

**Untersuchungen zur osteogenen  
Differenzierung auf  
mRNA- und microRNA-Ebene**

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

**vorgelegt von  
Sabine Krause  
aus Dresden**

**Mai 2008**

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. P. Wernet  
Korreferent: Prof. Dr. D. Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2008

*Wunder stehen nicht im Gegensatz zur Natur,  
sondern im Gegensatz zu dem,  
was wir über die Natur wissen.*

St. Augustin

(Apostel von England und  
erster Erzbischof von Canterbury)

**Meinen Eltern**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>vii</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Stammzellen .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Embryonale Stammzellen .....	2
1.1.2 Adulte Stammzellen .....	4
<b>1.2 Osteogene Differenzierung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 MicroRNAs .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>17</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Zelllinien .....	19
2.1.2 Kits .....	19
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien .....	20
2.1.4 Zellkultur- und Bakterienmedien, Lösungen, Puffer .....	22
2.1.5 Verbrauchsmittel .....	24
2.1.6 Geräte .....	25
2.1.7 Software .....	26
2.1.8 Herstellerliste .....	26
2.1.9 DNA-Oligonukleotide .....	28
2.1.9.1 Oligo-dT-T7-Primer .....	28
2.1.9.2 Primer für quantitative <i>Real-time</i> -PCR .....	28
2.1.9.3 Kolonie-PCR- und Sequenzierprimer .....	31
2.1.9.4 Sonden für Northern Blot .....	31
2.1.9.5 miRNA- <i>Stemloop</i> -Oligonukleotide .....	32
2.1.9.6 Oligonukleotide für Luciferase-Assays .....	32
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.2.1 Kultivierung der USSC, MSC und DH1 .....	33
2.2.2 Kultivierung der HeLa- und 293T-Zellen .....	33
2.2.3 Osteogene Differenzierung .....	34
2.2.4 Alizarinrot-Färbung .....	34

---

2.2.5	RNA-Isolierung.....	34
2.2.5.1	Isolierung mit mirVana miRNA Isolation Kit .....	34
2.2.5.2	Isolierung mit RNeasy Mini Kit .....	35
2.2.5.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung .....	35
2.2.6	DNase-Verdau .....	35
2.2.7	Globale Genexpressionsanalyse .....	35
2.2.7.1	Amplifizierung der RNA-Proben.....	36
2.2.7.2	Hybridisierung und Auswertung der Microarrays .....	39
2.2.8	Reverse Transkription.....	42
2.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
2.2.9.1	Block-PCR .....	43
2.2.9.2	Quantitative <i>Real-time</i> -Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....	44
2.2.9.3	qPCR mit SYBR Green.....	45
2.2.9.4	microRNA-qPCR (330plex-Assay).....	47
2.2.9.5	TaqMan-MicroRNA-Assay .....	49
2.2.9.6	Auswertung der qPCR .....	49
2.2.10	Agarosegel-Elektrophorese .....	51
2.2.10.1	RNA-Agarosegel-Elektrophorese.....	51
2.2.10.2	DNA-Agarosegel-Elektrophorese.....	52
2.2.11	Northern Blot.....	52
2.2.12	Plasmide .....	53
2.2.12.1	Restriktionsverdau .....	55
2.2.12.2	Herstellung elektrokompetenter Bakterien <i>E. coli</i> SURE .....	56
2.2.12.3	Klonierung der Plasmide.....	56
2.2.12.4	Transformation durch Elektroporation.....	56
2.2.12.5	Kolonie-PCR.....	57
2.2.12.6	Mini-Plasmidpräparation .....	58
2.2.12.7	Maxi-Plasmidpräparation .....	58
2.2.12.8	Sequenzierung.....	58
2.2.13	Luciferase-Assay .....	59
2.2.14	Überexpression von miRNAs .....	61
2.2.14.1	Transiente Transfektion .....	61
2.2.14.2	Stabile Transfektion .....	61

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>Globale Genexpressionsanalysen proteinkodierender Gene</b> .....	<b>64</b>
3.1.1	Qualität und Integrität der RNA.....	64
3.1.2	Auswertung der globalen Genexpressionsanalysen .....	67
3.1.3	Vergleich der USSC SA503 und MSC K111 (undifferenziert).....	69
3.1.4	Globale Genexpressionsanalysen der osteogenen Differenzierung ....	70
3.1.4.1	Analyse der USSC SA503 .....	70
3.1.4.2	Analyse der MSC K111 .....	75
3.1.4.3	Analyse der DH1.....	78
3.1.4.4	Vergleichende Analyse der osteogenen Differenzierungen .....	79
3.1.4.5	Auswertung der Microarray-Daten mit der DAVID-Datenbank.....	92
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen auf miRNA-Ebene</b> .....	<b>93</b>
<b>3.3</b>	<b>Korrelation der mRNA- und miRNA-Daten</b> .....	<b>100</b>
3.3.1	miRNAs und ihre Hostgene .....	100
3.3.2	miRNAs und ihre Zielgene .....	101
<b>3.4</b>	<b>Funktionelle Analysen</b> .....	<b>104</b>
3.4.1	Luciferase-Assay zur Überprüfung von miRNA-mRNA-Interaktionen	104
3.4.2	Überexpression von miRNAs .....	108
3.4.2.1	Virale Überstände und Infektion.....	109
3.4.2.2	Analyse der infizierten HeLa-Zellen .....	110
3.4.2.3	qPCR-Analyse der infizierten HeLa-Zellen .....	113
3.4.2.4	Virale Infektion von USSC SA503.....	115
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>118</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>144</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>145</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>157</b>

Danksagung

Erklärung

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa-UTP	Aminoallyl-Uridintriphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	<i>copy</i> DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cRNA	<i>copy</i> RNA
CSC	<i>cancer stem cell</i> (Tumorstammzelle)
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Dexamethason, Ascorbinsäure und β-Glycerolphosphat
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integration Discovery</i>
dCt	delta Ct-Wert
ddCt	delta delta Ct-Wert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNMP	Desoxyribonukleotid-Monophosphat
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dx	Tag x
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
EC-Zelle	<i>embryonic cancer cell</i> (embryonale Tumorzelle)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz
EG-Zelle	<i>embryonic germ cell</i> (embryonale Keimzelle)
ENSG	<i>Ensemble Gene</i>
ES-Zelle	<i>embryonic stem cell</i> (embryonale Stammzelle)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FAK	<i>focal adhesion kinase</i> (Fokale Adhäsionskinase)
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
fwd	<i>forward</i> (vorwärts)
g	Gramm
G	Guanin
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>

---

GO	<i>gene ontology</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde(n)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> (hämatopoietische Stammzelle)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITZ	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
kb	Kilobasen
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes</i>
l	Liter
LB-Medium	Lennox-Broth-Medium
LNA	<i>locked nucleid acid</i>
μ	mikro
m	milli
M	molar (mol/l)
MAQC	<i>Microarray Quality Control</i>
Mbp	Millionen Basenpaare
mRNA	<i>messenger RNA</i>
min	Minute(n)
miR-/miRNA	microRNA
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	3-N-(Morpholino)-Propansulfonsäure
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> (mesenchymale Stammzelle)
n	nano
n	Versuchsanzahl
NS	<i>Nonsense</i>
nt	Nukleotid(e)
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm Wellenlänge
p.A.	<i>pro analysi</i> (zur Analyse)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Puffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
qPCR	quantitative <i>Real-time</i> -PCR
rev	<i>reverse</i> (rückwärts)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
S/N	<i>Signal/Noise</i> (Signal über Hintergrund)
SSC	Puffer mit Natriumchlorid und Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA (Puffer)
TE	Tris-EDTA

---

TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	<i>units</i>
U	Uracil
USSC	<i>unrestricted somatic stem cell</i> (unrestringierte somatische Stammzelle)
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
vs.	versus
w(1-3)	Internet-Referenz

### Abkürzungen der Gene

Ago	Argonaut
ALPL	Alkalische Phosphatase
BACH1	<i>BTB and CNC homolog 1</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
CALM	Calmodulin
CEBP(D)	<i>CCAAT/enhancer binding protein (delta)</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CITED2	<i>Cbp/p300-interacting transactivator 2</i>
CLIC4	<i>Chloride intracellular channel protein 4</i>
CTDSP2	<i>Small CTD phosphatase 2</i>
CTDSP1	<i>CTD small phosphatase-like protein</i>
DLX2	<i>Homeobox protein DLX-2</i>
DSCR1	<i>Down syndrome critical region protein 1 (Calcipressin)</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELMO3	<i>Engulfment and cell motility protein 3</i>
EMD	Emerin
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FOXP1	<i>Forkhead box protein P1</i>
GABRE	<i>GABA A receptor epsilon</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GATA6	<i>GATA-binding factor 6</i>
GILZ	<i>Glucocorticoid-induced leucine zipper protein</i>
HOXC9	<i>Homeobox protein Hox-C9</i>
IBSP	<i>Bone sialo protein 2</i>
ID	<i>DNA-binding protein inhibitor</i>
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
IGFBP2	<i>Insulin like growth factor binding protein 2</i>
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>

---

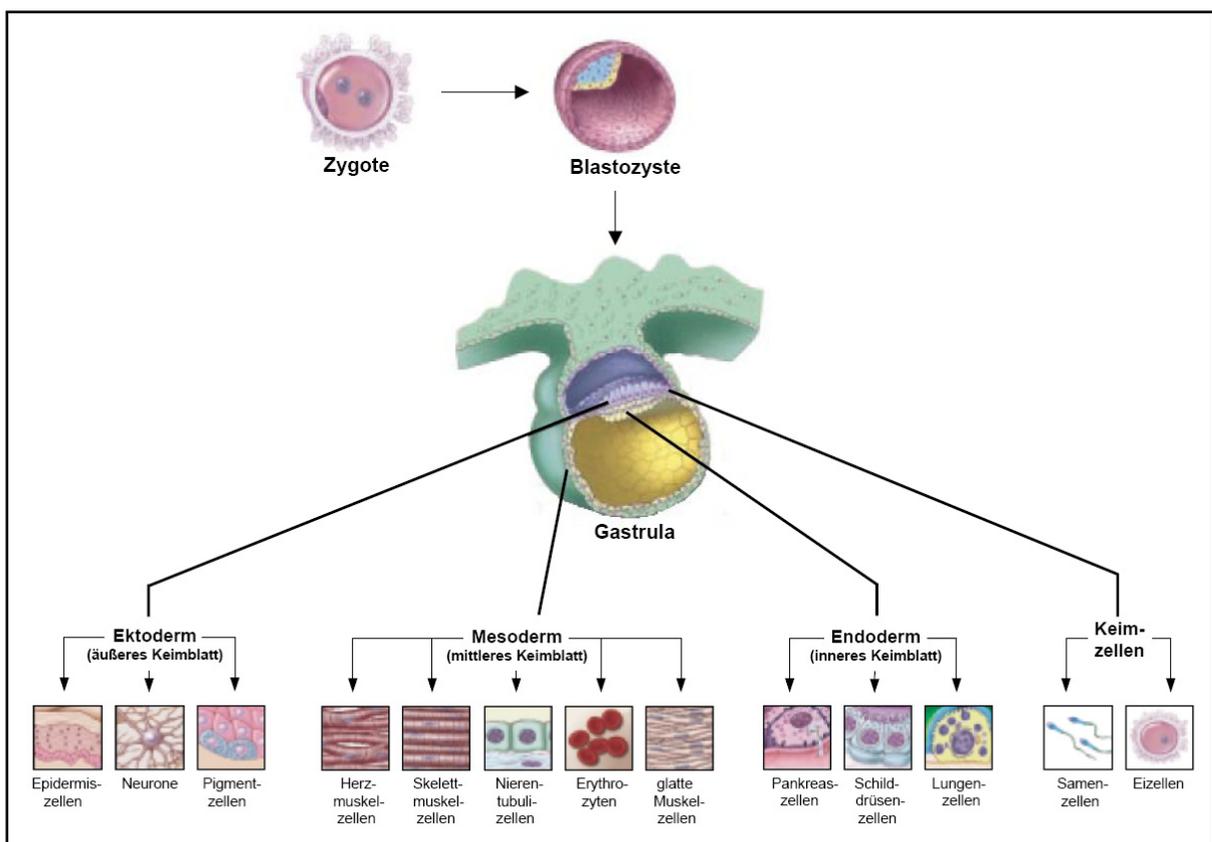
IL	Interleukin
ILF2	<i>Interleukin enhancer binding factor 2</i>
ISGF3G	<i>Interferon stimulated gene factor 3 gamma</i>
JUN	<i>Transcription factor AP-1</i>
LEMD1	<i>LEM domain-containing protein 1</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCM	<i>Minichromosome maintenance protein</i>
MEST	<i>Mesoderm-specific transcript homolog protein</i>
MyoD	<i>Myoblast determination protein</i>
Nanog	<i>Homeobox protein Nanog</i>
NFKBIA	<i>NF-kappaB inhibitor alpha</i>
NFYC	<i>Nuclear transcription factor Y subunit gamma</i>
Oct-4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
PBGD	<i>Porphobilinogen-Desaminase</i>
PITX2	<i>Pituitary homeobox 2</i>
PLAUR	<i>Urokinase plasminogen activator surface receptor precursor</i>
PMF1	<i>Osteocalcin (Polyamine modulated factor 1)</i>
POSTN	<i>Periostin</i>
PPAR $\gamma$ 2	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma 2</i>
PTK9	<i>Protein tyrosine kinase 9</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SERPINB2	<i>Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2)</i>
SH3RF1	<i>SH3 multiple domains 2</i>
SIX1	<i>Homeobox protein SIX1</i>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
Sox2	<i>SRY related HMG box gene 2</i>
SP7	<i>Osterix (Transcription factor SP7)</i>
SPARC	<i>Osteonectin (Secreted protein acidic and rich in cysteine)</i>
SPP1	<i>Osteopontin (Secreted phosphoprotein 1)</i>
SSEA	<i>Stage specific embryonic antigen</i>
TB114	<i>Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4 protein</i>
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TRA-1	<i>Tumor rejection antigen 1</i>
TRBP	<i>Transactivating response RNA-binding protein</i>
TRPM3	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3</i>
Wnt	<i>Wingless Int-1</i>
WWP2	<i>WW domain-containing protein 2</i>
ZNF	<i>Zinkfingerprotein</i>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich durch asymmetrische Zellteilung einerseits ständig selbst erneuern und andererseits Tochterzellen produzieren können, die weiter ausdifferenzieren. Je nach Herkunft werden sie in embryonale und adulte Stammzellen und je nach Differenzierungspotenzial in toti-, pluri-, multi- oder oligopotente Stammzellen eingeteilt.

Eine befruchtete Eizelle (Zygote) ist bis zum Achtzellstadium totipotent, weil sich aus jeder Zelle ein eigenständiges Lebewesen entwickeln kann. Aus der inneren Zellmasse der Blastozyste werden die so genannten embryonalen Stammzellen gewonnen. Sie sind in der Lage, in Zellen aller drei Keimblätter und zu Keimzellen zu differenzieren und sind somit pluripotent (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Differenzierung der Zygote in Zellen der verschiedenen Keimblätter.**

Aus der befruchteten Eizelle (Zygote) entwickelt sich die Blastozyste. Anschließend bilden sich die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) in der Gastrula aus. Aus den Keimblättern können u. a. die angegebenen Gewebezellen differenzieren. (Modifiziert nach Winslow, 2001)

Aus den drei Keimblättern Ektoderm (äußeres Keimblatt), Mesoderm (mittleres Keimblatt) und Endoderm (inneres Keimblatt) entwickeln sich nach der Gastrulation die verschiedenen Körperzellen. Aus dem Ektoderm bilden sich Haut, Nervengewebe, Nebennierenmark, Hypophyse, Bindegewebe von Kopf und Gesicht, Augen und Ohren. Das Mesoderm bildet Knochenmark, Blutzellen, Nebennierenrinde, Lymphgefäße, Skelett-, Herz- und glatte Muskeln, Knochen, Knorpel und Blutgefäße. Thymus, Kehlkopf, Luftröhre, Lunge, Leber, Pankreas und Schilddrüse bilden sich aus dem Endoderm.

Das Differenzierungspotential adulter Stammzellen ist im Vergleich zu embryonalen Stammzellen weiter eingeschränkt. Hämatopoietische Stammzellen bilden die verschiedenen Zellen des Blutsystems und gelten daher als multipotent. Wenn Stammzellen nur in wenige unterschiedliche Zellen differenzieren können, sind sie oligopotent. Zu diesen gehören z. B. neurale Stammzellen, aus denen Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten hervorgehen.

### **1.1.1 Embryonale Stammzellen**

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen, die man beim Menschen vom 4. bis zum 7. Tag nach der Befruchtung vorfindet. Danach differenzieren ES-Zellen und bilden die drei Keimblätter, die letztendlich in die ca. 200 verschiedenen Zelltypen differenzieren.

Die ersten humanen ES-Zellen wurden 1998 erfolgreich kultiviert (Thomson et al., 1998), 17 Jahre nachdem die ersten ES-Zellen aus Maus-Blastozysten isoliert wurden (Evans and Kaufman, 1981). Humane ES-Zellen lassen sich über bestimmte Marker wie Oct-4 (*Octamer binding transcription factor 4*), Nanog, Sox2 (*SRY related HMG Box gene 2*), SSEA-3 und -4 (*Stage specific embryonic antigen*) sowie TRA-1-60 und -81 (*Tumor rejection antigen*) charakterisieren.

Um die Differenzierung humaner ES-Zellen zu verhindern, erfolgte die Kultivierung anfangs auf Mausfibroblasten (*Feederlayer*) (Thomson et al., 1998). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden verschiedene Ansätze der Kultivierung untersucht und verbessert (Hoffman and Carpenter, 2005). Neben der Benutzung humaner *Feeder*-Zellen sind inzwischen auch *Feeder*-freie Kulturbedingungen etabliert worden (Skottman and Hovatta, 2006).

Das Differenzierungs- und theoretisch unendliche Regenerierungspotenzial macht ES-Zellen zu Hoffnungsträgern in der Medizin. Die gerichtete Differenzierung erzeugte u. a. neurale Zellen (Carpenter et al., 2001), Kardiomyozyten (Xu et al., 2002), Hämangioblasten (Lu et al., 2007), Knochenzellen (Sottile et al., 2003), Insulin-produzierende Zellen (Assady et al., 2001) und Hepatozyten (Schwartz et al., 2005). Die Transplantation von undifferenzierten ES-Zellen führt in Mäusen zur Teratombildung (Thomson et al., 1998; Fujikawa et al., 2005). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Xenotransplantation von undifferenzierten murinen ES-Zellen in Rattenhirne keine Tumoren auslöst, während dieselbe Zelllinie bei einer autologen Transplantation in Maushirne trotz neuraler Vordifferenzierung in Tumorbildung resultierte (Erdo et al., 2003). Bevor ES-Zellen beim Menschen zur therapeutischen Anwendung kommen können, muss daher gewährleistet sein, dass ausschließlich differenzierte ES-Zellen transplantiert werden, um das Risiko einer Teratombildung auszuschließen.

Ebenfalls zu den ES-Zellen gehören die embryonalen Keimzellen (*embryonic germ cells*, EG-Zellen), welche sich aus primordialen Keimzellen entwickeln. Humane EG-Zellen wurden erstmal 1998 isoliert (Shamblott et al., 1998). Zusätzlich zu den oben genannten Markern für ES-Zellen exprimieren EG-Zellen auch SSEA-1.

Des Weiteren wurden embryonale Krebszellen (*embryonic cancer cells*, EC-Zellen) identifiziert, welche Stammzellen aus Teratokarzinomen sind und das maligne Gegenstück zu ES-Zellen darstellen (Andrews et al., 2005). Teratokarzinome enthalten zum Teil Gewebe aus allen drei Keimblättern. Die maligne Wirkung von EC-Zellen in Mäusen konnte von Kleinsmith and Pierce (1964) gezeigt werden.

Die Gewinnung und der Einsatz humaner ES-Zellen in der Forschung sind ethisch bedenklich und werden kontrovers diskutiert. Das Gesetz zum Schutz von Embryonen verbietet seit 1990 den Missbrauch menschlicher Embryonen nach *In-vitro*-Fertilisation. Das Stammzellgesetz von 2002 (w1) regelt die Einfuhr und Verwendung embryonaler Stammzellen. Diese dürfen nur mit behördlicher Genehmigung verwendet werden und müssen vor dem 1. Januar 2002 erzeugt worden sein. Im April 2008 wurde dieser Stichtag auf den 1. Mai 2007 verschoben.

### 1.1.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen können nach ihrem ontogenetischen Alter weiter in fötale, neonatale und adulte Stammzellen unterteilt werden. Dabei bestehen gewisse Schwierigkeiten, Stammzellen mit dem Potenzial zur Selbsterneuerung von Vorläuferzellen, die sich nicht mehr selbst erneuern können, zu unterscheiden.

Fötale Stammzellen wurden in fötalem Blut und Organen, der Plazenta und im Amnion nachgewiesen. Fötalen hämatopoietischen und mesenchymalen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC und *mesenchymal stem cell*, MSC respektive) wird eine größere Proliferationskapazität und Differenzierungsfähigkeit nachgesagt als adulten HSC bzw. MSC (Guillot et al., 2006).

Im Nabelschnurblut befindet sich neben MSC und HSC eine weitere Stammzellpopulation, die so genannten unrestringierten somatischen Stammzellen (*unrestricted somatic stem cell*, USSC), die als neonatale Stammzellen gelten (Kögler et al., 2004). Sie wachsen adhärent und sind negativ für hämatopoietische Oberflächenantigene (*Cluster of differentiation* CD45 oder CD34), jedoch konnte die Expression u. a. der Adhäsionsmoleküle CD29, CD44 und CD49e auf ihrer Oberfläche nachgewiesen werden. USSC haben im Gegensatz zu MSC aus Nabelschnurblut längere Telomere und können ohne Verlust ihres Differenzierungspotenzials über mehr als 20 Passagen kultiviert werden. Sie können in Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden. USSC konnten *in vitro* in neurale, Knorpel-, Fett-, Herz-, Leber- und hämatopoietische Zellen differenziert werden. In verschiedenen *In-vivo*-Experimenten konnte die Differenzierung in neurale, Knorpel-, Herz- und Leberzellen nachgewiesen werden. USSC können durch Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat ins Medium osteogen differenziert werden. Sie zeigen nach ca. fünf Tagen Kalziumphosphat-Anlagerungen und exprimieren osteotypische Marker wie Alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Osteopontin und *Bone sialo protein*. *In-vivo*-Experimente zeigten, dass USSC in Ratten mit Knochenbrüchen, die aufgrund ihrer Größe nicht von selbst heilen (*critical size bone defect*) nach zwölf Wochen eine Wiederherstellung des Knochens ermöglichten (Kögler et al., 2004).

Inzwischen konnte man in ca. 20 Organen des menschlichen Körpers adulte Stammzellen nachweisen, z. B. im Knochenmark (Dawn and Bolli, 2005), in der

Retina (Coles et al., 2004), im Gehirn (Johansson et al., 1999), in der Haut (Slack, 2000), im Fettgewebe (Zuk et al., 2001), im Darm (Bach et al., 2000) und in der Leber (Herrera et al., 2006). Die Stammzellen ersetzen abgestorbene Zellen und sorgen so für den Erhalt des jeweiligen Gewebes. Adulte Stammzellen sind selten und schwer zu identifizieren und isolieren. Die Stamm-/Vorläuferzellen des Knochenmarks sind am besten untersucht, da es sich um eine gut zugängliche Quelle handelt. Dazu gehören HSC, MSC, endotheliale Stamm- und Vorläuferzellen (EPC), so genannte Seitenpopulationszellen und multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC) (Dawn and Bolli, 2005).

Als erste adulte Stammzelle wurde die hämatopoietische Stammzelle (HSC) definiert (Lewis and Trobaugh, 1964). HSC sind multipotent und in der Lage, sämtliche Blutzellen zu bilden. Diese haben zum Teil nur eine kurze Lebensdauer und müssen daher ständig nachgebildet werden. HSC können aus Knochenmark, peripherem Blut (nach Aktivierung mit G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*)) oder Nabelschnurblut gewonnen werden. HSC sind CD34-positive und *lineage-* (d. h. CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20- und CD56-) negative Zellen. Man kann sie nach ihrer CD38-Expression weiter unterteilen, wobei die CD38-negativen Zellen als die primitivsten gelten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse in verschiedene Blutzellen differenzieren (Bhatia et al., 1997). Die Transplantation von HSC wird erfolgreich bei hämatologischen Erkrankungen eingesetzt (Zubler, 2006).

MSC wurden erstmals 1968 beschrieben (Friedenstein et al., 1968). Typischerweise aus dem Knochenmark isoliert, fehlen ihnen die hämatopoietischen Oberflächenmarker CD34 und CD45 (Pittenger et al., 1999; Conget and Minguell, 1999). Zurückzuführen auf unterschiedliche Isolations- und Kultivierungsprotokolle variiert die Liste der exprimierten Oberflächenmarker. Das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* veröffentlichte daher die minimalen Kriterien, die eine Zelle erfüllen muss, um als MSC zu gelten (Dominici et al., 2006). Neben dem adhärenenten Wachstum und dem Nachweis der *In-vitro*-Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten, müssen sie die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 exprimieren.

MSC gelten als heterogene Population, weil *in vitro* nur ca. 30 % multipotent sind und als wahre MSC gelten (Kuznetsov et al., 1997). Bisher fehlen aber geeignete Marker, um diese Zellen zu isolieren.

Außer im Knochenmark existieren MSC auch in Fettgewebe (Park et al., 1999) und im Nabelschnurblut (Bieback et al., 2004). Die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen der anderen Keimblätter (Transdifferenzierung, Plastizität) zum Beispiel in neurale Zellen (Dezawa et al., 2004) oder Hepatozyten (Luk et al., 2005) ist umstritten. MSC bilden außerdem die Nische für HSC und somit die Grundlage für deren Wachstum und Differenzierung (Dexter, 1979). *In vivo* zeigten MSC in verschiedenen Tierversuchen die Reparatur von Knochendefekten (Bruder et al., 1994; Ohgushi et al., 1989).

Die Stammzellforschung ist aber nicht nur aus entwicklungsbiologischer und therapeutischer Sicht interessant, sondern spielt auch in der Tumorforschung eine Rolle. Die Theorie der Tumorstammzelle ist relativ neu. So soll es wie im gesunden Gewebe eine kleine Gruppe von Zellen (Tumorstammzellen, *cancer stem cells*, CSC) geben, die sich selbst erneuern und differenzieren können. Damit können sie das Tumorstadium auf unbestimmte Zeit aufrechterhalten. Die Therapieresistenz der CSC soll Rezidive und Metastasenbildung erklären (Ailles and Weissman, 2007). Woher diese Zellen kommen und wie sie konventionellen Therapien wie Chemotherapie entkommen, ist unklar. Die Aufklärung des Mechanismus oder die Entdeckung von CSC-spezifischen Markern wären ein weiterer Schritt, um bessere Erfolge in der Therapie zu erzielen.

Definiert werden CSC über ihre Fähigkeit, wiederholt stetig wachsende Tumore generieren zu können (Clarke et al., 2006). Dazu werden serielle Transplantationen in immunsupprimierten Mäusen durchgeführt. Für akute myeloische Leukämie (AML) wurden erstmalig CSC definiert. Bei Patienten mit AML überlebten die CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen die Therapie und wurden als CSC definiert (Bonnet and Dick, 1997). Auch in soliden Tumoren in der Brust (Al-Hajj et al., 2003), im Gehirn (Singh et al., 2003), im Pankreas (Li et al., 2007), im Darm (Dalerba et al., 2007), in der Prostata (Collins et al., 2005) und in der Lunge (Eramo et al., 2007) wurden inzwischen CSC nachgewiesen. Die meisten dieser CSC exprimieren CD133 und/oder CD44.

## 1.2 Osteogene Differenzierung

Das Skelett des menschlichen Körpers setzt sich aus über 200 langen Röhrenknochen sowie kurzen und flachen Knochen zusammen. Knochen bilden außerdem mit Gelenken die Hebel für den Muskelansatz und bieten mechanischen Schutz für Gehirn, Organe und Rückenmark (Pschyrembel, 2002). Neben Stütze und Schutz sind sie die Hauptquelle anorganischer Ionen und stabilisieren aktiv das Kalziumgleichgewicht. 99 % des Kalziums und 80 % des Phosphats im menschlichen Körper sind im Knochen gespeichert. Außerdem werden essentielle Ionen wie Magnesium, Kalium oder Carbonat gespeichert. Damit spielt der Knochen auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Säure-Base-Gleichgewichts des Körpers, da in Folge des Knochenabbaus auch Phosphat und Carbonat abgebaut werden, die als Puffer dienen und somit eine Azidose verhindern können (Felsenberg, 2001).

Knochen haben einen 30%igen organischen und einen 70%igen anorganischen Anteil. 95 % der organischen Matrix bildet Typ I-Kollagen, die restlichen 5 % verteilen sich auf Proteoglycan und andere nicht-kollagene Proteine wie zum Beispiel Osteokalzin, Osteonektin, Knochenproteoglykan und Sialoprotein. Diese sind für den Metabolismus des Knochengewebes und die Mineralisierung der Matrix wichtig. Durch die mineralisierte extrazelluläre Matrix weisen Knochen neben ihrer Festigkeit eine gewisse Elastizität auf. 95 % der anorganischen Substanz bildet Hydroxylapatit, die restlichen 5 % bilden Magnesium-, Natrium- und Kaliumfluoride und Chloride.

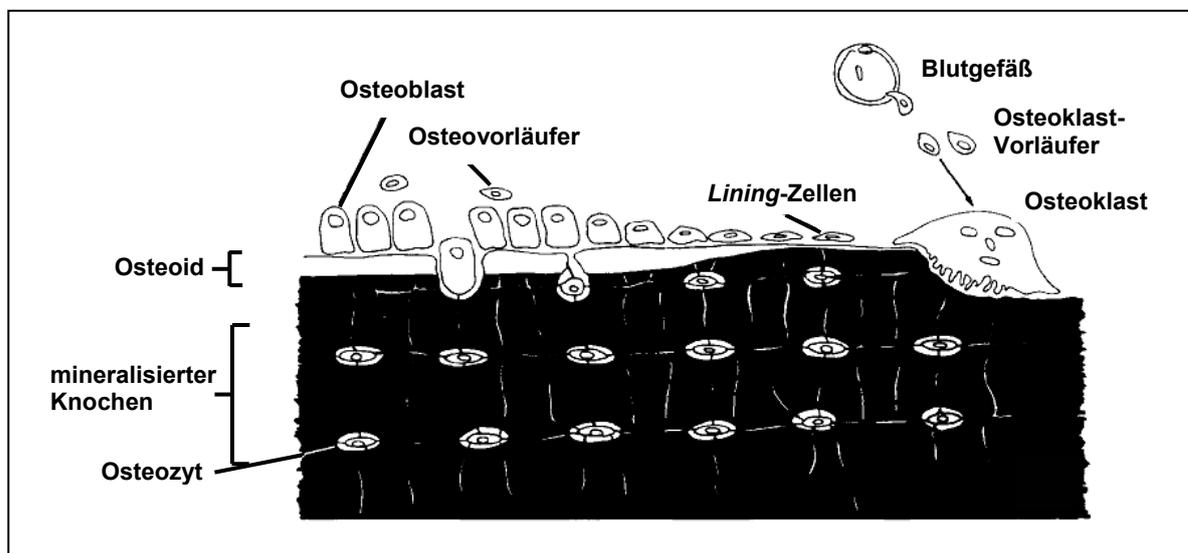
Knochen setzen sich aus verschiedenen Geweben zusammen. Den Knochen selbst umgibt eine eng anliegende Bindegewebshaut (Knochenhaut, Periost). Die eigentliche Knochensubstanz setzt sich aus der äußeren, festen *Substantia compacta* und der inneren, schwammartigen *Substantia spongiosa* zusammen, die neben ihren strukturellen auch funktionelle Unterschiede aufweisen. Die kompakte Substanz besteht aus dicht gepackten Kollagenfibrillen, die konzentrische Lamellen formen. Diese wiederum verlaufen in benachbarten Schichten senkrecht zueinander und bilden so eine feste Schutzschicht mit optimaler biomechanischer Stabilität. Die schwammartige Substanz hingegen ist locker und porös und dient dem Metabolismus. Im Inneren der Knochen befindet sich das Knochenmark. Es bleibt mit

zunehmendem Alter nur in wenigen Knochen erhalten und wird durch gelbes Fettmark ersetzt (Marks and Odgren, 2002).

