im Vergleich zu ihren Ursprungszelllinien. In mehreren klonalen Linien einer CB-MSC Ursprungszelllinie wurden dabei verschieden starke adipogene Differenzierungen beobachtet ^{175,212}.

Pittenger *et al.* und Muraglia *et al.* haben Studien an klonalen KM-MSCs zum Differenzierungspotential durchgeführt ^{44,213}. Klonale MSCs, die immunphänotypisch keine Unterschiede zeigten, waren ihr Differenzierungspotential betreffend heterogen. Etwa ein Drittel der klonalen Zelllinien war zur adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung fähig, während über 60% kein adipogenes Differenzierungspotential zeigten. Keine der 185 klonalen Zelllinien zeigte ausschließlich adipogenes oder ausschließlich chondrogenes Differenzierungspotential ²¹³. Diese Ergebnisse lassen auf Subpopulationen innerhalb der KM-MSCs Population schließen. Ähnliche Subpopulationen sind auch bei Progenitorzellen aus Nabelschnurblut zu vermuten.

4.1.6.3 Unter 5% O₂ generierte Zelllinien aus Nabelschnurblut zeigten unterschiedliche *DLK1*-Expression und verschiedenes Differenzierungspotential

Ob die Generierung und/ oder Kultivierung unter 5% O₂ Einfluss auf das Differenzierungspotential der Zellen hat, wurde untersucht. In murinen KM-MSCs, die unter 21% O₂ generiert und unter 21% O₂ und 8% O₂ kultiviert wurden, konnten Ren *et al.* eine mehr als 5-fach stärkere Bildung von Fettvakuolen in Zellen unter 8% O₂ im Vergleich zu 21% O₂ beobachten ²¹⁴. Unter 5% O₂ generierte und kultivierte Zelllinien aus Knochenmark (KM-H Linien) zeigten ein hohes adipogenes und schwaches osteogenes Differenzierungspotential. Ein geringeres osteogenes Differenzierungspotential von KM-MSCs unter geringeren Sauerstoffkonzentrationen wurde von Yang *et al.* beobachtet und von ihnen auf den direkten Einfluss des durch Hypoxie (Mangel an Sauerstoff) aktivierten Genes *hypoxia-inducible transcription factor (Hif1)* zurückgeführt. Yang und Kollegen zeigten eine Hochregulation von *Hif1* und seinem Zielgen *Twist1* unter Hypoxie (1% O₂) ²¹⁵. *Twist1* inhibiert *Runx2*, welches ein Schlüsselgen der Skelettogenese ist und dessen Expression für die Expression von weiteren Genen zur Osteoblastenreifung notwendig ist ¹⁵⁶. Park *et al.* zeigten bereits 2002 eine zeitabhängige Verringerung der mRNA-Expression und des Proteinlevels von RUNX2 in der humanen MG-63 Osteosarkom-Zelllinie unter Hypoxie (2% O₂) ²¹⁶. Weitere *in vitro* Studien zeigten hemmende Effekt von Hypoxie (2% O₂ - 10% O₂) auf die Proliferation, Differenzierung und Knochenbildung von Osteoblasten ^{12,217-221}.

Es konnte nicht generell ein geringeres osteogenes Differenzierungspotential für unter 5% generierte Progenitorzellen aus NSB im Vergleich zu unter 21% O₂ generierten Progenitorzellen aus NSB festgestellt werden. Auffallend war jedoch, dass alle unter 21% O₂ generierten USSC und CB-MSC und drei der vier CB-H Linien zur osteogenen Differenzierung fähig waren, während CB-H 3 nur ein sehr eingeschränktes Potential zeigte.

Beim Vergleich der *DLK1*-Expression, dargestellt in Abbildung IV A, und dem Differenzierungspotential der Zellen, welches in Kapitel 3.1.4 behandelt wird, zeigte CB-H 1 unter den getesteten CB-H Linien die stärkste *DLK1*-Expression und damit einhergehend hohes osteogenes, jedoch kein adipogenes und chondrogenes Differenzierungspotential. CB-H 2 und CB-H 4 zeigten schwache *DLK1*-Expression sowie osteogenes und chondrogenes, aber kein adipogenes Differenzierungspotential. Die CB-H Linie 3 zeigte wenig osteogenes und kein chondrogenes Differenzierungspotential. Sie zeigte jedoch als einzige der insgesamt 4 unter 5% O₂ aus NSB generierten Linien starkes adipogenes Differenzierungspotential.

CB-H 3 zeigte zudem, im Vergleich zu den anderen CB-H Linien, auffallend geringe Expressionswerte des Adipogenese-inhibierenden *DLK1* sowie der Gene *SOX9*, *TWIST1* und *RUNX2* (vergleiche Abb.18 und Abb.19), die für die chondrogene und osteogene Differenzierung von Bedeutung sind. Die Präkonditionierung (4 Tage) oder vollständige Kultivierung in 21% O₂ von CB-H oder KM-H Zelllinien hatte keinen Einfluss auf deren adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential (vergleiche Abb.13 und Abb.14).

4.1.6.4 Die Generierung unter 5% O₂ hatte keinen generellen Einfluss auf die mit Differenzierung assoziierte Genexpression an Tag 0

Die Expression der mit chondrogener und osteogener Differenzierung assoziierten Gene war nicht prinzipiell unterschiedlich zwischen Zelllinien aus NSB, die unter 5% und 21% O₂ generiert wurden. Wie in Kapitel 3.2.1 dargestellt, zeigten CB-MSC und CB-H Linien ähnliche relative Expressionsmuster der Gene *RUNX2*, *FOSL1*, *FOSL2*, *FGF2* und *FGF5*.

Die Expression von *Dickkopf-related protein 1* (*DKK1*) wurde in USSC kaum detektiert, während die einzelnen CB-MSC ähnlich wie die CB-H Linien *DKK1* unterschiedlich stark exprimierten. Alle unter 5% O₂ aus NSB generierten Zelllinien exprimierten *DKK1*. Aktuelle Arbeiten von Guo *et al.* zeigten eine erhöhte *DKK1* Expression in malignen Gliomzellen bei der Kultivierung unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen²²².

Ein Einfluss der Zellkultur auf die Expression von *DKK1* kann nach Daten von Prockop *et al.* nicht ausgeschlossen werden. Sie sehen einen Zusammenhang zwischen einzelnen Phasen der Populationsdynamik von MSC aus KM und der *DKK1*-Expression. *DKK1* verringerte die β -Catenin Konzentration der Zellen, was für einen gehemmten WNT-Signalweg spricht. Diese Hemmung soll es den Zellen ermöglichen erneut in einen Zellzyklus einzutreten^{223,224}. USSC und CB-MSC zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Wachstumskinetik, wohl jedoch in der *DKK1*-Expression, dargestellt in Abbildung 7B respektive Kapitel 3.2.5. Einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhtem Wachstum und starker *DKK1*-Expression, wie er für KM-MSC vermutet wird, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden.

Des Weiteren gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der *Dkk1* und *homolog of Drosophila muscle segment homeobox 2 (Msx2)* Expression. *Msx2* inhibiert die Expression von *Dkk1* in murinen Fibroblasten²²⁵. In der vorliegenden Arbeit analysierte CB-MSC zeigten *DKK1*, aber kaum *MSX2* Expression (vergleiche Abb.17 und Abb.19). *Real-time* PCR Ergebnisse und Auswertungen von Microarray-Analysen von T. Hennicke aus unserer Gruppe bestätigten die Expression von *MSX2* in USSC und KM-MSC. In CB-MSC wurde *MSX2* Expression nur geringfügig detektiert¹⁷⁵.

Der Transkriptionsfaktor *Msx2* erfüllt eine wichtige regulierende Rolle bei der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten und Adipozyten²²⁶. *Msx2* hemmt die Adipogenese durch die Unterdrückung der Expression und Funktion von *C/ebp α* und *Ppar γ* ²²⁷. Li *et. al* konnten an transgenen Mäusen zeigen, dass *Dkk1* die Osteoblasten-vermittelte Mineralisierung der Knochen hemmt und eine Überexpression von *Dkk1* erheblichen Knochenschwund verursachen kann. Die Zugabe von rekombinantem, humanem *DKK1* zu *in vitro* kultivierten murinen Osteoblasten hemmte die Differenzierung der Osteoblasten deutlich und verminderte die Mineralisierung dosisabhängig²²⁸. Die starke *MSX2* Expression in USSC könnte daran beteiligt sein, dass diese Zellen kein adipogenes Differenzierungspotential zeigten und, aufgrund der gehemmten *DKK1*-Expression, zur starken osteogenen Differenzierung fähig waren.

4.2 HOX-Genexpression

Die DAVID Analyse zeigte, dass die 271 Gene, die beim Vergleich von USSC zu CB-MSC signifikant unterschiedlich exprimiert wurden, vor allem bei entwicklungsbiologischen Prozessen und als Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen. In den 10 *GO Terms* mit den geringsten Überschreitungswahrscheinlichkeiten fanden sich mehr als 15 *HOX*-Gene (vergleiche Tab.6).

4.2.1 Die *HOX*-Genexpression in USSC, CB-MSC und KM-MSC

Unsere Arbeitsgruppe konnte 2010 zeigen, dass USSC *in vitro* im Gegensatz zu CB-MSC keine *HOX*-Gene exprimieren¹⁶⁵. Diese Eigenschaft haben sie mit embryonalen Stammzellen, iPS-Zellen und fötalem sowie adultem Lebergewebe gemeinsam. *HOX*-Cluster Analysen bestätigen die Unterteilung von Vorläuferzellen aus NSB in CB-MSC und USSC auf Grundlage ihres adipogenen Differenzierungspotentials und der *DLK1*-Expression¹⁶⁵. Analysen der *HOX*-Genexpression klonaler USSC, CB-MSC und KM-MSC gaben erneut Einsicht in die Heterogenität der Zelllinien. Nicht nur verschiedene CB-MSC oder KM-MSC Zelllinien zeigten, wie in Abbildung 23 dargestellt, eine unterschiedliche *HOX*-Genexpression, sondern auch diverse Klone einer Zelllinie. Dabei ähnelte das Expressionsmuster dem der Ursprungszelllinie, geringe Abweichungen waren jedoch möglich. Nicht klonale Zelllinien bestehen demnach aus verschiedenen Subpopulationen, die unterschiedliche *HOX*-Gene exprimieren können. Dabei kann ein Klon *HOX*-Gene exprimieren, deren Expression in der Ursprungslinie aufgrund der geringen Präsenz des Klons nicht detektiert wird. *HOX*-Genexpressionsschwankungen in nicht klonalen Linien könnten durch das Auswachsen und die Dominanz einzelner Klone innerhalb der Zelllinien begründet sein.

Obwohl Fibroblasten, die von anatomisch verschiedenen Stellen gewonnen wurden, in Kultur die gleiche Morphologie aufwiesen, zeigten sie doch große Unterschiede in der Genexpression und wiesen ihrer anatomischen Herkunft entsprechende *HOX*-Genexpressionsmuster auf^{229,230}. Auch aus verschiedenen Organen isolierte mesenchymale Vorläuferzellen, die von K. B. Ackema und J. Charité untersucht wurden, zeigten unterschiedliche topographische *Hox*-Codes²³¹. Die anatomische Herkunft der Zelle spiegelt sich diesen Ergebnissen zufolge in ihrem *Hox*-Code wider^{229,231,232}. Erkenntnisse von R. Morgan lassen vermuten, dass der *Hox*-Code einer Zelle im adulten Organismus den *Hox*-Code während der embryonalen Musterbildung widerspiegelt und somit Rückschlüsse auf den Ursprung der Zelle zulässt²³³. Demzufolge können nicht klonale Zelllinien aus mehreren Vorläuferzellen hervorgegangen sein, die einen anatomisch sehr ähnlichen, aber nicht unbedingt identischen Ursprung haben. Dies würde für verschiedene anatomische oder entwicklungsbiologische Ursprünge von USSC und CB-MSC beziehungsweise KM-MSC sprechen.

4.2.2 Die Generierung und Kultivierung unter 5% O₂ hatte Einfluss auf die *HOX*-Genexpression

Der Einfluss der Generierung und Kultivierung von Progenitorzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut unter 5% O₂ auf die *HOX*-Genexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht. Alle getesteten, unter 5% O₂ generierten Zelllinien exprimierten diverse Gene des *HOX* A- und D-Clusters (vergleiche Abb. 25). Nach 21-tägiger Kultivierung unter 21% O₂ regulierte die Zelllinie CB-H 3 die Expression der *HOX*-Gene rauf und initiierte die Expression von 3 *HOX*-Genen, während die anderen drei CB-H Linien ihre *HOX*-Genexpression reduzierten (CB-H 4) oder nahezu einstellten (CB-H 1 und CB-H 2). Wenn sich der *HOX*-Code der Zellen jedoch in Abhängigkeit von der umgebenden Sauerstoffkonzentration ändert, lässt er keine Rückschlüsse auf den Ursprung der Zellen zu.

CB-H Zelllinien, die eine sehr geringe *HOX*-Genexpression unter 21% O₂ zeigten, hatten auch weitere Eigenschaften, wie ein fehlendes adipogenes Differenzierungspotential und die *DLK1*-Expression mit USSC gemeinsam. Die einzige, unter 5% O₂ generierte Zelllinie CB-H 3, die keine *DLK1*-Expression zeigte, verstärkte ihre *HOX*-Genexpression bei Kultivierung unter 21% O₂ und zeigte adipogenes Differenzierungspotential ähnlich wie CB-MSK. Der *HOX*-Code von Zellen, die unter 5% O₂ generiert und kultiviert wurden, kann demzufolge nicht zur Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen *in vitro* herangezogen werden.

HOX-negative USSC zeigten keine Expression von *HOX*-Genen nach 21-tägiger Kultur unter 5% O₂. Wenn diese Zellsubpopulation erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt war (Generierung und Kultivierung bei 21% O₂), ist der Verlust der *HOX*-Genexpression nicht alleine durch Verminderung der Sauerstoffkonzentration reversibel, auch wenn die Expression anderer Gene, wie der des Wnt-Signalweges schon nach kurzer Kultivierung (4h) unter 5% O₂ wieder an die der CB-H Linien angeglichen werden kann (diskutiert in Kapitel 4.3.2). Dies sollte bei der Generierung von Progenitorzellen, die als Modellsystem oder zur Geweberegeneration verwendet werden sollen, vor allem aufgrund der aktuellen Forschungsergebnisse von Leucht und Kollegen, wonach der *Hox*-Code eine wesentliche Rolle beim *Engraftment* nach Zelltransplantation spielt, berücksichtigt werden²³².

4.2.3 Die *in vitro* Differenzierung hatte keinen einheitlichen Einfluss auf die *HOX*-Genexpression

Die Untersuchungen der *HOX*-Gene wurden durchgeführt, um einen Einblick in die *HOX*-Genexpression bei der *in vitro* Differenzierung zu erhalten. Hierzu ist in der Literatur nicht viel bekannt. Die Arbeit von Leucht und Kollegen gibt erste Hinweise darauf, dass die *Hox*-Genexpression das Differenzierungspotential *in vivo* beeinflusst ²³². *Hox*-negative murine Vorläuferzellen aus dem Unterkieferknochen adaptierten ein *Hox*-positives Expressionsmuster, nachdem sie in *Hox*-positives verletztes Gewebe des Schienbeins transplantiert wurden und trugen ferner zur Knochenregeneration bei. *Hox*-positive Progenitorzellen aus dem Schienbein, die in Bereiche des verletzten Unterkieferknochens transplantiert wurden, differenzierten hingegen zu Chondrozyten und hielten ihre *Hox*-Genexpression aufrecht ²³².

Es konnten keine *HOX*-Gene identifiziert werden, die während der Differenzierung *in vitro* einheitlich reguliert wurden. Alle *HOX*-positiven CB-MSC und KM-MSC exprimierten nach adipogener Differenzierung *in vitro* unter anderem die Gene *HOXA5*, *D8*, *C10*, *D10*. CB-MSC und KM-MSC zeigten nach chondrogener *in vitro* Differenzierung eine Abnahme der *HOX*-Gene des B- und C-Clusters. Die Expression der Gene *HOXA5-7*, *D8* und *D10* wurde in allen CB-MSC und KM-MSC während chondrogener Differenzierung aufrechterhalten. Insgesamt wurde die Expression der *HOX*-Gene 4-10 der Cluster A, C und D in der osteogenen Differenzierung von CB-MSC und KM-MSC *in vitro* ubiquitär eher stabilisiert, während die Gene 1-3 und 11-13 der *HOX*-Cluster zelllinienabhängig reguliert wurden (vergleiche Abb.24).

Beim Vergleich der *HOX*-Genexpression (analysiert in Kapitel 3.2.3) mit dem Differenzierungspotential *in vitro* (dargestellt in Kapitel 3.1.4) zeigte sich, dass für die chondrogene und osteogene Differenzierung von Progenitorzellen aus Nabelschnurblut *in vitro* eine Expression von *HOX*-Genen scheinbar nicht erforderlich ist, da alle *HOX*-negativen USSC dieses Potential ebenfalls zeigten. Drei der CB-H Linien, die unter 5% O₂ *HOX*-Genexpression zeigten, waren dessen ungeachtet sowohl unter 5% als auch unter 21% O₂ nicht zur adipogenen Differenzierung fähig (vergleiche Abb.11).

4.2.4 HOX-Genexpression ist induzierbar

Die direkte Ko-Kultur der *HOX*-positiven Zellpopulationen (CB-MSC und KM-MSC) mit *HOX*-negativen USSC wurde etabliert. Erste Ergebnisse sprechen für eine Adaptation der *HOX*-Genexpression von *HOX*-negativen USSC durch die direkte Ko-Kultur mit *HOX*-positiven CB-MSC oder KM-MSC. Eine indirekte Ko-Kultur mittels Transwells wurde in Vorversuchen ebenfalls durchgeführt, führte aber zu keiner Veränderung der *HOX*-Genexpression in USSC (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist der direkte Zell-Zellkontakt dazu erforderlich.

Initiiert die direkte Ko-Kultur die *HOX*-Genexpression der USSC, könnte das vermutlich auch Auswirkungen auf die Expression weiterer Gene, wie beispielsweise *DLK1* oder Wnt-assoziiierter Gene haben. Ist dies der Fall, zeigen USSC dann möglicherweise ein adipogenes Differenzierungspotential nach direkter Ko-Kultur? Die Ergebnisse der *in vitro* Differenzierung der CB-H Linien zeigten, dass die Expression verschiedener *HOX*-Gene alleine nicht ausreichend ist, um das Differenzierungspotential zu beeinflussen, da drei der CB-H Linien trotz *HOX*-Genexpression unter 5% O₂ weder unter 5% noch unter 21% O₂ zur adipogenen Differenzierung fähig waren.

4.2.5 Veränderungen im *HOX*-Code durch Sauerstoffkonzentration und Ko-Kultur

HOX-Gene sind im Bereich der regenerativen Medizin von Interesse, da ihre Funktion der Identitätszuweisung nicht nur auf die Embryogenese beschränkt ist, sondern auch gravierenden Einfluss auf die Zellregeneration und das Anwachsen von Transplantaten zu haben scheint²³². Die ständige Erneuerung eines Gewebes erfordert auch im adulten Organismus die Zuweisung von Position und Identität für neugebildete Zellen und macht die *HOX*-Genexpression zu einem möglichen Mechanismus, der auch lange nach der Geburt noch in diversen Geweben und Zelltypen von großer Bedeutung ist^{182,234}.

