

**Vergleich des Differenzierungspotentials und der
assozierten Genexpressionssignatur von adulten und
neonatalen humanen Stromazellpopulationen in
Korrelation zur Knochenregeneration.**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Julia Bosch

aus Straelen

Düsseldorf, Mai 2013

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. Gesine Kögler
Korreferent: Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	11
1.1 Regeneration von Knochen und Knorpel	11
1.1.1 Zelluläre Komponente des <i>tissue engineering</i> : Stromazellen unterschiedlichen Ursprungs	12
1.1.1.1 Adulte und neonatale Stromazellen	12
1.1.1.2 Embryonale Stammzellen / induzierte pluripotente Stammzellen	15
1.2 Skelettentwicklung	15
1.2.1 Chondro- und Osteogenese während der Embryonalentwicklung	17
1.2.1.1 Regulation der mesenchymalen Kondensation	18
1.2.1.2 Regulation der desmalen Ossifikation	19
1.2.1.3 Regulation der endochondralen Ossifikation	19
1.2.2 Ausblick: Einsatz neonataler Stromazellen in der Therapie von Knochendefekten	21
1.3 Ziele der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Zellen	25
2.1.2 Medien	26
2.1.3 Primer	27
2.1.4 Antikörper	28
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellkulturarbeiten	28
2.2.1.1 Isolation und Expansion der verschiedenen Zelltypen	28
2.2.1.2 Kryokonservierung	29
2.2.1.3 <i>In vitro</i> Differenzierungen	30
2.2.1.4 Direkte Ko-Kultur vor <i>HOX^{neg}</i> und <i>HOX^{pos}</i> Zellen	31
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	31
2.2.2.1 RNA-Isolation	31
2.2.2.2 Reverse Transkription (RT)	32
2.2.2.3 Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	32
2.2.2.4 Quantitative Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	32
2.2.2.5 Western Blot	32
2.2.2.6 Immunzytochemische Färbungen	33
2.2.2.7 Durchflusszytometrische Analyse	33
2.2.2.8 Zellsortierung	33
2.2.2.9 Lentiviral vermittelte stabile Überexpression	33
2.2.2.10 Affymetrix PrimeView™ human gene expression Microarrays	35
2.2.3 Statistische Auswertung	35

3	Ergebnisse	36
3.1	Grundlegende Charakterisierung von Stromazellen aus Nabelschnur, Nabelschnurblut und Knochenmark	36
3.1.1	Wachstumspotential	36
3.1.2	Immunphänotyp	36
3.1.3	<i>HOX</i> -Genexpression	38
3.1.4	Differenzierungspotential	40
3.1.4.1	Adipogene Differenzierung	40
3.1.4.2	Chondrogene Differenzierung	42
3.1.4.3	Osteogene Differenzierung	44
3.2	Vergleichende Genexpressionsanalyse	50
3.2.1	Microarray Analysen	50
3.2.2	Quantitative Genexpressionsanalysen	54
3.3	Überexpression von <i>integrin-binding/bone sialoprotein (BSP)</i>	55
3.3.1	Nachweis der Überexpression	55
3.3.2	Verändertes Differenzierungspotential	57
3.4	Überexpression von <i>osterix/transcription factor SP7 (OSX)</i>	58
3.4.1	Nachweis der Überexpression	58
3.4.2	Expression Osteogenese-assoziiierter Gene	60
3.4.3	Verändertes Differenzierungspotential	60
3.5	Direkte Ko-Kultur von USSC mit anderen Zelltypen: Adaptation des Potentials?	62
3.5.1	Einfluss der Ko-Kultur auf die <i>HOX</i> -Expression	62
3.5.2	Differentielle Genexpression	64
3.5.3	Verändertes Differenzierungspotential	67
3.5.3.1	Adipogene Differenzierung	67
3.5.3.2	Chondrogene Differenzierung	68
3.5.3.3	Osteogene Differenzierung	69
4	Diskussion	71
4.1	Proliferationspotential, Immunphänotyp und <i>HOX</i>-Genexpression	71
4.2	Differenzierungen	73
4.2.1	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Differenzierungsassays	73
4.2.2	Fehlendes Differenzierungspotential von UC-SC	73
4.2.3	Adipo- und chondrogenes Potential von USSC, CB- und BM-SC	74
4.2.4	Osteogenes Potential von USSC, CB- und BM-SC	75
4.2.4.1	Variabilität der BM-SC	75
4.2.4.2	Regulation der osteogenen Differenzierung	75
4.3	Überexpressionen	77
4.3.1	Positiver Einfluss von <i>BSP</i> auf das osteogene Differenzierungspotential	78
4.3.2	Negativer Einfluss von <i>OSX</i> auf das osteogene Differenzierungspotential	78
4.4	Adaptation des Potentials durch direkte Ko-Kultur	79
4.4.1	Veränderte Genexpression	80

4.4.2	Induziertes adipogenes, reduziertes chondro- und osteogenes Potential.....	80
4.4.3	Fazit: Rückschluss auf das regenerative Potential.....	81
5	Zusammenfassung.....	82
6	Summary.....	84
7	Referenzen.....	85
8	Eigene Referenzen.....	91
9	Abbildungsverzeichnis.....	92
10	Tabellenverzeichnis.....	93
11	Anhang.....	94
12	Danksagung.....	103
13	Erklärung.....	104

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actin beta
ADIPOQ	Adipocyte-, C1q, and collagen domain-containing/adiponectin
AEBP1	AE binding protein 1
AK	Antikörper
AMBM	Ameloblastin (enamel matrix protein)
aRNA	Antisense RNA
ATP7A	ATPase, Cu(2+) transporting, alpha polypeptide
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BM	Bone marrow
BM-SC	Bone marrow mesenchymal stromal cells
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSP	Integrin-binding/bone sialoprotein
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
C1	Complement component 1
CADM1	Cell adhesion molecule 1
CB	Cord blood
CB-SC	Cord blood-derived stromal cells
CD	Cluster of differentiation
CD105	Endoglin, ENG
CD117	V-KIT hardy zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, KIT
CD146	Melanoma adhesion molecule, MCAM
CD184	Chemokine CXC motif receptor 4, CXCR4
CD31	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM1
CD326	Epithelial cellular adhesion molecule, EPCAM
CD45	Protein-tyrosine phosphatase receptor-type C, PTPRC
CD56	Neural cell adhesion molecule 1, NCAM1
CD71	Transferrin receptor, TFRC
CD73	Ecto-5-prime nucleotidase, NT5E
CD90	T-cell antigen, THY1
cDNA	Complementary DNA
CFL1	Cofilin 1 (non-muscle)
CHRD	Chordin-like

CIP	Calf intestine phosphatase
CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL	Kollagen
CPD	Cumulative population doublings
Ct	Cycle Threshold
CTSK	Cathepsin K
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DLK1	Delta drosophila homolog-like 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DST	Dystonin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	Embryonic stem cells
FABP4	Fatty acid-binding protein 4
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAM98B	Family with sequence similarity 98, member B
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOXF1	Forkhead box F1
GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GAS1	Growth arrest-specific 1
GFP	Green fluorescent protein
GLI3	GLI family zinc finger 3
GO	Gene ontology
GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb
GRLF1	Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1
GSC	Gooseoid homeobox
HECTD2	HECT domain containing 2
HHIP	Hedgehog interacting protein
HIST2H2A	Histone gene cluster 2, H2A histone family
HLA	Human leukocyte antigen
HLA-ABC	Major histocompatibility complex class I A/B/C

HLA-DR	Major histocompatibility complex class II DR
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
HOX	Homeobox
HSC	Haematopoietic stem cells
HSPA	Heat shock 70kDa protein
HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxantin
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IHH	Indian hedgehog
INS-IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) /// INS-IGF2 readthrough transcript
iPSC	Induced pluripotent stem cells
ITZ	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
KIF3A	Kinesin family member 3A
KK	Ko-Kultur
MAFK	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (avian)
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix metalloproteinase
MNC	Mononuclear cells
MSC	Mesenchymal stem cell
MSX2	Homolog of muscle segment homeobox 2 drosophila
n.s.	Nicht signifikant
NFATC1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
ng	Nanogramm
NG2	Chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4
NGS	Normal goat serum
NHDF	Normal human dermal fibroblasts
nm	Nanometer
NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule
O ₂	Sauerstoff
OC/BGLAP	Osteocalcin/gamma-carboxyglutamic acid protein bone
OPN/SPP1	Osteopontin/secreted phosphoprotein 1
OSX	Osterix/transcription factor SP7
P	Passage
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS + Tween 20
PCA	Principal component analysis
PCDHB	Protocadherin beta

PCR	Polymerase chain reaction
PDCD6	Programmed cell death 6
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PLIN	Perilipin
pM	Pikomolar
PPAP2B	Phosphatidic acid phosphatase type 2B
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PSG	Penicillin/Steptomycin/L-Glutamin
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
RCF	Relative centrifugal force
RNA	Ribonucleic acid
RPL13a	Human ribosomal protein L13a
RT	Reverse transkription
RT-PCR	Reverse transkription - Polymerase chain reaction
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
Sek.	Sekunde
SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
SF3B1	Splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa
SNORA33	Small nucleolar RNA, H/ACA box 33
SOX	SRY-Box
SRP19	Signal recognition particle 19kDa
STC1	Stanniocalcin 1
Std.	Stunde
SULF1	Sulfatase 1
TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
TEAD4	TEA domain family member 4
TFAP2A	Transcription factor AP-2 alpha
TGF β	Transforming growth factor beta
THBS1	Thrombospondin 1
THRA	Thyroid hormone receptor, alpha
TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily
u.a.	Unter anderem
UC-SC	Umbilical cord stromal cells
UPP1	Uridine phosphorylase 1
USSC	Unrestricted somatic stromal cells
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WNT	wingless-type MMTV integration site family

WWOX	WW domain containing oxidoreductase
ZNF280D	Zinc finger protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Regeneration von Knochen und Knorpel

Die wichtigsten Aufgaben des Knochengerüsts als Stützgewebe bestehen darin, dem Körper Stabilität zu geben, die inneren Organe zu schützen und Bewegung zu ermöglichen. Das zweite Stützgewebe ist der Knorpel, der durch seine extrazelluläre Matrix Druck- und Biegungeelastizität unter anderem in Gelenken bietet. Ein Großteil des knöchernen Skeletts wird über die Zwischenstufe einer Knorpelanlage gebildet.

Nach Traumata, Tumorsektionen oder anderen das skeletale System betreffende Krankheiten, die auch alters-assoziiert sein können, stellt die Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe eine große Herausforderung dar.

Als eines der wenigen Gewebe wird Knorpel nicht durchblutet, sodass Nährstoffe nur in das Gewebe diffundieren können. Zudem besteht Knorpel hauptsächlich aus Glykosaminoglykan- und Kollagen-reicher extrazellulärer Matrix, in die Chondrozyten mit geringer metabolischer Aktivität eingebettet sind, was zur mangelnden Selbstheilungsfähigkeit von Knorpel beiträgt (1). Die konventionelle Therapie von Knorpeldefekten besteht zur Zeit in der Transplantation eigenen oder fremden Knorpels (Autograft/ Allograft).

Knochen wird im Gegensatz zu Knorpel durch Osteoklasten (Knochenabbau) und Osteoblasten (Knochenneubildung) ständig erneuert (Kapitel 1.2). Durch die Vaskularisierung gelangen Nährstoffe und Sauerstoff in das Knochengewebe, außerdem befinden sich im Knochenmark und dem Periosteum (das den Knochen umgebende Bindegewebe, Knochenhaut) Progenitorzellen, die in verschiedene Knochenzelltypen ausdifferenzieren können (1). Kleinere Knochendefekte können daher selbst heilen, bei größeren Schäden, sogenannten *critical size defects*, müssen unterstützende Therapien angewandt werden.

Die gängigste Behandlung dieser großen Knochendefekte besteht in der Transplantation autologen (patienteneigenen) Knochens, der meist aus dem Beckenkamm entnommen wird (2). Nachteil ist das nur begrenzt zur Verfügung stehende Knochenmaterial und vor allem die zusätzliche Belastung für den Patienten bei der Entnahme des Knochenfragmentes (3). Die Möglichkeit der Nutzung allogener Knochen Spenden ist, wie bei allen Organspenden, durch die Verfügbarkeit limitiert. Bedingt durch die Möglichkeit der Abstoßung durch Gewebeinkompatibilität sowie durch die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern werden Allografts nur begrenzt eingesetzt. Um diese Limitationen zu umgehen, werden inzwischen auch zell-freie, demineralisierte Allografts kommerziell hergestellt (4), was jedoch zu einer im Vergleich zu Autografts reduzierten Formation neuen Knochens führt (3, 5). Alternativ zu Auto- oder Allografts werden natürliche oder synthetische Biomaterialien, z.B. Hydroxyapatit, Metall oder Keramik verwendet (6). Allerdings erreichen diese den osteoinduktiven Effekt der in Autografts vorhandenen Osteoprogenitorzellen ebenfalls nicht (7).

Mit der *ex vivo* Herstellung von Gewebekonstrukten, dem sogenannten *tissue engineering*, wird seit einigen Jahren versucht, Defekte kritischer Größe zu behandeln. Ziel ist die Generierung eines „lebendigen“ Gewebekonstruktes, das nach Implantation in das geschädigte Gewebe des Patienten integriert und dort zur Regeneration beiträgt. Die Forschung in diesem Gebiet konzentriert sich erstens auf die Wahl des Grundgerüsts, einer dreidimensionalen Matrix natürlichen oder synthetischen Ursprungs (z.B. Metalle, Keramik, abbaubare Polymere) (8). Zweitens wird der mögliche Einsatz von Wachstumsfaktoren, z.B. *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *fibroblast growth factors* (FGFs) oder *transforming growth factor beta* (TGFβ), untersucht (8). Drittens werden verschiedene allogene oder autologe Zelltypen zur Besiedelung der Matrix charakterisiert (9).

Um eine effiziente Knochenregeneration zu ermöglichen, ist zudem eine schnelle Neovaskularisierung des transplantierten Gewebekonstruktes notwendig. Nur bis zu einer Implantatgröße von 2-3mm³ kann eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen sowie ein Gasaustausch stattfinden (10). Daher werden verschiedene Methoden zur Vaskularisierung des Konstrukts, wie die Nutzung angiogener Wachstumsfaktoren oder die Ko-Besiedelung mit endothelialen Vorläuferzellen, untersucht (10).

1.1.1 Zelluläre Komponente des *tissue engineering*: Stromazellen unterschiedlichen Ursprungs

Zur Besiedelung der gewählten Matrix können sowohl autologe als auch allogene Zelltypen mit nachgewiesenem osteogenem Potential genutzt werden.

Die Entnahme und *ex vivo* Vermehrung patienteneigener Osteoblasten aus dem Periosteum hat den Vorteil, keine Immunreaktionen hervorzurufen. Daneben überwiegen jedoch die Nachteile der limitierten Zahl verfügbarer Zellen sowie deren begrenztes Proliferationsvermögen (8, 11). Daneben besteht die Möglichkeit des Einsatzes xenogener (nicht-humaner) Zellen. Auf beide Zelltypen wird im Folgenden nicht näher eingegangen.

1.1.1.1 Adulte und neonatale Stromazellen

Ursprünglich wurde der Begriff „*mesenchymal stem cells*“ (MSC) für nicht-haematopoetische Stromazellen aus dem Knochenmark geprägt, die das Potential besitzen, in Zellen mesenchymaler Gewebe, also Knochen, Knorpel, Fett, Sehnen, Muskel und Knochenmark-Stroma, zu differenzieren (12, 13). Nach heterotoper Transplantation (an atypischer Stelle, z.B. subkutan) in Mäuse bilden MSC Knochen und rekrutieren murine haematopoetische Stammzellen (HSC). Auf diese Weise entsteht ein heterotopes Ossikel, d.h. Knochen mit Knochenmark bestehend aus Osteozyten, Osteoblasten, Haematopoese-unterstützendem Stroma, Adipozyten und Wirts-eigenen HSC (14, 15).

Aufgrund fehlender eindeutiger Definitionskriterien für den Terminus MSC wurde dieser Zelltyp in den letzten Jahren vermeintlich in nahezu allen Geweben (z.B. Fettgewebe, Zahnpulpa, Nabelschnur) beschrieben, obwohl die oben genannten Anforderungen an das *in vivo* Differenzierungspotential nicht nachgewiesen wurden (14, 16).

In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff „Mesenchymale Stammzelle“ nicht verwendet, stattdessen wird von „Stromazellen“ gesprochen.

Adulte BM-SC

Adultes Knochenmark (*bone marrow*, BM) enthält neben haematopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen, die therapeutisch zur Behandlung von Erkrankungen des blutbildenden Systems genutzt werden, auch nicht-haematopoetische Stromazellen. Im Knochenmark sind diese Zellen daran beteiligt, die Mikroumgebung (*endosteal niche*) für HSC zu bilden und ihre Selbsterhaltung oder Differenzierung in Blutzellen zu regulieren (17, 18). Es wird vermutet, dass Stromazellen aus dem Knochenmark *in situ* als perivaskuläre Zellen fungieren, also an die Oberfläche von kleinen Blutgefäßen (Sinusoide) angelagert sind (15, 19).

Bevor der Begriff „MSC“ geprägt wurde (12, 13), konnten Friedenstein und Kollegen bereits im Jahr 1966 im Knochenmark nicht-haematopoetische Stromazellen mit osteogenem Potential nachweisen (20). Für den Einsatz zur Knochenregeneration gelten *bone marrow stromal cells* (BM-SC) als „Gold-Standard“, da eine einzelne Zelle sowohl dazu in der Lage ist sich selbst zu erneuern, als auch ein vollständiges Gewebe (Knochen mit Knochenmark) zu bilden (14, 15). Dies wurde sowohl im Tiermodell und in ersten klinischen Studien belegt. So führte im immundefizienten Mausmodell die subkutane Transplantation von humanen BM-SC auf einer Hydroxyapatit-Matrix zur Bildung von Knochen (humanen Ursprungs) und haematopoetischem Gewebe (murinen Ursprungs) (15, 21). Die erste Studie zur Regeneration eines großen Knochendefektes unter Verwendung autologer BM-SC auf einem Hydroxyapatit-Gerüst stammt von Quarto *et al.* aus dem Jahr 2001 (22). In den drei Patienten der Studie zeigte sich eine Integration des Implantats bereits nach sechs Monaten. Eine weitere Pilotstudie nutzte autologe BM-SC in Kombination mit einem Trägermaterial aus Hydroxyapatit/ β -Trikalziumphosphat zur Implantation in die Kieferhöhle. Nach vier Monaten hatte in allen sechs Patienten eine Integration des Implantats stattgefunden (23).

Dennoch bedarf es klinischer Studien mit größeren Patienten- und geeigneten Kontrollgruppen sowie objektiver Methoden zur Auswertung der Knochenregeneration, um eindeutige Aussagen zum Erfolg des Einsatzes von BM-SC in der Knochengewebeherstellung treffen zu können (7).

Neonatale USSC und CB-SC

Die Nabelschnur besteht aus einer Vene, in der das Blut von der Plazenta zum Embryo/Fetus fließt und zwei Arterien, die Blut zurück zur Plazenta leiten. Nabelschnur(rest)blut (*cord blood*, CB) wird nach der Entbindung des Kindes durch Punktion der Nabelschnurvene gewonnen und erfordert daher keinen invasiven Eingriff, der Mutter oder Kind gefährden würde. Nabelschnurblut ist reich an HSC, die seit der ersten erfolgreichen Transplantation durch Eliane Gluckman im Jahr 1988 zur Behandlung von Erkrankungen des haematopoetischen Systems als Alternative zur Transplantation von Knochenmark eingesetzt werden (24). Die im Vergleich zu BM-HSC unreiferen CB-HSC werden in öffentlichen Nabelschnurblutbanken eingelagert, um für allogene Stammzelltransplantationen sofort zur Verfügung zu stehen. Aufgrund der begrenzten Menge von Nabelschnurblut – und der dadurch limitierten Anzahl an HSC – wurde Nabelschnurblut lange Zeit vorwiegend zur Behandlung von Kindern eingesetzt. Seit einigen Jahren werden Transplantationen bei Erwachsenen erfolgreich durch die simultane Transplantation von zwei unverwandten Nabelschnurbluten (*double umbilical cord blood transplantation*) ermöglicht (25).

Neben HSC enthält Nabelschnurblut auch nicht-haematopoetische Zelltypen. Multipotente Stromazellen wurden im Nabelschnurblut erstmals im Jahr 2000 beschrieben (26). Die Arbeitsgruppe um Prof. Kögler charakterisierte im Jahr 2004 die Zellpopulation der *unrestricted somatic stromal cells* (USSC), die ein hohes Proliferationspotential sowie längere Telomere als BM-SC besitzen (27). Später wurde zunächst anhand des unterschiedlichen adipogenen Differenzierungspotentials ein weiterer nicht-haematopoetischer Zelltyp im Nabelschnurblut, die *cord blood mesenchymal stromal cells* (CB-SC), nachgewiesen. CB-SC besitzen im Gegensatz zu USSC die Fähigkeit, Fettzellen zu bilden (28). Nach Microarray-Genexpressionsanalysen wurden differentiell exprimierte Marker zur Unterscheidung der USSC- und CB-SC-Populationen definiert: USSC exprimieren das Gen *delta drosophila homolog-like 1 (DLK1)*, jedoch keine *homeobox (HOX)*-Gene. Umgekehrt sind CB-SC negativ für *DLK1* und exprimieren *HOX*-Gene (28, 29). Des Weiteren unterscheiden sich die beiden neonatalen Zellpopulationen durch die Unterstützung haematopoetischer Zellen *in vitro*. Verglichen mit CB-SC führten USSC als *feeder layer* zu einer höheren Expansionsrate von CD34⁺ haematopoetischen Stammzellen in Ko-Kulturen (30). USSC und CB-SC können bislang noch nicht prospektiv anhand von Oberflächenmarkern aus dem Nabelschnurblut isoliert werden. Daher erfolgt die Unterscheidung nach Isolation und Expansion der Zellen (Kapitel 2.2.1.1) anhand von Genexpression und *in vitro* Differenzierungspotential.

Das Potential von Stromazellen aus dem Nabelschnurblut zur Knochenbildung wurde in präklinischen Tiermodellen belegt. Osteogen vordifferenzierte USSC induzierten auf einer kollagenen Knochenmatrix heterotope Knochenformation nach Implantation in Ratten (31). Jedoch konnte der Nachweis des Potentials von Nabelschnurblut-Stromazellen, Knochen zu bilden und haematopoetische Zellen zu rekrutieren mittels stringenter *in vivo* Assays bis heute nicht erbracht werden (14).

Neonatale UC-SC

Die drei Blutgefäße der Nabelschnur sind in ein schützendes, gelartiges Bindegewebe (*Wharton's Jelly*) eingebettet und vom Amnionepithel umschlossen. In den vergangenen Jahren beschrieben zahlreiche Studien auch in diesem neonatalen Gewebe mesenchymale Stromazellen (*umbilical cord stromal cells*, UC-SC). Dabei weisen die Protokolle große Unterschiede bezüglich der Zellisolation mit (32-35) oder ohne (36-38) vorhergehenden enzymatischem Verdau auf.

Auch bezüglich des Differenzierungspotentials der UC-SC gibt es kontroverse Veröffentlichungen. Einige Studien beschreiben eine geringere Fähigkeit der Zellen, in Richtung Knochen, Fett oder Knorpel zu differenzieren. Capelli *et al.* konnten für UC-SC nur minimale Kalziumablagerungen (osteogene *in vitro* Differenzierung), wenige Fettvakuolen (adipogen) sowie eine geringe Anfärbung extrazellulärer Matrix (chondrogen) nachweisen (36). Auch Sudo und Kollegen zeigten für Stromazellen aus der Nabelschnur im Vergleich zu anderen Geweben ein verringertes Potential adipo- und chondrogen zu differenzieren sowie das vollständige Fehlen osteogener Differenzierung (39). Eine weitere Studie von Kaltz und Kollegen beschrieb *in vitro* ein marginales adipogenes und osteogenes Potential, des Weiteren wurden *in vivo* Studien am Tiermodell durchgeführt (32). Dabei bildeten *umbilical vein-derived stromal cells* nach subkutaner Transplantation in immundefiziente Mäuse kein heterotopes Ossikel aus humanem Knochen, Adipozyten und murinem

haematopoetischem Gewebe (32). Andere Studien beschreiben für UC-SC ein ähnliches Differenzierungspotential wie für BM-SC (40). *In vitro* bildeten UC-SC und BM-SC auf einem Kollagen I/III Gel und nach osteogener Differenzierung Hydroxyapatitkristalle und exprimierten osteogene Marker (41). Zur Analyse des *in vivo* osteogenen Differenzierungspotentials wurden UC-SC auf einer Matrix subkutan in Mäuse implantiert und zeigten Knochenbildung humanen Ursprungs (42). Um das osteogene Potential der UC-SC eindeutig zu belegen, fehlen auch hier Studien, die die Bildung eines heterotopen Ossikels nach *in vivo* Transplantation in Mäusen zeigen.

1.1.1.2 Embryonale Stammzellen / induzierte pluripotente Stammzellen

Nach der erfolgreichen Isolation humaner embryonaler Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC) (43) bestand aufgrund der beschriebenen Pluripotenz und des hohen Proliferationspotentials die Hoffnung, in großen Mengen Zellen zur Herstellung osteogenen Gewebes differenzieren zu können. Gleiches gilt für induzierte pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSC), die erstmals durch Reprogrammierung adulter humaner Hautfibroblasten (44) und seitdem aus unzähligen weiteren adulten Zelltypen generiert wurden. Shinya Yamanaka erhielt für die Beschreibung der Technik zur Reprogrammierung adulter Zellen den Medizin-Nobelpreis 2012, was die Hoffnung verdeutlicht, patienteneigene adulte Zellen zur Reprogrammierung zu nutzen, um Gewebeinkompatibilitäten zu vermeiden. Neben den ethischen Bedenken zur Nutzung embryonaler Stammzellen gibt es auch vor dem möglichen therapeutischen Einsatz von iPSC Hindernisse. Durch virale Transduktion entstandene iPSC bergen ein Risiko für den Patienten durch Integration des Virus in das Genom. Ebenso besteht die Gefahr der Tumorbildung durch kontaminierende, undifferenzierte iPSC oder ESC nach der *ex vivo* Differenzierung zum „gewünschten“ Zelltyp. Außerdem besteht durch die Manipulation des Genoms die Gefahr der genetischen Instabilität (14, 45). Für beide Zelltypen konnte bislang die *in vivo* Fähigkeit zur Knochenbildung und Rekrutierung haematopoetischer Stammzellen nicht belegt werden (14).

1.2 Skelettentwicklung

Während der humanen Embryogenese beginnt die Entwicklung des Skeletts bereits in der vierten Schwangerschaftswoche mit der Anlage der Wirbelkörper. In der fünften bis siebten Woche wird das Knorpelskelett angelegt, ab der neunten Woche beginnt die Knochenbildung (Kapitel 1.2.1), (46)). Knochen besteht zu einem Großteil aus dem Strukturprotein Kollagen, das durch Kalziumphosphatkristalle in Form von Hydroxyapatit zusätzliche Stabilität erlangt. Des Weiteren am Knochenaufbau beteiligt sind nicht-kollagene Proteine (u.a. *bone sialoprotein*), Wasser, Polysaccharide, Zellen und Blutgefäße (46, 47). Die verschiedenen Knochentypen können mikroskopisch, makroskopisch oder anhand ihrer äußeren Form klassifiziert werden.

Per mikroskopischer Analyse können zwei Knochentypen durch die Anordnung der Kollagenfasern identifiziert werden. In den Geflecht-/Faserknochen erscheinen die Kollagenfasern ungeordnet, die Knochenbildung erfolgt sehr schnell (mehr als 4mm pro Tag, (47)). Dieser Knochentyp ist charakteristisch für fetale Knochen sowie die Kallusformation während der Knochenheilung (47). Lamellenknochen wird dagegen sehr langsam gebildet (weniger als 1µm pro

Tag (47)). Die Kollagenfasern und die assoziierte Mineralisierung sind parallel in sogenannten Lamellen angeordnet, wodurch mechanische Stabilität erlangt wird. In nahezu allen Knochen des adulten Organismus wird der Geflecht- durch den Lamellenknochen ersetzt (46, 47).

Makroskopisch kann kortikaler/kompakter von spongiösem/trabekulärem Lamellenknochen abgegrenzt werden. Der dicht mineralisierte kortikale Knochen enthält deutlich mehr Knochengewebe je Volumeneinheit (ca. 90%) als spongiöser Knochen (ca. 5-35%, (48)). Etwa 80% des Knochengewebes im menschlichen Skelett wird durch kortikalen Knochen gebildet (48).

Anhand der äußeren Form werden fünf Knochentypen unterschieden. Die langen Knochen (u.a. Oberschenkel-, Oberarmknochen) werden aufgrund ihrer Markhöhle auch als Röhrenknochen bezeichnet. Anhand der Wachstumsfugen (Kapitel 1.2.1) werden lange Knochen in Diaphyse (zwischen den Wachstumsfugen) und Epiphysen (jenseits der Wachstumsfugen) eingeteilt (48). Kurze Knochen (u.a. Hand-, Fußwurzelknochen) sind kubisch geformt und werden durch spongiösen Knochen gebildet, der von einer dünnen Schicht kortikalen Knochens umschlossen wird (48). Flache Knochen (u.a. Brustbein) sind ähnlich aufgebaut wie kurze Knochen (innen spongiöser, außen kortikaler Knochen), zwischen den Spongiosatrabekeln befindet sich rotes Knochenmark (48). Sesamoide Knochen (u.a. Kniescheibe) sind zwischen Sehnen eingelagerte Knochen (48). Unregelmäßige Knochen (u.a. Wirbel) erhalten ihre Bezeichnung durch ihre unregelmäßige Form und bestehen aus einer dünnen Schicht kortikalen Knochens um einen Kern aus spongiösem Knochen. Auch einige Schädelknochen, die luftgefüllte Hohlräume enthalten, zählen zu den unregelmäßigen Knochen (48).

Die folgenden Zelltypen sind an der Knochenentwicklung beteiligt:

Während der Embryonalentwicklung differenzieren mesenchymale Vorläuferzellen über die Zwischenstufe der Chondroblasten zu Chondrozyten, also zu Knorpelzellen. Diese sezernieren eine Knorpelmatrix und bilden damit die Anlage für die folgende Knochenformation (Kapitel 1.2.1, (49)). Außerdem ermöglichen Chondrozyten das Längenwachstum der Knochen und sind essentiell für die Gelenkentwicklung (49).

Die Knochen-bildenden Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Zellen meso- oder ektodermalen Ursprungs und sind verantwortlich für die Bildung der extrazellulären Matrix während der desmalen und endochondralen Ossifikation (Kapitel 1.2.1) (50). Dazu produzieren sie extrazelluläre Proteine, unter anderem Osteocalcin, Alkalische Phosphatase und Kollagen Typ I (51). Ein Teil der Osteoblasten differenziert zu reifen Osteozyten, die von Knochenmatrix eingebettet werden (Kapitel 1.2.1).

Im Gegensatz zu Osteoblasten stammen Osteoklasten von den haematopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Die vielkernigen Zellen sind verantwortlich für die Resorption von Knochen durch Auflösung von Hydroxyapatit und Degradierung der kollagenreichen organischen Komponente der Knochenmatrix (52). Sowohl während der Knochenneubildung als auch im adulten Organismus ermöglichen Osteoklasten die kontinuierliche Erneuerung der Knochensubstanz.

1.2.1 Chondro- und Osteogenese während der Embryonalentwicklung

Das Knochen/Knorpel-Skelett von Vertebraten besteht aus Elementen unterschiedlichen embryonalen Ursprungs. Das kraniofaziale Skelett (Gesicht und Teile des Schädels) wird aus Zellen der kranialen Neuralleiste (Ektoderm) gebildet, das axiale Skelett (Schädel, Wirbelsäule, Rippen, Brustbein) entsteht aus Zellen des paraxialen Mesoderms (Somiten) und das appendikuläre Skelett (Gliedmaßen, Schultern, Hüftgürtel) aus Zellen des lateralen Plattenmesoderms (50, 53). Während der Embryonalentwicklung migrieren Zellen aus den genannten embryonalen Geweben zum Ort der Skelettentwicklung und formen einen dichten Zellkomplex, die sog. mesenchymale Kondensation (Abbildung 1.1 B), aus der sich auf zwei Arten Knochen entwickelt (50).

Das kraniofaziale Skelett wird durch desmale Ossifikation gebildet. Dazu proliferieren und kondensieren mesenchymale Zellen und differenzieren ohne vorhergehende Knorpelanlage zu Osteoblasten, die eine kalzifizierte Matrix bilden (53).

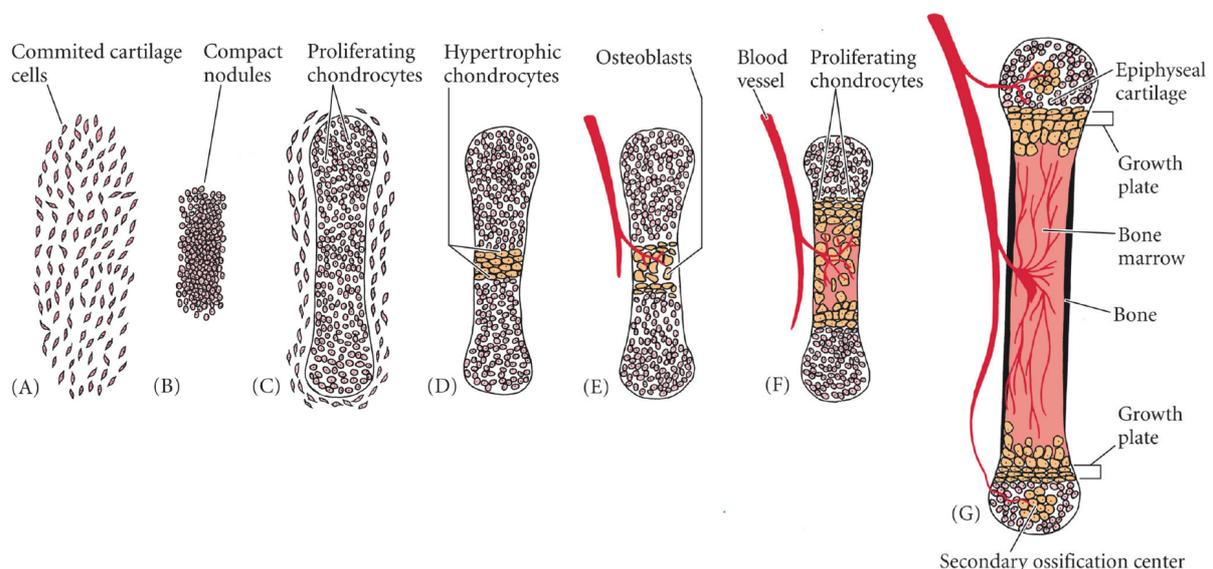


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation.

Entnommen aus (54).

Das restliche Skelett entsteht durch endochondrale Ossifikation bei der aus der mesenchymalen Kondensation zunächst ein Knorpelgerüst angelegt wird (Abbildung 1.1 A-D) (50). Dazu bilden mesenchymale Zellen nicht-hypertrophe Chondrozyten und Zellen des Perichondriums (das den Knorpel umgebende Bindegewebe, Knorpelhaut) (55). Durch Proliferation und Sekretion von extrazellulärer Knorpelmatrix vergrößert sich die Knorpelanlage (prähypertrophe Chondrozyten) (50). Im nächsten Schritt wird die Proliferation in den im Zentrum lokalisierten Chondrozyten eingestellt. Die Zellen nehmen drastisch an Volumen zu, sie reifen zu hypertrophen Chondrozyten. Die jetzt sekretierte extrazelluläre Matrix ist reich an Kollagen Typ X und kann mineralisieren (50, 53). Zellen des Perichondriums, die an die hypertrophen Chondrozyten angrenzen, differenzieren zu Osteoblasten (55). Durch von den hypertrophen Chondrozyten sezernierte Faktoren wird Angiogenese (Sprossung bereits vorhandener Blutgefäße) aus dem Perichondrium induziert (50). Durch die entstehenden Blutgefäße (Abbildung 1.1 E) können Osteoklasten, Osteoblasten aus dem

Perichondrium und haematopoetische Vorläuferzellen in die Knorpelanlage einwandern. Diese Struktur wird als primäres Ossifikationszentrum bezeichnet (50). Die hypertrophen Chondrozyten sterben und werden vermutlich mit Hilfe der Osteoklasten abgebaut. Die Vorläufer der Osteoblasten differenzieren und bilden eine Knochenmatrix, die durch die Akkumulation von Kalziumphosphat in Form von Hydroxyapatit mineralisiert (51, 56). Ein Teil der Osteoblasten wird in die Knochenmatrix eingebaut (Osteozyten), die restlichen Osteoblasten werden apoptotisch oder verbleiben inaktiv als Barriere an der Knochenoberfläche („*bone-lining cells*“) (51, 57). Die durch die Blutgefäße eingewanderten haematopoetischen Zellen bilden das Knochenmark (50).

Die endochondrale Ossifikation beginnt im Zentrum der Knorpelanlage und setzt sich in beide Richtungen fort. An einem oder beiden Enden der Knorpelanlage (Epiphyse) entstehen sekundäre Ossifikationszentren, eine Schicht aus Knorpelzellen verbleibt und ermöglicht weiteres Knochenwachstum (Wachstumsfuge, Abbildung 1.1 G).

1.2.1.1 Regulation der mesenchymalen Kondensation

Nach der Migration mesenchymaler Zellen zum Ort der Skeletogenese führen Interaktionen zwischen epithelialelem und mesenchymalem Gewebe zur Initiation der Kondensation. Dies wird auf zellulärer Ebene durch die erhöhte Zelldichte und auf molekularer Ebene durch die Expression charakteristischer Moleküle der extrazellulären Matrix und der Zelladhäsion sichtbar (58). Zellen der mesenchymalen Kondensation produzieren eine extrazelluläre Matrix, die hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht (Abbildung 1.2, (49)) und exprimieren die Zelladhäsionsmoleküle N-Cadherin und NCAM (*neural cell adhesion molecule*, CD56) (59). Die Expression der Zelladhäsionsmoleküle wird durch *TGFβ* (*transforming growth factor beta*) initiiert (59). Dieses Zytokin wird auch als Induktor der Chondrogenese für *in vitro* Differenzierungen verwendet (Tabelle 3).

Bone morphogenetic proteins (*BMPs*, u.a. *BMP2*, 4 und 7), die ursprünglich als Regulatoren der Ossifikation beschrieben wurden, spielen auch in der mesenchymalen Kondensation und in nahezu jedem Schritt der Chondrogenese eine Rolle (59, 60). So unterstützen *BMPs* ebenfalls die Bildung von Zell-Zell-Kontakten durch die Induktion von N-Cadherin (60). Der *BMP*-Inhibitor Noggin blockierte in *in vivo* Studien am Huhn die Bildung der mesenchymalen Kondensation, was zu einer fehlenden Knorpelentwicklung führte (61).

Die 39 im humanen System beschriebenen *HOX*-Gene sind auf 4 paraloge Cluster (A-D) verteilt (62). Während der Embryogenese sind die *HOX*-Gene durch ihre zeitliche und räumliche (anterior/posterior) Expression an der Achsenfestlegung und der Extremitätenentwicklung beteiligt. Gene der *HOX*-Cluster A und D sind in die frühe Musterbildung im undifferenzierten Mesenchym involviert (59) und regulieren zuerst die epithelial-mesenchymalen Interaktionen und später die Bildung der Kondensation (58).

Zellen der mesenchymalen Kondensation differenzieren direkt in Osteoblasten (desmale Ossifikation) oder zunächst in Chondrozyten (endochondrale Ossifikation) (50). Die Regulation beider Prozesse wird im Folgenden beschrieben.

1.2.1.2 Regulation der desmalen Ossifikation

Der Mechanismus der desmalen Ossifikation wird über den Transkriptionsfaktor *runx-related transcription factor 2 (RUNX2)* vermittelt. *RUNX2* wird durch *BMPs*, wahrscheinlich durch *BMP2, 4, 7*, aktiviert und induziert die mesenchymalen Zellen der kranialen Neuralleiste zur direkten Knochenformation (53). Auch die *HOX*-Gene, unter anderem *HOXA1, A2, A3* und *B1* sind an der Regulation der desmalen Ossifikation beteiligt (50, 63, 64).

1.2.1.3 Regulation der endochondralen Ossifikation

Der für die endochondrale Ossifikation essentielle Prozess der Chondrogenese wird durch Signale der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren, intrazelluläre Signalkaskaden sowie durch die räumlich/zeitliche Regulation der Genexpression beeinflusst (59). Abbildung 1.2 stellt einige der wichtigsten Regulatoren der endochondralen Ossifikation sowie die Bestandteile der extrazellulären Matrix zusammen.

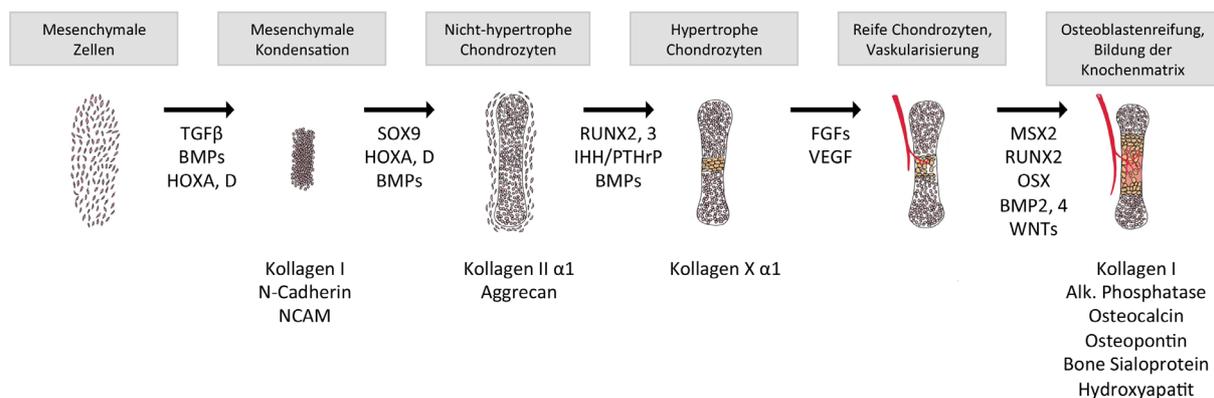


Abbildung 1.2: Genregulation und Bildung der extrazellulären Matrix während der endochondralen Ossifikation.