Es gibt vier verschiedene Knochenzellen (Abbildung 1.2): Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und so genannte *Lining*-Zellen (ruhende Osteoblasten).

Osteoblasten sind ausdifferenzierte Zellen, die für die Bildung des Knochens verantwortlich sind. Sie sekretieren Typ I-Kollagen und andere Proteine und regulieren die Mineralisierung. Osteozyten sind mineralisierte Osteoblasten, die sich mit Matrixablagerungen umhüllen und so die nächste Osteozytenschicht bilden. Die Matrix wird damit undurchlässig. Osteozyten bilden vor der Mineralisierung zytoplasmatische Verbindungen mit benachbarten Zellen. Osteoblasten produzieren außerdem Faktoren, die die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten beeinflussen (Chambers, 2000). Unterhalb der Osteoblasten befindet sich immer eine Schicht unmineralisierter Knochenmatrix (Osteoid) (Marks and Popoff, 1988).

Außer den Osteoklasten entwickeln sich alle Zelltypen aus lokalen Osteovorläuferzellen. Osteoklasten hingegen entstehen durch Fusion mononukleärer Vorläuferzellen, die aus den hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen.



**Abbildung 1.2: Übersicht über die verschiedenen Knochenzellen.**

Aus Osteovorläufern entwickeln sich Osteoblasten, die sich durch Mineralisierung in Osteozyten umwandeln und somit für den Knochenaufbau verantwortlich sind. Osteoklasten stammen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie und bauen durch Resorption Knochen ab. *Lining*-Zellen sind ruhende Osteoblasten. (Modifiziert nach Marks and Popoff, 1988)

Osteoklasten sind große, multinukleäre Zellen, die dem enzymatischen und phagozytotischen Knochenabbau dienen und wiederum durch Produktion bestimmter Faktoren Osteoblasten rekrutieren und aktivieren können. Osteoklasten können sich wie Amöben fortbewegen und besitzen an ihrer Unterseite eine spezialisierte Zellmembran (Bürstensaum), die eine große Kontaktfläche bewirkt und für die Knochenresorption verantwortlich ist. Um den Bürstensaum befindet sich eine klare Zone, die Mikrofillament-reich und Organellen-frei ist und der Anhaftung an den Knochen dient. Die mineralisierten Matrixkomponenten werden durch einen erniedrigten pH-Wert von 4,5 abgebaut. Die freigesetzten proteolytischen Enzyme lösen die kollagene Knochenmatrix auf. Die entstehenden Kollagenfragmente werden anschließend phagozytiert. Osteoklasten hinterlassen auf dem Knochen eine charakteristische Struktur, die so genannten Howship-Lakunen (Felsenberg, 2001).

Die Entwicklung der Knochen (Ossifikation) kann direkt (desmal) oder indirekt (chondral) erfolgen (Felsenberg, 2001). Bei der desmalen Ossifikation differenzieren mesenchymale Zellen direkt in Osteoblasten, die anschließend mineralisieren. Auf diese Art werden Schädelhöhle, Gesichtsknochen und Teile des Kiefers und des Schlüsselbeins gebildet. Die chondrale Ossifikation bezeichnet die Bildung von Knochen auf mineralisiertem Knorpel.

Um den Erhalt der Knochen zu gewährleisten, herrscht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau. Die Regulation hierfür ist komplex und nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch führen Fehlregulationen zu Ungleichgewichten zwischen Auf- und Abbau und damit zum Beispiel zu Osteoporose.

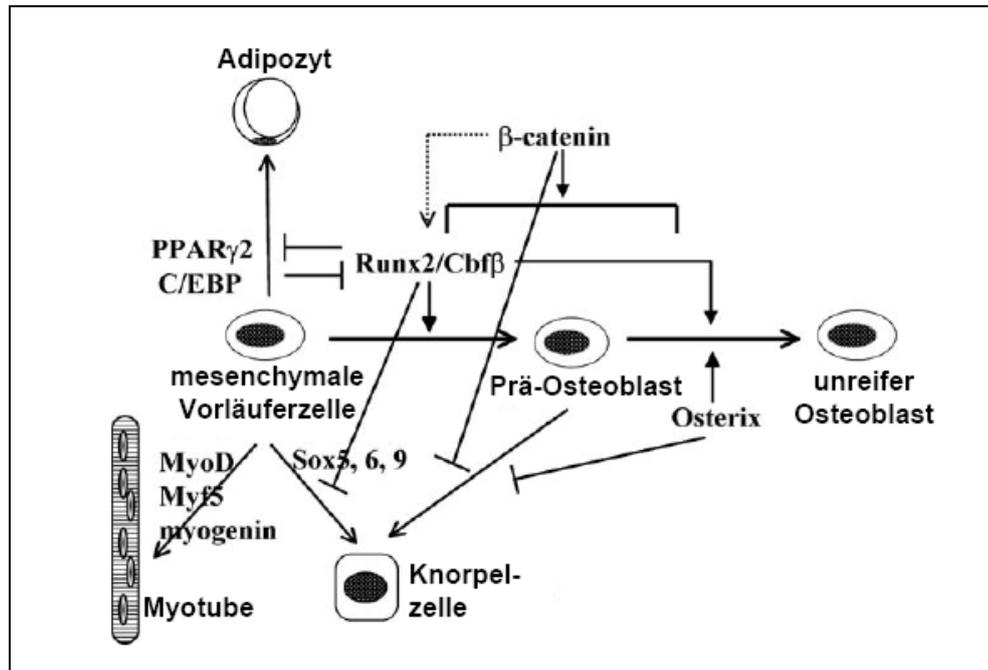
Die Induktion der osteogenen Differenzierung erfolgt durch Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat zum Zellkulturmedium (Jaiswal et al., 1997). Neben MSC können damit auch humane ES-Zellen in Osteoblasten differenziert werden (Bielby et al., 2004). Eine kontrollierbare Knochenbildung wäre für diverse Krankheiten wie Osteoporose oder schwerwiegende Knochenverletzungen von großem Nutzen. Bielby et al. (2004) konnten in Tierversuchen nachweisen, dass vordifferenzierte humane ES-Zellen in Mäusen Knochen bilden können. MSC werden für therapeutische Anwendungen bereits genutzt. Verschiedene klinische Studien mit *Osteogenesis imperfecta*-Patienten wurden in den vergangenen Jahren durchgeführt (Waese et al., 2008). Diese Erbkrankheit führt aufgrund einer Kollagenfehlbildung zu unvollständiger

Knochenbildung. Nach Transplantation von MSC konnte eine Verbesserung der Knochenstruktur nachgewiesen werden (Horwitz et al., 1999).

Mesenchymale Stammzellen sind in der Lage, in Adipoblasten, Chondroblasten und Osteoblasten zu differenzieren (Bianco et al., 2001). Der Differenzierungsprozess der Osteoblasten setzt sich aus mehreren Stadien zusammen, die zum Teil parallel stattfinden: Proliferation, Entwicklung der extrazellulären Matrix und Reifung sowie Mineralisierung. Inzwischen sind einige der relevanten Gene und Signalwege für die Osteoblastendifferenzierung charakterisiert. Die Regulation ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalwege. Eine Rolle spielen z. B. der MAPK (*Mitogen activated protein kinase*)-Signalweg (Franceschi et al., 2003), FAK (*Focal adhesion kinase*)-Signalweg (Salasnyk et al., 2007) und TGF $\beta$  (*Transforming growth factor beta*)-Signalweg (Moses and Serra, 1996). Außerdem sind der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Hedgehog-Signalweg beteiligt (Chung et al., 2001, Hu et al., 2005, Kang et al., 2007).

Ein essentieller Faktor, der die Differenzierung der Vorläufer in Osteoblasten steuert, ist Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*). Es ist aber kein „Mastergen“ wie PPAR $\gamma$ 2 (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma 2*) für die Adipozyten-Differenzierung aus MSC und es werden noch andere Transkriptionsfaktoren benötigt (Aubin and Triffitt, 2002). In Abbildung 1.3 ist eine Übersicht der wichtigsten Gene der verschiedenen Differenzierungen mesenchymaler Vorläuferzellen und ihre Interaktionen dargestellt.

Runx2, Osterix (SP7) und  $\beta$ -Catenin regulieren die osteogene Differenzierung, während verschiedene Sox-Gene die Knorpeldifferenzierung, MyoD-Transkriptionsfaktoren die Myotubendifferenzierung und PPAR $\gamma$ 2 und CEBP die Adipozytendifferenzierung steuern. Die meisten dieser Gene fördern eine Differenzierungsrichtung und inhibieren gleichzeitig andere Differenzierungsrichtungen. Runx2,  $\beta$ -Catenin und Osterix inhibieren die Knorpeldifferenzierung und Runx2 inhibiert gleichzeitig auch die Adipozytendifferenzierung.



**Abbildung 1.3: Regulation der Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen.**

PPAR $\gamma$ 2 gilt als Mastergen für die Adipozytendifferenzierung. Das hauptsächlich für die osteogene Differenzierung verantwortliche Gen ist Runx2. Später spielt Osterix eine große Rolle, da es die osteogene Differenzierung fördert und gleichzeitig die Knorpeldifferenzierung inhibiert. Auch Runx2 und  $\beta$ -Catenin gelten als Inhibitor der Knorpeldifferenzierung. Runx2 inhibiert außerdem die Adipozytendifferenzierung. (Modifiziert nach Komori, 2006)

Neben Runx2 und SP7, den für die osteogene Differenzierung essentiellen Faktoren, gibt es eine Reihe weiterer Gene, die als „Osteomarker“ gelten. Ihre Expression wird zum Nachweis der Differenzierung herangezogen. Zu ihnen gehören z. B. Alkalische Phosphatase (ALPL), *Bone sialo protein 2* (IBSP), Osteocalcin (*Polyamine-modulated factor 1*, PMF1), Osteonectin (*Secreted protein acidic and rich in cysteine*, SPARC) und Osteopontin (*Secreted phosphoprotein 1*, SPP1) (Kulterer et al., 2007).

Die Regulation von Genexpressionen erfolgt auf verschiedenen Wegen. Neben den Mechanismen des mRNA-Spleißing und der Polyadenylierung, der Chromationmodifikation sowie der Proteinmodifizierung und des -Abbaus, sind die Regulationsmechanismen der Transkriptionsfaktoren am besten untersucht (Chen and Rajewsky, 2007). Allgemeine und spezielle Transkriptionsfaktoren regulieren die gesamte Transkription von der Initiation über die Elongation bis zur Termination

(Lehninger Biochemie, 2001). Mit der Entdeckung der ersten microRNA im Jahr 1993 ergab sich, wie sich wenig später herausstellte, eine neue Art der Genregulation auf post-transkriptioneller Ebene.

### 1.3 MicroRNAs

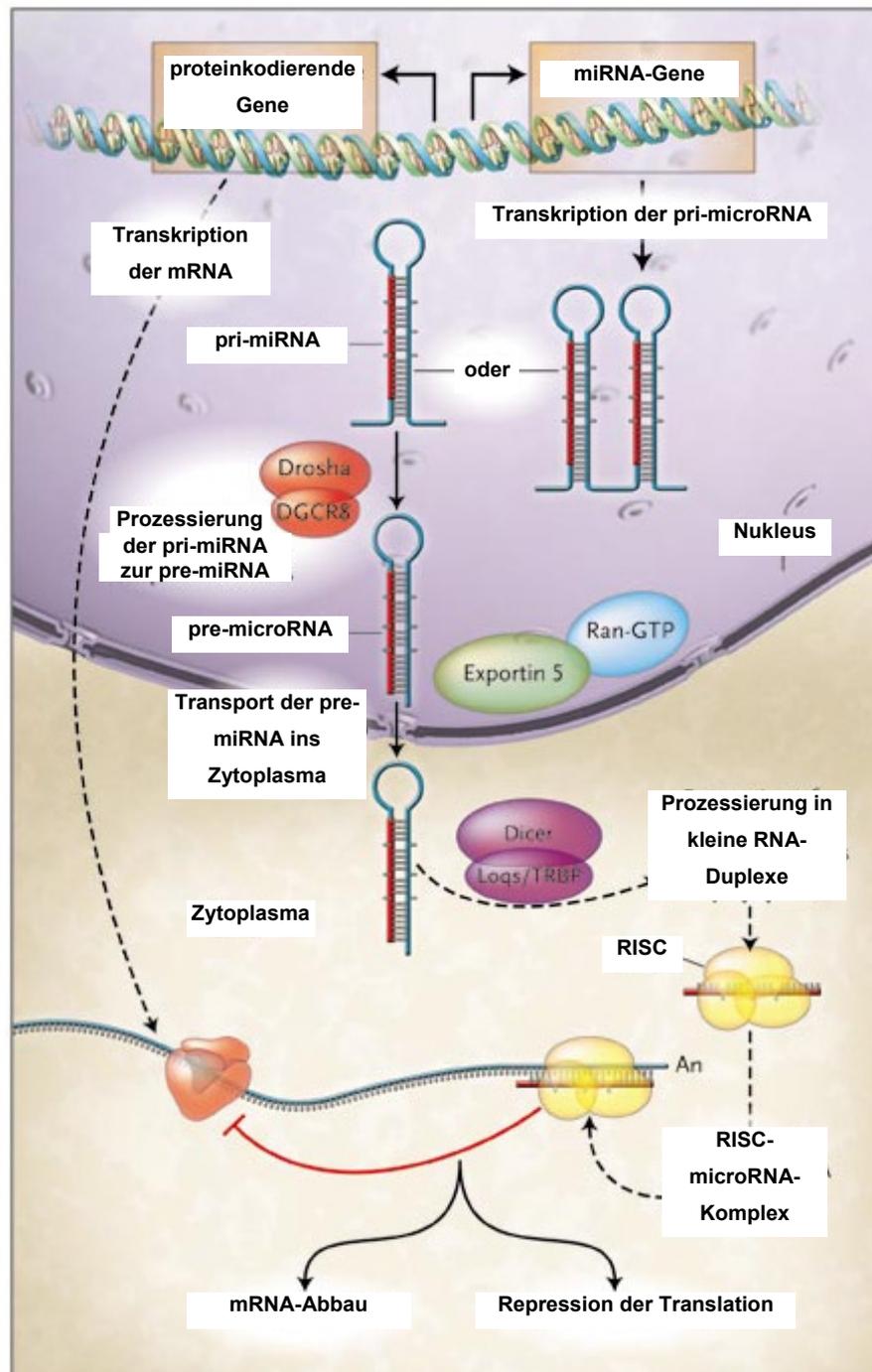
MicroRNAs (miRNAs) sind kleine (18-25 nt), nicht-kodierende, regulatorische RNAs. Im Jahr 1993 wurde in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) die erste microRNA (miRNA) *lin-4* entdeckt (Lee et al., 1993). Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Wurms. Sieben Jahre später wurde eine weitere miRNA (*let-7*) ebenfalls in *C. elegans* entdeckt (Reinhart et al., 2000). Als im Jahr 2001 von verschiedenen Gruppen unabhängig weitere miRNAs entdeckt wurden, wurden diese kleinen RNAs als neue Familie der „miRNAs“ definiert.

MiRNAs wurden seit dem in fast allen Lebewesen – von Pflanzen bis zum Menschen – und inzwischen auch in Prokaryoten (Grünalge) und Viren nachgewiesen (Sanger Datenbank, <http://microrna.sanger.ac.uk>). Zuerst konzentrierte man sich darauf, neue miRNAs nachzuweisen, inzwischen ist der Schwerpunkt der Forschung die Funktionalität. Bisher sind der Mechanismus und die Regulation der miRNA-Expression nicht vollständig geklärt und nur wenige Zielgene experimentell nachgewiesen worden.

MiRNAs werden im Menschen wie proteinkodierende Gene von RNA-Polymerasen des Typs II transkribiert. Die Vorläufer (*primary* miRNAs, pri-miRNA) bilden typische Haarnadelstrukturen, so genannte *Stemloops* (Abbildung 1.4).

Pri-miRNAs enthalten sowohl eine Cap-Struktur (5'-Ende) als auch einen Poly-A-Schwanz (3'-Ende) (Cai et al., 2004). Sie werden von der RNase III Drosha in ca. 70 nt lange pre-miRNAs (*precursor* miRNA) prozessiert. Diese werden mit Exportin 5 vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort von Dicer, einer Ribonuklease III, zu reifen miRNAs (~ 22 nt, doppelsträngig) prozessiert. Diese haben einen Überhang von 2 nt am 3'-Ende.

Der so genannte *RNA-induced silencing complex* (RISC) setzt sich aus verschiedenen Proteinen zusammen, die in anderen Lebewesen variieren können. Beim Menschen besteht er aus Dicer, TRBP (*Transactivating response RNA-binding protein*) und Ago2 (*Argonaute 2*).



**Abbildung 1.4: Biosynthese-Weg der miRNAs.**

MiRNAs werden wie proteinkodierende Gene durch RNA-Polymerase II transkribiert. Die entstehenden pri-miRNAs enthalten die typischen Haarnadelstrukturen einer oder mehrerer (Cluster) miRNAs. Diese werden durch das Protein Drosha zu pre-miRNAs prozessiert und über Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert. Dicer produziert doppelsträngige RNA-Duplexe und der biologisch aktive Strang wird in RISC geladen. Dieser Komplex bindet an den 3'-UTR proteinkodierender Gene und führt bei komplementärer Bindung zum Abbau der RNA. Partielle Bindung führt zur Repression der Translation, ohne den RNA-Level zu beeinflussen. (Modifiziert nach Chen, 2005)

Ein Strang der doppelsträngigen miRNA wird in diesen RISC geladen (*guide strand*), während der andere (*passenger strand*) abgebaut wird (Lin et al., 2005). Für manche miRNAs sind beide Stränge als biologisch aktiv nachgewiesen worden (z. B. miR-142 (Kasashima et al., 2004)). Eine miRNA kann an verschiedene mRNAs binden und eine mRNA kann im 3'-UTR (untranslatierter Bereich, *untranslated region*) Bindestellen für mehrere miRNAs besitzen (Lim et al., 2005). Die miRNA bindet dann im 3'-UTR der Ziel-mRNA und induziert bei vollständig komplementärer Bindung einen RNA-Abbau, wie es typischerweise in Pflanzen der Fall ist, aber auch in Säugetieren schon nachgewiesen wurde (Yekta et al., 2004). Der Abbau der mRNA erfolgt nach Destabilisierung durch miRNA-vermittelte Deadenylierung, wobei der genaue Mechanismus unklar ist (Wu et al., 2006). Bei Säugetieren ist die Bindung häufig nur partiell und der mRNA-Level des Zielgens wird nicht beeinflusst. Stattdessen erfolgt eine Repression der Translation, wobei auch hier der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist (Liu, 2008).

Die Gene für miRNAs liegen in Introns proteinkodierender Gene bzw. in Introns oder Exons nicht proteinkodierender Gene (Rodriguez et al., 2004) und nicht wie anfangs angenommen hauptsächlich zwischen Genregionen (Lagos-Quintana et al., 2001). Humane miRNAs sind auf allen Chromosomen außer dem Y-Chromosom zu finden und einige der miRNAs sind in Clustern angeordnet, d. h. bis zu sieben miRNAs liegen in unmittelbarer Nähe zueinander und werden zusammen in pri-miRNAs umgeschrieben (Lagos-Quintana et al., 2001). MiRNAs machen ca. 2 % der Gene in Säugetieren aus und zeigen dabei in verschiedenen Geweben verschiedene Expressionslevel. Es sind bisher 541 humane miRNAs identifiziert worden und man schätzt, dass beim Menschen 20-30 % der proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2005, Xie et al., 2005).

Um neue miRNAs zu identifizieren, wurden neben Klonierungsexperimenten auch *In-silico*-Vorhersagen durchgeführt. Dabei wurde nach Sequenzen gesucht, die die typischen Haarnadelstrukturen bilden sowie die Konservierung in anderen Lebewesen überprüft (Lindow and Gorodkin, 2007).

Die unvollständige Bindung der miRNAs erschwert die Vorhersage der Zielgene. Für die Vorhersage wurden verschiedene Computerprogramme wie z. B.

TargetScan (Lewis et al., 2003), Miranda (John et al., 2004) oder PicTar (Krek et al., 2005) entwickelt. Diese Programme scannen den 3'-UTR der mRNAs nach der so genannten *Seed*-Sequenz. Das sind die Nukleotide 2-8 am 5'-Ende der miRNA, die meist vollständig an die mRNA binden. Außerdem erfolgt die Berechnung der freien Energie der Bindung. Zum Teil wird die Konservierung der Bindestelle in anderen Lebewesen überprüft. Die verschiedenen Herangehensweisen resultieren in verschiedenen Ergebnissen der Vorhersage. Trotzdem werden diese Programme verwendet, um Hinweise für mögliche Zielgene zu bekommen und eine Basis für funktionelle Experimente zu haben.

Inzwischen wurde in vielen Bereichen die Rolle von miRNAs nachgewiesen. Wie bereits angeführt sind sie essentiell für die Entwicklung von *C. elegans* (Knight and Bass, 2001), aber auch für Zebrafisch (Wienholds et al., 2003; Giraldez et al., 2005) und Maus (Bernstein et al., 2003) wie mit Dicer-Mutanten gezeigt wurde. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Dicer-Mutanten die Effekte der Fehlentwicklung nur auf die fehlende miRNA-Prozessierung zurückzuführen sind. Einen direkten Hinweis darauf, dass einzelne miRNAs essentiell für die Entwicklung sind, zeigten Leaman et al. (2005). Die Hemmung von miR-9 durch *Antisense*-Oligoribonukleotide behinderte die Entwicklung von *Drosophila melanogaster* erheblich.

Zudem konnte ein Einfluss von miRNAs auf Zellwachstum und Apoptose gezeigt werden. In *Drosophila melanogaster* wurden in *Loss-of-function*-Experimenten verschiedene miRNAs nachgewiesen, die pro-apoptotische Gene regulieren und die Apoptose der Embryonen unterdrücken (Leaman, 2005). Bei einem miRNA-Screening von gesundem Brustgewebe und Brustkrebsgewebe zeigte sich miR-21 in letzteren als erhöht exprimiert. In der Brustkrebszelllinie MCF-7 wurde durch Hemmung von miR-21 mit *Antisense*-Oligonukleotiden ein verlangsamtes Zellwachstum durch erhöhte Apoptose und verringerte Proliferation nachgewiesen. Das langsamere Zellwachstum konnte auch *in vivo* in Xenograft-Mäusen gezeigt werden. Als Zielgen konnte das anti-apoptotische Gen Bcl-2 nachgewiesen werden und so die Rolle von miR-21 als Onkogen und Regulator in der Tumorgenese postuliert werden (Si et al., 2007).

Eine wichtige Rolle spielen miRNAs auch bei verschiedenen Krankheiten (Wernet, 2006). MiRNA-Gene sind häufig in fragilen Stellen im Genom oder in

Regionen lokalisiert, die für ihre Mitwirkung bei Krebserkrankungen bekannt sind. Zielgene der miRNAs sind häufig Gene, die in Verbindung mit Onkogenese beschrieben werden (Calin et al., 2004). Zum ersten Mal wurde der Zusammenhang zwischen miRNA und Krebserkrankungen in Lungenkrebs beschrieben. Eine verringerte let-7-Expression und die damit verbundene schlechtere Überlebensrate bei Lungenkrebs konnten von Takamizawa et al. (2004) gezeigt werden. MiR-21 und miR-221 wurden in Glioblastomen überexprimiert gefunden (Ciafre et al., 2005). In B-Zelllymphomen spielt das miR17-92-Cluster eine wichtige Rolle (He et al., 2005) und miR-15 und miR-16 in chronischer lymphatischer Leukämie (Calin et al., 2002). Andererseits können auch Komponenten der miRNA-Maschinerie dereguliert sein und den Biosyntheseweg negativ beeinflussen. So wurde für Lungenkrebs eine verminderte Dicer-Expression nachgewiesen (Karube et al., 2005).

Auch Viren enthalten miRNAs. Diese werden im Wirt prozessiert und können dann die Zellfunktion des Wirts oder die Virusreplikation beeinflussen. Andererseits sind zelluläre miRNAs auch wichtig für Virus-Wirt-Interaktionen. MiR-122 zeigt in der Leber eine sehr hohe Expression und fördert nachweislich die Replikation von Hepatitis-C-Viren (Jopling et al., 2005).

Es ist außerdem bekannt, dass miRNAs als Regulator in der Differenzierung wirken können. In HeLa zeigte die Überexpression der bis dahin als gehirnspezifisch beschriebenen miR-124 im Microarray eine Verlagerung der Genexpression hin zu gehirnspezifischen Genen. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Überexpression der so genannten muskelspezifischen miR-1. Im Microarray wurden verschiedene, muskelspezifische Gene nachgewiesen (Lim et al., 2005). Des Weiteren konnten in verschiedenen humanen Zellen der Hämatopoiese spezifische miRNA-Expressionsprofile erstellt werden, die auf eine Rolle von miRNAs in der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen schließen lassen (Dissertation von S. Weinhold (2007)). Esau et al. (2004) zeigten, dass miR-143 bei der Fettdifferenzierung beteiligt ist. MiR-206 fördert die Muskeldifferenzierung (Kim et al., 2006) und miR-223 ist ein Schlüsselfaktor in der Osteoklastendifferenzierung (Sugatani and Hruska, 2007). Fazi et al. (2005) zeigten außerdem, dass miR-223 die Granulozytendifferenzierung reguliert.

Inzwischen sind veränderte miRNA-Expressionen auch in Verbindung mit osteogener Differenzierung beschrieben worden. Palmieri et al. (2007) zeigten, dass während der osteogenen Differenzierung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG63)

miR-26a, miR-30b und miR-92 erhöht und miR-25, miR-129, miR-133b, miR-200b, miR-337, miR-373, miR-377 und miR-489 vermindert exprimiert werden. Erst kürzlich wurde miR-125b in murinen MSC als Regulator der osteogenen Differenzierung identifiziert (Mizuno et al., 2008).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die systematische Untersuchung der osteogenen Differenzierung. Es gibt bereits Untersuchungen mit MSC, aber keine Veröffentlichung zur USSC, die hier erstmals genauer untersucht wurde. Neben der Aufklärung der Biochemie der osteogenen Differenzierung sollen zudem Marker definiert werden. Diese sollen einerseits die Differenzierung beschreiben und andererseits als potentielle Marker der Stammzellerhaltung dienen.

Dazu wurden verschiedene Stammzellen verwendet: USSC, MSC aus dem Knochenmark und eine potentielle Nierentumorstammzelle (DH1). Es wurden fünf Zeitpunkte der *In-vitro*-Differenzierung analysiert. Dabei wurden Microarray-Analysen mittels Zweifarbenhybridisierung zur Untersuchung der globalen Genexpression durchgeführt. Die Microarrays decken mit über 35000 Oligos mehr als 25000 humane Gene ab und ermöglichen einen Überblick über die Expression der Gene, die im Weiteren mittels quantitativer *Real-time*-PCR verifiziert werden.

Bisher ist die Rolle von miRNAs als negative Regulatoren der Genexpression in der osteogenen Differenzierung nicht vollständig geklärt. In der einzigen Veröffentlichung von Palmieri et al. (2007) wurden zudem bereits andifferenzierte Osteoblasten-ähnliche Zellen verwendet. Daher wurde erstmals in osteogen differenzierten Stammzellen die miRNA-Ebene als neue Form der post-transkriptionellen Regulation genauer untersucht. Dazu wurde ein nicht-kommerzieller, PCR-basierter Assay verwendet, mit dem 330 verschiedene miRNAs detektiert werden können. Die Ermittlung osteogen- bzw. stammzellspezifischer miRNAs ermöglicht nicht nur eine weitere Aufklärung der Regulation der osteogenen Differenzierung bzw. der Stammzellerhaltung, sondern bildet auch eine neue Möglichkeit der Intervention.

Die Ergebnisse der globalen mRNA- und miRNA-Analysen wurden miteinander verglichen in Hinblick auf die jeweils differentiell exprimierten Gene bzw.

miRNAs, um das Zusammenspiel besser charakterisieren zu können. Die resultierenden Ergebnisse wurden mit funktionellen Analysen verifiziert. Dafür wurde ein Luciferase-Assay zur Verifizierung von potentiellen miRNA-mRNA-Interaktionen etabliert. Getestet wurde damit die potentielle Interaktion von miR-26a und GATA6 (*GATA-binding factor 6*), einem in der endodermalen Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor.

Des Weiteren wurde ein System zur Überexpression von miRNAs etabliert. Dieses System wurde zur transienten und stabilen Überexpression von miR-26a in HeLa- und USSC-Zellen verwendet. Um potentielle Zielgene von miR-26a identifizieren zu können, wurde mit RNA von viral transfizierten USSC eine globale Genexpressionsanalyse mittels Zweifarbenhybridisierung durchgeführt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten USSC-Zellen aus Nabelschnurblut (SA503 und SA573) sowie die mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark (MSC) K111 wurden von der Düsseldorfer José-Carreras-Stammzellbank (Prof. Dr. Gesine Kögler) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Aus einem Nierentumor wurde in der Arbeitsgruppe von PD Rüdiger Sorg die Zelllinie DH1 generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

HeLa- und 293T-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Uhrberg zur Verfügung gestellt und stammen ursprünglich aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bzw. der *American Type Culture Collection* (ATCC).