Da die direkte Ko-Kultur *in vitro* mit *HOX*-positiven Zellen Einfluss auf *HOX*-negative USSC zu haben scheint und in ihnen *HOX*-Genexpression initiiert, kann der *HOX*-Code von CB-MSC und KM-MSC vielleicht auch Aufschluss darüber geben, mit welchen Zellen sie *in vivo* Kontakt hatten. Dies könnte bedeuten, dass USSC *in vivo* bisher nur mit ebenfalls *HOX*-negativen Gewebe Kontakt hatten, oder sogar einen anderen anatomisch Ursprung haben als CB-MSC und KM-MSC. Die verschiedenen Subpopulationen, die aus Nabelschnurblut generiert werden können, spiegeln vielleicht unterschiedliche Entwicklungsstufen einer Vorläuferzelle oder aber den unterschiedlichen anatomischen Ursprung verschiedene Vorläuferzellen wieder.

Sind USSC sehr junge Vorläuferzellen, die noch nicht viel Kontakt zu Zellen außerhalb ihrer potentiellen Nische hatten? Möglicherweise beeinflusste aber auch eine andere physiologische Umgebung den *HOX*-Code der USSC, so wie es verschiedene Sauerstoffkonzentrationen *in vitro* tun. Die Beobachtung, dass einige *HOX*-positive CB-H Linien unter 21% O₂ ihre *HOX*-Genexpression nahezu einstellen, könnte auch bedeuten, dass USSC und CB-MSK *in vivo* unterschiedlichen Einflüssen ausgesetzt waren.

HOX-Genexpressionsanalysen unserer Gruppe an Primärkolonien aus Nabelschnurblut haben gezeigt, dass die gebildeten Primärkolonien bereits anhand der *HOX*-Genexpression in USSC und CB-MSK unterteilt werden können (Daten nicht gezeigt). Wenn die *HOX*-Genexpression jedoch bei der Generierung von Progenitorzellen aus Nabelschnurblut unter 21% O₂ noch vor der Primärkolonienbildung eingestellt wird, könnten USSC dann vorher *HOX*-positiv sein?

Da die *HOX*-Genexpression *in vivo* elementare Abläufe steuert, ist zu vermuten, dass dem Phänomen der Veränderung der *HOX*-Genexpression durch direkte Ko-Kultur und erhöhte Sauerstoffkonzentrationen eine biologische Funktion zugrunde liegt. *HOX*-Genexpression und die Fähigkeit diese zu initiieren, ist ein wichtiger Aspekt für die potentielle spätere Verwendung der Zellen in Transplantationen und dem Knochen-/ Knorpelersatz *in vivo*. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Regulation der *HOX*-Genexpression in Progenitorzellen durch verschiedene Sauerstoffkonzentrationen zu bestimmen, ihre Auswirkung auf das Differenzierungspotential zu evaluieren und die Bedeutung für den Einsatz der Zellen in der regenerativen Medizin zu klären.

4.3 Wnt-Genexpression

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist an der Steuerung vieler Prozesse während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus beteiligt. Von besonderem Interesse war daher die Analyse einzelner am Wnt-Signalweg beteiligter Gene in undifferenzierten und in *in vitro* differenzierten Zellen. Mögliche Zusammenhänge zwischen spezifischen Genexpressionsmustern und dem Differenzierungspotential der Zellen wurden untersucht.

4.3.1 USSC, CB-MSC und KM-MSC zeigten individuelle Unterschiede im Wnt-Genexpressionsmuster

Obwohl CB-MSC und KM-MSC gemeinsame Eigenschaften, wie adipogenes Differenzierungspotential und *HOX*-Genexpression haben, die sie nicht mit USSC teilen, wiesen die Populationen aus dem Nabelschnurblut im Wnt-Genexpressionsmuster mehr Übereinstimmungen auf. USSC und CB-MSC zeigten ein ähnliches Wnt-Genexpressionsprofil mit nur wenigen unterscheidenden Genen, wie beispielsweise *sFRP4*, welches stärker in USSC exprimiert wurde und *DKK1*, welches CB-MSC stärker exprimierten (vergleiche Abb.29).

KM-MSC exprimierten 14 Gene mehr als 4-fach unterschiedlich im Vergleich zu USSC und CB-MSC. *PITX2*, *WNT5B* und *FZD5* wurden dabei einheitlich von KM-MSC stärker exprimiert als in den Zellpopulationen aus dem Nabelschnurblut. CB-H Linien zeigten eine insgesamt stärkere Expression der 84 getesteten Gene im Vergleich zu USSC und CB-MSC, welche auch nach 4-tägiger Kultivierung der CB-H Linien in 21% O₂ bestehen blieb (vergleiche Abb.33A).

4.3.2 Kultivierung von USSC in 5% O₂ führte zu einer Angleichung des Wnt-Genexpressionsmusters an das der CB-H Linien

CB-H Linien zeigten im Vergleich zu USSC eine differentielle Expression von mehr als 40 und im Vergleich zu CB-MSC von 26 der 84 getesteten Gene. Fehrer *et al.* führten Genexpressionsanalysen an MSC aus Knochen durch, die unter 3% und 20% O₂ kultiviert wurden. Etwa 40 der 2244 stark unterschiedlich exprimierten Gene in den miteinander verglichenen Populationen gehörten dem Wnt-Signalweg an¹⁸⁸. Dies deutet auf einen Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Wnt-Genexpression hin, der für die unter 5% O₂ generierten CB-H Linien nicht reversibel scheint.

USSC zeigten bereits nach 4-stündiger Kultivierung in 5% O₂ eine deutlich höhere Genexpression von über 30 der 84 getesteten Gene (vergleiche Abb.VII). Das Genexpressionsmuster der USSC näherte sich nach 4-tägiger Kultivierung unter 5% O₂ dem der CB-H Linien an. Die differentielle Expression einzelner Gene, wie *sFRP4*, *CCND2*, *DKK1* und *WIF1*, blieb bestehen oder stellte sich spätestens nach 4 Tagen in 5% O₂ erneut ein (vergleiche Abb. 34B).

Die Kultivierung von Progenitorzellen aus Nabelschnurblut unter 5% O₂ hat großen Einfluss auf das Wnt-Genexpressionsprofil und vermutlich auch erhebliche Auswirkungen auf den Stoffwechsel und die weitere Genexpression der Zellen.

4.3.3 Analyse der Genexpression vor und nach chondrogener und osteogener Differenzierung

Ingenuity Pathway Analysen gaben Hinweise darauf, dass eine unterschiedliche Wnt-Genexpression Auswirkungen auf das Differenzierungspotential der Zellen haben könnte. USSC und CB-MSC zeigten **WNT5A** Expression an Tag 0. Die chondrogene und osteogene Differenzierung ging mit einer Runterregulation der *WNT5A* Expression einher (vergleiche Abb.35 und 39). *Wnt5a* wird während der Entwicklung der Extremitäten von Huhn und Maus in Bereichen der chondrogenen Kondensation exprimiert^{146,235}. *Wnt5a* verstärkt die chondrogene Differenzierung im frühen Stadium, unterdrückt aber die Hypertrophie der Chondrozyten durch die Inhibition von Runx2 über NF-kappaB²³⁵. Demzufolge ist eine basale Expression, wie in USSC und CB-MSC an Tag 0 detektiert, wahrscheinlich relevant für deren chondrogene Differenzierung. Eine Runterregulation wird in späteren Stadien der Chondrogenese und, da Runx2 auch essentiell ist für die osteogenen Differenzierung, auch mit osteogener Differenzierung erforderlich (vergleiche Abb.35 und 39).

Die Expression von **WNT9A** hingegen stieg in beiden Zelllinien mit chondrogener Differenzierung leicht an (vergleiche Abb.35). *Wnt9a* wird *in vivo* vor allem im Bereich des Mesenchyms, welches an die Chondrogenese angrenzt, und im Bereich der Gelenkbildung exprimiert, wo es die Chondrogenese inhibiert^{146,236}. Die Abbildungen der *Safranin-O/ Fast Green* gefärbten, chondrogen differenzierten Pellets von USSC und CB-MSC zeigten, dass die Zellen in der dreidimensionalen Pelletkultur nicht homogen differenzierten (vergleiche Abb.16). Einzelne, an chondrogen-differenzierende Zellen angrenzende Zellen könnten zeitweise Chondrogenese-inhibierende Gene, wie *WNT9A*, hochregulieren. Da nicht alle Zellen einer Pelletkultur gleichmäßig differenzieren, ist so auch eine Steigerung der Chondrogenese-inhibierenden Genexpression möglich.

Die Expression von **sFRP3** stieg mit chondrogener Differenzierung *in vitro* an. Die Expressionswerte nach osteogener Differenzierung waren ebenfalls bemerkenswert hoch (vergleiche Abb.35 und 40). *sfrp3* wird *in vivo* stark in Bereichen der Kondensation, sowie in prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten und im Periosteum exprimiert^{146,237}. Ein direkter Einfluss auf die Reifung und Funktion von Chondrozyten und dadurch auch auf die Skelettogenese von Säugetieren wurde bereits 1996 von Hoang *et. al* vermutet²³⁸. Chung *et al.* zeigten 2004 eine unerwartete Verstärkung der osteogenen Differenzierung von murinen Osteoblasten durch Zugabe von rekombinantem sFRP3²³⁹. Eine zugrundeliegende Selbstregulierung der *sFRP3*-Genexpression könnte das osteogene Potential der Zellen verstärken.

In vivo Experimente an *Knock-out* Mäusen weisen auf eine essentielle und redundante Funktion von **Lrp5** und **Lrp6** bei der Weiterleitung von Wnt-Signalen zur Osteoblastenbildung und Chondrogenese im Embryo hin²⁴⁰. USSC und CB-MSC zeigten eine negative Korrelation zwischen der chondrogenen und osteogenen Differenzierung und der Expression von *LRP5* und *LRP6* nach Differenzierung, welche vielleicht durch eine Autoregulation begründet sein könnte. Je weniger Rezeptoren für den kanonischen Signalweg zur Verfügung stehen, umso weniger inhibierenden Einfluss können Wnt-Proteine auf den Verlauf der Differenzierung nehmen. Zudem müssen stark differenzierte Zellen nicht mehr in dem Maße empfänglich für Signale anderer Zellen sein, da ihr Zellschicksal bereits feststeht/ vollzogen ist.

Insgesamt exprimierten USSC **DKK1** geringer als CB-MSC und KM-MSC. Während die *DKK1*-Expression in CB-MSC mit chondrogener Differenzierung bis zur Nachweißgrenze sank, ist sie nach der osteogenen Differenzierung der CB-MSC noch stark detektierbar. C-terminales Bindungsprotein (**CTBP1**) interagiert als Ko-Repressor mit Transkriptionsfaktoren verschiedener Signalwege (Wnt, Notch) und verhindert das Ablesen ihrer Zielgene^{134,241}. CTBP1 ist physiologisch reguliert und aktiver in Vorhautfibroblasten, die unter Hypoxie (1% O₂) kultiviert werden als unter Normoxie (21% O₂)²⁴². Dies wird durch die Beobachtung, dass die Überexpression von *CTBP1* den BMP-Signalweg inhibiert, während der *Knockdown* von *CTBP1* durch *small interfering* RNA die hypoxische Unterdrückung des BMP-Signalweges durch *CTBP1* verhindert, unterstützt²⁴³. CB-MSC zeigten für *CTBP1* ebenfalls eine starke Abnahme der Expression nach chondrogener, nicht jedoch nach osteogener Differenzierung. Osteogen differenzierte KM-MSC wiesen sogar einen Anstieg der *CTBP1* Genexpression auf. Die Expression von *CTBP1* nahm in USSC mit chondrogener und osteogener Differenzierung ab (vergleiche Abb. 36 und 41).

Die vermindert osteogen differenzierende CB-MSC 2 exprimierte als einzige Zelllinie aus Nabelschnurblut nach 14 Tagen osteogener Differenzierung eine erhöhte Menge **BMP4**. Zudem war sie auch die einzige Zelllinie neben KM-MSC deren **MYC** Expression nicht durch die osteogene Differenzierung stark runterreguliert wurde. Eine erfolgreiche osteogene Differenzierung hat anscheinend das Einstellen der **MYC**-Expression zur Folge. Ähnliches konnte auch für die chondrogene Differenzierung beobachtet werden. Myc spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von Stammzellen durch eine Kombination von microRNA und Transkriptionsfaktoren ²⁴⁴ und kann über eine Bindungsstelle in der humanen **BMP4** Promotorregion auch Einfluss auf die **BMP4** Genexpression nehmen ²⁴⁵.

Die für die chondrogene Differenzierung beschriebenen Markergene **SOX9**, **COMP** und **IGF1** wurden von USSC nach chondrogener Differenzierung deutlich erhöht exprimiert, während CB-MSC nur teilweise einen leichten Anstieg dieser Markergenexpression zeigten. Die Expressionslevel von Markergenen der osteogenen Differenzierung, wie **BSP**, **RUNX2** und **OSX**, waren in osteogen differenzierten CB-MSC höher als in USSC. Es ist jedoch bemerkenswert, dass USSC nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung, einen leichten Anstieg der **BSP**-Expression zeigten den sie nach 14 Tagen osteogener Differenzierung nicht zeigten.

USSC und CB-MSC zeigten ein chondrogenes Differenzierungspotential, welches auf Genexpressionsebene einheitlich mit der Abnahme der **WNT5A**, **LRP5**, **LRP6**, **DKK1**, **CTBP1** und **MYC**-Expression einherging. **WNT9A**, **sFRP3** und **SOX9**, **COMP** und **IGF1** hingegen wurden im Anschluss an die chondrogene Differenzierung stärker exprimiert. Die **sFRP4** Expression wurde durch die Differenzierung nur in undifferenziert schon stark **sFRP4** positiven USSC erhöht.

4.4 Überexpression von Schlüsselgenen

Die erfolgreiche Überexpression der Zellen mit **WIF1**, **BMP4** (vergleiche Abb.44 und Abb.46) oder **WNT3A** (Masterarbeit Fomin)¹⁸⁴ wurde auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen. Wie in Abbildung 48 dargestellt, zeigten **DLK1**-positive USSC auch nach **WIF1**, **BMP4** oder **WNT3A** Überexpression noch **DLK1**-Expression. Die **WIF1** Überexpression hatte dabei keinen einheitlichen Einfluss auf die **DLK1**-Expression, während die **BMP4** Überexpression zu einem Anstieg von **DLK1** führte. Die nativ nur sehr schwach **DLK1** exprimierende CB-MSC 2 zeigte die höchste **BMP4** Proteinmenge nach der Überexpression und wies ferner einen leichten Anstieg der **DLK1**-Expression auf. Die Überexpression von **WNT3A** hatte keine starke Änderung der **DLK1**-Expression zur Folge.

4.4.1 Die mit *WIF1*, *BMP4* oder *WNT3A* Überexpression einhergehenden Veränderungen in der Genexpression

Die Überexpression von *WIF1* und *BMP4* in USSC und CB-MSC hatte überwiegend eine Runterregulation der Expression der getesteten Gene zur Folge. Die Überexpression von *WNT3A* in USSC 1 und CB-MSC 1 führte zu einem Anstieg der *WIF1*, *COMP* und *BMP4* Expression und einer Expressionsabnahme von *SOX9* und *ACAN*.

4.4.2 Die Überexpression von *WIF1*, *BMP4* oder *WNT3A* hatte Einfluss auf das adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungspotential

Mit ***WIF1*** transduzierte CB-MSC wiesen ein starkes, **adipogenes Differenzierungspotential** auf und auch die Überexpression von *WIF1* in KM-MSC erhöhte das adipogene Differenzierungspotential dieser Zellen deutlich (vergleiche Abb.51 und 52). USSC waren nach der *WIF1* oder *BMP4* Überexpression unverändert nicht zur adipogenen Differenzierung fähig. Die Überexpression von ***BMP4*** hingegen hatte einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von Fettvakuolen in CB-MSC. Dies steht im Widerspruch mit der Beobachtung, dass BMPs die adipogene Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen induzieren und für die Differenzierung sogar erforderlich sind ²⁴⁶⁻²⁴⁸.

In USSC, CB-MSC und KM-MSC führte die Überexpression von ***WIF1*** zu einem erhöhten **osteogenen Differenzierungspotential**. *Wif1* inhibiert den Wnt-Signalweg *in vitro*, reduziert die Menge an β -Catenin im Zytosol und induziert so die Differenzierung von humanen und murinen Osteoblasten in Kultur ²⁴⁹. ***BMP4*** kann die Knochenbildung initiieren, auch wenn die Expression von *BMP4* für die Bildung des Skeletts nicht zwingend erforderlich ist ²⁵⁰. Die Überexpression von *BMP4* verstärkte das osteogene Differenzierungspotential der USSC und bewirkte in einer CB-MSC verändertes Wachstum. Durch dieses geänderte Wachstumsverhalten der CB-MSC 2 lässt die Methode der Quantifizierung in diesem Fall keine vergleichbare Aussage über das osteogene Differenzierungspotential zu.

Eine *Safranin-O/ Fast Green* Färbung im Anschluss an die **chondrogene Differenzierung** sollte Aufschluss über das chondrogene Differenzierungspotential geben. Zellen, die mit ***WIF1*** transduziert wurden, bildeten stabile Pellets in der chondrogene Differenzierung. Diese zeigten jedoch kaum positive *Safranin-O/ Fast Green* Färbung. Eine mögliche Erklärung liegt in der Methode der Färbung.

Der kationische *Safranin-O* Farbstoff färbt selektiv die Proteoglykane in Knorpelgewebe orange-rot. Proteoglykane sind Moleküle, die aus einem Protein und kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen bestehen. Die Farbintensität steigt proportional zur Menge der Glykosaminoglykane. Heparansulfat gehört ebenfalls zur Gruppe der Glykosaminoglykane, ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und kann durch die *epidermal growth factor (EGF)-like domains* Bindungsstellen II-V von WIF1 gebunden werden ²⁵¹. Wenn diese Bindungsstelle von WIF1 auch weitere Glykosaminoglykane binden kann, ist nicht auszuschließen, dass die Bindung des, durch Überexpression sehr stark vorhandenen Proteins WIF1 an die, durch chondrogene Differenzierung gebildete Glykosaminoglykane, eine Färbung durch den *Safranin-O* Farbstoff verhindert.

Während der Embryonalentwicklung des Huhns wird ***Bmp4*** in Regionen der Knorpelentwicklung, dem Perichondrium, exprimiert. Eine in diesen Regionen lokale Überexpression von *Bmp4* im Huhn führte zu einer Zunahme der extrazellulären Matrix und Chondrozytenzahl, vermutlich verursacht durch eine erhöhte Rekrutierung von Vorläuferzellen ²⁵². *BMP4* überexprimierende USSC und CB-MSC zeigten eine erhöhte Bildung von Proteoglykanen, die mittels *Safranin-O/ Fast Green* Färbung nachgewiesen werden konnte. Zudem wiesen auch randständige, in Mock-Kontrollzellen durchgehend nicht differenzierte Zellen eine positive Färbung auf.

WNT3A überexprimierende USSC und CB-MSC zeigten keine erfolgreiche chondrogene Differenzierung *in vitro* ¹⁸⁴. Die Runterregulation der *SOX9* Expression sowie die erhöhte Expression von *WIF1* könnten sich negativ auf das chondrogene Differenzierungspotential der Zellen auswirken.

Für die Kondensation *in vivo* sind ein Wachstumsarrest sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen erforderlich. Proteine wie N-cadherin sind von wesentlicher Bedeutung für die Adhäsion der Zellen bei der Kondensation und N-Cam für die Stabilisierung und Aufrechterhalten der Kondensation, was den Zellen erst ermöglicht dichte Aggregate zu bilden ¹⁴⁸. Kondensierte Zellen stoppen die Expression der Adhäsionsmoleküle und beginnen mit der Produktion der extrazellulären Matrix. Vermutlich wird die Bildung der Adhäsionsmoleküle durch die *WNT3A* Überexpression verhindert, was den Zerfall der Pelletkultur nach spätestens 10 Tagen zur Folge hat.