Vereinfachte Darstellung der Regulation der endochondralen Ossifikation. Teile der Abbildung wurden entnommen aus (54).

TGFβ; Transforming growth factor beta, *BMP*: Bone morphogenetic protein, *HOX*: homeobox, *SOX9*: SRY-Box9, *RUNX2/3*: Runt-related transcription factor 2/3, *IHH*: Indian hedgehog, *PTHrP*: Parathyroid hormone-related protein, *FGF*: fibroblast growth factor, *VEGF*: Vascular endothelial growth factor, *MSX2*: homolog of muscle segment homeobox 2 drosophila, *OSX*: Osterix/transcription factor SP7, *WNT*: wingless-type MMTV integration site family, *N-CAM*: Neural cell adhesion molecule CD56.

Nach der Differenzierung von Zellen aus der mesenchymalen Kondensation zu nicht-hypertropen Chondrozyten proliferieren diese stark und exprimieren Kollagen Typ II α1 und das Proteoglykan Aggrecan (65). Proliferation und Differenzierung der nicht-hypertropen Chondrozyten wird durch den Hauptregulator der Chondrogenese, den Transkriptionsfaktor *SRY-Box 9 (SOX9)*, gesteuert (65). *Sox9^{-/-}* Mäuse exprimieren keine der für nicht-hypertrophe Chondrozyten charakteristischen Gene (66). *SOX5* und *SOX6* aus der gleichen Proteinfamilie können an *SOX9* binden und dessen Aktivität verstärken (67).

Durch *Runx2^{-/-}* Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass dieser Transkriptionsfaktor neben der Osteoblastenentwicklung auch die Differenzierung zu hypertropen Chondrozyten reguliert (68).

Während der Chondrogenese hat *RUNX2* zum einen eine induzierende Wirkung, indem es durch seine zeitlich begrenzte Expression in Chondrozyten deren Hypertrophie fördert. Zum anderen inhibiert die Expression in Zellen des Perichondriums die Chondrozytenreifung, möglicherweise um eine zu frühe Knochenbildung zu verhindern (65). *RUNX3*, ein weiterer Transkriptionsfaktor aus der *RUNX*-Familie, fungiert ebenfalls als positiver Regulator der Hypertrophie (69).

Indian hedgehog (IHH), das in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird und *parathyroid hormone-related protein (PTHrP)*, das von Zellen des Perichondriums und von proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird, beeinflussen in einem negativen *feedback-loop* die Hypertrophie. Durch die zeitlich begrenzte Induktion von Proliferationsmarkern und die Repression von Differenzierungsmarkern wird die Anzahl hypertrophierender Zellen reguliert (55, 59, 70). *IHH* induziert zudem Zellen des Perichondriums zur Differenzierung in Osteoblasten (55).

Während des gesamten Prozesses der Chondrogenese interagieren der *fibroblast growth factor* (FGF)- und der BMP-Signalweg. *FGFs* reduzieren die Proliferation der Chondrozyten, steigern die Expression von *IHH* und fördern die Differenzierung zu reifen Chondrozyten. BMPs wirken bei jedem dieser Schritte gegensätzlich (55).

Hypertrophe Chondrozyten sind durch die Expression von Kollagen Typ X $\alpha 1$ gekennzeichnet (65), das die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix ermöglicht (53).

Die Vaskularisierung der hypertrophen Zone wird über *vascular endothelial growth factor (VEGF)* vermittelt, das von Chondrozyten exprimiert wird. Gleichzeitig findet eine verstärkte Expression der VEGF-Rezeptoren in Zellen des Perichondriums statt. Während der Reifung zu hypertrophen Chondrozyten initiiert *RUNX2* eine verstärkte Sekretion von VEGF, wodurch Angiogenese induziert wird (71). Osteoblastenvorläufer wandern in die Knorpelanlage ein und reifen zu Osteoblasten.

Während ihrer Reifung sekretieren Osteoblasten zunächst eine Knochenmatrix, die reich an Kollagen Typ I ist und auf die von hypertrophen Chondrozyten gebildete Matrix aus Kollagen Typ X aufgelagert wird. Außerdem exprimieren sie Alkalische Phosphatase, ein Enzym das an der Mineralisierung der Matrix beteiligt ist (49, 72). Mit fortschreitender Reifung exprimieren Osteoblasten knochenspezifische Proteine wie *osteocalcin (OC)* und *integrin-binding/bone sialoprotein (BSP)*. In diesem Stadium findet die Mineralisierung der Knochenmatrix statt (72).

Der Transkriptionsfaktor *RUNX2* ist essentiell für die Osteoblastendifferenzierung. Die homozygote Deletion von *Runx2* in Mäusen führt zu einem völligen Fehlen von Osteoblasten (73). Zu den von *RUNX2* aktivierten Genen gehören *OC*, *osteopontin (OPN)*, Kollagen Typ I und *BSP*. (74, 75).

Runx2^{-/-}-Mäuse weisen keine Expression von *osterix/transcription factor SP7 (OSX)* auf, das in der Transkriptionskaskade nach (*downstream*) *RUNX2* lokalisiert ist (75, 76). Die Inaktivierung von *Osx* in *knockout*-Mäusen ist durch das völlige Fehlen einer Knochenbildung perinatal letal (65, 76).

Das Gen *homolog of muscle segment homeobox 2 drosophila (MSX2)* ist in der Regulationskaskade, die die Differenzierung von Osteoblasten steuert, vor (*upstream*) *RUNX2* lokalisiert (65). *MSX2*-defiziente Mäuse weisen eine fehlerhafte Osteogenese in durch endochondrale Ossifikation entstandenen Knochen auf (77).

Auch während der Osteoblastendifferenzierung spielen *BMPs* eine essentielle Rolle. Für *Bmp2* und *Bmp4* wurde durch *knockout*-Studien nachgewiesen, dass eine bestimmte Transkriptionsstärke beider Gene für die Reifung der Osteoblasten nötig ist (78).

Mitglieder der WNT-Proteine (*wingless-type MMTV integration site family*) des kanonischen WNT/ β -Katenin Signalweges sind nötig für die Reifung von Osteoprogenitorzellen zu reifen Osteoblasten (79).

1.2.2 Ausblick: Einsatz neonataler Stromazellen in der Therapie von Knochendefekten

Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, unterscheiden sich Elemente des Skeletts hinsichtlich ihres embryonalen Ursprungs. Das kraniofaziale Skelett wird von ektodermalen Neuralleistenzellen, das restliche Skelett von mesodermalen Zellen gebildet. Die Skelettelemente weisen je nach embryonaler Herkunft einen unterschiedlichen „*HOX*-Code“ auf. Das kraniofaziale Skelett ist *HOX*-negativ (80), der Großteil des restlichen Skeletts hingegen *HOX*-positiv (81). Dies gilt auch für die jeweiligen Progenitorzellen aus diesen Geweben, die an der Knochenheilung beteiligt sind und unter anderem aus dem Periosteum isoliert werden können (81).

Leucht und Kollegen führten Transplantationsversuche in Mäusen durch, bei denen auch die Expression der *HOX*-Gene analysiert wurde, da diese die Musterbildung und Osteogenese während der Skelettentwicklung beeinflussen (Kapitel 1.2.1). Skeletale Progenitorzellen aus der mesodermalen Tibia (*HOX*^{pos}) wurden in Defekte der ektodermalen Mandibel (*HOX*^{neg}), eingebracht was zu einer Knorpelbildung statt Knochenregeneration führte. Hingegen resultierte die Transplantation von Osteoprogenitorzellen aus der Mandibel (*HOX*^{neg}) in einen Knochendefekt der Tibia (*HOX*^{pos}) in der Bildung von neuem Knochen (81). Die *HOX*-positiven Zellen behielten die Expression auch nach Transplantation in das *HOX*-negative Gewebe bei, die *HOX*-negativen Zellen adaptierten hingegen die *HOX*-Expression des Gewebes in das sie eingebracht wurden (81).

Dazu passt die Beobachtung von Kieferchirurgen, die nach Nutzung von Knochenfragmenten aus dem Beckenkamm zur Behandlung von Knochendefekten im Kiefer keine dauerhafte Knochenregeneration nachweisen konnten (14, 82). Die Korrelation des *HOX*-Codes eines transplantierten Gewebes oder transplantierte Zellen und des „Zielgewebes“ beeinflusst demnach möglicherweise den Erfolg der Geweberegeneration.

Wie bereits in Kapitel 1.1.1.1 beschrieben, unterscheiden sich die in dieser Arbeit analysierten neonatalen Stromazellpopulationen aus dem Nabelschnurblut hinsichtlich der Expression der *HOX*-Gene: USSC sind *HOX*-negativ, CB-SC *HOX*-positiv (29). In Kenntnis der oben beschriebenen Studie von Leucht und Kollegen könnte der embryonale Ursprung – und damit auch der *HOX*-Code – dieser Zelltypen den regenerativen Erfolg bei einem potentiellen Einsatz zur Knochenregeneration in *tissue engineering* Anwendungen (Kapitel 1.1) beeinflussen (83).

1.3 Ziele der Arbeit

Die *in vitro* Herstellung von Knochengewebe (*bone tissue engineering*) ist ein vielversprechender Ansatz zur Regeneration von Knochendefekten. Dazu wird eine dreidimensionale Matrix natürlichen oder synthetischen Ursprungs mit patienteneigenen oder –fremden Zellen besiedelt. Zudem wird versucht, die Bildung von Knochengewebe und dessen Vaskularisierung durch Wachstumsfaktoren oder Ko-Besiedelung mit blutgefäßbildenden Zellen zu unterstützen.

Autologe Stromazellen aus dem Knochenmark (BM-SC) galten bisher als Gold-Standard für die Anwendung zur Knochenregeneration (14) und sollen in dieser Arbeit mit neonatalen Stromazellpopulationen aus der Nabelschnur (UC-SC) und dem Nabelschnurblut (USSC, CB-SC) verglichen werden. Diese Zelltypen stellen potentielle Alternativen zu BM-SC dar, die ohne Risiko für den Spender isoliert und stark expandiert werden können. Um das Potential im Hinblick auf den möglichen therapeutischen Einsatz zu analysieren, soll zunächst eine vergleichende Basischarakterisierung hinsichtlich Wachstumsvermögen, Immunphänotyp, *HOX*-Genexpression und *in vitro* Differenzierungspotential erfolgen. Mittels detaillierter Expressionsanalysen soll die mit der Knochenbildung assoziierte Genexpressionssignatur der zu untersuchenden Zellpopulationen beschrieben und in Relation zu *in vitro* Differenzierungen interpretiert werden. Anschließende Überexpressionsexperimente differentiell exprimierter Gene sollen deren Funktion in humanen neonatalen Zellpopulationen sowie den Einfluss auf das Differenzierungspotential aufklären.

Transplantationsversuche in Mäusen konnten zeigen, dass die Korrelation der *HOX*-Genexpression in Transplantat und Zielgewebe den Erfolg der Knochenregeneration beeinflusst (81). *HOX*-negative Gewebe/Zellen adaptierten nach Implantation die *HOX*-Expression des Zielgewebes und induzierten die Knochenregeneration. *HOX*-positive Transplantate hingegen induzierten im Knochendefekt die Bildung von Knorpel. Angelehnt an diese Studie soll die *in vivo*-Situation nach Transplantation *HOX*-negativer Zellen in eine *HOX*-positive Umgebung *in vitro* durch direkte Ko-Kultur von *HOX*-negativen USSC mit *HOX*-positiven Zellen (UC-/CB-/BM-SC) simuliert werden. Der Einfluss der gemeinsamen Kultivierung auf die Genexpression und das *in vitro* Differenzierungspotential soll analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Liste der Verbrauchsmaterialien und zugehörigen Hersteller.

Produkt	Hersteller
0,25% Trypsin	Lonza (Verviers, Belgium)
0,25% Trypsin/EDTA Solution	PAA/GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
100 bp Leiter	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
15ml / 50ml Röhrchen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
3' IVT Express Kit	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
5x First strand buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
96 well plates, optical for qPCR	Biozym Scientific (Hess.Oldendorf)
Aceton	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose (Molecular Biology Grade)	Eurogentec (Köln)
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Alizarin Rot	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Alkalische Phosphatase (CIP, calf intestine phosphatase)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers	GE Healthcare (Freiburg)
Ammoniumchlorid Lysepuffer pH 7,4	Zentralapotheke Uniklinikum Düsseldorf
Ammoniumhydroxyd	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ampicillin Sodium Salt	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Antioxidant	Invitrogen (Karlsruhe)
Aqua Dest. Spüllösung	Delta Select (Dreieich)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ascorbinsäure 2-Phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Warrington, UK)
Bis Tris-Novex SDS Gele	Invitrogen (Karlsruhe)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
BSA (Albumin Fraktion V Protease-frei)	Roth (Karlsruhe)
Chamber slides	Merck (Darmstadt)
Cloning cylinders	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Collagenase P	Invitrogen (Karlsruhe)
Cryo-Sure DMSO	WAK-Chemie Medical (Steinbach)
Cytofix/Cytoperm	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DMEM (low Glucose: 1g/L; high Glucose: 4,5g/l)	Lonza (Verviers, Belgium)
dNTP Mix (10mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
DTT (0,1M)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E.coli</i> RNase H (2U/μl)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E.coli</i> TOP10	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Fluca / Sigma-Aldrich (Steinheim)
Entellan	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Fast Green	Waldeck/Chroma S (Münster)
FastDigest® Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI	Fermentas/Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
FCS	HyClone (New Zealand) / Lonza (Walkersville, MD, USA)
Ficoll (Biocoll Separating Solution)	Biochrom AG (Berlin)
Formaldehyd	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
FuGENE® transfection reagent	Roche (Grenzach-Wyhlen)
GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
Glycerol 2-Phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
IBMX	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Indomethacin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Insulin-Transferrin-Selenium	Invitrogen (Karlsruhe)

Fortsetzung Tabelle 1

Produkt	Hersteller
Kryoröhrchen (CRYO.S)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
L-Glutamin (200mM in 0,85% NaCl Solution)	Lonza (Verviers, Belgium)
LB-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
LDS Sample Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
MES Runningbuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
MgCl ₂ (50mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
MicroAmp Optical 96 well Reaction Plate	Applied Biosystems (Warrington, UK)
Midori Green	Biozym Scientific (Hess.Oldendorf)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
NaCl	Merck (Darmstadt)
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumthiosulfal-Pentahydrat	Merck (Darmstadt)
Normal Goat Serum	Linaris (Wertheim)
Nupage Transfer-Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Oil Red O	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Oligo(dT) ₂₀ (50 µM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Oligonukleotide	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Paraformaldehyde Solution (PFA) (4% in PBS)	USB Corporation (Cleveland, OH, USA)
PBS pH 7,3	Serag Wiessner (Naila)
PCR Softstrips	Biozym Scientific (Hess.Oldendorf)
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) je 10000U/ml	Lonza (Verviers, Belgium)
PermWash	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
Petrischale (10cm)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Phusion® high-fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Pipettenspitzen	Biozym Scientific (Hess.Oldendorf)
Plasmid Purification Kit (Mini oder Maxi)	Qiagen (Hilden)
Power SYBR® Green PCR Mastermix	Applied Biosystems (Warrington, UK)
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen (Karlsruhe)
Pronase E	Merck (Darmstadt)
Protease inhibitor cocktail tablets	Roche (Grenzach-Wyhlen)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNase OUT (40 U/µl)	Invitrogen (Karlsruhe)
RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Safranin O	Waldeck/Chroma S (Münster)
Sample Reducing Agent	Invitrogen (Karlsruhe)
See Blue Plus 2 Molekulargewichtsmarker	Invitrogen (Karlsruhe)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sterilfilter 0,45µm	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Stripetten	Costar, Corning incorporated (Corning, NY, USA)
SuperScript III RT (200U/µl)	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Taq DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen (Karlsruhe)
TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix No Amp Erase® UNG	Applied Biosystems (Warrington, UK)
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems (Warrington, UK)
TGFβ1	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Tissue Freezing Medium (Einbettmedium für Gefrierschnitte)	Jung (Heidelberg)
TRI Reagent (Trizol)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Western Lightining Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Xylol	Merck (Darmstadt)
Zellkulturflaschen	Corning (Corning, NY, USA)
Zellkulturplatten (6/24 well)	Costar, Corning incorporated (Corning, NY, USA)
β-Mercaptoethanol/2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Tabelle 2: Verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
Aviso CellCelector	ALS Automated Lab Solutions (Jena)
Axiocam HRC camera	Zeiss (Oberkochen)
Axioplan 2 imaging microscope	Zeiss (Oberkochen)
CO2 Inkubator HERAccl 240i	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
FACS Canto	BD Bioscience (Bedford, MA, USA)
Genepulser-2 Electroporation System	Bio-Rad Laboratories (München)
Inkubator Hepa Class 100	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Kryostat Leica CM1850	Leica (Wetzlar)
LAS 3000 Lite	Fujifilm Europe (Düsseldorf)
MoFlo XDP Sorter	Beckman Coulter (Krefeld)
NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
PCR-Cycler (MasterCycler proS)	Eppendorf (Hamburg)
Semi Dry Blotting Apparatur	Invitrogen (Karlsruhe)
StepOnePlus	Applied Biosystems (Warrington, UK)
X Cell Sure Lock Gelapparatur	Invitrogen (Karlsruhe)
Zentrifuge MIKRO 22 R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Zentrifuge ROTIXA 50 RS	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

2.1.1 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien der Zelltypen UC-SC, USSC, CB-SC und BM-SC wurden in der Arbeitsgruppe Kögler des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf isoliert (Kapitel 2.2.1.1). Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zeigt Tabelle A 1. Ebenso wurde die Zelllinie BS1 (genutzt zur Klonierung des Gens *BSP*, Kapitel 2.2.2.9) durch Ausplattieren eines humanen Beckenspongiosa-Knochenstückes auf einer Zellkulturschale in Kulturmedium (Tabelle 3) selbst generiert. Die Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 wurde von ATCC bezogen. Humane Adipozyten wurden vom Deutschen Diabetes-Zentrum, Fibroblasten aus der Vorhaut von der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf und die Zelllinie HEK293T (Kapitel 2.2.2.9) vom Institut für Humangenetik und Anthropologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Medien

Tabelle 3: Zellkulturmedien.

Kulturmedium
DMEM <i>low glucose</i>
30% FCS
1% PSG

Negativmedium (für adipo- und osteogene Differenzierung)
DMEM <i>low glucose</i>
10% FCS
1% PSG

Adipogene Differenzierungsmedien	
Induktionsmedium	Kultivierungsmedium
DMEM <i>high glucose</i>	DMEM <i>high glucose</i>
10% FCS	10% FCS
1% PSG	1% PSG
0,1mg/ml Insulin	0,01mg/ml Insulin
1mM IBMX	
10 ⁻⁶ M Dexamethason	
0,2mM Indomethacin	

Chondrogenes Differenzierungsmedium
DMEM <i>high glucose</i>
1% PS
100nM Dexamethason
35µg/ml Ascorbinsäure 2-Phosphat
1mM Natriumpyruvat
Insulin-Transferrin-Selenium (1/100 Verd.)
10ng/ml TGF β1

Osteogenes Differenzierungsmedium
DMEM <i>low glucose</i>
30% FCS
1% PSG
10 ⁻⁷ M Dexamethason
50µg/ml Ascorbinsäure
10mM β-Glycerolphosphat

2.1.3 Primer

Tabelle 4: Primersequenzen und Annealingtemperaturen.

Klonierungsprimer sind grau unterlegt dargestellt.

Primer	forward (5'-3')	reverse (5'-3')	Produktgröße (bp)	Annealingtemp. (°C)
<i>ADIPOQ (APM1)</i>	TGTTGCTGGGAGCTGTCTACTG	ATGTCTCCCTTAGGACCAATAAG	235	60
<i>BMP2</i>	TGCGCCAGGTCCTTTGACC	AACGCTAGAAGACAGCGGGTCC	134	60
<i>BMP4</i>	CCACCACGAAGAACATCTGG	ACCTCGTTCTCAGGGATGC	96	60
<i>BSP</i>	GGGCAGTAGTGACTCATCCG	AAGCTGGATTGCAGCTAACCC	214	60
<i>FABP4</i>	GCTTTGCCACCAGGAAAGTG	ATGACGCATCCACCACAG	280	60
<i>FOS</i>	CTTACTACCACTACCCGCAG	GTGGGAATGAAGTTGGCACTG	106	60
<i>FOXF1</i>	CAGCCTCTCCACGCACTC	CCTTTCGGTCCACACATGCT	122	60
<i>GAPDH</i>	GAGTCAACGGATTTGGTCTG	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238	60
<i>HHIP</i>	AGTCTGTGACAAAGCAGTG	TTCCATTGTGAGTCTGGGTC	163	55
<i>HOXA1</i>	ATCGGAGACATCTTCTCCA	CAGGTAAGTGTGAAGTGG	178	56
<i>HOXA10</i>	GATTCCTGGCAATTCC	ACTTGTCTGTCGGTGAGG	191	56
<i>HOXA11</i>	AACTTCAAGTTCGGACAGC	AGACGCTGAAGAAGAATCTC	230	56
<i>HOXA13</i>	TACCTGGATATGCCAGTG	GATTTCCCGTTCAAGTTC	279	56
<i>HOXA2</i>	TCAGCCACAAAGAATCCCT	CTCTCAGTCAAATCCAGCA	175	56
<i>HOXA3</i>	TCAGAATGCCAGCAACAAC	AGTGAGGTTACAGCAGATTG	310	56
<i>HOXA4</i>	TGGATGAAGAAGATCCATG	TGGTCTTTTCCACTTCA	233	56
<i>HOXA5</i>	TAAGTCATGACAAACATAGGC	TTAAACGCTCAGATACTCAG	276	56
<i>HOXA6</i>	ACTACCTGCACCTTTCTCC	CGTGAATGTAGAGCTTG	359	56
<i>HOXA7</i>	TCCTACGACAAAACATCC	GTCTTATGTCTTTCTTCC	324	56
<i>HOXA9</i>	AATGCTGAGAATGAGAGCGG	TCTCGGTGAGGTTGAGCAG	208	56
<i>HOXB1</i>	CAAGACAGCGAAGGTGTCA	CTTCTGCTTATTCTGTCGG	208	56
<i>HOXB13</i>	AGCATTGCGAGACTCCAGC	TGTTCTTACCTTGGCGAG	251	56
<i>HOXB2</i>	TCCACCCTTCAGAGACCCA	GCGGGTGACAGCAGGCTT	565	56
<i>HOXB3</i>	CAAATCTCCTTGGACCGGCTGTTG	GTCCAAGCGGCTGACCTTAG	282	56
<i>HOXB4</i>	GCAAAGTTCACGTGAGCA	TTGGGCAACTTGTGGTCT	238	56
<i>HOXB5</i>	ATCAGCCATGATATGACCCG	GTTGCTCTTCTCCACTTC	207	56
<i>HOXB6</i>	GAATTCGTGCAACAGTTCC	TATCTTATGTCTGCTCTCC	175	56
<i>HOXB7</i>	GAGTAACTTCCGGATCTACC	TGATCTGTCTTTCCGTGAGG	182	56
<i>HOXB8</i>	TACGCAGACTGCAAGCTTG	TTTGCTGCTGGGAACTTG	324	56
<i>HOXB9</i>	TGCTGTCTAATCAAAGACC	AGAAACTCCTTCTTAGCT	175	56
<i>HOXC10</i>	AGACACCTCGGATAACGAAG	AATGGTCTTCTAATCTCCAG	190	56
<i>HOXC11</i>	TTTCTTCGACAACGCCTAC	TCCGTACAGTTTCCAGCATC	360	56
<i>HOXC12</i>	AATCCGACTCCAGTTCGTC	TCTGCCAGTTGCAACTTCG	184	56
<i>HOXC13</i>	TGTACTGCTCCAAGGAGCA	CTTCTAGCTCCTTCAGC	152	56
<i>HOXC4</i>	AATTCACGTTAGCACGGTG	AGTGGTCTTCAGAAGTACC	317	56
<i>HOXC5</i>	TGACCAAAGTGCACATGAG	TTCTTCAACTTATCCTGTC	205	56
<i>HOXC6</i>	ATGCAGCGAATGAATTGCG	GTGGATGTGAGATTAGATTC	239	56
<i>HOXC8</i>	CCAACACTAACAGTAGCGA	GATCTTCACTGTCTCTCG	233	56
<i>HOXC9</i>	AAGCACAAAGAGGAGAAGG	GTTTAGGACTGCTCCTGT	281	56
<i>HOXD1</i>	TCTAAGAAGGCAAACCTCGC	GTGTCATTACAGGTGCAAGC	170	56
<i>HOXD10</i>	CAAGAGTACAATAAGCCC	GGTGTATCAGACTTGATTTTC	278	56
<i>HOXD11</i>	AATGGCATCTTGGCACAGG	AAACTCGGTTCCAGTTCG	345	56
<i>HOXD12</i>	AACTTGAACATGACAGTGC	TATTGGACAATTCCTTGCC	202	56
<i>HOXD13</i>	ATATCGACATGGTGTCCAC	CCGCTTGTCTTGTAAATG	302	56
<i>HOXD3</i>	AGCAGAAGAACAGCTGTGC	GTGAGATTCAGCAGGTTGG	187	56
<i>HOXD4</i>	ATGAAGAAGGTGCACGTGA	TGTGAGCGATTTCAATCCG	160	56
<i>HOXD8</i>	TGAGACCACAAGCAGCTCC	GTCTTCTCCAGCTCTTGG	284	56
<i>HOXD9</i>	CAACTTGACCCAAACAACC	ACCTGTCTCTGTAGGT	182	56
<i>MSX2</i>	AATTCAGAAGATGGAGCGGCGTG	CGAGGAGCTGGGATGTGGTAAAG	145	65
<i>OC (BGLAP)</i>	CCTCACACTCTGCCCTATT	CCCTCTGCTTGGACACAAA	117	60
<i>OSX (SP7)</i>	TGCTTGAGGAGGAAGTTCAC	CTGAAAGGTCAGTCCAC	153	60
<i>PLIN</i>	CTCACCTTGCTGGATGGAGA	CGAGTGTGGCAGCAAATTC	485	60
<i>PPARγ</i>	GCTGTTATGGGTGAAACTCTG	ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC	351	60
<i>RPL13A</i>	GAGGTATGCTGCCCAACAAA	TTACAGACGACACCTTGAG	136	60
<i>RUNX2</i>	GAGTGGACGAGGCAAGAG	GGACACCTACTCTCACTG	215	60
<i>BSP (Klon.)</i>	AAAGAATTCGCCACCATGAAGACTGCTTTAATTTGCT	AAAGGATCCTCACTGGTGGTGGTAGTAATTC	978	60
<i>OSX (Klon.)</i>	AAAGAATTCGCCACCATGGCGTCTCCCTGCTTGA	AAAGGATCCTCAGATCTCCAGCAAGTTGCTC	1320	65

2.1.4 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper und die zugehörigen Hersteller.

Antikörper	Klon	Hersteller
CD 31 FITC	5.6E	Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
CD 45 FITC	2D1	BD Biosciences (Heidelberg)
CD 56 PE	NKH-1	Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
CD 71 FITC	YDJ1.2.2	Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
CD 73 PE	AD2	BD Biosciences (Heidelberg)
CD 90 FITC		Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
CD105 PE	166707	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
CD117 PE		R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
CD146 FITC	128018	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
CD184 PE	12G5	BD Biosciences (Heidelberg)
CD326 FITC	HEA125	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Cytokeratin FITC	J1B3	Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor® 488 Conjugate		Invitrogen (Karlsruhe)
Goat anti-mouse IgG-HRP		Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Goat F(ab') ₂ fragment anti-mouse IgG+IgM (H+L) - FITC		Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
HLA-ABC FITC	B9.12.1	Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
HLA-DR PE	G46-6	BD Biosciences (Heidelberg)
IgG1		Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
IgG1 FITC		Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
IgG1 PE		Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)
Monoclonal mouse anti-BSP	LFMv-24	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Monoclonal mouse anti-HOXC10	3F2	Abnova (Heidelberg)
Monoclonal mouse anti-SP7 (OSX)	2G6	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Monoclonal mouse anti-β-Actin	AC-74	Sigma-Aldrich (Steinheim)
NG2 PE		Immunotech/Beckman Coulter (Krefeld)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

2.2.1.1 Isolation und Expansion der verschiedenen Zelltypen

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf hat die Genehmigungen zur Isolation der verschiedenen Zelltypen mit den folgenden Studiennummern erteilt: UC-SC: #3436, USSC/CB-SC: #2975, BM-SC: #3240.

Zur Isolation von UC-SC wurden humane Nabelschnüre in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf unter schriftlicher Einverständnis der Spenderinnen gesammelt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in Kochsalzlösung, die Isolation der Zellen wurde innerhalb von 24 Stunden durchgeführt. Sowohl die Nabelschnur als auch die Nabelschnurvene wurden mit *phosphate buffered saline* (PBS) gespült (Abbildung A 1). Die Nabelschnur wurde mit einem Skalpell längs der Vene geöffnet und in kleine Stücke geschnitten (2x2mm). Diese wurden in eine sterile Zellkulturschale überführt, nach etwa 30 Min. wurde das Kulturmedium (Tabelle 3) vorsichtig zugegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 6 Tagen. Nachdem auswachsende Zellen zu erkennen waren, wurden die Nabelschnurstücke entfernt und die Zellen expandiert. Auf diese Weise wurden 9 Zelllinien generiert, deren Zellen aus vielen Nabelschnurstücken ausgewachsen sind (zum besseren Verständnis siehe Abbildung A 1). Um zu untersuchen, ob diese „Mischpopulation“ das Differenzierungspotential der UC-SC beeinflusst, wurden einzelne Nabelschnurstücke ausplattiert (Abbildung A 1) und die ausgewachsenen Zellen kultiviert (8 Zelllinien aus 2 verschiedenen

Nabelschnüren). Dies zeigte keinen Einfluss auf das Differenzierungspotential der Zellen (Daten werden nicht dargestellt). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse beruhen auf der Verwendung von UC-SC Zelllinien, deren Zellen aus vielen Nabelschnurstücken ausgewachsen sind.

USSC und CB-SC (Kapitel 1.1.1.1) wurden aus humanem Nabelschnurrestblut, das nach schriftlicher Einverständnis der Spenderinnen gesammelt wurde, generiert. Dabei wurden ausschließlich Nabelschnurblutspenden verwendet, die aufgrund einer zu geringen Zellzahl als haematopoetisches Stammzelltransplantat ungeeignet waren. Die Isolation der Zellen wurde wie folgt durchgeführt (detailliert beschrieben in (27)). Die mononukleären Zellen (MNC) wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenseparation (Dichte: 1,077g/ml) isoliert. Die Zellen der Interphase wurden gewaschen, die verbliebenen Erythrozyten durch Ammoniumchlorid lysiert. Die MNC wurden in mit Dexamethason (1×10^{-7} M/ml) versetztem Kulturmedium ausplattiert. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt. Sobald adhären Kolonien sichtbar wurden, wurde Medium ohne Dexamethason verwendet. Hatten sich nach 4 Wochen keine Kolonien gebildet, wurden die Kulturen verworfen. Kolonien wurden mit Hilfe von kleinen Zylindern (*cloning cylinders*) einzeln trypsiniert und expandiert. Um „USSC-Kolonien“ von „CB-SC Kolonien“ zu unterscheiden, wurde nach Expansion der Zellen die Expression von *DLK1* und der *HOX*-Gene sowie das adipogene Differenzierungspotential analysiert. USSC exprimieren *DLK1*, jedoch keine *HOX*-Gene und sind nicht zur adipogenen Differenzierung fähig. CB-SC dagegen sind *DLK1*-negativ, exprimieren *HOX*-Gene und können nach adipogener Induktion Adipozyten bilden (Kapitel 1.1.1.1, (28, 29)).

BM-SC wurden aus Knochenmarkaspiraten aus dem Beckenkamm gesunder Spender isoliert (beschrieben in (84)).

Alle Zelltypen wurden in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert bis sie 80% Konfluenz erreicht hatten. USSC und CB-SC wurden mit Trypsin (0,25%) abgelöst, BM-SC mit Trypsin/EDTA (0,25%). Um die enzymatische Aktivität des Trypsins abzuschwächen, wurde Kulturmedium zu den Zellen gegeben bevor diese pelletiert wurden (7 Min., 550RCF, 4°C). Die Zellzahlen wurden unter Verwendung einer Neubauerkammer ermittelt. Je nach Versuchsplanung wurden die Zellen neu ausplattiert, pelletiert oder kryokonserviert. Um die kumulative Populationsverdopplungen (*cumulative population doublings*, CPD) zu berechnen wurde die folgende Formel angewandt:

$$PD = [\log(n1/n0)] / \log 2$$

$$CPD = \sum PD$$

n1= Anzahl geernteter Zellen, n0= Anzahl ausplattierter Zellen.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Zur kryokonservierten Lagerung wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in 500µl fötalem Kälberserum (FCS, 80%) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) aufgenommen, mit der gleichen Menge Dimethylsulfoxid (DMSO, 20%) in DMEM gemischt und unverzüglich in -80°C überführt. Die dauerhafte Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte nach einigen Tagen in flüssigem Stickstoff.

Um kryokonservierte Zellen wieder aufzutauen, wurde die Zellsuspension im Kryoröhrchen im Wasserbad (37°C) aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskristall vorhanden war. Anschließend wurden

zügig 2ml FCS (50%) in DMEM zur Zellsuspension gegeben. Diese Suspension wurde in ein 15ml Röhrchen überführt und mit FCS (15%) in DMEM aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt (7 Min., 550RCF, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in Kultur genommen.

2.2.1.3 *In vitro* Differenzierungen

Die Differenzierungen wurden in verschiedenen Passagen durchgeführt, die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Differenzierungen in Passage 5-7. Die RNA der adipo-, osteo-, oder chondrogen differenzierten Zellen wurde, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, isoliert.

Zur adipogenen Differenzierung wurden die Zellen in Standardmedium ausplattiert ($8,3 \times 10^3$ Zellen/cm²) und bis zu einer Konfluenz von etwa 70% kultiviert. Die Induktion erfolgte für 21 Tage durch die in Tabelle 3 beschriebenen Differenzierungsmedien, wobei Induktions- und Kultivierungsmedium alternierten und zweimal wöchentlich gewechselt wurden. Als Negativkontrolle wurden die Zellen in Medium ohne Induktionszusätze kultiviert (Tabelle 3).

Zum Nachweis von Lipiden wurde eine Färbung mit dem Farbstoff *Oil Red O* wie folgt durchgeführt. Die differenzierten - und Kontrollzellen wurden mit Formaldehyd fixiert (4%, -20°C, 2 Min.), mit Ethanol (50%) gewaschen und mit *Oil Red O* (0,2%, 20 Min.) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit Ethanol (50%) und Aqua dest. wurden gegebenenfalls vorhandene, rot angefärbte Fettvakuolen fotografisch dokumentiert.

Die osteogene Induktion erfolgte bei einer Zell-Konfluenz von etwa 70%. Die in Tabelle 3 beschriebenen Differenzierungs- und Negativmedien wurden für 14 Tage zu den Zellen gegeben und zweimal wöchentlich gewechselt.

Um die Mineralisierung nachzuweisen, wurden zwei unabhängige Färbeprotokolle (Silbernitrat/Von Kossa und Alizarin Rot) verwendet. Für die Färbung nach Von Kossa wurde eine Fixierung mit Ethanol (70%, -20°C, 10 Min.) durchgeführt. Nach einem Waschschriff mit Aqua dest. wurden die Zellen in Silbernitrat-Lösung (0,05g/ml, 30 Min.) inkubiert, erneut mit Aqua dest. gewaschen und in Natriumthiosulfatpentahydrat-Lösung (0,01g/ml, 1 Min.) inkubiert. Zur Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte eine Inkubation in Kernechtrot-Lösung (30 Min.), anschließend wurde die Färbung mikroskopisch dokumentiert. Zur Färbung mit Alizarin Rot wurden die Zellen ebenfalls mit Ethanol (70%, -20°C, 10 Min.) fixiert, mit Aqua dest. gewaschen und in Alizarin Rot-Lösung (0,02g/ml, 10 Min.) inkubiert. Nach mehreren Waschschriffen mit Aqua dest. wurde die Färbung mikroskopisch dokumentiert.

Die Menge des gebundenen Alizarin Rot-Farbstoffs wurde quantifiziert, um auf die Stärke der Mineralisierung rückschließen zu können. Zunächst wurden die gefärbten Zellen in Essigsäure unter ständigem Schütteln inkubiert (10%, 800µl/10cm²-well, 30 Min.), mit einem Zellschaber von der Platte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Nach 10-minütigem Erhitzen bei 85°C wurde die Zellsuspension für 5 Min. auf Eis gelagert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 Min., 19028 RCF, 4°C) wurde der Überstand (500µl) in ein neues Gefäß überführt und mit Ammoniumhydroxyd (10%, 200µl) gemischt. Die Intensität des gelösten Farbstoffs wurde photometrisch bestimmt (405nm).

Die chondrogene Differenzierung wurde in einer Pelletkultur durchgeführt (Abbildung 3.5). Dazu wurden je Pellet 2×10^5 Zellen in einem 15ml Röhrchen pelletiert (7 Min., 550RCF, 4°C) und für 21 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium (Tabelle 3) differenziert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Fläche und Durchmesser der Pellets wurden an Tag 7, 14 und 21 der Differenzierung mit der *analySIS image* Software des AVISO *CellCelector™* vermessen. Für jeden Zeitpunkt wurden Mittelwert und Standardabweichung der Messungen von mindestens 7 Pellets berechnet.

Der histologische Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgte mittels *Safranin O/Fast Green* Färbung. Dazu wurden die Pellets in *Tissue Freezing Medium* eingebettet und am Kryotom geschnitten (-25°C, 6µm). Die Fixierung erfolgte in Ethanol (70%, -20°C, 10 Min.), anschließend wurden die Objektträger auf einer Heizplatte getrocknet. Nach einem Waschschrift in Aqua dest. (5 Min.) erfolgte die Inkubation in Safranin O (0,3%, 30 Min.). Die Objektträger wurden kurz in Aqua dest., dann in *Fast Green* (0,004%) und erneut in Aqua dest. getaucht. Die Objektträger wurden getrocknet und in Ethanol (96%) getaucht, anschließend für 2x2 Min. in Xylol. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte in Entellan.

Vor der RNA-Isolation mittels TRI Reagent® (Kapitel 2.2.2.1) wurden die chondrogen differenzierten Pellets in Pronase E (1 Std., 37°C) und in Collagenase P (24 Std., 37°C) inkubiert.

2.2.1.4 Direkte Ko-Kultur vor *HOX^{neg}* und *HOX^{pos}* Zellen

Zur direkten Ko-Kultur wurden *HOX^{neg}* USSC mit *HOX^{pos}* CB-SC gemeinsam im Verhältnis 1:1 in Kultivierungsmedium (Tabelle 3) je nach Versuchsplanung für 16 Stunden oder 5 Tage kultiviert. Die verwendeten USSC Zelllinien waren mit dem *green fluorescent protein* (GFP)-Vektor pCL6IEGwo transfiziert (Abbildung A 2, Kapitel 2.2.2.9) und wurden anhand dessen nach der gemeinsamen Kultivierung sortiert (Kapitel 2.2.2.8). Um eine hohe Reinheit (ca. 98%) zu erreichen, wurden nur USSC, bei denen ein starkes Fluoreszenzsignal detektiert wurde, sortiert. Nach der Sortierung wurden die Zellen ausplattiert. Je nach Versuchsplanung wurde nach 24 Stunden die RNA isoliert oder die Zellen wurden für Differenzierungsanalysen verwendet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA aus undifferenzierten Zellen wurden kommerzielle Kits genutzt (Qiagen *RNeasy Micro Kit* ($<0,5 \times 10^6$ Zellen) oder *RNeasy Mini Kit* ($>0,5 \times 10^6$ Zellen)). Bei der Isolation wurde das Herstellerprotokoll inklusive der *QIAshredder*-Säulen und des optionalen DNA-Verdau befolgt. RNA differenzierter Zellen wurden mittels TRI Reagent® gemäß der Herstellerangaben isoliert und in H₂O eluiert, ein nachträglicher DNA-Verdau wurde durchgeführt. Direkt nach der Isolation wurden die RNA-Konzentration sowie -Reinheit im *NanoDrop® ND-1000* spektrophotometrisch bestimmt. Die RNA wurde direkt in cDNA umgeschrieben oder bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Reverse Transkription (RT)

Die Synthese der cDNA wurde mit dem *SuperScriptIII*-Kit gemäß des Herstellerprotokolls unter Verwendung von oligo-dT Primern und inklusive des optionalen RNaseH-Verdau durchgeführt. Die cDNA wurde bei 4°C, zur längeren Lagerung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die Temperatur für die Primer zu optimieren, wurde eine 9 Punkt-PCR mit jedem Primerpaar durchgeführt und mittels gelelektrophoretischer Auftrennung untersucht. Die Primersequenzen und die entsprechenden Annealingtemperaturen sind in Tabelle 4 aufgelistet. 1µl cDNA (umgeschrieben aus 50ng RNA) wurde in den RT-PCR Analysen in einem Volumen von 25µl als *template* eingesetzt. Außerdem wurden je Ansatz 2,5µl 10xPuffer; 0,75µl MgCl₂ (50mM); 0,5µl dNTP-Mix (10mM); 0,5µl *forward* Primer (10pM); 0,5µl *reverse* Primer (10pM); 0,2µl Taq Polymerase (1U/µl) und 19,05µl H₂O pipettiert. Es wurde das folgende PCR-Programm verwendet: 2 Min. 94°C; 30 Sek. 94°C, 30 Sek. 55/56/60/65°C, 30 Sek. 72°C (35 Zyklen); 10 Min. 72°C.

Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2%, 170V, 30 Min.) aufgetrennt und mit Ethidumbromid (2,4µl/100ml) oder *Midori Green* (4µl/100ml) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.2.4 Quantitative Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Für qRT-PCRs wurde der *Power SYBR Green PCR Mastermix* nach Herstellerangaben genutzt. Die Primersequenzen und die zugehörigen Annealingtemperaturen sind in Tabelle 4 aufgelistet. *Human ribosomal protein L13a (RPL13a)* oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) wurden als *housekeeping* Gen zur Normalisierung verwendet. In Vorversuchen wurden mehrere *housekeeping* Gene bezüglich ihrer Expressionsstabilität während Differenzierungen verglichen. *RPL13a* erwies sich als am besten geeignet. Um die Expression des Gens SRY-Box 9 (*SOX9*) zu analysieren, wurde ein *TaqMan® Gene Expression Assay* mit dem *TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix No Amp Erase® UNG* genutzt. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten im *ABI Step One Plus qPCR Cycler* detektiert, es wurde das folgende Programm verwendet: 10 Min. 95°C; 15 Sek. 95°C, 1 Min. 55/56/60/65°C (40 Zyklen). Anschließend an jede PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die relativen Änderungen der Genexpression wurden je nach Versuchsplanung mit der Δ Ct- oder $\Delta\Delta$ Ct- Methode berechnet.

2.2.2.5 Western Blot

Proteine zur Verwendung in Western Blot Analysen wurden in RIPA-Puffer (versetzt mit Proteinase Inhibitor) lysiert, die Proteinkonzentration wurde mit dem *Micro BCA Protein Assay™* Kit photometrisch bestimmt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde das *NuPage®* System mit 4-12% Bis-Tris Gelen verwendet. Die Proteine (20µg) wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert, unspezifische Bindungsstellen wurden mit Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween 20 (PBST, 5%, 1 Std.) blockiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper werden in Tabelle 5 aufgelistet. β -Actin (ACTB) wurde als interner Standard verwendet. Proteine wurden mit Hilfe des *Western Lightening Chemiluminescence Reagent LAS 3000 Lite* detektiert.

2.2.2.6 Immunzytochemische Färbungen

Zellen, die für immunzytochemische Färbungen genutzt wurden, wurden auf *chamber slides* kultiviert. Die Fixierung erfolgte in Paraformaldehyd (4%, 15 Min.). Nach 3 Inkubationsschritten in PBST (10 Min.) wurden unspezifische Bindungen in PBST/Normal Goat Serum (NGS) blockiert (5%, 1 Std.). Die verwendeten Primär- (Inkubation über Nacht bei 4°C) und Sekundärantikörper (1 Std. bei Raumtemperatur) sind in Tabelle 5 aufgelistet. Das Eindeckeln erfolgte in *ProLong Gold antifade reagent with DAPI*. Alle Fotos eines Versuchs (inkl. der zugehörigen Kontrollen) wurden unter Verwendung der gleichen Aufnahmeparameter gemacht.

2.2.2.7 Durchflusszytometrische Analyse

Um intra- oder extrazelluläre Antigene durchflusszytometrisch nachzuweisen, wurden direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Primärantikörper oder unmarkierte Primär- in Verbindung mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern verwendet. Für die Untersuchung intrazellulär exprimierter Antigene wurden die Zellen vor Zugabe des Primärantikörpers mit dem *Cytofix/Cytoperm* Kit permeabilisiert, in jedem Waschschrift wurde der *PermWash* Puffer anstatt PBS verwendet. Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsiniert (Kapitel 2.2.1.1), die gewünschte Anzahl von Zellen ($1-2 \times 10^5$) wurde zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Pellets wurden in 100µl PBS je Ansatz resuspendiert und mit je 4µl Primärantikörper bzw. 4µl der entsprechenden Isotypkontrolle versetzt. Nach Inkubation für 25 Min. bei 4°C folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in etwas PBS resuspendiert. Für die unmarkierten Ansätze wurde anschließend 1µl Sekundärantikörper sowohl in die Probe als auch in die entsprechende Isotypkontrolle pipettiert. Nach erneuter Inkubation für 25 Min. bei 4°C erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden die Proben in PBS resuspendiert und sofort im *FACS Canto™* Durchflusszytometer mit der *FACSDiva* Software analysiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

2.2.2.8 Zellsortierung

Die Sortierung von Zellen anhand der Expression von GFP erfolgte im Durchflusszytometrie-Labor (*Core Flow Cytometry Facility*) des ITZ der Uniklinik Düsseldorf am Hochgeschwindigkeitssorter MoFlo XDP.

2.2.2.9 Lentiviral vermittelte stabile Überexpression

In den Zelllinien USSC1 und 2 sowie UC-SC1 und 2 wurden die Gene *integrin-binding/bone sialoprotein (BSP)* und *osterix/transcription factor SP7 (OSX)* stabil überexprimiert.

Zur Klonierung der DNA-Sequenzen (*BSP* aus BS1, *OSX* aus BM-SC2) wurden genspezifische Primer mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme designed (Tabelle 4). Die Klonierungs-RT-PCR wurde mit der *Phusion® high-fidelity DNA Polymerase* durchgeführt. Die Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (1%, 1 Std., 150V), das gewünschte Produkt wurde mit Hilfe des *MinElute Gel Extraction Kit* aufgereinigt.

Für beide DNA-Fragmente wurden die *FastDigest®* Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* verwendet. Auch der Klonierungsvektor pCL6IEGwo (Abbildung A 2) wurde mit den beiden

Restriktionsenzymen geschnitten und mit CIP (*calf intestine phosphatase*) dephosphoryliert (30 Min, 37°C). Die Auftrennung erfolgte gelelektrophoretisch (1%, 80 Min., 150V). Nachdem die gewünschten Produkte aus dem Gel ausgeschnitten wurden, wurde das geschnittene Plasmid mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* und die geschnittenen Insertfragmente (*BSP* und *OSX*) mit dem *MinElute Gel Extraction Kit* extrahiert. Die DNA-Konzentrationen wurden am *NanoDrop*[®] gemessen.

Der mit den Restriktionsenzymen geschnittene Klonierungsvektor pCL6IEGwo sowie die Inserts wurden mit der T4 DNA Ligase ligiert (Verhältnis Klonierungsvektor zu Insert: 1 zu 3).

Je 2µl des Ligationsansatzes (pCL6IEGwo*BSP* und pCL6IEGwo*OSX*) wurden mittels Elektroporation (2500V, 25µF, 200Ω) in *E.coli* TOP10 transformiert. Die transformierten *E.coli* TOP10 wurden in S.O.C. Medium unter starkem Schütteln inkubiert (1 Std., 37°C), anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen auf selektiven Agarplatten (75µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht inkubiert.

Mehrere Kolonien wurden von den Agarplatten gepickt und als Vorkultur in LB-Medium mit Ampicillin (75µg/ml) überführt. Mittels RT-PCR (Kapitel 2.2.2.3) mit sequenzspezifischen Primern wurde überprüft, ob das korrekte Insert in den gepickten Kolonien vorhanden war. Von ausgewählten Vorkulturen wurden Startkulturen für die Präparation der Plasmid-DNA aus den Bakterien mittels *Plasmid Purification Kit* (Mini oder Maxi) angesetzt.

Um zu überprüfen, ob die gewünschten DNA-Fragmente korrekt in das Plasmid pCL6IEGwo kloniert wurden, wurde eine Sequenzierung mit dem *BigDye*[®] *Terminator Cycle Sequencing Kit* durchgeführt und im HLA-Labor des ITZ analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der *Sequence Scanner* Software (Version 1.0).

Zur Virusproduktion wurden HEK293T Zellen auf 10cm-Petrischalen ausplattiert ($0,5 \times 10^6$ Zellen/cm² in DMEM *high glucose*, 10% FCS, 1% PSG). Nach 24 Stunden wurde DMEM *high glucose* mit 5% FCS auf die HEK293T Zellen gegeben, im Anschluss wurden je Petrischale je 5µg der Helferplasmide (pCD/NL-BH und pALF-GALV TM) sowie 5µg des gewünschten Plasmids (pCL6IEGwo*BSP* oder pCL6IEGwo*OSX*) mit 45µl *FuGENE*[®] *transfection reagent* in 400µl DMEM *high glucose* für 20 Min. inkubiert. Dieser Mix wurde anschließend zu den HEK293T Zellen gegeben (Lipofektion). Nach 24 Stunden wurde das Medium der HEK293T gewechselt ($0,6 \text{ ml/cm}^2$ DMEM *high glucose*, 5% FCS, 1% PSG). Nach weiteren 24 Stunden wurde dieses Medium (=Virusüberstand) steril filtriert (0,45µm Porengröße).

Die Zielzellen wurden in geringer Dichte (2×10^3 Zellen/cm²) in Kulturmedium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit dem Virusüberstand infiziert, ggf. wurde dieser verdünnt. Für die Mock-Kontrollzellen wurde Medium ohne Virus (DMEM *high glucose*, 5% FCS, 1% PSG) verwendet. Nach 24 und 48 Stunden wurde jeweils ein Mediumwechsel zu frischem Kulturmedium durchgeführt (Tabelle 3).

Um eine hohe Effizienz der Transfektion zu gewährleisten, wurde die Stärke der GFP-Expression in den überexprimierten Zellen nach dem ersten Passagieren durchflusszytometrisch analysiert (Kapitel 2.2.2.7). Bei Transfektionseffizienzen unter 80% wurden die Zellen anhand der GFP-Expression sortiert (Kapitel 2.2.2.8).

2.2.2.10 Affymetrix PrimeView™ human gene expression Microarrays

Die Microarray Genexpressions-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. René Deenen und Prof. Karl Köhrer aus dem *Genomics & Transcriptomics* Labor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden kultiviert, anschließend wurde die RNA isoliert (Kapitel 2.2.2.1). Die Qualität der RNA wurde mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* überprüft. Die Synthese der cDNA und die Biotinylierung erfolgte mit dem *3' IVT Express Kit*. Dabei wurden zunächst 100ng Gesamt-RNA in cDNA und anschließend in aRNA (*in vitro* Transkription) umgeschrieben. Die aRNA wurde biotinyliert, fragmentiert und für 16 Stunden bei 45°C an die *Affymetrix PrimeView™ Human Gene Expression Microarrays* hybridisiert. Die Färbung erfolgte mittels Streptavidin/Phycoerythrin, die Fluoreszenzstärken wurden detektiert. Die Auswertung der digitalisierten Fluoreszenzsignale erfolgte mit der *GeneSpring GX* Software (Agilent Technologies, Version 12.1). Proben eines Datensatzes wurden Quantil-normalisiert und mittels RMA (*Robust Multi-array analysis*) zusammengefasst.

Für die Auswertung zur Analyse der Genexpression wurden je nach Versuch experimentelle Gruppen gebildet. Zum Vergleich der Genexpression vor und nach direkter Ko-Kultur (KK, Kapitel 3.5) wurden die Gruppen „USSC Tag 0“, „USSC nach 16 Stunden KK mit CB-SC“ und „USSC nach 5 Tagen KK mit CB-SC“ (jeweils 3 Replikate) eingeteilt. Zum Vergleich der Genexpression der verschiedenen Zellpopulationen (Kapitel 3.2) wurden die Gruppen „USSC“, „CB-SC“ und „BM-SC“ (jeweils 3 Replikate) untersucht. Um mit in die Auswertung einbezogen zu werden, musste ein Datensatz in mindestens 2 von 3 Replikaten in jeder Gruppe stärkere Signale zeigen als die Hintergrundfluoreszenz (innerhalb der 20. - 100. Perzentile der Fluoreszenz-Signalstärke des jeweiligen Microarrays). Die differentielle Genexpression wurde mittels ANOVA Analyse ($p < 0,05$) statistisch ausgewertet und mit einem weiteren Test gegen Falsch-positive abgesichert (*FDR correction for multiple testing*, Benjamini-Hochberg). Die der Erstellung des Venn-Diagramms und der *principal component analysis* (PCA) zugrunde liegenden Parameter werden in der Legende zu Abbildung 3.11 im Detail beschrieben.

2.2.3 Statistische Auswertung

Je nach Versuch wurden unterschiedliche statistische Analysen mit *GraphPad Prism* Version 5.01 durchgeführt. Der jeweilige statistische Test wird unter der Abbildung angegeben. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant betrachtet (* $p = 0,01$ bis 0,05: signifikant; ** $p = 0,001$ bis 0,01: sehr signifikant; *** $p < 0,001$: extrem signifikant).

3 Ergebnisse

3.1 Grundlegende Charakterisierung von Stromazellen aus Nabelschnur, Nabelschnurblut und Knochenmark

3.1.1 Wachstumspotential

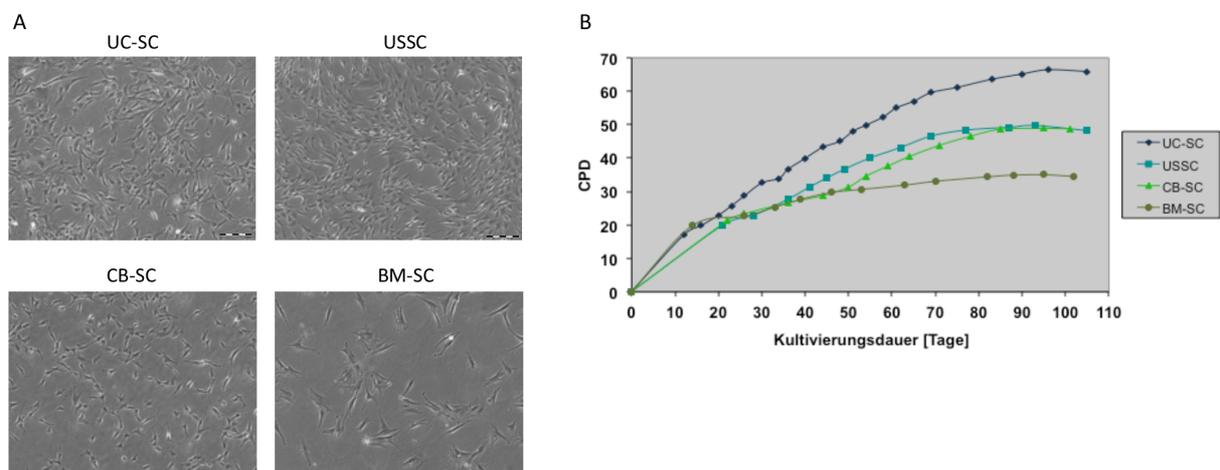


Abbildung 3.1: Morphologie und Wachstum.

A: Repräsentative Darstellung der Morphologie nativer Zellen (Größenmaßstab entspricht 200µm). **B:** Vergleich des Wachstumsverhaltens mit zunehmender Kultivierungsdauer.

CPD: cumulative population doubling.

Die in dieser Arbeit analysierten Zelltypen aus der Nabelschnur (UC-SC), aus Nabelschnurblut (USSC, CB-SC) und aus Knochenmark (BM-SC) zeigten ein adhärentes Wachstum und eine spindelförmige Morphologie (Abbildung 3.1 A). Das Wachstumsverhalten der Zelltypen unterschied sich deutlich, wie in Abbildung 3.1 B für jeweils eine charakteristische Zelllinie dargestellt wird. Die maximale Zahl an kumulativen Populationsverdopplungen (*cumulative population doubling*, CPD), erreichte die Zelllinie UC-SC1 (66,34 CPD nach 96 Tagen Kultivierungsdauer). Die Zelllinien USSC4 (49,75 CPD; 93 Tage) und CB-SC3 (48,88 CPD; 95 Tage) erreichten ein in etwa gleiches Wachstumsmaximum, wohingegen die Zelllinie BM-SC7 ein deutlich geringeres Wachstumspotential zeigte (35,0 CPD; 95 Tage).

3.1.2 Immunphänotyp

Um den Immunphänotyp der 4 Zellpopulationen zu vergleichen, wurde die Expression der Oberflächenantigene durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden Marker ausgewählt, die in der Literatur als charakteristisch für mesenchymale Stromazellen (85) oder für endotheliale, epitheliale, antigenpräsentierende oder haematopoetische Zellen beschrieben wurden.

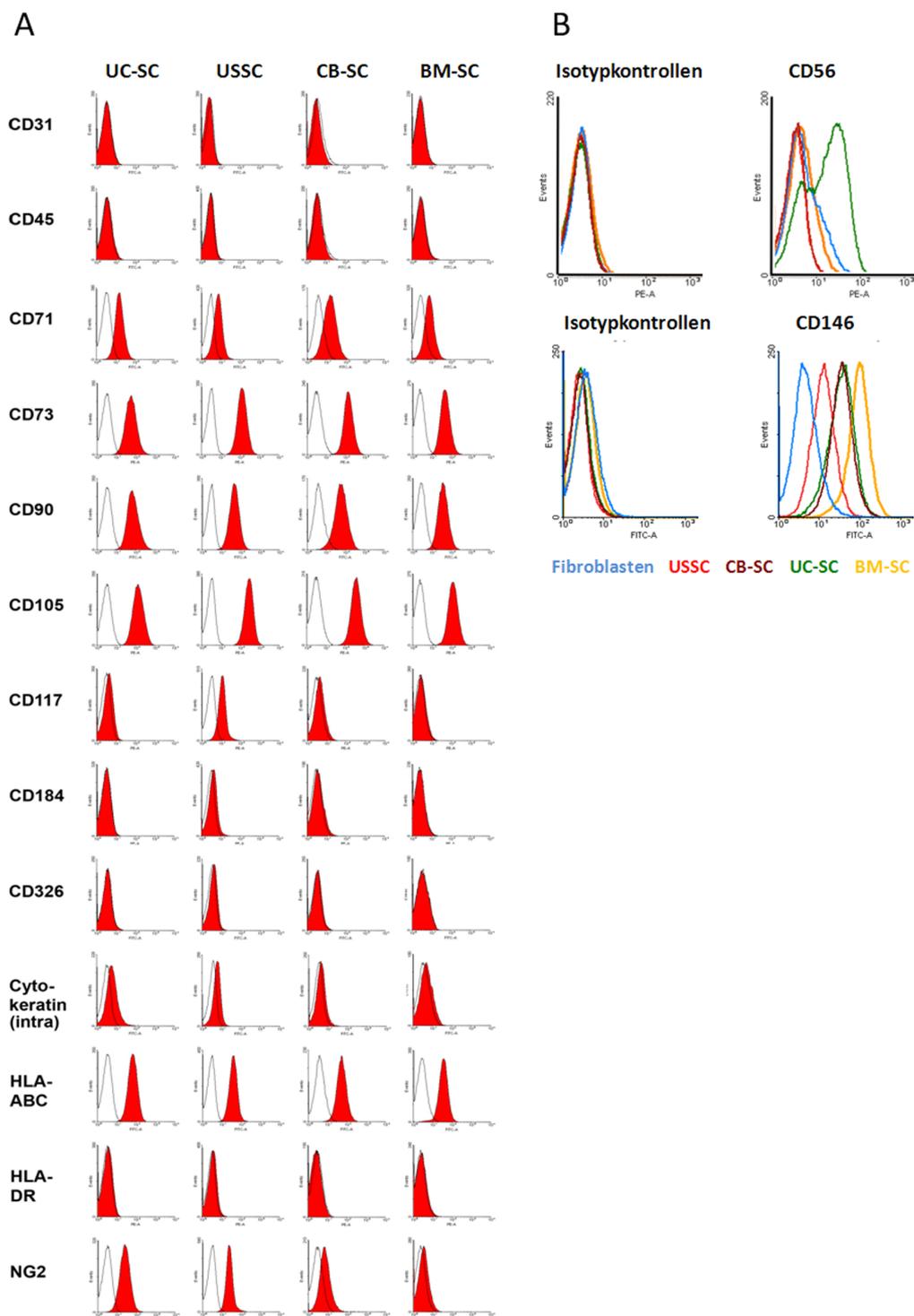


Abbildung 3.2: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen.

Repräsentative durchflusszytometrische Analyse ausgewählter Oberflächenantigene in den verschiedenen Zelltypen. **A:** Ungefärbtes Histogramm: Isotypkontrolle, rotes Histogramm: Antigen. **B:** Durchflusszytometrische Analyse von CD56 und CD146 im direkten Vergleich. Als Kontrolle wurden Vorhaut-Fibroblasten verwendet.

CD: cluster of differentiation; CD31: platelet-endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM1; CD45: protein-tyrosine phosphatase receptor-type C, PTPRC; CD71: transferrin receptor, TFRC; CD73: ecto-5-prime nucleotidase, NT5E; CD90: t-cell antigen, THY1; CD105: endoglin, ENG; CD117: V-KIT hardy zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, KIT; CD184: chemokine CXC motif receptor 4, CXCR4; CD326: epithelial cellular adhesion molecule, EPCAM; HLA-ABC: major histocompatibility complex class I A/B/C; HLA-DR: major histocompatibility complex class II DR, NG2: chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4; CD56: neural cell adhesion molecule 1, NCAM1; CD146: melanoma adhesion molecule, MCAM.

Alle 4 verglichenen Zelltypen (UC-SC, USSC, CB-SC und BM-SC, Abbildung 3.2 A) waren sowohl negativ für den endothelialen Marker CD31, als auch für den Leukozyten-Marker CD45. Des Weiteren wurden die Epithel-assoziierten Proteine CD326 und Cytokeratin (intrazellulär) sowie HLA-DR, das auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, nicht nachgewiesen. Außerdem war CD184 in keinem Zelltyp exprimiert.

Hingegen wurden die Oberflächenantigene CD71, CD73, CD90, CD105 und HLA-ABC, das auf allen kernhaltigen Zellen präsent ist, von allen Zellpopulationen exprimiert.

Vier der hier getesteten Proteine zeigten ein differentielles Expressionsmuster in den Zelltypen: CD117, NG2, CD56 und CD146. CD117 war nur in USSC deutlich exprimiert, wohingegen dieses Oberflächenantigen in den anderen Zelltypen nur minimal oder nicht präsent war. NG2 wurde am stärksten in UC-SC und USSC nachgewiesen, schwächer in CB-SC und nur geringfügig in BM-SC (Abbildung 3.2 A).

Die Histogramme der Oberflächenproteine CD56 und CD146 werden zum besseren Vergleich aller Zellpopulationen überlagert dargestellt (Abbildung 3.2 B). Zudem wurden diese beiden Oberflächenantigene in Fibroblasten aus der Vorhaut untersucht. Als einziger Marker wurde CD56 ausschließlich von UC-SC exprimiert. CD146 war negativ in Fibroblasten aber positiv in den anderen Zelltypen. USSC zeigten im Vergleich die schwächste Expression, CB-SC und UC-SC eine stärkere. Die deutlichste Expression von CD146 wurde für BM-SC nachgewiesen.

3.1.3 HOX-Genexpression

Die beiden Zelltypen aus dem Nabelschnurblut (USSC und CB-SC) können weder anhand ihrer Morphologie (Abbildung 3.1), noch immunphänotypisch durch einen eindeutig diskriminierenden Oberflächenmarker (Abbildung 3.2) unterschieden werden. Anhand der differentiellen Expression des Gens *delta drosophila homolog-like 1 (DLK1)* und der *homeobox (HOX)*-Gene ist eine Unterscheidung möglich. USSC exprimieren *DLK1*, CB-SC sind hingegen *DLK1*-negativ. Dagegen sind USSC negativ für *HOX*-Gene, in CB-SC werden (abhängig von der untersuchten Zelllinie) etwa 20 bis 30 der 39 im humanen System beschriebenen *HOX*-Gene exprimiert (28, 29).

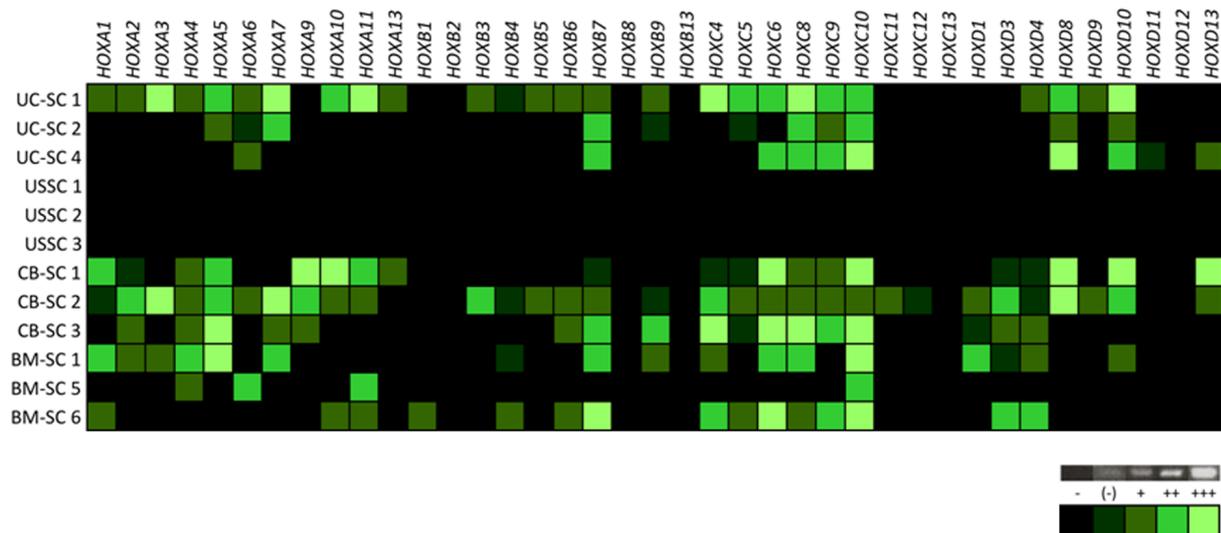


Abbildung 3.3: Expression von *HOX*-Genen.

RT-PCR Analyse der Expression der 39 *HOX*-Gene in 4 verschiedenen Zelltypen (je 3 Zelllinien). Schwarz: nicht exprimiert (-), grün: exprimiert, die Expressionsstärken werden durch die Farbtintensitäten dargestellt ((-), +, ++, +++).

HOX: homeobox.

Abbildung 3.3 stellt die *HOX*-Genexpressionsmuster nach RT-PCR Analyse von jeweils 3 charakteristischen Zelllinien pro Zelltyp dar. Die untersuchten Zelllinien unterschieden sich sowohl in der Expression einzelner *HOX*-Gene als auch in der Stärke der Expression. Wie bereits durch Liedtke *et al.* beschrieben ((29)), exprimierten USSC keine *HOX*-Gene, wohingegen CB-SC und BM-SC eine Expression aufwiesen. Auch in UC-SC wurden *HOX*-Gene nachgewiesen, wobei die Zelllinie UC-SC1 mehr *HOX*-Gene exprimierte als die Zelllinien UC-SC2 und 4 (Abbildung 3.3). Trotz der unterschiedlichen Genexpressionsprofile können einige *HOX*-Gene definiert werden, die in allen Replikaten eines Zelltyps nachgewiesen wurden. So exprimierten alle getesteten UC-SC-Zelllinien *HOXA6*, *B7*, *C8-C10*, *D8* und *D10*. Alle CB-SC-Zelllinien waren positiv für die Gene *HOXA2*, *A4-A5*, *A9*, *B7*, *C4-C10* und *D3-D4*, alle BM-SC-Zelllinien für *HOXC10*.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellpopulationen unterschieden sich bezüglich ihres Wachstumsverhaltens. UC-SC zeigten das stärkste Proliferationspotential, gefolgt von USSC und CB-SC. BM-SC wiesen ein deutlich geringeres Wachstumsvermögen auf. Durch durchflusszytometrische Analysen konnte ausgeschlossen werden, dass eine der Zellpopulationen einen endothelialen (CD31⁻), leukozytären (CD45⁻) oder epithelialen (CD326⁻, Cytokeratin⁻) Immunphänotyp aufweist. Des Weiteren zeigte CD146 die deutlichsten Expressionsunterschiede (USSC CD146⁺, CB-/UC-SC CD146⁺⁺, BM-SC CD146⁺⁺⁺). Die Oberflächenantigene CD56 und CD146 konnten zur Unterscheidung von UC-SC (CD56⁺, CD146⁺⁺) und Fibroblasten (CD56⁻, CD146⁻) verwendet werden. *HOX*-Gene waren in UC-SC, CB-SC und BM-SC präsent, USSC waren *HOX*-negativ.

3.1.4 Differenzierungspotential

3.1.4.1 Adipogene Differenzierung

Nachdem die Zelltypen bezüglich ihres Immunphänotyps sowie der Expression der *HOX*-Gene verglichen wurden, folgten Analysen des Differenzierungspotentials. Wie bereits durch unsere Gruppe beschrieben, sind USSC nicht zur Differenzierung in Adipozyten (Fettzellen) fähig, wohingegen die zweite Population aus Nabelschnurblut (CB-SC) sowie BM-SC ein adipogenes Differenzierungspotential aufweisen (28). In dieser Arbeit wurde zudem die Fähigkeit zur Bildung von Adipozyten in UC-SC untersucht. Zur Induktion dienten unter anderem Insulin und Indomethacin. Die Auswertung der Differenzierung erfolgte mittels *Oil Red O* Färbung und PCR-Analyse charakteristischer adipogener Marker. *Oil Red O* ist ein roter, lipidlöslicher Farbstoff, wodurch Fettvakuolen sichtbar werden.

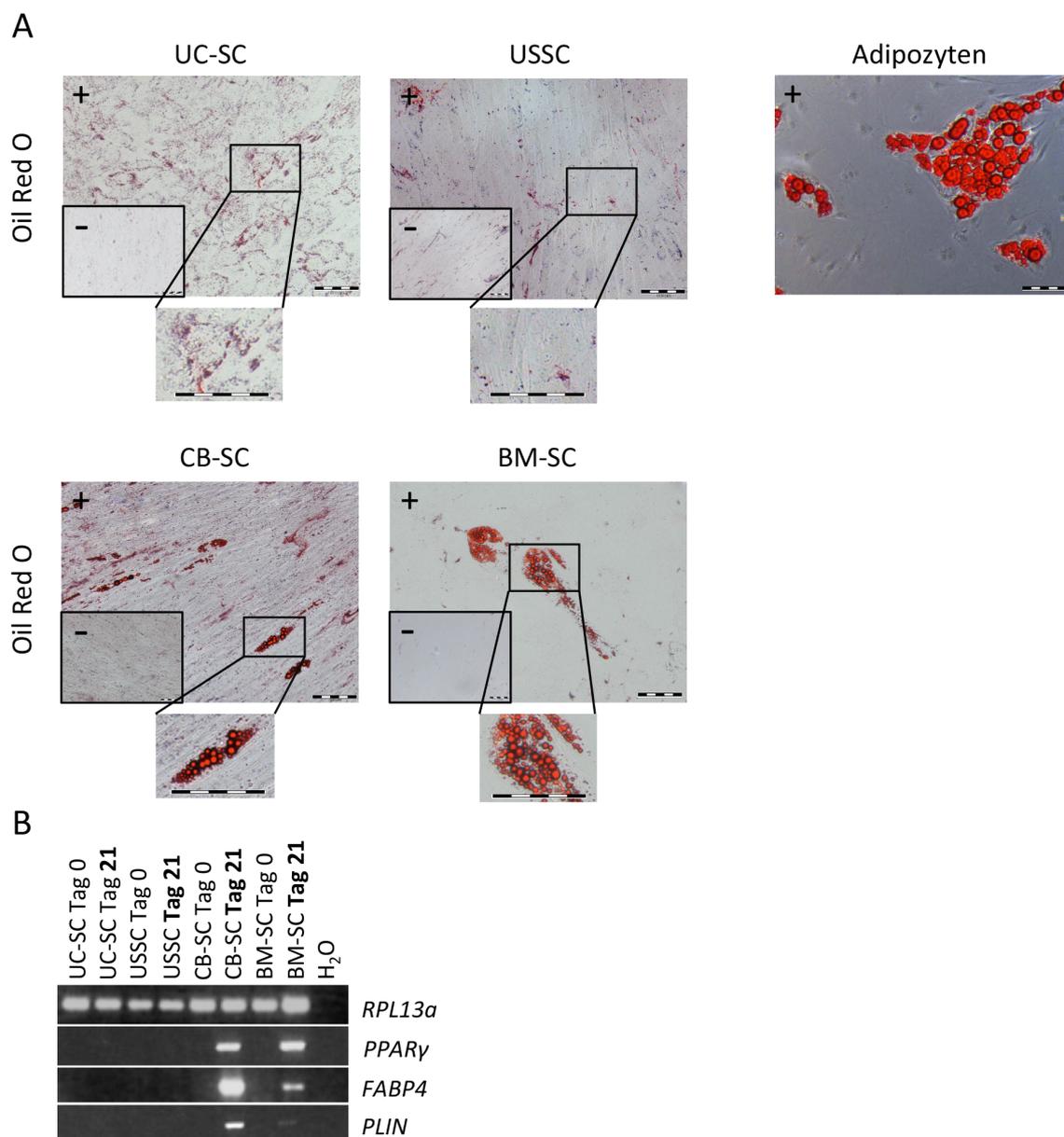


Abbildung 3.4: Adipogene *in vitro* Differenzierung.

A: Repräsentative *Oil Red O* Färbungen von Lipidvakuolen in adipogen differenzierten Zellen (+, Tag 21) und den Negativkontrollen (-). Humane Adipozyten wurden als Positivkontrolle verwendet. Der Größenmaßstab entspricht 100 μ m. **B:** RT-PCR Analyse von an der Adipogenese beteiligten Genen in nativen (Tag 0) und adipogen differenzierten (Tag 21) Zellen. *RPL13a* wurde als *housekeeping* Gen verwendet.

RPL13a: human ribosomal protein L13a, *PPAR γ* : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *FABP4*: fatty acid-binding protein 4, *PLIN*: perilipin.

Wie USSC sind auch UC-SC nach 21-tägiger adipogener Induktion mit dem hier verwendeten Differenzierungsmedium (Tabelle 3) nicht zur Bildung von Adipozyten fähig. Abbildung 3.4 A zeigt, dass nur in CB- und BM-SC Lipidvakuolen angefärbt wurden. Im Vergleich zu den als Positivkontrolle genutzten Adipozyten waren die durch CB- und BM-SC gebildeten Fettvakuolen kleiner. Die adipogene Differenzierung von CB- und BM-SC wurde durch die Analyse der Expression der Adipogenese-assoziierten Gene *PPAR γ* , *FABP4* und *PLIN* bestätigt. Die Reverse Transkriptase-PCR zeigte eine Expression dieser Gene nur nach Differenzierung von CB-SC und BM-SC (Abbildung 3.4 B).

3.1.4.2 Chondrogene Differenzierung

Neben der Untersuchung des adipogenen gehört auch die des chondrogenen (Knorpel-bildenden) Potentials zum Standard bei der Charakterisierung von mesenchymalen Stromazellpopulationen („MSC“, Kapitel 1.1.1, (85)). Im Gegensatz zur adipogenen muss die chondrogene Differenzierung in einer dreidimensionalen Pelletkultur durchgeführt werden, um die *in situ*-Versorgung von Knorpel mit Sauerstoff und Nährstoffen zu simulieren und um Zell-Zell Kontakte analog zu denen während der embryonalen Chondrogenese zu ermöglichen (86). Zur Induktion der Differenzierung wurde das Zytokin TGFβ1 zugesetzt (Kapitel 1.2.1.3). Um zu untersuchen, ob während der Differenzierung eine Verdichtung des Zellpellets („mesenchymale Kondensation“, Kapitel 1.2.1) stattfand, wurde die Größe der Pellets an Tag 7, 14 und 21 ausgemessen.

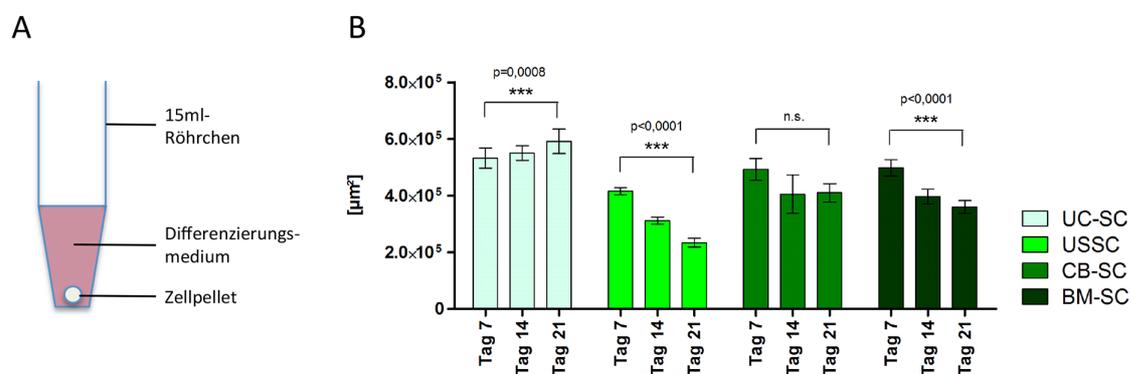


Abbildung 3.5: Chondrogene *in vitro* Differenzierung: Pelletkultur.

A: Schematische Darstellung der Pelletkultur im 15ml Röhrchen. **B:** Messung der Pellet-Fläche (je mind. 7 Pellets) an Tag 7, 14 und 21 der chondrogenen Differenzierung je einer repräsentativen Zelllinie. Statistik: ungepaarter t-Test Tag 7 gegen Tag 21.

***: extrem signifikant ($p < 0,001$), n.s.: nicht signifikant.

Abbildung 3.5 A zeigt schematisch die dreidimensionale Pelletkultur in der die Differenzierung durchgeführt wurde. An Tag 7, 14 und 21 der Differenzierung wurde die Fläche der Pellets mit der *analySIS image* Software des AVISO CellCelector™ ausgemessen (Abbildung 3.5 B). In der dargestellten Zelllinie UC-SC1 nahm die Fläche der Pellets im Laufe der Differenzierung signifikant zu (Tag 7: $532533 \pm 35099 \mu\text{m}^2$, Tag 21: $591829 \pm 43371 \mu\text{m}^2$; $p=0,0008$). Im Gegensatz dazu nahm die Pelletfläche bei den 3 anderen getesteten Zelltypen ab, die Pellets kondensierten demnach. Die mittlere Fläche der Pellets der Zelllinie USSC1 reduzierte sich von Tag 7 ($416031 \pm 12108 \mu\text{m}^2$) zu Tag 21 ($234157 \pm 15727 \mu\text{m}^2$) signifikant ($p < 0,0001$). Auch die gemittelte Pelletfläche der Zelllinie CB-SC3 nahm während der Differenzierung ab, was sich jedoch nach statistischer Auswertung als nicht signifikant erwies (Tag 7: $493002 \pm 38294 \mu\text{m}^2$, Tag 21: $410063 \pm 32865 \mu\text{m}^2$). Statistisch signifikant nahm die Fläche der Pellets der Zelllinie BM-SC3 ab (Tag 7: $498450 \pm 28917 \mu\text{m}^2$, Tag 21: $360211 \pm 22108 \mu\text{m}^2$; $p < 0,0001$).

Der Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgte in dieser Arbeit zum einen über die Analyse des Transkriptionsfaktors *SOX9*, der als essentieller Regulator während der Chondrogenese

beschrieben wurde (66). Zum anderen wurde eine histologische Färbung zum Nachweis der Differenzierung zu Chondroblasten durchgeführt. Die Safranin O Färbung basiert auf der Bindung des kationischen rötlich/violetten Farbstoffs an Proteoglykane, die den Hauptbestandteil der Knorpelmatrix ausmachen. Dabei nimmt die Intensität der Färbung mit dem Gehalt an Proteoglykanen zu (87).

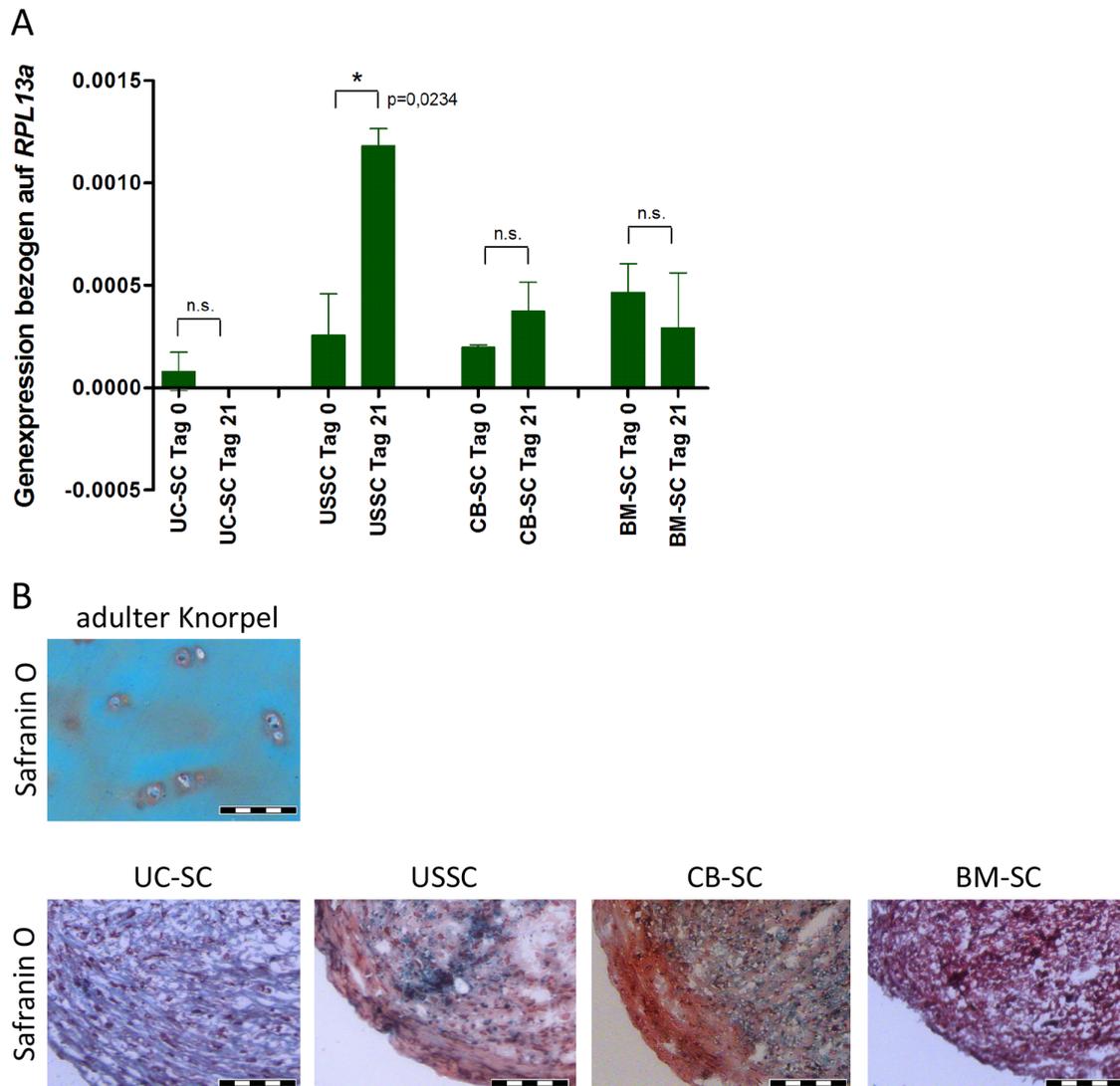


Abbildung 3.6: Chondrogen *in vitro* Differenzierung: Nachweis.