#### 2.1.2 Kits

330plex-microRNA-Assay	Applied Biosystems
BigDye <sup>®</sup> Terminator Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems
Dual-Light <sup>®</sup> Combined Reporter Gene Assay System	Applied Biosystems
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Megascript T7 Kit	Ambion
mirVana <sup>™</sup> miRNA Isolation Kit	Ambion
OpHyb Hybridization Buffer Kit	Operon
pMIR-REPORT <sup>™</sup> miRNA Expression Reporter System	Ambion
Pre-miR <sup>™</sup> miRNA Precursor Starter Kit	Ambion
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Nukleotid Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuantiTect <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen
RNeasy MinElute Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen

---

SuperScript™ II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase (inklusive 5x Puffer und DTT)	Invitrogen
TaqMan® MicroRNA Assays (miR-16, miR-26a)	Applied Biosystems
TaqMan® Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG)	Applied Biosystems

### 2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

3-N-(Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth
5-(3-aminoallyl)-Uridintriphosphat	Ambion
100 bp DNA-Leiter	Peqlab
1 kb DNA-Leiter	Invitrogen
β-Glycerolphosphat	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
γ- <sup>32</sup> P-Phosphat-Adenosintriphosphat (γ- <sup>32</sup> P-ATP)	Hartmann Analytik
Acrylamid/Bis Solution 37,5 : 1	Roth
Agarose	Invitrogen
Alizarinrot	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Sigma
Ampli Taq Gold	Applied Biosystems
Aqua dest.	Delta Select
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
Cy3, Cy5 Mono-Reactive Dye	Amersham Bioscience
Denhardts Lösung (50x)	Applichem
Dexamethason	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Atlas™ Glass Approved)	BD Bioscience
dNTP-Mix (10 mM)	Peqlab
DNA I Polymerase	Invitrogen
DNA-Oligonukleotide	Operon, Thermo
Doxycyclin	Fluka
Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM) (Low Glucose (1000 mg/l), ohne Glutamin)	Cambrex, Gibco
Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz (EDTA)	Roth

Ethanol p.A.	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd	Fluka
Fötale Kälberserum (FCS)	Cambrex, Biochrom
Gel loading buffer II	Ambion
Glycerin	Roth
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen
Humanalbumin (20 %)	Octapharma
Hydroxylamin	Sigma
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen
Kanamycin	Gibco
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma
LB Broth Base	Invitrogen
L-Glutamin	Cambrex, Gibco
Natriumacetat	Merck
Natriumbutyrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natronlauge	Roth
Opti-MEM	Invitrogen
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Serag/Wiessner
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma
Polyethylenimin (PEI)	Sigma
Pre-miR™ miRNA Precursor (miR-26°)	Ambion
RNA High Ranger Ladder	Fermentas
RNA Loading Dye Solution	Fermentas
<i>E. coli</i> DNA Ligase	Invitrogen
<i>E. coli</i> SURE	Stratagene
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Fermentas
RNase H	Invitrogen
RNasin	Invitrogen
Salzsäure	Roth
Second Strand Buffer	Invitrogen
Selectagar	Life Technologies
siPORT™ XP-1	Ambion
Sonicated Salmon Sperm DNA	Applichem

---

T4-DNA-Ligase	Invitrogen
T4-DNA-Polymerase	Promega
T4-Polynukleotid-Kinase	Invitrogen
Tetracyclin	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris	Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco
Urea	Sigma
Xylencyanol	Merck

#### 2.1.4 Zellkultur- und Bakterienmedien, Lösungen, Puffer

Kulturmedium USSC      DMEM  
30 % FCS  
2 mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Kulturmedium MSC      DMEM  
20 % FCS  
2 mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Kulturmedium DH1      DMEM  
20 % FCS  
2 mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

Kulturmedium  
HeLa und 293T      DMEM  
10 % FCS  
8 mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin

---

Kulturmedium für virale Überstände	IMDM 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
LB-Medium	20 g LB in 1 l Aqua dest. lösen auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin 15 g/l Selectagar zum Herstellen von Agarplatten
Ammoniumacetatlösung	7,5 M Ammoniumacetat in RNase-freiem Wasser lösen
Alizarinrotlösung	2 g Alizarinrot in 100 ml Aqua dest. lösen mit 0,5 M Natronlauge auf pH 4,1 – 4,3 einstellen
5x Blaumarker	35 ml Aqua dest. 15 ml Glycerin jeweils eine Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol
DEPC-Wasser	1 ml DEPC pro 1 l Aqua dest. unter Rühren auflösen autoklavieren
10 % Glycerinwasser	10 % Glycerin in Aqua dest. (v/v) autoklavieren
5x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA mit Natronlauge auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
Natriumbutyratlösung	1 M Natriumbutyrat in Aqua dest. lösen
10 % SDS	100 g SDS in 1 l Aqua dest. lösen, autoklavieren

20x SSC                      3 M Natriumchlorid  
 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat  
 mit Salzsäure auf pH 7 einstellen, autoklavieren

10x TBE                      890 mM Tris  
 890 mM Borsäure  
 2 mM EDTA  
 in Aqua dest. lösen und autoklavieren

### Northern Blot

Hybridisierungslösung    5x SSC  
 20 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2)  
 1 % SDS  
 1x Denhardts Lösung  
 3 mg Sonicated Salmon Sperm DNA

Waschpuffer 1              5x SSC  
 1 % SDS

Waschpuffer 2              1x SSC  
 1 % SDS

### 2.1.5 Verbrauchsmittel

10 cm-Zellkulturplatten	Corning
12-Well-Zellkulturplatten	Greiner
6-Well-Zellkulturplatten	Greiner
96-Well-Zellkulturplatten	Greiner
96-Well-PCR-Platten	Costar
Elektroporationsküvetten (2 mm)	Peqlab
5 ml Polypropylen-Röhrchen	BD
Human Genome OpArray™	Operon
Hybond-N+-Membran	Amersham Bioscience
Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience
LifterSlips 25x60	Implen

---

Röhren-Tubes 3,5 ml	Sarstedt
Minisart Filter 0,2 und 0,45 µm	Sartorius
Phase Lock Gel™ Heavy (PLG-Gefäße)	Eppendorf
Thermo-Fast 96-Well-PCR-Platten	Abgene
Ultra Clear Cap Strips	Abgene
Whatman Papier	Whatman
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Corning
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD

### 2.1.6 Geräte

96-Well GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
ABI™ PRISM® 7700	Applied Biosystems
Agagel Maxi	Biometra
Biorad PowerPac Basic™	Biorad
Brutschrank Forma Scientific	Thermo, Memmert
ComPhor L Midi/Mini Bioplastic BV	Biozym
Durchflusszytometer FC500	Beckman Coulter
Electrophoresis Power Supply-EPS	Biorad
Gelfotosystem UVT-28 M	Herolab
GenePix 4000B Laserscanner	Axon Instruments/ Molecular Devices
Gene Pulser® II, Capacitance Extender Plus, Pulse controller Plus	Biorad
Hybridisierungsinubator	GFL
InversMikroskop DM IRB	Leica
MiniLumat LB9506	Berthold
Metallkammern	Anfertigung von Welabo
NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
Neubauer Zählkammer	Brand
Power Pac Basic™	Biorad
Sterilbank MCS 12	Jouan, Haereus
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph
Thermomixer compact	Eppendorf

UV Stratalinker® 1800	Stratagene
Wasserbad 1086	GFL
Vakuum Concentrator 5301	Eppendorf
Vortex-Gerät MS1	IKA
Zentrifugen 5415 D, 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Sorvall® RC 5B Plus	Kendro

### 2.1.7 Software

Acuity 3.1	Axon Instruments/ Molecular Devices
Chromas 1.45	Grifith University, Australien
Cytomics™ RXP	BD
GenePix Pro 5.1	Axon Instruments/ Molecular Devices
Microsoft Office	Microsoft
SDS2.3	Applied Biosystems

### 2.1.8 Herstellerliste

Abgene	Epsom, UK
Ambion	Austin, USA
Amersham Bioscience	Buckinghamshire, UK
Applichem	Darmstadt
Applied Biosystems	Foster City, USA
Axon Instruments/Molecular Devices	Sunnyvale, USA
BD	Heidelberg
Beckman Coulter	Krefeld
Berthold	Bad Wildbad
Biochrom	Berlin
Biometra	Göttingen
Biorad	München
Biozym	Hess. Oldendorf
Brand	Wertheim
Cambrex	Verviers, B

Corning	New York, USA
Costar	Schipol-Rijk, NL
DeltaSelect	Pfullingen
Eppendorf	Hamburg
Fermentas	St. Leon-Rot
Fluka	St. Gallen, CH
GFL	Burgwedel
Gibco	Eggenstein
Greiner	Frickenhausen
Haereus	Hanau
Hartmann Analytik	Braunschweig
Heidolph	Schwabach
Herolab	Wiesloch
IKA	Staufen
Implen	München
Invitrogen	Karlsruhe
Jouan	Fernwald
Kendro	Langenselbold
Leica	Solms
Life Technologies	Eggenstein
Memmert	Schwabach
Merck	Darmstadt
Octapharma	Langenfeld
Operon	Köln
Peqlab	Erlangen
Promega	Mannheim
Qiagen	Hilden
Roth	Karlsruhe
Sarstedt	Nümbrecht
Sartorius	Göttingen
Serag/Wiessner	Naila
Sigma	Steinheim
Stratagene	Heidelberg
Thermo	Egelsbach
Whatman	Dassel
Welabo	Düsseldorf

## 2.1.9 DNA-Oligonukleotide

### 2.1.9.1 Oligo-dT-T7-Primer

Für die globalen Genexpressionsanalysen wird in der Erststrangsynthese ein Oligo-dT-Primer eingesetzt, der die Bindestelle der T7-DNA-Polymerase für die *In-vitro*-Transkription enthält. Die Sequenz ist wie folgt:



### 2.1.9.2 Primer für quantitative *Real-time*-PCR

Die folgende Tabelle 2.1 enthält Primer mit der optimalen *Annealing*-Temperatur von 56 °C.

Tabelle 2.1: Primersequenzen für qPCR (56 °C).

Gen-symbol	ENSG-Nummer	Sequenz 5' – 3'	Produktlänge
β-Aktin	ENSG00000075624	fwd ACTGGGACGACATGGAGAAAAT	189 bp
		rev ATAGCACAGCCTGGATAGCAAC	
ALPL	ENSG00000162551	fwd CACTCACTCCAAGACCACCA	207 bp
		rev TCCCTTTTAACCACCACCAA	
BMP6	ENSG00000153162	fwd CTGTATGTGAGTTTCCAAGACCTG	232 bp
		rev TGTCATCAAAGTAAAGAACCGAGA	
CALM	ENSG00000143933	fwd GGAAGTGTGAGCATGTTGTTG	233 bp
		rev AGGCAAATTGTGCCATAAGC	
CD44	ENSG00000026508	fwd GTGATCAACAGTGGCAATGG	221 bp
		rev TCCAACGGTTGTTTCTTTCC	
CLIC4	ENSG00000169504	fwd TTACTACTAAATGGATCAACTCTAGGA	215 bp
		rev TGCAAGAAATTGGTGAATCAT	
DSCR1	ENSG00000159200	fwd TGCATGCTTTGGAAATTTGG	216 bp
		rev TTTTGAGGTTAGCCTCTCCAG	
EMD	ENSG00000102119	fwd GCAGGGGCTTTATGTGTTTT	226 bp
		rev AACGGGGCTTTTATTGTGTG	

Gen-symbol	ENSG-Nummer	Sequenz 5' – 3'	Produkt-länge
GILZ	ENSG00000157514	fwd TGGGCTTCACAGTGTCATTT	238 bp
		rev TCCAAATCCTGGAACCATACA	
IBSP	ENSG00000029559	fwd AACCTACAACCCCACCACAA	217 bp
		rev TAGCCATCGTAGCCTTGTCC	
IGFBP2	ENSG00000115457	fwd ATATTTGGAAAGAGACCAGCAC	210 bp
		rev ACTTTTCCTTCCTTTAATCTTATGC	
ISGF3G	ENSG00000092098	fwd TTCACACGATTGACCTGTCC	221 bp
		rev GAGGTCAGGGAAGAGGGAAA	
PBGD	ENSG00000149397	fwd CAGGAAGCTCAACCCCTCT	204 bp
		rev AAACCTCAACAGCATACAAAATAGCA	
PMF1	ENSG00000160783	fwd GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	238 bp
		rev AGCAGAGCGACACCCTAGAC	
POSTN	ENSG00000133110	fwd GATGACCTTTCATCTTTTAGAGCAG	183 bp
		rev GATGTGGTACTTCATAAGAGCTTCG	
Runx2	ENSG00000124813	fwd GAGTGGACGAGGCAAGAGT	215 bp
		rev GGACACCTACTCTCATACTG	
SH3RF1	ENSG00000154447	fwd CCTCTGTTTCATAGTTTCCTGGT	216 bp
		rev TGAAACCTTTTATCCAGTCCTCA	
SMAD6	ENSG00000137834	fwd GATTCCACATTGTCTTACACTGAAAC	201 bp
		rev AGGTAGGTCGTAGAAGATGCTGAC	
SP7	ENSG00000170374	fwd GGCACAAAGAAGCCGTAATC	247 bp
		rev CACTGGGCAGACAGTCAGAA	
SPARC	ENSG00000107742	fwd TGTTAGACTGTGTGCGTGTGC	201 bp
		rev AACATTTGATTTCTTTATGCATGT	
SPP1	ENSG00000237623	fwd CCGTGGGAAGGACAGTTATG	213 bp
		rev TTGGGGTCTACAACCAGCAT	
ZNF711	ENSG00000147180	fwd ATATCTTTGGATGATGTTGGAGAAA	199 bp
		rev TGGTGTACTCACTCTCTGTGACAAT	

Tabelle 2.2 enthält die Primersequenzen, die in qPCRs mit einer *Annealing*-Temperatur von 62 °C verwendet werden.

**Tabelle 2.2: Primersequenzen für qPCR (62 °C).**

Gen-symbol	ENSG-Nummer	Sequenz 5' – 3'	Produktlänge
BACH1	ENSG00000156273	fwd TTATGTTTCAGAACCCCAGCAAGAA	200 bp
		rev TGTGCATTTTCAACAAGGACTGAAA	
DLX2	ENSG00000115844	fwd CACATGGGTTCCCTACCAGTACCAAG	181 bp
		rev TCACTATCCGAATTTTCAGGCTCAAG	
FGF2	ENSG00000138685	fwd AGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTG	153 bp
		rev GCCACATACCAACTGGTGTATTTCC	
FOXP1	ENSG00000114861	fwd AACTGGTTCACACGAATGTTTGCTT	187 bp
		rev GGAAGGGTTACCACTGATCTTTTG	
GATA6	ENSG00000141448	fwd CAATAATTCCATTCCCATGACTCCA	184 bp
		rev GTAGAGCCCATCTTGACCCGAATAC	
JUN	ENSG00000177606	fwd GCTGGAGGAAAAAGTGAAAACCTTG	158 bp
		rev AAAATGTTTGCAACTGCTGCGTTTCG	
NFKBIA	ENSG00000100906	fwd TCCATCCTGAAGGCTACCAACTACA	196 bp
		rev ACTTCAACAGGAGTGACACCAGGTC	
PLAUR	ENSG00000011422	fwd GAAGACCAACAGGACCCTGAGCTAT	162 bp
		rev ATGTCTGATGAGCCACAGGAAATG	
TB114	ENSG00000102804	fwd ATTGCATGAAATCCCAATGGTGTAG	184 bp
		rev TCCATAGCTTGCTCGATTTTGTGT	

### 2.1.9.3 Kolonie-PCR- und Sequenzierprimer

Kolonie-PCRs werden zum Test auf positive Klone durchgeführt. Dieselben Primer (Tabelle 2.3) können später zur Sequenzierung verwendet werden (2.2.12.8).

**Tabelle 2.3: Kolonie-PCR- und Sequenzierprimer.**

Primernamen	Sequenz 5' – 3'
pCL5EG fwd	GCAGAAGAACGGCATCAAGG
pCL5EG rev	GGAGCAACATAGTTAAGAATACC
pMIR-REPORT fwd	GCTGCAAGGCGATTAAGT
pMIR-REPORT rev	GGTCTTACCGGAAAACCTCG

### 2.1.9.4 Sonden für Northern Blot

Folgende DNA-Oligonukleotide werden nach radioaktiver Markierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP für die Detektion der entsprechenden microRNA (miRNA) verwendet. Die *small nuclear* RNA U6 dient dabei als Ladekontrolle und wird in jeder Hybridisierung eingesetzt.

**Tabelle 2.4: Sonden für Northern Blot.**

Sonden-name	Sequenz 5' – 3'
miR-16	CGCCAATATTTACCTGCTGCTA
miR-26a	GCCTATCCTGGATTACTTGAA
miR-335	ACATTTTTTCGTTATTGCTCTTGA
miR-483	AGAAGACGGGAGGAGAGGAGTGA
U6	GCCATGCTAATCTTCTCTGTAT

### 2.1.9.5 miRNA-*Stemloop*-Oligonukleotide

Für die Herstellung der Vektoren zur Überexpression von miRNAs werden Oligonukleotide kommerziell erworben. Diese enthalten bereits die benötigten *Cla*I- bzw. *Mlu*I-Schnittstellen und können sofort zur Klonierung eingesetzt werden. Die Sequenzen sind Tabelle 2.5 zu entnehmen.

**Tabelle 2.5: miRNA-Oligonukleotide zur Klonierung des Überexpressionsvektors.**

Die Oligonukleotide enthalten die *Stemloop*-Sequenz der entsprechenden miRNA und nach Hybridisierung bilden die Enden die Schnittstellen *Cla*I und *Mlu*I.

Oligonukleotid-name	Sequenz 5' – 3'
miR-26a <i>sense</i>	CGCGTGTGGCCTCGTTACCGTAATCCAGGATAGGCTGTGCAGGT CCCAATGGGCCTATTCTTGTTACTTGCACGGGGAC GCAT
miR-26a <i>antisense</i>	CGATGCGTCCCCGTGCAAGTAACCAAGAATAGGCCCATTTGGGAC CTGCACAGCCTATCCTGGATTACTTGAACGAGGCCACA

### 2.1.9.6 Oligonukleotide für Luciferase-Assays

Für den Luciferase-Assay wird der Teil des 3'-UTRs von GATA6 hinter die Luciferase kloniert, der die vorhergesagte Bindestelle für miR-26a enthält. Die komplementären Oligonukleotide für die Klonierung werden kommerziell erworben. Sie enthalten bereits die benötigten *Hind*III- und *Mlu*I-Schnittstellen und können direkt für die Klonierung in den pMIR-REPORT-Vektor verwendet werden.

**Tabelle 2.6: Oligonukleotide für Luciferase-Assay.**

Die Oligonukleotide enthalten den Teil des GATA6-3'-UTRs mit der vorhergesagten Bindestelle für miR-26a und nach Hybridisierung bilden die Enden die Schnittstellen *Hind*III und *Mlu*I.

Oligonukleotid-name	Sequenz 5' – 3'
GATA6-3'-UTR fwd	CGCGTGAGCCGTTTTGTACCTTTTATACCTTGGCTTATTTGAAGTT GACACATGGGGTTAA
GATA6-3'-UTR rev	AGCTTTAACCCCATGTGTCAACTTCAAATAAGCCAAGGTATAAAAAG GTACAAAACGGCTCA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der USSC, MSC und DH1

Die Zellkultivierung erfolgt in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Partialdruck und maximaler Luftfeuchtigkeit.

Je nach Wachstumsdichte werden die Zellen 1-2 mal wöchentlich bei ca. 80%iger Konfluenz passagiert. Die Beurteilung erfolgt mikroskopisch. Die folgenden Arbeitsschritte werden mit sterilen Materialien an der Sterilbank durchgeführt.

Das Medium wird entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 10 ml Trypsin/EDTA-Mix (1x, verdünnt mit PBS) zugegeben. Die Zellen werden 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wird mit 20 % Humanalbumin abgestoppt und zentrifugiert (500xg, 7 min). Der Überstand wird verworfen. Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen in einem definierten Volumen Medium resuspendiert. Zu 20 µl Zellsuspension werden 20 µl Trypanblau gegeben und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es werden vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl pro Milliliter wie folgt berechnet: Zellzahl pro ml =  $\frac{1}{4} \cdot \text{gezählte Zellen} \cdot 2 \cdot (\text{Verdünnungsfaktor}) \cdot 10^4$ .

Zur Passagierung und osteogenen Differenzierung werden  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt. Für eine Alizarinrot-Färbung werden die Zellen in 6-Well-Platten gegeben (300.000 Zellen pro Well). Zur RNA-Isolierung werden die Zellen in Lysepuffer lysiert.

### 2.2.2 Kultivierung der HeLa- und 293T-Zellen

HeLa- und 293T-Zellen werden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert und je nach Wachstumsdichte alle 2-3 Tage passagiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA (1x) bedeckt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit Medium abgestoppt, die Zellen zentrifugiert (500xg, 7 min), in neuem Medium aufgenommen und 1 : 5 bis 1 : 8 verdünnt weiterkultiviert.

Für verschiedene Experimente werden die Zellen in 6- oder 12-Well-Platten oder 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät. Zur Herstellung viraler Überstände werden  $6 \cdot 10^6$  293T-Zellen in 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät. Für Luciferase-Assays

werden 60000 HeLa-Zellen in 12-Well-Platten und für virale Infektion 150.000 HeLa-Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät.

### **2.2.3 Osteogene Differenzierung**

Für die osteogene Differenzierung von USSC-, MSC- und DH1-Zellen werden folgende Chemikalien (DAG) zum Medium gegeben und das Medium zwei Mal pro Woche gewechselt:  $10^{-7}$  M Dexamethason, 50  $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-phosphat und 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat. Der Nachweis der Differenzierung erfolgt mit einer Alizarinrot-Färbung (2.2.4).

### **2.2.4 Alizarinrot-Färbung**

Zur Kontrolle der osteogenen Differenzierung werden Zellen in 6-Well-Platten kultiviert und induziert. Zum Vergleich werden undifferenzierte Zellen mitgeführt. Alizarinrot bildet mit zweiwertigen Kationen einen roten Komplex und kann so zum Nachweis der Kalzifizierung der Zellen verwendet werden.

Das Medium wird entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wird 1 ml eiskalter 70%iger Ethanol zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Ethanols und Waschen der Zellen mit Aqua dest. werden 500  $\mu$ l Alizarinrot-Lösung zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5x Waschen mit Aqua dest. kann die Rotfärbung unter dem Mikroskop begutachtet und dokumentiert werden.

### **2.2.5 RNA-Isolierung**

#### **2.2.5.1 Isolierung mit mirVana miRNA Isolation Kit**

Mit Hilfe des mirVana miRNA Isolation Kit kann RNA kleiner 200 nt (im Weiteren als smallRNA bezeichnet) getrennt vom Rest (im Folgenden als totalRNA bezeichnet) isoliert werden.

Die Isolierung erfolgt nach Herstellerangaben. Dabei werden bis zu  $1 \cdot 10^7$  Zellen in 600  $\mu$ l Lysepuffer lysiert und entweder so aufgearbeitet, dass die

totalRNA- und die smallRNA-Fraktion einzeln isoliert werden oder gemeinsam. Es wird mit je 100 µl RNase-freiem Wasser von den Säulen eluiert.

### **2.2.5.2 Isolierung mit RNeasy Mini Kit**

Die Zellen werden in RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol lysiert und nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA wird in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

### **2.2.5.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgt durch Extinktionsmessung bei 260 und 280 nm am Nanodrop. Aus  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$  ergibt sich die Reinheit und aus  $OD_{260} * \epsilon_{RNA} * \text{Verdünnung} / 100$  (mit  $\epsilon_{RNA} = 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ergibt sich die Konzentration in µg/µl. Die Qualität der RNA kann mit einer RNA-Agarosegel-Elektrophorese überprüft werden (2.2.10.1).

### **2.2.6 DNase-Verdau**

Um die restliche DNA aus den totalRNA-Proben zu entfernen, wird ein DNase-Verdau durchgeführt. Zu 87,5 µl RNA-Probe werden 10 µl RDD-Puffer und 2,5 µl RNase-freie DNase gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (2.2.5.2) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **2.2.7 Globale Genexpressionsanalyse**

Bei der vergleichenden Genexpressionsanalyse werden zwei Proben durch gleichzeitige Hybridisierung auf demselben Microarray direkt miteinander verglichen.

Prinzipiell können die RNA-Proben amplifiziert oder unamplifiziert untersucht werden. Da in den bisherigen Arbeiten am Institut die globalen Genexpressionsanalysen der USSC SA479 (Dr. T. Polen) aufgrund geringer RNA-

Mengen amplifiziert wurden, wird bei allen weiteren Untersuchungen zur besseren Vergleichbarkeit die RNA ebenfalls amplifiziert. Verwendet werden die Zellen USSC SA503 (Stammzellen aus Nabelschnurblut), MSC K111 (mesenchymale Stammzellen) und DH1 (Nierenkarzinomzellen). Es werden jeweils fünf Zeitpunkte der osteogenen Differenzierung untersucht: 1, 3, 5, 7 und 14 Tage nach Induktion. Auf den Microarrays werden diese Proben jeweils im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (d0) untersucht. Zu jedem Experiment wird eine Wiederholung mit vertauschten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt (*colour-swap*).

Dazu wird zunächst die Gesamt-mRNA aus den Zellen isoliert und in einem RNA-Agarosegel auf Reinheit und Qualität kontrolliert (2.2.10.1). Ausgehend von 2 µg totalRNA (2.2.5.1) wird mit Oligo-dT-T7-Primern ds-cDNA synthetisiert und diese für die lineare Amplifikation durch *In-vitro*-Transkription eingesetzt (modifiziertes Eberwine-Protokoll (van Gelder et al., 1990) nach S. Weinhold (ITZ)). Bei der *In-vitro*-Synthese der RNA erfolgt gleichzeitig der statistische Einbau von Aminoallyl-Nukleotiden (im Nukleotid-Mix enthalten), was im folgenden Schritt eine Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Die zu vergleichenden Aminoallyl-RNAs werden dann mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen (Cy3, Cy5) in einer Kopplungsreaktion markiert, vereinigt und simultan auf einem Microarray für 16 h hybridisiert. Nach der simultanen Hybridisierung werden die Microarrays mit verschiedenen Waschpuffern stringent gewaschen und die Fluoreszenz auf der Oberfläche des Microarrays mit einem Laserscanner bestimmt und ausgewertet.

### **2.2.7.1 Amplifizierung der RNA-Proben**

#### **Erststrangsynthese**

Zu 2 µg totalRNA in 3,5 µl RNase-freiem Wasser wird 1 µl Oligo-dT<sub>24</sub>-T7-Primer (10 mM) gegeben, 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Pro Reaktion werden 2 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl DTT, 1 µl dNTP-Mix, 0,5 µl RNasin und 1 µl Superscript II zugegeben und 2 h bei 42 °C und anschließend 10 min bei 65 °C inkubiert.

## **Zweitstrangsynthese**

Pro Ansatz werden nach der Erststrangsynthese 45,5 µl RNase-freies Wasser, 15 µl Second Strand Buffer, 1,5 µl dNTP-Mix, 0,5 µl *E. coli* Ligase, 2 µl DNA I Polymerase und 0,5 µl RNase H zugegeben und 2 h bei 16 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 U T4-DNA-Polymerase wird 15 min bei 16 °C und anschließend 15 min bei 70 °C inkubiert. Das Produkt kann bei -20 °C gelagert oder zur weiteren Verwendung aufgereinigt werden.

## **Aufreinigung der ds-cDNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol**

Zu 77 µl ds-cDNA-Reaktionsansatz werden 77 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1-Gemisch) gegeben und durch Resuspendieren gut vermischt. Die PLG-Gefäße werden 3 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert.

Das Gemisch wird in die PLG-Gefäße gegeben und 5 min bei 12000xg zentrifugiert, während die Matrix eine feste Barriere zwischen organischer und wässriger Phase bildet. Der Überstand (77 µl) wird in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß transferiert und die DNA durch Zugabe von 38 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 282 µl absolutem Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 12000xg) und Abnahme des Überstandes wird zweimal mit je 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (10 min, 12000xg). Der Überstand wird abgenommen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 15 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (Nanodrop) wird die Lösung auf 7,5 µl eingengt (Vakuum-Konzentrator).

## ***In-vitro*-Transkription**

Mit Hilfe des Megascript T7 Kit wird die ds-cDNA in cRNA umgeschrieben (*In-vitro*-Transkription). Dazu werden zu 7,5 µl ds-cDNA 2 µl ATP, 2 µl CTP, 2 µl GTP, 1 µl UTP, 1,5 µl 5-(3-aminoallyl)-UTP (aa-UTP), 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl 10x Enzym-Mix gegeben und 10 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl DNase I wird bei 37 °C 30 min inkubiert.

### **Aufreinigung der cRNA mittels RNeasy Mini Kit**

Der Reaktionsansatz wird mit 80 µl RNase-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, 350 µl RLT-Puffer (2 % β-Mercaptoethanol) zugegeben und gut gemischt. Anschließend werden 250 µl absoluter Ethanol zugegeben und gut vermischt.

Die Aufreinigung der cRNA erfolgt nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgt in 30 µl RNase-freiem Wasser.

### **Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5**

Cy3 und Cy5 sind fluoreszierende Cyanin-Farbstoffe, deren Sulfit-Gruppe mit der Aminoallyl-Gruppe des aa-UTP reagieren und die somit an RNA gekoppelt werden können. Cy3 hat sein Absorptionsmaximum bei 550 nm und sein Emissionsmaximum bei 570 nm. Für Cy5 liegen die Werte bei 649 nm und 670 nm respektive. Zum direkten Vergleich zweier Proben werden diese mit unterschiedlichen Farben markiert und auf einem Microarray hybridisiert.

Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 werden in je 35 µl DMSO gelöst. Für die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes werden zu 4 µg cRNA (in 3,33 µl RNase-freiem Wasser) 1,66 µl 0,3 M NaHCO<sub>3</sub> und 2 µl Cy3 bzw. Cy5 gegeben und 1 h bei 23 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 4,5 µl 4 M Hydroxylamin wird 15 min bei 23 °C inkubiert.

### **Aufreinigung der gekoppelten cRNA mit RNeasy MinElute Kit**

Die Reaktion wird mit 88,5 µl RNase-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, 350 µl RLT zugegeben und gut gemischt. Anschließend werden 250 µl absoluter Ethanol zugegeben und ebenfalls gut gemischt. Die Aufreinigung der RNA erfolgt nach Herstellerangaben. Die RNA wird in 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt (Nanodrop).

### **2.2.7.2 Hybridisierung und Auswertung der Microarrays**

#### **Blocken der Oberfläche der Microarrays**

Für die globale Genexpressionsanalyse werden Human Genome OpArrays (Version 4.0) verwendet. Diese enthalten 35035 Oligonukleotid-Spots, die insgesamt ca. 25100 Gene repräsentieren.

Zum Scannen der Microarrays wird der GenePix 4000B Laser Scanner verwendet. Für die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe werden zwei Wellenlängen verwendet: 532 nm für den Farbstoff Cy3 und 635 nm für Cy5. Die emittierte Fluoreszenz wird für beide Farbstoffe gleichzeitig gemessen und die Werte liegen bei maximal 65535 Quanten. Gescannt wird immer mit einer Auflösung von 5 µm.

Die Microarrays werden vor Gebrauch zur Überprüfung gescannt (700 V für beide Wellenlängen). Zum Blocken und Hybridisieren wird das OpHyb-1 Hybridization Buffer Kit verwendet. Die enthaltene Pre-Hyb-Lösung wird auf 42 °C vorgewärmt und die benötigte Menge sterilfiltriert (0,2 µm). Die Microarrays werden 1 h bei 42 °C in Pre-Hyb-Lösung inkubiert. Anschließend werden sie 10 min bei Raumtemperatur in Waschlösung 1 (2,5 % Wash B in Aqua dest.) gewaschen. Danach wird dreimal je 10 min mit Aqua dest. gewaschen, bei 165xg 8 min zentrifugiert und zur Überprüfung erneut gescannt (700 V für beide Wellenlängen).

#### **Hybridisierung der Microarrays**

Die zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cRNA-Proben werden vereinigt und bis zur Trockene eingengt (Vakuum-Konzentrator). Es werden 55 µl Hybridisierungspuffer zugegeben und die Probe 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Probe wird auf 42 °C abgekühlt. Der Microarray wird in eine Metallkammer gelegt, das Deckgläschen (LifterSlip) aufgelegt und die Probe unter das Deckgläschen pipettiert. Anschließend werden 300 µl 3x SSC in die Kammer pipettiert und der Microarray 16 h bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wird mit 90 rpm geschüttelt.