Eine weitere Erklärung könnte die Rekrutierung von β -Catenin durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges darstellen. β -Catenin kann als Ligand für APC und Cadherin dienen und bindet den Transkriptionsfaktor TCF^{111,253}. Als Komponente von Adhäsions-Verbindungen fördern α -Catenin und β -Catenin zusammen mit Cadherinen Zell-Zell-Kontakte und damit den interzellulären Zusammenhalt. Dabei liegt β -Catenin in stabiler, membran-assoziiierter Form vor²⁵⁴. Es ist möglich, dass die *WNT3A* Überexpression dazu führt, dass sowohl das zytosolische, als auch das membran-gebundene β -Catenin für den Wnt-Signalweg rekrutiert werden. Dabei könnte eine Veränderung des COOH Endes von β -Catenin den Verlust der Bindungskapazität zu Cadherin, nicht aber zu TCF bedingen, was eine Verschiebung der membran-assoziierten Form zur zytosolischen beziehungsweise nukleären Form zur Folge hätte²⁵³. β -Catenin stände dann nicht mehr für die Bildung von Zell-Zell-Kontakten zur Verfügung, was ebenfalls den Zerfall der Pelletkultur nach spätestens 10 Tagen erklären könnte.

Die Überexpression von *WIF1* oder *BMP4* führte zu einer Änderung der Genexpression, die das Differenzierungspotential der Zellen an Tag 0 beeinflusst und hat scheinbar zudem im Verlauf der Differenzierung hemmende oder aktivierende Auswirkungen. Die *WNT3A* Überexpression bewirkte erste chondrogenese inhibierende Genexpressionsveränderungen an Tag 0, die die chondrogene Differenzierung hemmten. Eine ähnlich Regulation der Genexpression und ist von Surmann-Schmitt *et. al* beobachtet worden²⁵⁵. Sie zeigten weiterhin, dass *Wif1* das Wachstum von mesenchymalen Vorläuferzellen beeinträchtigt und die *Wnt3a*-vermittelte Hemmung der Chondrogenese *in vitro* neutralisiert.

4.5 Fazit

Zurzeit wird die Nutzung von Vorläuferzellen verschiedener Gewebe als Modellsystem sowie zur klinischen Anwendung in der regenerativen Medizin angestrebt. Als sofort verfügbare junge Zellen, die in großer Anzahl bei gleichzeitigem Erhalt des Differenzierungspotentials produziert werden können und die *in vivo* keine Tumorbildung zeigen, bieten Progenitorzellen aus Nabelschnurblut im Vergleich zu mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark (KM-MSC) und (induziert-) pluripotenten Stammzellen entscheidende Vorteile für die präklinische und klinische Anwendung. Vor ihrer Anwendung müssen diese Zellen jedoch eingehend charakterisiert werden.

Das eingeschränkte adipogene Differenzierungspotential der unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) geht mit der Expression von *DLK1* einher, während *Cord blood-derived mesenchymal stromal cells* (CB-MSC) kaum *DLK1* exprimierten und zur adipogenen Differenzierung *in vitro* fähig sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei unter 5% O₂ generierten Zelllinien aus Nabelschnurblut eine inverse Korrelation zwischen der *DLK1*-Expression und adipogenem Differenzierungspotential besteht.

Während unter 21% O₂ generierte und kultivierte USSC scheinbar fähig sind die Wnt-Genexpression nach kurzer Kultivierung unter 5% O₂ zu (re-)aktivieren, gilt dies vermutlich nicht für die gesamte Genexpression. Die *HOX*-Genexpression der unter 5% O₂ generierten Zellen wird unter sauerstoffarmen Bedingungen stabilisiert, kann aber ersten Ergebnissen zufolge von *HOX*-negativen USSC nicht allein durch sauerstoffarme Kultivierung wieder aufgenommen werden, sondern bedarf des Kontaktes zu *HOX*-positiven Zellen. Dies könnte von Bedeutung sein für das Differenzierungspotential *in vivo* und damit für mögliche klinische Anwendungen.

Die Eigenschaften der verschiedenen Vorläuferzellen, die aus Nabelschnurblut generiert werden können, spiegeln vielleicht die unterschiedlichen Entwicklungsstufen einer Vorläuferzelle oder aber den unterschiedlichen anatomischen Ursprung verschiedener Vorläuferzellen wieder. Eine strikte Einteilung nach verifizierten Kriterien ist aufgrund der biologischen Varianz der Zellen schwierig.

5. Zusammenfassung

Humanes Nabelschnurblut (NSB) enthält morphologisch und immunphänotypisch nicht voneinander unterscheidbare, nicht-hämatopoetische Vorläuferzellpopulationen, wie unrestringierte somatische Stammzellen (USSC) und *Cord blood-derived mesenchymal stromal cells* (CB-MSC). Einhergehend mit der Expression des Adipogeneseinhibitors *DLK1* zeigen USSC kein adipogenes Differenzierungspotential, wohingegen CB-MSC kaum *DLK1* exprimieren und ein ähnlich starkes adipogenes Differenzierungspotential zeigen wie *Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells* (KM-MSC). USSC exprimieren im Gegensatz zu CB-MSC keine *HOX*-Gene. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Für die Nutzung der Vorläuferzellen zur präklinischen und klinischen Anwendung müssen diese Zellen eingehender charakterisiert werden.

Ein wichtiger Aspekt war die Rolle der Sauerstoffkonzentrationen während der Zellgenerierung und Kultivierung. Es besteht auch bei unter 5% O₂ generierten Zelllinien aus NSB (CB-H Linien) eine inverse Korrelation zwischen *DLK1*-Expression und adipogenem Differenzierungspotential. USSC, CB-MSC, CB-H Linien und klonale Linien aus NSB wurden im Vergleich zu KM-MSC *in vitro* charakterisiert. Zellpopulationen aus NSB zeigten ein höheres Wachstumspotential und längere Telomere als KM-MSC, da es sich um jüngere Zellen handelt. Die direkte Ko-Kultur von *HOX*-negativen mit *HOX*-positiven Zellen hatte die Induktion der *HOX*-Expression in gewöhnlich *HOX*-negativen USSC zur Folge. CB-H Linien exprimierten *HOX*-Gene, stellten dies aber unter 21% O₂ teilweise ein. Die Beeinflussbarkeit der *HOX*-Genexpression stellt in Frage, ob Rückschlüsse auf den entwicklungsbiologischen oder anatomischen Ursprung der Zellen aufgrund ihres *HOX*-Codes, zulässig sind.

Über die Kontrolle der Zielgenexpression kann der Wnt-Signalweg die Proliferation und Differenzierung regulieren. Die Analyse einzelner Signalmoleküle des Wnt-Signalweges basal und in *in vitro* Differenzierungen zeigte, dass beispielsweise die Gene *DKK1*, *sFRP4*, *MSX2*, *PITX2*, *WISP1* und *WIF1* in den verschiedenen Zellpopulationen unterschiedlich exprimiert werden. Die Expression von *WNT5A*, *sFRP3*, *sFRP4*, *CTBP1* und *MYC* wird durch chondrogene und osteogene Differenzierung *in vitro* beeinflusst. Die Überexpression von *WIF1*, *BMP4* oder *WNT3A* in den verschiedenen Zellpopulationen führte zu einer Veränderung der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungsstärke. Durch die gezielte Aktivierung (*WNT3A*) oder Hemmung (*WIF1*) des Wnt-Signalweges kann das Differenzierungsverhalten verschiedener Zellpopulationen beeinflusst werden. Die aktuellen Daten legen nahe, dass weitere Subpopulationen beziehungsweise verschiedene Entwicklungsstufen von Vorläuferzellen im NSB vorhanden sind.

6. Abstract

Human umbilical cord blood contains morphologically and immunophenotypically indistinguishable non-hematopoietic progenitor cell populations, such as unrestricted somatic stem cells (USSC) and cord blood-derived mesenchymal stromal cells (CB-MSC). Accompanied by the expression of *DLK1*, USSC show no adipogenic differentiation potential, whereas marginal *DLK1* expressing CB-MSC show a strong adipogenic differentiation potential similar to that of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (KM-MSC). USSC express no *HOX*-genes in contrast to CB-MSC. The underlying mechanisms are still mostly unknown. For preclinical and clinical use of these precursor cells, they must first be characterized in detail. Evaluating the role of oxygen concentrations during generation and cultivation of cells was an important issue.

An inverse correlation between the *DLK1* expression and the adipogenic differentiation potential could be shown for cell lines generated from cord blood in 5% O₂ (CB-H lines). USSC, CB-MSC, CB-H lines and clonal cell lines from cord blood were characterized in comparison to KM-MSC *in vitro*. Cell populations from cord blood showed higher growth potential and longer telomeres than KM-MSC, probably because they are younger cells. Co-culture of *HOX*-negative with *HOX*-positive cells resulted in the induction of *HOX*-gene expression in originally *HOX*-negative USSC. The expression of *HOX*-genes in CB-H lines was stopped after cultivation in 21% O₂. *HOX*-gene expression was alterable which brings up the question whether conclusions about the developmental or anatomical origin of a cell could be drawn from this.

The Wnt-signaling pathway affects cell proliferation and differentiation through the regulation of target gene expression. Analysis of Wnt-signaling pathway molecules in undifferentiated and *in vitro* differentiated cells showed genes like *DKK1*, *sFRP4*, *MSX2*, *PITX2*, and *WIF1*. *WISP1* differentially expressed in distinct cell populations. The expression of *WNT5A*, *sFRP3*, *sFRP4*, *CTBP1* and *MYC* is affected by chondrogenic and osteogenic differentiation *in vitro*. Overexpression of *WIF1*, *BMP4* or *WNT3A* resulted in a change of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation potential. By selective activation (*WNT3A*) or inhibition (*WIF1*) of Wnt-signaling pathway the differentiation potential of different cell populations can be manipulated. Current data suggest that more subpopulations or different stages of progenitor cells are available in cord blood.

7. Literaturverzeichnis

- 1 National Center for Biotechnology Information, Suchergebnis für "Stem cells" in PubMed.gov. (2011).
- 2 Wagner, J. E. & Gluckman, E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin Hematol* 47, 3-12 (2010).
- 3 Abdallah, B. M. & Kassem, M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J Cell Physiol* 218, 9-12 (2009).
- 4 (BMBF), B. f. B. u. F. Regenerative Medizin und Biologie Die Heilungsprozesse unseres Körpers verstehen und nutzen. (2005).
- 5 Wild, J. M. *et al.* 3D volume-localized pO₂ measurement in the human lung with ³He MRI. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 53, 1055-1064 (2005).
- 6 Roy, S. *et al.* Characterization of perceived hyperoxia in isolated primary cardiac fibroblasts and in the reoxygenated heart. *J Biol Chem* 278, 47129-47135 (2003).
- 7 Cipolleschi, M. G., Dello Sbarba, P. & Olivotto, M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82, 2031-2037 (1993).
- 8 Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M. & Papoutsakis, E. T. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* 81, 675-684 (2001).
- 9 Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M. & Papoutsakis, E. T. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 81, 685-696 (2001).
- 10 Bartels, R. & Bartels, H. Physiologie, Lehrbuch der Funktionen des menschlichen Körpers. Elsevier, München (2004).
- 11 Klinke, R. Physiologie. Thieme, Stuttgart (2005).
- 12 D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Roos, B. A. & Schiller, P. C. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone* 39, 513-522 (2006).
- 13 Grayson, W. L., Zhao, F., Bunnell, B. & Ma, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 948-953 (2007).
- 14 Santos, F. d. *et al.* Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *Journal of Cellular Physiology* 223, 27-35 (2010).
- 15 Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 285-296 (2008).
- 16 Carrancio, S. *et al.* Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Experimental Hematology* 36, 1014-1021 (2008).
- 17 Maitra, A. *et al.* Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37, 1099-1103 (2005).

- 18 Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N., Gokhale, P. J. & Andrews, P. W. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 13, 325-336 (2004).
- 19 Erdo, F. *et al.* Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 780-785 (2003).
- 20 Wu, D. C., Boyd, A. S. & Wood, K. J. Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Front Biosci* 12, 4525-4535 (2007).
- 21 Baker, D. E. *et al.* Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25, 207-215 (2007).
- 22 Arnhold, S., Klein, H., Semkova, I., Addicks, K. & Schraermeyer, U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4251-4255 (2004).
- 23 Zweiter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes (2007).
- 24 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676 (2006).
- 25 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872 (2007).
- 26 Wernig, M. *et al.* In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324 (2007).
- 27 Kim, J. B. *et al.* Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643 (2009).
- 28 Kim, J. B. *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136, 411-419 (2009).
- 29 Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317 (2007).
- 30 Park, I. H. *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146 (2008).
- 31 Mali, P. *et al.* Improved Efficiency and Pace of Generating Induced Pluripotent Stem Cells from Human Adult and Fetal Fibroblasts. *Stem Cells* 26, 1998-2005 (2008).
- 32 Lin, T. *et al.* A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature methods* 6, 805-808 (2009).
- 33 Brennand, K. J. *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473, 221-225 (2011).
- 34 Malgrange, B. *et al.* Using human pluripotent stem cells to untangle neurodegenerative disease mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 68, 635-649 (2011).
- 35 Saha, K. & Jaenisch, R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5, 584-595 (2009).
- 36 Gluckman, E. *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321, 1174-1178 (1989).
- 37 Johnson, F. L. Placental blood transplantation and autologous banking--caveat emptor. *J Pediatr Hematol Oncol* 19, 183-186 (1997).

- 38 Reimann, V., Creutzig, U. & Kogler, G. Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine. *Dtsch Arztebl Int* 106, 831-836 (2009).
- 39 Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74 (1997).
- 40 Erices, A., Conget, P. & Minguell, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242 (2000).
- 41 Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-247 (1968).
- 42 Owen, M. & Friedenstein, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136, 42-60 (1988).
- 43 Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650 (1991).
- 44 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).
- 45 Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301 (2006).
- 46 Battula, V. L. *et al.* Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 75, 279-291 (2007).
- 47 Bieback, K., Kern, S., Kocaomer, A., Ferlik, K. & Bugert, P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 18, S71-76 (2008).
- 48 Maharlooei, M. K. *et al.* Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 93, 228-34 (2011).
- 49 Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228 (2001).
- 50 Bianco, P., Robey, P. G., Saggio, I. & Riminucci, M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther* 21, 1057-1066 (2010).
- 51 Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317 (2006).
- 52 Kogler, G. *et al.* A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200, 123-135 (2004).
- 53 Aktas, M. *et al.* Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood. *Cytotherapy* 12, 338-348 (2010).
- 54 Kluth, S. M. *et al.* DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem Cells Dev.* 19, 1471-83 (2010).
- 55 Wacławczyk, S. *et al.* Hepatic differentiation of unrestricted somatic stem cells (USSC). *Human Gene Therapy* 20, 1400 (2009).
- 56 Wacławczyk, S., Buchheiser, A., Flögel, U., Radke, T. F. & Kögler, G. In vitro differentiation of unrestricted somatic stem cells into functional hepatic-like cells displaying a hepatocyte-like glucose metabolism. *J Cell Physiol* 225, 545-54 (2010).

- 57 Kogler, G., Critser, P., Trapp, T. & Yoder, M. Future of cord blood for non-oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 44, 683-697 (2009).
- 58 Jeltsch, K. S. *et al.* Unrestricted somatic stem cells: interaction with CD34+ cells in vitro and in vivo, expression of homing genes and exclusion of tumorigenic potential. *Cytotherapy* 13, 357-365 (2010).
- 59 Avanzini, M. A. *et al.* Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood- and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica* 94, 1649-1660 (2009).
- 60 Zhang, X. *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 112, 1206-1218 (2011).
- 61 Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. & Fortini, M. E. Notch signaling. *Science* 268, 225-232 (1995).
- 62 Gerhart, J. 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* 60, 226-239 (1999).
- 63 Glinka, A., Wu, W., Onichtchouk, D., Blumenstock, C. & Niehrs, C. Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517-519 (1997).
- 64 Meulmeester, E. & Ten Dijke, P. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol* 223, 205-218 (2010).
- 65 Sengupta, A. *et al.* Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* 21, 949-955 (2007).
- 66 Krause, D. S. & Van Etten, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353, 172-187 (2005).
- 67 Phay, J. E. & Shah, M. H. Targeting RET receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Clin Cancer Res* 16, 5936-5941 (2010).
- 68 Niemann, S. Tetra-Amelia Syndrome. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. Source GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2007 Aug 28 (1993).
- 69 Lewis, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570 (1978).
- 70 Seimiya, M., Ishiguro, H., Miura, K., Watanabe, Y. & Kurosawa, Y. Homeobox-containing genes in the most primitive metazoa, the sponges. *Eur J Biochem* 221, 219-225 (1994).
- 71 McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408 (1984).
- 72 Carrasco, A. E., McGinnis, W., Gehring, W. J. & De Robertis, E. M. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell* 37, 409-414 (1984).
- 73 Levine, M., Rubin, G. M. & Tjian, R. Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38, 667-673 (1984).
- 74 McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* 308, 428-433 (1984).

- 75 Homeodomains- Hox Genes - A short video about the homeodomain protein motif in Hox genes. <http://www.youtube.com/watch?v=gZtGrsr8DMY&NR=1> 18.04.2007 (2007).
- 76 Swalla, B. J. Building divergent body plans with similar genetic pathways. *Heredity* 97, 235-243 (2006).
- 77 Duboule, D. The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* 134, 2549-2560 (2007).
- 78 Ohno, S. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Semin Cell Dev Biol* 10, 517-522 (1999).
- 79 Kuraku, S. Hox gene clusters of early vertebrates: do they serve as reliable markers for genome evolution? *Genomics Proteomics Bioinformatics* 9, 97-103 (2011).
- 80 Duboule, D. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Dev Suppl*, 135-142 (1994).
- 81 McIntyre, D. C. *et al.* Hox patterning of the vertebrate rib cage. *Development* 134, 2981-2989 (2007).
- 82 Zhao, X. *et al.* Mutations in HOXD13 underlie syndactyly type V and a novel brachydactyly-syndactyly syndrome. *Am J Hum Genet* 80, 361-371 (2007).
- 83 Johnson, R. L., Riddle, R. D. & Tabin, C. J. Mechanisms of limb patterning. *Curr Opin Genet Dev* 4, 535-542 (1994).
- 84 Mastick, G. S., McKay, R., Oligino, T., Donovan, K. & Lopez, A. J. Identification of target genes regulated by homeotic proteins in *Drosophila melanogaster* through genetic selection of Ultrabithorax protein-binding sites in yeast. *Genetics* 139, 349-363 (1995).
- 85 Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452 (2003).
- 86 Takada, R. *et al.* Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* 11, 791-801 (2006).
- 87 Nusse, R. Wnt Homepage <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/> 01.09.2011
- 88 Shimizu, H. *et al.* Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8, 1349-1358 (1997).
- 89 Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, e115 (2006).
- 90 Wodarz, A. & Nusse, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59-88 (1998).
- 91 Tamai, K. *et al.* LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535 (2000).
- 92 Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B. & Baltimore, D. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119, 97-108 (2004).
- 93 Blitzer, J. T. & Nusse, R. A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biol* 7, 28 (2006).
- 94 Yamamoto, H., Komekado, H. & Kikuchi, A. Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell* 11, 213-223 (2006).