A: Analyse der Expression von *SOX9* mittels qRT-PCR in nativen (Tag 0) und chondrogen differenzierten (Tag 21) Zellen bezogen auf das *housekeeping* Gen *RPL13a*. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung der Expressionswerte von je 3 Zelllinien. Statistik: gepaarter t-Test Tag 0 gegen Tag 21. **B:** Safranin O Färbung in Schnitten chondrogen differenzierter Pellets (Tag 21) und humanen adulten hyalinen Knorpels als Positivkontrolle. Die rötliche Färbung zeigt Proteoglykane in der extrazellulären Matrix. Der Größenmaßstab entspricht 100µm.

RPL13a: human ribosomal protein L13a, *SOX9*: SRY-Box 9, *: signifikant ($p=0,01 - 0,05$), n.s.: nicht signifikant.

Abbildung 3.6 A zeigt die Expression des Transkriptionsfaktors *SOX9* in undifferenzierten (Tag 0) und chondrogen differenzierten (Tag 21) Zellpellets. UC-SC exprimierten ein basales Level von *SOX9*, das jedoch während der Differenzierung abnahm (Expression bezogen auf *RPL13a*, Tag 0: $7,9 \pm 9,3 \text{ E-5}$,

nicht nachweisbar an Tag 21). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Expression von *SOX9* signifikant in USSC (Tag 0: $2,6 \pm 2,0 \text{ E-4}$; Tag 21: $1,2 \text{ E-3} \pm 8,3 \text{ E-5}$; $p=0,0234$) und nicht signifikant in CB-SC (Tag 0: $2,0 \text{ E-4} \pm 1,1 \text{ E-5}$, Tag 21: $3,7 \pm 1,4 \text{ E-4}$). BM-SC exprimierten *SOX9* bereits in undifferenziertem Zustand ($4,7 \pm 1,4 \text{ E-4}$), das Expressionslevel stieg während der Differenzierung nicht an (Tag 21: $2,9 \pm 2,7 \text{ E-4}$).

Als Positivkontrolle für die Safranin O Färbung wurden Schnitte adulten hyalinen Knorpels verwendet (Abbildung 3.6 B). Um die Chondrozyten wurden Proteoglykane rötlich mit Safranin O angefärbt. Die Kryoschnitte der UC-SC Pellets zeigten nur eine leichte rötlich/violette Färbung, also nur einen geringen Anteil von Proteoglykanen. Die Schnitte von USSC, CB-SC und BM-SC waren nach der Safranin O-Färbung rot bzw. violett angefärbt. Die Pellets aus den Nabelschnurblut-Zellpopulationen wiesen einen abgegrenzten Randbereich auf, der deutlicher angefärbt war, wohingegen die Schnitte von BM-SC Pellets im Gesamten stärker gefärbt waren (Abbildung 3.6 B).

3.1.4.3 Osteogene Differenzierung

Im Gegensatz zur dreidimensionalen *in vitro* Knorpeldifferenzierung fand die Differenzierung zu Osteoblasten, also zu Knochen-bildenden Zellen, in einer Monolayerkultur statt. Als osteogene Induktoren fungierten unter anderem β -Glycerolphosphat und Ascorbinsäure. Nach 14-tägiger Differenzierung in Induktionsmedium wurden histologische Färbungen zum Nachweis einer mineralisierten Knochenmatrix sowie Expressionsanalysen relevanter Gene durchgeführt. Die Färbung mit Alizarin Rot basiert auf der Bindung des Farbstoffs an Kalzium, die braun/schwarze Färbung von Silbernitrat (Von Kossa) auf der Reaktion von Silber-Ionen mit Phosphaten in der Knochenmatrix (88). In der vorliegenden Arbeit wurden beide Färbungen vergleichend durchgeführt.

Bevor im Folgenden das osteogene Potential von Knochenmark-Stromazellen mit dem der anderen Zelltypen verglichen wird, sollen kurz Probleme bei der Wahl des passenden Stromazellspenders für den potentiellen klinischen Einsatz erwähnt werden

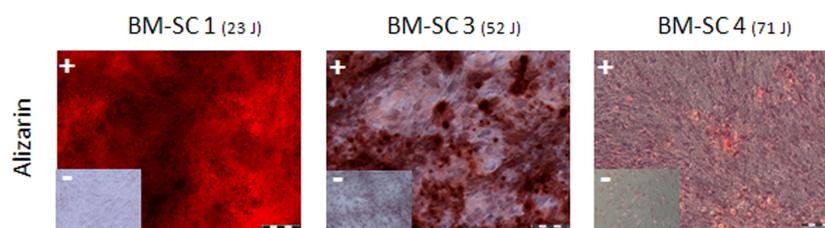


Abbildung 3.7: Osteogene *in vitro* Differenzierung von BM-SC in Abhängigkeit vom Alter des Knochenmarkspenders.

Alizarin Rot-Färbungen zum Vergleich des osteogenen Potentials von BM-SC, die aus Knochenmark von Spendern unterschiedlichen Alters isoliert wurden.

Abbildung 3.7 stellt beispielhaft die Abhängigkeit des *in vitro* osteogenen Differenzierungspotentials der BM-SC vom Alter des Knochenmarkspenders dar. Mit zunehmendem Alter (23, 52 und 71 Jahre) des Zellspenders nimmt die mit Alizarin Rot angefärbte Kalzifizierung deutlich ab. Bei den BM-SC des 71-jährigen Spenders wurde nach der Differenzierung kaum Kalzium angefärbt.

Wenn Stromazellen aus dem Knochenmark also in *tissue engineering*-Anwendungen zur Behandlung von Erkrankungen des skeletalen Systems eingesetzt werden sollen, können neben Gewebeinkompatibilitäten auch weitere Faktoren wie der Gesundheitszustand oder das Alter des Knochenmarkspenders den regenerativen Erfolg des hergestellten Gewebekonstruktes beeinflussen.

Um den Zeitpunkt des Beginns der Kalzifizierung der analysierten Zellen während der osteogenen *in vitro* Differenzierung bestimmen zu können, wurden histologische Färbungen und Genexpressionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung durchgeführt.

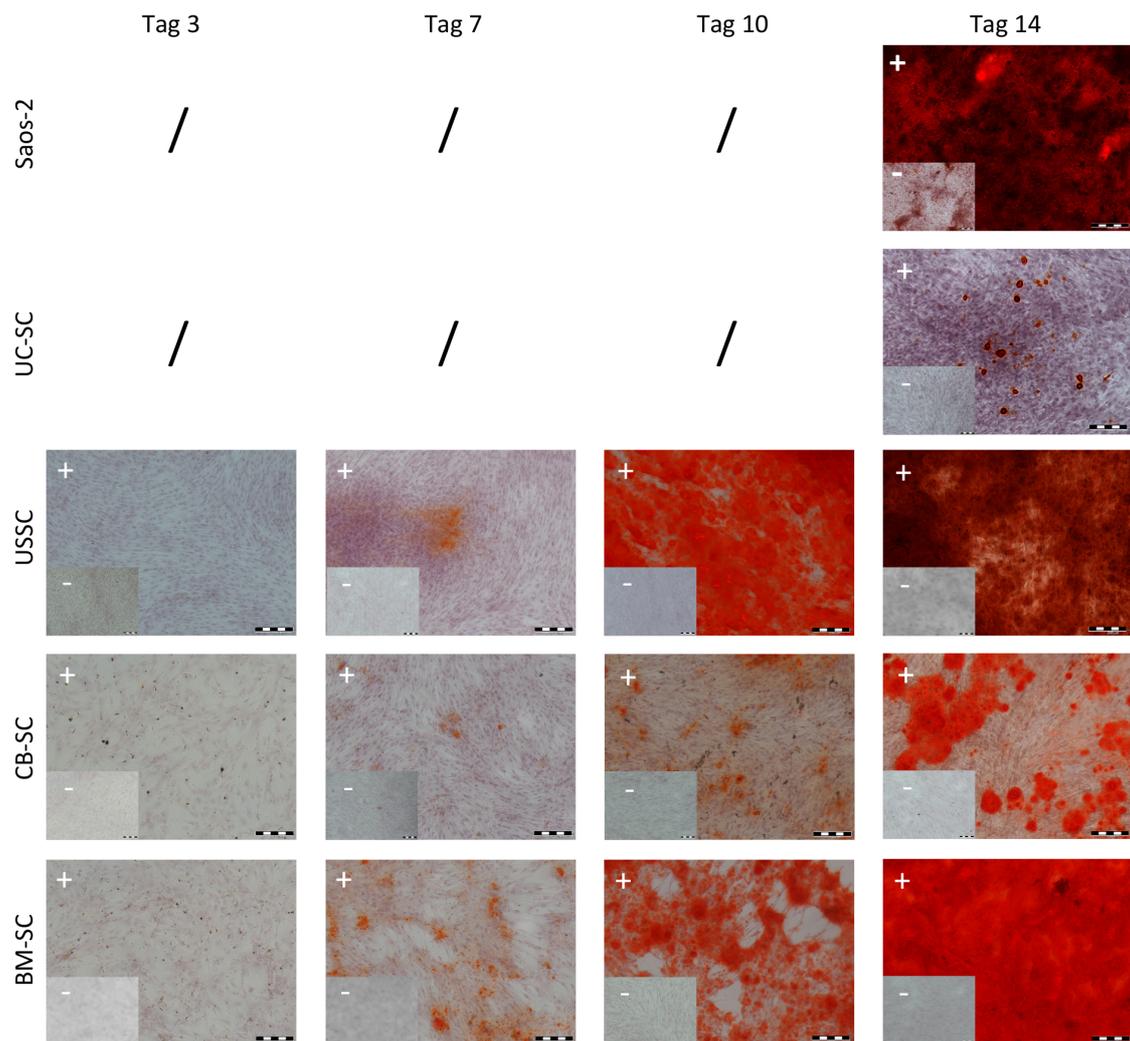


Abbildung 3.8: Osteogene *in vitro* Differenzierung: Zeitverlauf der Kalzifizierung (Alizarin Rot-Färbung).

Repräsentative Alizarin Rot-Färbungen osteogen differenzierter Zellen (+) und der Negativkontrollen (-) an Tag 3, 7, 10 und 14 der Differenzierung. Für die Positivkontrolle Saos-2 (entstanden aus einem primären Osteosarkom) sowie für UC-SC wurde die Färbung nur an Tag 14 der Differenzierung durchgeführt. Die rote Färbung zeigt Kalziumablagerungen. Der Größenmaßstab entspricht 200µm.

Verwendete Zelllinien: UC-SC 3, USSC 3, CB-SC 3, BM-SC 1 (Spenderalter: 23 Jahre).

Abbildung 3.8 stellt den zeitlichen Verlauf der mittels Alizarin Rot sichtbar gemachten Kalzifizierung während der *in vitro* Knochendifferenzierung dar. Die als Positivkontrolle genutzte Karzinomzelllinie Saos-2 wies an Tag 14 die stärkste Kalzifizierung aller Zelltypen auf. Für die repräsentative UC-SC

Zelllinie 3 wurde die Färbung nur an Tag 14 durchgeführt, da UC-SC nur in sehr geringem Ausmaß – und nicht vor Tag 14 – Kalzium ablagerten. Im Unterschied zu UC-SC wurden bei den Zelllinien USSC3, CB-SC3 und BM-SC1 bereits nach 7-tägiger Differenzierung erste rot angefärbte Kalziumdepots detektiert. An Tag 10 der Differenzierung waren USSC und BM-SC deutlich stärker kalzifiziert als CB-SC. Dies setzte sich bis zum Endpunkt der Analyse an Tag 14 fort. Die Monolayerkulturen von USSC und BM-SC waren vollständig rot angefärbt, CB-SC zeigten einen deutlich geringeren Kalzifizierungsgrad.

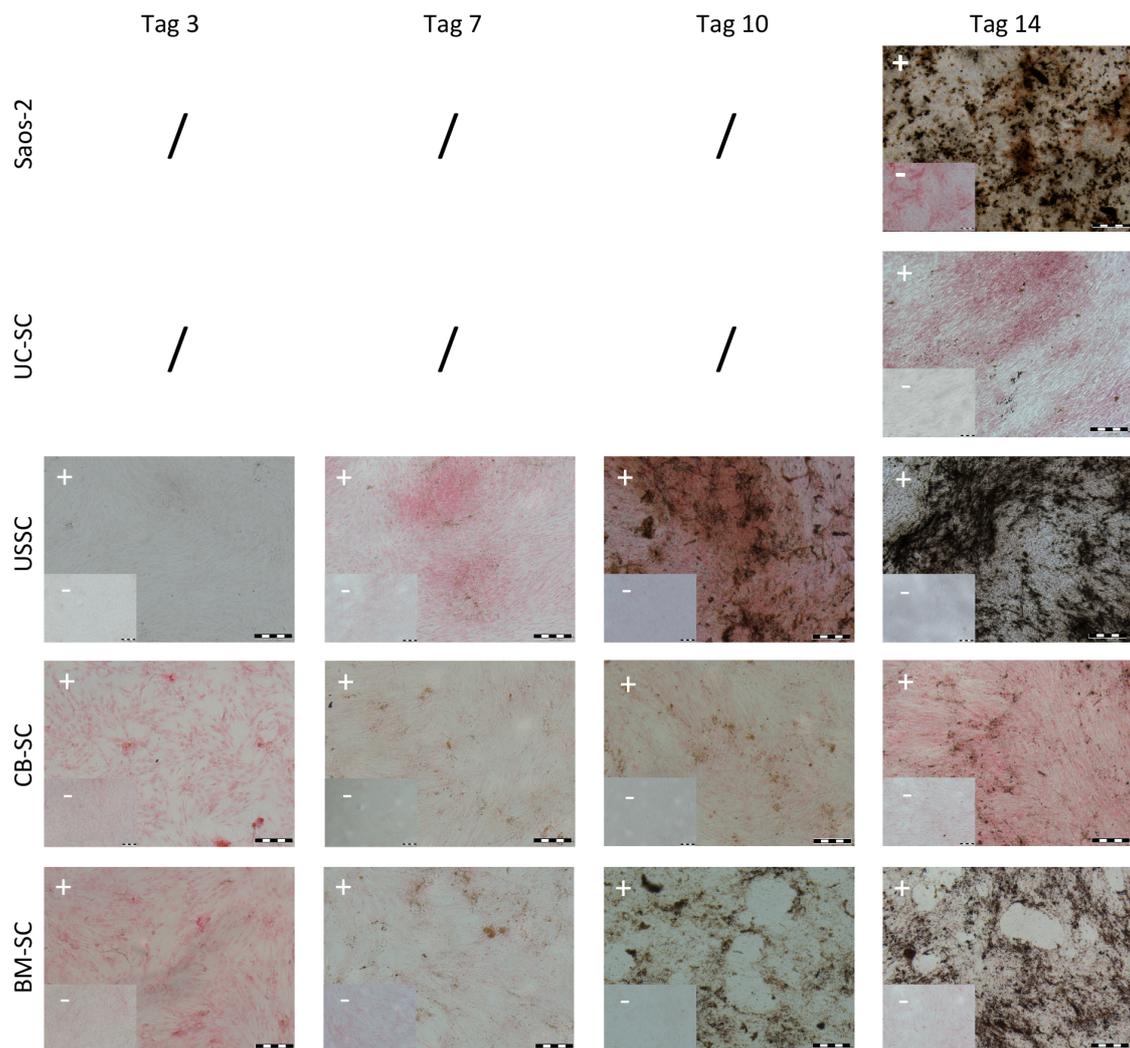


Abbildung 3.9: Osteogene *in vitro* Differenzierung: Zeitverlauf der Kalzifizierung (Von Kossa-Färbung).

Repräsentative Von Kossa-Färbungen osteogen differenzierter Zellen (+) und der Negativkontrollen (-) an Tag 3, 7, 10 und 14 der Differenzierung. Für die Positivkontrolle Saos-2 (entstanden aus einem primären Osteosarkom) sowie für UC-SC wurde die Färbung nur an Tag 14 der Differenzierung durchgeführt. Die braun/schwarze Färbung zeigt Phosphate. Der Größenmaßstab entspricht 200µm.

Verwendete Zelllinien: UC-SC 3, USSC 3, CB-SC 3, BM-SC 1 (Spenderalter: 23 Jahre).

Analog zu Abbildung 3.8 zeigt Abbildung 3.9 den Verlauf der osteogenen *in vitro* Differenzierung an Tag 3, 7, 10 und 14 nach Von Kossa-Färbung. In der dargestellten UC-SC Zelllinie reagierten an Tag 14

nur geringfügig Phosphate der extrazellulären Matrix mit dem zur Färbung genutzten Silbernitrat, bei den anderen Zelltypen hingegen war ab Tag 7 eine braun/schwarze Färbung erkennbar. Vergleichbar zur Alizarin Rot Färbung wurde auch nach Von Kossa-Färbung deutlich, dass CB-SC an Tag 14 weniger extrazelluläre Matrix sezernierten als USSC und BM-SC.

Neben den gezeigten histologischen Färbungen ermöglicht die Analyse der Expression Osteogenese-relevanter Gene einen genaueren Einblick in die *in vitro* Knochendifferenzierung. Dabei wurde besonderer Fokus auf die in Kapitel 1.2.1.3 beschriebenen frühen und späten Regulatoren der Osteogenese gelegt.

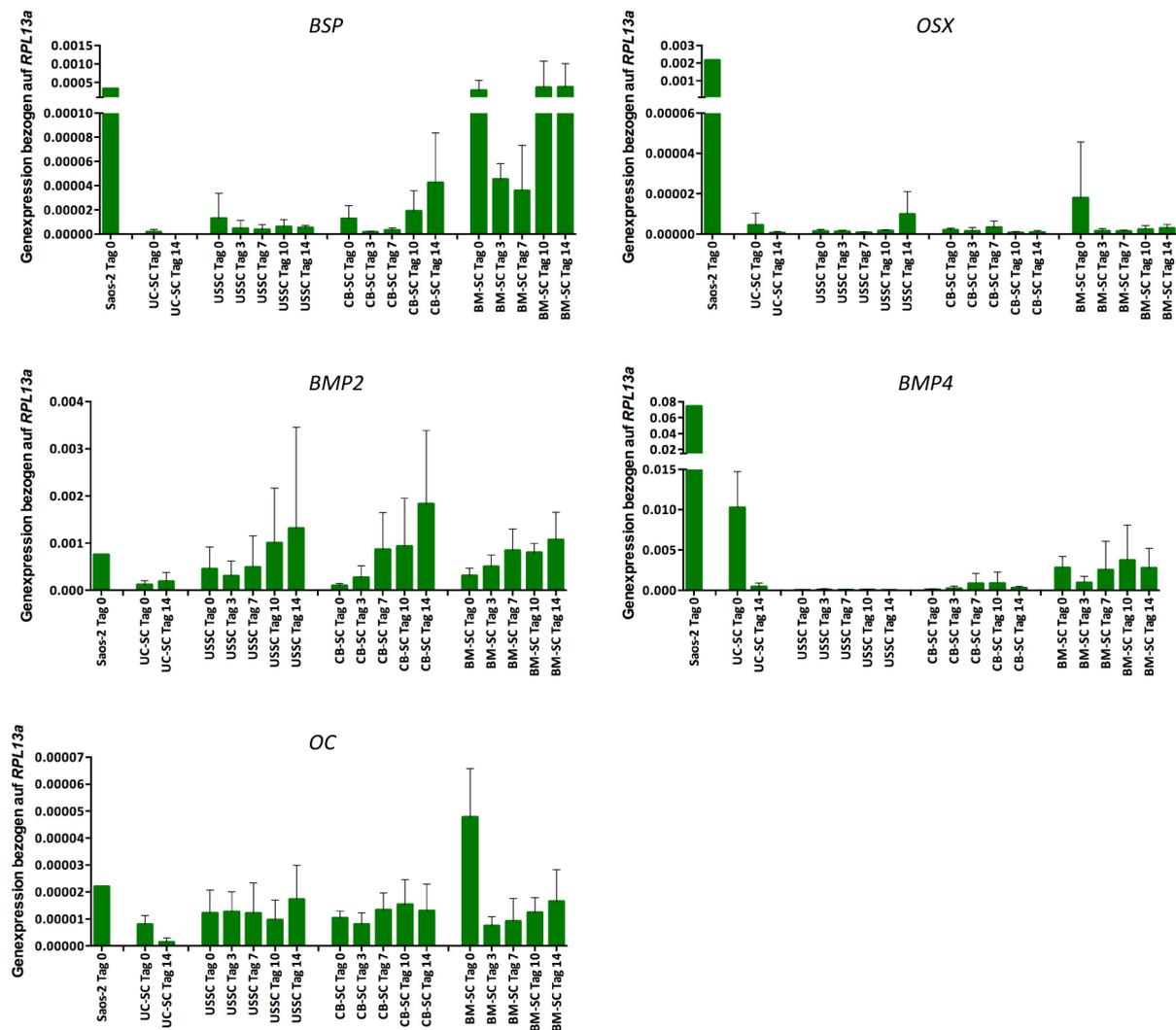


Abbildung 3.10: Osteogene *in vitro* Differenzierung: Zeitverlauf der Expression relevanter Marker.

QRT-PCR Analyse der Expression an der Osteogenese beteiligter Gene in nativen (Tag 0) und osteogen differenzierten (Tag 3, 7, 10, 14) Zellen bezogen auf das *housekeeping* Gen *RPL13a*. Dargestellt werden Mittelwert und Standardabweichung der Genexpression von mindestens 3 Zelllinien je Zelltyp. Die Genexpression in wurde UC-SC aufgrund des fehlenden Differenzierungspotentials (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9) nur an Tag 0 und 14 analysiert. Die Zelllinie Saos-2 (entstanden aus einem primären Osteosarkom) diene als Positivkontrolle.

RPL13a: human ribosomal protein L13a, *BSP*: integrin-binding/bone sialoprotein, *OSX*: osterix/transcription factor SP7, *BMP2/4*: bone morphogenetic proteins 2/4, *OC*: osteocalcin.

Abbildung 3.10 veranschaulicht Resultate der quantitativen PCRs zur zeitlichen Regulation der Expression der Gene *BSP*, *OSX*, *BMP2*, *BMP4* und *OC* während der *in vitro* Differenzierung zu Osteoblasten. Die Expression während der Differenzierung wird jeweils mit der undifferenzierten Zellen (Tag 0) und der Expression in Saos-2 Osteosarkom-Zellen verglichen. Für UC-SC wurde wie in Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9 nur der Endpunkt der Differenzierung (Tag 14) analysiert. Die biologische Variabilität zwischen den Zelllinien eines Zelltyps (dargestellt wird der Mittelwert von mindestens 3 Zelllinien) führte zu großen Standardabweichungen. Daher werden im Folgenden keine Details beschrieben, sondern nur die deutlichsten Unterschiede der Genexpression während der

osteogenen Differenzierung der verschiedenen Zellpopulationen hervorgehoben. Die Abbildung 3.10 zugrunde liegenden Expressionswerte werden in Tabelle A 2 aufgeführt.

Das Knochenmatrix-Phosphoprotein *BSP* wurde in undifferenzierten BM-SC ähnlich stark exprimiert wie in der Positivkontrolle Saos-2. Zu Beginn der Differenzierung nahm die Expression zunächst ab und erreichte ihr Maximum in BM-SC ab Tag 10. Das Expressionslevel von *BSP* in UC-SC, USSC und CB-SC war vor und während der Differenzierung deutlich geringer als in den Knochenmark-Stromazellen. In UC-SC wurde unbeeinflusst von der osteogenen Induktion nur eine minimale Expression detektiert. USSC zeigten die stärkste Expression in undifferenziertem Zustand, in CB-SC dagegen erhöhte sich das Expressionslevel von *BSP* durch die Differenzierung und erreichte das Maximum an Tag 14.

Der Transkriptionsfaktor *OSX* wurde am stärksten in Saos-2 Zellen exprimiert. In BM-SC an Tag 0 war ein hohes Level des Gens nachweisbar, durch die Differenzierung wurde es runterreguliert und blieb bis Tag 14 auf einem konstant niedrigen Niveau. CB-SC und USSC zeigten undifferenziert und während der Induktion nur eine minimale *OSX*-Expression, in USSC wurde im Gegensatz zu CB-SC am Ende der osteogenen Differenzierung eine gesteigerte Expression nachgewiesen. UC-SC zeigten undifferenziert eine basale Expression von *OSX*, die jedoch nach Induktion nicht mehr detektiert wurde.

Die Expression des Osteogenese-induzierenden Morphogens *BMP2* steigerte sich in allen untersuchten Zelltypen (außer UC-SC) durch die Differenzierung kontinuierlich und erreichte an Tag 14 ein höheres Level als die Positivkontrolle Saos-2 (undifferenziert). Sowohl für USSC als auch für CB-SC wurde am Ende der Differenzierung eine stärkere Expression nachgewiesen als für BM-SC. Auch die Expression in UC-SC stieg von Tag 0 zu Tag 14 minimal an, das Level blieb jedoch verglichen mit den anderen Zellpopulationen auf einem sehr geringen Niveau.

Dagegen wurde das Morphogen *BMP4* in undifferenzierten UC-SC stark exprimiert und durch die Differenzierung nahezu abgeschaltet. In USSC und CB-SC war unabhängig von der Differenzierung keine oder nur eine basale Expression von *BMP4* nachweisbar, BM-SC hingegen exprimierten das Gen undifferenziert sowie während der osteogenen Induktion, mit einem maximalen Level an Tag 10.

Osteocalcin, ein von Osteoblasten sekretiertes Hormon, wurde am stärksten von nicht-differenzierten BM-SC exprimiert, durch die Differenzierung sank das Level des Gens. In USSC und CB-SC wurde *OC* weitgehend konstant exprimiert. Das Expressionslevel in UC-SC hingegen sank mit der Differenzierung.

Für die hier untersuchten Differenzierungen lässt sich zusammenfassen, dass Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-SC) neben einem fehlenden adipo- (Abbildung 3.4) und chondrogenen (Abbildung 3.6) auch kein osteogenes Differenzierungsvermögen (Abbildung 3.8 bis Abbildung 3.10) aufwiesen.

Wie bereits beschrieben, besaßen CB- und BM-SC, nicht jedoch USSC das Potential, in adipogene Richtung zu differenzieren, d.h. Fettvakuolen zu bilden und relevante Gene (*PPAR γ* , *FABP4*, *PLIN*) zu exprimieren.

UC-SC bildeten während der chondrogenen Differenzierung geringer kondensierte Zellpellets aus, in denen nur in geringem Ausmaß Proteoglykane angefärbt wurden und der Transkriptionsfaktor *SOX9* nicht verstärkt exprimiert wurde (Abbildung 3.5, Abbildung 3.6). Pellets der anderen Zelltypen

kondensierten dagegen während der Differenzierung, zeigten bereits vor (BM-SC) oder nach der Differenzierung eine Expression von *SOX9* und sekretierten eine Matrix, in der Proteoglykane angefärbt wurden.

Das osteogene *in vitro* Potential der hier untersuchten Zelltypen stellte sich sehr unterschiedlich dar. Sowohl USSC als auch BM-SC – bei deren Verwendung das Alter des Knochenmarkspenders beachtet werden sollte (Abbildung 3.7) – bildeten nach osteogener Induktion eine kalziumhaltige Matrix. (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9). Auch CB-SC waren in geringerem Maße zur osteogenen Differenzierung fähig. Die qRT-PCR Analyse relevanter Marker ergab eine starke Expression von *BSP*, *OSX*, *BMP4* und *OC* bereits in undifferenzierten BM-SC.

3.2 Vergleichende Genexpressionsanalyse

3.2.1 Microarray Analysen

Nachdem im vorhergehenden Kapitel das adipo-, chondro- und osteogene Differenzierungspotential der verschiedenen Zelltypen eingehend untersucht wurde, wird im Folgenden die molekulare Grundlage verglichen. Microarray Genexpressionsanalysen ermöglichen zunächst einen allgemeinen Einblick in die Genexpression undifferenzierter Zellen. Da die Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-SC) kein vielversprechendes Potential aufwiesen, in Richtung Adipozyten, Chondro- oder Osteoblasten zu differenzieren (Abbildung 3.4, Abbildung 3.6, Abbildung 3.8), wurden sie für die Microarray Analysen nicht berücksichtigt. Für USSC, CB-SC und BM-SC wurden je 3 Zelllinien untersucht.

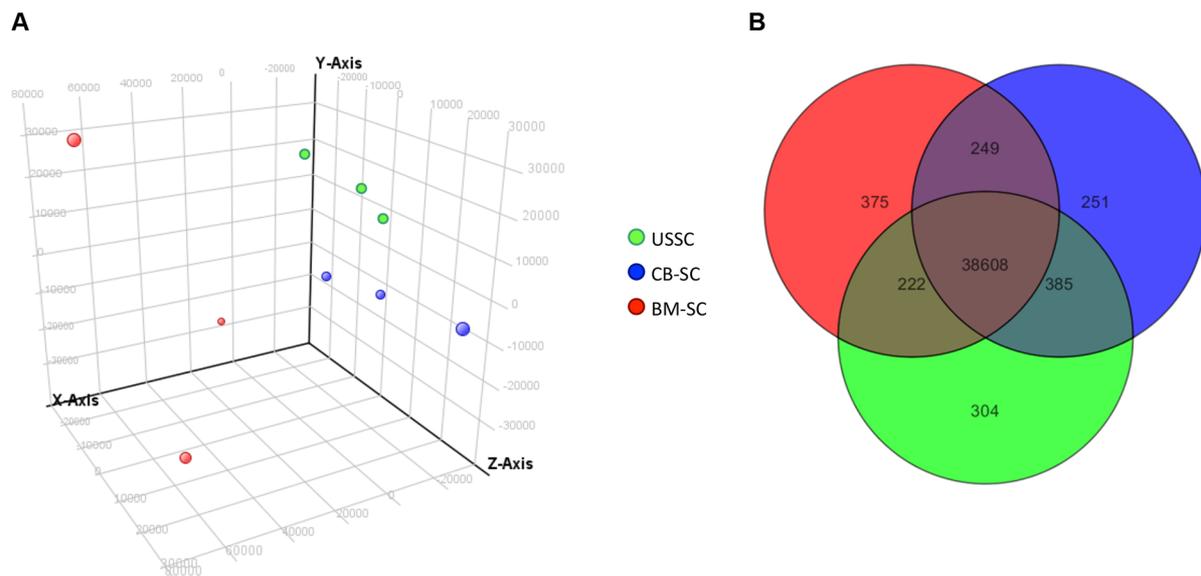


Abbildung 3.11: Grafischer Vergleich der Genexpression von USSC, CB-SC und BM-SC.

Die Genexpression von USSC (grün), CB-SC (blau) und BM-SC (rot, jeweils als Triplikate) wurde mittels *PrimeView™ human gene expression microarrays* analysiert. **A:** *Principal component analysis* (PCA) zur Darstellung der Korrelation der Genexpression in den einzelnen Replikaten eines Zelltyps. Analysiert wurden nur Datensätze, deren Fluoreszenz-Signalstärke in mindestens 2 von 3 Replikaten sowie in mindestens 1 von 3 Zelltypen über dem Hintergrundsignal (innerhalb der 20.-100. Perzentile der Fluoreszenz-Signalstärke des jeweiligen Microarrays) lag. **B:** Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl gemeinsam oder exklusiv exprimierter Gene. Die Genexpression wurde für jeden Zelltypen gefiltert: Ein Datensatz musste in mindestens 2 von 3 Replikaten stärker als das Hintergrundsignal exprimiert sein. Daraus ergaben sich für USSC 39519, für CB-SC 39493 und für BM-SC 39454 Transkripte.

Verwendete Zelllinien: USSC2, 3, 4; CB-SC2, 3, 4; BM-SC1, 5, 6.

Die *principal component analysis* (PCA, Abbildung 3.11 A) stellt die Korrelation der Genexpression zwischen den 3 untersuchten Zelllinien eines Zelltyps als Kugeln im dreidimensionalen Raum dar. Je näher die Kugeln einer Zellpopulation beieinander liegen, umso mehr stimmt die Genexpression in den jeweiligen Zelllinien überein. Die 3 BM-SC Replikate wiesen eine größere Streuung im dreidimensionalen Raum und damit eine stärkere Variabilität ihrer Genexpression auf als die USSC- oder CB-SC Triplikate.

Das Venn-Diagramm in Abbildung 3.11 B stellt die Anzahl der Gene dar, die ausschließlich von einer oder aber von mehreren Zellpopulationen exprimiert wurden. Der Großteil der Gene (38608) war in allen 3 Zelltypen präsent. Unter den Genen, die nicht in allen Zelltypen nachgewiesen wurden, exprimierten USSC und CB-SC 385 Gene, die nicht in BM-SC präsent waren. 249 Gene waren in CB-SC und BM-SC, nicht jedoch in USSC detektierbar. Die Expression von 222 Genen wurde von USSC und BM-SC aber nicht von CB-SC geteilt. 304 Gene wurden exklusiv von USSC, 251 von CB-SC und 375 von BM-SC exprimiert. Die weitergehende Analyse dieser Gene wird in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: An der Knochenentwicklung beteiligte Gene, die ausschließlich in USSC, CB-SC oder BM-SC exprimiert wurden.

Gene, die nur in einem einzelnen Zelltyp (USSC, CB-SC oder BM-SC) präsent waren, wurden biologischen Prozessen (*GO-terms*) zugeordnet. Es werden nur Osteogenese-assoziierte *GO-terms* dargestellt. Ein Gen kann mehreren *GO-terms* zugeordnet werden.

Verwendete Zelllinien: USSC2, 3, 4; CB-SC2, 3, 4; BM-SC1, 5, 6. *GO: gene ontology; AMBM: ameloblastin (enamel matrix protein); BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2; CADM1: cell adhesion molecule 1; CHRDL2: chordin-like 2; COL12A1/14A1: collagen type XII alpha 1/type XIV alpha 1; FGF9: fibroblast growth factor 9; HOXC8/D10: homeobox C8/D10; IGF1: insulin-like growth factor 1; IGFBP5: insulin-like growth factor binding protein 5; MMP13: matrix metalloproteinase 13; NRCAM: neuronal cell adhesion molecule; PCDHB14/16: protocadherin beta 14/16; SPP1: secreted phosphoprotein 1 (Osteopontin); TDGF1: teratocarcinoma-derived growth factor 1; TFAP2A: transcription factor AP-2 alpha; TNFRSF11A: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a.*

	<i>Gene Ontology Biological Process</i>	<i>zugeordnete Gene</i>
USSC	GO:0001503~ossification	<i>CHRDL2, TNFRSF11A, FGF9</i>
	GO:0060348~bone development	<i>CHRDL2, TNFRSF11A, FGF9</i>
	GO:0001501~skeletal system development	<i>CHRDL2, TNFRSF11A, FGF9</i>
CB-SC	GO:0001503~ossification	<i>AMBN, MMP13</i>
	GO:0060348~bone development	<i>AMBN, MMP13</i>
	GO:0001501~skeletal system development	<i>AMBN, MMP13, HOXD10</i>
BM-SC	GO:0001649~osteoblast differentiation	<i>IGF1, IGFBP5, SPP1</i>
	GO:0010810~regulation of cell-substrate adhesion	<i>BCL2, TDGF1, SPP1</i>
	GO:0001952~regulation of cell-matrix adhesion	<i>BCL2, TDGF1</i>
	GO:0060348~bone development	<i>BCL2, IGF1, IGFBP5, SPP1</i>
	GO:0001501~skeletal system development	<i>HOXC8, BCL2, IGF1, TFAP2A, COL12A1, IGFBP5, SPP1</i>
	GO:0030155~regulation of cell adhesion	<i>BCL2, TDGF1, SPP1</i>
	GO:0001503~ossification	<i>BCL2, IGF1, IGFBP5, SPP1</i>
	GO:0043062~extracellular structure organization	<i>NRCAM, COL14A1, CADM1, PCDHB16, PCDHB14, COL12A1</i>
	GO:0030199~collagen fibril organization	<i>COL14A1, COL12A1</i>
	GO:0030198~extracellular matrix organization	<i>COL14A1, COL12A1</i>

In Tabelle 6 werden nur die exklusiv in einer Zellpopulation exprimierten, an der Knochenentwicklung beteiligten Gene dargestellt. Sowohl USSC (*CHRDL2, TNFRSF11A, FGF9*) als auch CB-SC (*AMBN, MMP13, HOXD10*) exprimierten jeweils nur 3 Osteogenese-assoziierte Gene exklusiv. BM-SC hingegen wiesen die alleinige Expression von 13 Genen, die an der Knochenentwicklung beteiligt sind, auf (*IGF1, IGFBP5, SPP1, BCL2, TDGF1, HOXC8, TFAP2A, COL12A1/14A1, NRCAM, CADM1, PCDHB14/16*).

Da Stromazellen aus dem Knochenmark deutlich mehr Osteogenese-assoziierte Gene exklusiv exprimierten, wird diese Zellpopulation im Folgenden im Detail mit USSC und CB-SC aus dem Nabelschnurblut verglichen.

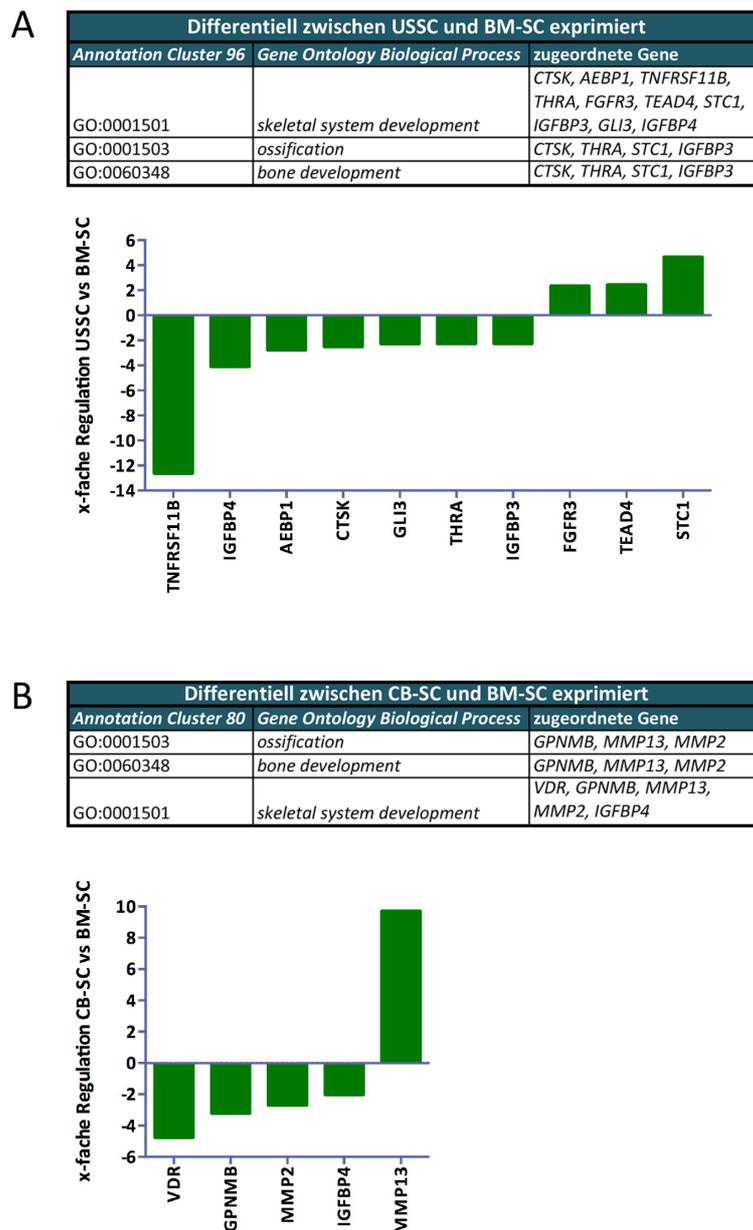


Abbildung 3.12: Osteogenese-assoziierte, differentiell exprimierte Gene.

Zwischen USSC und BM-SC (**A**) bzw. CB-SC und BM-SC (**B**) signifikant ($p < 0,05$) differentiell exprimierte Gene, die mit der Knochenentwicklung assoziiert sind (mehr als 2-fach stärker/schwächer). Die Analyse erfolgte mittels *Affymetrix PrimeView™ Human Gene Expression Microarrays*.

Verwendete Zelllinien: USSC2, 3, 4; CB-SC2, 3, 4; BM-SC1, 5, 6. GO: gene ontology; AEBP1: AE binding protein 1; CTSK: cathepsin K; FGFR3: fibroblast growth factor receptor 3; GLI3: GLI family zinc finger 3; GPNMB: glycoprotein (transmembrane) nmb; IGFBP3/4: insulin-like growth factor binding protein 3/4; MMP2/13: matrix metalloproteinase 2/13; STC1: stanniocalcin 1; TEAD4: TEA domain family member 4; THRA: thyroid hormone receptor, alpha; TNFRSF11B: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b; VDR: vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor.