## Waschen und Scannen der Microarrays

Zum Waschen werden folgende Lösungen mit Hilfe des Hybridization Buffer Kits hergestellt:

Waschlösung 2 (42 °C)	10 % Wash A 5 % Wash B
Waschlösung 3	10 % Wash A
Waschlösung 4	1 % Wash A

Die Microarrays werden aus den Metallkammern genommen und in Waschlösung 2 überführt. Nach vorsichtigem Entfernen des Deckgläschens wird der Microarray 10 min bei 42 °C unter Rühren und Schütteln inkubiert. Anschließend wird bei Raumtemperatur 10 min in Waschlösung 3 und 5 min in Waschlösung 4 gewaschen. Während des Vorganges darf der Microarray nicht austrocknen. Nach Zentrifugation (8 min, 165xg) wird der Microarray bei jeweils 450 V gescannt. Danach folgt ein weiterer Scanvorgang bei ca. 550-700 V. Die Spannung wird dabei der Intensität der Farbstoffe angepasst, sodass beide Farbstoffe gleiche Intensitäten haben. Die erhaltenen Rohdaten werden im 16-bit-Format als TIFF-Bild gespeichert.

## Auswertung der Microarrays

Die TIFF-Bilder enthalten die Information über die Rot- und Grünfluoreszenzwerte, aus denen sich die relativen mRNA-Spiegel für die einzelnen Gene ermitteln lassen. Dazu werden die Bilder mit der Bildauswertungs-Software GenePix Pro 5.1 analysiert. Zur Quantifizierung der Fluoreszenzen aller Gene wurde mit der GenePix Software ein Gitter (GeneArrayList) über die Spots gelegt und der Integrationskreis an die jeweilige Spotgröße angepasst. Die GenePix Software ermittelt anhand der Rohdaten die gemessene Rot- und Grünfluoreszenz. Aus der ermittelten Rot- und Grünfluoreszenz wird rechnerisch das Verhältnis gebildet (*Ratio of Median*). Dieses Fluoreszenzverhältnis spiegelt die relativen mRNA-Spiegel der Gene wider. Ist die Expression eines Gens unverändert, ist das Verhältnis 1. Je stärker die Expression

eines Gens verändert ist, umso stärker weicht das Fluoreszenzverhältnis nach oben oder unten von 1 ab. Der Zahlenwert der Signalstärke von Rot- und Grünfluoreszenzen liegt in diesem System zwischen 0 und 65535 Quanten. Je schwächer die gemessenen Fluoreszenz-Signale für ein Gen sind, desto unsicherer ist die Aussage über die Expressionsveränderung. Deshalb wird die Expressionsveränderung nur dann bestimmt, wenn das Rot- oder Grün-Signal eines Gens mindestens fünffach über der Hintergrund-Signalstärke liegt (*Signal/Noise*,  $S/N > 5$ ). Alle anderen Signale werden als zu schwach eingestuft und als nicht auswertbar betrachtet. Um die sich u. a. aus experimentellen Schwankungen, unterschiedlichen Einbauraten der Fluoreszenzfarbstoffe sowie Scanner-Einstellungen ergebenden Varianzen der relativen mRNA-Level im Endergebnis auszugleichen, werden die *Ratio of Median*-Werte nach der Lowess-Methode signalintensitätsabhängig normalisiert (Acuity 3.1). Man erhält so genannte *Norm Ratio of Median*-Werte, die einen Vergleich der relativen mRNA-Level über verschiedene Experimente ermöglichen.

Für jedes Einzelexperiment wird eine Doppelbestimmung mit vertauschter Fluoreszenzmarkierung durchgeführt (*colour-swap*, *csw*). Die Genexpression wird für die Gene ausgewertet, für die  $S/N > 5$  für Rot- oder Grünfluoreszenz gilt. Es werden in der weiteren Analyse nur die Gene berücksichtigt, die bei der jeweiligen Doppelbestimmung in beiden Hybridisierungsexperimenten auswertbar sind ( $S/N > 5$ ). Für jedes Gen wird aus der Doppelbestimmung der Mittelwert der *Norm Ratio of Median*-Werte gebildet ( $n=2$ ).

## **Statistik**

Zur statistischen Auswertung werden die p-Werte von differentiell exprimierten Genen bestimmt. Dazu wird ein einseitiger, heteroskedastischer t-Test (Microsoft Excel) durchgeführt. Der p-Wert wird für die Streuung der Einzelwerte (*Norm Ratio of Median*) für ein Gen bezogen auf die Streuung der Gesamtheit aller Werte der auswertbaren Gene bei der Mehrfachbestimmung ermittelt. Alle p-Werte kleiner 0,05 gelten als statistisch signifikant.

## Clusteranalyse

Für die Clusteranalysen werden die *Norm Ratio of Median*-Werte verwendet. Es gelten die oben genannten Qualitätskriterien ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ). Für die Gene, die an mindestens einem Zeitpunkt mindestens 1,4fach verändert exprimiert sind, werden die Werte für die anderen Zeitpunkte ergänzt und hierarchisch geclustert und farblich dargestellt. Dazu wird eine von Dr. T. Polen selbstentwickelte Software verwendet, die auf der Software Treeview und Cluster von Eisen et al. (1998) beruht.

Rot zeigt Gene, die im Verlauf der Differenzierung vermehrt exprimiert werden, grün zeigt die Gene, die vermindert exprimiert werden. Schwarz bedeutet keine Änderung in der Expression. Grau zeigt die Gene, die die Qualitätskriterien nicht erfüllt haben.

### 2.2.8 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription werden 800 ng bis 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wird die entsprechende Menge RNA mit RNase-freiem Wasser auf 10,5 µl aufgefüllt, 1 µl Oligo-dT-Primer zugegeben, 10 min bei 70 °C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend werden 4 µl 5x Puffer, 2 µl DTT, 1 µl dNTP-Mix, 0,5 µl RNasin und 1 µl Superscript II zugegeben. Nach 60minütiger Inkubation bei 42 °C wird das Enzym bei 70 °C 15 min denaturiert. Die cDNA wird 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Amplifizierung von spezifischen DNA- oder cDNA-Sequenzen verwendet. Die Primer binden sequenzspezifisch an den Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes. Die PCR-Bedingungen müssen dem jeweiligen System angepasst werden, um eine optimale Amplifizierung zu gewährleisten. Veränderbare Parameter sind dabei u. a. die *Annealing*-Temperatur der Primer, die  $MgCl_2$ - sowie die Primer- und Enzym-Konzentrationen. Eine PCR wird in 30-40 Zyklen durchgeführt, die jeweils aus drei Schritten bestehen: Denaturierung, *Annealing* der Primer und Elongation. Bei der Denaturierung werden

die Proben auf 95 °C erhitzt, sodass die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge dissoziiert. Für das *Annealing* der Primer wird die Probe auf die optimale *Annealing*-Temperatur abgekühlt, die abhängig ist von der Länge und Basenzusammensetzung (GC-Gehalt) der Primer. Bei der Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase bei 72 °C die neuen DNA-Stränge. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Zahl der DNA-Doppelstränge, d. h. die DNA-Menge steigt exponentiell an. Durch Agarosegel-Elektrophorese der amplifizierten Proben kann die erhaltene DNA-Menge semi-quantitativ bestimmt werden. Die quantitative *Real-time*-PCR (qPCR) ermöglicht eine genauere Quantifizierung.

### 2.2.9.1 Block-PCR

Für einen qualitativen Test der Primer wird eine Block-PCR durchgeführt und die Proben anschließend elektrophoretisch im Agarosegel (1 %) aufgetrennt und die Größe der Amplifikate überprüft. Ein 25 µl-Ansatz wird wie folgt pipettiert:

15,875 µl	Aqua dest.
2,5 µl	10x PCR-Puffer
0,5 µl	dNTP-Mix
1 µl	<i>Forward</i> -Primer (10 pmol)
1 µl	<i>Reverse</i> -Primer (10 pmol)
4 µl	cDNA
0,125 µl	HotStarTaq DNA-Polymerase

Für das *Annealing* der Primer werden die entsprechenden Temperaturen der Primer verwendet (siehe Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2). Das PCR-Programm verläuft wie folgt.

	95 °C	15 min
33x	95 °C	20 s
	56/62 °C	20 s
	72 °C	35 s
	72 °C	10 min

### 2.2.9.2 Quantitative *Real-time*-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Es gibt verschiedene, auf Fluoreszenz basierende Messprinzipien, die zum Beispiel DNA-interkalierende Farbstoffe oder TaqMan<sup>TM</sup>-Sonden verwenden.

Ein interkalierender Farbstoff ist SYBR<sup>®</sup> Green, das sich in die kleinen Furchen der DNA einlagert. Durch die Bindung wird die Intensität der Fluoreszenz verstärkt und man erhält ein Signal, das proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA in der Probe ist. Die Messung erfolgt am Ende der Elongationsphase. Bei dieser Methode werden alle doppelsträngigen DNA-Moleküle, d. h. auch eventuelle Nebenprodukte detektiert. Mit Hilfe einer Schmelzkurve erfolgt die Prüfung auf Nebenprodukte oder Primerdimere. Genauer sind Detektionsmethoden, die mit sequenzspezifischen Sonden arbeiten.

Für die Detektion mit einer TaqMan-Sonde wird ein sequenzspezifisches Oligonukleotid benötigt, das doppelt markiert ist. Zum einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM = Carboxyfluorescein), zum anderen mit einem *Quenching*-Molekül. Letzteres unterdrückt die Fluoreszenz des Farbstoffes, solange es sich in räumlicher Nähe zu diesem befindet.

Beim *Annealing* bindet neben den Primern auch die TaqMan-Sonde sequenzspezifisch an die einzelsträngige DNA. Beim Elongationsschritt baut die Polymerase mit ihrer 5'-Exonukleaseaktivität die Sonde ab und trennt damit Fluoreszenzfarbstoff und *Quenching*-Molekül räumlich voneinander.

Carboxyfluorescein emittiert daraufhin nach Anregung Fluoreszenz, die detektiert wird. Die Stärke des Signals ist proportional zur Anzahl neu gebildeter DNA. Die Messung erfolgt nach dem Elongationsschritt.

### 2.2.9.3 qPCR mit SYBR Green

Für qPCRs mit SYBR Green werden nur Primerpaare verwendet, die nach der Block-PCR im Agarosegel eine saubere Bande zeigen. Zunächst erfolgt eine Effizienzbestimmung, in der vier verschiedene cDNA-Konzentrationen verwendet werden. Es werden für alle Proben Dreifachwerte bestimmt. Der SYBR Green PCR-Mix enthält SYBR Green, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und DNA-Polymerase. Das Pipettierschema für einen 25 µl-Ansatz ist wie folgt:

6,5 µl	Aqua dest.
1 µl	<i>Forward</i> -Primer (10 pmol)
1 µl	<i>Reverse</i> -Primer (10 pmol)
12,5 µl	PCR-Mix
4 µl	cDNA

Prinzipiell wird das gleiche Programm wie in der Block-PCR verwendet. Die *Annealing*-Temperatur (x °C) ist primerabhängig.

	95 °C	15 min
40x	95 °C	20 s
	x °C	20 s
	72 °C	35 s

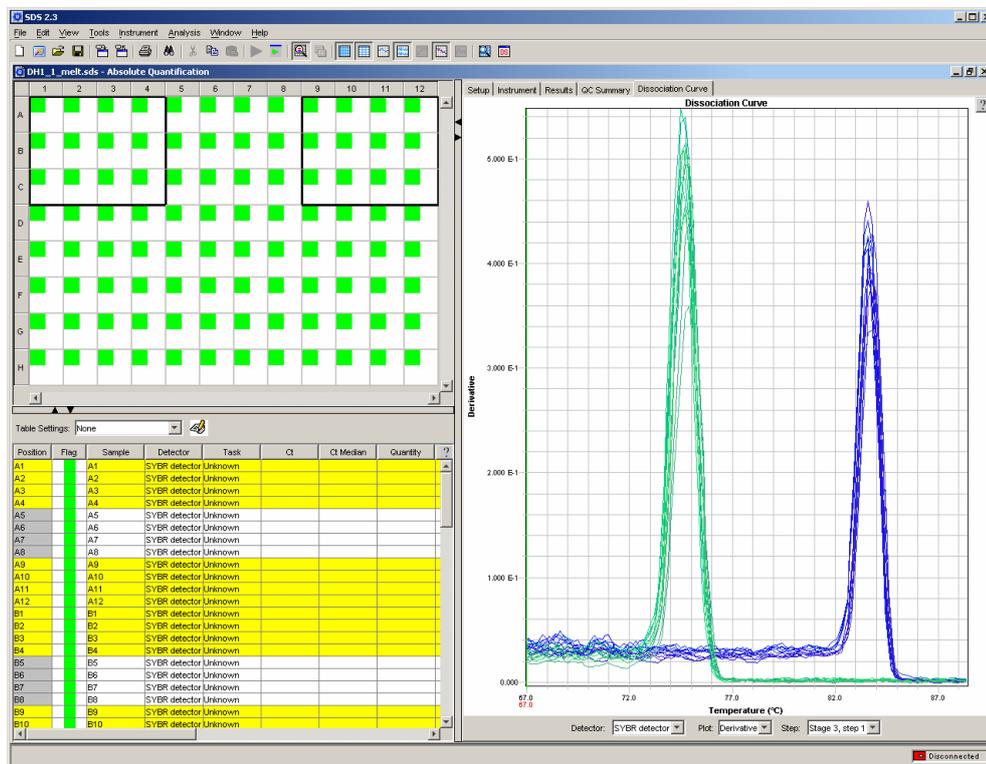
Nach jeder qPCR wird eine Schmelzkurve erstellt.

## Schmelzkurve

Um die Detektion eventueller Nebenprodukte auszuschließen, wird nach jeder qPCR eine Schmelzkurve nach folgendem Programm erstellt.

95 °C      15 s  
 60 °C      20 s  
 innerhalb von 20 min langsames Aufheizen auf 95 °C  
 95 °C      15 s

Während der 20minütigen Aufheizphase wird die Fluoreszenz der Proben gemessen. Durch das Schmelzen des Produktes kann SYBR Green nicht mehr in die DNA interkalieren und die Fluoreszenz wird schwächer. Jedes Produkt hat einen spezifischen Schmelzpunkt, der in der anschließenden Auswertung als Peak zu sehen ist (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Schmelzkurve einer qPCR.**

Zu sehen sind die Schmelzkurven von zwei verschiedenen Produkten, deren Schmelztemperaturen bei 74,5 °C und 83,5 °C liegen. Es sind keine zusätzlichen Peaks zu sehen, die auf Primerdimere oder unspezifische Produkte hindeuten.

#### 2.2.9.4 microRNA-qPCR (330plex-Assay)

Für die Untersuchungen der miRNA-Expression steht ein nicht-kommerziell erhältlicher 330plex-Assay zur Verfügung (Lao et al., 2007). Darin enthalten sind 319 humane miRNAs und 11 virale miRNAs (Humanes Zytomegalovirus). Für die Analysen können Zellen oder isolierte RNA eingesetzt werden. Zellen werden vor den folgenden Reaktionen 5 min bei 95 °C lysiert. Es erfolgt zunächst eine Reverse Transkription mit 330 miRNA-spezifischen *Stemloop*-Primern. Anschließend wird eine Prä-Amplifizierung mit 330 miRNA-spezifischen *Forward*-Primern und einem universalen *Reverse*-Primer durchgeführt. Diese Reaktionen erfolgen in einem Reaktionsgefäß. Zur Detektion der einzelnen miRNAs erfolgt nun eine quantitative *Real-time*-PCR mit miRNA-spezifischen TaqMan-Sonden. Pro Well wird eine miRNA detektiert.

Die Reverse Transkription wird mit dem High Capacity cDNA Archive Kit durchgeführt und das Pipettierschema ist wie folgt.

0,5 µl	10x Puffer
0,25 µl	dNTP-Mix
0,065 µl	RNase Inhibitor
0,25 µl	330plex <i>Reverse</i> -Primer
0,6 µl	RNase-freies Wasser
3 µl	RNA oder Zellen
0,335 µl	MMLV Reverse Transkriptase

Die Inkubation erfolgt zyklisch. Je nach Menge der miRNA bzw. Anzahl der Zellen werden 30-60 Zyklen durchgeführt.

30-60x	20 °C	30 s
	42 °C	30 s
	50 °C	1 s
	85 °C	5 min

Für die Prä-Amplifikation wird dem Ansatz folgendes zugegeben.

12,5 µl	TaqMan Universal PCR Master Mix
2,5 µl	330plex <i>Forward</i> -Primer
1,25 µl	universaler <i>Reverse</i> -Primer
0,5 µl	dNTP-Mix
1 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung
1 µl	Aqua dest.
1,25 µl	AmpliTaq Gold

Das Programm der Prä-Amplifikation wird wie folgt durchgeführt.

	95 °C	10 min
	55 °C	2 min
18x	95 °C	1 s
	65 °C	1 min

Der Ansatz wird 1 : 4 mit Aqua dest. verdünnt. Für die qPCR liegen für jede miRNA spezifische *Forward*-Primer und spezifische TaqMan-Sonden als Mix vor. Zur Überprüfung der Reaktion erfolgt zunächst eine quantitative PCR für miR-16, bevor alle anderen miRNAs gemessen werden. Ein 10 µl-Ansatz wird wie folgt pipettiert.

2,85 µl	Aqua dest.
5 µl	TaqMan Universal PCR Master Mix
2 µl	<i>Forward</i> -Primer und TaqMan-Sonde
0,05 µl	universaler <i>Reverse</i> -Primer
0,1 µl	Prä-PCR-Mix

Die PCR verläuft nach folgendem Programm.

	95 °C	10 min
40x	95 °C	15 s
	60 °C	1 min

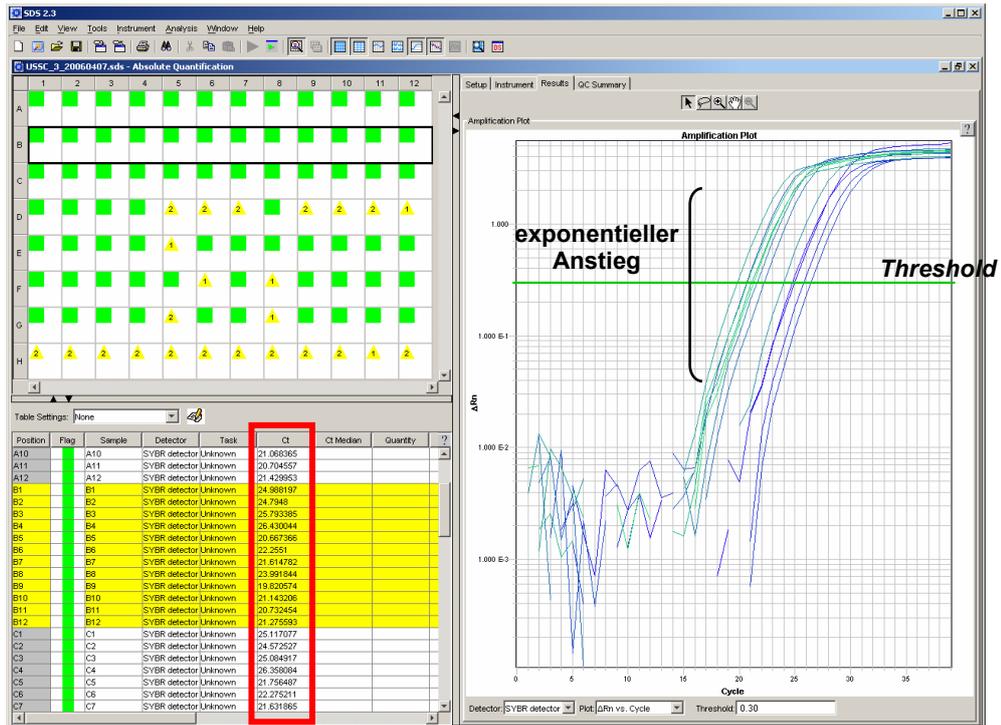
Die Auswertung erfolgt mit der Software SDS2.3.

### **2.2.9.5 TaqMan-MicroRNA-Assay**

Die TaqMan-MicroRNA-Assays für miR-16 und miR-26a werden nach Herstellerangaben verwendet. Es werden 5 ng smallRNA-Fraktion für die Reverse Transkription eingesetzt. Es wird das High Capacity miRNA Archive Kit verwendet. Die Reaktion wird 1 : 15 verdünnt in der TaqMan-PCR eingesetzt und Dreifachwerte bestimmt.

### **2.2.9.6 Auswertung der qPCR**

Die Auswertung der qPCRs erfolgt nach Konvertierung in SDS-Files mit der Software SDS2.3. Dabei berechnet das Programm die Basislinie automatisch. Anschließend legt man für die Berechnung der Ct-Werte (*cycle threshold*) den so genannten *Threshold* fest. Er sollte im Bereich des exponentiellen Anstiegs der Kurven liegen (Abbildung 2.2). Der Ct-Wert stellt den Schnittpunkt der Probenkurve mit dieser Geraden dar.



**Abbildung 2.2: Schema der qPCR-Auswertung.**

Logarithmische Darstellung der Amplifizierung. Der *Threshold* (grüne Linie) muss im Bereich des exponentiellen Anstiegs liegen. Die Schnittpunkte der Probenkurven mit dem *Threshold* (Ct-Werte) werden von der Software berechnet (rotes Kästchen).

Mit Hilfe einer cDNA-Konzentrationsreihe kann die Effizienz einer qPCR bestimmt werden. Trägt man die Ct-Werte gegen die logarithmierten Werte der Konzentrationen auf, kann man mit Hilfe des Anstiegs (m) die Effizienz nach folgender Formel bestimmen:  $\text{Effizienz} = 10^{1/m} - 1$ . Ein Anstieg von 3,32 entspricht einer 100%igen PCR-Effizienz.

Um Veränderungen der Genexpression nachweisen zu können, müssen die erhaltenen Werte zunächst normalisiert werden. Für mRNA-Messungen wird auf ein geeignetes Referenzgen normalisiert, bei dem von einer konstanten Expression ausgegangen wird. Der delta(d)Ct-Wert berechnet sich aus dem Ct-Wert des untersuchten Gens und dem Ct-Wert des Referenzgens:

$$dCt = Ct (\text{Gen}_{\text{Tag x}}) - Ct (\text{Referenzgen}_{\text{Tag x}})$$

Für miRNAs gibt es zurzeit keine geeignete Referenz-miRNA, deren Expression als unverändert gilt. Daher wird, ähnlich wie bei der globalen Genexpressionsanalyse, über alle exprimierten miRNAs normalisiert. Dazu wird für jede Probe der Median der miRNAs mit Ct<35 bestimmt und dieser Wert für die Berechnung der dCt-Werte verwendet:

$$dCt = Ct (miRNA_{Tag\ x}) - Ct (Median_{Tag\ x})$$

Die Berechnung der Expressionsveränderung (ddCt-Wert) errechnet sich wie folgt:

$$ddCt = dCt (Tag\ x) - dCt (Tag\ 0)$$

ddCt-Werte kleiner Null zeigen eine erhöhte Expression verglichen mit der Referenzprobe, Werte größer Null entsprechend eine verringerte Expression. Das Vielfache der Veränderung berechnet sich nach  $2^{-ddCt}$ .

## **2.2.10 Agarosegel-Elektrophorese**

### **2.2.10.1 RNA-Agarosegel-Elektrophorese**

Zur Überprüfung der Qualität von Gesamt-RNA wird diese in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch untersucht. Dazu wird 0,82 g Agarose in 42 ml DEPC-Wasser und 5,5 ml 5x MOPS unter Erwärmen aufgelöst. Nach Zugabe von 9,9 ml 37%igem Formaldehyd wird das Gel gegossen. Je 1 µg Gesamt-RNA und 2 µl RNA High Range Ladder werden 1 : 1 mit 2x RNA Loading Dye Solution (enthält Ethidiumbromid) vermischt und 10 min bei 68 °C denaturiert. Nach Auftragung der Proben und des Standards erfolgt die Elektrophorese bei 10-15 V/cm in Laufpuffer (0,5x MOPS und 0,25 % 37%iges Formaldehyd) bis der blaue Farbstoff des Ladepuffers ca. 2/3 des Gels durchlaufen hat. Die Banden werden im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Transilluminator und entsprechender Software dokumentiert.

### **2.2.10.2 DNA-Agarosegel-Elektrophorese**

Zur Überprüfung der Reinheit von PCR-Produkten werden die PCR-Proben durch Agarosegel-Elektrophorese getrennt. Dazu werden 1-2%ige Agarosegele benutzt. Die entsprechende Menge Agarose wird in 1x TBE aufgekocht und nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid-Lösung auf 100 ml in eine Gelkammer gegossen. Jeweils 10 µl der Probe werden mit 2 µl gemischt und aufgetragen. Als Marker wird eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter verwendet. 1 µl der DNA-Leiter wird mit 4 µl Aqua dest. und 1 µl 5x Blaumarker gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 10-15 V/cm in 1x TBE bis der blaue Farbstoff des Blaumarkers ca. 2/3 des Gels durchlaufen hat. Die Banden werden im UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Transilluminator und entsprechender Software dokumentiert.

### **2.2.11 Northern Blot**

#### **Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

7,2 g Urea werden unter Erwärmen in 5,6 ml Acrylamid/Bis-Lösung (37,5 : 1) und 1,5 ml 10x TBE gelöst und 1,9 ml DEPC-Wasser zugegeben. Nach Zugabe von 80 µl 10 % APS und 15 µl TEMED wird das Gel gegossen. Das fertige Gel wird 10 min bei 250 V äquilibriert. 1 µg smallRNA-Probe wird mit Gel loading buffer II gemischt, 2 min bei 95 °C inkubiert, auf Eis gekühlt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1x TBE bei 250 V bis das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hat.

#### **Blotten auf Hybond-N+-Membran (Semi-Dry-Verfahren)**

Es werden sechs Whatman-Papiere und einmal Hybond-N+-Membran auf Größe des Gels zugeschnitten und in 0,25x TBE getränkt. Der Aufbau der Blotting-Apparatur ist wie folgt (von unten nach oben): Drei Whatman-Papiere, Membran, Polyacrylamidgel, drei Whatman-Papiere. Die Transferrichtung ist von oben (Kathode) nach unten (Anode). Das Blotten erfolgt bei 3 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche für eine Stunde und anschließend das *Cross-linking* der Membran bei 120 mJ.

### **5'-Oligonukleotidmarkierung mit radioaktivem $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP**

50 pmol DNA-Sonde in 0,5  $\mu$ l Aqua dest. werden mit 1  $\mu$ l *Forward*-Reaktionspuffer gemischt. Anschließend werden 2,5  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und 1  $\mu$ l T4-Polynukleotid-Kinase zugegeben, gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde erfolgt mit dem QIAquick Nukleotid Removal Kit nach Herstellerangaben. Die Sonde wird in 100  $\mu$ l EB-Puffer eluiert.

### **Hybridisierung**

Die Membran wird mit der RNA-Seite nach innen in die Hybridisationsröhre gelegt. Die Sonicated Salmon Sperm DNA wird 5 min bei 95 °C denaturiert. Es werden 6 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung in die Hybridisationsröhre gegeben und 30  $\mu$ l denaturierte DNA-Lösung zugegeben. Die Röhre wird mindestens eine Stunde unter Drehen bei 40-42 °C inkubiert.

Die radioaktive Sonde wird 10 min bei 95 °C denaturiert. 15  $\mu$ l Sonde und 5  $\mu$ l einer 1:500-Verdünnung der U6-Sonde (Ladekontrolle) werden in die Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 40-42 °C inkubiert.

### **Waschen, Exposition und Entwickeln des Films**

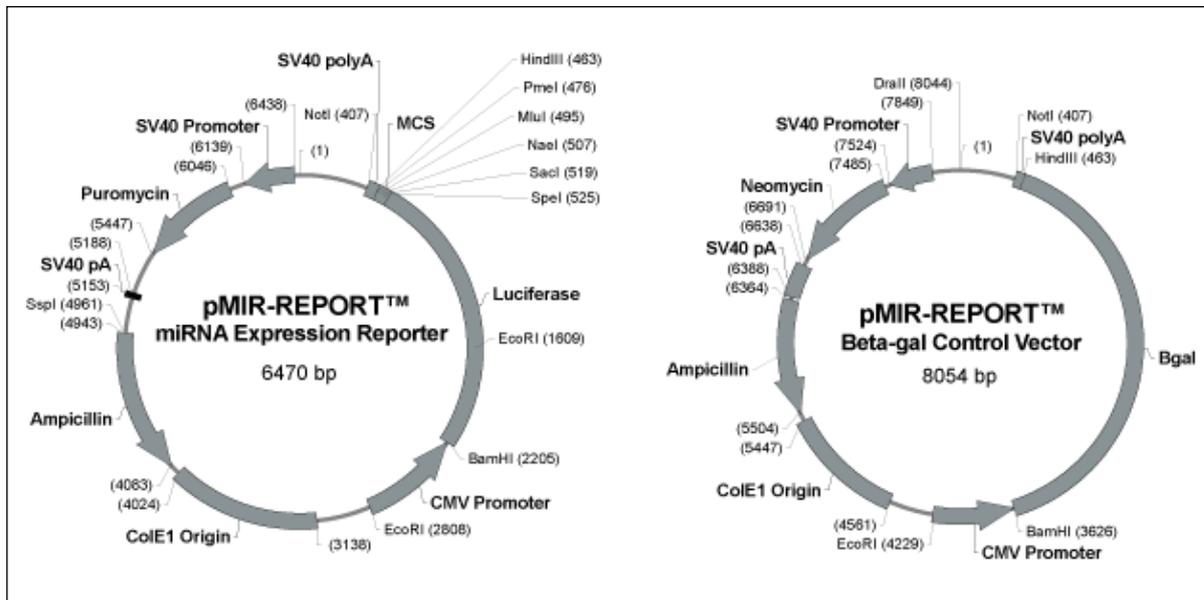
Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wird 2x mit Waschlösung 1 und 1x mit Waschlösung 2 je 10 min bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur gewaschen. Die Membran wird in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt und der Hyperfilm ECL bei -80 °C 3-5 Tage exponiert. Das Entwickeln der Filme erfolgt in der Kinderklinik des Uniklinikums Düsseldorf.

## **2.2.12 Plasmide**

### **Luciferase-Assays**

Für die Luciferase-Assays werden kommerziell erhältliche Vektoren verwendet. In den Vektor pMIR-REPORT wird der Teil des 3'-UTRs eines Gens (GATA6) kloniert, der die vorhergesagte Bindestelle für miR-26a enthält. Dazu

werden ca. 60 nt lange Oligonukleotide bestellt, die komplementär zueinander sind und an den Enden *HindIII*- bzw. *MluI*-Restriktionsschnittstellen (Tabelle 2.6) bilden.