- 95 Yu, A. *et al.* Association of Dishevelled with the clathrin AP-2 adaptor is required for Frizzled endocytosis and planar cell polarity signaling. *Dev Cell* 12, 129-141 (2007).
- 96 Kuhl, M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 9, 967-974 (2004).
- 97 Slusarski, D. C., Corces, V. G. & Moon, R. T. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410-413 (1997).
- 98 Veeman, M. T., Axelrod, J. D. & Moon, R. T. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5, 367-377 (2003).
- 99 Ishitani, T. *et al.* The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399, 798-802 (1999).
- 100 MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26 (2009).
- 101 Tamai, K. *et al.* A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13, 149-156 (2004).
- 102 MacDonald, B. T., Yokota, C., Tamai, K., Zeng, X. & He, X. Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6. *J Biol Chem* 283, 16115-16123 (2008).
- 103 He, X., Semenov, M., Tamai, K. & Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/{beta}-catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677 (2004).
- 104 Zeng, X. *et al.* Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367-375 (2008).
- 105 Hart, M., de los Santos, R., Albert, I., Rubinfeld, B. & Polakis, P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8, 573 - 581 (1998).
- 106 Behrens, J. *et al.* Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280, 596-599 (1998).
- 107 Zeng, L. *et al.* The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* 90, 181-192 (1997).
- 108 Liu, C. *et al.* Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-847 (2002).
- 109 Peifer, M., Pai, L. M. & Casey, M. Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol* 166, 543-556 (1994).
- 110 Hart, M. *et al.* The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9, 207-210 (1999).
- 111 Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Munemitsu, S. & Polakis, P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* 270, 5549-5555 (1995).
- 112 Su, L. K., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262, 1734-1737 (1993).
- 113 Molenaar, M. *et al.* XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. *Cell* 86, 391-399 (1996).

- 114 Behrens, J. *et al.* Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642 (1996).
- 115 Huber, O. *et al.* Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10 (1996).
- 116 Cadigan, K. & Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286 - 3305 (1997).
- 117 Hobmayer, B. *et al.* WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 407, 186-189 (2000).
- 118 Kiecker, C. & Niehrs, C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in Xenopus. *Development* 128, 4189-4201 (2001).
- 119 Niehrs, C. On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development* 137, 845-857 (2010).
- 120 Wilson, S. I. *et al.* The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature* 411, 325-330 (2001).
- 121 Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. & Moon, R. T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in Xenopus embryos. *Mol Cell Biol* 15, 2625-2634 (1995).
- 122 Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804 (1997).
- 123 Hsieh, J. C. *et al.* A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431-436 (1999).
- 124 Liepinsh, E., Banyai, L., Patthy, L. & Otting, G. NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. *J Mol Biol* 357, 942-950 (2006).
- 125 Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E. & Lopez-Rios, J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease *J Cell Sci* 121, 737-746 (2008).
- 126 Galli, L. M. *et al.* Differential inhibition of Wnt-3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3. *Dev Dyn* 235, 681-690 (2006).
- 127 Glinka, A. *et al.* Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-362 (1998).
- 128 Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469-7481 (2006).
- 129 Mao, B. *et al.* Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664-667 (2002).
- 130 Lee, A. Y. *et al.* Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 1246-1250 (2004).
- 131 Chang, J. L., Chang, M. V., Barolo, S. & Cadigan, K. M. Regulation of the feedback antagonist naked cuticle by Wingless signaling. *Dev Biol* 321, 446-454 (2008).
- 132 Guo, J. *et al.* Mutations in the human naked cuticle homolog NKD1 found in colorectal cancer alter Wnt/Dvl/beta-catenin signaling. *PLoS One* 4, e7982 (2009).
- 133 Van Raay, T. J. *et al.* Naked1 antagonizes Wnt signaling by preventing nuclear accumulation of beta-catenin. *PLoS One* 6, e18650 (2011).

- 134 Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D. & Moon, R. T. XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 126, 3159-3170 (1999).
- 135 Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414 (2003).
- 136 Radtke, F. & Clevers, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-1909 (2005).
- 137 Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850 (2005).
- 138 Peifer, M. & Polakis, P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287, 1606-1609 (2000).
- 139 Battle, E. *et al.* Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-263 (2002).
- 140 Sansom, O. J. *et al.* Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18, 1385-1390 (2004).
- 141 DeLise, A. M., Fischer, L. & Tuan, R. S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 309-334 (2000).
- 142 Chung, U. I. Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr J* 51, 19-24 (2004).
- 143 Lefebvre, V. & Bhattaram, P. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol* 90, 291-317 (2010).
- 144 Chung, U. I., Kawaguchi, H., Takato, T. & Nakamura, K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci* 9, 410-414 (2004).
- 145 Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97, 33-44 (2006).
- 146 Witte, F., Dokas, J., Neuendorf, F., Mundlos, S. & Stricker, S. Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expression Patterns* 9, 215-223 (2009).
- 147 Coelho, C. N. & Kosher, R. A. Gap junctional communication during limb cartilage differentiation. *Dev Biol* 144, 47-53 (1991).
- 148 Hall, B. K. & Miyake, T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22, 138-147 (2000).
- 149 Ng, L. J. *et al.* SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183, 108-121 (1997).
- 150 Bastiaansen-Jenniskens, Y. M. *et al.* Proteoglycan production is required in initial stages of new cartilage matrix formation but inhibits integrative cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med* 3, 117-123 (2009).
- 151 Jenniskens, Y. M. *et al.* Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF2. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1136-1146 (2006).
- 152 Guo, X., Mak, K. K., Taketo, M. M. & Yang, Y. The Wnt/beta-catenin pathway interacts differentially with PTHrP signaling to control chondrocyte hypertrophy and final maturation. *PLoS One* 4, e6067 (2009).

- 153 Hill, T. P., Spater, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. & Hartmann, C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8, 727-738 (2005).
- 154 Mundlos, S. *et al.* Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773-779 (1997).
- 155 Karsenty, G. & Wagner, E. F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2, 389-406 (2002).
- 156 Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754 (1997).
- 157 Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29 (2002).
- 158 Glass, D. A., 2nd *et al.* Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8, 751-764 (2005).
- 159 Glass, D. A., 2nd & Karsenty, G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 148, 2630-2634 (2007).
- 160 Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T. & Helms, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87, 57-66 (1999).
- 161 Sandberg, M. M., Aro, H. T. & Vuorio, E. I. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res*, 292-312 (1993).
- 162 Vortkamp, A. *et al.* Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev* 71, 65-76 (1998).
- 163 Aktas, M., Radke, T. F., Strauer, B. E., Wernet, P. & Kogler, G. Separation of adult bone marrow mononuclear cells using the automated closed separation system Sepax. *Cytotherapy* 10, 203-211 (2008).
- 164 Radke, T. F. *et al.* GMP-Conform Generation and Cultivation of Unrestricted Somatic Stems Cells (USSC) from Cord Blood Using the SEPAX(C)-Separation Method a Closed Culture System Applying Cell Stacks. *ASH Annual Meeting Abstracts* 110, 1211- (2007).
- 165 Liedtke, S. *et al.* The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood. *Stem Cell Res* (2010).
- 166 Kogler, G. *et al.* A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200, 123-135 (2004).
- 167 Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry* 329, 77-84 (2004).
- 168 Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034 (2002).
- 169 SABiosciences RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (2011).
- 170 Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196, 947-950 (1987).
- 171 Geyh, S. Differenzierungspotential klonaler Unrestringierter Stammzellen. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika Diplomarbeit* (2009).

- 172 Buchheiser, A. *et al.* Cord Blood as a Very Valuable Source of Neonatal Cells but Embryonic-Like Nature Reevaluated. *Blood* 112, 997; abstract. (2008).
- 173 Liedtke, S., Enczmann, J., Wacławczyk, S., Wernet, P. & Kogler, G. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* 1, 364-366 (2007).
- 174 Liedtke, S., Stephan, M. & Kogler, G. Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biol Chem* 389, 845-850 (2008).
- 175 Hennicke, T. Identifizierung molekularer Marker der chondrogenen Differenzierung bei mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarks (MSC) im Vergleich zu unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und MSC des Nabelschnurblutes *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika Diplomarbeit (2011).
- 176 Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M. & Vortkamp, A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3, 439-449 (2002).
- 177 Bialek, P. *et al.* A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 6, 423-435 (2004).
- 178 Zhou, G. *et al.* Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19004-19009 (2006).
- 179 Dong, Y. F. *et al.* Transforming growth factor-beta and Wnt signals regulate chondrocyte differentiation through Twist1 in a stage-specific manner. *Mol Endocrinol* 21, 2805-2820 (2007).
- 180 Gene Ontology website <http://www.geneontology.org/> (2011).
- 181 Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29 (2000).
- 182 Wang, K. C., Helms, J. A. & Chang, H. Y. Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends Cell Biol* 19, 268-275 (2009).
- 183 Ingenuity Systems, I. Ingenuity Pathways Analysis (IPA) http://www.ingenuity.com/products/pathways_analysis.html (2011).
- 184 Fomin, A. Characterization of cord blood derived stem cells overexpressing genes of the WNT-signaling pathway. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika Masterarbeit (2011).
- 185 Ma, T., Grayson, W. L., Frohlich, M. & Vunjak-Novakovic, G. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol Prog* 25, 32-42 (2009).
- 186 Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636 (1965).
- 187 Collado, M. & Serrano, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6, 472-476 (2006).
- 188 Fehrer, C. *et al.* Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6, 745-757 (2007).
- 189 Dimri, G. P., Testori, A., Acosta, M. & Campisi, J. Replicative senescence, aging and growth-regulatory transcription factors. *Biological signals* 5, 154-162 (1996).

- 190 Vaziri, H. *et al.* Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9857-9860 (1994).
- 191 Allsopp, R. C. *et al.* Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220, 194-200 (1995).
- 192 Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405-413 (1985).
- 193 Greider, C. W. & Blackburn, E. H. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337 (1989).
- 194 Nakamura, T. M. *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959 (1997).
- 195 Amit, M. *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278 (2000).
- 196 Marion, R. M. *et al.* Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 141-154 (2009).
- 197 Yehezkel, S. *et al.* Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 6, 63-75 (2011).
- 198 Floridon, C. *et al.* Does Fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation* 66, 49-59 (2000).
- 199 Smas, C. M. & Sul, H. S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725-734 (1993).
- 200 Kaneta, M. *et al.* A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* 164, 256-264 (2000).
- 201 Carlsson, C. *et al.* Growth hormone and prolactin stimulate the expression of rat preadipocyte factor-1/delta-like protein in pancreatic islets: molecular cloning and expression pattern during development and growth of the endocrine pancreas. *Endocrinology* 138, 3940-3948 (1997).
- 202 Okamoto, M., Takemori, H., Halder, S. K., Nonaka, Y. & Hatano, O. Implication of ZOG protein (zona glomerulosa-specific protein) in zone development of the adrenal cortex. *Endocrine research* 24, 515-520 (1998).
- 203 Halder, S. K. *et al.* Cloning of a membrane-spanning protein with epidermal growth factor-like repeat motifs from adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 139, 3316-3328 (1998).
- 204 Larsen, J. B. *et al.* Fetal antigen 1 and growth hormone in pituitary somatotroph cells. *Lancet* 347, 191 (1996).
- 205 Smas, C. M., Chen, L. & Sul, H. S. Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 17, 977-988 (1997).
- 206 Sul, H. S. Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol* 23, 1717-25 (2009).
- 207 Greschat, S. *et al.* Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype. *Stem Cells Dev* 17, 221-232 (2008).
- 208 Covas, D. T. *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 36, 642-654 (2008).

- 209 Handschel, J. *et al.* Comparison of Ectopic Bone Formation of Embryonic Stem Cells and Cord Blood Stem Cells In Vivo. *Tissue Eng Part A* 16, 2475-83 (2010).
- 210 Mackay, A. M. *et al.* Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4, 415-428 (1998).
- 211 Ylostalo, J., Bazhanov, N. & Prockop, D. J. Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Exp Hematol* 36, 1390-1402 (2008).
- 212 Krenz, T. Generierung und Charakterisierung klonaler unrestringierter somatischer Stammzellen (USSC) aus dem Nabelschnurblut und Analyse des mesodermalen Differenzierungspotentials. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika Masterarbeit* (2009).
- 213 Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 (Pt 7), 1161-1166 (2000).
- 214 Ren, H. *et al.* Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 12-21 (2006).
- 215 Yang, D. C. *et al.* Hypoxia Inhibits Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells through Direct Regulation of RUNX2 by TWIST. *PLoS One* 6, e23965 (2011).
- 216 Park, J. H., Park, B. H., Kim, H. K., Park, T. S. & Baek, H. S. Hypoxia decreases Runx2/Cbfa1 expression in human osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol* 192, 197-203 (2002).
- 217 Tuncay, O. C., Ho, D. & Barker, M. K. Oxygen tension regulates osteoblast function. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 105, 457-463 (1994).
- 218 Zahm, A. M., Bucaro, M. A., Srinivas, V., Shapiro, I. M. & Adams, C. S. Oxygen tension regulates preosteocyte maturation and mineralization. *Bone* 43, 25-31 (2008).
- 219 Ontiveros, C., Irwin, R., Wiseman, R. W. & McCabe, L. R. Hypoxia suppresses runx2 independent of modeled microgravity. *J Cell Physiol* 200, 169-176 (2004).
- 220 Salim, A., Nacamuli, R. P., Morgan, E. F., Giaccia, A. J. & Longaker, M. T. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 279, 40007-40016 (2004).
- 221 Utting, J. C. *et al.* Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res* 312, 1693-1702 (2006).
- 222 Guo, K. T., Fu, P., Tonn, J. C. & Schichor, C. Wnt-inhibitor DKK1 (Dickkopf 1) expression is determined by intercellular crosstalk and hypoxia in malignant gliomas. *62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), Joint Meeting mit der Polnischen Gesellschaft für Neurochirurgen (PNCH). Hamburg, 07.-11.05.2011. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House* (2011).
- 223 Prockop, D. J., Gregory, C. A. & Spees, J. L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11917-11923 (2003).
- 224 Gregory, C. A., Singh, H., Perry, A. S. & Prockop, D. J. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 278, 28067-28078 (2003).

- 225 Shao, J. S. *et al.* Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 115, 1210-1220 (2005).
- 226 Qadir, A. S. *et al.* Msx2 is required for TNF-alpha-induced canonical Wnt signaling in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 408, 399-404 (2011).
- 227 Ichida, F. *et al.* Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279, 34015-34022 (2004).
- 228 Li, J. *et al.* Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 39, 754-766 (2006).
- 229 Chang, H. Y. *et al.* Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12877-12882 (2002).
- 230 Rinn, J. L., Bondre, C., Gladstone, H. B., Brown, P. O. & Chang, H. Y. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2, e119 (2006).
- 231 Ackema, K. B. & Charite, J. Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev* 17, 979-991 (2008).
- 232 Leucht, P. *et al.* Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development* 135, 2845-2854 (2008).
- 233 Morgan, R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet* 22, 67-69 (2006).
- 234 Akam, M. Hox genes: from master genes to micromanagers. *Curr Biol* 8, R676-678 (1998).
- 235 Bradley, E. W. & Drissi, M. H. WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF-kappaB pathways. *Mol Endocrinol* 24, 1581-1593 (2010).
- 236 Spater, D. *et al.* Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. *Development* 133, 3039-3049 (2006).
- 237 Enomoto-Iwamoto, M. *et al.* The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev Biol* 251, 142-156 (2002).
- 238 Hoang, B., Moos, M., Jr., Vukicevic, S. & Luyten, F. P. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to Drosophila frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Biol Chem* 271, 26131-26137 (1996).
- 239 Chung, Y. S. *et al.* Effects of secreted frizzled-related protein 3 on osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res* 19, 1395-1402 (2004).
- 240 Joeng, K. S., Schumacher, C. A., Zylstra-Diegel, C. R., Long, F. & Williams, B. O. Lrp5 and Lrp6 redundantly control skeletal development in the mouse embryo. *Dev Biol* 359, 222-9 (2011).
- 241 Morel, V. *et al.* Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in Drosophila. *Curr Biol* 11, 789-792 (2001).
- 242 Mroz, E. A., Baird, A. H., Michaud, W. A. & Rocco, J. W. COOH-terminal binding protein regulates expression of the p16INK4A tumor suppressor and senescence in primary human cells. *Cancer Res* 68, 6049-6053 (2008).
- 243 Wu, X., Chang, M. S., Mitsialis, S. A. & Kourembanas, S. Hypoxia regulates bone morphogenetic protein signaling through C-terminal-binding protein 1. *Circ Res* 99, 240-247 (2006).

- 244 Dong, J. *et al.* c-Myc regulates self-renewal in bronchoalveolar stem cells. *PLoS One* 6, e23707 (2011).
- 245 Katoh, Y. & Katoh, M. Comparative genomics on BMP4 orthologs. *Int J Oncol* 27, 581-585 (2005).
- 246 Kang, Q. *et al.* A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 18, 545-559 (2009).
- 247 Bowers, R. R., Kim, J. W., Otto, T. C. & Lane, M. D. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13022-13027 (2006).
- 248 Huang, H. *et al.* BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12670-12675 (2009).
- 249 Kansara, M. *et al.* Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J Clin Invest* 119, 837-851 (2009).
- 250 Wang, E. A. *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2220-2224 (1990).
- 251 Malinauskas, T., Aricescu, A. R., Lu, W., Siebold, C. & Jones, E. Y. Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1. *Nat Struct Mol Biol* 18, 886-893 (2011).
- 252 Duprez, D. *et al.* Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev* 57, 145-157 (1996).
- 253 Gottardi, C. J. & Gumbiner, B. M. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 167, 339-349 (2004).
- 254 Bienz, M. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* 15, R64-67 (2005).
- 255 Surmann-Schmitt, C. *et al.* Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis. *J Cell Sci* 122, 3627-3637 (2009).

8. Anhang

8.1 Anhang

Tab.I: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien die aus Nabelschnurblut und Knochenmark generiert wurden. Klarnamen der Zelllinien.