Sowohl zwischen USSC und BM-SC (Abbildung 3.12A) als auch zwischen CB-SC und BM-SC (Abbildung 3.12 B) wurden differentiell exprimierte Gene detektiert, die nach DAVID Analyse der Knochenentwicklung zugeordnet wurden. Von den 10 zwischen USSC und BM-SC unterschiedlich exprimierten Genen, waren 7 stärker in BM-SC exprimiert (*TNFRSF11B*, *IGFBP4*, *AEBP1*, *CTSK*, *GLI3*, *THRA*, *IGFBP3*), nur 3 in USSC (*FGFR3*, *TEAD4*, *STC1*). 5 Gene zeigten eine differentielle Expression

beim Vergleich von CB-SC mit BM-SC, davon waren 4 Gene stärker in BM-SC präsent (*VDR*, *GPNMB*, *MMP2*, *IGFBP4*). Nur das Gen *MMP13* war stärker in CB-SC als in BM-SC exprimiert. Diese Auswertung bestätigt demnach die verstärkte Expression zahlreicher für die Knochenentwicklung relevanter Gene in BM-SC verglichen mit USSC oder CB-SC.

3.2.2 Quantitative Genexpressionsanalysen

Die Analyse der Basisexpression (in undifferenzierten Zellen) von Genen, die an der Regulation der Knochenbildung beteiligt sind, kann Aufschluss über das unterschiedliche Potential der Zelltypen geben, osteogen zu differenzieren. Daher wurden zur Ergänzung der Ergebnisse der Microarray Genexpressionsanalysen (Kapitel 3.2.1) quantitative PCRs durchgeführt. Des Weiteren sollten Gene definiert werden, die als diskriminierende Marker zwischen den Zelltypen dienen können.

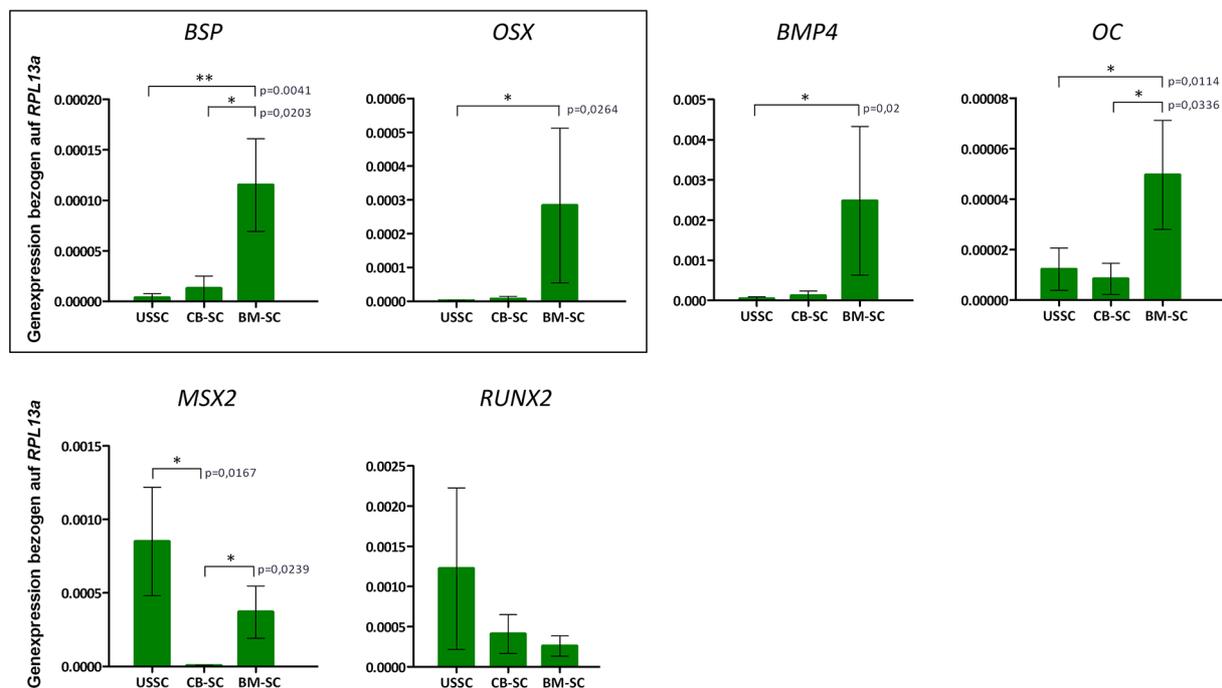


Abbildung 3.13: Expression von Osteogenese-relevanten Genen.

Analyse der Expression von *BSP*, *OSX*, *BMP4*, *OC*, *MSX2* und *RUNX2* in undifferenzierten Zellen mittels qRT-PCR bezogen auf das *housekeeping* Gen *RPL13a*. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens 3 Zelllinien je Zelltyp. Statistik: ungepaarter t-Test. Eingerahmt sind die Gene, die für Überexpressionen ausgewählt wurden (Kapitel 3.3 und 3.4).

RPL13a: human ribosomal protein L13a; *BSP*: integrin-binding/bone sialoprotein; *OSX*: osterix/transcription factor SP7; *BMP4*: bone morphogenetic protein 4; *OC*: osteocalcin/gamma-carboxyglutamic acid protein bone, *BGLAP*; *MSX2*: homolog of muscle segment homeobox 2, *drosophila*, *RUNX2*: runt-related transcription factor 2, *: signifikant ($p=0,01 - 0,05$), **: sehr signifikant ($p=0,001 - 0,01$).

BSP, *OSX*, *BMP4* und *OC* wurden signifikant stärker in BM-SC exprimiert als in den Zellpopulationen aus dem Nabelschnurblut (Abbildung 3.13, Expression bezogen auf *RPL13a*, *BSP*: USSC: $3,5 \pm 2,0 E-6$; CB-SC: $1,3 E-5 \pm 7,1 E-6$; BM-SC: $1,2 E-4 \pm 2,7 E-5$; *OSX*: USSC: $1,3 E-6 \pm 4,4 E-7$; CB-SC: $6,5 \pm 4,8 E-6$; BM-SC: $2,8 \pm 1,3 E-4$; *BMP4*: USSC: $3,8 \pm 2,2 E-5$; CB-SC: $1,2 E-4 \pm 6,7 E-5$; BM-SC: $2,5 E-3 \pm 9,3 E-4$;

OC: USSC: $1,2 \text{ E-5} \pm 3,8 \text{ E-6}$; CB-SC: $8,4 \pm 3,5 \text{ E-6}$; BM-SC: $5,0 \pm 1,2 \text{ E-5}$). *MSX2* dagegen zeigte eine signifikant stärkere Expression in USSC und BM-SC verglichen mit CB-SC, wobei die stärkste Expression in USSC nachgewiesen wurde (USSC: $8,5 \pm 2,1 \text{ E-4}$; CB-SC: $6,4 \text{ E-6} \pm 9,5 \text{ E-7}$; BM-SC: $3,7 \pm 1,0 \text{ E-4}$). *RUNX2* wurde am deutlichsten in USSC und schwächer in CB- und BM-SC exprimiert (USSC: $1,2 \pm 1,0 \text{ E-3}$; CB-SC: $4,1 \pm 2,4 \text{ E-4}$; BM-SC: $2,6 \pm 1,3 \text{ E-4}$).

Die Microarray Genexpressionsanalysen ergaben eine höhere Anzahl gemeinsam exprimierter Gene in den neonatalen Zelltypen USSC und CB-SC verglichen mit adulten BM-SC (Abbildung 3.11 B). Letztere wiesen eine osteogene Signatur auf, da unter den ausschließlich in BM-SC exprimierten Genen deutlich mehr Osteogenese-assoziierte Gene als in USSC oder CB-SC nachgewiesen wurden (Tabelle 6). Außerdem zeigten sich unter den differentiell exprimierten, für die Osteogenese relevanten Genen eine stärkere Expression zahlreicher Gene in BM-SC im Vergleich zu USSC oder CB-SC (Abbildung 3.12). Die Genexpression in den 3 untersuchten Zelllinien des Typs BM-SC wies eine größere biologische Variabilität auf als die in den USSC- oder CB-SC-Replikaten (Abbildung 3.11 A).

In Übereinstimmung mit den Resultaten der Microarray Analysen wurden in BM-SC mittels quantitativer RT-PCR hohe Expressionslevel von Genen, die mit der Knochenbildung assoziiert sind, detektiert (Abbildung 3.13). BM-SC tragen demnach eine osteogene Signatur in sich. Wie in den Microarray Analysen zeigte sich in den qRT-PCRs zudem eine teilweise große Variabilität zwischen den einzelnen BM-SC Zelllinien (Standardabweichungen in Abbildung 3.13).

Da BM-SC in der Literatur Vorteile bezüglich der *in vivo* Knochenregeneration gegenüber Zelltypen aus anderen Geweben zugeschrieben werden ((14)), sind die hier beschriebenen Gene möglicherweise an der Regulation des osteogenen Potentials eines Zelltyps beteiligt. Um die Funktion der Gene *BSP* und *OSX* in diesem Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden Überexpressionsexperimente durchgeführt.

3.3 Überexpression von *integrin-binding/bone sialoprotein (BSP)*

3.3.1 Nachweis der Überexpression

Das Phosphoprotein *integrin-binding/bone sialoprotein (BSP)* ist Teil der extrazellulären Knochenmatrix und scheint mitverantwortlich für das *in vivo* osteogene Potential eines Zelltyps zu sein (89, 90). Zur Analyse der Genfunktion *in vitro* wurde *BSP* in je 2 UC-SC und USSC Zelllinien überexprimiert. Dazu wurde die *BSP*-Gensequenz zunächst über geeignete Schnittstellen (Kapitel 2.2.2.9) in den Vektor pCL6IEGwo kloniert (Abbildung A 3).

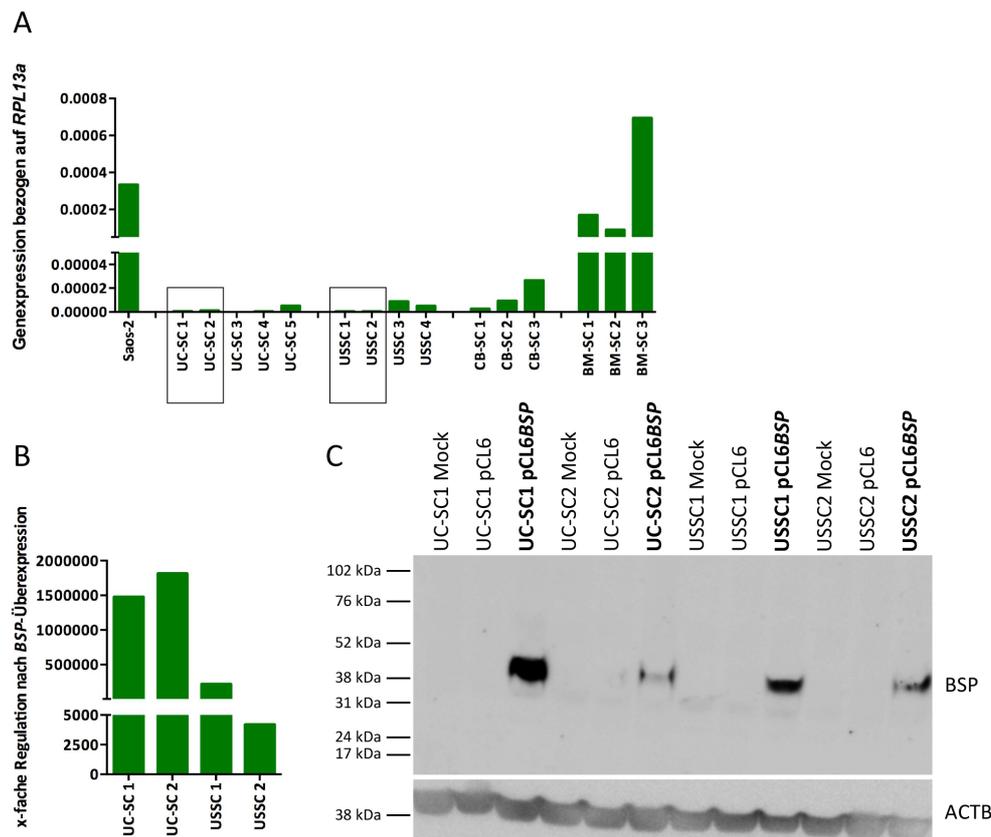


Abbildung 3.14: Stabile Überexpression von BSP.

A: Analyse der Expression von *BSP* in verschiedenen UC-SC, USSC, CB-SC und BM-SC Zelllinien mittels qRT-PCR. Als *housekeeping* Gen wurde *RPL13a* verwendet. Die markierten Zelllinien wurden für die Überexpression von *BSP* ausgewählt. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie Saos-2 (entstanden aus einem primären Osteosarkom). **B:** Nachweis der Überexpression von *BSP* in je 2 USSC- und UC-SC Zelllinien mittels qRT-PCR bezogen auf das *housekeeping* Gen *RPL13a* und auf die Genexpression in den zugehörigen nicht-überexprimierten (Mock) Zellen. **C:** Nachweis der Überexpression auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse. Neben den Mock- wurden auch die Leervektor-Kontrollzellen (pCL6) untersucht. Der Nachweis des *housekeeping* Proteins ACTB diente als Auftragskontrolle.

RPL13a: human ribosomal protein L13a, *BSP*: integrin-binding/bone sialoprotein, *ACTB*: Actin beta.

Stromazellen aus dem Knochenmark wiesen eine deutlich stärkere Expression von *BSP* auf als Zellen aus dem Nabelschnurblut (Abbildung 3.13). Die Expression wurde in mehreren Zelllinien je Zelltyp verglichen (Abbildung 3.14 A). Besonders UC-SC und USSC zeigten eine wesentlich geringere Expression als BM-SC. Daher wurde *BSP* in den Zelllinien UC-SC1 und 2 sowie USSC1 und 2 überexprimiert. Auf Genexpressionsebene wurde die Effizienz der Transfektion durch qRT-PCR nachgewiesen (Abbildung 3.14 B, UC-SC1: 1476018-fach stärkere Expression als Mock-Kontrollzellen, UC-SC2: 1811255-fach, USSC1: 215927-fach, USSC2: 4185-fach). Auf Proteinebene wurde *BSP* nur in den überexprimierten Zelllinien detektiert, sowohl die Mock- als auch die Leervektor-Kontrollzellen (pCL6) exprimierten *BSP* nicht (Abbildung 3.14 B). Die Expression des *housekeeping* Proteins β -Actin belegte, dass nahezu die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

3.3.2 Verändertes Differenzierungspotential

Die lentiviral-vermittelte Überexpression des Knochenmatrix-Proteins *BSP* beeinflusste die Expression anderer für die Osteogenese relevanter Gene nicht (*RUNX2*, *OSX*, *OC*, *BMP2*, *BMP4*; Daten werden nicht gezeigt). Dennoch wird *BSP* ein Kalzifizierungs-fördernder Effekt zugeschrieben, da es während der Knochenentwicklung die Bildung von Kalziumphosphat (Hydroxyapatit)-Kristallen initiieren kann (91). Aus diesem Grund wird im Folgenden der Einfluss der Überexpression auf das Differenzierungspotential dargestellt. Allein die Überexpression von *BSP* – ohne darauffolgende osteogene Induktion – führte nicht zur Bildung einer kalzifizierten Matrix. Daher wurde untersucht, ob sich ein Einfluss der Überexpression mit zusätzlicher osteogener Differenzierung zeigt.

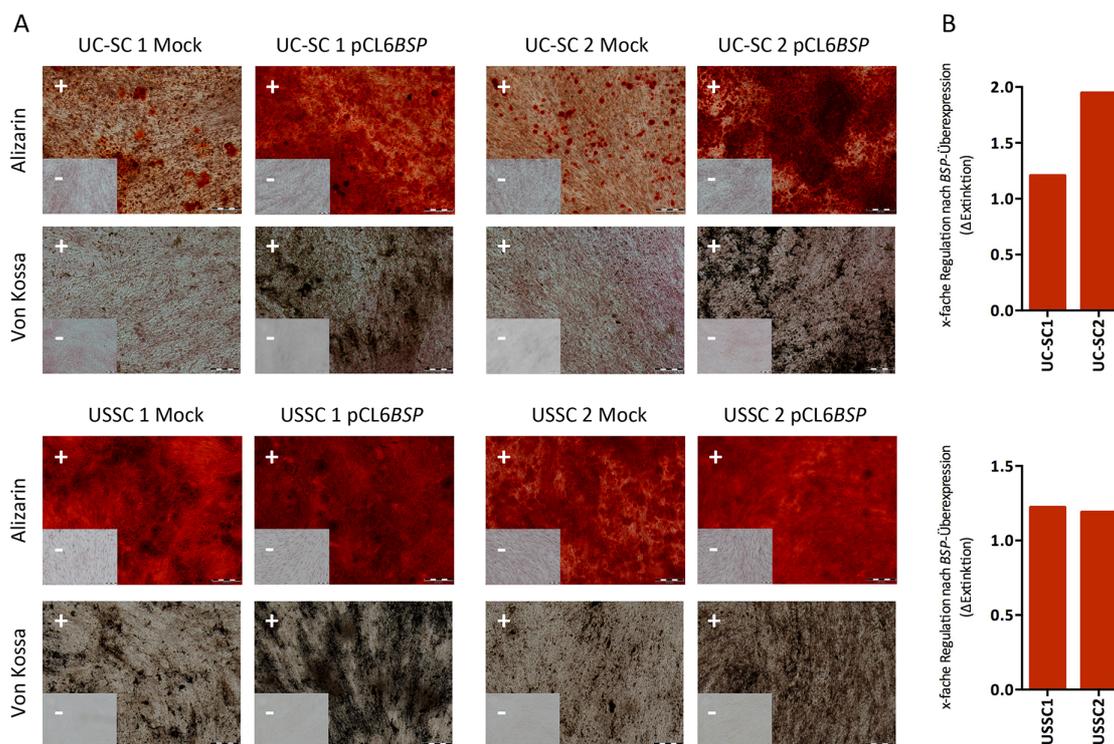


Abbildung 3.15: Osteogenes Differenzierungspotential nach *BSP*-Überexpression.

Einfluss der Überexpression von *BSP* auf das osteogene Differenzierungspotential. Mock bezeichnet die nicht überexprimierten Kontrollzellen. **A:** Alizarin Rot- und von Kossa-Färbungen osteogen differenzierter Zellen (+, Tag 14) und der Negativkontrollen (-). Die rote bzw. braun/schwarze Färbung zeigt Kalziumablagerungen. Der Größenmaßstab entspricht 200µm. **B:** Quantifizierung des gebundenen Alizarin Rot-Farbstoffs nach *BSP*-Überexpression in Relation zu Mock-Kontrollzellen.

BSP: integrin-binding/bone sialoprotein.

Abbildung 3.15 stellt den Einfluss der Überexpression des Gens *BSP* auf die osteogene Differenzierung der Zelllinien UC-SC1 und 2 sowie USSC1 und 2 dar. Alizarin Rot- und Von Kossa-Färbungen verdeutlichen die Bildung einer kalzifizierten Matrix (Abbildung 3.15 A). Zur genaueren Auswertung der Alizarin Rot-Färbung wurde der gebundene Farbstoff quantifiziert, wodurch auf die sekretierte Kalziummenge rückgeschlossen werden kann (Abbildung 3.15 B).

Wie bereits in Kapitel 3.1.4 beschrieben, können USSC auch ohne Überexpression *in vitro* osteogen differenzieren (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9). Durch die Überexpression von *BSP* konnte

ein leichter Anstieg des Kalzifizierungsgrads festgestellt werden. Der Nachweis mittels Von Kossa-Färbung machte dies deutlicher als die Alizarin Rot-Färbung (Abbildung 3.15 A). Die Quantifizierung des gebundenen Alizarin Rot-Farbstoffs bestätigte die Von Kossa-Färbung (Abbildung 3.15 B, relative Extinktion USSC1: 1,22-fach stärker als Mock-Kontrollzellen, USSC2: 1,19-fach stärker).

UC-SC dagegen zeigen nur ein sehr geringes Potential, osteogen zu differenzieren (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9). Bei diesem Zelltyp wurde der positive Einfluss der Überexpression von *BSP* auf das Kalzifizierungspotential besonders deutlich. Nach Differenzierung und Alizarin Rot-Färbung zeigte fast der gesamte Zell-Monolayer eine rot angefärbt Kalzifizierung, was durch Quantifizierung des Farbstoffs bestätigt wurde (Abbildung 3.15 B, relative Extinktion UC-SC1: 1,21-fach stärker als Mock-Kontrollzellen, UC-SC2: 1,95-fach stärker). Ebenso wurde nach der Von Kossa-Färbung eine vermehrte braun/schwarze Färbung durch Reaktion von Phosphaten in der kalzifizierten Matrix mit Silbernitrat detektiert (Abbildung 3.15 A).

Eine Beeinflussung der *in vitro* Differenzierung in Adipozyten und Chondroblasten durch die Überexpression von *BSP* wurde mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht nachgewiesen (Daten nicht dargestellt). In USSC und UC-SC unterstützte die Überexpression die osteogene *in vitro* Differenzierung (Abbildung 3.15).

3.4 Überexpression von *osterix/transcription factor SP7 (OSX)*

3.4.1 Nachweis der Überexpression

Der Transkriptionsfaktor *SP7/osterix (OSX)* ist essenziell für die Differenzierung zu Osteoblasten, seine Inaktivierung führt zu einem Scheitern der Knochenbildung in der Maus (65, 76). Um die Funktion des Gens in den humanen Zellpopulationen aus der Nabelschnur und Nabelschnurblut näher zu untersuchen, wurde *OSX* in je 2 UC-SC und USSC-Zelllinien überexprimiert. Dazu wurde die *OSX*-Gensequenz zunächst über geeignete Schnittstellen (Kapitel 2.2.2.9) in den Vektor pCL6IEGwo kloniert (Abbildung A 3).

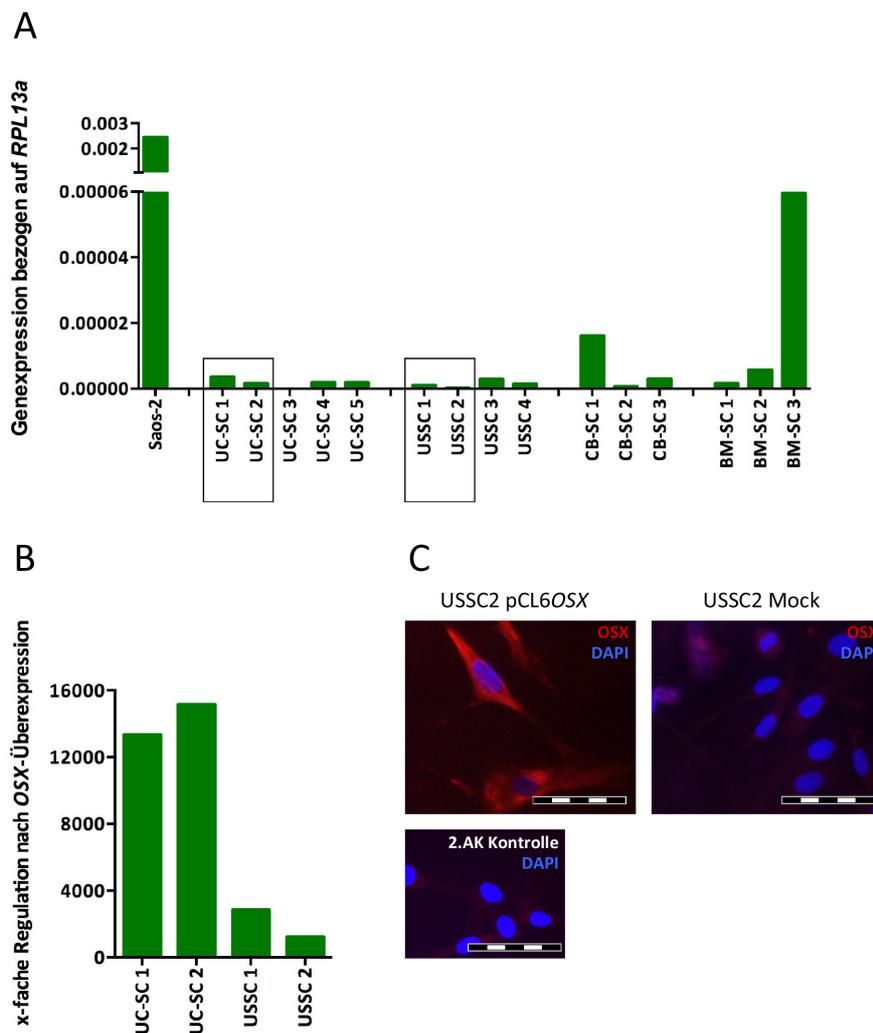


Abbildung 3.16: Stabile Überexpression von *OSX*.

A: Analyse der Expression von *OSX* in verschiedenen UC-SC, USSC, CB-SC und BM-SC Zelllinien mittels qRT-PCR. Als *housekeeping* Gen wurde *RPL13a* verwendet. Die markierten Zelllinien wurden für die Überexpression von *OSX* ausgewählt. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie Saos-2 (entstanden aus einem primären Osteosarkom). **B:** Nachweis der Überexpression von *OSX* in je 2 USSC- und UC-SC Zelllinien mittels qRT-PCR bezogen auf das *housekeeping* Gen *RPL13a* und auf die Genexpression in den zugehörigen nicht-überexprimierten (Mock) Zellen. **C:** Exemplarischer Nachweis der Überexpression in der Zelllinie USSC2 auf Proteinebene mittels immunocytochemischer Analyse. Als Kontrollen dienten die zugehörige Mock-Zelllinie sowie eine Färbung ohne Zugabe des *OSX*-Antikörpers zum Nachweis der Spezifität des Zweitantikörpers. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

RPL13a: ribosomal protein L13a, *OSX*: osterix/transcription factor SP7, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, AK: Antikörper.

Das Expressionsmuster von *OSX* in den verschiedenen Zelltypen ähnelte dem von *BSP*. In BM-SC wurde *OSX* exprimiert, in USSC und CB-SC dagegen nicht (Abbildung 3.13). Um geeignete Zelllinien zur Überexpression auszuwählen, wurde die Expression von *OSX* in mehreren Zelllinien je Zelltyp verglichen (Abbildung 3.16 A). Die Zelllinien UC-SC1 und 2 sowie USSC1 und 2 wurden mit *OSX* überexprimiert. Auf Ebene der mRNA erfolgte der Nachweis der erfolgreichen Transfektion mittels qRT-PCR. Im Vergleich zu den jeweiligen Mock-Kontrollzellen zeigte die Zelllinie UC-SC1 eine 13328-fach, UC-SC2 eine 15144-fach, USSC1 eine 2831-fach und USSC2 eine 1223-fach gesteigerte

Expression von *OSX* (Abbildung 3.16 B). Auf Proteinebene erfolgte der Nachweis mittels immunocytochemischer Analyse (Abbildung 3.16 C). *OSX* wurde nur nach Überexpression detektiert, die Mock-Zellen und die Zweitantikörperkontrolle zeigten nur Hintergrundsignale.

3.4.2 Expression Osteogenese-assoziiierter Gene

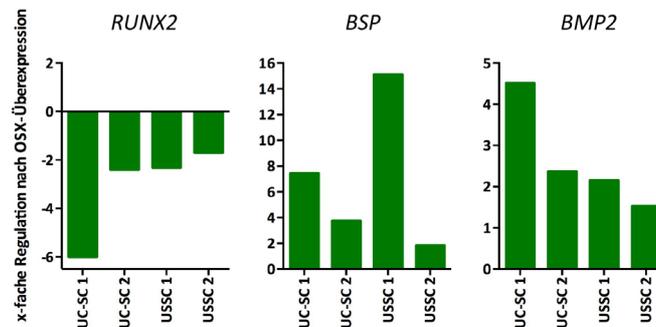


Abbildung 3.17: Genregulation nach *OSX*-Überexpression.

Analyse für die Knochenentwicklung wichtiger Gene mittels qRT-PCR. Die Genexpressionswerte wurden auf das *housekeeping* Gen *RPL13a* und auf die Genexpression in den zugehörigen nicht-überexprimierten (Mock) Zellen bezogen.

OSX: osterix/transcription factor *SP7*, *RPL13a*: human ribosomal protein *L13a*, *RUNX2*: runt-related transcription factor 2, *BSP*: integrin-binding/bone sialoprotein, *BMP2*: bone morphogenetic protein 2.

Nach Überexpression des Transkriptionsfaktors *OSX* wurde zunächst dessen Einfluss auf die Expression weiterer Gene untersucht, die für die Knochenentwicklung wichtig sind (Abbildung 3.17). In allen überexprimierten Zelllinien wurde die Expression von *RUNX2*, eines weiteren essentiellen Transkriptionsfaktors während der Osteogenese, runterreguliert (UC-SC1: -6,0-fach schwächer als in Mock-Zellen; UC-SC2: -2,4-fach; USSC1: -2,3-fach; USSC2: -1,7-fach). Hingegen wurden sowohl *BSP* (UC-SC1: 7,4-fach, UC-SC2: 3,7-fach; USSC1: 15,1-fach; USSC2: 1,8-fach stärker) als auch das Morphogen *BMP2* (UC-SC1: 4,5-fach, UC-SC2: 2,4-fach; USSC1: 2,2-fach; USSC2: 1,5-fach stärker) in Folge der Überexpression verstärkt exprimiert.

3.4.3 Verändertes Differenzierungspotential

Die Fähigkeit zur Bildung von Adipozyten sowie die chondrogene Differenzierung wurden durch die Überexpression von *OSX* in UC-SC und USSC nicht beeinflusst (Daten werden nicht gezeigt).

Die Überexpression von *OSX* alleine – ohne zusätzliche osteogene Differenzierung – zeigte keinen Einfluss auf die Kalzifizierung der Zellen. Daher wurde der Einfluss des Gens mit Zusatz der Differenzierungsinduktoren analysiert.

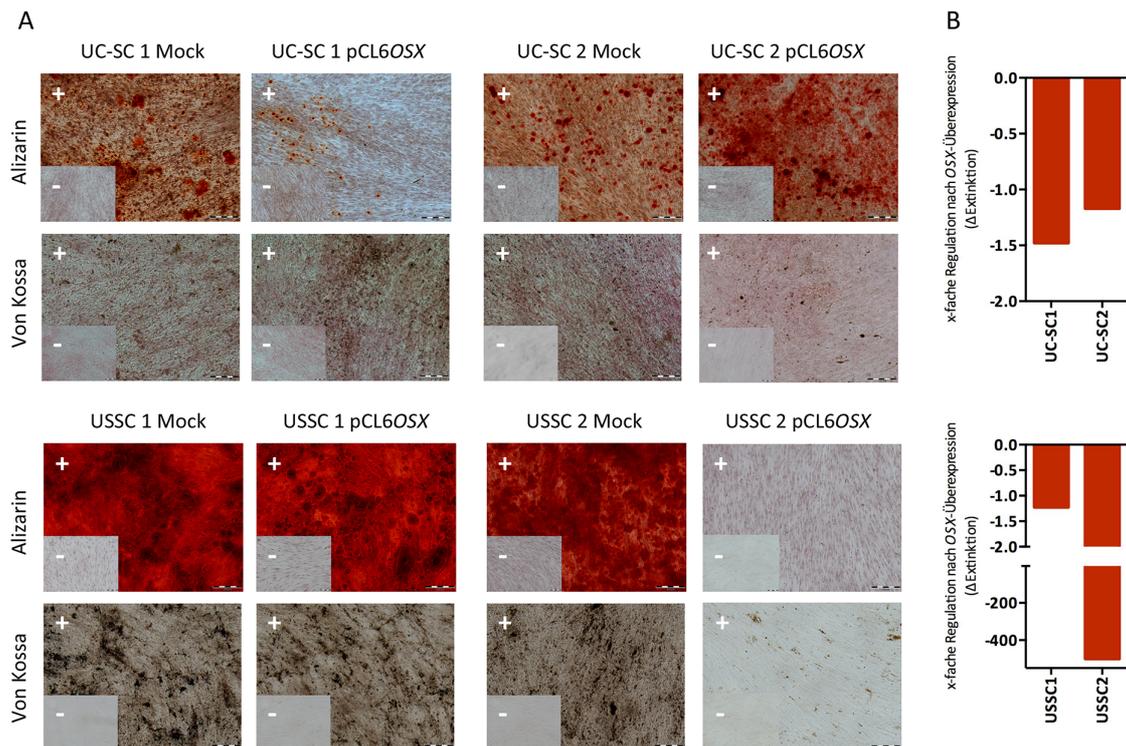


Abbildung 3.18: Osteogenes Differenzierungspotential nach *OSX*-Überexpression.

Einfluss der Überexpression von *OSX* auf das osteogene Differenzierungspotential. Mock bezeichnet die nicht überexprimierten Kontrollzellen. **A:** Alizarin Rot- und von Kossa-Färbungen osteogen differenzierter Zellen (+, Tag 14) und der Negativkontrollen (-). Die rote bzw. braun/schwarze Färbung zeigt Kalziumablagerungen. Der Größenmaßstab entspricht 200µm. **B:** Quantifizierung des gebundenen Alizarin Rot-Farbstoffs nach *OSX*-Überexpression in Relation zu Mock-Kontrollzellen.

OSX: *osterix/transcription factor SP7*.

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, besitzen native USSC, nicht jedoch UC-SC ein osteogenes Potential (Abbildung 3.8). Nach Überexpression von *OSX* und anschließender *in vitro* Differenzierung von UC-SC reduzierte sich selbst die minimale Kalzifizierung, zu der Mock-Kontrollzellen fähig waren. Abbildung 3.18 zeigt die Alizarin Rot und Von Kossa-Färbungen osteogen differenzierter Zellen (A) mit der zugehörigen photometrischen Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs Alizarin Rot (B, UC-SC1: -1,5-fach; UC-SC2: -1,2-fach im Vergleich zu Mock-Kontrollzellen).

Analog zu UC-SC reduzierte sich auch in USSC nach *OSX*-Überexpression die Menge sekretierten Kalziums nach osteogener Differenzierung. Dabei reagierten die untersuchten Zelllinien USSC1 und 2 in unterschiedlichem Ausmaß auf die Überexpression. Während die Zelllinie USSC1 nur eine geringfügige Reduktion des osteogenen Potentials aufwies (Abbildung 3.18 A, -1,2-fach weniger Alizarin Rot Farbstoff als in Mock-Zellen), zeigte die Zelllinie USSC2 nach Überexpression nahezu keine Kalzifizierung mehr (Abbildung 3.18 A, B: -499,8-fach geringer).

Die Überexpression des Transkriptionsfaktors *OSX* führte zu einer Reduktion der Kalziumsekretion nach der osteogenen *in vitro* Differenzierung (Abbildung 3.18). In Korrelation dazu wurde das Gen *RUNX2* durch die Überexpression verringert exprimiert (Abbildung 3.17). Die verstärkte Expression von *BSP* und *BMP2* schien das osteogene Potential nicht positiv zu beeinflussen (Abbildung 3.17).

3.5 Direkte Ko-Kultur von USSC mit anderen Zelltypen: Adaptation des Potentials?

3.5.1 Einfluss der Ko-Kultur auf die HOX-Expression

In den vorhergehenden Kapiteln wurde das Differenzierungspotential der neonatalen Zelltypen aus der Nabelschnur (UC-SC) und dem Nabelschnurblut (USSC und CB-SC) mit dem der adulten Knochenmark-Stromazellen (BM-SC) verglichen. Die genetische Signatur der Zellpopulationen wurde mit besonderem Fokus auf die Prozesse der Knorpel- und Knochenentwicklung verglichen, regulatorische Schlüsselgene wurden definiert. Im folgenden Kapitel wird die Fragestellung behandelt, ob eine gemeinsame Kultivierung von Zellen unterschiedlichen Ursprungs mit direktem Zell-Zell Kontakt (Ko-Kultur) die Genexpression oder das Differenzierungspotential beeinflusst. Besondere Bedeutung hat dabei die Expression von *HOX*-Genen (Abbildung 3.3).

Hintergrund dieser Versuche sind Studien von Leucht und Kollegen, die in der Maus zeigen konnten, dass die Transplantation von *HOX*-negativen Progenitorzellen aus der Mandibel bei Transplantation in einen Defekt der *HOX*-positiven Tibia deren „*HOX*-Code“ adaptierten und auf diese Weise einen Vorteil in der Regeneration von Knochendefekten aufwiesen (81). Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, zeigten die in dieser Arbeit untersuchten Stromazellen Unterschiede in der Expression von *HOX*-Genen. Nur USSC waren *HOX*-negativ, die anderen untersuchten Zelltypen exprimierten *HOX*-Gene. Zur Analyse der Anpassung des *HOX*-Codes wurden daher *green fluorescent protein* (GFP)-markierte USSC mit *HOX*-positiven Zellen gemeinsam kultiviert und nach 16 Stunden oder 5 Tagen mittels Zellsortierung (FACS, Kapitel 2.2.2.8) wieder separiert. Anschließend wurde die veränderte Genexpression mittels RT-PCR und Microarray untersucht und das Differenzierungspotential analysiert.

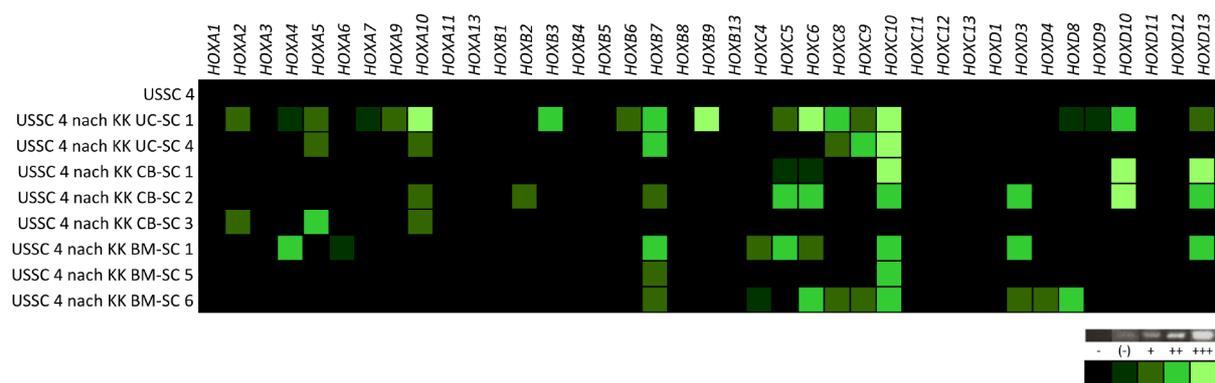


Abbildung 3.19: *HOX*-Genexpression nach Ko-Kultur.

RT-PCR Analyse der Expression der 39 *HOX*-Gene vor und nach direkter Ko-Kultur (5 Tage) von USSC mit *HOX*-positiven Zellen (UC-, CB-, BM-SC). Schwarz: nicht exprimiert (-), grün: exprimiert, die Expressionsstärken werden durch die Farbintensitäten dargestellt ((-, +, ++, +++).

HOX: homeobox, KK: Ko-Kultur.

Die Zelllinie USSC4 wurde gemeinsam mit 2 UC-SC sowie jeweils 3 CB-SC und BM-SC Zelllinien kultiviert. Abbildung 3.19 veranschaulicht die Expression aller 39 *HOX*-Gene in der Zelllinie USSC 4 vor

und nach der direkten Ko-Kultur. In USSC, die zuvor keine *HOX*-Gene exprimierten, wurde nach der gemeinsamen Kultivierung mit *HOX*-positiven Zellen – unabhängig vom Zelltyp – eine *HOX*-Genexpression nachgewiesen. Dabei variierte die Stärke der Expression sowie die Anzahl der nach Ko-Kultur exprimierten *HOX*-Gene zwischen den Zelllinien. *HOXC10* war in USSC nach Ko-Kultur mit allen untersuchten Zelllinien außer der Zelllinie CB-SC3 stark präsent. Aus diesem Grund wurde *HOXC10* zum Proteinnachweis ausgewählt.

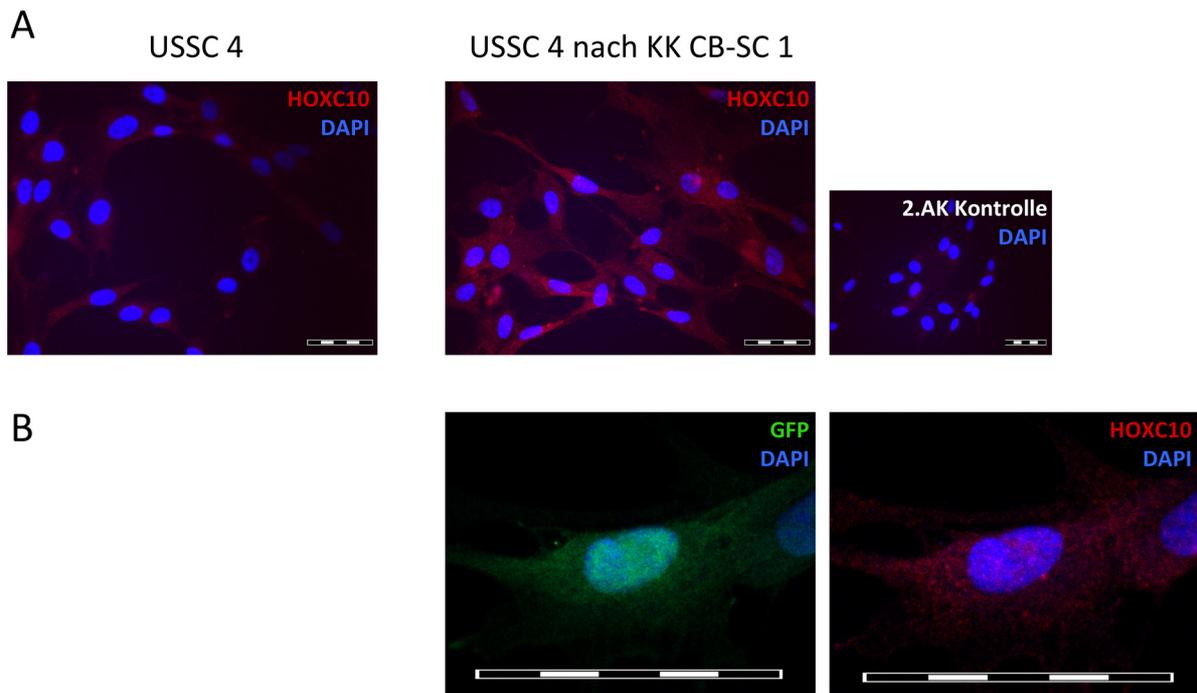


Abbildung 3.20: HOX-Proteinnachweis nach Ko-Kultur.