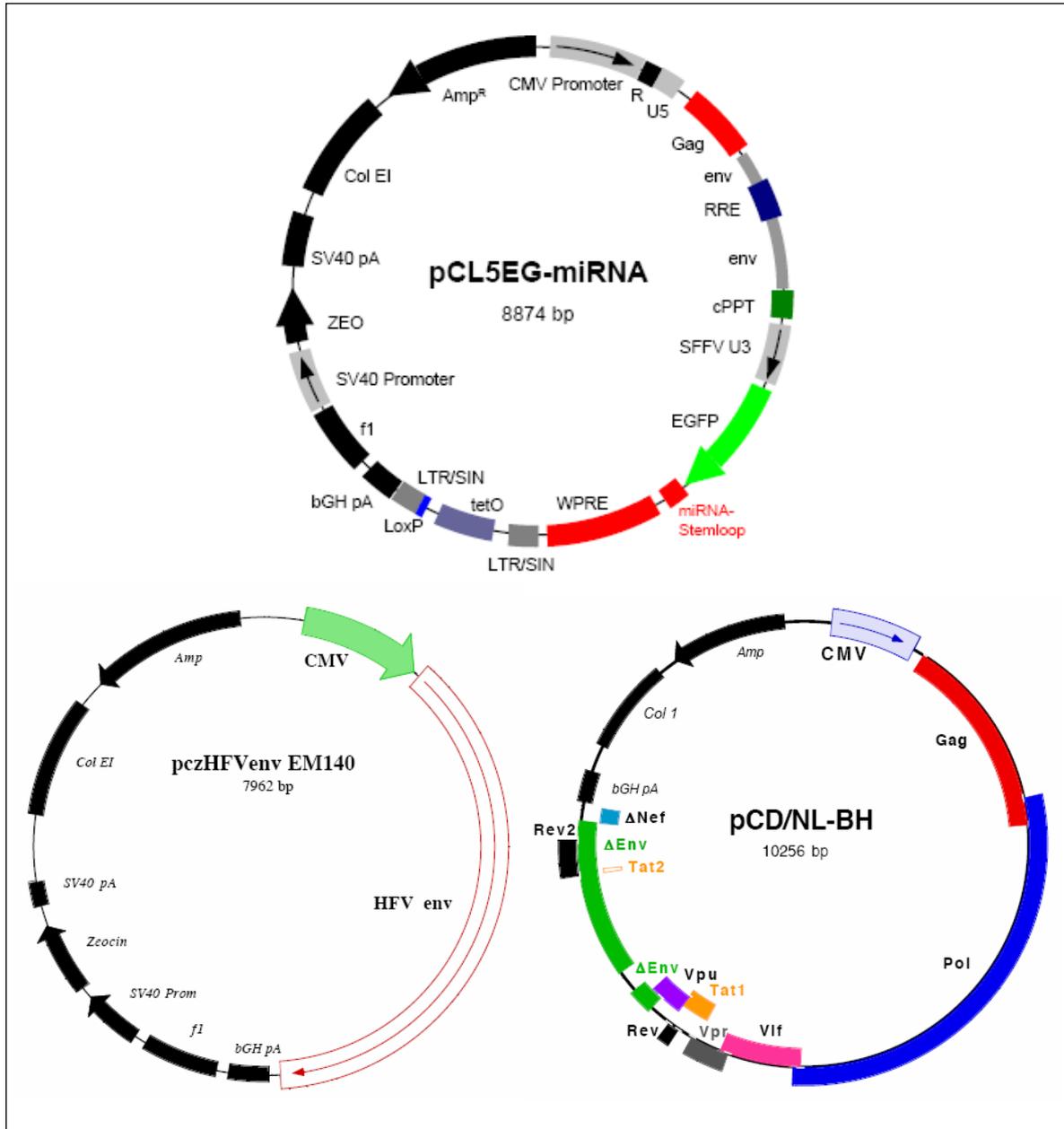
**Abbildung 2.3: Verwendete Plasmide für Luciferase-Assays.**

Im Vektor pMIR-REPORT miRNA Expression Reporter befindet sich diverse Schnittstellen für Restriktionsenzyme, um die zu untersuchenden 3'-UTRs hinter die Luciferase klonieren zu können. Der Vektor pMIR-REPORT Beta-gal Control wird bei den Luciferase-Assays als Referenzvektor verwendet.

## Virale Überexpression

Für die virale Infektion wird der Vektor pCL5EG verwendet. Der Ursprungsvektor wurde von Prof. Dr. Helmut Hanenberg (Kinderklinik, Uni Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und von Dr. Ingo Trompeter (ITZ, Uni Düsseldorf) in dieser Form kloniert. Der Vektor enthält einen Polymerase II-Promotor und das Gen für *Enhanced green fluorescence protein* (EGFP). Über diesen Marker kann der Anteil infizierter Zellen in durchflusszytometrischen Messungen quantifiziert werden. Hinter dem Gen für EGFP befinden sich verschiedene Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die für die Klonierung des miR-26a-*Stemloops* (2.1.9.5) verwendet wurden. Der resultierende Vektor pCL5EG-miR-26a ist in Abbildung 2.4 zu sehen. EGFP und der miRNA-*Stemloop* werden zusammen transkribiert und erst nach der Translation getrennt. Der Vektor pczHFVenv EM140 ist das Foamy-Verpackungsplasmid und pCD/NL-BH ist das Helferplasmid. Sie wurden

freundlicherweise von Prof. Dr. Helmut Hanenberg zur Verfügung gestellt und sind ebenfalls in Abbildung 2.4 dargestellt.



**Abbildung 2.4: Verwendete Plasmide für miRNA-Überexpression.**

Für die Überexpression von miRNAs wird der Vektor pCL5EG (oben) verwendet. Die benötigten Plasmide für die Herstellung der Viren sind pczHFVenv EM140 als Foamy-Verpackungsplasmid (links unten) und pCD/NL-BH als Helferplasmid (rechts unten).

### 2.2.12.1 Restriktionsverdau

Pro 1 µg DNA wird mit 5 U Restriktionsenzym im entsprechenden Puffer eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird enzymabhängig bei 65-80 °C hitzeinaktiviert oder der Ansatz direkt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit

aufgereinigt. Für einen Doppelrestriktionsverdau werden die Enzyme und Puffer nach Herstellerangaben kombiniert.

#### **2.2.12.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien *E. coli* SURE**

Es werden 5 ml einer 25 ml-Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium mit Tetracyclin und Kanamycin unter Schütteln bei 37 °C so lange inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht ist. Die Bakterien werden dann bei 4 °C und 4000xg 15 min zentrifugiert und anschließend in 500 ml kaltem Glycerinwasser (10 %) resuspendiert. Dieser Schritt wird mit 250 ml und 10 ml Glycerinwasser wiederholt. Zuletzt werden die Bakterien in 1,5 ml Glycerinwasser resuspendiert, zu 40 µl in Eppendorftubes aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.12.3 Klonierung der Plasmide**

Der Vektor pMIR-REPORT wurde *HindIII-MluI*-geschnitten, das Plasmid pCL2.THPC *ClaI-MluI*-geschnitten verwendet.

Die Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben in TE-Puffer gelöst und 1 : 1 gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Ligation werden in einem 5 µl-Ansatz 100 ng des Vektors 1 : 5 (molares Verhältnis) mit den Oligonukleotiden gemischt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend werden 1 µl 5x Puffer und 1 µl (1 U) T4-DNA-Ligase zugegeben und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Zur Kontrolle der Re-Ligation des Vektors wird ein Kontrollansatz ohne Insert mitgeführt. Die Aufreinigung des Ligationsansatzes erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit. Das Plasmid wird in 25 µl Aqua dest. eluiert.

#### **2.2.12.4 Transformation durch Elektroporation**

Für die Transformation werden elektrokompetente *E. coli* SURE (2.2.12.2) verwendet. Nach 10minütigem Auftauen auf Eis werden 2,5 µl eines ligierten und aufgereinigten Plasmids bzw. 0,5 µl eines Plasmids einer Mini- oder Maxi-

Plamidpräparation zugegeben und vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wird in eine Elektroporationsküvette überführt und die Bakterien bei 2500 V, 200  $\Omega$  und 25  $\mu$ F elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) wird das Gemisch in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 30 min bei 37 °C und 210 rpm inkubiert. Es werden 50 bzw. 300  $\mu$ l (bei Plasmiden einer Mini- oder Maxipräparation vorher 1:100-Verdünnung in LB-Medium) auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.12.5 Kolonie-PCR

Für Kolonie-PCRs werden Bakterienkolonien von LB-Agar-Platten gepickt und in 10  $\mu$ l Aqua dest. in 96-Well-PCR-Platten überführt. Ein Teil davon (ca. 1  $\mu$ l) wird in 300  $\mu$ l LB-Medium (mit Ampicillin) überführt und bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien werden bei 95 °C 10 min denaturiert. Für die PCR wird folgender Mix mit den in Tabelle 2.3 angegebenen Primern angesetzt (15  $\mu$ l pro Reaktion).

9,85 $\mu$ l	Aqua dest.
2,5 $\mu$ l	10x PCR-Puffer
0,5 $\mu$ l	dNTP-Mix
1 $\mu$ l	<i>Forward</i> -Primer (10 pmol)
1 $\mu$ l	<i>Reverse</i> -Primer (10 pmol)
0,15 $\mu$ l	HotStarTaq DNA-Polymerase

Die PCR verläuft nach folgendem Programm.

	95 °C	15 min
35x	95 °C	30 s
	55 °C	20 s
	72 °C	40 s
	72 °C	7 min

Die Proben werden mit 5 µl Blaumarker gemischt und 15 µl in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Größe der Amplifikate überprüft. Von den Bakterienkolonien, die das klonierte Insert enthalten, werden Mini-Plasmidpräparationen angesetzt.

#### **2.2.12.6 Mini-Plasmidpräparation**

Einzelne Klone oder 100 µl der Kulturen, die bei der Kolonie-PCR angesetzt werden (2.2.12.5), werden in je 3 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C und 210 rpm inkubiert. 2 ml davon werden mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Nach Elution in 50 µl Aqua dest. erfolgt ein Restriktionsverdau zur Überprüfung.

#### **2.2.12.7 Maxi-Plasmidpräparation**

Für eine Maxi-Plasmidpräparation werden 100 µl der Mini-Präparation oder eine Kolonie einer Agarplatte in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37 °C und 210 rpm inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgt mittels HiSpeed Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wird in 400 µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration am Nanodrop photometrisch bestimmt.

#### **2.2.12.8 Sequenzierung**

Für die Sequenzierung der Plasmide wird das BigDye Terminator Sequencing Kit v1.1 verwendet. Ein 10 µl-Ansatz enthält 6 µl Aqua dest., 1 µl 5x Puffer, 1 µl Plasmid-DNA (ca. 250 ng), 10 pmol des *Forward*- oder *Reverse*-Sequenzierprimers (Tabelle 2.3) und 1 µl des Sequenziermixes. Das PCR-Programm verläuft wie folgt.

---

	96 °C	1 min
25x	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60 °C	4 min

Die Sequenzierung selbst erfolgt im HLA-Labor des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika. Ausgewertet werden die Sequenzen mit dem Programm Chromas.

### 2.2.13 Luciferase-Assay

Für den Nachweis der Bindung bestimmter miRNAs an ein vorhergesagtes Zielgen werden Luciferase-Assays durchgeführt. Dazu wird der Bereich des 3'-UTRs des Gens mit der potentiellen miRNA-Bindestelle an das 3'-Ende der Luciferase kloniert (Tabelle 2.6).

Für die Optimierung der Transfektion der miRNA-Vorläufer wird das Pre-miR miRNA Precursor Starter Kit verwendet. Es enthält das Transfektionsmittel siPORT NeoFX, miR-1-Vorläufer, *Nonsense*(NS)-Vorläufer (Negative Control # 1) und den Primer-TaqMan-Sonden-Mix für PTK9 (*Protein Tyrosine Kinase 9*), ein experimentell nachgewiesenes Zielgen von miR-1.

Es werden HeLa-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät (60000 Zellen/Well). 24 h später wird der Transfektionsmix für die miRNA/NS-Vorläufer (je 6,25 µM) wie folgt angesetzt. Zunächst werden zwei verschiedene Verhältnisse siPORT NeoFX zu miRNA/NS-Vorläufer getestet, wofür HeLa-Zellen mit 50 nM miRNA/NS-Vorläufern transfiziert werden. Dazu werden 3,6, 6 bzw. 9 µl siPORT *NeoFX* in Opti-MEM pipettiert (ad 35 µl), gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubation werden 6 µl miRNA/NS-Vorläufer (6,25 µM) in 29 µl Opti-MEM pipettiert. Dieser Mix wird anschließend zum siPORT NeoFX-Opti-MEM-Mix pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Zellen werden 680 µl frisches Medium (inklusive FCS und Pen/Strep) gegeben und der Transfektionsmix tropfenweise zugegeben. Die Platten werden vorsichtig geschüttelt und 24 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 750 µl frischem Medium

wird erneut 24 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach Zentrifugation und Waschen mit PBS werden sie in 350 µl RLT-Puffer (1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) lysiert und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit isoliert (2.2.5.2). Die Reverse Transkription erfolgt mit 800 ng RNA wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben. Die Bestimmung der Transkriptmenge von PTK9 erfolgt nach Herstellerangaben. Die cDNA wird auf 160 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und davon 3 µl in die qPCR eingesetzt. Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 2.2.9.6 beschrieben. Als Referenzgen wird  $\beta$ -Aktin verwendet.

Für die Luciferase-Assays erfolgt die Transfektion der Plasmide pMIR-REPORT miRNA Expression Reporter (mit und ohne GATA6-3'UTR) und pMIR-REPORT Beta-gal Control Vector (vgl. Abbildung 2.3) mit siPORT XP-1 zeitgleich mit oder 24 h nach Transfektion der miRNA/NS-Vorläufer. Es werden 20-200 ng pro Plasmid transfiziert. Das Verhältnis siPORT XP-1 (µl) zu Plasmid (µg) beträgt 3 : 1. Der pMIR-REPORT Beta-gal Control Vektor dient der Effizienzkontrolle der Transfektion und wird als Normalisator verwendet. Der leere Vektor pMIR-REPORT wird als Kontrolle mit transfiziert. Die Ansätze werden wie folgt pipettiert: Die entsprechende Menge siPORT XP-1 wird in Opti-MEM pipettiert (ad 56 µl), gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die entsprechenden Mengen der Vektoren pMIR-REPORT bzw. pMIR-REPORT-GATA6 zugegeben. Zu jedem Ansatz werden außerdem die gleiche Menge pMIR-REPORT Beta-gal Control Vektor gegeben (ad 60 µl), gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des alten Mediums und Waschen der Zellen mit PBS werden 690 µl frisches Medium (inklusive FCS und Pen/Strep) in jedes Well gegeben, 60 µl Transfektionsmix tropfenweise zugegeben, vorsichtig gemischt und 24-48 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Für die Messung der Luciferaseaktivität werden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert und in 100 µl Lysepuffer lysiert. Das Dual-Light Combined Reporter Gene Assay System wird nach Herstellerangaben verwendet. 10 µl Lysat werden mit 25 µl Puffer A gemischt, 100 µl Puffer B (inklusive Galacton-Plus Substrate) zugegeben und die Luciferaseaktivität 1 s im Luminometer gemessen. Die Proben werden anschließend 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Light Emission Accelerator II Lösung wird die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität 1 s im Luminometer gemessen. Zur Berechnung der relativen Luciferaseaktivität wird der Quotient aus Luciferaseaktivität und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität gebildet.

## **2.2.14 Überexpression von miRNAs**

### **2.2.14.1 Transiente Transfektion**

Zum Test der Funktionalität der klonierten Vektoren (pCL5EG) werden diese zunächst mit siPORT XP-1 transient in HeLa-Zellen transfiziert. Dazu werden am Vortag HeLa-Zellen ausgesät (60000 Zellen in 12-Well-Platten). Es werden 300 ng Vektor transfiziert. Dazu werden 0,9 µl siPORT XP-1 in 56,1 µl Opti-MEM pipettiert, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 3 µl Vektor (100 ng/µl) zugegeben, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Zellen werden 690 µl frisches Medium (inklusive FCS und Pen/Strep) gegeben, 60 µl Transfektionsmix tropfenweise zugegeben, die Platten vorsichtig geschüttelt und unter Zellkulturbedingungen 24 h inkubiert. Nach Zugabe von 750 µl frischem Medium wird erneut 24 h inkubiert. Die Zellen werden dann mit PBS gewaschen, trypsinisiert und die Zellen mit 600 µl Lysepuffer (mirVana miRNA Isolation Kit) lysiert. Die Isolierung der smallRNA erfolgt nach 2.2.5.1. Mit Hilfe der TaqMan-MicroRNA-Assays wird die Expression der überexprimierten miRNAs bestimmt (2.2.9.5).

### **2.2.14.2 Stabile Transfektion**

#### **Virale Überstände**

Es werden  $6 \cdot 10^6$  293T-Zellen in 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und maximale Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Für die Transfektion wird Polyethylenimin (PEI) verwendet. Transfiziert werden die Plasmide für die Überexpression (pCL5EG), sowie die Verpackungs- und Helferplasmide pczHFVenv EM140 und pCD/NL-BH.

Am Folgetag werden folgende Lösungen hergestellt:

PEI-Lösung	45 µl PEI (1 mg/ml) ad 1000 µl Medium ohne FCS
DNA-Lösung	5 µg Plasmid-miRNA 5 µg pczHFVenv EM140 5 µg pCD/NL-BH ad 1000 µl Medium ohne FCS

PEI- und DNA-Lösung werden vereinigt und gemischt. Dieser Transfektionsmix wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transfektion wird das Medium der 293T-Zellen entfernt und 4 ml Medium (15 % FCS, 2 % Pen/Strep) auf die Zellen gegeben. 2 ml Transfektionsmix werden zu den Zellen gegeben und diese über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

Zur Induktion werden am nächsten Tag nach Entfernen des alten Mediums 5 ml neues Medium und 60 µl Natriumbutyrat-Lösung (1 M) zu den Zellen gegeben und 8 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird das Medium entfernt, 5 ml IMDM (10 % FCS) zu den Zellen gegeben und über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Der Überstand wird am nächsten Tag abgenommen und sterilfiltriert (0,45 µm). Er wird direkt für virale Infektionen verwendet oder bei -80 °C gelagert.

### **Infektion**

Zur Infektion werden am Vortag HeLa- oder USSC-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät (200.000 bzw. 100.000 Zellen pro Well). Der virale Überstand wird in Originalkonzentration oder verdünnt verwendet. Die Zellen werden über Nacht bei Zellkulturbedingungen inkubiert (mindestens 16 h).

Nach Zugabe von frischem Medium werden die Zellen einen weiteren Tag unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und weiterkultiviert bzw. in PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

## **Durchflusszytometrie**

Bei durchflusszytometrischen Analysen werden Zellen mit Laserlicht aktiviert und ihre Eigenschaften durch Emission optischer Signale bestimmt. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und einzeln analysiert. Dabei erfolgt zuerst eine Größen- und Granularitätsbestimmung durch Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht respektive. Sind die Zellen durch fluoreszierende Farbstoffe markiert wie in diesem Fall mit EGFP, dessen Gen im pCL5EG-Vektor kodiert ist, erfolgt die Messung der Fluoreszenz der Zellen.

Vor der Messung erfolgt eine Einstellung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes und der Fluoreszenz mit unbehandelten Zellen. Um die Population der lebenden Zellen wird ein Gate gesetzt. Zur Quantifizierung werden die fluoreszierenden Zellen eingegrenzt, um sie von den nicht-fluoreszierenden Zellen der im Folgenden zu messenden Proben abzutrennen und die Effizienz der viralen Markierung beurteilen zu können. Es werden die Werte von je 50000 lebenden Zellen aufgenommen.

## **qPCR- und Microarray-Analyse nach viraler Transfektion**

Die Zellen werden weiter kultiviert. Ein Teil der Zellen wird erneut durchflusszytometrisch analysiert, aus den restlichen Zellen wird mittels mirVana miRNA Isolation Kit die RNA isoliert (2.2.5.1). Dabei werden die small- und totalRNAs zusammen isoliert. Die miR-26a-Expression wird in TaqMan-MicroRNA-Assays analysiert (2.2.9.5). Außerdem wird mit USSC SA503 eine globale Genexpressionsanalyse der pCL5EG-miR-26a- im Vergleich zu pCL5EG-infizierten Zellen durchgeführt.

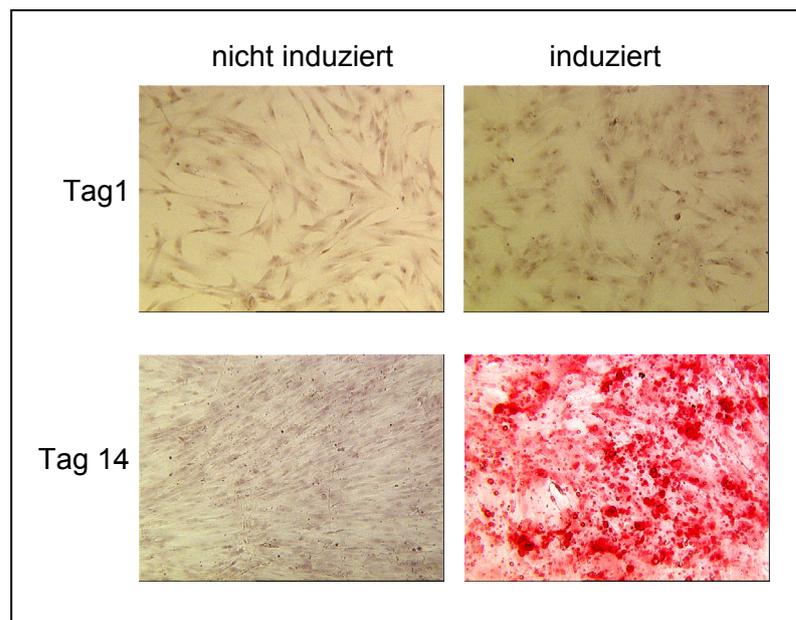
### **3 ERGEBNISSE**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der osteogenen Differenzierung von Stammzellen untersucht. Dazu wurden globale Genexpressionsanalysen zur Identifizierung wichtiger proteinkodierender Gene durchgeführt und die Expression von microRNAs (miRNAs) als negative Regulatoren der Translation analysiert. Während einige osteorelevante proteinkodierende Gene bereits bekannt sind, ist die Rolle der miRNAs in der osteogenen Differenzierung nicht geklärt und bisherige Veröffentlichungen beschränken sich auf die Untersuchung von Prä-Osteoblasten. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit unrestringierte Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (USSC SA503), mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC K111) und eine potentielle Nierentumorzelllinie (DH1) verwendet. Des Weiteren erfolgte die Etablierung funktioneller Assays zur Untersuchung von miRNAs.

#### **3.1 Globale Genexpressionsanalysen proteinkodierender Gene**

##### **3.1.1 Qualität und Integrität der RNA**

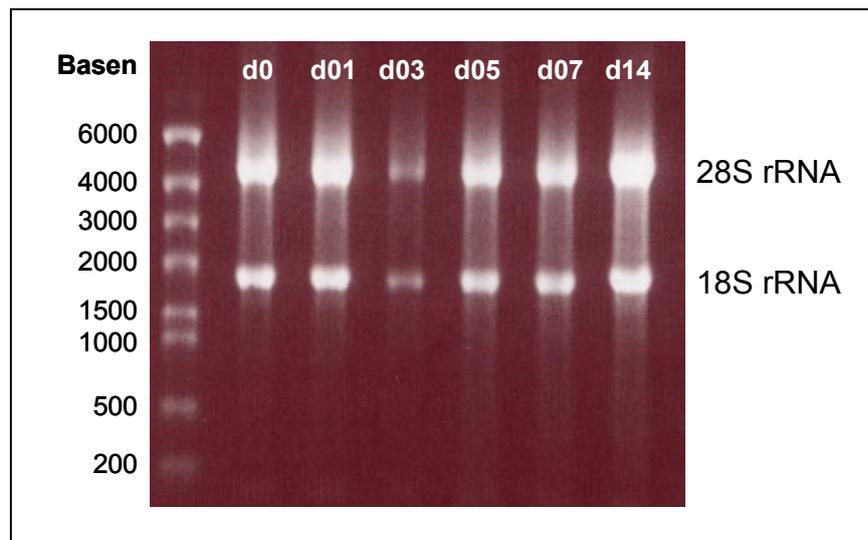
Die Beurteilung der osteogenen Differenzierung der Zellen erfolgte durch Nachweis der Kalziumanlagerungen mittels Alizarinrot-Färbung. Es wurden fünf Zeitpunkte der osteogenen Differenzierung untersucht: Tag 1, 3, 5, 7 und 14 nach Induktion, die im Weiteren als d01, d03, d05, d07 bzw. d14 bezeichnet werden. An allen Tagen wurden Alizarinrot-Färbungen durchgeführt, wobei nicht induzierte Zellen als Vergleich dienten. USSC SA503, MSC K111 und DH1 zeigten an den Tagen 5 und 7 nur vereinzelte Rotfärbungen. An Tag 14 war bei allen Zellen eine deutliche und fast vollständige Rotfärbung nachweisbar. Die undifferenzierten Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt und in keiner Zelllinie Kalziumanlagerungen. Beispielhaft ist in Abbildung 3.1 die Alizarinrot-Färbung der Zellen der MSC K111 an Tag 1 und Tag 14 zu sehen.



**Abbildung 3.1: Alizarinrot-Färbung der MSC K111 an Tag 1 und Tag 14 nach Induktion der osteogenen Differenzierung.**

An Tag 1 ist keine Rotfärbung zu erkennen, während an Tag 14 die osteogene Differenzierung der Zellen anhand der Rotfärbung nachgewiesen wurde. Nicht induzierte Zellen (links) dienten als Kontrolle.

Für die RNA-Isolierung wurde ein Kit verwendet, bei dem die smallRNA-Fraktion (<200 nt) getrennt isoliert werden kann. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde mit der isolierten totalRNA-Fraktion ein DNase-Verdau durchgeführt. Die Qualität der RNA wurde anschließend mit einem denaturierenden RNA-Agarosegel überprüft. Bei allen Proben waren im Gel deutlich die 28S- und 18S-rRNA-Banden bei ca. 4700 bzw. 1900 bp zu sehen. DNA-Kontamination war ebenso wenig erkennbar wie Degradation der RNA. In Abbildung 3.2 ist beispielhaft ein RNA-Agarosegel nach dem DNase-Verdau der RNA-Proben von MSC K111 zu sehen.



**Abbildung 3.2: Denaturierendes RNA-Agarosegel zur Überprüfung der Qualität und Integrität der totalRNA.**

Aufgetragen wurde jeweils 1 µg totalRNA aller sechs Zeitpunkte der osteogen differenzierten MSC K111.

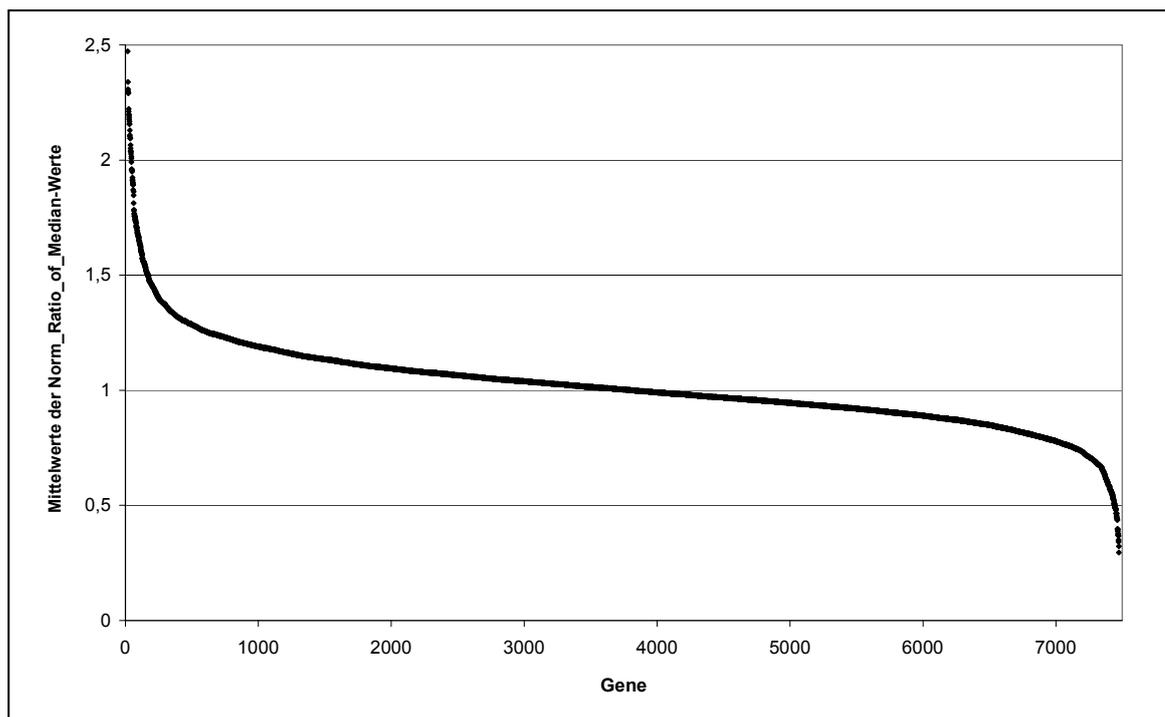
Um differentielle Genexpressionen untersuchen zu können, wurden mit den totalRNA-Proben der Zellen globale Genexpressionsanalysen unter Verwendung der Microarraytechnologie durchgeführt. Es wurde ein System zur Zweifarbenhybridisierung verwendet, womit die Expression von ca. 25100 Genen ermittelt werden konnte. Als Referenz diente immer die RNA undifferenzierter Zellen (d0) der entsprechenden Zelllinie. Zu jedem Experiment erfolgte eine technische Wiederholung mit vertauschten Fluoreszenzfarbstoffen (*colour-swap*). Die smallRNA-Proben wurden für die Untersuchung der miRNA-Expression verwendet. Dazu wurde ein 330plex-qPCR-Assay verwendet.

### 3.1.2 Auswertung der globalen Genexpressionsanalysen

Um möglichst viele Gene, deren relative Expressionen sehr verschieden sind, auswerten zu können, wurde jeder Microarray zweimal mit unterschiedlicher Signalverstärkung gescannt. Die in beiden Scanvorgängen ermittelten Ratios wurden mit der Software Acuity 3.1 intensitätsabhängig normalisiert (Lowess-Normalisierung) und die erhaltenen *Norm Ratio of Median*-Werte in einer institutsinternen Datenbank hinterlegt.

Bei der Auswertung erfolgte zuerst ein Filtern des Signals über Hintergrund (*Signal/Noise*, S/N). Nur Gene, deren Rot- oder Grünfluoreszenzen mindestens fünffach stärker waren als die Fluoreszenz des Hintergrunds, wurden in die Auswertung einbezogen. Der Hintergrund bei den Operon-Microarrays war durchgängig sehr niedrig: zum Teil lagen die Signale der Fluoreszenzwerte unter 100 auf der Skala bis 65535 Quanten. Für Gene, deren Fluoreszenz für eine der beiden Farben in der Signalsättigung (>65535 Quanten) lag, musste das Signal der jeweils anderen Farbe <32750 Quanten betragen, um dieses Gen als verändert exprimiert definieren zu können (zweifach veränderte Expression). Wurde diese Bedingung nicht erfüllt, war dieser Spot für diesen Scanvorgang nicht auswertbar und wurde in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Eine weitere Bedingung war, dass Gene in beiden Hybridisierungen auswertbar sein müssen (n=2). War ein Spot nach den genannten Kriterien in beiden Scans auswertbar, wurden die *Norm Ratio of Median*-Werte gemittelt. Die Bildung der Mittelwerte erfolgte stets nach Logarithmierung der Einzelwerte. Anschließend wurden die *Norm Ratio of Median*-Mittelwerte wieder delogarithmiert (siehe Kapitel 2.2.7.2).

Trägt man die Mittelwerte der *Norm Ratio of Median*-Werte aller auswertbaren Gene eines Experimentes (S/N>5, n=2) der Größe nach auf, wird deutlich, dass der Expressionsunterschied für die meisten Gene sehr gering ist (kleiner 1,4fach). Gene mit mehr als 1,4fachem Unterschied hoben sich deutlich von den restlichen Genen ab und können als differentiell exprimiert betrachtet werden. Diese Darstellung sieht für alle Zeitpunkte der osteogenen Differenzierung ähnlich aus und ist in Abbildung 3.3 beispielhaft für MSC K111 d01 dargestellt.



**Abbildung 3.3: Normalisierte Ratios auswertbarer Gene ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ) in MSC K111 d01.**  
Der Größe nach aufgetragen sind die Mittelwerte der *Norm Ratio of Median-Werte* der 7475 auswertbaren Gene.