	USSC		Klonale USSC		Klonale CB-MSC		KM-MSC
1	SA 8/77N	1	SA 11/05B KB	1	SA 6/51 A10	1	KM Bous.1
2	SA 5/73	2	SA 11/11A KA	2	SA 6/51 B1	2	KM 9/16
3	SA 8/25	3	SA 11/07B KB	3	SA 6/51 B4	3	KM 8/06
4	SA 4/101	4	SA 5/73 A1	4	SA 6/51 B6	4	KM 9/14
5	SA 5/03	5	SA 5/73 A2	5	SA 6/51 C1	5	KM Bous.2
	CB-MSC	6	SA 5/73 A3	6	SA 6/51 C2	6	KM 120
1	SA 6/51	7	SA 5/73 A4	7	SA 6/51 D9	7	KM 111
2	USSC 120A	8	SA 5/73 A5	8	USSC 63 B10	8	KM 201
3	USSC 63	9	SA 5/73 A8	9	USSC 63 C4	9	KM 114
4	SA 335	10	SA 5/73 B1	10	USSC 63 E11		KM-H Linien
	CB-H Linien	11	SA 5/73 B3			1	KM Bous.2 H
1	SA 8/77H	12	SA 5/73 C4			2	KM 9/01 H
2	SA 8/43H	13	SA 5/73 C8			3	KM 201 H
3	SA 8/58H						
4	SA 9/22H						

Tab.II: Gene des Wnt-Signalweges auf dem PCR Array

SABiosciences PCR Array Catalog #PAHS-043				
Unigene	GenBank	Symbol	Definition	Alternative Namen/ Symbole
Hs.515053	NM_001130	AES	Amino-terminal enhancer of split	AES-1/AES-2/ESP1/GRG/GRG5/TLE5
Hs.158932	NM_000038	APC	Adenomatous polyposis coli	BTPS2/DP2/DP2.5/DP3/GS
Hs.592082	NM_003502	AXIN1	Axin 1	AXIN/MGC52315
Hs.415209	NM_004326	BCL9	B-cell CLL/lymphoma 9	LGS/MGC131591
Hs.643802	NM_033637	BTRC	Beta-transducin repeat containing	BETA-TRCP/FBW1A/FBXW1/FBXW1A/FWD1/MGC4643/bTrCP/bTrCP1/betaTrCP
Hs.17631	NM_003468	FZD5	Frizzled family receptor 5	C2orf31/DKFZp434E2135/HFZ5/MGC129692
Hs.523852	NM_053056	CCND1	Cyclin D1	BCL1/D11S287E/PRAD1/U21B31
Hs.376071	NM_001759	CCND2	Cyclin D2	KIAK0002/MGC102758
Hs.534307	NM_001760	CCND3	Cyclin D3	-
Hs.529862	NM_001892	CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1	CK1/HLCDGP1/PRO2975
Hs.631725	NM_001893	CSNK1D	Casein kinase 1, delta	HCKID
Hs.646508	NM_022048	CSNK1G1	Casein kinase 1, gamma 1	-
Hs.644056	NM_001895	CSNK2A1	Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	CK2A1/CKII
Hs.208597	NM_001328	CTBP1	C-terminal binding protein 1	BARS/MGC104684
Hs.501345	NM_022802	CTBP2	C-terminal binding protein 2	-
Hs.476018	NM_001904	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	CTNNB/DKFZp686D02253/FLJ25606/FLJ37923
Hs.463759	NM_020248	CTNNBIP1	Catenin, beta interacting protein 1	ICAT/MGC15093
Hs.12248	NM_025212	CXXC4	CXXC finger protein 4	IDAX/MGC149872
Hs.654934	NM_014992	DAAM1	Dishevelled associated activator of morphogenesis 1	FLJ41657/KIAA0666
Hs.655626	NM_033425	DIXDC1	DIX domain containing 1	CCD1/KIAA1735
Hs.40499	NM_012242	DKK1	Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK-1/SK
Hs.74375	NM_004421	DVL1	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	DVL/DVL1L1/MGC54245
Hs.118640	NM_004422	DVL2	Dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)	-
Hs.517517	NM_001429	EP300	E1A binding protein p300	KAT3B/RSTS2/p300
Hs.484138	NM_012300	FBXW11	F-box and WD repeat domain containing 11	BTRC2/BTRCP2/FBW1B/FBXW1B/Fbw11/Hos/KIAA0696
Hs.494985	NM_012164	FBXW2	F-box and WD repeat domain containing 2	FBW2/Fwd2/MGC117371/Md6
Hs.1755	NM_002007	FGF4	Fibroblast growth factor 4	HBGF-4/HST/HST-1/HSTF1/K-FGF/KFGF
Hs.283565	NM_005438	FOSL1	FOS-like antigen 1	FRA/FRA1/fra-1
Hs.663679	NM_003593	FOXN1	Forkhead box N1	FKHL20/ONU/WHN
Hs.126057	NM_005479	FRAT1	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas	FLJ97193
Hs.128453	NM_001463	FRZB	Frizzled-related protein	FRE/FRITZ/FRP-3/FRZB-1/FRZB-PEN/FRZB1/FZRB/OS1/SF RP3/SRFP3/hFIZ
Hs.36975	NM_000510	FSHB	Follicle stimulating hormone, beta polypeptide	-
Hs.94234	NM_003505	FZD1	Frizzled family receptor 1	DKFZp564G072/FLJ95923
Hs.142912	NM_001466	FZD2	Frizzled family receptor 2	Fz2/fz-2/fzE2/hFz2

Unigene	GenBank	Symbol	Definition	Alternative Namen/ Symbole
Hs.40735	NM_017412	FZD3	Frizzled family receptor 3	Fz-3
				CD344/EVR1/FEVR/FZD4S/ Fz-
Hs.19545	NM_012193	FZD4	Frizzled family receptor 4	4/FzE4/GPCR/MGC34390
Hs.591863	NM_003506	FZD6	Frizzled family receptor 6	FZ6/HFZ6
Hs.173859	NM_003507	FZD7	Frizzled family receptor 7	FzE3
Hs.302634	NM_031866	FZD8	Frizzled family receptor 8	FZ-8/hFZ8
Hs.466828	NM_019884	GSK3A	Glycogen synthase kinase 3 alpha	DKFZp686D0638
Hs.445733	NM_002093	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	-
Hs.714791	NM_002228	JUN	Jun proto-oncogene	AP-1/AP1/c-Jun
			Kringle containing transmembrane protein 1	
Hs.229335	NM_001039570	KREMEN1		FLJ31863/KREMEN/KRM1
				DKFZp586H0919/FLJ4639 0/TCF10/TCF1ALPHATCF7 L3
Hs.555947	NM_016269	LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	
				BMND1/EVR1/EVR4/HBML R3/LRP7/OPPG/OPS/OPTA 1/VBCH2
Hs.6347	NM_002335	LRP5	Low density lipoprotein receptor-related protein 5	
			Low density lipoprotein receptor-related protein 6	
Hs.584775	NM_002336	LRP6		ADCAD2/FLJ90062/FLJ904 21
Hs.202453	NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MRTL/bHLHe39/c-Myc
Hs.592059	NM_033119	NKD1	Naked cuticle homolog 1 (Drosophila)	FLJ11639/FLJ13722/FLJ20 269/Naked1
Hs.208759	NM_016231	NLK	Nemo-like kinase	DKFZp761G1211/FLJ2103 3
				ARP1/Brx1/IDG2/IGDS/IGD S2/IHG2/IRID2/MGC11102 2/MGC20144/Otlx2/PTX2/R GS/RIEG/RIEG1/RS
Hs.643588	NM_000325	PITX2	Paired-like homeodomain 2	
Hs.386453	NM_022825	PORCN	Porcupine homolog (Drosophila)	DHOF/FODH/MG61/MGC29 687/PORC/PPN/por
Hs.483408	NM_002715	PPP2CA	Protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme	PP2Ac/PP2CA/PP2Calpha/ RP-C
				MGC786/PP2A-
Hs.467192	NM_014225	PPP2R1A	Protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	Aalpha/PP2AAALPHA/PR65 A
Hs.256587	NM_015617	PYGO1	Pygopus homolog 1 (Drosophila)	DKFZp547G0910
				ARHU/CDC42L1/DJ646B1 2.2/FLJ10616/WRCH1/fJ64 6B12.2/hG28K
Hs.647774	NM_021205	RHOU	Ras homolog gene family, member U	
			SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2	
Hs.401388	NM_021627	SEN2		AXAM2/DKFZp762A2316/KI AA1331/SMT3IP2
Hs.713546	NM_003012	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	FRP/FRP- 1/FRP1/FrzA/SARP2
Hs.658169	NM_003014	SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4	FRP-4/FRPHE/MGC26498
			F-box and WD repeat domain containing 4	
Hs.500822	NM_022039	FBXW4		DAC/FBW4/FBWD4/SHFM3 /SHSF3
Hs.728760	NM_004252	SLC9A3R1	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1	EBP50/NHERF/NHERF1/N PHLOP2
Hs.98367	NM_022454	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	FLJ22252/MUR3
Hs.389457	NM_003181	T	T, brachyury homolog (mouse)	MGC104817/TFT
			Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	
Hs.573153	NM_003202	TCF7		FLJ36364/MGC47735/TCF- 1

Unigene	GenBank	Symbol	Definition	Alternative Namen/ Symbole
Hs.516297	NM_031283	TCF7L1	Transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	TCF-3/TCF3
Hs.197320	NM_005077	TLE1	Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)	ESG/ESG1/GRG1
Hs.332173	NM_003260	TLE2	Transducin-like enhancer of split 2 (E(sp1) homolog, Drosophila)	ESG/ESG2/FLJ41188/GRG2
Hs.284122	NM_007191	WIF1	WNT inhibitory factor 1	WIF-1
Hs.492974	NM_003882	WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	CCN4/FLJ14388/WISP1c/WISP1i/WISP1tc
Hs.248164	NM_005430	WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	INT1
Hs.121540	NM_025216	WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A	FLJ14301/SSPS
Hs.108219	NM_004626	WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11	HWNT11/MGC141946/MGC141948
Hs.272375	NM_057168	WNT16	Wingless-type MMTV integration site family, member 16	-
Hs.567356	NM_003391	WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2	INT1L1/IRP
Hs.258575	NM_004185	WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	WNT13/XWNT2
Hs.445884	NM_030753	WNT3	Wingless-type MMTV integration site family, member 3	INT4/MGC131950/MGC138321/MGC138323
Hs.336930	NM_033131	WNT3A	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A	MGC119418/MGC119419/MGC119420
Hs.25766	NM_030761	WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4	SERKAL/WNT-4
Hs.696364	NM_003392	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	hWNT5A
Hs.306051	NM_032642	WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	MGC2648
Hs.29764	NM_006522	WNT6	Wingless-type MMTV integration site family, member 6	-
Hs.72290	NM_004625	WNT7A	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	-
Hs.512714	NM_058238	WNT7B	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B	-
Hs.591274	NM_058244	WNT8A	Wingless-type MMTV integration site family, member 8A	WNT8D
Hs.149504	NM_003395	WNT9A	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A	MGC138165/MGC141991/WNT14
Hs.728776	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	L13A/TSTA1

Tab.III: Liste der unterschiedlich exprimierten Gene in Streudiagrammen

Gene die in USSC stärker exprimiert wurden als in CB-MSC		Gene die in USSC geringer exprimiert wurden als in CB-MSC		Gene die in USSC stärker exprimiert wurden als in KM-MSC		Gene die in USSC geringer exprimiert wurden als in KM-MSC	
Regulierung	Gen	Regulierung	Gen	Regulierung	Gen	Regulierung	Gen
5,5	WSP1	-4,2	MYC	4,0	TCF7	-4,6	FZD5
6,0	SFRP4	-4,2	SOX17	4,6	WNT3	-7,8	RHOU
		-4,7	PITX2	6,4	WNT16	-12,1	WNT5B
		-4,9	WNT16	7,5	WNT5A	-57,7	DKK1
		-23,3	DKK1	12,3	SFRP1	-209,9	PITX2
				17,0	MYC		
				22,7	CCND2		
				49,6	JUN		
				59,0	CTBP1		
Gene die in USSC stärker exprimiert wurden als in CB-H		Gene die in CB-MSC stärker exprimiert wurden als in CB-H					
Regulierung	Gen	Regulierung	Gen				
6,2	SFRP4	/	/				
Gene die in USSC geringer exprimiert wurden als in CB-H		Gene die in CB-MSC geringer exprimiert wurden als in CB-H		Gene die in CB-MSC stärker exprimiert wurden als in KM-MSC		Gene die in CB-MSC geringer exprimiert wurden als in KM-MSC	
Regulierung	Gen	Regulierung	Gen	Regulierung	Gen	Regulierung	Gen
-4,1	FBXW4	-4,1	SENP2	6,1	CCND2	-4,2	FZD5
-4,2	CSNK1A1	-4,1	WNT5B	20,3	WNT5A	-4,2	SFRP4
-4,2	WNT16	-4,2	CCND3	26,1	SFRP1	-4,3	NKD1
-4,4	FOSL1	-4,2	CSNK1D	27,2	JUN	-5,4	WNT5B
-4,4	TLE1	-4,3	FZD4	31,6	WNT16	-9,1	WSP1
-4,8	CTBP2	-4,3	CSNK1A1	71,2	MYC	-12,8	RHOU
-5,2	WNT2B	-4,3	FZD1	212,8	CTBP1	-44,3	PITX2
-5,3	AXIN1	-4,4	TCF7				
-5,6	EP300	-4,7	CSNK1G1				
-5,6	CSNK1D	-4,8	MYC				
-5,8	TCF7	-5,1	WNT3				
-5,9	PPP2CA	-5,2	DKK1				
-6,0	DIXDC1	-5,2	DIXDC1				
-6,0	FZD1	-6,0	NKD1				
-6,1	APC	-6,2	WNT5A				
-6,2	FZD7	-6,3	WNT2B				
-6,3	WSP1	-6,6	WIF1				
-6,4	PORCN	-6,8	FZD3				
-6,5	SENP2	-7,7	LEF1				
-6,7	CTNBN1	-9,3	CTBP1				
-6,9	LRP6	-9,9	WSP1				
-7,5	CCND3	-10,5	JUN				
-8,2	NKD1	-12,1	LRP5				
-8,7	FZD4	-15,9	WNT11				
-9,3	PITX2	-28,3	RHOU				
-9,3	CCND1	-43,3	WNT7B				
-9,4	LRP5						
-11,0	JUN						
-12,2	CSNK1G1						
-12,8	WNT5B						
-17,1	WIF1						
-17,3	WNT11						
-18,8	LEF1						
-21,0	WNT4						
-31,9	WNT5A						
-43,2	RHOU						
-43,5	MYC						
-54,3	CTBP1						
-124,5	DKK1						
-360,4	WNT7B						

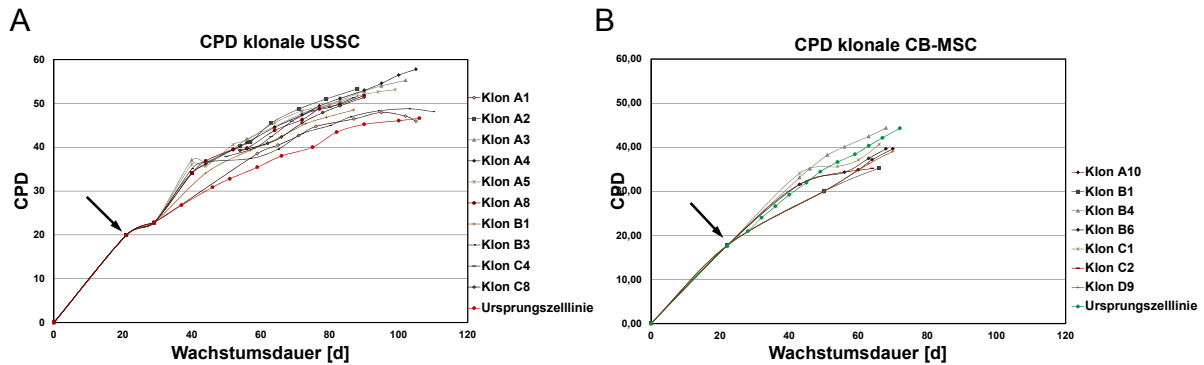


Abb.I: Wachstumskinetik von klonalen Zelllinien im Vergleich zur Ursprungszelllinie. Dargestellt ist das Wachstumsverhalten der Ursprungszelllinie und verschiedener Zellklone nach ihrer Generierung (Pfeil). Wachstumsverhalten einer USSC (A) und einer CB-MSC (B) und jeweiliger Klone.

Während die USSC Ursprungszelllinie insgesamt 45 CPD bis Tag 90 durchlief, erreichten die entsprechenden Klone einen durchschnittlichen Wert von 51 CPD ($\pm 2,1$) in 90 ($\pm 2,6$) Tagen (Abb.I A). Die Ursprungszelllinie durchlief insgesamt 47 CPD in 106 Tagen. Klon B3 konnte am längsten kultiviert werden (110 Tage), wies aber mit maximal 49 CPD nicht die höchste Anzahl an CPD auf. Die CB-MSC Ursprungszelllinie erreichte insgesamt 50 CPD in 124 Tagen. Ihre Klone wiesen einen ähnlichen Wachstumsverlauf auf (Abb.I B). Nach 51 Tagen erreichte die CB-MSC Ursprungszelllinie 35 CPD, während die entsprechenden klonalen Linien einen durchschnittlichen Wert von 35 CPD ($\pm 0,5$) in 59 ($\pm 6,8$) Tagen durchliefen.

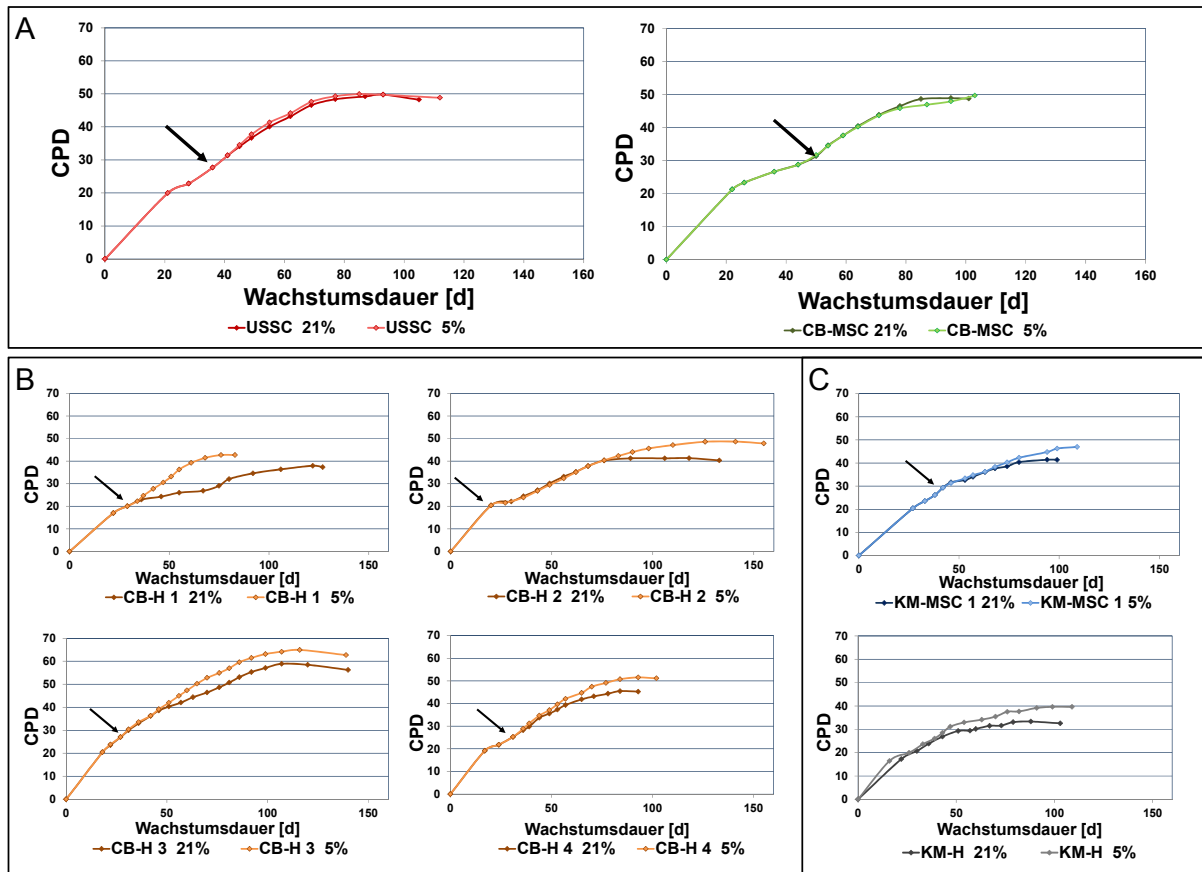


Abb.II: Die Wachstumskinetik von CB-H und KM-H Linien ist von der umgebenden Sauerstoffkonzentration beeinflusst. Charakteristischer Wachstumsverlauf von USSC und CB-MSC bei Kultivierung in 5% und 21% O₂. Abbildung A zeigt beispielhaft die Wachstumskinetik von USSC 2 und CB-MSC 1 (A). Der Wachstumsverlauf von vier CB-H Linien unter 5% und 21% O₂ ist in Abbildung B dargestellt. Abbildung C zeigt den Wachstumsverlauf von KM-MSC 4 die bei 21% O₂ generiert und von Passage 4 an parallel in 5% O₂ kultiviert wurde sowie den Wachstumsverlauf von KM-MSC 5 und KM-H 1, die unter Standard-Zellkulturbedingungen (21% O₂) und physiologischen Bedingungen (5% O₂) aus einem Präparat generiert werden konnten. Der Pfeil markiert den jeweiligen Beginn der Kultivierung in 5% O₂.