A: Immunzytochemische Analyse zum exemplarischen Nachweis von *HOXC10* vor und nach direkter Ko-Kultur (5 Tage) der Zelllinien USSC4 und CB-SC1. Als Kontrolle der Spezifität des Zweitantikörpers wurden Zellen verwendet, die ohne Primärantikörper gefärbt wurden. DAPI färbt die Zellkerne blau. **B:** Vergrößerter Bildausschnitt einer einzelnen Zelle zum Nachweis der simultanen Expression von GFP und *HOXC10* nach Ko-Kultur. Zur Verstärkung des GFP-Signals wurde ein anti-GFP Antikörper verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht in allen Aufnahmen 50µm.

HOX: homeobox, KK: Ko-Kultur, AK: Antikörper, *GFP*: green fluorescent protein, DAPI: 4',6-Diamidin-2-Phenylindol.

In Abbildung 3.20 wird exemplarisch die *HOX*-Expression auf Proteinebene anhand von *HOXC10* in der Zelllinie USSC4 nach Ko-Kultur mit CB-SC1 dargestellt. Sowohl in nativen USSC, als auch in der Zweitantikörperkontrolle wurde nur Hintergrundfluoreszenz detektiert. Nach Ko-Kultur wurde *HOXC10* jedoch deutlich nachgewiesen (Abbildung 3.20 A). Um zu gewährleisten, dass die auf mRNA und Proteinebene gezeigte *HOX*-Expression nicht auf eine Kontamination mit *HOX*-positiven Zellen bei der Zellsortierung zurückgeführt werden kann, wurden immunzytochemische Analysen zum Nachweis der simultanen Expression von GFP und *HOXC10* in einer Zelle durchgeführt. Abbildung 3.20 B veranschaulicht dies in der Zelllinie USSC4 nach Ko-Kultur mit CB-SC1. Da nur USSC, nicht jedoch CB-SC mit einem *GFP*-haltigen Plasmid transfiziert wurden (Abbildung A 2), kann die

nachgewiesene Expression von HOX-Genen und -Proteinen nicht durch verschleppte CB-SC sondern durch eine Adaptation der HOX-Expression durch USSC erklärt werden. Im Folgenden wird der Einfluss der Ko-Kultur auf das Differenzierungspotential und die Genexpression von USSC analysiert.

3.5.2 Differentielle Genexpression

Um den Einfluss der direkten Ko-Kultur auf das Genexpressionsprofil, insbesondere in Zusammenhang mit Skeleto-/ Osteogenese, näher zu untersuchen wurden 3 USSC-Zelllinien mit 1 CB-SC Zelllinie für 16 Stunden bzw. 5 Tage ko-kultiviert. Die Genexpression in USSC nach Ko-Kultur sowie in den zugehörigen Kontrollen wurde mittels *Affymetrix PrimeView™ human gene expression Microarrays* analysiert.

Nach statistischer Auswertung (Kapitel 2.2.2.10) der Microarray Genexpressionsanalyse entstand ein Datensatz mit 278 signifikant differentiell exprimierten Genen (Tabelle A 3), Abbildung A 4 zeigt alle Gene, die nach der Ko-Kultur mehr als 2-fach stärker bzw. schwächer exprimiert wurden. Zur Detailanalyse wurden die 278 differentiell exprimierten Gene mittels *DAVID Functional Annotation Cluster Analysis* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) funktionellen Kategorien zugeordnet. Tabelle A 4 listet mit der Achsenausbildung bzw. Knochenentwicklung assoziierte Kategorien (*Annotation Cluster* 9 und 29) auf.

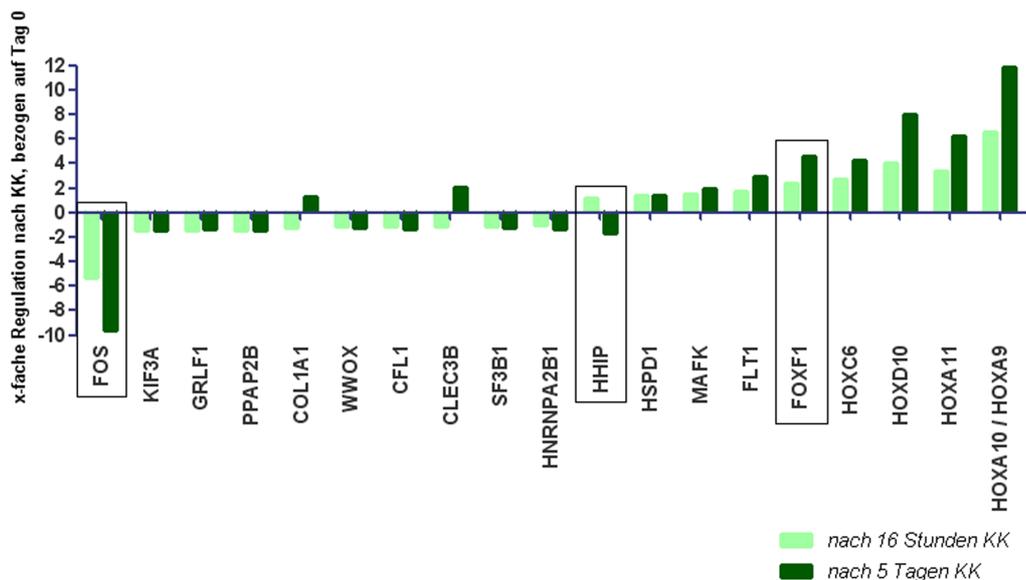


Abbildung 3.21: Microarray Genexpressionsanalyse nach Ko-Kultur: Knochen-assoziierte Gene.

Einfluss der direkten Ko-Kultur (16 Stunden bzw. 5 Tage) mit CB-SC auf die Genexpression der USSC. Dargestellt sind alle Gene, die nach DAVID-Analyse einen biologischen Zusammenhang zur Knochenentwicklung aufweisen (Cluster 9 und 29, Tabelle A 4). Falls für ein Gen mehrere Sonden vorhanden waren, wurde der Mittelwert gebildet. Eingerahmt sind Gene, die im Folgenden näher betrachtet werden.

KK: Ko-Kultur, verwendete Zelllinien: USSC2, 3 und 4; CB-SC 1. *CFL1*: *cofilin 1 (non-muscle)*; *CLEC3B*: *C-type lectin domain family 3, member B*; *COL1A1*: *collagen, type I, alpha 1*; *FLT1*: *fms-related tyrosine kinase 1*; *FOS*: *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*; *FOXF1*: *forkhead box F1*; *GRLF1*: *glucocorticoid receptor DNA binding factor 1*; *HHIP*: *hedgehog interacting protein*; *HNRNPA2B1*: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1*; *HOXA9/10/11*: *homeobox A9/10/11*; *HOXC6*: *homeobox C6*; *HOXD10*: *homeobox D10*; *HSPD1*: *heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)*; *KIF3A*: *kinesin family member 3A*; *MAFK*: *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (avian)*; *PPAP2B*: *phosphatidic acid phosphatase type 2B*; *SF3B1*: *splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa*; *WWOX*: *WW domain containing oxidoreductase*.

Unter den in Abbildung 3.21 dargestellten Genen, die in USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC reguliert wurden und die mit dem Prozess der Skeletogenese assoziiert sind, wurden jeweils 8 Gene sowohl nach 16 Stunden als auch nach 5 Tagen geringer bzw. stärker exprimiert als in USSC vor Ko-Kultur. 3 Gene wurden nach 16 Stunden Ko-Kultur hoch und nach 5 Tagen Ko-Kultur runter reguliert oder umgekehrt. Nach Literaturrecherche wurden einige dieser Gene zur näheren Analyse ausgewählt (eingerahmt in Abbildung 3.21, *FOS*: 16 Std. KK: -5,3-fach geringer als in Tag 0, 5 Tage KK: -9,6-fach; *HHIP*: 16 Std. KK: +1,2-fach, 5 Tage KK: -1,7-fach; *FOXF1*: 16 Std. KK: +2,4-fach, 5 Tage KK: +4,6-fach).

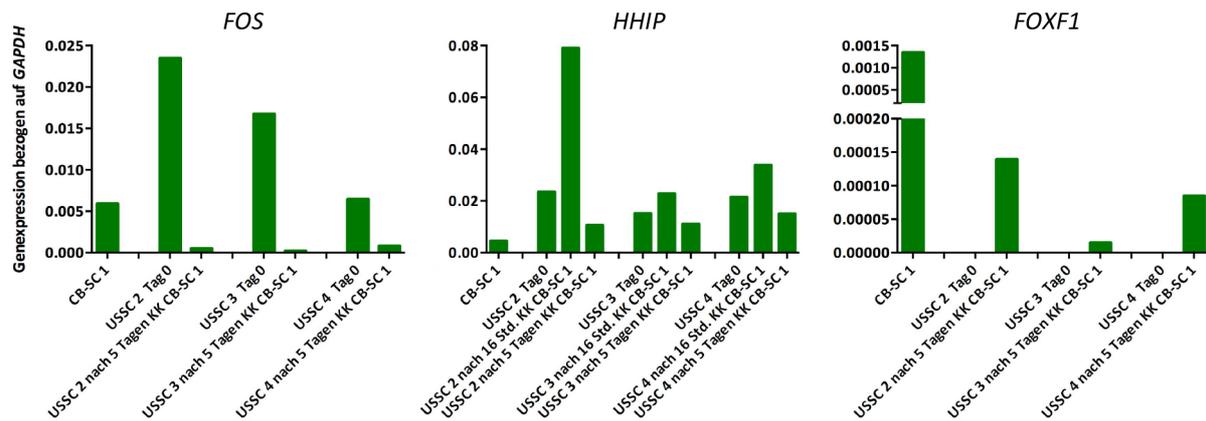


Abbildung 3.22: Bestätigung der Microarray Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR.

3 USSC Zelllinien wurden mit einer CB-SC Zelllinie für 16 Stunden bzw. 5 Tage ko-kultiviert, anschließend wurde der Einfluss auf die Genexpression der USSC mittels qRT-PCR untersucht. *GAPDH* wurde als *housekeeping* Gen verwendet.

KK: Ko-Kultur, *GAPDH*: glycerinaldehyd-3-phosphate-dehydrogenase, *FOS*: V-FOS *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*, *HHIP*: hedgehog-interacting protein, *FOXF1*: forkhead box F1.

Zur Bestätigung der Microarray Genexpressionsanalysen (Abbildung 3.21) wurde die Expression der Gene *FOS*, *HHIP* und *FOXF1* mittels qRT-PCR in mit CB-SC ko-kultivierten USSC untersucht (Abbildung 3.22). Die Expression aller 3 Gene bestätigt die Microarray Analysen. *FOS* wurde in USSC vor Ko-Kultur stärker exprimiert als in CB-SC (Genexpression bezogen auf *GAPDH*: CB-SC1: 5,9 E-3; USSC2: 2,3 E-2; USSC3: 1,7 E-2; USSC4: 6,4 E-3), nach 5 Tagen Ko-Kultur wurde nur noch eine geringe Expression detektiert (USSC2: 5,1 E-4; USSC3: 2,1 E-4; USSC4: 7,9 E-4). *HHIP* zeigte in USSC an Tag 0 ebenfalls eine stärkere Expression als in CB-SC (CB-SC: 4,5 E-3; USSC2: 2,3 E-2; USSC3: 1,5 E-2; USSC4: 2,1 E-2), die zudem nach 16 Stunden Ko-Kultur in allen USSC-Zelllinien anstieg (USSC2: 7,9 E-2; USSC3: 2,3 E-2; USSC4: 3,4 E-2). Nach 5 Tagen Ko-Kultur reduzierte sich die Expression von *HHIP* wieder (USSC2: 1,1 E-2; USSC3: 1,1 E-2; USSC4: 1,5 E-2). Für *FOXF1* dagegen wurde die stärkste Expression in CB-SC detektiert (1,3 E-3), USSC exprimierten das Gen vor Ko-Kultur nicht. Nach 5 Tagen Ko-Kultur mit CB-SC wurde auch in USSC eine Expression nachgewiesen (USSC2: 1,4 E-4; USSC3: 1,5 E-5; USSC4: 8,5 E-5).

Nach der Untersuchung des Einflusses der Ko-Kultur auf die Genexpression in USSC wird im Folgenden das Differenzierungspotential analysiert.

3.5.3 Verändertes Differenzierungspotential

3.5.3.1 Adipogene Differenzierung

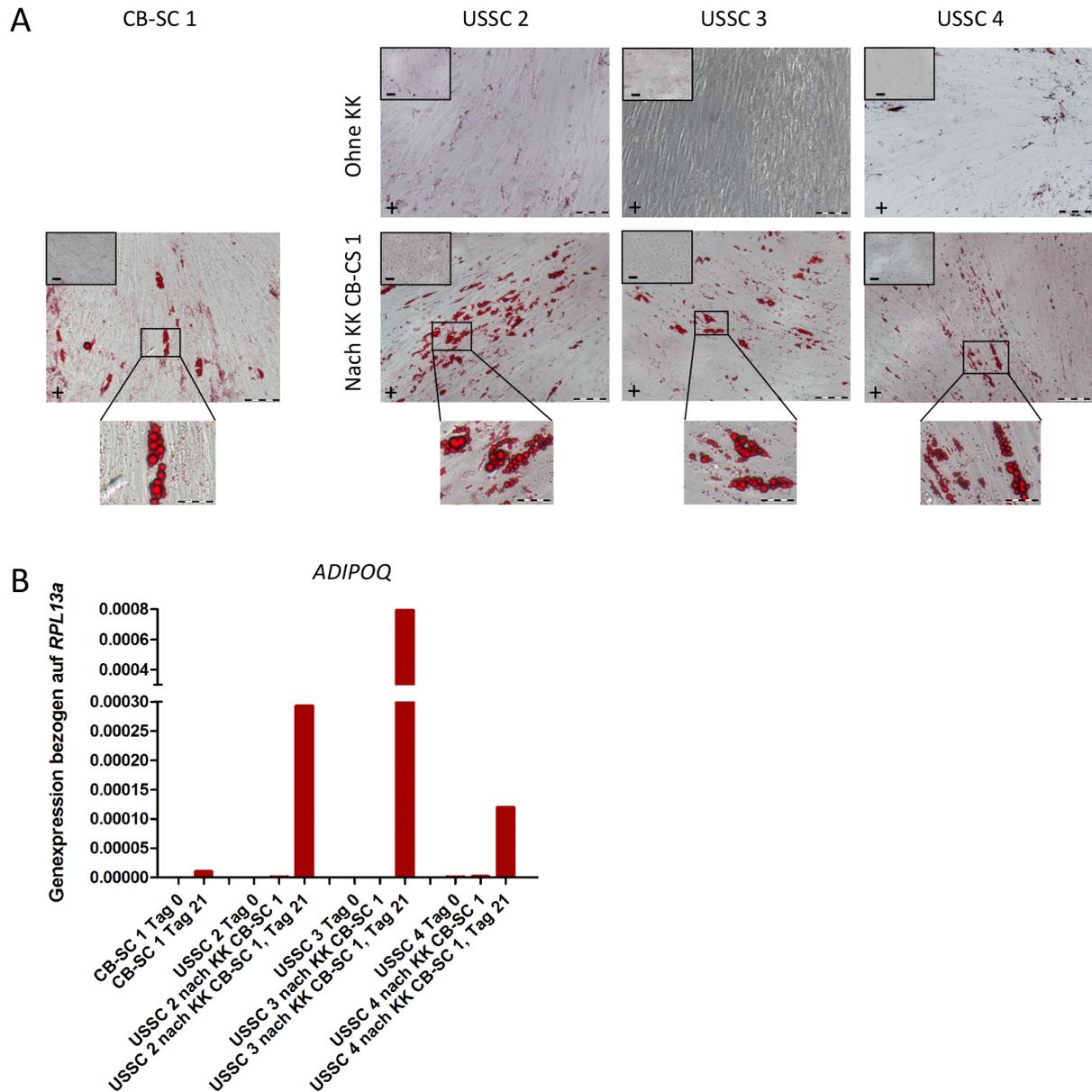


Abbildung 3.23: Adipogenes Differenzierungspotential von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC.

3 USSC-Zelllinien wurden mit bzw. ohne vorhergehende Ko-Kultur mit CB-SC (5 Tage) adipogen differenziert. Nach der Ko-Kultur wurden die USSC für eine Passage weiterkultiviert und anschließend zur Differenzierung induziert. **A:** *Oil Red O* Färbungen von Lipidvakuolen in adipogen differenzierten Zellen (+, Tag 21) und den Negativkontrollen (-). Der Größenmaßstab entspricht 100µm bzw. 25µm in den vergrößerten Bildausschnitten. **B:** QRT-PCR Analyse von *ADIPOQ* in nativen (Tag 0), ko-kultivierten sowie adipogen differenzierten (Tag 21) Zellen. *RPL13a* wurde als *housekeeping* Gen verwendet.

KK: Ko-Kultur, *RPL13a*: human ribosomal protein L13a, *ADIPOQ*: adipocyte-, C1q, and collagen domain-containing/adiponectin.

Nach Ko-Kultur von USSC mit CB-SC wurde das Differenzierungspotential zu Adipozyten untersucht. Durch *Oil Red O* angefärbte Fettvakuolen wurden in CB-SC, nicht jedoch in nativen USSC detektiert

(Abbildung 3.4 A, Abbildung 3.23 A). Nach Ko-Kultur mit CB-SC hingegen differenzierten USSC adipogen und bildeten Fettvakuolen aus. Zur Bestätigung der Differenzierung wurde die Expression des Adipozyten-spezifischen Hormons *ADIPOQ* analysiert (Abbildung 3.23 B). Undifferenziert exprimierten weder USSC noch CB-SC *ADIPOQ*. Nach Ko-Kultur und anschließender adipogener Differenzierung exprimierten USSC höhere Level von *ADIPOQ* als differenzierte CB-SC (Expression bezogen auf RPL13a, CB-SC Tag 21: $1,0 \text{ E-}5$; USSC2 nach KK Tag 21: $2,9 \text{ E-}4$; USSC3 nach KK Tag 21: $7,9 \text{ E-}4$; USSC4 nach KK Tag 21: $1,2 \text{ E-}4$).

3.5.3.2 Chondrogene Differenzierung

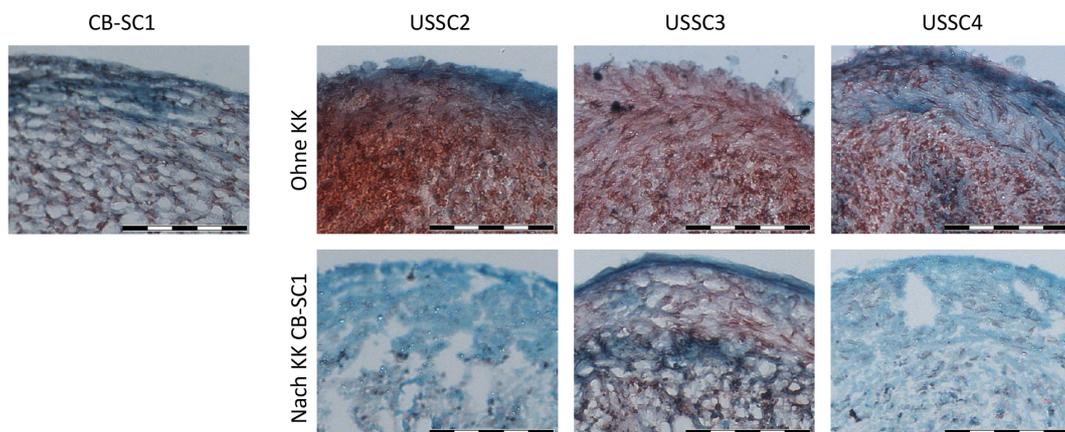


Abbildung 3.24: Chondrogenes Differenzierungspotential von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC.

USSC wurden mit bzw. ohne vorhergehende Ko-Kultur mit CB-SC (5 Tage) chondrogen differenziert. Nach der Ko-Kultur wurden die USSC für eine Passage weiterkultiviert und anschließend zur Differenzierung induziert. Dargestellt wird die Safranin O-Färbung von Schnitten differenzierter Pellets (Tag 21). Die rötliche Färbung zeigt Proteoglykane in der extrazellulären Matrix. Der Größenmaßstab entspricht $100\mu\text{m}$.

KK: Ko-Kultur.

Zur Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotentials von USSC nach Ko-Kultur wurde eine *in vitro* Pelletkultur durchgeführt. In Kryoschnitten der zur Ko-Kultur genutzten Zelllinie CB-SC1 wurden in geringem Ausmaß Proteoglykane rötlich angefärbt, außerdem wiesen die Pellets eine relativ lockere Struktur auf (Abbildung 3.24). Im Gegensatz dazu zeigten die Schnitte der 3 USSC Zelllinien vor Ko-Kultur eine dichter kondensierte Struktur und deutlich mehr angefärbte Proteoglykane. Nach der Ko-Kultur wurden nur noch in Schnitten der Zelllinie USSC3 Proteoglykane angefärbt, in den Zelllinien USSC2 und 4 hingegen wurde keine rötliche Färbung detektiert. Zudem zeigten die Schnitte der USSC-Pellets nach Ko-Kultur eine weniger kondensierte Struktur, vergleichbar mit der der CB-SC1.

3.5.3.3 Osteogene Differenzierung

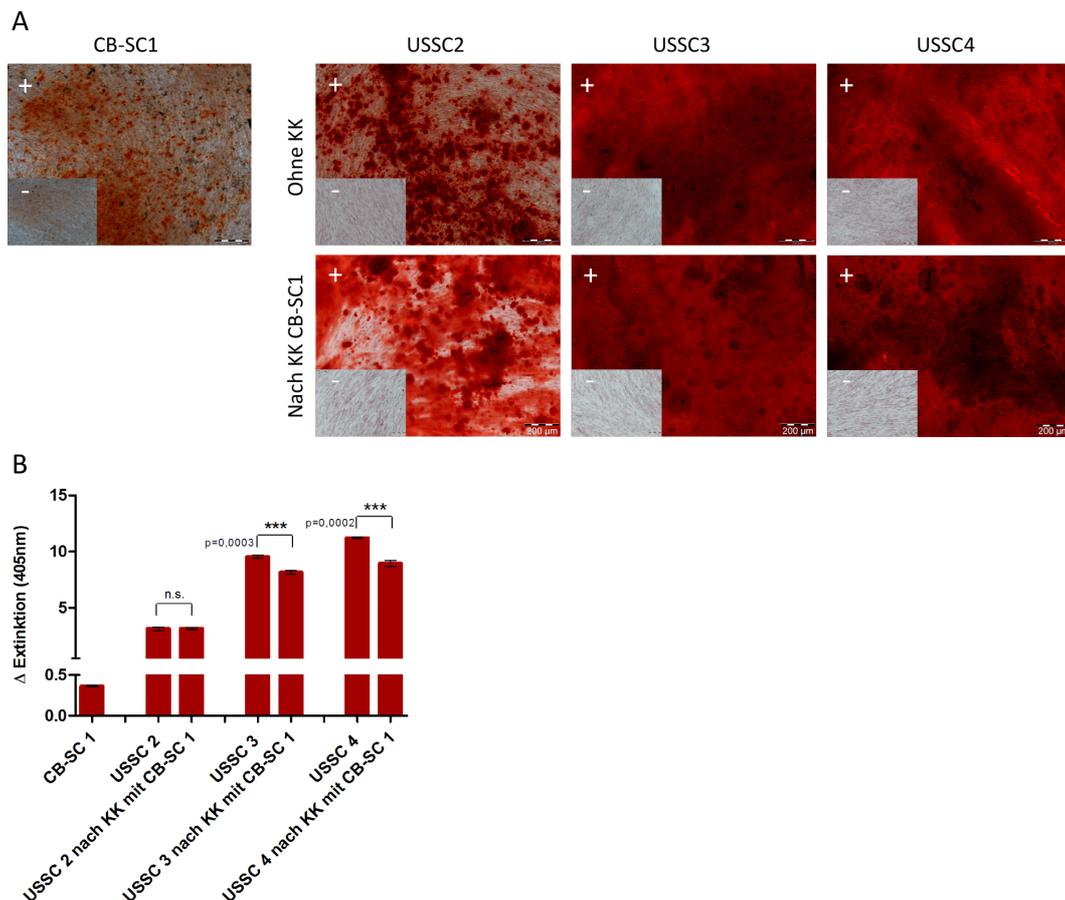


Abbildung 3.25: Osteogenes Differenzierungspotential von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC.

USSC wurden mit bzw. ohne vorhergehende Ko-Kultur mit CB-SC (5 Tage) osteogen differenziert. Nach der Ko-Kultur wurden die USSC für eine Passage weiterkultiviert und anschließend zur Differenzierung induziert. **A:** Alizarin Rot Färbungen in differenzierten Zellen (+, Tag 14) und den Negativkontrollen (-). Die rote Färbung zeigt Kalziumablagerungen. Der Größenmaßstab entspricht 200 μ m. **B:** Quantifizierung des gebundenen Alizarin Rot-Farbstoffs. Statistik: ungepaarter t-Test.

KK: Ko-Kultur, ***: extrem signifikant, n.s.: nicht signifikant.

Abbildung 3.25 zeigt den Einfluss der Ko-Kultur auf das Potential von USSC, Osteoblasten zu bilden. Wie bereits in Abbildung 3.8 veranschaulicht, zeigten CB-SC ein weniger starkes osteogenes *in vitro* Differenzierungspotential als USSC. Die Quantifizierung des an die kalzifizierte Matrix gebundenen Farbstoffs Alizarin Rot verdeutlichte die reduzierte Kalzifizierung in den Zelllinien USSC3 und 4 nach Ko-Kultur mit CB-SC (Abbildung 3.25 B). Die Zelllinie USSC2 zeigte bereits vor Ko-Kultur ein im Vergleich zu den anderen Zelllinien geringeres osteogenes Differenzierungspotential, das durch die Ko-Kultur nicht beeinflusst wurde.

Die direkte Ko-Kultur von *HOX*-negativen USSC mit *HOX*-positiven Zelltypen führte zur Expression von *HOX*-Genen (Abbildung 3.19) und -Proteinen (Abbildung 3.20) in USSC. Auch die Expression anderer Gene (z.B. *FOS*, *HHIP* und *FOXF1*, Abbildung 3.22) wurde durch die Ko-Kultur beeinflusst. Bezüglich ihres Differenzierungsvermögens passten sich USSC durch die Ko-Kultur der CB-SC Zelllinie an: Zuvor

nicht zur adipogenen Differenzierung fähige USSC bildeten nach Ko-Kultur und adipogener Induktion Adipozyten und exprimierten *ADIPOQ* (Abbildung 3.23). Nach Ko-Kultur und chondrogener Differenzierung bildeten USSC Pellets, in denen vergleichbar zur ko-kultivierten Zelllinie CB-SC1 weniger oder keine Proteoglykane nachgewiesen wurden (Abbildung 3.24). Auch in osteogenen Differenzierungsassays zeigten USSC eine Adaptation des Potentials von CB-SC. USSC, die ohne Ko-Kultur eine stark kalzifizierte Matrix ausbildeten, wiesen nach Ko-Kultur mit CB-SC ein reduziertes *in vitro* Kalzifizierungspotential auf (Abbildung 3.25).

4 Diskussion

4.1 Proliferationspotential, Immunphänotyp und *HOX*-Genexpression

Stromazellen aus Nabelschnur (UC-SC), Nabelschnurblut (USSC, CB-SC) und Knochenmark (BM-SC) wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens sowie der Expression von Oberflächenantigenen und *HOX*-Genen verglichen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stromazelltypen wiesen eine vergleichbare, spindelförmige Zellmorphologie auf (Abbildung 3.1 A). UC-SC zeigten ein stärkeres Proliferationspotential als USSC und CB-SC, die ein in etwa gleich starkes Wachstumsmaximum aufwiesen. BM-SC besaßen das geringste Wachstumsvermögen (Abbildung 3.1 B). Kulturen von BM-SC wiesen eine im Vergleich zu den neonatalen Zellpopulationen erhöhte Anzahl seneszenter Zellen auf (92), was in ihrer Herkunft aus einem adulten Gewebe begründet liegt und eine mögliche Erklärung für das geringere *in vitro* Proliferationspotential darstellt.

Zur weitergehenden Charakterisierung der Zellpopulationen wurde der Immunphänotyp mittels durchflusszytometrischer Analysen bestimmt. CD31 wurde als charakteristischer Marker für Endothelzellen, CD45 für Leukozyten sowie CD326 und Cytokeratin für Epithelzellen genutzt. Weder UC-SC, noch USSC, CB-SC oder BM-SC exprimierten eines dieser Antigene (Abbildung 3.2 B) und bilden demnach keinen endothelialen, leukozytären oder epithelialen Phänotyp aus. Außerdem kann eine durch die Zellisolation entstandene Kontamination der Stromazellpopulationen mit den genannten Zellen ausgeschlossen werden. Die *International Society for Cellular Therapy* definierte die Präsenz der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 – neben Plastikadhärenz und *in vitro* Differenzierungspotential – als Minimalkriterien mesenchymaler Stromazellen (85). Die genannten Marker wurden von allen untersuchten Zelltypen exprimiert (Abbildung 3.2 A).

Sacchetti und Kollegen beschrieben CD146 (MCAM) als Marker für Perizyten (subendotheliale Zellen) (15). Die starke Expression von CD146 wurde von Stromazellen aus dem Knochenmark geteilt, die *in vivo* heterotop Knochen bilden und Haematopoese induzieren konnten. Daher wird vermutet, dass BM-SC *in situ* als Perizyten fungieren (15, 19). Im Gegensatz dazu wurde CD146 von Zellen, die *in vivo* zwar heterotop Knochen aber kein haematopoetisches System bilden konnten, nicht exprimiert (15). In dieser Arbeit zeigte CD146 deutliche Expressionsunterschiede in den verschiedenen Zelltypen. Wie von Sacchetti *et al.* beschrieben, wiesen BM-SC eine starke Expression von CD146 auf. USSC zeigten die geringste Expression, gefolgt von UC-SC/CB-SC (Abbildung 3.2 B). In Übereinstimmung mit der Studie von Sacchetti wurde die Fähigkeit der Zelltypen aus Nabelschnurblut und Nabelschnur *in vivo* Knochen zu bilden und haematopoetische Zellen zu rekrutieren bislang nicht nachgewiesen (Kapitel 1.1.1, (14)). Eine weitere Studie beschrieb für klonale BM-SC einen Zusammenhang zwischen dem Level der CD146-Expression und dem

Differenzierungspotential (93). Klone, die adipo-, chondro- und osteogen differenzierten, exprimierten stärkere Level von CD146 als unipotente Klone. Die Studie von Russell und Kollegen passt nur zum Teil zu den Ergebnissen dieser Arbeit. BM-SC exprimierten starke Level von CD146 und waren zur Fett-, Knorpel- und Knochendifferenzierung fähig (Abbildung 3.4 bis Abbildung 3.9). UC-SC differenzierten *in vitro* in keine dieser Richtungen, exprimierten jedoch stärkere Level von CD146 als USSC, die chondro- und osteogen differenzierten und zeigten die gleiche Expressionsstärke wie CB-SC, die adipo-, chondro- und begrenzt osteogen differenzierten. Die Ergebnisse der *in vitro* Differenzierungen und der Expression von CD146 der vorliegenden Arbeit stimmen mit *in vivo* Studien von Kaltz *et al.* überein, bei denen Stromazellen aus der Nabelschnurvene CD146 exprimierten, jedoch keinen Knochen oder Adipozyten bildeten (32, 94).

Während der Knochenentwicklung wird das Oberflächenantigen CD56 (NCAM) von Zellen der mesenchymalen Kondensation exprimiert (Kapitel 1.2.1.1). Außerdem wurde CD56 unter anderem auf Satellitenzellen des Muskels (95) nachgewiesen. In dieser Arbeit war CD56 nur auf UC-SC präsent (Abbildung 3.2 B). Um den möglichen Zusammenhang zur Fähigkeit der Bildung von Muskelzellen zu untersuchen, wurden myogene *in vitro* Differenzierungen durchgeführt (Daten nicht dargestellt, siehe *supplementary material* in (96)). Dabei bildeten UC-SC – wie auch USSC, CB- und BM-SC – keine für skeletale Muskelzellen charakteristische Morphologie oder Genexpression aus.

Als Fibroblasten werden Zellen des Bindegewebes mesenchymalen Ursprungs bezeichnet, die in verschiedenen Geweben (u.a. Haut, Muskel) vorkommen. Da sowohl Stromazellen aus der Nabelschnur (UC-SC) als auch Fibroblasten kein oder nur ein begrenztes Differenzierungspotential aufwiesen (Abbildung 3.4 bis Abbildung 3.9 und (96)), wurde die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker zur Abgrenzung dieser beiden Zelltypen genutzt. CD56 und CD146 können zur immunphänotypischen Unterscheidung von UC-SC (CD56⁺, CD146⁺⁺) und Fibroblasten (CD56⁻, CD146⁻ für Fibroblasten aus der Vorhaut) verwendet werden.

Durch unterschiedliche räumliche und zeitliche Expression sind die Transkriptionsfaktoren der *HOX*-Genfamilie an der anterior/posterioren Achsenfestlegung während der Embryonalentwicklung beteiligt (97). So werden die *HOX*-Gene mit niedriger Nummerierung (z.B. *HOXB1*) während der Entwicklung früher und stärker anterior exprimiert als die Gene mit höherer Nummerierung (z.B. *HOXB9*) (98). Neben der anterior/posterioren Achse regulieren *HOX*-Gene u.a. auch die Musterbildung bei der Gliedmaßenentwicklung (99). Das embryonale Expressionsmuster der *HOX*-Gene bleibt auch in adulten Zellen als „positionelle Identität“ erhalten (98) und ist charakteristisch für den anatomischen Ursprung der Zelle (100). In der vorliegenden Arbeit wurde das *HOX*-Expressionsmuster in Stromazellen unterschiedlicher anatomischer Herkunft verglichen. UC-SC aus der Nabelschnur und BM-SC aus dem Knochenmark exprimierten je nach Zelllinie etwa 20 bis 30 der 39 humanen *HOX*-Gene. Die Zelltypen aus dem Nabelschnurblut unterschieden sich hinsichtlich der *HOX*-Genexpression: USSC waren negativ, CB-SC für etwa 20 bis 30 *HOX*-Gene positiv (Abbildung 3.3 und (29)). Obwohl beide Zelltypen aus dem Nabelschnurblut isoliert werden können, stammen sie vermutlich aus unterschiedlichen embryonalen Geweben. Ein möglicher Ursprungsort von USSC ist die fetale Leber, die hauptsächlich *HOX*-negativ ist (Daten nicht dargestellt) und deren Muster der

Cytokinsekretion zur Regulation haematopoetischer Stammzellen dem der USSC ähnelt ((30), (101) für murine fetale Leber).

4.2 Differenzierungen

4.2.1 *In vitro* und *in vivo* Differenzierungsassays

Um das regenerative Potential einer Zellpopulation, den Einfluss von Wachstumsfaktoren oder intrazelluläre Signalwege im humanen System zu analysieren sind für viele Forscher *in vitro* Differenzierungsassays das Mittel der Wahl. Bei der Auswertung der Resultate ist jedoch gerade in Bezug auf osteogene Differenzierungsassays zu beachten, dass die Komplexität der Knochenstruktur aus verschiedenen Zelltypen, Knochenmark und Vaskularisierung nur in Ansätzen durch ein *in vitro* Protokoll simuliert werden kann (102). Außerdem werden die *in vitro* analysierten Zellen unphysiologischen Konzentrationen von Wachstumsfaktoren ausgesetzt, sodass häufig *in vivo* und *in vitro* Differenzierungsassays einer Zelllinie nicht zu den gleichen Resultaten führen (102, 103). Da jedoch *in vivo* Studien am Tiermodell nicht für jedes Labor möglich sind, sollten *in vitro* Differenzierungsassays nach Standardprotokollen durchgeführt, kritisch ausgewertet, durch die Analyse der Genexpression ergänzt und als Vorarbeiten zu *in vivo* Assays betrachtet werden.

4.2.2 Fehlendes Differenzierungspotential von UC-SC

UC-SC waren nicht zur adipogenen *in vitro* Differenzierung fähig, was durch *Oil Red O* Färbung von Lipidvakuolen und RT-PCR Analysen relevanter Marker belegt wurde (Abbildung 3.4).

Safranin O Färbungen und qRT-PCR Analysen von *SOX9* wiesen die fehlende Fähigkeit von UC-SC nach, *in vitro* in chondrogene Richtung zu differenzieren und eine extrazelluläre Knorpelmatrix zu sezernieren (Abbildung 3.6). Der Transkriptionsfaktor *SOX9* ist ein essentieller Initiator der frühen Chondrogenese (Abbildung 1.2) (104). UC-SC exprimierten in undifferenziertem Zustand ein geringes Level von *SOX9* (Abbildung 3.6 A), das jedoch zur Induktion der chondrogenen Differenzierung nicht ausreichte. Auch durch Zusatz des TGF β 1-haltigen Induktionsmediums und durch die Differenzierung in dreidimensionaler Pelletkultur wurde die Expression von *SOX9* nicht verstärkt. Der Farbstoff Safranin O färbt Proteoglykane in der extrazellulären Knorpelmatrix rot/violett an, wobei durch die Intensität der Färbung auf den Gehalt an Proteoglykanen rückgeschlossen werden kann (87). In Kryoschnitten chondrogen differenzierter UC-SC-Pellets wurden nur in geringem Ausmaß Proteoglykane angefärbt (Abbildung 3.6 B).

Alizarin Rot- und Von Kossa-Färbungen von Kalzium- bzw. Phosphatablagerungen in Kombination mit Genexpressionsanalysen wurden zum Nachweis der *in vitro* Knochendifferenzierung durchgeführt. Stromazellen aus der Nabelschnur zeigten nur eine minimale Kalzifizierung (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9). Für die Gene *BSP*, *OSX* und *BMP2* wurde in undifferenzierten Zellen und nach *in vitro* Differenzierung nur ein geringes Expressionsniveau detektiert (Abbildung 3.10). Die Gene *BMP4* und *OC* waren in undifferenzierten UC-SC nachweisbar und wurden nach Induktion der Differenzierung geringer exprimiert. Das Expressionslevel dieser Gene schien jedoch zur Initiierung einer osteogenen Differenzierung nicht auszureichen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof.

Paolo Bianco (La Sapienza Universität Rom, Daten nicht dargestellt, persönliche Mitteilung) wurde das fehlende Differenzierungspotential der UC-SC mittels *in vivo* subkutaner Transplantationsassays bestätigt.

Wie bereits in Kapitel 1.1.1.1 erläutert, sind die Veröffentlichungen zum Differenzierungspotential von UC-SC kontrovers. Secco *et al.* beschrieben für UC-SC, die mittels enzymatischem Verdau aus der Nabelschnur gewonnen wurden, die Fähigkeit, *in vitro* adipo-, chondro- und osteogen zu differenzieren (34). Hingegen verwendeten Sudo und Kollegen kommerziell erhältliche UC-SC, deren Isolationsprotokoll nicht beschrieben wurde, und zeigten ein im Vergleich zu anderen Zellpopulationen reduziertes adipo- und chondrogenes sowie ein nicht vorhandenes osteogenes *in vitro* Potential (39). Eine weitere Studie verdeutlicht die Problematik der Vergleichbarkeit von *in vitro* und *in vivo* Experimenten. Die Gruppe um Nikolas Kaltz beschrieb für *umbilical vein stromal cells*, die durch enzymatischen Verdau gewonnen wurden, ein reduziertes Potential *in vitro* Adipozyten und Osteoblasten zu bilden sowie ein fehlendes chondrogenes Potential. Nach subkutaner Implantation in Mäuse bildeten die Zellen jedoch keine heterotope Ossikel, besaßen also kein osteogenes Potential (32). In der vorliegenden Arbeit wurden UC-SC ohne enzymatischen Verdau isoliert (Kapitel 2.2.1.1), mittels *in vitro* Differenzierungsassays und Genexpressionsanalysen wurde kein adipo-, chondro-, oder osteogenes Potential aufgezeigt. Dies wurde *in vivo* durch Arbeiten von Kooperationspartnern bestätigt.

Diese kontroversen Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz der Verwendung vergleichbarer Isolationsprotokolle sowie stringenter Differenzierungsassays zum Nachweis der Multipotenz einer Zellpopulation. Zukünftige Analysen müssen zeigen, ob es sich bei den in der Literatur als „UC-SC“ oder „UC-MSC“ beschriebenen Zellen immer um die gleiche Zellpopulation handelt oder ob in Abhängigkeit vom Isolationsprotokoll (mit bzw. ohne enzymatischen Verdau) verschiedene Zelltypen gewonnen werden, die ein unterschiedliches Differenzierungsvermögen aufweisen.

4.2.3 Adipo- und chondrogenes Potential von USSC, CB- und BM-SC

USSC waren im Gegensatz zu CB- und BM-SC nicht zur adipogenen *in vitro* Differenzierung fähig, was durch *Oil Red O* Färbung von Lipidvakuolen und RT-PCR Analysen relevanter Marker belegt wurde (28) (Abbildung 3.4). Das Gen *DLK1*, das in USSC exprimiert wird, in CB-SC jedoch nicht vorhanden ist, wurde als ein möglicher Regulator des fehlenden adipogenen Potentials von USSC beschrieben (28). Neuere Studien zeigten jedoch, dass USSC die als adipogener Inhibitor wirksame, lösliche Form von *DLK1* nicht sekretieren, daher kann eine direkte Regulation der adipogenen Differenzierung durch *DLK1* ausgeschlossen werden (30).