Für die Auswertungen wurden die Gene berücksichtigt, die in einer Hybridisierung mindestens 1,4fach verändert waren und in der dazugehörigen *colour-swap*-Hybridisierung eine mindestens 1,2fache Expressionsveränderung in die gleiche Richtung aufwiesen. Außerdem wurden die Werte mit einem einseitigen, heteroskedastischen t-Test statistisch ausgewertet. Für die differentiell exprimierten Gene wurden p-Werte für Streuung der Einzelwerte (*Norm Ratio of Median*) bezogen auf die Streuung der Gesamtheit aller auswertbaren Gene bestimmt. Alle p-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Für die hier dargestellten Clusteranalysen wurden die *Norm Ratio of Median-Werte* nach oben genannten Qualitätskriterien ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ) verwendet. Für die Gene, die an mindestens einem Zeitpunkt mindestens 1,4fach verändert exprimiert waren, wurden die Werte für die anderen Zeitpunkte ergänzt und hierarchisch geclustert und farblich dargestellt. Für die ergänzten Werte galt ebenfalls  $S/N > 5$  und  $n=2$ . Rot zeigt Gene, die im Verlauf der Differenzierung vermehrt exprimiert waren, Grün zeigt Gene, die vermindert exprimiert waren. Schwarz bedeutete keine Änderung in der Expression und Grau zeigte Gene, die die Qualitätskriterien nicht erfüllten.

Für den Vergleich der undifferenzierten USSC SA503 mit undifferenzierter MSC K111 waren die Unterschiede schwächer. Gene, die in beiden Hybridisierungen 1,3- und 1,2fach verändert waren, wurden als differentiell exprimiert bewertet. Ansonsten erfolgte die Auswertung wie oben beschrieben.

Für die Analyse der Genexpressionsveränderungen während der osteogenen Differenzierung wurden USSC als auch MSC verwendet. Zunächst wurden die Genexpressionsprofile von nicht-induzierten Zellen der USSC SA503 und MSC K111 untersucht.

### **3.1.3 Vergleich der USSC SA503 und MSC K111 (undifferenziert)**

Für den Vergleich undifferenzierter SA503 und MSC wurden die Proben verwendet, die in der osteogenen Differenzierung als Vergleichs-RNA (d0) dienten. Sie wurden direkt in einer Zweifarbenhybridisierung und einem anschließenden *colour-swap*-Experiment untersucht. Insgesamt waren 8481 Gene auswertbar ( $S/N > 5$ ,  $n = 2$ ). Es konnten 613 Gene in SA503 als höher exprimiert als in MSC nachgewiesen werden, 254 davon waren statistisch signifikant. Den größten Unterschied wies das Gen ID1 (*DNA-binding protein inhibitor 1*) auf, welches einen 3,4fachen Unterschied zeigte. 494 Gene waren in MSC höher exprimiert als in SA503, 184 davon statistisch signifikant. Die größte Differenz lag bei 5,3fach für SERPINB2 (*Plasminogen activator inhibitor-2*). Signifikant unterschiedlich exprimiert waren außerdem IL-6 (Interleukin 6), IL-8 (Interleukin 8) und LIF (*Leukemia inhibitory factor*).

Unter den insgesamt 438 statistisch signifikanten, differentiell exprimierten Genen befanden sich 24 Transkriptionsfaktoren. Mehr als zweifach höher exprimiert in SA503 war CITED2 (*Cbp/p300-interacting transactivator 2*) und mehr als zweifach höher exprimiert in MSC waren HOXC9 (*Homeobox protein Hox-C9*) und PITX2 (*Pituitary homeobox 2*). Die in Stammzellen typischerweise exprimierten Gene Nanog, Oct-4 oder Sox2 waren in den Microarrays wegen zu schwacher Signale nicht auswertbar.

Zurzeit versucht das *Gene Ontology*-Konsortium (GO) (Ashburner et al., 2000; w2) eine einheitliche Nomenklatur für die Funktion, den Prozess und die Zelllokalisierung aller Gene zu erstellen. Dabei gibt es jeweils über 500 verschiedene

biologische Prozesse und molekulare Funktionen und über 300 verschiedene Zelllokalisationen. Ein Großteil der Gene, die mit dem Operon-Microarray detektiert werden, ist bereits mit einer GO-Nomenklatur versehen. Für ein Gen sind dabei nicht zwangsläufig alle drei Kategorien benannt, teilweise sind für ein Gen nur ein oder zwei Kategorien klassifiziert.

Von den insgesamt 438 statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen konnten 266 Genen ein biologischer Prozess nach der GO-Nomenklatur und 275 Genen eine molekulare Funktion zugeordnet werden. Die meisten Gene konnten dem Metabolismus (27), der Entwicklung (26), des Zellwachstums oder der -erhaltung (21) und der Zellkommunikation (18) zugeordnet werden. Bei den molekularen Funktionen spielen die meisten Gene in der Bindung (76), der katalytischen Aktivität (24), der Metallionenbindung (20) und der Proteinbindung (18) eine Rolle.

### **3.1.4 Globale Genexpressionsanalysen der osteogenen Differenzierung**

#### **3.1.4.1 Analyse der USSC SA503**

Es wurden fünf Zeitpunkte der osteogenen Differenzierung in SA503 untersucht: 1, 3, 5, 7 und 14 Tage nach Induktion. Die Zweifarbenhybridisierung erfolgte jeweils gegen d0 (undifferenziert). Zu jeder Hybridisierung wurde eine weitere Hybridisierung mit vertauschten Farben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach den in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Kriterien. Eine Übersicht über die Anzahl der auswertbaren Gene und den verändert exprimierten Genen für jeden Zeitpunkt bietet Tabelle 3.1.

Die Anzahl der auswertbaren Gene ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ) lag für die einzelnen Zeitpunkte zwischen 8693 und 11081. Die Anzahl der erhöht exprimierten Gene stieg ab d03 stetig von 232 auf 685 Gene an. Für die nicht signifikant veränderten Gene stieg die Anzahl der vermindert exprimierten Gene stetig an (von 335 auf 910), für die signifikant veränderten Gene verringert sich die Anzahl an d07 und steigt an d14 wieder an.

**Tabelle 3.1: Übersicht über verändert exprimierte Gene in USSC SA503 im Rahmen der osteogenen Differenzierung.**

Dargestellt ist die Anzahl der Gene, die an den jeweiligen Zeitpunkten nach Induktion der osteogenen Differenzierung auswertbar und im Vergleich zu d0 erhöht bzw. vermindert exprimiert waren. Die Anzahl der Gene, die statistisch signifikant verändert waren, steht in Klammern.

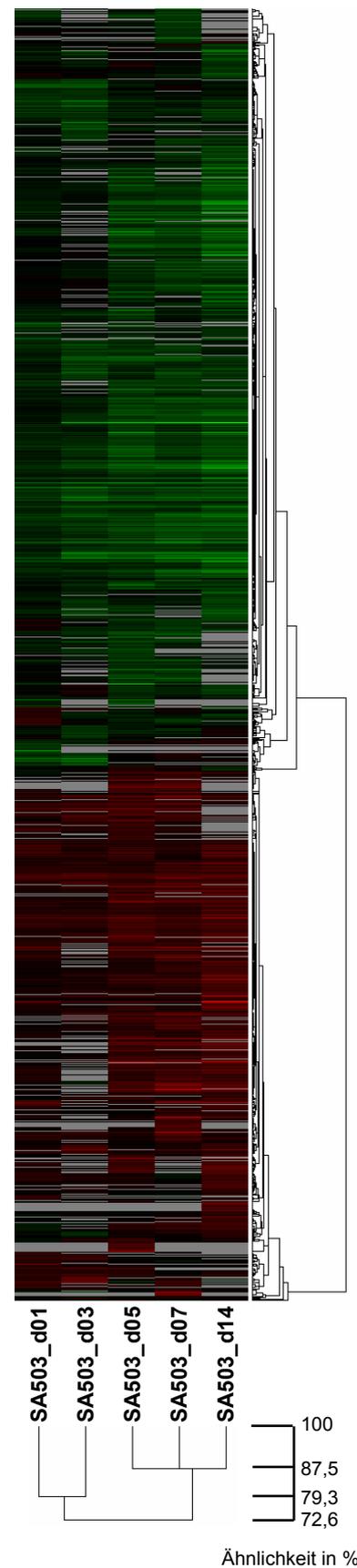
<b>Zeitpunkt</b>	<b>d01</b>	<b>d03</b>	<b>d05</b>	<b>d07</b>	<b>d14</b>
Anzahl auswertbarer Gene (S/N>5, n=2)	11081	9273	10814	9936	8693
erhöht exprimierte Gene (p<0,05)	261 (89)	232 (68)	498 (188)	505 (189)	685 (288)
vermindert exprimierte Gene (p<0,05)	335 (123)	473 (150)	720 (244)	774 (207)	910 (383)

Insgesamt waren in SA503 2988 Gene an mindestens einem Zeitpunkt verändert exprimiert, 1399 davon waren statistisch signifikant verändert. 70 dieser Gene waren Transkriptionsfaktoren. Ein Cluster der 1399 signifikant veränderten Gene und die Ähnlichkeiten der Proben der verschiedenen Zeitpunkte ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

relative Expressionsstärke  
im Vergleich zu Tag 0



5,9 -6,7



**Abbildung 3.4: Clusteranalyse der signifikant differentiell exprimierten Gene in SA503 während der osteogenen Differenzierung.**

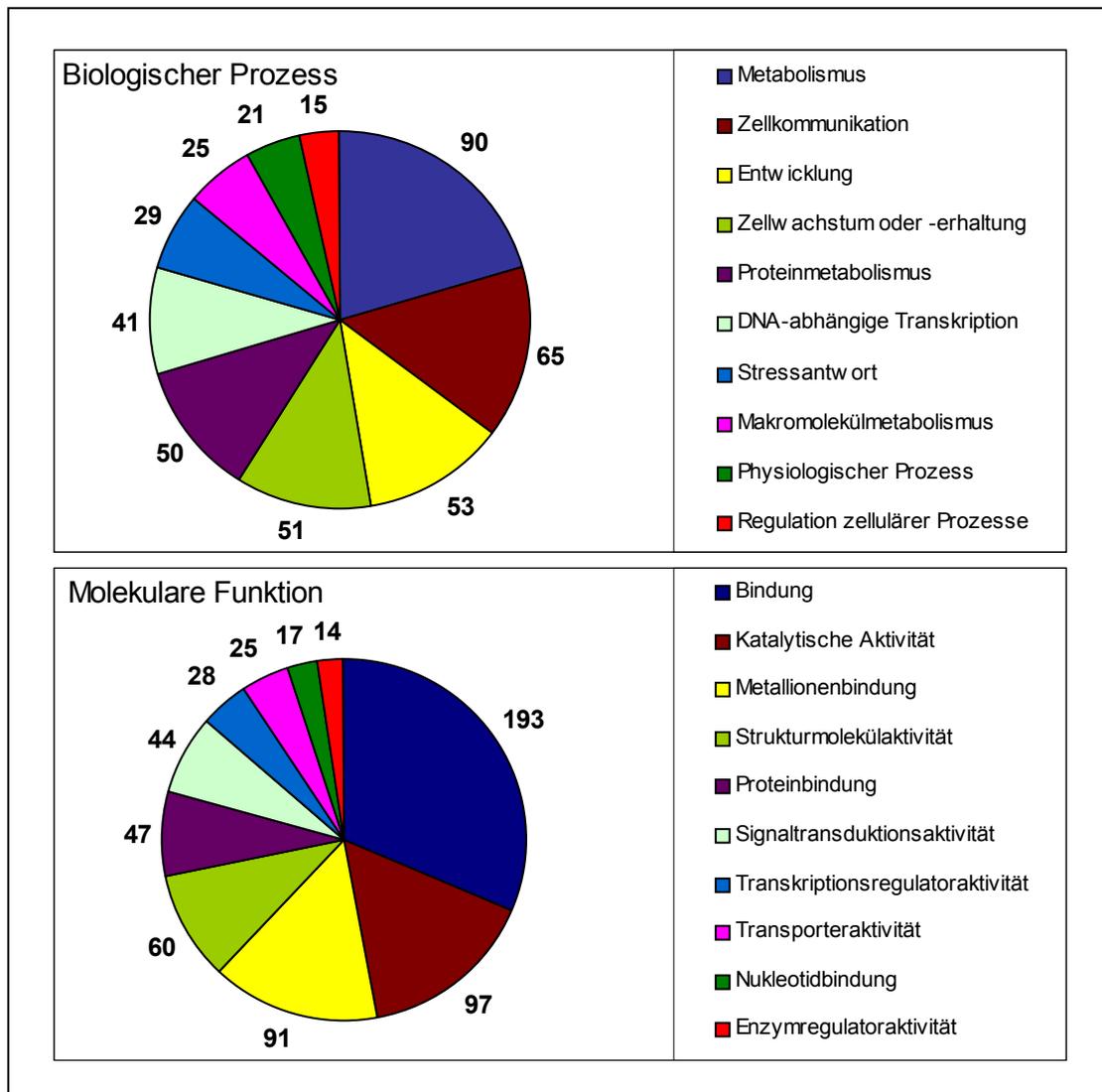
Die 1399 Gene waren in SA503 an mindestens einem Zeitpunkt statistisch signifikant verändert. Sowohl die Gene als auch die Proben wurden nach Ähnlichkeiten geclustert. Rot zeigt im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (d0) erhöht, Grün vermindert exprimierte Gene. Schwarz zeigt unverändert exprimierte Gene und Grau bedeutet, dass das Gen zu diesem Zeitpunkt nicht auswertbar war ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ).

Die größte Veränderung der differentiell exprimierten Gene lag für erhöhte Expressionen bezogen auf d0 bei 5,9fach und für verringerte Expression bei 6,7fach. Die Proben von d01 und d03 clustern mit einer Ähnlichkeit von 79,3 % getrennt von den restlichen Proben mit einer Ähnlichkeit von 87,5 %. Die beiden Gruppen haben eine Ähnlichkeit von 72,6 %. Sowohl in Tabelle 3.1 als auch in Abbildung 3.4 wird deutlich, dass im Verlauf der osteogenen Differenzierung mehr Gene verringert exprimiert waren verglichen mit der Zahl erhöht exprimierter Gene.

Wie oben bereits erwähnt kann für 1399 Gene eine signifikant veränderte Expressionsstärke im Verlauf der osteogenen Differenzierung von SA503 nachgewiesen werden. Unter Verwendung der GO-Nomenklatur konnte 791 Genen (56,5 %) ein biologischer Prozess und 845 Genen (60,4 %) eine molekulare Funktion zugeordnet werden. Die zehn häufigsten biologischen Prozesse und molekularen Funktionen und die jeweilige Anzahl der Gene sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

Die meisten veränderten Gene waren für Metabolismus (90 Gene), Zellkommunikation (65) und Entwicklung (53) zuständig. Außerdem traten Gene auf, die zuständig für das Zellwachstum und die -erhaltung sind (51 Gene), in der DNA-abhängigen Transkription mitwirken (41 Gene) oder eine Stressantwort der Zelle darstellen (29 Gene).

Bei den molekularen Funktionen wurde 193 Genen eine Bindung, 97 Genen eine katalytische Aktivität und 91 Genen eine Metallionenbindung zugeordnet. Des Weiteren waren 44 Gene dabei, die eine Signaltransduktionsaktivität haben und 28 Transkriptionsregulatoren.



**Abbildung 3.5: GO-Verteilung der häufigsten in SA503 signifikant veränderten Gene.**

Dargestellt sind die Verteilungen nach der GO-Nomenklatur der 1399 an mindestens einem Zeitpunkt signifikant veränderten Gene in SA503. Die jeweils zehn häufigsten biologischen Prozesse und molekularen Funktionen und die jeweilige Anzahl der Gene sind gezeigt.

Für die Auswertung der Daten zur osteogenen Differenzierung wurden Daten einer weiteren USSC (SA479) hinzugezogen. In vorangegangenen Arbeiten (Dr. T. Polen) wurden für die Zeitpunkte d01, d03 und d07 nach Induktion der osteogenen Differenzierung globale Genexpressionsanalysen, jeweils bezogen auf undifferenzierte USSC SA479 (d0), durchgeführt. Die Isolierung der RNA erfolgte mit einem anderen Kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen), aber die Amplifizierung der RNA, Hybridisierung, Auswertung und Analyse der Daten erfolgte auf dieselbe Weise wie für die anderen Zelllinien. Insgesamt wurden für SA479 1958 Gene an mindestens

einem Zeitpunkt verändert exprimiert gefunden, 693 davon waren statistisch signifikant. Im Vergleich mit SA503 waren 989 Gene übereinstimmend, 250 davon statistisch signifikant.

Um abgesehen von spender- und zelltypspezifischen Expressionsveränderungen die relevanten Veränderungen der osteogenen Differenzierung zu finden, wurden neben der USSC auch MSC und eine potentielle Nierentumorzelllinie (DH1) untersucht.

### 3.1.4.2 Analyse der MSC K111

Die globale Genexpressionsanalyse der osteogen differenzierten MSC K111 erfolgte analog zu der von USSC SA503. In Tabelle 3.2 ist eine Übersicht über die Anzahl der auswertbaren und der verändert exprimierten Gene verglichen mit d0 zu sehen.

**Tabelle 3.2: Übersicht über verändert exprimierte Gene in MSC K111.**

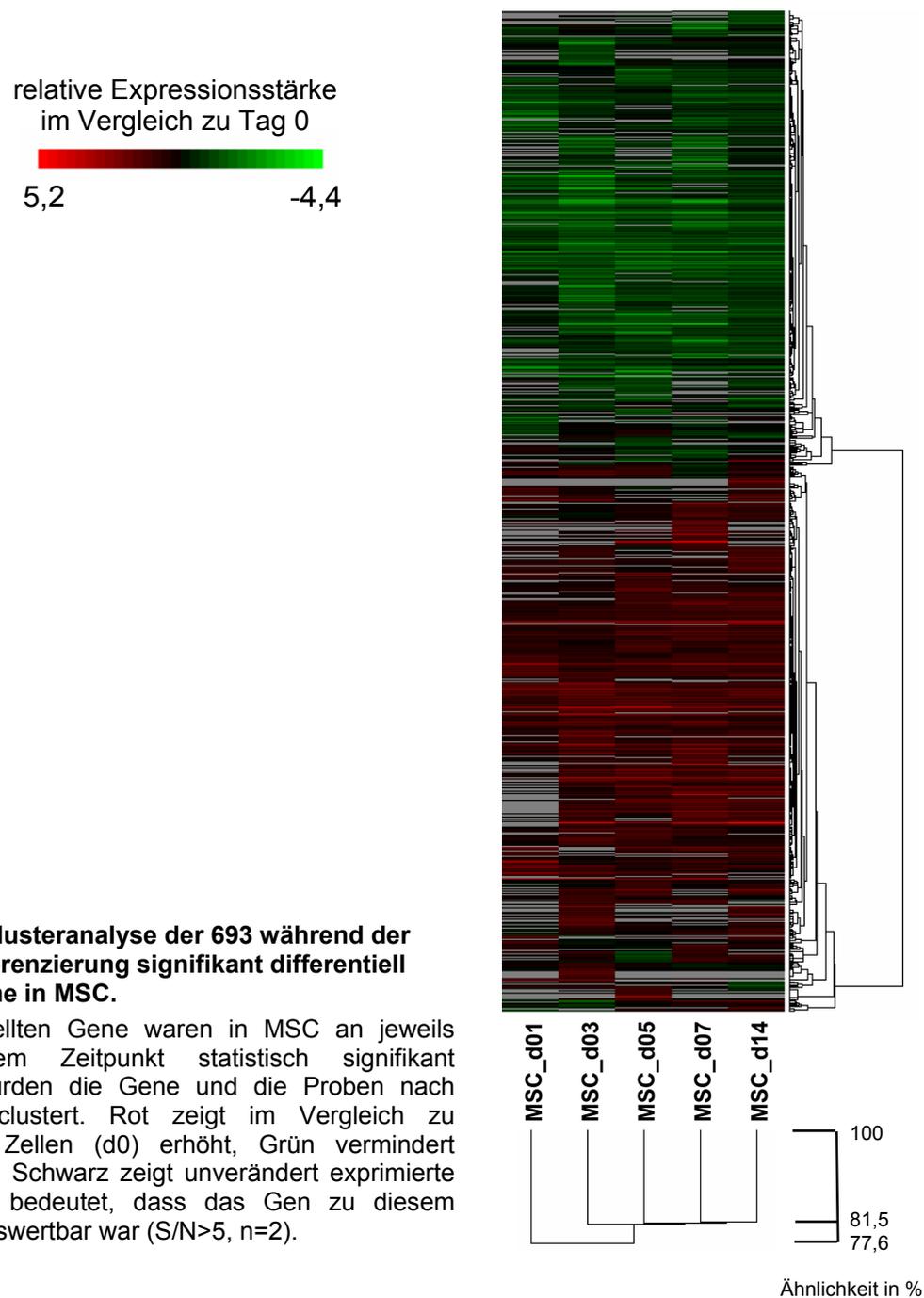
Gezeigt ist die Anzahl der Gene, die an den jeweiligen Zeitpunkten nach Induktion der osteogenen Differenzierung auswertbar und erhöht bzw. vermindert exprimiert waren. Die Anzahl der Gene, die statistisch signifikant verändert waren, steht in Klammern.

Zeitpunkt	d01	d03	d05	d07	d14
Anzahl auswertbarer Gene (S/N>5, n=2)	7475	8808	8255	8429	9606
erhöht exprimierte Gene (p<0,05)	252 (65)	451 (148)	458 (125)	598 (153)	508 (127)
vermindert exprimierte Gene (p<0,05)	265 (80)	472 (144)	402 (112)	421 (121)	316 (80)

An den einzelnen Zeitpunkten waren zwischen 7475 und 9606 Gene auswertbar. Die Anzahl der erhöht exprimierten Gene verglichen mit d0 ist an d01

am niedrigsten und an d07 am höchsten. Die Anzahl der vermindert exprimierten Gene steigt von d01 zu d03 zunächst an, fällt dann aber wieder ab. In MSC waren insgesamt 1958 Gene an mindestens einem Zeitpunkt verändert exprimiert, 693 davon statistisch signifikant. 42 der 693 Gene waren Transkriptionsfaktoren.

Die Clusteranalyse der 693 signifikant veränderten Gene ist in Abbildung 3.6 zu sehen. Sowohl die Gene als auch die Proben wurden nach Ähnlichkeiten geclustert.

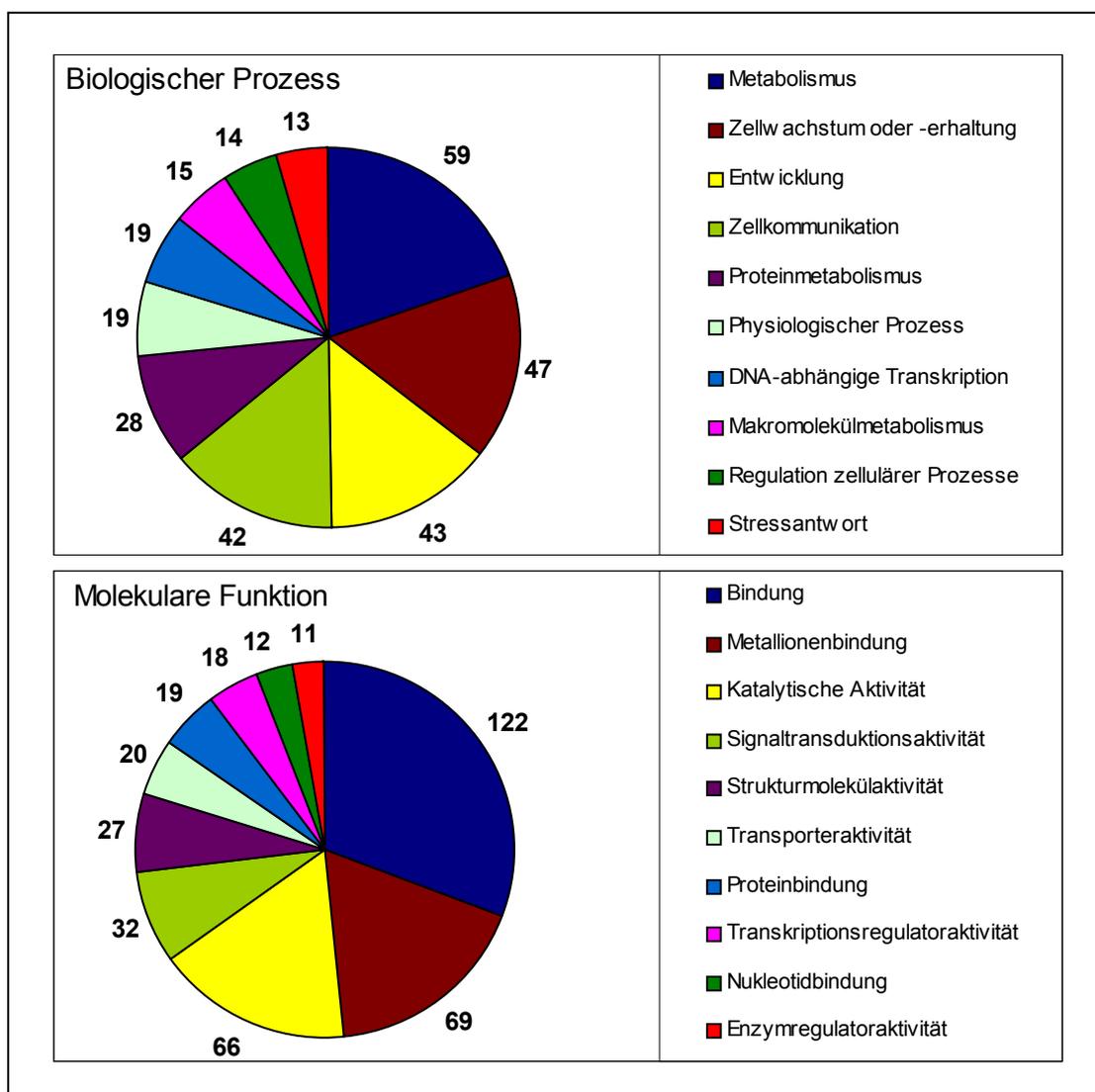


**Abbildung 3.6: Clusteranalyse der 693 während der osteogenen Differenzierung signifikant differentiell exprimierten Gene in MSC.**

Die 693 dargestellten Gene waren in MSC an jeweils mindestens einem Zeitpunkt statistisch signifikant verändert. Es wurden die Gene und die Proben nach Ähnlichkeiten geclustert. Rot zeigt im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (d0) erhöht, Grün vermindert exprimierte Gene. Schwarz zeigt unverändert exprimierte Gene und Grau bedeutet, dass das Gen zu diesem Zeitpunkt nicht auswertbar war ( $S/N > 5$ ,  $n = 2$ ).

Bei der MSC clustert d01 mit 77,6 % getrennt von den restlichen Zeitpunkten, die mit Ähnlichkeiten von 81,3-81,7 % analog ihrer zeitlichen Reihenfolge getrennt clustern. Die größte veränderte Expression verglichen mit d0 lag bei 5,2fach für erhöhte und 4,4fach für verringerte Expressionen. Es zeigten ähnlich viele Gene eine höhere (unterer Teil des Clusters (rot)) und eine verringerte Expression (oberer Teil (grün)).

Für die GO-Nomenklatur der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen sind die zehn häufigsten Bezeichnungen und die Anzahl der signifikant veränderten Gene in Abbildung 3.7 dargestellt.



**Abbildung 3.7: GO-Verteilung der häufigsten in MSC signifikant veränderten Gene.**

Dargestellt sind die Verteilungen nach der GO-Nomenklatur der 693 an mindestens einem Zeitpunkt signifikant veränderten Gene in MSC. Die jeweils zehn häufigsten biologischen Prozesse und molekularen Funktionen und die jeweilige Anzahl der Gene sind gezeigt.

Insgesamt konnte 551 Genen ein biologischer Prozess und 567 Genen eine molekulare Funktion zugeordnet werden. Die fünf häufigsten biologischen Prozesse waren in unterschiedlicher Reihenfolge die gleichen wie in SA503: Metabolismus (59 Gene), Zellwachstum und -erhaltung (47), Entwicklung (43) und Zellkommunikation (42). Auch die molekularen Funktionen glichen denen der SA503 in anderer Reihenfolge: Bindung (122 Gene), Metallionenbindung (69) und katalytische Aktivität (66).

### 3.1.4.3 Analyse der DH1

Prinzipiell erfolgte die Analyse der osteogenen Differenzierung in der potentiellen Nierentumorzelllinie DH1 analog zu der von SA503 und MSC. In der Alizarinrot-Färbung zeigten DH1-Zellen nach 14 Tagen eine deutliche Rotfärbung. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht der in DH1 auswertbaren und verändert exprimierten Gene der globalen Genexpressionsanalyse.

**Tabelle 3.3: Übersicht über verändert exprimierte Gene in DH1.**

Gezeigt ist die Anzahl der Gene, die an den jeweiligen Zeitpunkten nach Induktion der osteogenen Differenzierung auswertbar und verglichen mit d0 erhöht bzw. vermindert exprimiert waren. Die Anzahl der Gene, die statistisch signifikant verändert waren, steht in Klammern.

Zeitpunkt	d01	d03	d05	d07	d14
Anzahl auswertbarer Gene (S/N>5, n=2)	11948	8444	9026	9087	8584
erhöht exprimierte Gene (p<0,05)	366 (127)	388 (139)	500 (198)	435 (173)	697 (248)
vermindert exprimierte Gene (p<0,05)	318 (121)	294 (118)	533 (226)	411 (160)	680 (257)

Insgesamt waren in DH1 2546 Gene an mindestens einem Zeitpunkt differentiell exprimiert, 1165 Gene davon waren statistisch signifikant verändert. 59 signifikant veränderte Gene waren Transkriptionsfaktoren.

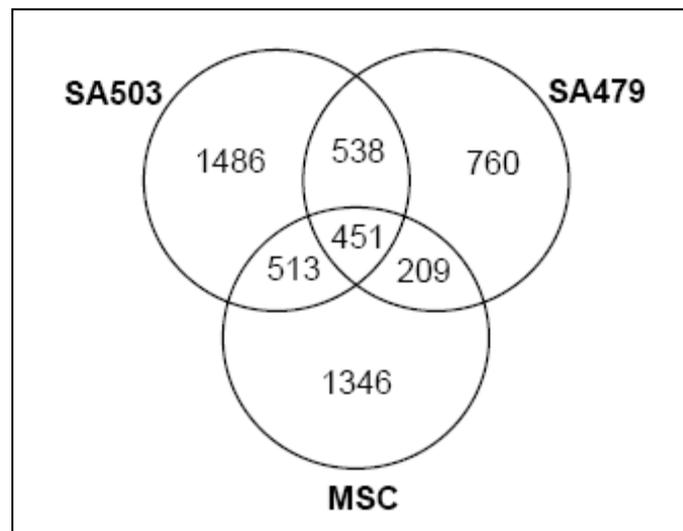
688 der 1165 Gene konnte bei den GO-Bezeichnungen ein biologischer Prozess und 714 Genen eine molekulare Funktion zugeordnet werden. Es ergab sich eine ähnliche Verteilung wie in SA503 und MSC. Bei den biologischen Prozessen waren die meisten Gene des Metabolismus (69 Gene), Zellkommunikation (61), Proteinmetabolismus (58), Entwicklung (53) und Zellwachstum und -erhaltung (45) verändert. Bei der molekularen Funktion spielten 143 Gene eine Rolle in Bindungen und 78 Gene bei Metallionenbindungen. 65 Gene hatten Strukturmolekülaktivitäten, 64 Gene eine katalytische Aktivität und 46 Gene eine Signaltransduktionsaktivität.