USSC 2 und CB-MSC 1 wurden in **21% O₂ generiert** und kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde ab Passage 3 – 4 (Abb.II A Pfeil) parallel in **5% O₂ kultiviert**. Drei USSC und drei CB-MSC konnten weitere 81 (+/- 5,9) Tage in **5% O₂ kultiviert** werden, ohne dass die PD über mehrere Passagen stagnierten oder abnahmen. Dabei erreichten die Linien maximale CPD Werte die sich in Abhängigkeit von der umgebenden Sauerstoffkonzentration um durchschnittlich 0,7 (+/- 0,5) CPD unterschieden.

CB-H Linien wurden unter **5% O₂ generiert** und ein Teil der Zellen spätestens ab Passage 3 (Pfeil) unter **21% O₂ kultiviert**. Sie wurden zwischen 62 und 122 Tagen unter **21% O₂ kultiviert**. Die Wachstumsdauer in 21% Sauerstoff war in der Hälfte der getesteten Linien kürzer, in den anderen beiden CB-H Linien länger als in 5% O₂ (Abb.II B).

Unter **21% O₂** generierte KM-MSC (n=3) wuchsen in **5% O₂** kultiviert durchschnittlich weitere 65 Tage (+/- 4). KM-H Linien (n=3) durchliefen im gleichen Zeitraum durchschnittlich 1,9 (+/- 1,7) CPD mehr als die jeweilige KM-MSC (Abb.II C).

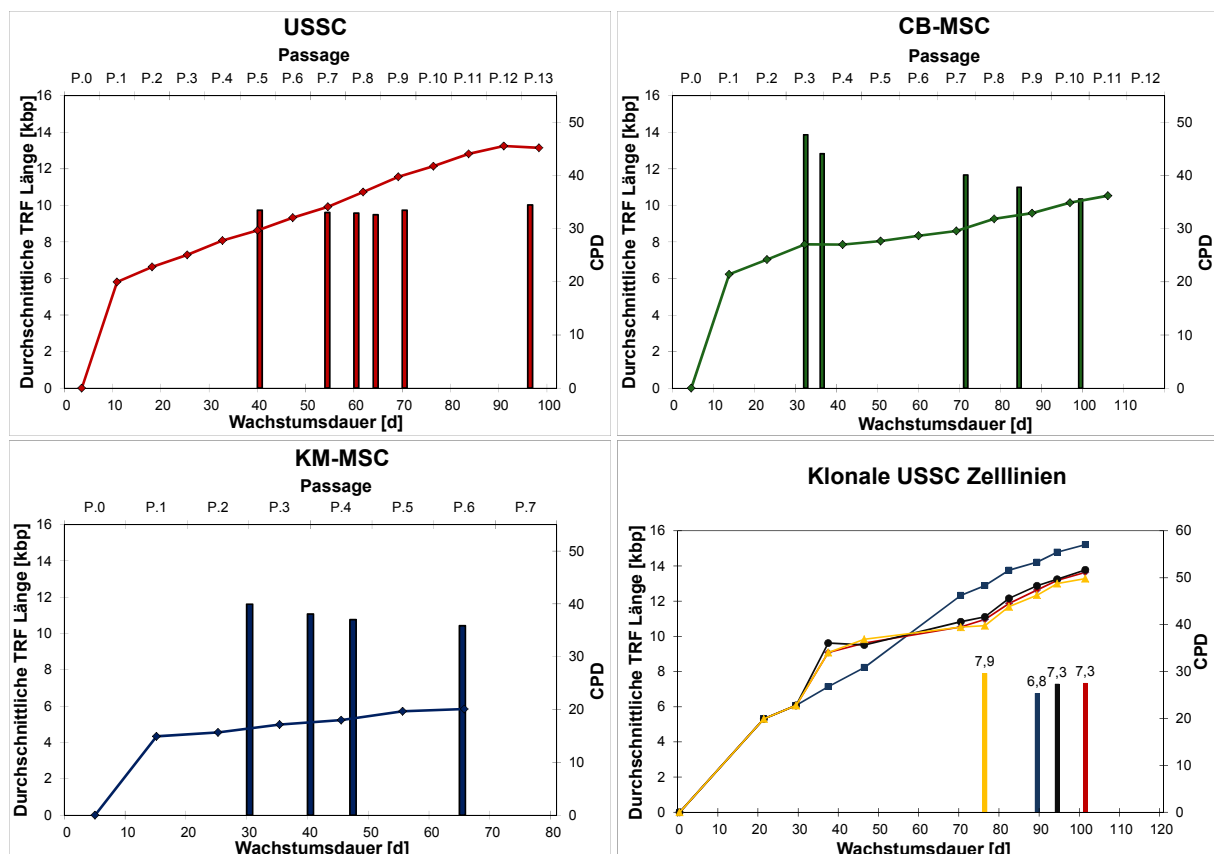


Abb.III: Durchschnittliche TRF Längenverteilung während der Kultivierung. Die Grafiken zeigen die charakteristische Längenverteilung terminaler Restriktionsfragmente (TRF) in USSC, CB-MSC und KM-MSC. Es sind beispielhaft die durchschnittlichen TRF Längen mehrerer klonaler USSC einer Ursprungszelllinie dargestellt. Legende: Klon A8 gelb, Klon A4 rot, Klon A5 schwarz, Klon B4 blau. Die Wachstumskinetik als CPD wurde gegen die ermittelte durchschnittliche TRF Länge [kbp] über die Dauer der Kultivierung [d] aufgetragen.

Abbildung III zeigt beispielhaft TRF Längen in verschiedenen Wachstumsphasen einer USSC, CB-MSC und KM-MSC sowie von 4 klonalen Zelllinien einer USSC in jeweils einem Wachstumsstadium.

In Passage 8 betrug die durchschnittliche TRF Länge der klonalen Zelllinie A8 (gelb) 7,9 kbp. Parallel zur Wachstumskurve von Zellklon A8 wächst Zellklon A4. Die klonale Zelllinie wies in Passage 12 nach 51,14 CPD eine durchschnittliche TRF Länge von 7,3 kbp auf und wuchs bis Passage 15 weiter (rot). Die klonale Zelllinie A5 beendete ihr Wachstum bereits in Passage 13. Sie erreicht in Passage 11 nach 49,67 CPD eine durchschnittliche TRF Länge

von 7,3 kbp (schwarz). USSC Klon B4 zeigte eine schnellere Verdopplung als die drei anderen Linien und wies nach 53,31 CPD eine TRF Länge von 6,8 kbp auf (blau) (Abb.III)

Die durchschnittlichen TRF Längen waren in klonalen Linien die in gleicher Passage mehr CPD erreicht hatten geringer als in klonalen Linien gleicher Passage, die weniger CPD durchlaufen hatten.

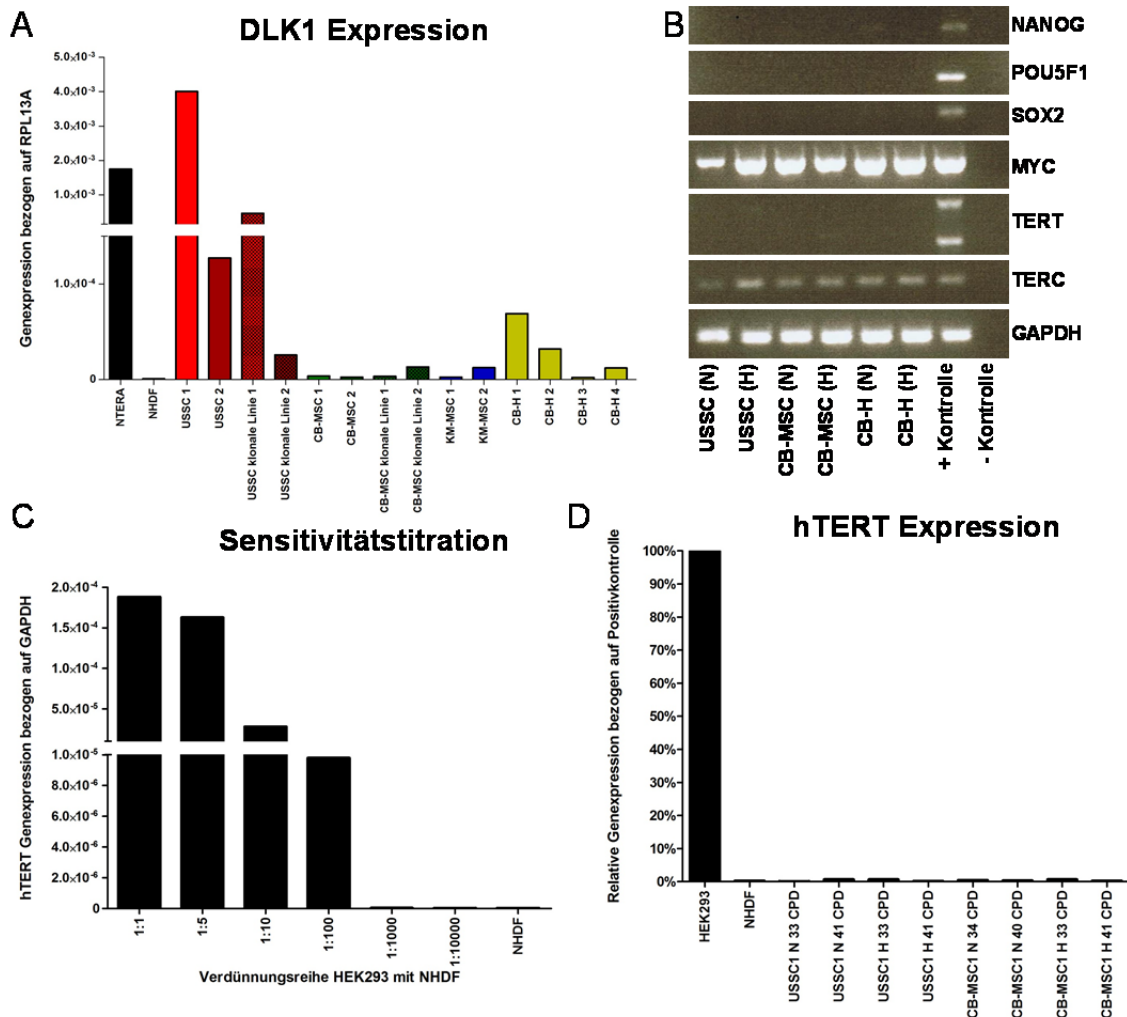


Abb.IV: USSC, CB-MSC und CB-H Linien unterscheiden sich in ihrer *DLK1*-Expression und exprimieren keine Pluripotenzmarker. Abbildung A zeigt *real-time* PCR Daten zur *DLK1*-Expression. Sie diente als Unterscheidungskriterium zwischen USSC und CB-MSC. (B) RT-PCR Analysen zur Bestimmung der Expression von Stammzellmarkern (*NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*, *MYC*) und der katalytische Untereinheit der humanen Telomerase sowie der RNA Komponente der Telomerase (*TERT* und *TERC*) in USSC, CB-MSC und CB-H Linien. Als Positivkontrolle diente HEK293 cDNA, die Negativkontrolle wurde mit Wasser als Template durchgeführt (C). Nachweis der *TERT* Expression mittels *real-time* PCR. Quantitative Sensitivitätstiteration von HEK293 Zellen mit NHDF812 Zellen zur Bestimmung der Nachweisgrenze von *TERT*. (D) Quantitativer Nachweis der Expression von *TERT* in einer USSC und einer CB-MSC in jeweils zwei Passagen. Die Zellen wurden sowohl unter 5% O₂, als auch unter 21% O₂ kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten. Die Expression in der Positivkontrolle HEK293 wurde als 100% definiert. Als Negativkontrolle wurden NHDF-Zellen verwendet.

Die PCR-Bedingungen und Primer wurden so gewählt, dass eine Unterscheidung der Spleißvarianten von *TERT* möglich war. Nur das volle Transkript, aber keine der Spleißvarianten (α -, β - und α + β -Deletion) ist Teil der aktiven Telomerase. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden *TERT*-positive HEK293 Zellen, die als Positivkontrolle in der PCR dienten, mit *TERT*-negativen NHDF-Zellen verdünnt. Abbildung IV C zeigt die gemessene Expression von *TERT*. Die Nachweisgrenze lag zwischen 1: 1000 und 1: 10.000 (HEK293: NHDF812).

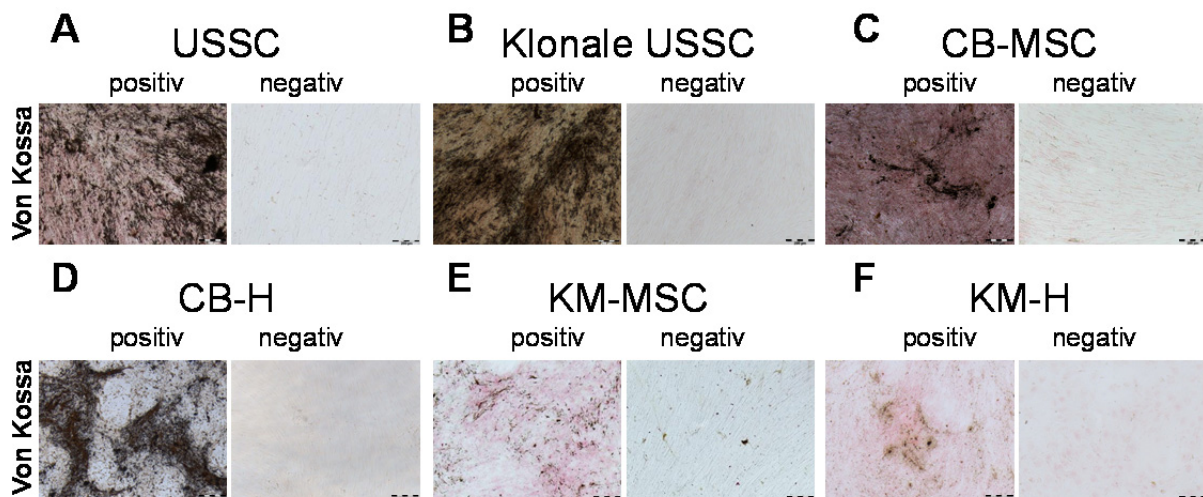


Abb.V: Osteogene Differenzierung. Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Silbernitrat gefärbten Zellen nach 14-tägiger osteogener Differenzierung (positiv) und nicht induziert (negativ). Der Maßstab beträgt 200 µm.

Abbildung V zeigt beispielhaft eine Linie jeder Population nach von Kossa-Färbung.

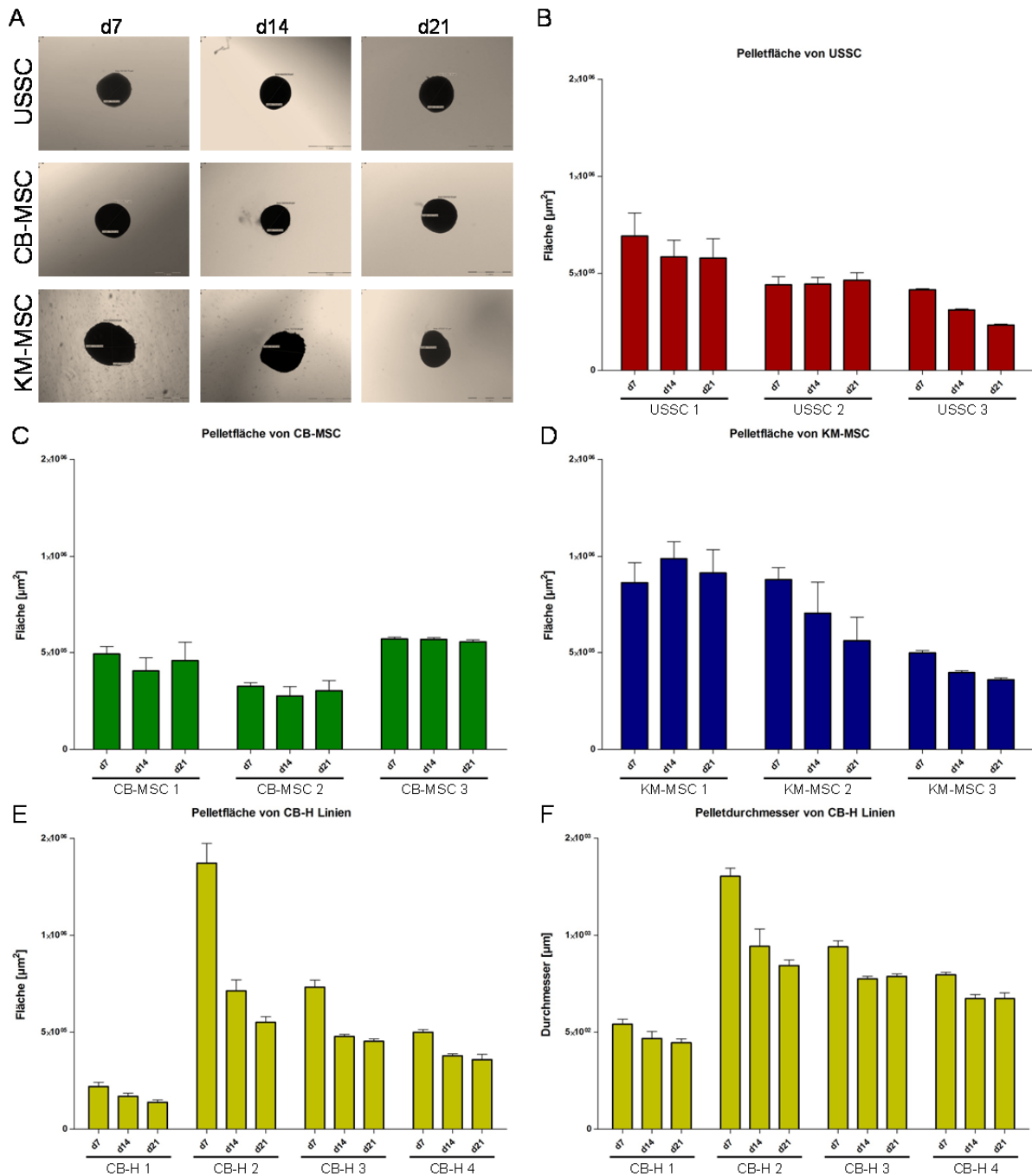


Abb.VI: Vermessung des dreidimensionalen Zellverbands (Pelletkultur). Während der 21 Tage andauernden Differenzierung wurden alle sieben Tage Durchmesser (µm) und Fläche (µm²) der Pellets am AVISO *CellCelector*TM dokumentiert (A). Der Maßstab beträgt 1 mm. Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Flächen (µm²) der Pellets von USSC (B), CB-MSC (C) und KM-MSC (D) an den Zeitpunkten d7, d14 und d21 in chondrogener Differenzierung. (E,F) Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Durchmesser (µm) respektive Flächen (µm²) der Pellets der vier CB-H Linien CB-H 1-4 in chondrogener Differenzierung unter 5% O₂ an den Zeitpunkten d7, d14 und d21.