Wie durch Safranin O Färbung und qRT-PCR Analyse von *SOX9* veranschaulicht, besaßen USSC, CB- und BM-SC *in vitro* die Fähigkeit zur Bildung einer extrazellulären Knorpelmatrix (Abbildung 3.6). USSC und CB-SC exprimierten ein basales Level des chondrogenen Transkriptionsfaktors *SOX9*, das durch die *in vitro* Differenzierung zusätzlich erhöht wurde (Abbildung 3.6 A). BM-SC zeigten undifferenziert die stärkste Expression von *SOX9*, die sich durch die Induktion der Differenzierung nicht verstärkte. Durch die Expression dieses essentiellen Regulators der Chondrogenese zeigt sich, dass BM-SC – mutmaßlich bedingt durch ihren anatomischen Ursprung und ihre physiologische

Funktion – auf die chondrogene Differenzierung vorgeprägt sind. Dieses „*lineage priming*“ wiesen auch Delorme und Kollegen für BM-SC nach, die ebenfalls bereits vor Differenzierung *SOX9*-positiv waren (105).

Kryoschnitte von USSC-, CB-SC- und BM-SC-Pellets waren nach Safranin O-Färbung deutlich rot oder violett gefärbt (Abbildung 3.6 B), sie wiesen demnach einen hohen Gehalt an Proteoglykanen auf. Besonders im Randbereich der Schnitte der USSC- und CB-SC-Pellets wurden Proteoglykane angefärbt, was vermuten lässt, dass die induzierenden Agenzien des Differenzierungsmediums in die Randbereiche der Pellets diffundierten und dort die Sekretion der extrazellulären Knorpelmatrix induzierten. Die Schnitte der BM-SC-Pellets zeigten eine gleichmäßige Proteoglykanverteilung, was die oben genannte Hypothese unterstützt, dass Stromazellen aus dem Knochenmark ein intrinsisches chondrogenes Differenzierungspotential besitzen, das nicht allein durch das Differenzierungsmedium induziert wird.

4.2.4 Osteogenes Potential von USSC, CB- und BM-SC

Die *in vitro* Knochendifferenzierung wurde zum einen durch Anfärben von Kalzium- oder Phosphatablagerungen in der sekretierten extrazellulären Matrix und zum anderen durch Expressionsanalysen knochenspezifischer Gene nachgewiesen. Dabei wurden die relevanten Marker in undifferenzierten Zellen zur Analyse des intrinsischen Potentials sowie während und am Ende der Differenzierung zur Untersuchung der Regulationsmechanismen analysiert.

4.2.4.1 Variabilität der BM-SC

Im Gegensatz zu den neonatalen Stromazellen wiesen BM-SC eine größere biologische Variabilität auf. So zeigten BM-SC bezüglich der Expression der *HOX*-Gene (Abbildung 3.3) und der Microarray Genexpressionsanalyse (Abbildung 3.11 A) die geringste Konstanz zwischen den untersuchten Zelllinien auf. Das osteogene *in vitro* Differenzierungsvermögen reduzierte sich mit zunehmendem Alter des Knochenmarkspenders deutlich (Abbildung 3.7). Dies wird durch die Studie von Mendes und Kollegen bestätigt, die mit steigendem Alter des Knochenmarkspenders eine signifikant geringere Frequenz der *in vivo* Knochenformation in Mäusen nach subkutaner Transplantation der BM-SC detektierten (106).

Stromazellen aus dem Knochenmark galten bisher als Gold-Standard bei der Verwendung in Knochen-regenerativen Anwendungen (14), jedoch muss vor allem bei autologen Zellen älterer Spender das verringerte osteogene Potential beachtet werden. In diesem Punkt besitzen die biologisch jüngeren Stromazellen aus dem Nabelschnurblut einen Vorteil.

4.2.4.2 Regulation der osteogenen Differenzierung

Durch detaillierte Expressionsanalysen mittels Microarray und quantitativer RT-PCR wurden mit der Knochenbildung assoziierte Genexpressionssignaturen erstellt. Dazu wurden undifferenzierte USSC, CB- und BM-SC untersucht, um eine Aussage über das den Zellen innewohnende Potential treffen zu können (vergleiche (105)).

Microarray Expressionsanalysen zeigten eine größere Übereinstimmung der Genexpression zwischen USSC und CB-SC im Vergleich zu BM-SC (Abbildung 3.11 B), was die gemeinsame Zellquelle

Nabelschnurblut widerspiegeln könnte. Die physiologische Funktion der BM-SC besteht unter anderem darin, gemeinsam mit anderen Zelltypen die endosteale Nische für HSC zu bilden (Kapitel 1.1.1.1). Aus dem Knochenmark isolierte BM-SC besitzen nach subkutaner Transplantation in Mäuse das Potential, heterotop Knochen zu regenerieren und haematopoetische Zellen zu rekrutieren (15, 21). Passend dazu wurde in der vorliegenden Arbeit durch Microarray und qRT-PCR-Analysen eine osteogene Signatur für BM-SC aufgezeigt. Zum einen exprimierten BM-SC eine größere Anzahl Osteogenese-assoziiierter Gene exklusiv als USSC oder CB-SC (Microarray Genexpressionsanalyse Tabelle 6). Zum anderen zeigte ein Vergleich der differentiell exprimierten Gene zwischen USSC und BM-SC bzw. CB- und BM-SC eine stärkere Präsenz von Osteogenese-assoziierten Genen in BM-SC (Microarray Genexpressionsanalyse Abbildung 3.12). Zur Vervollständigung wurden qRT-PCRs durchgeführt. Die Osteogenese-assoziierten Gene *BSP*, *OSX*, *BMP4* und *OC* waren in BM-SC signifikant stärker exprimiert als in den Zellen aus Nabelschnurblut, was die nach Microarray Analysen beschriebene osteogene Signatur für BM-SC bestätigt (Abbildung 3.13).

Mäusen, denen das Knochenmatrix-Phosphoprotein Bsp fehlt ($Bsp^{-/-}$) zeigten eine deutlich reduzierte Knochenbildung (89). In murinen Zellen wurde Bsp als essentiell für das *in vivo*-Potential zur Knochenbildung beschrieben (90). In der genannten Studie besaßen nur klonale BM-SC Zelllinien mit nachgewiesener Bsp-Expression ein osteogenes *in vivo* Potential, die Bsp-negativen Zelllinien waren nicht osteogen. Analog zu diesen Resultaten wurde bislang nur für die stark *BSP*-positiven BM-SC, nicht jedoch für USSC oder CB-SC ein osteogenes *in vivo* Potential nachgewiesen (Kapitel 1.1.1.1).

OSX wurde als essentieller Transkriptionsfaktor in der Regulation der Knochenentwicklung beschrieben. *Osx*-knockout Mäuse zeigten eine normale Knorpel- aber keine Knochenbildung, wodurch die spezifische Rolle von *Osx* in der Osteoblastendifferenzierung verdeutlicht wird (76, 107). Vergleichbar zu *BSP* belegt die starke Präsenz von *OSX* in BM-SC die osteogene Prägung dieses Zelltyps.

Das Signalmolekül *BMP4* nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation verschiedener Prozesse während der Embryogenese ein (59). Während der Gliedmaßenentwicklung ist der BMP-Signalweg essentiell für Chondrogenese und Osteoblastenreifeung (Abbildung 1.2), das Ausschalten von *Bmp2* und *Bmp4* in Mäusen resultierte in einer deutlich verminderten Osteogenese (78). Umgekehrt zeigten *Bmp4*-transgene Mäuse heterotope Knochenbildung (108). Die von Dr. Amelie Houben durchgeführte Überexpression von *BMP4* in USSC und CB-SC unterstützte das chondro- und osteogene, reduzierte jedoch das adipogene Differenzierungspotential (92).

Das Hormon *OC* wird als spezifisch für Osteoblasten beschrieben (50). Die deutliche Expression zeigt demnach einen osteoblastären Phänotyp für BM-SC.

Zusammenfassend können BM-SC im Bezug auf die Knochenentwicklung als biologisch reifer angesehen werden als USSC und CB-SC.

MSX2 wurde signifikant stärker in USSC und BM-SC exprimiert als in CB-SC (Abbildung 3.13). Neben der Expression von *DLK1* und der *HOX*-Gene kann *MSX2* daher als weiteres Gen definiert werden, das differentiell zwischen USSC und CB-SC exprimiert wird. *Msx2*-defiziente Mäuse zeigten Defekte in der endochondralen Ossifikation (77). In murinen Zellen unterstützte *Msx2* die Differenzierung zu

Osteoblasten, reduzierte jedoch das adipogene Potential (109). Passend dazu exprimierten USSC *MSX2* und waren nicht zur adipogenen Differenzierung fähig (Abbildung 3.4). BM-SC, die Fettzellen ausbilden konnten, exprimierten zwar *MSX2*, jedoch in geringerem Ausmaß als USSC. Die stark adipogenen CB-SC waren negativ für *MSX2*. Die Knochenbildungs-fördernde Wirkung von *MSX2* könnte mitverantwortlich für das starke osteogene *in vitro* Potential von USSC und BM-SC sein (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9)

Einer der wichtigsten und frühesten Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Chondro- und Osteogenese ist *RUNX2*, der unter anderem die Expression von *OC* induziert ((65), Kapitel 1.2.1). *RUNX2* wurde in USSC, CB- und BM-SC bereits in undifferenziertem Zustand exprimiert (Abbildung 3.13). Die starke Expression dieses frühen Regulators in USSC spricht für den bezüglich der osteogenen Genexpression unreiferen Status der USSC im Vergleich zu BM-SC. Letztere sind stark *OSX*-positiv und daher mutmaßlich schon zu reif für den *RUNX2*-Phänotyp.

Der histologische Nachweis von Kalzium- bzw. Phosphatablagerungen (Alizarin Rot-/Von Kossa-Färbung) nach osteogener *in vitro* Differenzierung zeigte eine starke Kalzifizierung von USSC und BM-SC beginnend an Tag 7, CB-SC wiesen dagegen einen deutlich geringeren Kalzifizierungsgrad auf (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9).

Zur tiefergehenden Analyse der Regulationsmechanismen wurden qRT-PCRs in nativen Zellen und zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro* Differenzierung durchgeführt (Abbildung 3.10). *BSP* wies sowohl an Tag 0, als auch während der osteogenen Differenzierung eine deutlich stärkere Expression in BM-SC als in USSC oder CB-SC auf. Da USSC und in geringerem Ausmaß auch CB-SC eine kalzifizierte Matrix bildeten, scheint das reduzierte Expressionslevel von *BSP* zur *in vitro* Differenzierung auszureichen. *OSX* wurde in USSC erstmals an Tag 14, in BM-SC jedoch bereits in undifferenziertem Zustand exprimiert, was für eine Reifung der USSC in Richtung eines Osteoblasten-Phänotyps spricht. CB-SC exprimierten ein kaum nachweisbares Level von *OSX*, was zu der geringen *in vitro* Kalzifizierung passt. Die Expression von *BMP2*, das an vielen regulatorischen Prozessen der Knochenentwicklung beteiligt ist (Abbildung 1.2), steigt in allen drei Zellpopulationen mit Dauer der osteogenen Differenzierung an. In USSC konnte *BMP4* zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung detektiert werden. Da die Zellen trotzdem zur *in vitro* osteogenen Differenzierung fähig waren, scheint die Regulation in diesem Zelltyp unabhängig von *BMP4* zu sein. *OC* gilt als Marker reifer Osteoblasten (50). Weder USSC noch CB-SC wiesen in Folge der Differenzierung eine gesteigerte Expression auf, was den im Vergleich zu BM-SC unreiferen Status der neonatalen Zellpopulationen bestätigt.

4.3 Überexpressionen

Die Gene *BSP* und *OSX* wurden signifikant stärker in BM-SC als in USSC und CB-SC exprimiert (Abbildung 3.13). Weitergehende qRT-PCR Analysen zeigten, dass dies auch für UC-SC aus der Nabelschnur galt (Abbildung 3.14 A, Abbildung 3.16 A), die kein osteogenes *in vitro* Potential besaßen (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9). Der Einfluss der lentiviral-vermittelten, stabilen Überexpression der

Gene *BSP* und *OSX* auf Genexpression und Differenzierungspotential wurde in je zwei USSC- und UC-SC-Zelllinien analysiert.

4.3.1 Positiver Einfluss von *BSP* auf das osteogene Differenzierungspotential

Die erfolgreiche Überexpression von *BSP* wurde auf Genexpressions- (Abbildung 3.14 B) und Proteinebene (Abbildung 3.14 C) nachgewiesen.

Die *in vitro* adipogene und chondroge Differenzierung wurde durch die Überexpression nicht beeinflusst (Daten nicht dargestellt). Native UC-SC waren nicht zur osteogenen *in vitro* Differenzierung fähig, USSC hingegen zeigten das Potential, in Knochenzellen zu differenzieren und eine kalzifizierte Matrix zu bilden (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9). Allein durch die Überexpression von *BSP* wurde kein Effekt auf das osteogene Potential nachgewiesen, dieser zeigte sich erst nach Zusatz des Differenzierungsmediums. Durch Alizarin Rot- und Von Kossa-Färbungen wurde nach Überexpression von *BSP* und anschließender *in vitro* Differenzierung eine gesteigerte Kalzifizierung sichtbar gemacht (Abbildung 3.15), was zu der beschriebenen Funktion des Knochenmatrixproteins *BSP* in der Initiation der Bildung von Hydroxyapatitkristallen während der Osteogenese passt (91, 110). Die Rolle von *BSP* in der Regulation der Mineralisierung wird durch Studien zur Knochenregeneration unterstützt. Künstlich erzeugte Femurdefekte heilten, bedingt durch verminderte Mineralisierung, in *Bsp*-defizienten Mäusen schlechter als in Wildtyp-Mäusen (111).

Mit der Überexpression in der vorliegenden Arbeit vergleichbare Resultate wurden nach adenoviraler Überexpression von *Bsp* in murinen Osteoblasten nachgewiesen. Gordon *et al.* detektierten nach Überexpression eine im Vergleich zu den Kontrollkulturen stärkere *in vitro* Kalzifizierung (112). Satomura und Kollegen konnten nachweisen, dass nur *Bsp*-positive Klone muriner BM-SC *in vivo* osteogen differenzierten (90). Zukünftige *in vivo* Differenzierungsassays mit *BSP*-überexprimierten USSC und UC-SC könnten aufdecken, ob dieser Zusammenhang auch für humane neonatale Stromazellpopulationen besteht.

4.3.2 Negativer Einfluss von *OSX* auf das osteogene Differenzierungspotential

Die Überexpression von *OSX* wurde auf mRNA- (Abbildung 3.16 B) und Proteinebene (Abbildung 3.16 C) nachgewiesen. Wie *BSP* beeinflusste auch die Überexpression von *OSX* das Potential zur Bildung von Fett- und Knorpelzellen nicht (Daten nicht dargestellt).

Da *OSX* als essentieller Transkriptionsfaktor während der Knochenbildung fungiert, wurde zunächst der Einfluss der Überexpression auf die Expression der assoziierten Gene *RUNX2*, *BSP* und *BMP2* mittels qRT-PCR untersucht. Alle Zelllinien zeigten durch die Überexpression eine reduzierte Expression von *RUNX2* sowie eine verstärkte Expression von *BSP* und *BMP2* (Abbildung 3.17). In der Signalkaskade während der Knochenentwicklung wird *OSX* nach *RUNX2* exprimiert (76), was für die hier gezeigten qRT-PCR Resultate auf einen negativen *feedback*-Mechanismus schließen lässt. Das Gen *BSP* wurde als eines der Zielgene von *OSX* beschrieben (113). Für *BMP2* wurde durch andere Studien eine *OSX*-induzierende Wirkung aufgezeigt (114), sodass die in der vorliegenden Arbeit nach *OSX*-Überexpression detektierte verstärkte *BMP2*-Expression auf einen positiven *feedback*-Mechanismus hindeutet, dessen Regulation noch unklar ist.

Nach *in vitro* Differenzierungen mit anschließenden Alizarin Rot- und Von Kossa-Färbungen wurde – trotz der verstärkten Expression von *BSP* und *BMP2* – ein negativer Einfluss der Überexpression von *OSX* auf die Kalzifizierung sichtbar (Abbildung 3.18). Selbst das minimal vorhandene osteogene Differenzierungsvermögen der UC-SC-Kontrollzellen reduzierte sich. Besonders deutlich ausgeprägt war der Effekt bei der Zelllinie USSC2, die in Folge der Überexpression von *OSX* nicht mehr zur osteogenen Differenzierung fähig war. Überraschenderweise wies diese Zelllinie nach Überexpression die geringste Expressionsstärke von *OSX* im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (1223-fach, Abbildung 3.16 B).

Die Studie von Kurata und Kollegen präsentierte vergleichbare Resultate. Die Überexpression von *OSX* in humanen fetalen Stromazellen resultierte nicht in der Bildung extrazellulärer Kalziumkristalle und daher in keiner terminalen osteogenen Differenzierung (115). In murinen primären Osteoblasten führte die Überexpression von *Osx* zu einer reduzierten Mineralisierung während späteren Stadien der Osteoblastendifferenzierung (116). Außerdem zeigten *Osx*-transgene Mäuse eine verringerte Knochendichte (Osteopenie) (116). Im Gegensatz zu diesen Studien und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit führten Überexpressionen von *Osx* in murinen Stromazellen aus dem Fettgewebe (117) oder in murinen BM-SC (118) zu einem verbesserten osteogenen Potential. Diese kontroversen Resultate legen den Schluss nahe, dass der Effekt der Überexpression von *OSX* abhängig vom transfizierten Zelltyp und dem assoziierten Genexpressionsmuster ist. Ein Beispiel stellt die differentielle Expression von Ko-Faktoren, die zur Induktion der Differenzierung notwendig sind, dar. Dazu gehört *NFAT* (nuclear factor of activated t-cells), der in einem Komplex mit *OSX* die Osteoblastendifferenzierung kontrolliert (119).

4.4 Adaptation des Potentials durch direkte Ko-Kultur

Transplantationsversuche in Mäusen, bei denen Progenitorzellen aus der Tibia in einen Mandibelfekt transplantiert wurden, resultierten in Knorpelbildung statt in der Regeneration von Knochen (81). Umgekehrt fand nach Transplantation mandibularer Zellen in einen Tibiadefekt Knochenheilung statt (81). Die Gruppe um Philipp Leucht konnte aufklären, dass ein Zusammenhang zwischen erfolgreicher Knochenregeneration und der *HOX*-Genexpression in transplantierten Zellen und Zielgewebe besteht. Grundlage ist die Fähigkeit *HOX*-negativer Zellen (Mandibel) nach Transplantation die *HOX*-Genexpression des Zielgewebes (Tibia) zu adaptieren (81). Übertragen auf die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Zellpopulationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch die *HOX*-negativen USSC (Abbildung 3.3) eine *HOX*-Genexpression annehmen können.

Diese These war die Grundlage der Entwicklung eines *in vitro* Modells zur Nachbildung der Situation nach Transplantation *HOX*-negativer USSC in eine *HOX*-positive Umgebung (83, 92). Durch gemeinsame Kultivierung von USSC mit den *HOX*-positiven UC-, CB- oder BM-SC wurde ein direkter Zell-Zell Kontakt ermöglicht. Nach 5-tägiger Ko-Kultur übernahmen USSC eine *HOX*-Genexpression von UC-, CB- oder BM-SC (Abbildung 3.19), adaptierten jedoch nicht den komplett identischen „*HOX*-Code“ (Vergleich von Abbildung 3.3 und Abbildung 3.19). Auch während der weitergehenden Kultivierung – nach der Separation von den zur Ko-Kultur genutzten *HOX*-positiven Zellen – behielten

USSC die *HOX*-Genexpression bei und steigerten sogar die Anzahl der exprimierten *HOX*-Gene (Daten dargestellt in (83)).

4.4.1 Veränderte Genexpression

Um den Einfluss auf das Genexpressionsmuster aufzudecken, wurden Microarray Analysen von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC durchgeführt. Dazu wurde sowohl die Genexpression nach 5 Tagen als auch nach 16 Stunden analysiert, da bereits zu diesem Zeitpunkt eine beginnende *HOX*-Genexpression detektiert wurde (83). Die Auswertung der Microarray Ergebnisse erfolgte mit besonderem Fokus auf die mit der Knochenbildung assoziierten Gene (Abbildung 3.21). Die Expression der Gene *FOS*, *HHIP* und *FOXF1* wurde mittels qRT-PCR Analysen bestätigt (Abbildung 3.22).

Der Transkriptionsfaktor *FOS* (*V-FOS FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) wurde in Folge der Ko-Kultivierung mit CB-SC verringert exprimiert. Fos-defiziente Mäuse waren durch eine Anhäufung von Knochenmatrix (Osteopetrose) gekennzeichnet, was durch eine fehlerhafte Differenzierung der Knochen-abbauenden Osteoklasten begründet wurde (120). *FOS* ist außerdem eine Hauptkomponente des AP1 (activator protein 1)-Komplex aus Transkriptionsfaktoren, der auch an der Regulation der Knochenentwicklung beteiligt ist (121). Die Überexpression von *Hoxb4* in Rattenzellen beeinflusste die Transkriptionsfaktoren des AP1-Komplexes und führte zu einer verringerten Expression von Fos (122). Diese Studie bestätigt demnach den in dieser Arbeit gezeigten Zusammenhang der Expression von *HOX*-Genen und des Transkriptionsfaktors *FOS*.

Das Gen *HHIP* (*hedgehog-interacting protein*) wurde in Abhängigkeit von der Dauer der gemeinsamen Kultivierung differentiell reguliert. Nach 16-stündiger Ko-Kultivierung wurde *HHIP* in USSC verstärkt exprimiert, nach 5-tägiger Ko-Kultur geringer. *HHIP* ist ein Inhibitor des *hedgehog*-Signalweges indem es mit den 3 *hedgehog*-Proteinen *SHH*, *IHH* oder *DHH* (*sonic-*, *indian-*, *desert hedgehog*) interagiert. Besonders *IHH* ist an der Regulation der endochondralen Ossifikation beteiligt, indem es unter anderem die Hypertrophie der Chondrozyten und die Osteoblastenreifung stimuliert (123). *HHIP* ist ein Zielgen der *hedgehog*-Signalkaskade und moduliert in einem negativen *feedback*-Mechanismus die Aktivität der *hedgehog*-Proteine (124). Die zeitlich frühe Expression von *HHIP* in USSC nach 16 Stunden Ko-Kultur spricht für eine Rolle im Beginn der Regulation der Effekte der Ko-Kultur.

Der Transkriptionsfaktor *FOXF1* (*forkhead box F1*) wurde in USSC in Folge der direkten Ko-Kultur verstärkt exprimiert. Die Deletion von *Foxf1* in Mäusen ist schon während der Schwangerschaft aufgrund von Defekten der mesodermalen Differenzierung und Zelladhäsion letal (125). *FOXF1* ist zudem ein Zielgen des *hedgehog*-Signalweges und in dieser Signalkaskade an der Entwicklung der rechts/links Asymmetrie während der Embryogenese beteiligt (126).

4.4.2 Induziertes adipogenes, reduziertes chondro- und osteogenes Potential

USSC sind nativ nicht zur adipogenen Differenzierung fähig (Abbildung 3.4, (28)). Nach direkter Ko-Kultur mit den adipogenen CB-SC und anschließender *in vitro* Differenzierung bildeten USSC ein adipogenes Potential aus, was durch *Oil Red O* Färbung und qRT-PCR Analyse des Markers *ADIPOQ* nachgewiesen wurde (Abbildung 3.23). Mit der Adaption der *HOX*-Genexpression in USSC nach

Ko-Kultur geht demnach ein verändertes Zellschicksal hin zu einem zur Adipogenese fähigen Zelltyp einher.

Nach Ko-Kultur passten sich die USSC hinsichtlich ihres *in vitro* chondrogenen Differenzierungspotentials der ko-kultivierten CB-SC Zelllinie an. Mittels Safranin O-Färbung in Schnitten differenzierter Pellets wurden in USSC nach Ko-Kultur weniger oder keine Proteoglykane in der extrazellulären Matrix angefärbt (Abbildung 3.24). Auch die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten wurde durch die Ko-Kultur beeinflusst. USSC, die nach *in vitro* Differenzierung eine stark kalzifizierte Matrix bildeten (Abbildung 3.8, Abbildung 3.9), wiesen nach Ko-Kultur mit CB-SC eine Reduktion des osteogenen Potentials auf (Abbildung 3.25). Dies wurde durch Alizarin Rot-Färbung mit anschließender Quantifizierung des Farbstoffs sichtbar gemacht. Auch andere Gruppen haben untersucht, ob Zellen aus Geweben unterschiedlichen embryonalen Ursprungs sich hinsichtlich ihres osteogenen Potentials unterscheiden. So konnten Quarto *et al.* in Mäusen zeigen, dass Osteoblasten aus dem Stirnbein (Ursprung Neuralleiste) ein höheres osteogenes *in vitro* Differenzierungspotential aufweisen als Osteoblasten aus dem Scheitelbein (Ursprung Mesoderm) (127). In dieser Studie wurde die *HOX*-Genexpression nicht untersucht, aufgrund ihrer Herkunft sind Zellen aus dem Stirnbein mutmaßlich *HOX*-negativ und Zellen aus dem Scheitelbein *HOX*-positiv, was zu den hier präsentierten Ergebnissen passen würde.

4.4.3 Fazit: Rückschluss auf das regenerative Potential

USSC und CB-SC werden aus dem gleichen Gewebe, dem Nabelschnurblut, isoliert und unterscheiden sich dennoch im Hinblick auf Differenzierungspotential und Genexpression. Die hier durchgeführten Ko-Kulturexperimente zeigten, dass USSC sowohl die *HOX*-Genexpression als auch das Differenzierungspotential von den gemeinsam kultivierten CB-SC adaptierten. Bezüglich des embryonalen Ursprungs von USSC und CB-SC kann die Hypothese aufgestellt werden, dass USSC während der Fetalentwicklung im Fetus/Embryo aus ihrem Ursprungsort in eine *HOX*-positive Umgebung migrieren und in Folge dessen einen CB-SC Phänotyp ausbilden. Dieser Theorie zufolge wären USSC Vorläufer der CB-SC. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die beiden Zelltypen aus unterschiedlichen Ursprungsorganen – USSC aus einem *HOX*-negativen und CB-SC aus einem *HOX*-positiven Gewebe – stammen.

Die oben beschriebene Studie von Quarto und Kollegen in der Maus stellte einen Zusammenhang zwischen der Heilungsfähigkeit eines Knochens und dessen embryonalem Ursprungsgewebe her. Ein Defekt im Stirnbein, das entwicklungsbiologisch der Neuralleiste entstammt, heilte besser als ein Defekt im mesodermalen Scheitelbein (127).

Werden die in dieser Arbeit nach *in vitro* Experimenten beschriebenen Ergebnisse auf das regenerative *in vivo* Potential übertragen, wird der Vorteil der unreifen, biologisch jüngeren USSC ersichtlich: Zur Gewinnung des Nabelschnurblutes ist kein invasiver Eingriff, wie bei der Knochenmarkentnahme, nötig. Weiterhin proliferieren USSC stark und passen sich hinsichtlich Genexpression und Differenzierungspotential dem umgebenden Gewebe an. Dies resultiert in einem Vorteil der *HOX*-negativen USSC hinsichtlich des regenerativen Potentials.

5 Zusammenfassung

In Folge der demografischen Alterung der Bevölkerung steigt der Bedarf an Therapien für Erkrankungen des skeletalen Systems. Auch Tumorsektionen oder Unfälle können den Ersatz von Knochen erfordern. Die konventionelle Therapie großer Knochendefekte (*critical size defects*), besteht in der Transplantation von patienteneigenem oder Spenderknochen (autolog/allogen). Die *in vitro* Herstellung von Gewebetransplantaten (*tissue engineering*) aus einer natürlichen oder synthetischen Matrix, die mit Zellen besiedelt und durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden kann, bietet einen alternativen Behandlungsansatz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die detaillierte Charakterisierung von humanen Stromazellpopulationen aus neonatalen (Nabelschnur, Nabelschnurblut) und adulten Geweben (Knochenmark) hinsichtlich ihrer Eignung für den Einsatz in regenerativen Therapien von Knochendefekten. Da adulte Stromazellen aus dem Knochenmark (*bone marrow stromal cells*, BM-SC) bislang als Gold Standard für den Einsatz in der regenerativen Knochengewebeherstellung gelten, werden die neonatalen Zellpopulationen mit diesem Zelltyp verglichen.

BM-SC waren stark positiv für CD146, exprimierten *HOX*-Gene und waren *in vitro* zur Fett-, Knorpel- und Knochendifferenzierung (adipo-/chondro-/osteogen) fähig. Jedoch reduzierte sich mit dem Alter des Zellspenders das *in vitro* Knochendifferenzierungspotential. Hinsichtlich der Genexpression wurde für BM-SC eine osteogen geprägte Signatur aufgezeigt. Weiterhin zeigten BM-SC eine große biologische Variabilität, wodurch der klinische Einsatz der Zellen beeinträchtigt würde.

Stromazellen aus der Nabelschnur (*umbilical cord stromal cells*, UC-SC) zeigten zwar ein starkes Proliferationspotential, wiesen *in vitro* jedoch weder ein adipo- oder chondrogenes, noch ein osteogenes Differenzierungspotential auf. Daher besitzt dieser Zelltyp keine Relevanz für die therapeutische Anwendung zur Knochenregeneration.

Zwei nicht-haematopoetische Stromazelltypen können aus dem Nabelschnurblut isoliert werden. *Cord blood stromal cells* (CB-SC) wurden durch das Potential zur adipogenen Differenzierung und die Präsenz von *HOX*-Genen charakterisiert. Im Vergleich zu BM-SC zeigten CB-SC *in vitro* ein verringertes osteogenes Differenzierungspotential. *Unrestricted somatic stromal cells* (USSC) sind ebenfalls im Nabelschnurblut präsent, exprimierten anders als CB-SC jedoch keine *HOX*-Gene und waren nicht zur Bildung von Fettzellen fähig. *In vitro* differenzierten USSC chondro- und osteogen und wiesen ein starkes Proliferationsvermögen auf. Die stabile Überexpression von *bone sialoprotein* (*BSP*) führte zu einer weiteren Steigerung der Kalzifizierung nach *in vitro* Differenzierung, die von *osterix* (*OSX*) hingegen zu einer Reduktion. Die Genexpressionssignatur der biologisch jüngeren USSC war im Gegensatz zu BM-SC nicht osteogen geprägt. Die *in vitro* Simulation der Transplantation *HOX*-negativer USSC in eine *HOX*-positive Umgebung (z.B. Tibia) durch direkte Ko-Kultur von USSC und CB-SC belegte die Fähigkeit der USSC, eine *HOX*-Genexpression zu adaptieren, was Studien anderer Gruppen zufolge essentiell für erfolgreiche Knochenregeneration ist.

Unter den in dieser Arbeit analysierten Zellpopulationen erwiesen sich USSC und BM-SC als vielversprechend für den therapeutischen Einsatz zur Knochenregeneration. Adulte BM-SC waren bereits hinsichtlich ihrer Genexpression auf die osteogene Differenzierung geprägt, die Zellpopulationen variierten jedoch stark in Abhängigkeit vom Zellspender. Neonatale USSC waren biologisch naiver und zeigten Vorteile bezüglich Proliferation und Anpassungsfähigkeit an die Umgebung.

6 Summary

The need to treat diseases affecting the skeleton increases due to the demographic aging of the population. Tumor resections or accidents are further reasons that may require the replacement of bone. Conventional treatment of so called critical size defects includes the transplantation of the patient's own or donor bone (autologous/allogeneic). The *in vitro* bone tissue engineering of a natural or synthetic matrix that can be seeded with cells and stimulated using growth factors provides an alternative therapeutic approach.

Aim of this thesis was the detailed characterization of human stromal cells derived from neonatal (umbilical cord, cord blood) and adult tissues (bone marrow) regarding their applicability in the regenerative treatment of bone defects. Since adult bone marrow stromal cells are considered as the gold standard for bone tissue engineering, the neonatal cell types were analyzed in comparison to this cell type.

BM-SC were strongly positive for CD146, expressed *HOX*-genes and could be differentiated *in vitro* towards adipose tissue, cartilage and bone (adipo-/chondro-/osteogenic). However, the osteogenic potential decreased with the age of the cell donor. According to the gene expression, an osteogenic signature was described. Furthermore, BM-SC displayed a strong biological variability, which impairs the potential clinical applicability of these cells.

Umbilical cord stromal cells (UC-SC) exhibited a strong proliferation potential but no adipo-, chondro- or osteogenic *in vitro* differentiation capacity. Therefore, UC-SC did not possess a clinical relevance for bone tissue engineering.

Two non-haematopoietic stromal cell types can be isolated out of cord blood. Cord blood stromal cells (CB-SC) were characterized by their potential to differentiate into adipocytes and by the expression of *HOX*-genes. In comparison to BM-SC, CB-SC revealed a reduced osteogenic *in vitro* capacity. Unrestricted somatic stromal cells (USSC) can also be isolated from cord blood. In contrast to CB-SC, USSC displayed no adipogenic differentiation potential and were *HOX*-negative. In addition to the chondro- and osteogenic *in vitro* potential, USSC showed a strong proliferation capacity. The overexpression of bone sialoprotein (*BSP*) enhanced the calcification after osteogenic *in vitro* differentiation while the overexpression of osterix (*OSX*) caused a reduction. In contrast to BM-SC, the gene expression signature of the biologically younger USSC revealed no osteogenic character. The *in vitro* simulation of the transplantation of *HOX*-negative USSC in a *HOX*-positive tissue (e.g. tibia) by direct co-culture of USSC and CB-SC (*HOX*-positive) demonstrated the ability of USSC to adapt a *HOX*-gene expression, which is according to studies of other groups essential for successful bone regeneration.

Among the cell populations analyzed in this thesis, USSC and BM-SC held promise for the use in bone tissue engineering. While adult BM-SC exhibited an osteogenic gene expression character, there is a high variability depending on the cell donor. Neonatal USSC were biologically naive and showed advantages in terms of proliferation and adaptability to surrounding cells.

7 Referenzen

1. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. 2012. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* 338: 917-21
2. Bueno EM, Glowacki J. 2009. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol* 5: 685-97
3. Finkemeier CG. 2002. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 454-64
4. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. 2012. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 1063-77
5. Lieberman JRF, G.E. 2005. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*: Humana Press Inc.
6. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. 2007. Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med* 4: e9
7. Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J. 2010. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Int* 2010: 215625
8. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. 2004. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4: 743-65
9. Langer R, Vacanti JP. 1993. Tissue engineering. *Science* 260: 920-6
10. Shieh SJ, Vacanti JP. 2005. State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery* 137: 1-7
11. Heath CA. 2000. Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 18: 17-9
12. Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-50
13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7
14. Robey PG. 2011. Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Eng Part B Rev* 17: 423-30
15. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131: 324-36
16. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY. 2013. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 19: 35-42
17. Prockop DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-4
18. Shi C. 2012. Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology* 136: 133-8
19. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829-34
20. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16: 381-90
21. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 12: 1335-47
22. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344: 385-6

23. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. 2008. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106: 203-9
24. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. 1989. 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: 1174-8
25. Barker JN, Weisdorf DJ, Wagner JE. 2001. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med* 344: 1870-1
26. Erices A, Conget P, Minguell JJ. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109: 235-42
27. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200: 123-35
28. Kluth SM, Buchheiser A, Houben AP, Geyh S, Krenz T, Radke TF, Wiek C, Hanenberg H, Reinecke P, Wernet P, Kogler G. 2010. DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem Cells Dev* 19: 1471-83
29. Liedtke S, Buchheiser A, Bosch J, Bosse F, Kruse F, Zhao X, Santourlidis S, Kogler G. 2010. The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood. *Stem Cell Res* 5: 40-50
30. Kluth SM, Radke TF, Kogler G. 2013. Increased Haematopoietic Supportive Function of USSC from Umbilical Cord Blood Compared to CB MSC and Possible Role of DLK-1. *Stem Cells Int* 2013: 985285
31. Handschel J, Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich RA, Ommerborn MA, Kubler NR, Brinkmann M, Kogler G, Meyer U. 2010. Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A* 16: 2475-83
32. Kaltz N, Funari A, Hippauf S, Delorme B, Noel D, Riminucci M, Jacobs VR, Haupl T, Jorgensen C, Charbord P, Peschel C, Bianco P, Oostendorp RA. 2008. In vivo osteoprogenitor potency of human stromal cells from different tissues does not correlate with expression of POU5F1 or its pseudogenes. *Stem Cells* 26: 2419-24
33. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. 2005. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23: 220-9
34. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. 2008. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* 26: 146-50
35. Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. 2008. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods Cell Biol* 86: 101-19
36. Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, Spinelli O, Cazzaniga G, Trezzi R, Gianatti A, Rambaldi A, Golay J, Introna M. 2011. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a very rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. *Cytotherapy* 13: 786-801
37. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. 2003. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21: 50-60
38. Reinisch A, Strunk D. 2009. Isolation and animal serum free expansion of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and endothelial colony forming progenitor cells (ECFCs). *J Vis Exp*
39. Sudo K, Kanno M, Miharada K, Ogawa S, Hiroyama T, Saijo K, Nakamura Y. 2007. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or

- adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells* 25: 1610-7
40. Hou T, Xu J, Wu X, Xie Z, Luo F, Zhang Z, Zeng L. 2009. Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15: 2325-34
 41. Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, Perez-Bouza A, Neuss S. 2010. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* 31: 467-80
 42. Diao Y, Ma Q, Cui F, Zhong Y. 2009. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 91: 123-31
 43. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7
 44. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-72
 45. Zhou H, Ding S. 2010. Evolution of induced pluripotent stem cell technology. *Curr Opin Hematol* 17: 276-80
 46. Jerosch JB, A.; Uhr, G. 2002. *Knochen. curasan Taschenatlas spezial*: Georg Thieme Verlag
 47. Currey JD. 2002. *Bones. Structure and Mechanics*: Princeton University Press
 48. Zilles KT, B. 2010. *Anatomie*: Springer Medizin Verlag
 49. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. 2009. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 629-48
 50. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. 2000. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 191-220
 51. Long F. 2011. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 27-38
 52. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113 (Pt 3): 377-81
 53. Gilbert SF. 2000. Osteogenesis: The Development of Bones. In *Developmental Biology*: Sinauer Associates Inc.
 54. Gilbert SF. 2006. *Developmental Biology*: Sinauer Associates Inc.
 55. Kronenberg HM. 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332-6
 56. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 46-62
 57. Bonewald LF. 2011. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-38
 58. Hall BK, Miyake T. 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22: 138-47
 59. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. 2006. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97: 33-44
 60. Yoon BS, Lyons KM. 2004. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 93: 93-103
 61. Capdevila J, Johnson RL. 1998. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev Biol* 197: 205-17
 62. Duboule D. 2007. The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* 134: 2549-60
 63. Hunt P, Clarke JD, Buxton P, Ferretti P, Thorogood P. 1998. Stability and plasticity of neural crest patterning and branchial arch Hox code after extensive cephalic crest rotation. *Dev Biol* 198: 82-104

64. Rossel M, Capecchi MR. 1999. Mice mutant for both *Hoxa1* and *Hoxb1* show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 126: 5027-40
65. Karsenty G. 2008. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 183-96
66. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 1999. *Sox9* is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22: 85-9
67. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. 1998. A new long form of *Sox5* (L-*Sox5*), *Sox6* and *Sox9* are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17: 5718-33
68. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. 1999. Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa1*. *Mech Dev* 80: 159-70
69. Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. 2004. *Runx2* and *Runx3* are essential for chondrocyte maturation, and *Runx2* regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18: 952-63
70. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273: 613-22
71. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR. 2001. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires *Cbfa1/Runx2*. *Mech Dev* 106: 97-106
72. Lefebvre V, Bhattaram P. 2010. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol* 90: 291-317
73. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-64
74. Ducy P. 2000. *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219: 461-71
75. Kobayashi T, Kronenberg H. 2005. Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology* 146: 1012-7
76. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29
77. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. 2000. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24: 391-5
78. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. 2006. Genetic analysis of the roles of *BMP2*, *BMP4*, and *BMP7* in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2: e216
79. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. 2005. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8: 727-38
80. Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. 2002. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* 129: 4301-13
81. Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. 2008. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development* 135: 2845-54
82. Burnette EW, Jr. 1972. Fate of an iliac crest graft. *J Periodontol* 43: 88-90
83. Liedtke S, Freytag EM, Bosch J, Houben AP, Radke TF, Deenen R, Kohrer K, Kogler G. 2013. Neonatal mesenchymal-like cells adapt to surrounding cells. *Stem Cell Res* 11: 634-46
84. Kogler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, Wernet P. 2005. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 33: 573-83
85. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7

86. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238: 265-72
87. Rosenberg L. 1971. Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 53: 69-82
88. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. 1969. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem* 17: 110-24
89. Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, Laroche N, Roux JP, Burt-Pichat B, Duboeuf F, Boivin G, Jurdic P, Lafage-Proust MH, Amedee J, Vico L, Rossant J, Aubin JE. 2008. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 205: 1145-53
90. Satomura K, Krebsbach P, Bianco P, Gheron Robey P. 2000. Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *J Cell Biochem* 78: 391-403
91. Hunter GK, Goldberg HA. 1994. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 302 (Pt 1): 175-9
92. Houben AP. 2012. *Dissertation: Untersuchung des Wnt-Signalweges in nicht-hämatopoetischen Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut zur Charakterisierung von Subpopulationen: Analyse einzelner Signalmoleküle in in vitro Differenzierungen*. Heinrich Heine Universität Düsseldorf
93. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. 2010. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28: 788-98
94. Kaltz N, Ringe J, Holzwarth C, Charbord P, Niemeyer M, Jacobs VR, Peschel C, Haupl T, Oostendorp RA. 2010. Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Exp Cell Res* 316: 2609-17
95. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. 2007. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 15: 867-77
96. Bosch J, Houben AP, Radke TF, Stapelkamp D, Bunemann E, Balan P, Buchheiser A, Liedtke S, Kogler G. 2012. Distinct differentiation potential of "MSC" derived from cord blood and umbilical cord: are cord-derived cells true mesenchymal stromal cells? *Stem Cells Dev* 21: 1977-88
97. Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78: 191-201
98. Morgan R. 2006. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet* 22: 67-9
99. Johnson RL, Riddle RD, Tabin CJ. 1994. Mechanisms of limb patterning. *Curr Opin Genet Dev* 4: 535-42
100. Ackema KB, Charite J. 2008. Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev* 17: 979-91
101. Chou S, Lodish HF. 2010. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7799-804
102. Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Gheron Robey P. 2006. Postnatal skeletal stem cells. *Methods Enzymol* 419: 117-48
103. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2: 313-9
104. Lefebvre V, Smits P. 2005. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75: 200-12
105. Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, Gaillard J, Langonne A, Sensebe L, Noel D, Jorgensen C, Haupl T, Charbord P. 2009. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* 27: 1142-51
106. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Bakker K, Both S, Platenburg PP, Oner FC, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA. 2002. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng* 8: 911-20

107. Harada S, Rodan GA. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-55
108. Kan L, Hu M, Gomes WA, Kessler JA. 2004. Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)-like phenotype. *Am J Pathol* 165: 1107-15
109. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T. 2004. Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279: 34015-22
110. Hunter GK, Goldberg HA. 1993. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8562-5
111. Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain JC, Chassande O. 2010. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone* 46: 447-52
112. Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. 2007. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* 41: 462-73
113. Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. 2011. Osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) is an upstream regulator of *Satb2* during bone formation. *J Biol Chem* 286: 32995-3002
114. Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. 2005. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem* 95: 518-28
115. Kurata H, Guillot PV, Chan J, Fisk NM. 2007. Osterix induces osteogenic gene expression but not differentiation in primary human fetal mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 13: 1513-23
116. Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, Fukuyama R, Mori M, Yamana K, Nakamura K, Liu W, Toyosawa S, Moriishi T, Kawaguchi H, Takada K, Komori T. 2012. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS One* 7: e32364
117. Wu L, Wu Y, Lin Y, Jing W, Nie X, Qiao J, Liu L, Tang W, Tian W. 2007. Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix. *Mol Cell Biochem* 301: 83-92
118. Tu Q, Valverde P, Chen J. 2006. Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1257-65
119. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. 2005. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 11: 880-5
120. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. 1994. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266: 443-8
121. Wagner EF. 2002. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2: ii40-2
122. Krosil J, Sauvageau G. 2000. AP-1 complex is effector of Hox-induced cellular proliferation and transformation. *Oncogene* 19: 5134-41
123. Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. 2004. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131: 1309-18
124. Chuang PT, McMahon AP. 1999. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397: 617-21
125. Mahlapuu M, Ormestad M, Enerback S, Carlsson P. 2001. The forkhead transcription factor *Foxf1* is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development* 128: 155-66
126. Tsiairis CD, McMahon AP. 2009. An Hh-dependent pathway in lateral plate mesoderm enables the generation of left/right asymmetry. *Curr Biol* 19: 1912-7
127. Quarto N, Wan DC, Kwan MD, Panetta NJ, Li S, Longaker MT. 2010. Origin matters: differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones. *J Bone Miner Res* 25: 1680-94

8 Eigene Referenzen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Comparing the gene expression profile of stromal cells from human cord blood and bone marrow: Lack of the typical "bone" signature in cord blood cells.