Die DH1-Zelllinie wurde als potenzielle Tumorzelllinie aus der Metastase eines klarzelligen Nierenkarzinoms in der Lunge generiert. Inzwischen besteht die Annahme, dass DH1 eine Stromazelllinie aus dem Nierenkarzinom ist (PD Dr. Rüdiger Sorg, persönliche Mitteilung). Für die weiteren Ergebnisse wurden die Daten daher zum Teil getrennt betrachtet oder aus der Auswertung ausgeschlossen.

#### **3.1.4.4 Vergleichende Analyse der osteogenen Differenzierungen**

Insgesamt waren in SA503 die meisten Gene an mindestens einem Zeitpunkt differentiell exprimiert (2988 Gene ohne Beachtung der Signifikanzen bzw. 1399 Gene mit  $p < 0,05$ ). Ohne Beachtung der Signifikanz waren in MSC und DH1 ähnlich viele Gene verändert exprimiert (2519 bzw. 2546 Gene). Bei den statistisch signifikanten Genen liegt die MSC vor der DH1 (1165 bzw. 893 Gene). Da für die SA479 nur Daten für drei der fünf Zeitpunkte vorlagen, war die Menge der differentiell exprimierten Gene nicht vergleichbar (1958 Gene bzw. 693 mit  $p < 0,05$ ).

Ohne Beachtung der p-Werte ergibt sich folgendes Venn-Diagramm für verändert exprimierte Gene in SA479, SA503 und MSC (Abbildung 3.8).

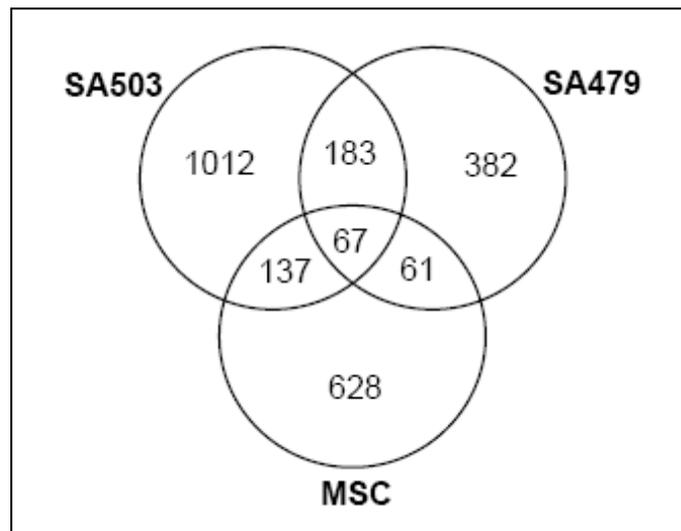


**Abbildung 3.8: Venn-Diagramm der veränderten Gene.**

Ohne Beachtung der Signifikanz ergeben sich die gezeigten Schnittmengen für Gene, die in der entsprechenden Zelllinie an mindestens einem Zeitpunkt verändert exprimiert sind.

451 Gene zeigten sich in allen drei Zelllinien übereinstimmend an jeweils mindestens einem Zeitpunkt verändert exprimiert. Die Schnittmengen von SA479 und SA503 enthielt 538 Gene, die von SA479 und MSC 209 Gene und die von SA503 und MSC 513 Gene. Die Anzahl der Gene, die nur in einer Zelllinie verändert exprimiert waren, war für SA479, SA503 und MSC 760, 1486 und 1346 respektive.

Unter Berücksichtigung der statistischen Auswertung ergibt sich für die Gene, deren p-Werte kleiner 0,05 betragen und damit statistisch signifikant verändert exprimiert sind, folgendes Venn-Diagramm (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9: Venn-Diagramm der statistisch signifikant veränderten Gene.**

Für die Darstellung der Schnittmengen wurden nur die Gene mit p-Werten kleiner 0,05 verwendet, die an mindestens einem Zeitpunkt verändert exprimiert sind.

Mit p-Werten kleiner 0,05 waren 67 Gene in allen drei Zelllinien verändert exprimiert. In SA479 und SA503 ergaben sich Schnittmengen von 183, in SA479 und MSC von 61 und in SA503 und MSC von 137 Genen. Ausschließlich in den einzelnen Zelllinien waren in SA479, SA503 und MSC 382, 1012 und 628 Gene respektive an mindestens einem Zeitpunkt signifikant differentiell exprimiert.

### Verifizierung der Daten der globalen Genexpressionsanalysen

Um die Daten der Microarray-Experimente zu überprüfen, wurden quantitative *Real-time*-PCRs (qPCRs) durchgeführt. Dabei wurden hauptsächlich bekannte Gene aus der osteogenen Differenzierung untersucht. Für die Wahl des Referenzgens wurden die Microarray-Daten herangezogen. Es wurden alle auswertbaren Spots ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ) für die drei in der Literatur häufig verwendeten Referenzgene  $\beta$ -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) und Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) betrachtet. Dabei war  $\beta$ -Aktin mit einem, GAPDH mit drei und PBGD mit vier unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen auf den Microarrays vertreten. Es wurden die insgesamt 36 durchgeführten Hybridisierungsexperimente

betrachtet. Tabelle 3.4 zeigt die durchschnittlichen Expressionsveränderungen und die Standardabweichungen für alle auswertbaren Spots.

**Tabelle 3.4: Übersicht der Microarray-Werte potentieller Referenzgene für qPCRs.**

Die Anzahl der Spots ergibt sich aus der Anzahl der Oligonukleotide pro Microarray pro Gen ( $\beta$ -Aktin ein, GAPDH drei und PBGD vier Oligonukleotide). Kriterium für die Auswertbarkeit eines Spots ist  $S/N > 5$ . Der Mittelwert aller auswertbaren Spots ergibt sich aus dem Mittelwert der logarithmierten relativen Expressionsveränderungen.

Referenzgen	Spotanzahl insgesamt	Anzahl auswertbarer Spots	Mittelwert der relativen Expressionsveränderung	Standardabweichung
$\beta$ -Aktin	36	36	1,070	0,45
GAPDH	108	73	0,834	0,43
PBGD	144	114	1,012	0,28

Für  $\beta$ -Aktin waren alle Spots auswertbar und die durchschnittliche Expressionsveränderung war mit 1,070 nahezu unverändert. Für GAPDH waren 67 % und für PBGD 79 % der Spots auswertbar. Die Expression von GAPDH von 0,834 deutet auf eine abnehmende Expression während der osteogenen Differenzierung hin. Die Standardabweichung liegt im gleichen Bereich wie die von  $\beta$ -Aktin. PBGD zeigt mit einer durchschnittlichen Expressionsveränderung von 1,012 eine unveränderte Expression. Die Standardabweichung ist mit 0,28 die geringste der drei Gene. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde PBGD als Referenzgen für die qPCRs ausgewählt. Für die PCR wurden Primer erstellt und die Effizienz der PCR bestimmt, die bei 93 % lag.

In der folgenden Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse der Microarray- und qPCR-Experimente für 21 Gene zusammengefasst. Aus der Literatur bekannte osteorelevante Gene sind Alkalische Phosphatase (ALPL), *Bone morphogenetic protein 6* (BMP6), *Fibroblast growth factor 2* (FGF2), *Bone sialo protein 2* (IBSP), Osteocalcin (PMF1), *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), *Mothers against decapentaplegic homolog 6* (SMAD6), *Transcription factor SP7* (Osterix, SP7), Osteonectin (SPARC) und Osteopontin (SPP1). Für alle Gene wurden Primer erstellt und die Effizienz der qPCR bestimmt.

**Tabelle 3.5: Übersicht über qPCR- und Microarray-Werte von 21 Genen.**

Alle qPCR-Werte wurden auf PBGD normalisiert. Die Effizienzen der qPCRs sind angegeben. Waren mehrere Oligonukleotide für ein Gen auf dem Microarray, sind entsprechend alle Werte der einzelnen Oligonukleotide angegeben. Werte  $\leq 0,83$  sind grün gekennzeichnet und gelten als vermindert exprimiert, Werte  $\geq 1,2$  (rot) als erhöht exprimiert. Nicht farblich markierte Werte gelten als unverändert exprimiert. Leere Zellen bei den Microarray-Daten zeigt nicht auswertbare Gene nach den Kriterien  $S/N > 5$  und  $n=2$ . n. d. bedeutet Gen nicht detektierbar.

Gen Effizienz	Zelle	qPCR			Microarray		
		d03	d07	d14	d03	d07	d14
<b>ALPL</b> 89 %	SA503	80	192	252	1,20	1,26	1,14
	MSC	7,23	6,15	6,62			
	DH1	0,83	1,00	1,75		1,15	
<b>BMP6</b> 80 %	SA503	8,52	11,64	33,07			1,44
	MSC	3,11	19,81	20,84		1,68	1,86
	DH1	18,38	96	44,93		0,49	0,59
<b>CALM</b> 99 %	SA503	0,50	0,48	0,54	0,67	0,60	0,55
	MSC	0,96	1,26	1,44	0,97	1,19	1,05
	DH1	2,42	1,95	2,17	1,29	1,20	0,90
<b>CLIC4</b> 93 %	SA503	0,27	0,65	0,80	0,58	0,81	0,71
					0,87	0,72	1,06
	MSC	1,15	2,05	1,68	0,98	1,30	1,25
					1,34	0,84	1,19
	DH1	1,70	2,88	4,77	1,57	1,68	1,43
				1,05	1,00	1,04	
<b>CD44</b> 92 %	SA503	0,21	0,35	0,21		0,85	
					0,86	0,56	1,53
					0,71	0,62	0,60
	MSC	0,22	0,28	0,34			
					0,81	0,92	0,82
					0,81	0,80	0,92
	DH1	0,93	0,69	1,01		0,91	
				0,93	0,73	0,76	
				0,94	0,90	1,01	
<b>DSCR1</b> 98 %	SA503	0,30	0,77	0,31	0,63	0,68	0,51
	MSC	1,64	1,62	1,37	0,88	0,94	0,91
	DH1	2,37	1,47	1,22	1,30	1,08	0,94
<b>EMD</b> 90 %	SA503	0,72	1,08	1,39		0,97	0,92
	MSC	1,68	1,78	1,53		1,09	1,05
	DH1	1,29	1,56	1,40	1,11	1,12	1,02
<b>FGF2</b> 107 %	SA503	0,33	0,72	1,54	0,71	1,00	0,83
	MSC	0,48	0,63	1,37	0,46	0,62	0,64
	DH1	0,15	0,16	0,30	0,30	0,32	0,26
<b>GILZ</b> 88 %	SA503	1,65	23,88	16,91	1,08	1,31	1,57
						1,71	
	MSC	4,27	6,46	7,50	1,98	1,65	1,99
	DH1	2,15	7,34	14,15	1,28	1,55	2,15

Fortsetzung Tabelle 3.5

Gen Effizienz	Zelle	qPCR			Microarray		
		d03	d07	d14	d03	d07	d14
<b>IBSP</b> 79 %	SA503	0,65	1,07	0,15	1,03	0,96	0,99
	MSC	0,34	1,03	1,27	0,83	0,87	0,84
	DH1	0,46	0,51	0,64	1,04	0,95	0,83
<b>IGFBP2</b> 85 %	SA503	12,05	516	2939		1,38	1,58
	MSC	1,33	1,53	2,35	1,13	1,18	1,23
	DH1	0,62	1,11	4,80	0,90	1,01	1,33
<b>ISGF3G</b> 96 %	SA503	1,01	2,98	4,92			
	MSC	2,08	1,72	3,60			
	DH1	1,10	1,36	2,04			
<b>PMF1</b> 80 %	SA503	0,69	1,91	2,08	1,08	0,95	0,81
					0,99	0,81	0,91
	MSC	1,02	0,91	1,04	0,87	0,82	0,93
					0,50		1,44
	DH1	1,00	1,35	1,32	1,05	1,13	1,09
				1,09	1,05	1,14	
<b>POSTN</b> 96 %	SA503	2,03	1,11	0,99	0,95	0,89	0,73
	MSC	1,38	2,59	4,09	0,92	0,64	0,77
	DH1	10,54	29	16,20	0,44	0,39	0,38
<b>Runx2</b> 90 %	SA503	1,60	2,32	1,57	0,90	0,87	1,07
	MSC	3,57	2,14	1,47	0,83	1,29	1,10
	DH1	1,45	3,19	1,47	0,96	0,97	0,99
<b>SH3RF1</b> 94 %	SA503	0,30	0,40	0,41	0,93	0,78	0,85
						0,62	
	MSC	0,34	0,55	0,34	1,07	0,79	0,88
					0,76	1,09	0,77
	DH1	2,12	2,78	1,53	1,08	0,99	0,86
				1,14	1,42		
<b>SMAD6</b> 87 %	SA503	2,29	2,06	1,00		0,69	0,85
	MSC	1,57	1,27	1,29	0,94	1,04	
	DH1	1,03	2,24	1,94		0,78	
<b>SP7</b> 101 %	SA503	9,66	18,24	6,77			
	MSC	19,68	14,02	14,63			
	DH1	n. d.	n. d.	n. d.			
<b>SPARC</b> 108 %	SA503	1,48	9,43	9,81			
	MSC	1,71	0,93	1,21			
	DH1	0,32	0,36	0,56			
<b>SPP1</b> 97 %	SA503	0,06	0,22	0,28			
	MSC	0,09	0,06	0,07	0,58	0,54	0,54
	DH1	0,13	0,16	0,12			
<b>ZNF6</b> 72 %	SA503	1,02	3,76	2,67			
	MSC	1,10	1,59	4,41			
	DH1	2,01	3,67	5,40			

---

Für die qPCR-Analysen wurde dieselbe RNA verwendet wie für die globalen Genexpressionsanalysen. Es konnten alle Gene in den qPCR-Analysen nachgewiesen werden, einzige Ausnahme war das Gen SP7 in DH1. Für alle qPCRs konnte außerdem eine sehr gute Effizienz nachgewiesen werden. Insgesamt war bei der Verifizierung der Microarray-Daten eine gute Übereinstimmung mit den qPCR-Daten erkennbar. Beim Vergleich wurden drei Tendenzen deutlich. Es gab Gene, die in den qPCRs eine differentielle Expression zeigten, in den Microarrays aber nicht auswertbar waren (ISGF3G, SP7, SPARC, SPP1 und ZNF6). Des Weiteren gab es Gene, die im Microarray keine Expressionsveränderung zeigten, während sie in den qPCRs verändert exprimiert waren (EMD, IBSP und Runx2). Und schließlich die Gene, bei denen die Expressionsveränderung in den Microarray-Werten weniger stark ausgeprägt war als in den qPCR-Werten.

Gegenläufige Tendenzen wurden bei sieben der insgesamt 234 Datenpunkte beobachtet: CD44 in SA503 (d14); IBSP in MSC (d14); PMF1 in SA503 (d07 und d14); Runx2 in MSC (d07); SMAD6 in SA503 und DH1 (d07). Vereinzelt wurden im Microarray größere Expressionsveränderungen gemessen als in der qPCR (z. B. PMF1 in MSC). POSTN zeigte die größten Diskrepanzen. Während im Microarray eine verringerte Expression gemessen wurde, war in den qPCRs eine erhöhte Expression nachweisbar.

Von den osteorelevanten Genen waren nur wenige im Microarray auswertbar, während in den qPCRs nur SP7 in DH1 nicht detektiert werden konnte. Die relativen Expressionen der Gene in den qPCRs waren für die drei Zelltypen bis auf wenige Ausnahmen differentiell und tendenziell ähnlich. BMP6 und Runx2 zeigten zu allen Zeitpunkten in allen Zelllinien eine erhöhte Expression. Die Expression von SPP1 war an allen Zeitpunkten verringert. Für ALPL und SP7 zeigten SA503 und MSC die gleiche Tendenz, während in DH1 keine Tendenz für ALPL zu sehen war und SP7 nicht detektierbar war. FGF2 zeigte an den frühen Zeitpunkten in allen drei Zelllinien übereinstimmend eine verringerte Expression. Gegenläufige Tendenzen der drei Zelllinien waren in PMF1 und SPARC nachweisbar. Während die Expression von PMF1 in SA503 und DH1 an d07 und d14 erhöht war, zeigte MSC eine unveränderte Expression. SPARC war in SA503 und MSC erhöht, während es in DH1 verringert exprimiert war. IBSP zeigte für alle Zellen an d01 einen einheitlichen Trend zu verringerter Expression und SMAD6 war fast durchgängig erhöht exprimiert.

---

Insgesamt konnte die Expression aller osteorelevanten Gene nachgewiesen werden und die drei Zelllinien zeigten außer in PMF1 und SPARC tendenziell die gleichen Expressionsveränderungen.

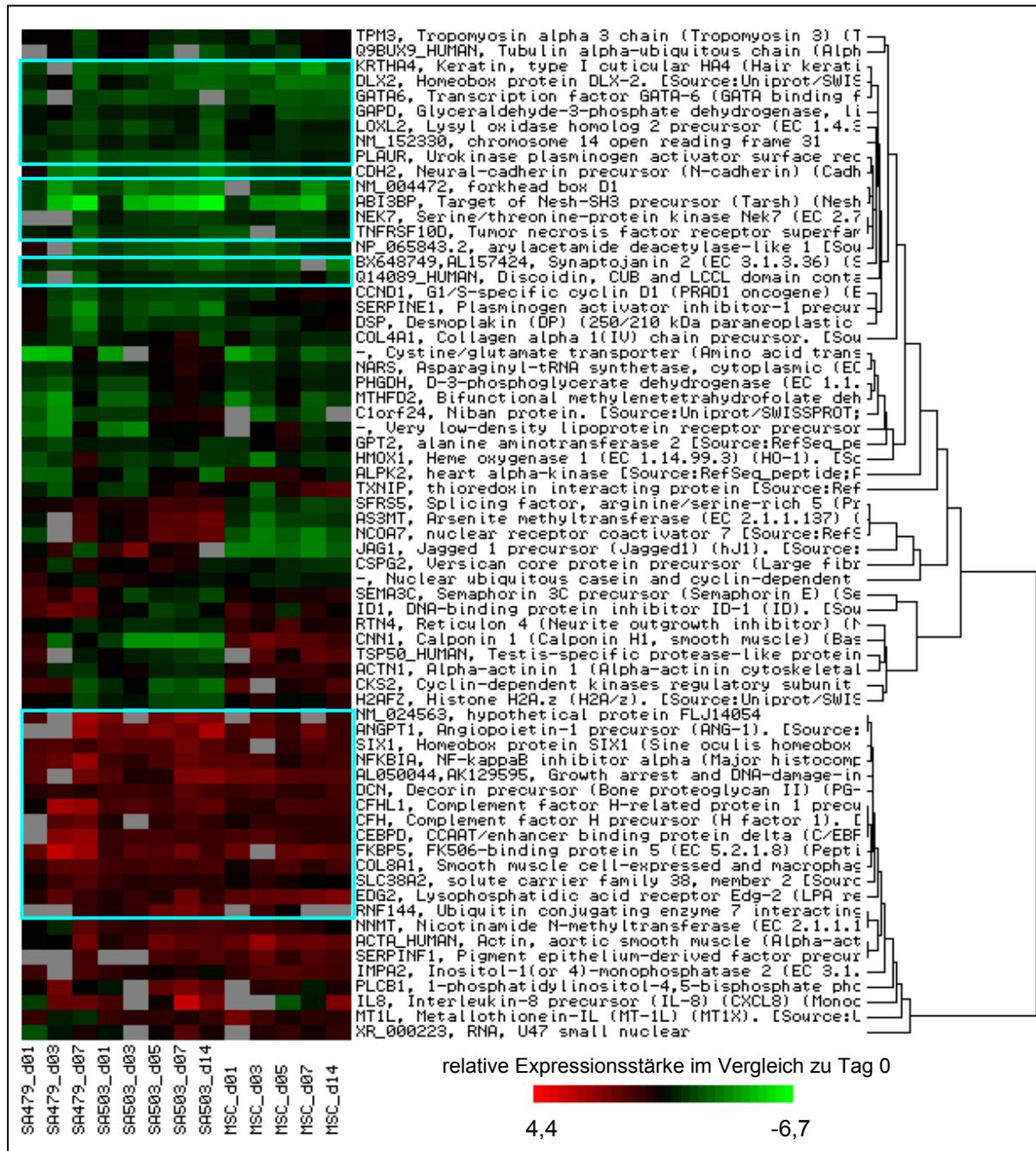
### **Detaillierte Analyse ausgewählter Gene**

Wie in Abbildung 3.9 gezeigt gab es 67 Gene, die in SA479, SA503 und MSC an mindestens einem Zeitpunkt signifikant differentiell exprimiert waren. In Abbildung 3.10 wurden zu diesen 67 Genen die Werte der restlichen Zeitpunkte ergänzt ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ) und im Cluster dargestellt.

Für die Clusteranalyse waren 5,8 % der Datenpunkte nach den Kriterien  $S/N > 5$  und  $n=2$  nicht auswertbar (grau). Die restlichen Werte zeigten überwiegend eine differentielle Expression (rot/grün) während nur wenige Gene eine unveränderte Expression zeigten (schwarz).

Es waren 13 Gene (obere Kästchen) nachweisbar, die in allen Proben nach Induktion der osteogenen Differenzierung vermindert exprimiert wurden. Zu diesen gehörten ABI3BP, BX648749, DLX2, GAPD, GATA6, RTHA4, LOXL2, NEK7, NM\_004472, NM\_152330, PLAUR, Q14089 und TNFRSF10D. Zu den 14 Genen (unteres Kästchen), die durchgängig erhöht exprimiert waren, gehörten AL050044, ANGPT1, CEBPD, CFH, CFHL1, COL8A1, DCN, EDG2, FKBP5, NFKBIA, NM\_024563, RNF144, SLC38A2 und SIX1. Die Expressionsunterschiede lagen dabei zwischen 4,4fach und -6,7fach.

Einige Gene zeigten gegenläufige Tendenzen in den verschiedenen Zelltypen. Während z. B. SFRS5 und JAG1 in SA503 zu allen Zeitpunkten erhöht exprimiert waren, war die Expression in MSC verringert. Für RTN4 und CNN1 zeigte sich das Gegenteil: Die Expression in MSC war durchgängig erhöht, während sie in SA503 verringert war.



**Abbildung 3.10: Clusteranalyse der statistisch signifikant veränderten Gene.**

67 Gene sind in SA479, SA503 und MSC an jeweils mindestens einem Zeitpunkt verändert und haben p-Werte kleiner 0,05. Die Gensymbole (soweit vorhanden) und der Anfang der Beschreibung resultieren aus den Angaben von Operon für die jeweiligen Oligos. Rote bzw. grüne Zellen zeigen Gene, die im Vergleich zu den jeweils undifferenzierten Zellen erhöht bzw. erniedrigt exprimiert sind. Schwarz bedeutet keine Veränderung und Grau, dass die Kriterien  $S/N > 5$  und/oder  $n = 2$  nicht erfüllt sind. Die türkisfarbenen gekennzeichneten Kästchen zeigen die Gene, die an allen Zeitpunkten vermindert (oben) bzw. vermehrt (unten) exprimiert sind.

## Analyse von verändert exprimierten Transkriptionsfaktoren

Unter den oben genannten 67 Genen befanden sich zum Teil Transkriptionsfaktoren (CEBPD, DLX2, GATA6 und SIX1).

Filtert man ungeachtet der Signifikanzen die insgesamt 451 Gene, die in beiden USSC und in MSC eine veränderte Expression aufwiesen, nach denen, die in der GO-Nomenklatur nach Operon mit „Transkription“ beschrieben sind, erhält man 28, davon vier statistisch signifikant veränderte Gene ( $p < 0,05$ ). In Tabelle 3.6 sind diese Gene mit ihren GO-Prozessen und -Funktionen und ihrer Genbeschreibung aufgelistet. Die vier statistisch signifikanten Gene sind rot markiert.

**Tabelle 3.6: Übersicht über verändert exprimierte Transkriptionsfaktoren in USSC und MSC.**

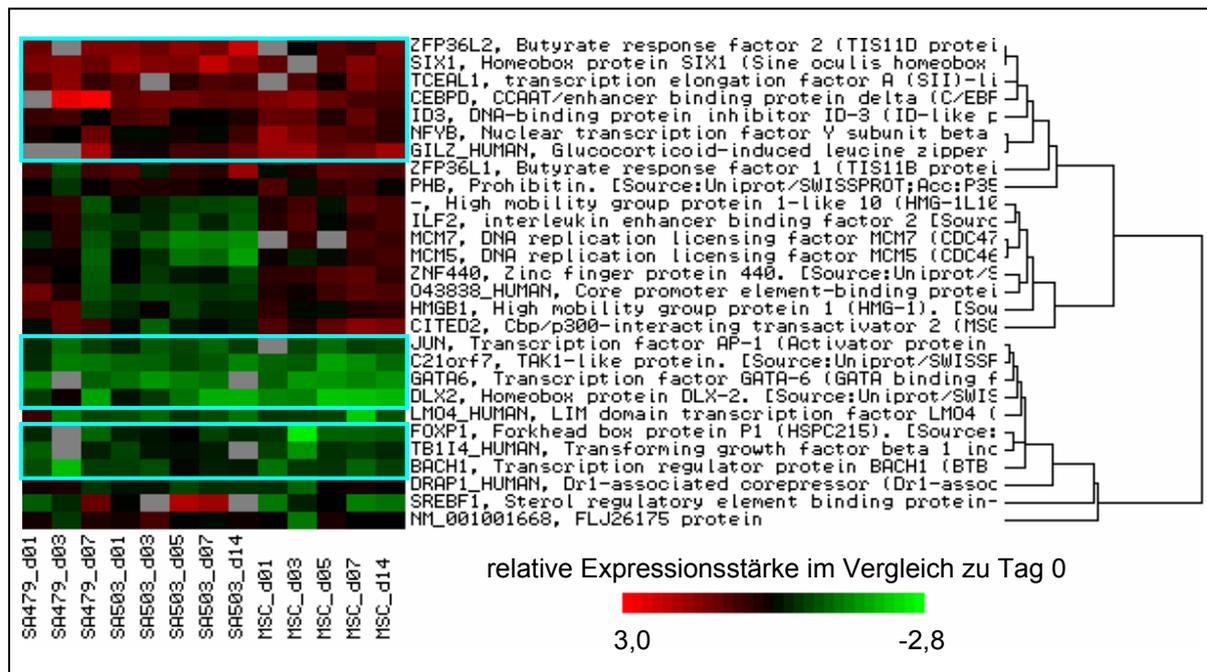
28 Gene, die in ihrer GO-Nomenklatur mit „Transkription“ beschrieben sind, waren in beiden USSC und MSC verändert exprimiert. Vier Gene, die statistisch signifikant verändert waren ( $p < 0,05$ ), sind rot markiert. (Alle Angaben nach Operon)

Gen-symbol	GO-Prozess	GO-Funktion	Beschreibung
BACH1	DNA-abhängige Transkription	Proteinbindung	Transcription regulator protein BACH1 (BTB and CNC homolog 1) (HA2303)
C21orf7	DNA-abhängige Transkription	Transkriptionsregulatoraktivität	TAK1-like protein
<b>CEBPD</b>	Transkription von Pol-II-Promotor	Bindung	CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBP delta) (Nuclear factor NF-IL6-beta) (NF-IL6-beta)
CITED2	Transkription von Pol-II-Promotor	Proteinbindung	Cbp/p300-interacting transactivator 2 (MSG-related protein 1) (MRG1 protein) (P35srj)
<b>DLX2</b>	Morphogenese	Transkriptionsregulatoraktivität	Homeobox protein DLX-2
DRAP1	DNA-abhängige Transkription	Bindung	Dr1-associated corepressor (Dr1-associated protein 1) (Negative co-factor 2 alpha) (NC2 alpha)
FOXP1	DNA-abhängige Transkription	Metallionenbindung	Forkhead box protein P1 (HSPC215)
<b>GATA6</b>	Positive Metabolismusregulation	Transkriptionsaktivatoraktivität	Transcription factor GATA-6 (GATA binding factor-6)
GILZ	DNA-abhängige Transkription	Transkriptionsregulatoraktivität	Glucocorticoid-induced leucine zipper protein (Delta sleep-inducing peptide immunoreactor) (DSIP-immunoreactive peptide) (DIP protein) (hDIP) (TSC-22-like protein)
HMG1L10	Regulation von transkriptionellem Prä-Initiationskomplex	Nukleinsäurebindung	High mobility group protein 1-like 10 (HMG-1L10)
HMGB1	Regulation von transkriptionellem Prä-Initiationskomplex	DNA-Biegungsaktivität	High mobility group protein 1 (HMG-1)
ID3	Entwicklung	Transkriptionsregulatoraktivität	DNA-binding protein inhibitor ID-3 (ID-like protein inhibitor HLH 1R21) (Helix-loop-helix protein HEIR-1)
ILF2	Physiologischer Prozess	Transkriptionsregulatoraktivität	Interleukin enhancer binding factor 2

Gen-symbol	GO-Prozess	GO-Funktion	Beschreibung
JUN	DNA-abhängige Transkription	RNA Polymerase II Transkriptionsfaktoraktivität	Transcription factor AP-1 (Activator protein 1) (AP1) (Proto-oncogene c-jun) (V-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog) (p39)
LMO4	DNA-abhängige Transkription	Zinkionenbindung	LIM domain transcription factor LMO4 (LIM-only protein 4) (LMO-4) (Breast tumor autoantigen)
MCM5	DNA-abhängige Transkription	Katalytische Aktivität	DNA replication licensing factor MCM5 (CDC46 homolog) (P1-CDC46)
MCM7	DNA-abhängige Transkription	nucleoside-triphosphatase activity	DNA replication licensing factor MCM7 (CDC47 homolog) (P1.1-MCM3)
NFYB	DNA-abhängige Transkription	Transkriptionsregulatoraktivität	Nuclear transcription factor Y subunit beta (NF-Y protein chain B) (NF-YB) (CCAAT-binding transcription factor subunit A) (CBF-A) (CAAT- box DNA binding protein subunit B)
O43838	Regulation zellulärer Prozesse	Transkriptionsregulatoraktivität	Core promoter element-binding protein (Kruppel-like factor 6) (B-cell derived protein 1) (Proto-oncogene BCD1) (Transcription factor Zf9) (GC-rich sites binding factor GBF)
PHB	Makromolekülmetabolismus	Transkriptionsrepressoraktivität	Prohibitin
Q9Y2N9	DNA-abhängige Transkription	Metallionenbindung	-
<b>SIX1</b>	Morphogenese	Transkriptionsregulatoraktivität	Homeobox protein SIX1 (Sine oculis homeobox homolog 1)
SREBF1	Steroidmetabolismus	RNA Polymerase II Transkriptionsfaktoraktivität	Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) (Sterol regulatory element-binding transcription factor 1)
TB114	Transkription von Pol-II-Promotor	Transkriptionsregulatoraktivität	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4 protein (Regulatory protein TSC-22) (TGFB stimulated clone 22 homolog) (hucep- 2)
TCEAL1	Transkription von Pol-II-Promotor	Transkriptionsregulatoraktivität	Transcription elongation factor A (SII)-like 1 (TCEAL1), transcript variant 2, mRNA
ZNF440	DNA-abhängige Transkription	Metallionenbindung	Zinc finger protein 440
ZFP36L1	-	Transkriptionsregulatoraktivität	Butyrate response factor 1 (TIS11B protein) (EGF-response factor 1) (ERF-1)
ZFP36L2	Zellwachstum oder -erhaltung	Transkriptionsregulatoraktivität	Butyrate response factor 2 (TIS11D protein) (EGF-response factor 2) (ERF-2)

Zwölf dieser Gene kann die Funktion der DNA-abhängigen Transkription zugeordnet werden. Zwei Gene (HMG1L10 und HMGB1) sind in der Regulation des transkriptionellem Prä-Initiationskomplexes beteiligt. Die beschriebenen Funktionen dieser Gene sind vielfältig und reichen von Protein-, Nukleinsäure- oder Metallionenbindung über nicht näher beschriebene Transkriptionsregulatoraktivität bis zur Rolle in der DNA-Biegung.