Zwei der drei USSC zeigten eine anfänglich starke Flächenabnahme der Pellets um durchschnittlich 105843 µm² (+/- 2153), auf 79,7% (+/- 4,7%) die sich zwischen Tag 14 und 21 leicht geschwächt auf 69,9% der ursprünglichen Größe fortsetzte. Die dritte USSC wies keine signifikanten Veränderungen auf (Abb.VI B). Die Pelletflächen von zwei der CB-MSC

verringerten sich von Tag sieben zu Tag 14 auf durchschnittlich 83,4% (+/- 1,1%) der ursprünglichen Größe, nahmen aber bis Tag 21 wieder auf 92,9% (+/- 0,2%) zu. Die Pellets einer CB-MSC unterlagen einer effektiven Abnahme von durchschnittlich 2,3% (Abb.VI C). KM-MSC bildeten die Pellets mit der größten Fläche ($\emptyset$ 747708 μm^2 ; +/- 24%), gefolgt von USSC ($\emptyset$ 516610 μm^2 ; +/- 24%) und CB-MSC ($\emptyset$ 463436 μm^2 ; +/- 22%). Bei KM-MSC 2 und 3 verringerte sich der Pelletdurchmesser von Tag 7 bis 21 kontinuierlich (Abb.VI D). Die Ausgangsgrößen der Pellets nach sieben Tagen (Durchmesser und Fläche) variierten stark innerhalb der CB-H Linien. In Abbildung VI E und F ist zu erkennen, dass sich Durchmesser und Fläche aller Pellets der CB-H Zelllinien über die Differenzierung verringerten. Es kam dabei zu einem Rückgang der Fläche um insgesamt 28% – 60%.

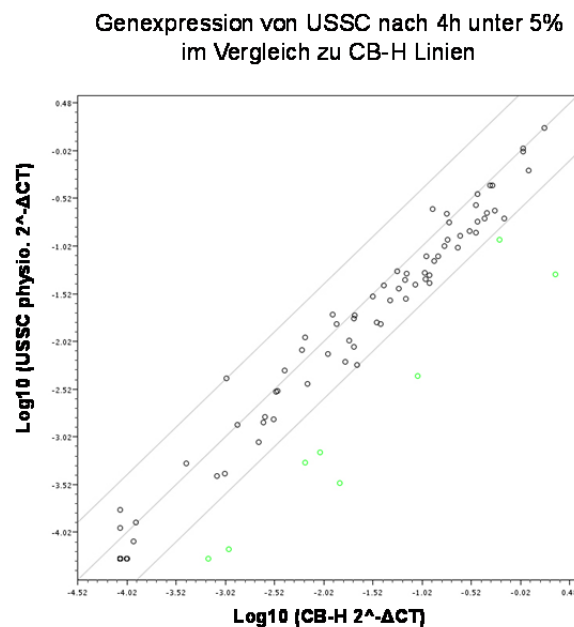


Abb.VII: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpressionsmuster der USSC. Die Abbildung zeigt die Genexpression von USSC nach vier Stunden Kultur unter 5% O₂ im Vergleich zu CB-H Linien (jeweils n=2). Die Ergebnisse der Auswertung wurden in einem Streudiagramm dargestellt. Der Schwellwert wurde auf 4 festgelegt. Von USSC stärker exprimierte Gene wurden rot, geringer exprimierte grün dargestellt.

Nach vierstündiger Kultivierung unter physiologischen Bedingungen zeigten USSC im Vergleich zu CB-H Linien acht Gene mehr als 4-fach differentiell exprimiert. Alle acht Gene wurden von CB-H Linien stärker exprimiert als von USSC. Zu den unterschiedlich exprimierten Genen zählten die Wnt-Gene *WNT5B*, *WNT7B* und *WNT11*, die Inhibitoren *DKK1*, *WIF1* und *NKD1* sowie die Gene *LEF1* und *RHO*.

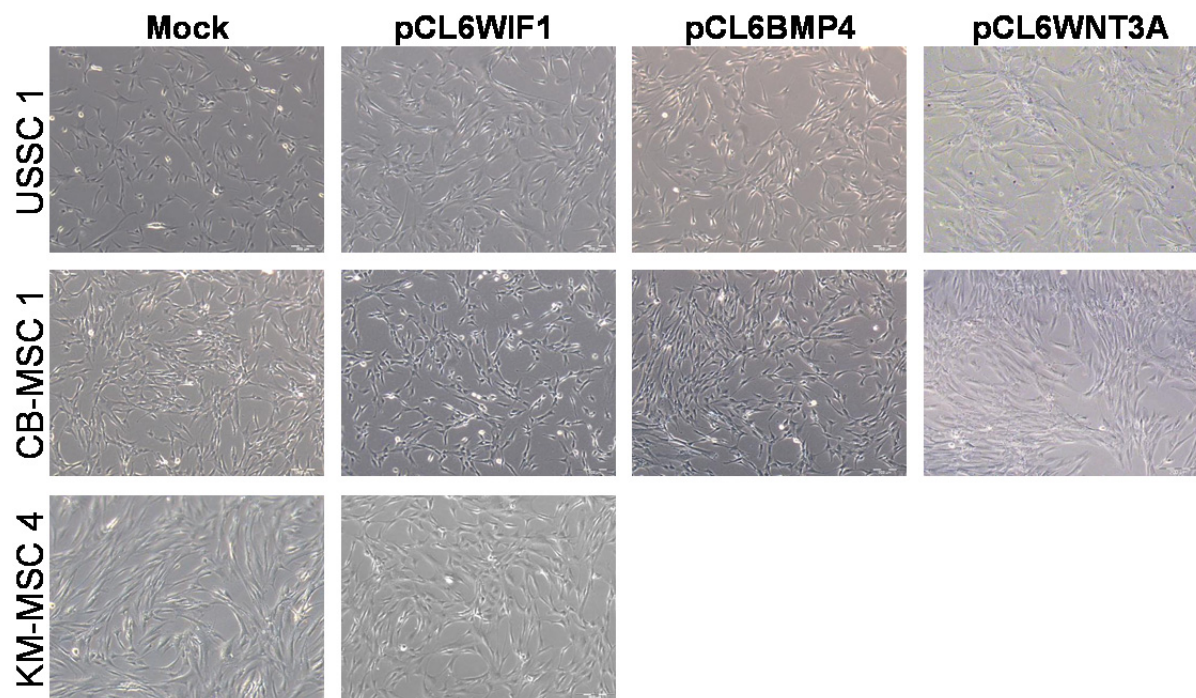


Abb.VIII: Morphologie der Zellen nach Überexpression.

Die Zellen zeigten keine Veränderungen in der Morphologie durch die Überexpression von *WIF1*, *BMP4* oder *WNT3A* (Abb.VIII).

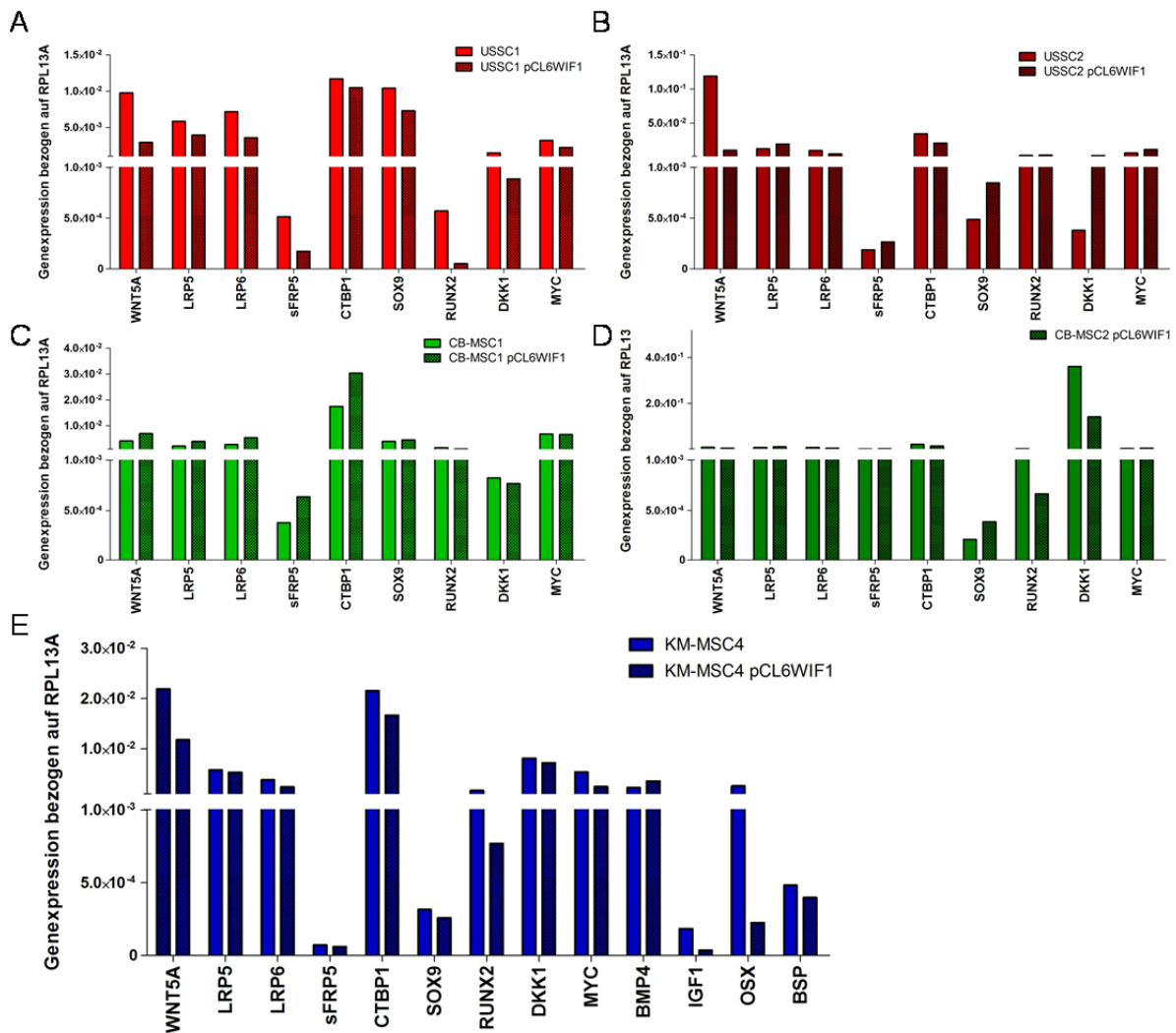


Abb.IX: Veränderung der Genexpression durch pCL6WIF1 Überexpression. Dargestellt sind die relativen Expressionen in Mock-Kontrollzellen und pCL6WIF1 überexprimierenden Zellen der USSC 1 (A), USSC 2 (B), CB-MSC 1 (C), CB-MSC 2 (D) und KM-MSC 4 (E).

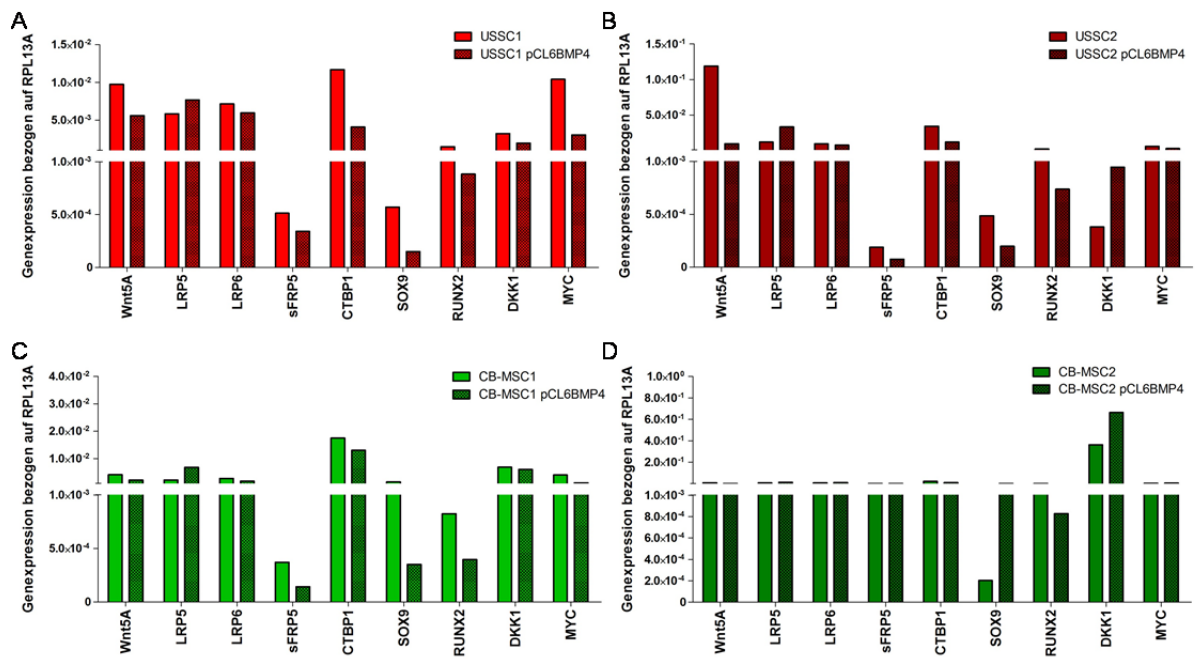


Abb.X: Veränderung der Genexpression durch pCL6BMP4 Überexpression. Dargestellt sind die relativen Expressionen von neun Genen in Mock-Kontrollzellen und pCL6BMP4 überexprimierenden Zellen der USSC 1 (A), USSC 2 (B), CB-MSC 1 (C) und CB-MSC 2 (D).

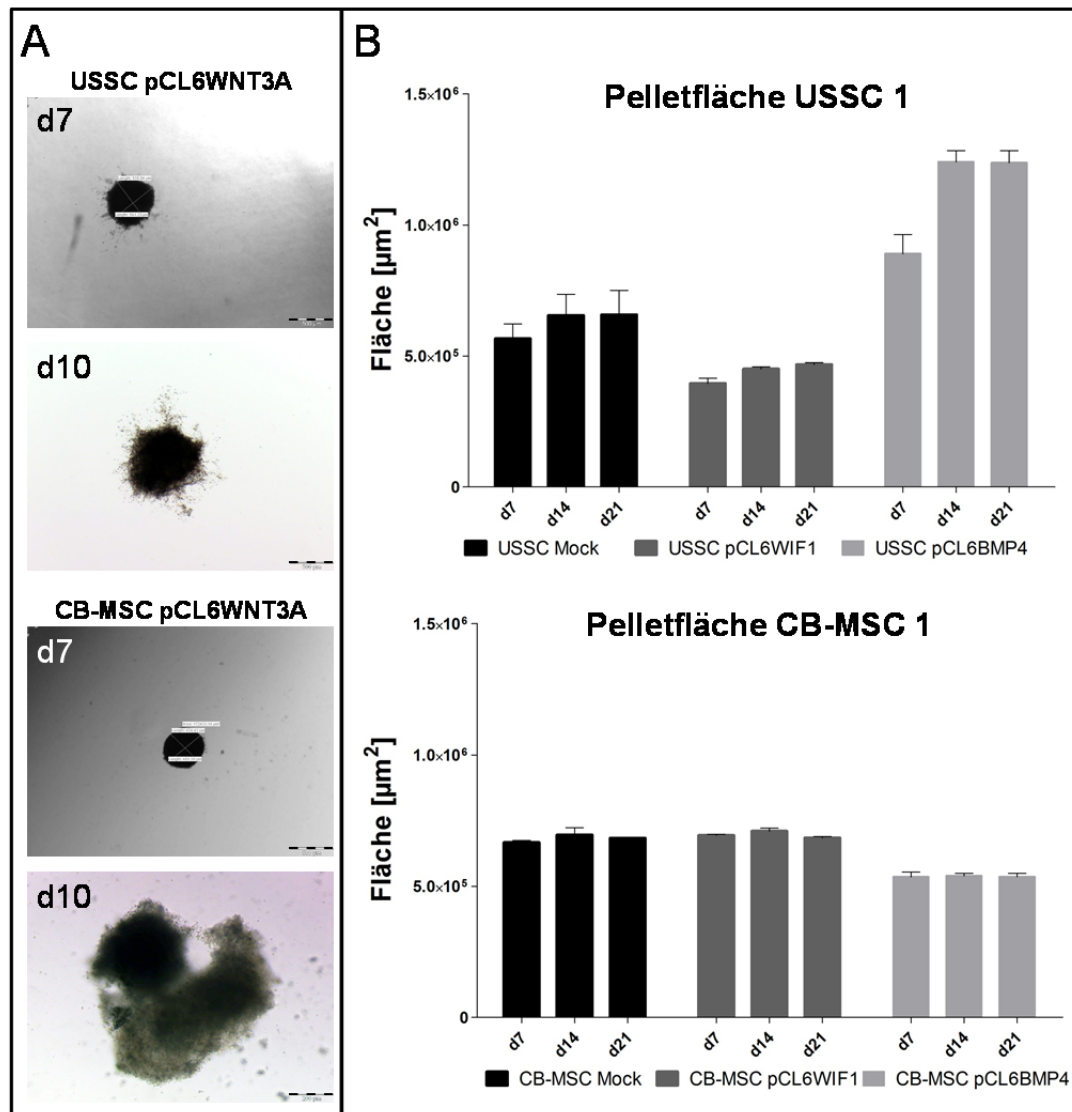


Abb.XI: Chondrogene Differenzierung der transduzierten Zellen im dreidimensionalen Zellverband (Pelletkultur). WNT3A überexprimierende Zellen in der chondrogenen Differenzierung an Tag 7 und Tag 10 (A). Der Maßstab beträgt 500 μm respektive 200 μm . Abbildung B zeigt Pelletflächen von USSC 1 und CB-MSC 1 Mock-Kontrollzellen, pCL6WIF1 und pCL6BMP4.

Die Arbeiten mit *WNT3A* überexprimierenden Zellen erfolgten im Rahmen einer Masterarbeit im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika¹⁸⁴. Abbildung IX A zeigt Fotos der Pellets von *WNT3A* überexprimierenden USSC 1 und CB-MSC 1 nach sieben (d7) und zehn Tagen (d10) Differenzierung.

Die Vermessungen der Pelletflächen (μm^2) in der chondrogenen Differenzierung von *WIF1* und *BMP4* transduzierten USSC 1 und CB-MSC 1 im Vergleich zu jeweiligen Mock-Kontrollzellen ist in Abbildung IX B dargestellt.

Die Zellen der *WNT3A* überexprimierenden USSC 1 und CB-MSC 1 bildeten in der chondrogenen Differenzierung keinen stabilen Zellverband (Abb.IX A). Mock-Kontrollzellen, pCL6WIF1 und pCL6BMP4 USSC 1 und CB-MSC 1 konnten im dreidimensionalen Zellverband differenziert und vermessen werden (Abb.IX B).