Bosch J, Houben AP, Hennicke T, Deenen R, Köhrer K, Liedtke S, Kögler G.
Stem Cells Int., *in press*.

Distinct differentiation potential of "MSC" derived from cord blood and umbilical cord: are cord-derived cells true mesenchymal stromal cells?

Bosch J, Houben AP, Radke TF, Stapelkamp D, Bünemann E, Balan P, Buchheiser A, Liedtke S, Kögler G.
Stem Cells Dev. 2012 Jul 20;21(11):1977-88.

Neonatal mesenchymal-like cells adapt to surrounding cells.

Liedtke S, Freytag EM, Bosch J, Houben AP, Radke TF, Deenen R, Köhrer K, Kögler G.
Stem Cell Res. 2013 Apr 10;11(1):634-646.

Oxygen tension modifies the 'stemness' of human cord blood-derived stem cells.

Buchheiser A, Houben AP, Bosch J, Marbach J, Liedtke S, Kögler G.
Cytotherapy. 2012 Sep;14(8):967-82.

The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood.

Liedtke S, Buchheiser A, Bosch J, Bosse F, Kruse F, Zhao X, Santourlidis S, Kögler G.
Stem Cell Res. 2010 Jul;5(1):40-50.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation.....	17
Abbildung 1.2: Genregulation und Bildung der extrazellulären Matrix während der endochondralen Ossifikation.	19
Abbildung 3.1: Morphologie und Wachstum.	36
Abbildung 3.2: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen.	37
Abbildung 3.3: Expression von <i>HOX</i> -Genen.	39
Abbildung 3.4: Adipogene <i>in vitro</i> Differenzierung.	41
Abbildung 3.5: Chondrogene <i>in vitro</i> Differenzierung: Pelletkultur.	42
Abbildung 3.6: Chondrogene <i>in vitro</i> Differenzierung: Nachweis.	43
Abbildung 3.7: Osteogene <i>in vitro</i> Differenzierung von BM-SC in Abhängigkeit vom Alter des Knochenmarkspenders.	44
Abbildung 3.8: Osteogene <i>in vitro</i> Differenzierung: Zeitverlauf der Kalzifizierung (Alizarin Rot- Färbung).	45
Abbildung 3.9: Osteogene <i>in vitro</i> Differenzierung: Zeitverlauf der Kalzifizierung (Von Kossa-Färbung).	46
Abbildung 3.10: Osteogene <i>in vitro</i> Differenzierung: Zeitverlauf der Expression relevanter Marker..	48
Abbildung 3.11: Grafischer Vergleich der Genexpression von USSC, CB-SC und BM-SC.....	51
Abbildung 3.12: Osteogenese-assoziierte, differentiell exprimierte Gene.	53
Abbildung 3.13: Expression von Osteogenese-relevanten Genen.	54
Abbildung 3.14: Stabile Überexpression von <i>BSP</i>	56
Abbildung 3.15: Osteogenes Differenzierungspotential nach <i>BSP</i> -Überexpression.	57
Abbildung 3.16: Stabile Überexpression von <i>OSX</i>	59
Abbildung 3.17: Genregulation nach <i>OSX</i> -Überexpression.....	60
Abbildung 3.18: Osteogenes Differenzierungspotential nach <i>OSX</i> -Überexpression.....	61
Abbildung 3.19: <i>HOX</i> -Genexpression nach Ko-Kultur.	62
Abbildung 3.20: <i>HOX</i> -Proteinnachweis nach Ko-Kultur.	63
Abbildung 3.21: Microarray Genexpressionsanalyse nach Ko-Kultur: Knochen-assoziierte Gene.....	65
Abbildung 3.22: Bestätigung der Microarray Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR.	66
Abbildung 3.23: Adipogenes Differenzierungspotential von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC.....	67
Abbildung 3.24: Chondrogenes Differenzierungspotential von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC.....	68
Abbildung 3.25: Osteogenes Differenzierungspotential von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC.....	69

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Verbrauchsmaterialien und zugehörigen Hersteller.	23
Tabelle 2: Verwendete Geräte und deren Hersteller.	25
Tabelle 3: Zellkulturmedien.	26
Tabelle 4: Primersequenzen und Annealingtemperaturen.	27
Tabelle 5: Verwendete Antikörper und die zugehörigen Hersteller.	28
Tabelle 6: An der Knochenentwicklung beteiligte Gene, die ausschließlich in USSC, CB-SC oder BM-SC exprimiert wurden.	52

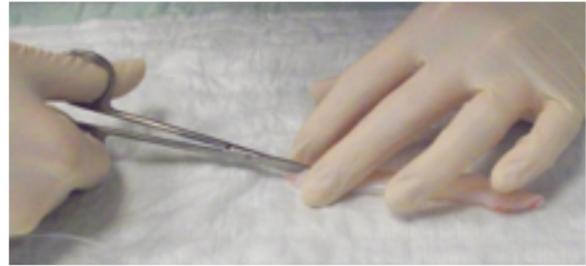
11 Anhang

Tabelle A 1: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien und die zugehörigen Laborbezeichnungen.

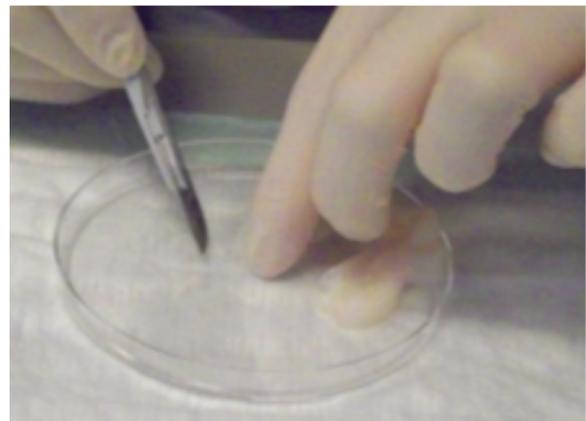
Zelllinie	Laborbezeichnung
UC-SC1	UC-SC 5C
UC-SC2	UC-SC 2-2
UC-SC3	UC-SC 5B
UC-SC4	UC-SC 4C
UC-SC5	UC-SC 3A
USSC1	SA8-25
USSC2	SA8-77N
USSC3	SA4-101
USSC4	SA5-73
USSC5	SA5-03
CB-SC1	USSC 120a
CB-SC2	USSC 63
CB-SC3	SA 6-51
CB-SC4	SA12-11NCR
BM-SC1	KM 9-14MNC
BM-SC2	KM 114
BM-SC3	KM 8-06VB
BM-SC4	KM 8-10
BM-SC5	KM 111
BM-SC6	KM 10-05 B
BM-SC7	KM 120



Die Nabelschnur und die Nabelschnurvene wurden mit PBS gespült.



Die Nabelschnur wurde der Länge nach aufgeschnitten...



... und in kleine Stücke geschnitten.

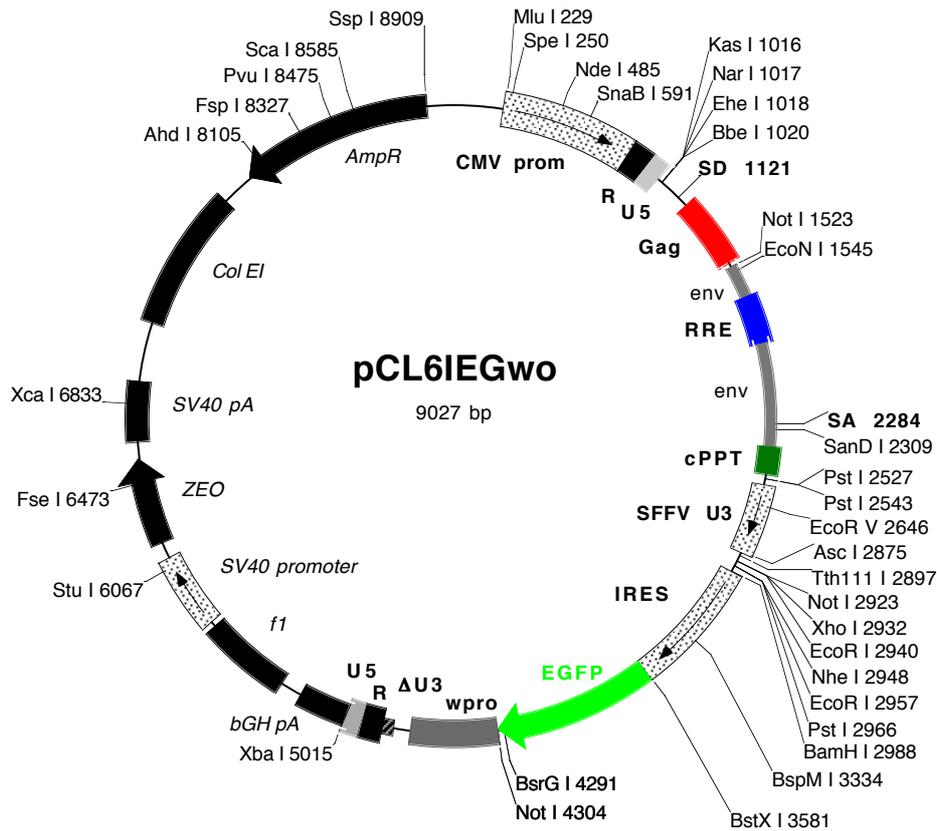


Generierung von UC-SC Zelllinien aus **einzelnen** Nabelschnurstücken.



Generierung einer UC-SC Zelllinie aus **mehreren** Nabelschnurstücken.

Abbildung A 1: Schema der Isolierung von UC-SC.



The following enzymes do not cut in pCL6IEGwo:

Age I	Blp I	BsaB I	BsiW I	BsmB I
BspE I	BstB I	BstE II	Bsu36 I	Cla I
Eco47 III	Esp I	Hpa I	Pac I	Pme I
Rsr II	Sfi I	Spl I	Srf I	Swa I
Xcm I				

Plasmid name: pCL6 IEGwo

Plasmid size: 9027 bp

Constructed by: Constanze Wiek

Construction date: 6'2007

Comments: Cut the WPRO element with BsrG I-Not I out of puc2MD9 EF1a WPRO

and cloned into pCL6IEG cut bsmB I, blundered with Klenow and then cut BsrG I.

IRES 2993-3580. EGFP 3581-4300 (720). WPRO 4307-4708. Corrected according

to sequencing 4708del11

Abbildung A 2: Vektorkarte des Klonierungsvektors pCL6IEGwo.

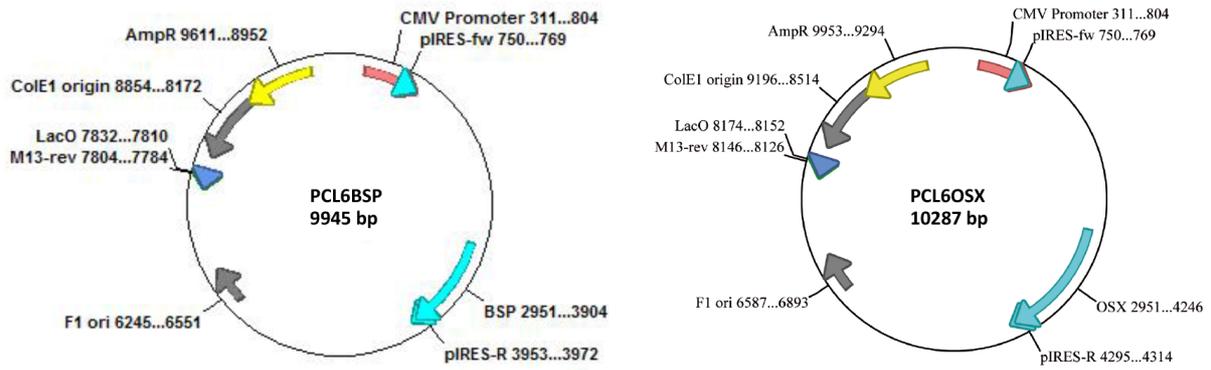


Abbildung A 3: Vektorkarten von pCL6IEGwo nach Klonierung von *BSP* und *OSX*.

BSP: integrin-binding/bone sialoprotein, *OSX*: osterix/transcription factor SP7

Tabelle A 2: Osteogene *in vitro* Differenzierung: Expression relevanter Gene.

Auflistung der Abbildung 3.10 zugrunde liegenden Expressionswerte Knochen-assoziiierter Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung.

BSP: integrin-binding/bone sialoprotein, *OSX*: osterix/transcription factor SP7, *BMP2/4*: bone morphogenetic proteins 2/4, *OC*: osteocalcin.

		<i>OSX</i>		<i>BSP</i>		<i>OC</i>		<i>BMP2</i>		<i>BMP4</i>	
		MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW
Saos-2	Tag 0	0,0021498		0,000333		0,000022		0,00076		0,07406	
UC-SC (n=5)	Tag 0	0,0000044	0,0000060	0,000002	0,000002	0,000008	0,000003	0,00012	0,00008	0,01023	0,00448
	Tag 14	0,0000006	0,0000007	0,000000	0,000000	0,000001	0,000002	0,00018	0,00019	0,00043	0,00046
USSC (n=5)	Tag 0	0,0000013	0,0000010	0,000013	0,000021	0,000012	0,000009	0,00045	0,00047	0,00003	0,00005
	Tag 3	0,0000012	0,0000007	0,000004	0,000007	0,000013	0,000007	0,00030	0,00032	0,00007	0,00014
	Tag 7	0,0000008	0,0000004	0,000004	0,000004	0,000012	0,000011	0,00049	0,00066	0,00004	0,00006
	Tag 10	0,0000015	0,0000006	0,000006	0,000006	0,000010	0,000007	0,00100	0,00116	0,00006	0,00008
	Tag 14	0,0000099	0,0000112	0,000005	0,000002	0,000017	0,000013	0,00131	0,00214	0,00003	0,00004
CB-SC (n=3)	Tag 0	0,0000019	0,0000010	0,000013	0,000011	0,000010	0,000003	0,00010	0,00005	0,00009	0,00011
	Tag 3	0,0000014	0,0000017	0,000002	0,000001	0,000008	0,000004	0,00027	0,00025	0,00022	0,00030
	Tag 7	0,0000032	0,0000033	0,000003	0,000002	0,000013	0,000006	0,00086	0,00078	0,00081	0,00127
	Tag 10	0,0000007	0,0000006	0,000019	0,000017	0,000015	0,000009	0,00093	0,00102	0,00083	0,00142
	Tag 14	0,0000008	0,0000010	0,000042	0,000041	0,000013	0,000010	0,00183	0,00156	0,00027	0,00022
BM-SC (n=3)	Tag 0	0,0000178	0,0000278	0,000285	0,000275	0,000048	0,000018	0,00031	0,00016	0,00279	0,00143
	Tag 3	0,0000014	0,0000013	0,000045	0,000013	0,000007	0,000004	0,00050	0,00025	0,00092	0,00082
	Tag 7	0,0000013	0,0000007	0,000036	0,000038	0,000009	0,000008	0,00084	0,00046	0,00253	0,00355
	Tag 10	0,0000022	0,0000019	0,000363	0,000710	0,000012	0,000006	0,00080	0,00020	0,00369	0,00442
	Tag 14	0,0000028	0,0000020	0,000372	0,000639	0,000016	0,000012	0,00107	0,00058	0,00275	0,00243

Tabelle A 3: Regulation der Genexpression nach Ko-Kultur.

Liste der 278 differentiell exprimierten Gene in USSC (n=3) nach 16 Stunden oder 5 Tagen Ko-Kultur mit CB-SC1 ermittelt durch *Affymetrix PrimeView™ human gene expression Microarrays*. In Abbildung A 4 werden alle Gene, die nach Ko-Kultur mehr als 2-fach stärker oder schwächer exprimiert wurden, dargestellt.

Probe Set ID	Gen	x-fache Regulation Tag 0 vs. 16 Std.	x-fache Regulation Tag 0 vs. Tag 5
11749852_s_at	FOS	-6,22	-12,22
11734658_s_at	FOS	-4,47	-7,03
11740838_a_at	FAM98B	-1,95	-2,44
11720520_s_at	PDE4DIP	-1,87	-1,26
11721307_at	PHLDA1	-1,75	-1,09
11762388_at	ZNF280D	-1,73	-2,40
11758625_s_at	GSTA4	-1,70	-1,33
11728705_at	COPG2	-1,69	-1,80
11745075_x_at	GSTA4	-1,67	-1,24
11721305_a_at	PHLDA1	-1,66	1,00
11727655_s_at	DST	-1,63	-2,42
11725674_at	HINT3	-1,61	-1,45
11726800_at	EBF1	-1,61	-1,56
11758842_at	THBS1	-1,59	-2,80
11730623_at	DSEL	-1,57	-1,74
11747220_a_at	COPG2	-1,55	-1,66
11759804_x_at	PDCD6	-1,54	-3,22
11759803_a_at	PDCD6	-1,53	-3,12
11731826_at	ZNF425	-1,52	1,03
11740896_s_at	C17orf91	-1,47	1,11
11724789_a_at	KIF3A	-1,47	-1,50
11725420_at	GRLF1	-1,46	-1,38
11744049_at	MAP1B	-1,46	-1,71
11756162_s_at	PPAP2B	-1,45	-1,50
11749307_x_at	CCNG1	-1,45	-1,26
11763888_at	SNORA33	-1,43	-2,99
11727595_at	KIAA2026	-1,43	-1,35
11756887_a_at	TENC1	-1,41	-1,78
11715739_s_at	PPAP2B	-1,41	-1,49
11720048_x_at	ARMCX1	-1,41	-1,50
11720047_a_at	ARMCX1	-1,38	-1,43
11723621_at	C7orf60	-1,38	-1,13
11722752_a_at	C14orf43	-1,35	-1,74
11758864_at	SRP19	-1,34	-2,77
11715693_s_at	CIRBP	-1,34	-1,41
11715388_s_at	CDKN1A	-1,34	1,21
11758100_s_at	C1S	-1,34	5,69
11758221_s_at	ARRDC3	-1,32	-1,57
11756233_a_at	AKIRIN2	-1,31	-1,09
11760780_at	ZAK	-1,30	-1,97
11727594_a_at	KIAA2026	-1,30	-1,34
11727687_s_at	KCTD18	-1,29	-1,32
11739458_at	SYNC	-1,29	1,32
11753923_at	LOC401093	-1,29	1,30
11724524_x_at	CDK5RAP2	-1,28	-1,16
11734141_at	GKS	-1,28	-1,62
11722606_s_at	CDC37L1	-1,28	-1,08
11736364_s_at	KIAA0586	-1,27	-1,68
11721956_at	RFX7	-1,26	-1,79
11740462_a_at	C8orf40	-1,26	-1,24
11745856_x_at	RNF145	-1,26	-1,55
11758809_at	RRAGC	-1,25	1,22
11748460_a_at	RHOBTB1	-1,25	-1,53
11735695_a_at	ARF5	-1,25	-1,07
11756291_a_at	CCDC53	-1,24	-1,30
11722690_at	SPTBN1	-1,24	-1,93
11717060_a_at	DECR1	-1,24	-1,32
11754984_s_at	MYH10	-1,24	-1,66
11740429_s_at	XRN1	-1,23	-1,60
11742699_a_at	C1R	-1,23	3,92
11747763_a_at	ADD1	-1,23	-1,36
11747496_x_at	USP19	-1,23	-1,02
11757668_s_at	SERF1A /// SERF1B	-1,22	-1,30
11744136_at	CADM4	-1,21	1,11
11753645_a_at	CFL1	-1,21	-1,53
11718457_at	STK11IP	-1,21	-1,28
11753646_x_at	CFL1	-1,21	-1,48
11734103_a_at	FGGY	-1,20	-1,37
11751353_a_at	RRAGC	-1,20	1,16
11754638_a_at	USP30	-1,20	-1,27
11725331_a_at	USP9X	-1,20	-1,70
11754158_a_at	CFL1	-1,20	-1,46
11744492_x_at	SRSF5	-1,20	-1,51
11723547_a_at	PEX1	-1,19	-1,51
11757980_s_at	EP400	-1,19	-1,58
11728646_at	NUCKS1	-1,18	-1,25
11727026_a_at	NDUFB5	-1,18	-1,27
11746872_a_at	COL1A1	-1,18	1,27
11753802_a_at	SRSF5	-1,18	-1,53
11726214_x_at	WWOX	-1,18	-1,26
11716689_s_at	GOLGA3	-1,17	-1,56
11723314_x_at	PXMP2	-1,16	-1,30
11737799_s_at	R3HDM1	-1,16	-1,25
11757499_s_at	C10orf26	-1,16	1,17
11719398_s_at	RRAGC	-1,16	1,21
11734079_x_at	LONP2	-1,15	-1,29
11756063_x_at	SRSF5	-1,15	-1,47
11727867_a_at	CLEC3B	-1,15	2,07
11761728_a_at	SMARCE1	-1,14	-1,85
11754477_x_at	GNL1	-1,14	1,03

Fortsetzung Tabelle A 3

Probe Set ID	Gen	x-fache Regulation Tag 0 vs. 16 Std.	x-fache Regulation Tag 0 vs. Tag 5
11729215_x_at	PIGX	-1,14	-1,45
200000_PM_s_at	PRPF8	-1,14	-1,36
11719365_x_at	SPATS2L	-1,14	-1,71
11745855_s_at	RNF145	-1,14	-1,38
11719593_at	RPRD2	-1,14	-1,43
11723548_x_at	PEX1	-1,13	-1,44
11720866_a_at	EIF2C1	-1,13	-1,35
11722289_a_at	ZBTB43	-1,13	-1,06
11759131_at	HIST1H2AG	-1,13	-3,35
11754761_x_at	HMGNI	-1,13	-1,21
11716084_at	SF3B1	-1,13	-1,27
11757956_s_at	PRTFDC1	-1,12	-1,69
11741107_a_at	MRPS14	-1,11	-1,29
11742657_x_at	HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	-1,11	1,90
11721835_s_at	TMEM14B	-1,11	-1,27
11757676_x_at	SHFM1	-1,11	-1,19
11715531_at	PRPF8	-1,10	-1,37
11748943_a_at	CHD4	-1,10	-1,38
11757388_x_at	SHFM1	-1,10	-1,21
11757323_x_at	TOP2B	-1,09	-1,38
11763259_x_at	CFL1	-1,09	-1,30
11742701_x_at	C1R	-1,09	4,29
11756967_x_at	SUCLG2	-1,08	-1,24
11716354_a_at	NDUFA11	-1,08	1,06
11716455_at	RHOBTB3	-1,08	-1,35
11737234_s_at	LOC162632 /// LOC220594 /// USP6	-1,07	-1,33
11756379_x_at	H3F3A /// LOC440926	-1,07	-1,14
11724205_x_at	SUMO1	-1,07	-1,18
11741789_a_at	NDUFB6	-1,07	-1,24
11763188_a_at	SNX5	-1,07	-1,69
11724491_at	NUDCD2	-1,07	-1,32
11725356_a_at	PRTFDC1	-1,06	-1,61
11723798_a_at	CSTF3	-1,06	-1,66
11723357_x_at	SRSF2IP	-1,06	-1,17
11739640_at	DIP2A	-1,06	-1,35
11750255_x_at	ARID1A	-1,06	-1,36
11757037_s_at	H3F3B	-1,05	-1,16
11716919_a_at	PDIA5	-1,05	-1,36
11757636_x_at	ATP5L	-1,05	-1,21
11732247_s_at	HNRNPC	-1,05	-1,52
11742679_s_at	HNRNPA2B1	-1,04	-1,29
11723799_x_at	CSTF3	-1,04	-1,66
11756337_x_at	HNRNPC	-1,04	-1,19
11717176_at	SNX27	-1,03	-1,17
11716369_x_at	SUMO2	-1,03	-1,13
200014_PM_s_at	HNRNPC	-1,03	-1,22
11759450_x_at	DDI2	-1,02	-1,39
11731480_a_at	SNRPB2	-1,02	-1,34
11728994_a_at	AZI2	-1,02	-1,31
11750022_a_at	LCORL	-1,02	-1,55
11719841_s_at	PHLDA3	-1,01	1,36
11727580_x_at	CSTF3	-1,01	-1,45
11722199_at	ADAM12	1,00	1,40
11758162_s_at	FDX1	1,00	-1,19
11763439_s_at	HNRNPU	1,00	-1,35
11731313_a_at	GCFC1	1,01	-1,24
11741092_a_at	GPD2	1,02	-1,28
11751219_x_at	GOLGA4	1,02	-1,24
11721132_at	HCFC1	1,02	-1,29
11719392_a_at	RNF14	1,02	1,20
11751701_a_at	TMX3	1,03	-1,37
11755281_a_at	TGFB1	1,03	1,47
11721679_a_at	RBM17	1,03	-1,12
11723200_s_at	HNRNPA3	1,04	-1,31
11721312_a_at	ATOX1	1,04	1,18
11754070_a_at	SSNA1	1,04	1,22
11726965_a_at	L3MBTL3	1,04	-1,74
11726238_s_at	TRIM36	1,04	1,09
11717240_at	RBBP4	1,05	-1,66
11760192_s_at	TMEM68	1,05	-1,35
11733725_a_at	CFB	1,05	1,89
11745411_a_at	TMX3	1,05	-1,38
11734550_x_at	TGFB1	1,05	1,37
11720945_x_at	SNRPA1	1,05	-1,27
11755709_s_at	LARP6	1,05	1,50
11742688_s_at	HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	1,05	2,33
11745884_a_at	UBE2Z	1,05	1,19
11716651_a_at	UBE2Z	1,05	1,19
11715294_s_at	HECTD2	1,06	-2,00
11756124_x_at	IKBK	1,06	-1,21
11725591_a_at	SPATA2	1,06	1,42
11739087_a_at	MESDC2	1,06	-1,19
11758459_s_at	API5	1,08	-1,12
11716218_s_at	PRKAB1	1,08	1,24
11715728_a_at	ITGB1	1,08	1,13
11755612_s_at	SNRPA1	1,09	-1,20
11746235_a_at	LIN37	1,10	1,54
11752509_s_at	PSAP	1,10	1,45
11727785_s_at	CACYBP	1,10	-1,07
11715445_a_at	DNAJB1	1,10	1,41
11719280_a_at	NAA10	1,12	1,29
11758140_s_at	CPSF6	1,13	-1,36

Fortsetzung Tabelle A 3

Probe Set ID	Gen	x-fache Regulation Tag 0 vs. 16 Std.	x-fache Regulation Tag 0 vs. Tag 5
11726365_a_at	ERIC1	1,13	1,24
11725579_s_at	BEND3	1,14	-1,44
11751675_s_at	AK2	1,14	1,23
11742925_a_at	C11orf59	1,15	1,41
11716983_at	CDC34	1,15	1,29
11757367_s_at	HSPA6 /// HSPA7	1,15	4,93
11750992_x_at	SHMT2	1,15	1,27
11750213_a_at	ADPRHL2	1,16	1,33
11722897_a_at	REV1	1,16	1,01
11733264_a_at	EML1	1,16	1,47
11742287_a_at	CHAC1	1,16	1,72
11736280_at	SLC22A3	1,16	1,39
11724373_a_at	GSK3A	1,16	1,27
11749555_a_at	MAP2K1	1,17	1,28
11755048_a_at	MED22	1,17	1,23
11738829_x_at	C1orf109	1,18	1,32
11758547_s_at	EML1	1,19	1,47
11758558_s_at	ATP2A2	1,19	1,05
11746438_a_at	SHMT2	1,19	1,41
11754527_a_at	RQCD1	1,19	-1,02
11736086_a_at	HHIP	1,19	-1,68
11760170_x_at	SNRPB	1,20	1,21
11749300_x_at	WDR77	1,20	1,17
11720468_x_at	DPAGT1	1,20	1,24
11732768_at	RNF152	1,21	-1,36
11744541_a_at	CXCR7	1,21	1,02
11753649_s_at	SRSF3	1,21	1,23
11715902_a_at	DDX23	1,22	1,42
11754105_x_at	SNRPB	1,22	1,24
11724079_s_at	E2F2	1,23	-1,21
11733147_at	ZFP161	1,23	1,01
11755368_a_at	MSH6	1,24	-1,25
11752314_a_at	ATF7IP	1,25	-1,44
11745202_a_at	RMI1	1,25	1,02
11732434_at	ZNF250	1,26	1,48
11739106_a_at	TMEM33	1,26	1,15
11736405_a_at	DNMT1	1,26	-1,13
11750638_a_at	SF3A1	1,26	1,12
11757443_s_at	C18orf55	1,26	1,10
11736675_a_at	SNRPB	1,27	1,29
11730930_a_at	IKBK	1,27	1,35
11743468_at	DKC1	1,27	1,19
11719636_a_at	NUP153	1,28	1,08
11720969_a_at	GART	1,28	1,30
11761622_x_at	TIPIN	1,29	-1,13
11739198_a_at	DDX52	1,29	1,42
11756564_a_at	AUP1	1,29	1,45
11720313_a_at	ATP6V0B	1,30	1,37
11756187_s_at	RPA2	1,31	1,13
11758020_s_at	EIF5	1,31	1,88
11746556_a_at	SLBP	1,31	1,01
11749528_a_at	CDCA7	1,32	-1,37
11725074_a_at	FAM126A	1,33	1,70
11743066_s_at	PTDSS1	1,33	1,37
11756674_s_at	STRBP	1,33	1,01
11751697_a_at	NAA50	1,34	1,30
11720523_at	RRP9	1,34	1,43
11742997_x_at	MCM3	1,35	-1,14
11716799_at	FADD	1,35	1,44
11742996_a_at	MCM3	1,36	-1,01
11748174_x_at	MCM3	1,37	-1,17
11758572_s_at	HELLS	1,38	-1,07
11753017_s_at	HSPD1	1,39	1,35
11743041_a_at	STIP1	1,39	1,53
11749478_a_at	MCM3	1,40	-1,18
11724307_x_at	ORAOV1	1,40	1,49
11755876_a_at	IFRD2	1,40	1,47
11748596_a_at	KLHL2	1,40	1,49
11718276_x_at	IFRD2	1,41	1,49
11717548_a_at	BTBD10	1,44	1,58
11747820_x_at	UPP1	1,45	2,22
11727883_a_at	AP3M2	1,45	1,59
11747276_a_at	AKAP1	1,47	1,19
11758478_s_at	CDCA7	1,50	-1,60
11747253_a_at	UNG	1,51	-1,37
11756885_a_at	ATAD2	1,55	1,11
11719388_x_at	MAFK	1,55	1,95
11716417_a_at	UNG	1,55	-1,43
11731068_s_at	FIGNL1	1,56	1,10
11739615_at	CD3EAP	1,58	1,31
11728300_at	CCNE2	1,61	-1,41
11728301_a_at	CCNE2	1,70	-1,34
11747162_a_at	FLT1	1,73	2,91
11726566_a_at	EIF4G1	1,74	1,58
11758071_s_at	SULF1	1,86	3,28
11757865_a_at	GADD45B	1,87	2,67
11745531_a_at	MARCH3	1,89	1,91
11723635_s_at	MMP3	2,04	7,78
11729020_at	ZNF804A	2,08	3,71
11716631_s_at	SERPINB2	2,32	10,82
11729385_at	FOXF1	2,38	4,61
11744770_a_at	HOXA11	2,67	4,70
11740290_a_at	HOXC6	2,70	4,27
11730130_at	HOXD10	4,01	7,96
11735303_a_at	HOXA11	4,09	7,75
11725603_a_at	HOXA10 /// HOXA9	6,60	11,89

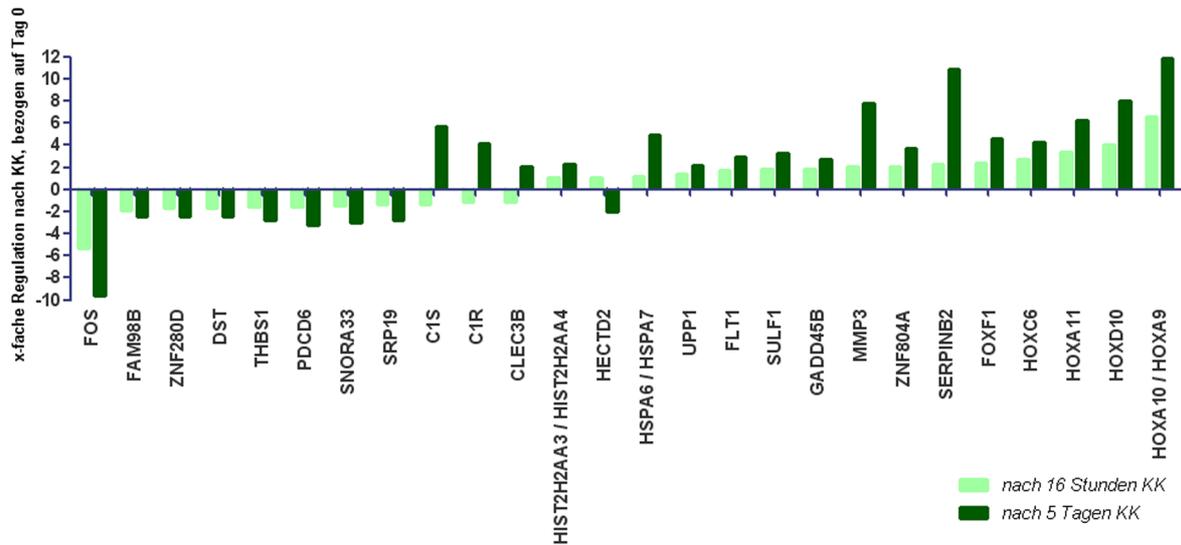


Abbildung A 4: Microarray Genexpressionsanalyse nach Ko-Kultur.

3 USSC Zelllinien wurden mit einer CB-SC Zelllinie für 16 Stunden bzw. 5 Tage ko-kultiviert, anschließend wurde der Einfluss auf die Genexpression der USSC untersucht. Nach Normalisierung und statistischer Auswertung ergaben sich 278 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene. Davon werden hier alle Gene dargestellt, die eine um das 2-fache stärkere bzw. schwächere Expression im Vergleich zu den Zellen vor Ko-Kultur (Tag 0) aufwiesen. Falls für ein Gen mehrere Sonden vorhanden waren, wurde der Mittelwert gebildet.

KK: Ko-Kultur, verwendete Zelllinien: USSC2, 3 und 4; CB-SC 1. *C1R/S*: complement component 1, r/s subcomponent; *CLEC3B*: C-type lectin domain family 3, member B; *DST*: dystonin; *FAM98B*: family with sequence similarity 98, member B; *FLT1*: fms-related tyrosine kinase 1; *FOS*: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; *FOXF1*: forkhead box F1; *GADD45B*: growth arrest and DNA-damage-inducible, beta; *HECTD2*: HECT domain containing 2; *HIST2H2A A3/4*: histone cluster 2, H2aa3/4; *HOXA9/10/11*: homeobox A9/10/11; *HOXC6*: homeobox C6; *HOXD10*: homeobox D10; *HSPA6/7*: heat shock 70kDa protein 6/7; *MMP3*: matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase); *PDCD6*: programmed cell death 6; *SERPINB2*: serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2; *SNORA33*: small nucleolar RNA, H/ACA box 33; *SRP19*: signal recognition particle 19kDa; *SULF1*: sulfatase 1; *THBS1*: thrombospondin 1; *UPP1*: uridine phosphorylase 1; *ZNF280D/804A*: zinc finger protein 280D/804A.

Tabelle A 4: DAVID Cluster Analyse der nach Ko-Kultur differentiell regulierten Gene.

Auflistung der *GO-Terms* und der zugehörigen Gene nach DAVID-Auswertung der Microarray Genexpressionsanalysen von USSC nach Ko-Kultur mit CB-SC. Abbildung 3.21 stellt die Genexpression grafisch dar.

GO: gene ontology, Gennamen siehe *Abbildung 3.21*.

Annotation Cluster 9: GO Term	Gene Ontology Biological Process	zugeordnete Gene, reguliert durch Ko-Kultur
GO:0009954	<i>proximal/distal pattern formation</i>	<i>HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0007389	<i>pattern specification process</i>	<i>HOXC6, SF3B1, FLT1, KIF3A, HOXA11, FOXF1, HOXA10, HOXA9, HHIP, HOXD10</i>
GO:0009952	<i>anterior/posterior pattern formation</i>	<i>HOXC6, SF3B1, KIF3A, HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0003002	<i>regionalization</i>	<i>HOXC6, SF3B1, KIF3A, HOXA11, HOXA10, HOXA9, HHIP, HOXD10</i>
GO:0030326	<i>embryonic limb morphogenesis</i>	<i>HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0035113	<i>embryonic appendage morphogenesis</i>	<i>HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0048598	<i>embryonic morphogenesis</i>	<i>HOXA11, FOXF1, CFL1, GRLF1, HOXA10, HOXA9, PPAP2B, HOXD10</i>
GO:0001501	<i>skeletal system development</i>	<i>HOXC6, CLEC3B, HOXA11, HOXA10, HOXA9, COL1A1, HOXD10, WWOX</i>
GO:0035108	<i>limb morphogenesis</i>	<i>HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0035107	<i>appendage morphogenesis</i>	<i>HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0048736	<i>appendage development</i>	<i>HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0060173	<i>limb development</i>	<i>HOXA11, HOXA10, HOXA9, HOXD10</i>
GO:0043565	<i>sequence-specific DNA binding</i>	<i>HOXC6, FOS, HOXA11, FOXF1, HNRNPA2B1, HOXA10, HOXA9, HSPD1, MAFK, HOXD10</i>
Annotation Cluster 29: GO Term	Gene Ontology Biological Process	zugeordnete Gene, reguliert durch Ko-Kultur
GO:0001501	<i>skeletal system development</i>	<i>HOXC6, CLEC3B, HOXA11, HOXA10, HOXA9, COL1A1, HOXD10, WWOX</i>
GO:0048705	<i>skeletal system morphogenesis</i>	<i>HOXA11, COL1A1, HOXD10, WWOX</i>
GO:0060348	<i>bone development</i>	<i>HOXA11, COL1A1, WWOX</i>

12 Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Gesine Kögler für die Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, sowie für die stetige Forderung und Förderung.

Für die Übernahme der Zweitbetreuung möchte ich mich bei Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt bedanken.

Der Jürgen Manchot Stiftung danke ich für die Vergabe des Promotionsstipendiums.

Katharina Raba der Core Flow Cytometry Facility danke ich für die Durchführung der Zellsortierung, dem Team des HLA-Labors für die Sequenzierungen.

Meinen aktuellen und früheren Kollegen der „Forschung und Routine“ – Lutz, Teja, Anja, Magda, Tatiana, Andrea, David, Justyna, Andrey, Simon, Karen, Anastasia, Julia, Sabine, Maria, ... – danke ich für die Unterstützung und Ablenkung, für gute Laune, entspannende Mittagspausen, Hilfsbereitschaft, fachliche und nicht-fachliche Diskussionen.

Besonders danken möchte ich Daniela Stapelkamp für die stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Stimmung im Labor und Dr. Stefanie Liedtke für die Unterstützung während der Zeit meiner Promotion sowie für die Korrektur der Arbeit.

Meinen Freunden – im Besonderen Fredi, Amelie und Eva – danke ich für Interesse und Motivation, auch aus der Ferne, vor allem aber für die nötige Ablenkung. Eva und Amelie danke ich zudem für die Korrekturen der Arbeit.

Der größte Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich während der ganzen Zeit meines Studiums und meiner Promotion unterstützt und den Stress ein wenig abgefangen haben.

13 Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, 06.05.2013

(Julia Bosch)