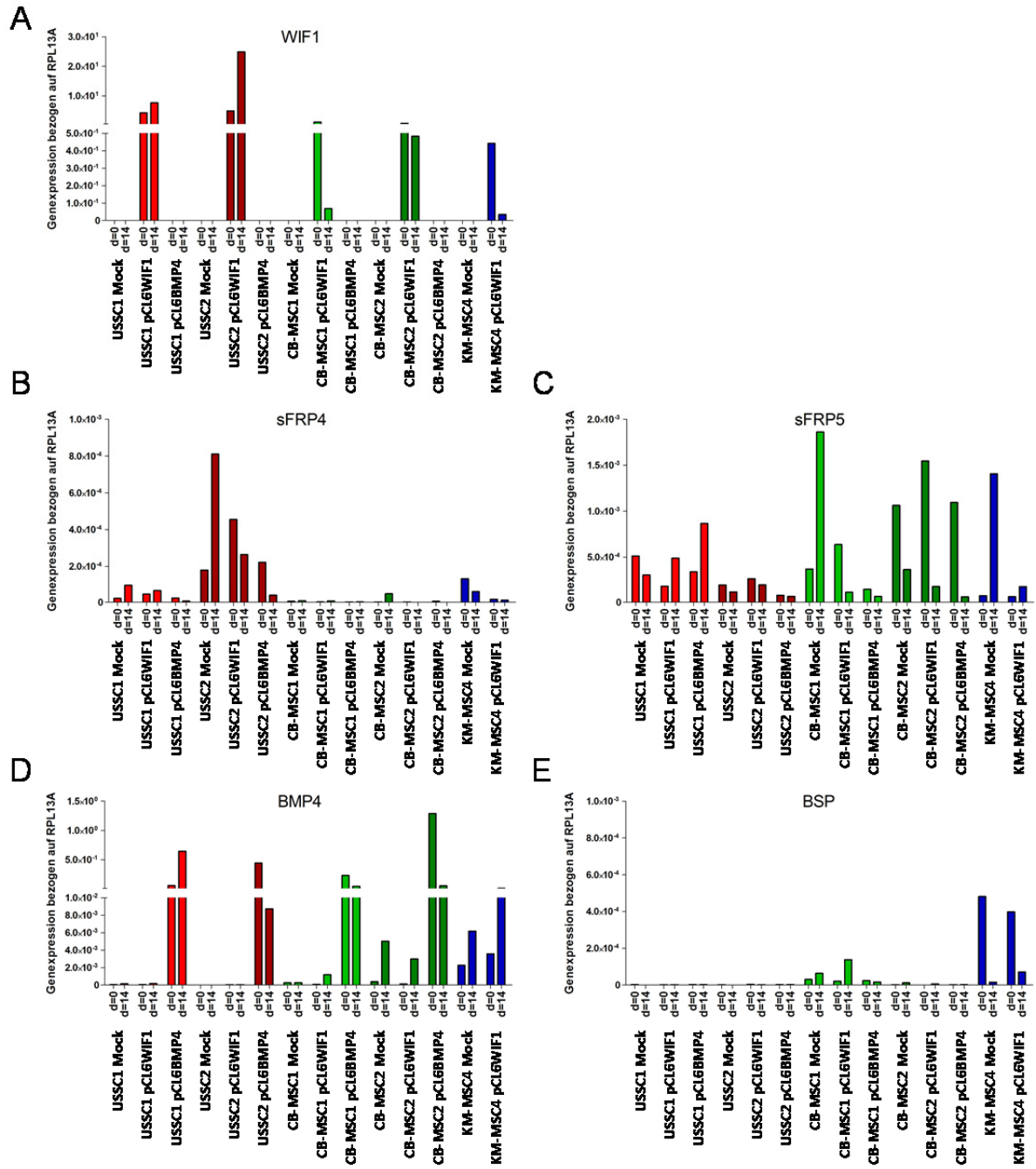


Abb.XII: Quantitative Genexpression von Mock-Kontrollzellen und transduzierten Zellen vor und nach osteogener Differenzierung. Expression der Gene *WIF1*, *sFRP4*, *sFRP5*, *BMP4* und *BSP*. Die Expression wurde in undifferenzierten und 14 Tagen osteogen differenzierten Zellen untersucht. Die Genexpression ist in Relation zu der Expression von *RPL13A* dargestellt.

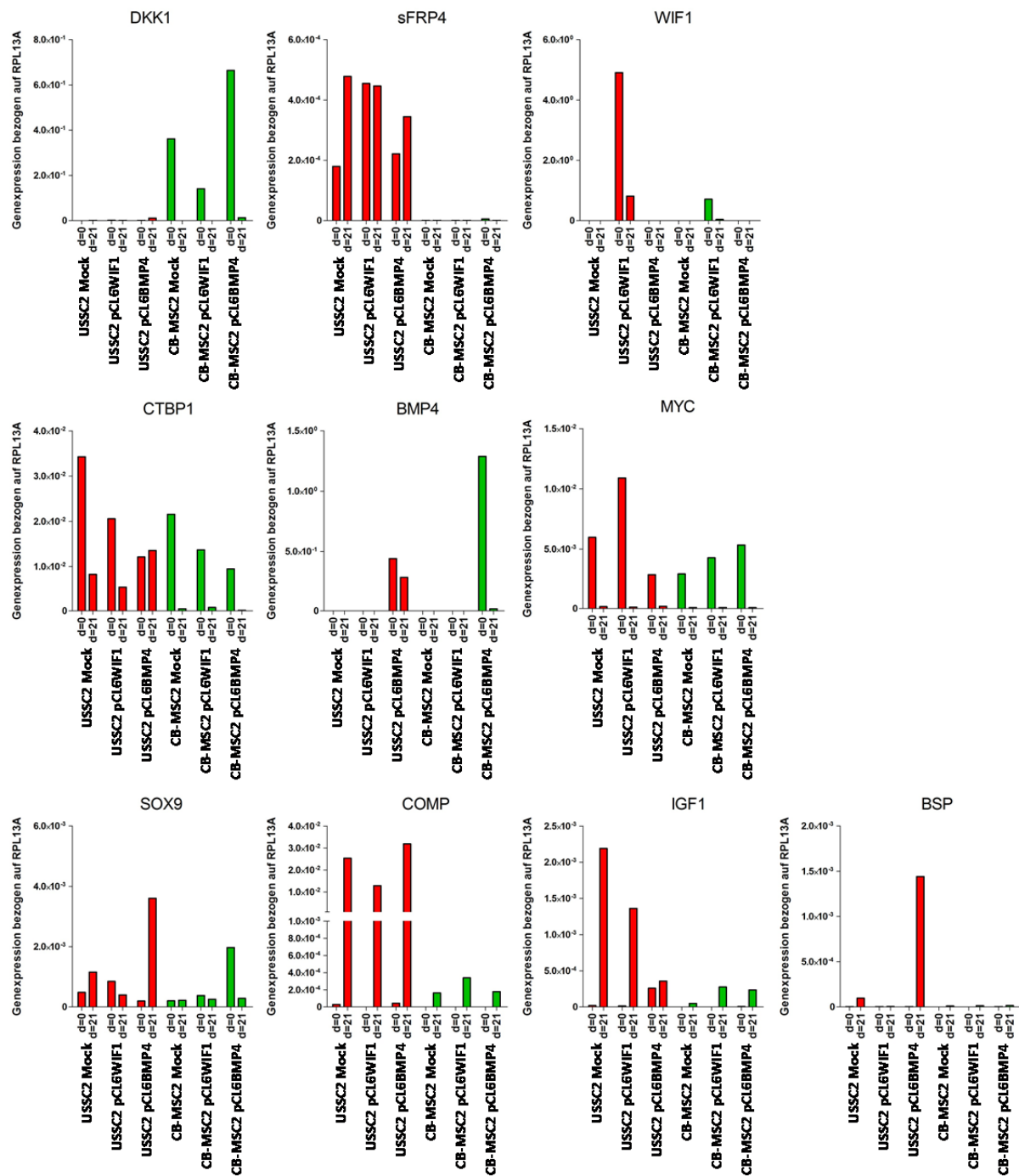


Abb.XIII: Quantitative Genexpression von Mock-Kontrollzellen und transduzierten Zellen vor und nach chondrogener Differenzierung. Die Expression der Gene *DKK1*, *sFRP4*, *WIF1*, *CTBP1*, *BMP4*, *MYC*, *SOX9*, *COMP*, *IGF1* und *BSP* wurde in undifferenzierten und 21 Tage chondrogen differenzierten Zellen untersucht. Die Genexpression ist in Relation zu der Expression von *RPL13A* dargestellt.

8.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb.1: *Hox-Gene* in Säugetieren.

Abb.2: Kanonischer Wnt-Signalweg.

Abb.3: Ablauf der chondralen Ossifikation während der Entwicklung von Röhrenknochen.

Abb.4: Chronologisch-schematische Übersicht der an der chondralen Ossifikation beteiligten Faktoren.

Abb.5: Karte des lentiviralen Plasmids pCL6IEGwo.

Abb.6: Morphologie und Immunphänotyp von plastikadhärenten Zellenpopulationen generiert aus Nabelschnurblut und Knochenmark *in vitro*.

Abb.7: Wachstumskinetik von USSC, CB-MSC und KM-MSC.

Abb.8: Wachstumskapazitäten der Stromazellen *in vitro*.

Abb.9: Replikativen Seneszenz der Stromazellen *in vitro*.

Abb.10: Auswertung des Telomerlängen-Assays.

Abb.11: Adipogene Differenzierung.

Abb.12: Osteogene Differenzierung.

Abb.13: Adipogene Differenzierung der physiologisch generierten Zellpopulationen.

Abb.14: Osteogene Differenzierung der physiologisch generierten Zellpopulationen.

Abb.15: Pelletkultur der Zellen in 15 ml Polyethylenröhrchen.

Abb.16: Chondrogene Differenzierung.

Abb.17: Gene deren Expression mit dem chondrogenen und osteogenen Differenzierungspotential von Vorläuferzellen verbunden sind.

Abb.18: Gene deren Expression Proliferation und Kondensation der MSC sowie deren Differenzierung zu Chondroprogenitorzellen steuern.

Abb.19: Gene die bei der Differenzierung der Chondrozyten über prä-hypertrophe und hypertrophe Chondrozyten zu ausdifferenzierten Chondrozyten von Bedeutung sind.

Abb.20: Model zur Reifung von Chondrozyten.

Abb.21: *HOX*-Genexpressionsmuster.

Abb.22: Stromazellen aus Nabelschnurblut zeigten eine differentielle *HOX*-Genexpression.

Abb.23: *HOX*-Genexpression in klonalen Linien.

Abb.24: Veränderungen der *HOX*-Genexpression durch *in vitro* Differenzierung.

Abb.25: Der Einfluss des Sauerstoffgehalts auf die *HOX*-Genexpression.

Abb.26: Direkte Ko-Kultur einer *Gfp*-exprimierenden USSC mit einer CB-MSC.

Abb.27: *HOX*-Genexpression vor und nach Ko-Kultur.

Abb.28: Funktionelle Einteilung der 84 Gene des Arrays.

Abb.29: Genexpressionsmuster von USSC 1-3 und CB-MSC 1-3 im Vergleich.

Abb.30: Genexpressionsmuster von USSC und CB-MSC im Vergleich zu KM-MSC.

Abb.31: Genexpressionsmuster von USSC und CB-MSC im Vergleich zu CB-H Linien.

Abb.32 Die Zellpopulationen exprimierten diverse Gene des Wnt-Signalweges differentiell.

Abb.33: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpressionsmuster.

Abb.34: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpressionsmuster.

Abb.35: Quantitative Expression von *WNT*-Genen und Inhibitoren vor und nach chondrogener Differenzierung.

Abb.36: Quantitative Genexpression vor und nach chondrogener Differenzierung.

Abb.37: Quantitative Genexpression von Markergenen vor und nach chondrogener Differenzierung.

Abb.38: Quantifizierung der Alizarin-Färbung.

Abb.39: Quantitative Expression von *WNT*-Genen vor und nach osteogener Differenzierung.

Abb.40: Quantitative Expression von Inhibitoren vor und nach osteogener Differenzierung.

Abb.41: Quantitative Expression vor und nach osteogener Differenzierung.

Abb.42: Quantitative Genexpression vor und nach osteogener Differenzierung.

Abb.43: Quantitative Expression von Markergenen vor und nach osteogener Differenzierung.

Abb.44: Lentivirale Transduktion von USSC, CB-MSC und KM MSC mit *WIF1*.

Abb.45: Analyse der mit *WIF1* transduzierten Zellen.

Abb.46: Lentivirale Transduktion von USSC und CB-MSC mit *BMP4*.

Abb.47: Analyse der mit *BMP4* transduzierten Zellen.

Abb.48: Einfluss der *WIF1*, *BMP4* oder *WNT3A* Überexpression auf die *DLK1*-Expression.

Abb.49: Einfluss der *WIF1* Überexpression auf die Genexpression.

Abb.50: Einfluss der *BMP4* Überexpression auf die Genexpression.

Abb.51: Einfluss der Überexpressionen auf das adipogene Differenzierungspotential.

Abb.52: Quantifizierung der Öl-Rot Färbung.

Abb.53: Einfluss der Überexpressionen auf das osteogene Differenzierungspotential.

Abb.54: Quantifizierung der Alizarin-Rot Färbung.

Abb.55: Einfluss der Überexpression auf das chondrogene Differenzierungspotential.

Abb.56: Genexpressionsveränderung nach chondrogener Differenzierung.

Abb.57: Genexpressionsveränderung nach osteogener Differenzierung.

Abb.58: Genexpressionsveränderung nach osteogener Differenzierung.

Abb.59: Mögliche Ursachen von Seneszenz in Zellen.

Abbildungen im Anhang

Abb.I: Wachstumskinetik von klonalen Zelllinien im Vergleich zur Ursprungszelllinie.

Abb.II: Die Wachstumskinetik von CB-H und KM-H Linien ist von der umgebenden Sauerstoffkonzentration beeinflusst.

Abb.III: Durchschnittliche TRF Längenverteilung während der Kultivierung.

Abb.IV: USSC, CB-MSC und CB-H Linien unterscheiden sich in ihrer DLK1 Expression und exprimieren keine Pluripotenzmarker.

Abb.V: Osteogene Differenzierung.

Abb.VI: Vermessung des dreidimensionalen Zellverbands (Pelletkultur).

Abb.VII: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpressionsmuster der USSC.

Abb.VIII: Morphologie der Zellen nach Überexpression.

Abb.IX: Veränderung der Genexpression durch pCL6WIF1 Überexpression.

Abb.X: Veränderung der Genexpression durch pCL6BMP4 Überexpression.

Abb.XI: Chondrogene Differenzierung der transduzierten Zellen im dreidimensionalen Zellverband (Pelletkultur).

Abb.XII: Quantitative Genexpression von Mock-Kontrollzellen und transduzierten Zellen vor und nach osteogener Differenzierung.

Abb.XIII: Quantitative Genexpression von Mock-Kontrollzellen und transduzierten Zellen vor und nach chondrogener Differenzierung.

Tabellen

Tab.1: Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Tab.2: Primer

Tab.3: Antikörper

Tab.4: Kits, Enzyme und Puffer für molekularbiologische Analysen

Tab.5: Verwendete Geräte und Software mit Angabe des Herstellers respektive der Quelle

Tab.6: *TOP10 GO Terms* der DAVID Analyse

Tab.7: Auf *Functional analysis* beruhende Einteilung der 84 Gene des *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler* PCR Array

Tabellen im Anhang

Tab.I: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien die aus Nabelschnurblut und Knochenmark generiert wurden.

Tab.II: Gene des Wnt-Signalweges auf dem PCR Array

Tab.III: Liste der unterschiedlich exprimierten Gene in Streudiagrammen

8.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Amelie Pia Houben
Geburtsdatum: 20.01.1984
Geburtsort: Mönchengladbach

Schulbildung

08/ 1994 – 06/ 2003 Bischöfliche Marienschule, Gymnasium in Mönchengladbach
Abschluss: allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/ 2003 – 09/ 2008 Studium der Biologie; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abschluss: Diplom; Gesamturteil „ausgezeichnet“

Thema der Diplomarbeit: „Telomeraseaktivität und
Telomerlängen während der Stammzellalterung“

Berufserfahrung

03/ 2008 – 09/ 2008 Studentische Mitarbeiterin am Institut für
Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)
Heinrich-Heine-Universität und Universitätsklinikum Düsseldorf

11/ 2008 – 06/ 2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)
Heinrich-Heine-Universität und Universitätsklinikum Düsseldorf
Schwerpunkt: Molekular- und Stammzellbiologie

8.4 Referenzen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Paper:

Buchheiser A, **Houben AP**, Bosch J, Marbach J, Liedtke S, Kögler G (2012) Oxygen tension modifies the 'stemness' of human cord blood-derived stem cells. *Cytotherapy*. 14, Pages 967-82

Bosch J, **Houben AP**, Radke TF, Stapelkamp D, Bünemann E, Balan P, Buchheiser A, Liedtke S, Kögler G (2012) Distinct differentiation potential of "MSC" derived from cord blood and umbilical cord: Are cord-derived cells true MSC? *Stem Cells Dev*. 21, Pages 1977-1988

Kluth SM, Buchheiser A, **Houben AP**, Geyh S, Krenz T, Radke TF, Wiek C, Hanenberg H, Reinecke P, Wernet P, Kögler G (2010) DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem Cells Dev*. 19, Pages 1471-1483

Aktas M, Buchheiser A, **Houben A**, Reimann V, Radke T, Jeltsch K, Maier P, Zeller WJ, Kogler G (2010) Good manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood. *Cytotherapy*. 12, Pages 338-348

Posterauswahl:

Houben AP, Liedtke S, Buchheiser A, Kögler G (2009) The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct MSC populations. 5th International Conference on Mesenchymal and Non-Hematopoietic Stem Cells Texas A&M HSC College of Medicine

Waclawczyk S, **Houben AP**, Floegel U, Buchheiser A, Kögler G (2009) Hepatic differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells (USSC). 5th International Conference on Mesenchymal and Non-Hematopoietic Stem Cells Texas A&M HSC College of Medicine

Houben AP, Waclawczyk S, Kluth SM, Buchheiser A, Kögler G (2009) The role of WNT signaling in endodermal differentiation of cord blood derived stem cells. Wnt-associated signaling networks in tumor progression and in development University Göttingen

Bosch J, Fudim M, **Houben AP**, Wernet P, Buchheiser A, Kögler G (2009) The influence of hypoxia on generation, expansion and differentiation of Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC) from cord blood (CB) and bone marrow stromal cells (BM-MSC). Stem Cell Network North Rhine-Westphalia 5th International Meeting; Abstracts. 87

Houben AP, Buchheiser A, Aktas M, Fischer J, Wernet P, Kögler G (2008) Age-Related Differences Between Unrestricted Somatic Stem Cells from Cord Blood and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stroma Cells. ASH Annual Meeting; Abstracts. 112, 1335

9. Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Kögler, die es mir ermöglichte diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke ihr für die gute fachliche Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit. Danke auch an Herrn Prof. Dr. R. Wagner, der sich dazu bereit erklärte die Betreuung aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät für mich zu übernehmen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danke an Dr. Anja Buchheiser insbesondere für ihre Hilfsbereitschaft und den wissenschaftlichen Austausch. Frau Dr. Stefanie Liedtke der PCR-Großmeisterin danke ich ebenfalls für den fachlichen Austausch. Ich danke Frau Dipl. Ing. Raba der Core Flow Cytometry Facility des ITZ für die Sortierung der Zellen und besonders Daniela Stapelkamp für ihre Unterstützung im Laboralltag. Weiterhin danke ich allen weiteren Kooperationspartnern der AG Kögler. Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme Atmosphäre danken.

Figen, Sonja, Björn, Manuel, Philipp, Murat, Maria, Thomas, Teja, Aurélie, Simon, Andrea, Lutz, Verena, Clarissa, Justyna, Corinna, Anastasia, Julia N. und all jenen weiteren, die ich hier nicht alle namentlich nennen kann danke ich für die vielen schönen Momente die ich während meines Studiums erlebt habe und die mir immer in Erinnerung bleiben werden. Meiner lieben Kollegin Julia danke ich für all die Gespräche die mit: „kann ich dich mal was wissenschaftliches fragen“ begannen und ihre Unterstützung vor allem auch gegen Ende der Arbeit. Julia, Tatiana und Magda danke ich zudem für die vielen Stunden voll Freude und für ihre Freundschaft.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Oliver

– Danke für einfach Alles –

10. Erklärung

Die hier vorgelegte Inauguraldissertation habe ich eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Inauguraldissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 24.11.2011

(Amelie Pia Houben)