Zur Überprüfung der relativen Expressionen wurden zu diesen 28 Transkriptionsfaktoren die restlichen Microarray-Werte für alle Zeitpunkte ergänzt ( $S/N > 5$ ,  $n = 2$ ). Die Clusteranalyse ergab folgendes Bild (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11: Clusteranalyse der verändert exprimierten Transkriptionsfaktoren.**

In USSC und MSC waren 28 Gene verändert, die nach der GO-Nomenklatur Transkriptionsfaktoren sind. Rot zeigt erhöhte Expression, grün erniedrigte Expression im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (d0) an. Grau bedeutet nicht auswertbar im Sinne der Kriterien  $S/N > 5$  und  $n = 2$ . Schwarz zeigt unveränderte Expressionen an. Die türkisfarbenen Kästchen kennzeichnen die Gene, die in allen Zelllinien (soweit auswertbar) erhöht (oben) bzw. erniedrigt (unten) exprimiert waren.

Es gab sieben Gene, die im Laufe der osteogenen Differenzierung in allen Zelllinien an mindestens einem Zeitpunkt erhöht exprimiert waren (türkisfarbene Kästchen, oben): ZFP36L2, SIX1, TCEAL1, CEBPD, ID3, NFYB und GILZ. Davon waren zwei Gene statistisch signifikant verändert ( $p < 0,05$ ): SIX1 und CEBPD.

Sieben Gene waren in allen Zelllinien an mindestens einem Zeitpunkt verringert exprimiert (türkisfarbene Kästchen, unten): JUN, C21orf7, GATA6, DLX2, FOXP1, TB114 und BACH1. Zwei dieser Gene waren statistisch signifikant verändert exprimiert: GATA6 und DLX2.

Unter den Genen, die jeweils verglichen mit d0 in SA503 verringert und in MSC erhöht exprimiert waren (mittlerer Teil des Clusters in Abbildung 3.11), waren vier der Transkriptionsfaktoren, die schon im direkten Vergleich SA503 vs. MSC

---

(undifferenziert) eine signifikant höhere Expression in SA503 zeigten (ILF2, MCM5, MCM7 und ZNF440).

Die Expression einer Auswahl der 67 veränderten Gene in SA503, SA479 und MSC und der verändert exprimierten Transkriptionsfaktoren wurden mit qPCRs überprüft. Für acht Gene konnten qPCRs etabliert werden, sechs davon mit verminderter Expression (BACH1, DLX2, FOXP1, GATA6, JUN, PLAU und TB114) und ein Gen mit erhöhter Expression (NFKBIA). Zunächst wurden die Effizienzen der qPCRs bestimmt. Alle Effizienzen lagen zwischen 90 und 100 %. Für die qPCRs wurden RNA-Proben der Tage d03, d07 und d14 nach Induktion der osteogenen Differenzierung in SA503 und MSC untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Vergleichend dazu sind die Werte der Microarrays für diese Zeitpunkte angegeben und die Veränderung der Expression bezogen auf d0 farblich dargestellt. Aufgrund der geringen Unterschiede im Microarray wurden alle Werte über 1,2 als erhöhte Expression rot und Werte unter 0,83 als verringerte Expression grün markiert.

Im Microarray zeigten alle Gene außer NFKBIA und TB114 in SA503 an d07 und d14 eine verringerte oder unveränderte Expression. Diese Tendenzen konnten mit qPCRs in den meisten Fällen bestätigt werden. Fünf Datenpunkte zeigten gegenläufige Werte in Microarray und qPCR (BACH1, SA503, d14; JUN, SA503, d14 und TB114, SA503, d07). Teilweise wiesen die Gene eine tendenziell verringerte Expression auf, lagen aber knapp unter dem Cut-off von 0,83 wie zum Beispiel FOXP1 an d14 in SA503 (0,84). Für manche Gene, die im Microarray keine auswertbaren Werte lieferten, konnte in den qPCRs eine veränderte Expression gemessen werden (z. B. GATA6, SA503, d14). Die erhöhte Expression von NFKBIA in SA503 und MSC konnte in den qPCRs bestätigt werden.

**Tabelle 3.7: Übersicht über qPCR- und Microarray-Werte ausgewählter Transkriptionsfaktoren.**

Es sind die Veränderungen, gemessen in qPCR und Microarray, in SA503 und MSC zusammengefasst. Die Effizienzen der qPCRs sind angegeben, die Werte wurden auf PBGD normalisiert. Waren mehrere Oligos für ein Gen auf dem Microarray vorhanden, sind entsprechend alle Werte der einzelnen Oligos angegeben. Werte  $\leq 0,83$  sind grün gekennzeichnet und gelten als vermindert exprimiert, Werte  $\geq 1,2$  (rot) als erhöht exprimiert. Leere Felder bei den Microarray-Daten zeigen nicht auswertbare Gene nach den Kriterien  $S/N > 5$  und  $n = 2$ .

Gen Effizienz	Zelle	qPCR			Microarray		
		d03	d07	d14	d03	d07	d14
<b>BACH1</b>	SA503	0,34	0,73	1,26	0,72	0,87	0,90
92 %	MSC	0,77	0,50	0,62	0,79	0,65	0,76
<b>DLX2</b>	SA503	0,17	0,10	0,21	0,78	0,47	0,46
94 %	MSC	0,18	0,10	0,13	0,57	0,43	0,45
<b>FOXP1</b>	SA503	0,34	0,57	0,75	0,92	0,75	0,84
98 %	MSC	0,65	0,57	0,83	0,36	0,66	0,69
<b>GATA6</b>	SA503	0,30	0,62	0,73	0,52	0,61	
93 %	MSC	0,28	0,50	0,62	0,51	0,56	0,53
<b>JUN</b>	SA503	0,33	0,64	2,01	0,68	0,65	0,77
94 %	MSC	0,66	0,40	1,11	0,74	0,77	0,73
<b>NFKBIA</b>	SA503	1,32	3,61	6,98	1,35	2,09	1,93
94 %	MSC	3,85	4,53	7,86	1,76	1,49	1,60
<b>PLAUR</b>	SA503	0,20	0,13	0,08	0,38	0,33	0,31
97 %					0,82	0,64	0,48
					0,58	0,55	0,47
	MSC	0,32	0,30	0,46	0,64	0,60	0,55
					0,84	0,88	0,97
					0,79	0,86	0,83
<b>TB114</b>	SA503	0,40	0,77	2,33		1,21	1,20
90 %					0,92	0,89	
	MSC	0,53	0,32	0,93	0,87	0,78	0,80
					0,52	0,77	0,84

GATA6 konnte außerdem in zwei USSC-Linien einer unabhängigen osteogenen Differenzierung in qPCRs als vermindert exprimiert bestätigt werden. In USSC SA573 war fünf Tage nach Induktion eine zwölfmal und in SA503 eine fünfmal erniedrigte Expression nachweisbar.

### 3.1.4.5 Auswertung der Microarray-Daten mit der DAVID-Datenbank

Mit Hilfe der *Database for Annotation, Visualization and Integration Discovery* (DAVID) können Genlisten u. a. nach Häufigkeiten bestimmter GO-Bezeichnungen, Proteinfamilien, Protein-Protein-Interaktionen, Krankheitsassoziationen, Literatur

oder Signalwegen analysiert werden (Huang et al., 2007). Identifiziert werden können die einzelnen Gene zum Beispiel über Genbank-Accession-Nummer, Gensymbol, Unigene-Nummer oder RefSeq-Nummer. Operon gibt zu den auf den Microarrays verwendeten Oligos für den Großteil der Gene RefSeq-Nummern an, die für die Analyse mit DAVID verwendet wurden. In USSC SA479, SA503 und MSC waren ohne Beachtung der p-Werte 451 Gene an je mindestens einem Zeitpunkt differentiell exprimiert. 60 dieser Gene hatten keine RefSeq-Nummer und wurden somit in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Signalwege werden u. a. als KEGG-Signalwege (*Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes*, w3) angegeben. Für die in SA479, SA503 und MSC verändert exprimierten Gene erhielt man u. a. folgende Signalwege (Anzahl der Gene): Fokale Adhäsion (15), ECM-Rezeptor Interaktion (12), Zellkommunikation (9), Komplement- und Koagulations-Kaskade (8), TGF $\beta$ -Signalweg (8) und *Gap Junction* (7).

Die globalen Genexpressionsanalysen und die dazugehörigen qPCRs zeigten eine ausführliche Analyse der osteogenen Differenzierung auf mRNA-Ebene. Dabei konnten für verschiedene Gene in USSC SA479, SA503 und MSC die differentielle Expression in den Microarray- und/oder den qPCR-Analysen nachgewiesen werden. Neben den bekannten Osteomarkern wurde auch eine differentielle Genexpression anderer Gene identifiziert wie z. B. für DLX2, FOXP1, GATA6 und PLAUR, die alle eine verringerte Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung aufwiesen.

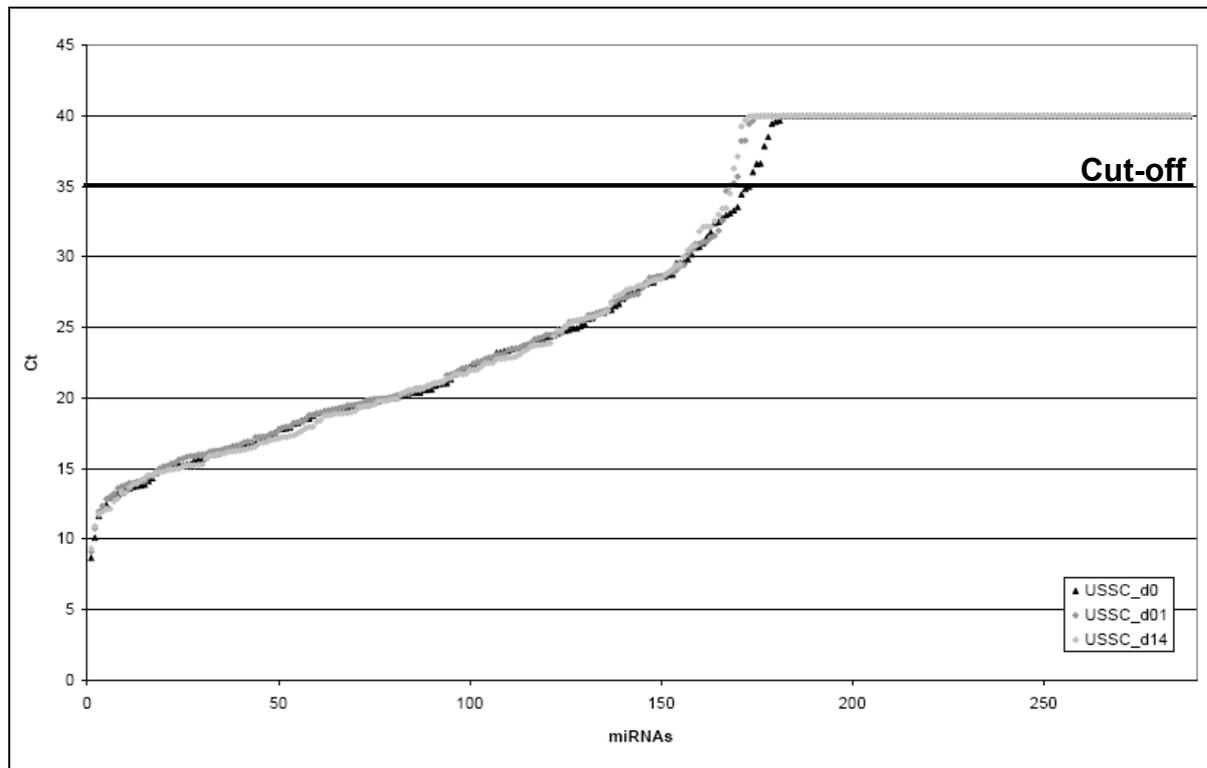
### **3.2 Untersuchungen auf miRNA-Ebene**

MicroRNAs (miRNAs) sind eine relativ neue Klasse von kleinen RNAs, die eine wichtige Rolle in der Genregulation spielen. Wie bereits in Kapitel 1.3 angeführt, sind miRNAs in vielen Bereichen von Bedeutung wie der Entwicklung, bei Krankheiten sowie der Muskel-, Fett- und Granulozytendifferenzierung. Dies ließ vermuten, dass miRNAs auch die osteogene Differenzierung mitregulieren.

Um den Einfluss von miRNAs auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen, wurden mit Hilfe einer microRNA-qPCR (330plex-Assay) miRNA-Expressionsprofile erstellt, die 330 unterschiedliche miRNAs enthielten. Dazu wurde die smallRNA-Fraktion derselben Differenzierung verwendet, mit der auch die

globale Expressionsanalyse erfolgte. Gemessen wurden zunächst die RNA von USSC SA503 undifferenziert (d0) sowie einen (d01), fünf (d05) und 14 (d14) Tage nach Induktion der osteogenen Differenzierung. Mit dem Tag 5 zeigte sich eine zum Teil gegenläufige Expression der miRNAs verglichen mit Tag 1 und Tag 14 (Daten nicht gezeigt). Dieser Zeitpunkt wurde deshalb im Folgenden nicht weiter untersucht. Um die Reproduzierbarkeit des Assays beurteilen zu können, wurden die Proben der USSC zweimal analysiert (Reverse Transkription und qPCR) und im Folgenden mit SA503(2) benannt. Undifferenzierte MSC K111 (im Folgenden MSC genannt) und DH1, sowie die Proben von d01 und d14 nach Induktion der osteogenen Differenzierung wurden ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse der DH1 wurden wie auch bei der globalen Genexpressionsanalyse getrennt getrachtet.

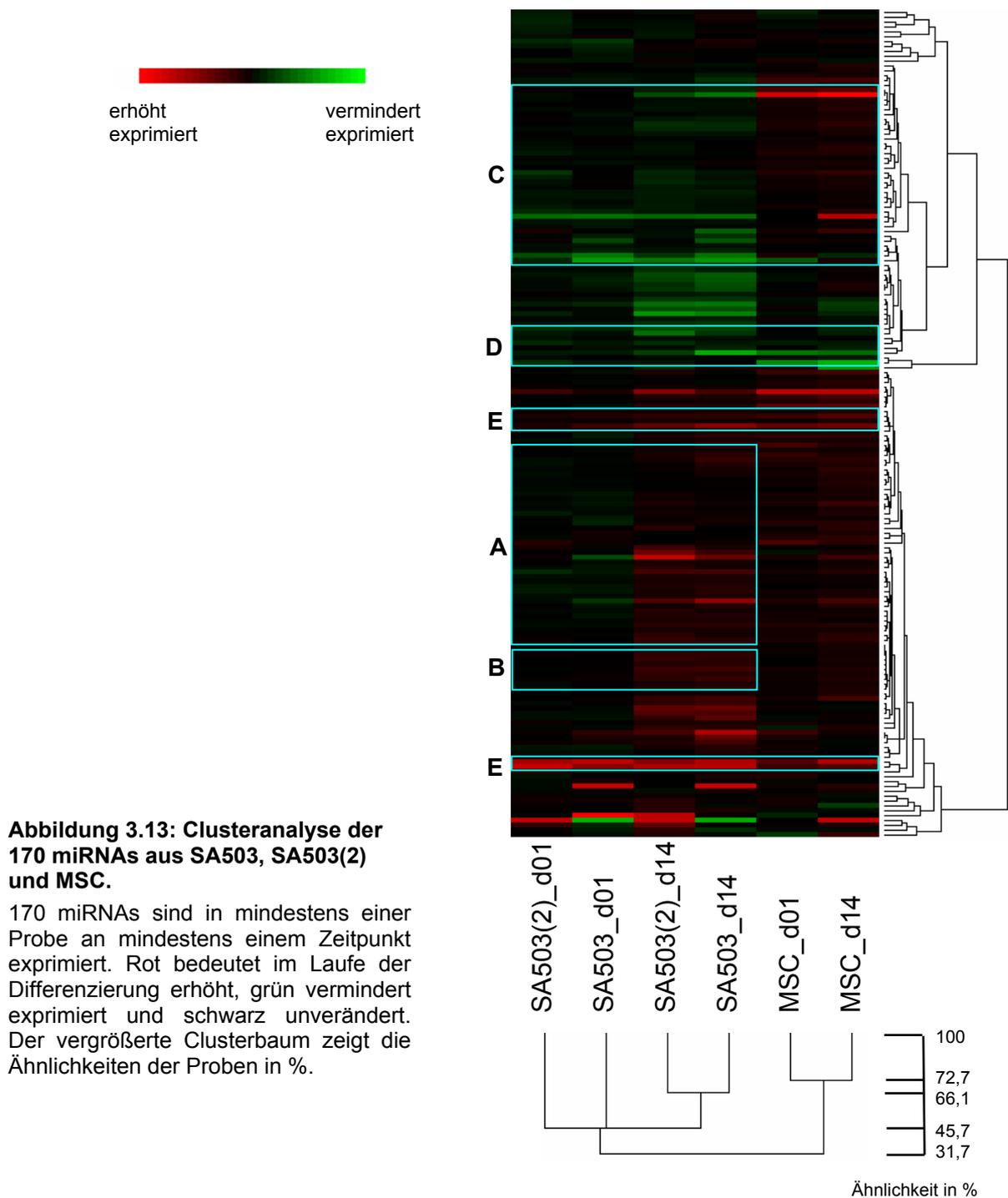
Es gibt bislang keine so genannte Haushalts-miRNA, d. h. eine miRNA, die in allen Geweben gleich exprimiert wird. Daher mussten die Messwerte global normalisiert werden. Um den Cut-off der exprimierten miRNAs zu bestimmen, wurden alle Ct-Werte der Proben aufsteigend für jede Probe geordnet und im Diagramm aufgetragen. Alle Proben zeigten einen ähnlichen Verlauf. Stellvertretend für die drei Zelllinien ist in Abbildung 3.12 die Auftragung für USSC SA503 gezeigt. Aufgrund der einerseits geringen Menge Ausgangs-RNA und der andererseits durchgeführten Prä-Amplifizierung wurden alle miRNAs mit Ct-Werten kleiner 35 als exprimiert definiert. Die dCt-Bestimmung erfolgte mit dem Median aller miRNAs mit  $Ct < 35$  der jeweiligen Probe. Für die Berechnung der ddCt-Werte wurden jeweils die undifferenzierten Proben (d0) als Bezugspunkt verwendet.



**Abbildung 3.12: Bestimmung des Cut-offs zur Auswertung der miRNA-Messwerte.**

Die Proben der USSC wurden nach Ct-Werten aufsteigend aufgetragen. Ct=35 wurde als Cut-off gewählt. Dieser Wert wurde für die folgenden Auswertungen und Berechnung der dCt-Werte verwendet.

Die Berechnung der ddCt-Werte für SA503, SA503(2) und MSC für d01 und d14 bezogen auf d0 ergab, dass 170 miRNAs in mindestens einer der Proben an mindestens einem Zeitpunkt exprimiert waren. Abbildung 3.13 zeigt die Clusteranalyse dieser 170 miRNAs. Die Ähnlichkeiten der Proben zueinander sind ebenfalls dargestellt. Die Proben der MSC clusterten getrennt von den Proben der SA503 (31,7 % Ähnlichkeit). In der Gruppe der SA503 clusterten die Proben nach Zeitpunkten getrennt. Die jeweils zwei Proben desselben Zeitpunktes zeigten eine Ähnlichkeit von 45,7 % (d01) bzw. 66,1 % (d14). Es existierten miRNAs, die in der Wiederholung des Assays (SA503 vs. SA503(2)) verschiedene Expressionsveränderungen zeigten (Kästchen A), während andere einmal unverändert und einmal verändert exprimiert waren (Kästchen B). Eine Gruppe von miRNAs zeigte im Vergleich der beiden Zelltypen unterschiedliche Expressionsveränderungen (Kästchen C). Genauer analysiert wurden die miRNAs, die in allen Proben die gleiche Tendenz zur verminderten (Kästchen D) bzw. erhöhten Expression (Kästchen E) zeigten.



Unter den miRNAs, die in SA503 und MSC an je mindestens einem Zeitpunkt exprimiert waren (Ct>35), waren 13 miRNAs, die mit der osteogenen Differenzierung in USSC und MSC in gleicher Weise erhöht bzw. erniedrigt exprimiert waren. Einige

dieser miRNAs zeigten die gleichen Tendenzen auch in DH1. Die miRNAs und ihre Expressionsveränderungen sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

**Tabelle 3.8: Differenziell exprimierte miRNAs in USSC, MSC und DH1.**

Es sind die relativen Expressionen verglichen mit undifferenzierten Zellen gezeigt. Mehr als zweifache Überexpression wurde Rot markiert, mehr als zweifach verminderte Expression (Werte<0,5) wurden grün markiert. Leere Zellen bedeuten keine detektierbare Expression.

miRNA Chromosom und Orientierung	SA503 d01	SA503 d14	SA503 (2) d01	SA503 (2) d14	MSC d01	MSC d14	DH1 d01	DH1 d14	
	0,82	0,04	0,46	0,02	0,74		0,43	1,26	0,34
	0,73	0,28	0,56	0,06	0,91		0,49	1,02	0,48
	0,72	0,26	0,82	0,27	0,73		0,45	0,87	0,66
	0,36	0,18	0,32	0,16	0,97		0,43	0,56	0,20
	0,82	0,14	0,93	0,15	1,29		0,28	1,29	1,69
	0,37	0,05	0,53	0,07	0,81		0,23	0,63	0,60
<b>miR-376a</b> 2x 14+	0,53	<0,01	0,55	0,21	<0,01	<0,01			
<b>miR-26a</b> 3+ und 12-	2,06	5,57	4,83	28	>200	>200	>200	>200	
<b>miR-29c</b> 1-	2,21	2,93	1,76	3,04	3,82	7,46	14,54	6,86	
<b>miR-30e</b> 1+	4,57	31	2,00	12,52	12,06	17,94	1,55	1,03	
<b>miR-204</b> 9-	29	>200	>200	>200	4,37	7,48	1,51	3,46	
<b>miR-328</b> 16-	0,27	36	0,76	7,16	2,12	5,99	1,47	0,009	
<b>miR-483</b> 11-	>200	>200	>200	>200	8,52	93	1,29	0,65	

Sieben miRNAs waren in beiden Messungen der SA503 und in MSC an mindestens einem der beiden Zeitpunkte vermindert exprimiert verglichen mit undifferenzierten Zellen: miR-135a, miR-135b, miR-140, miR-210, miR-224, miR-335 und miR-376a. Alle waren an d14 mindestens zweifach vermindert exprimiert, einige bereits an d01. Für miR-135a, miR-135b, miR-210 und miR-335 konnte die verringerte Expression auch in DH1 an mindestens einem Zeitpunkt bestätigt werden.

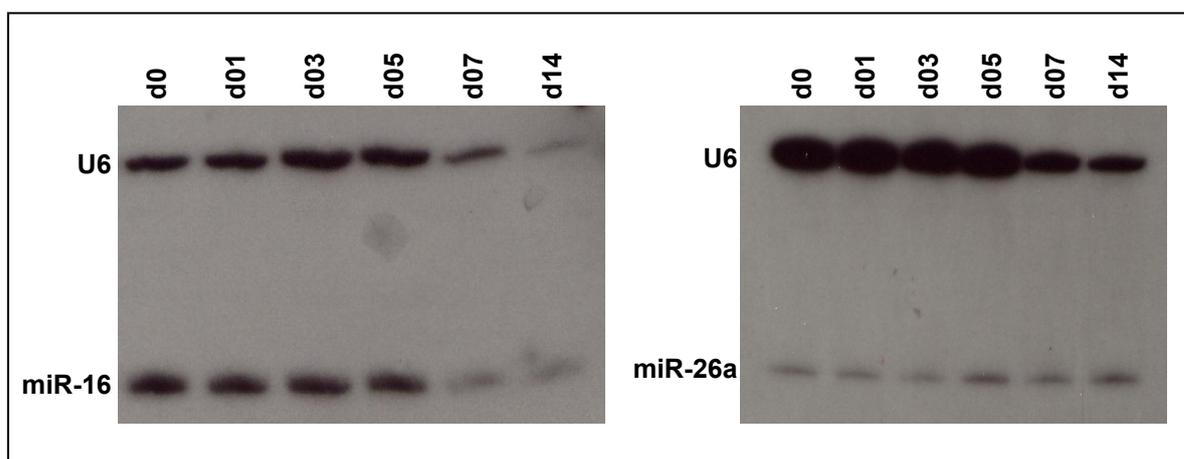
Es konnten sechs miRNAs als erhöht exprimiert in allen drei Proben detektiert werden: miR-26a, miR-29c, miR-30e, miR-204, miR-328 und miR-483. Bis auf miR-29c und miR-328 waren alle an beiden Zeitpunkten mindestens zweifach stärker exprimiert als an d0. Dabei zeigte miR-483 die stärkste Veränderung. In SA503 war sie an d0 nicht detektierbar, wurde aber ab d01 der osteogenen Differenzierung exprimiert. In MSC und DH1 war miR-483 bereits in undifferenzierten Zellen exprimiert und stieg während der Differenzierung in MSC stark an. Das gleiche gilt für miR-204. Die veränderte Expression von miR-26a, miR-29c (jeweils d01 und d14) und miR-204 (d14) konnte in DH1 bestätigt werden.

Die Lage der Gene ist über das gesamte Genom verteilt (Tabelle 3.8). MiRNAs, die sich auf dem Genom in räumlicher Nähe zueinander befinden („Cluster“, siehe Kapitel 1.3), waren während der osteogenen Differenzierung nicht verändert exprimiert. Für miR-135a und miR-26a gibt es jeweils zwei Gene, die sich jeweils auf Chromosom 3p und 12q befinden. Allerdings liegen diese Gene 14 bzw. 40 Mbp auseinander und die Orientierung ist jeweils verschieden. Die zwei Gene für miR-376a liegen beide auf Chromosom 14q und liegen nur 780 Basen auseinander. MiR-135b und miR-29c liegen auf Chromosom 1q und haben die gleiche Orientierung. Die veränderte Expression ist gegenläufig. Die Gene für diese miRNAs liegen 2,4 Mbp auseinander. Ähnliches gilt für miR-210 und miR-483, die beide mit der gleichen Orientierung auf Chromosom 11p liegen, aber unterschiedlich verändert exprimiert waren. Die Gene liegen 1,6 Mbp auseinander.

Es gab zwei miRNAs, die exklusiv in USSC exprimiert waren: miR-205 und miR-453. MiR-205 war nur in undifferenzierten USSC vorhanden und eine Expression war 14 Tage nach Induktion der osteogenen Differenzierung nicht mehr nachweisbar. MiR-453 war in USSC an allen Zeitpunkten schwach exprimiert und in MSC sowie in DH1 an keinem Zeitpunkt detektierbar. Eine miRNA (miR-196a) wurde

ausschließlich in MSC detektiert und die Expression stieg mit fortlaufender osteogener Differenzierung leicht an.

Für die Bestätigung der veränderten Expressionen einiger miRNAs wurden Northern Blots durchgeführt. Dazu wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet. Prinzipiell konnten miRNAs mit dieser Methode nachgewiesen werden, wie die Hybridisierung mit der miR-16-Sonde zeigte (Abbildung 3.14, links). Allerdings konnten weder miR-335 noch miR-483 im Northern Blot nachgewiesen werden. Für miR-26a konnte eine geringe Erhöhung der Expression gezeigt werden (Abbildung 3.14, rechts). Die ubiquitär exprimierte *small nuclear RNA* U6 wurde dabei als Ladekontrolle verwendet.



**Abbildung 3.14: Northern Blot der SA503-Proben mit miR-16- und miR-26a-Sonde.**

Die Proben der SA503 von d0 bis d14 wurden aufgetragen und die Blots mit radioaktiv markierten miR-16- (links) bzw. miR-26a-Sonden (rechts) hybridisiert. Nach vier (miR-16) bzw. sieben Tagen (miR-26a) wurden die exponierten Filme entwickelt.

An Tag 7 (d07) und Tag 14 (d14) war bei dem linken Northern Blot eine wesentlich schwächere Bande für U6 zu sehen, analog war auch die Bande für miR-16 in diesen Proben schwächer. Die restlichen Zeitpunkte zeigten ähnlich starke Banden für U6 und miR-16. Im Vergleich dazu war im rechten Blot auch eine Abschwächung der U6-Bande zu sehen, die Bande für miR-26a war für die späteren Zeitpunkte aber stärker, was aufgrund der unterschiedlichen Beladungen auf eine erhöhte Expression schließen lässt. Ein ähnliches Bild war auch in den Proben der MSC zu sehen (Daten nicht gezeigt).

### 3.3 Korrelation der mRNA- und miRNA-Daten

#### 3.3.1 miRNAs und ihre Hostgene

Die Gene der miRNAs können u. a. in Introns proteinkodierender Gene (Hostgene) liegen und damit zeitgleich mit diesen transkribiert werden. Um diesen eventuellen Einfluss zu analysieren, wurden die 13 verändert exprimierten miRNAs auf ihre Lage im Genom überprüft. Neun der miRNAs liegen in Introns von proteinkodierenden Genen (Nomenklatur nach Operon): miR-135b (*LEMD1*, *LEM domain-containing protein 1*), miR-140 (*WWP2*, *WW domain-containing protein 2*), miR-224 (*GABRE*, *GABA A receptor epsilon*), miR-335 (*MEST*, *Mesoderm-specific transcript homolog protein*), miR-26a (*CTDSPL*, *CTD small phosphatase-like protein* und *CTDSP2*, *Small CTD phosphatase 2*), miR-30e (*NFYC*, *Nuclear transcription factor Y subunit gamma*), miR-204 (*TRPM3*, *Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3*), miR-328 (*ELMO3*, *Engulfment and cell motility protein 3*) und miR-483 (*IGF2*, *Insulin-like growth factor 2*). Die Expression der Hostgene in den Microarray-Experimenten von SA503 und MSC wurde geprüft. Nur für die Gene *WWP2*, *MEST*, *CTDSPL* und *IGF2* konnten Spots ausgewertet werden ( $S/N > 5$ ,  $n = 2$ ). Eine Übersicht über die Microarray-Werte ist im Anhang zu finden (Tabelle 8.1). Expressionen von kleiner 0,83 galten als vermindert exprimiert, Expressionen über 1,2 als erhöht exprimiert. *WWP2* war in SA503 an drei der fünf Zeitpunkte in Übereinstimmung mit miR-140 vermindert exprimiert. Ein Zeitpunkt zeigte eine unveränderte Expression von *WWP2* und ein Zeitpunkt war nicht auswertbar. In MSC war für dieses Gen nur d03 auswertbar und unverändert exprimiert. Für *MEST*, in dessen Intron miR-335 liegt, konnte in SA503 und MSC an neun der insgesamt zehn Zeitpunkte eine verminderte Expression, in Übereinstimmung mit der verminderten Expression von miR-335, gezeigt werden. MiR-26a zeigte eine erhöhte Expression und das dazugehörige Gen *CTDSPL* war an allen Zeitpunkten auswertbar. An zwei Zeitpunkten (jeweils d14 für SA503 und MSC) wurde eine erhöhte Expression gemessen, die restlichen Zeitpunkte zeigten unveränderte Expressionen. Im Intron von *IGF2* liegt die in der osteogenen Differenzierung erhöht exprimierte miR-483. *IGF2* ist auf den Microarrays mit drei Oligos vertreten. Zwei davon zeigten in MSC eine durchgängig erhöhte Expression für *IGF2*, das dritte war nicht auswertbar. In SA503 waren zwei der drei Spots nicht

auswertbar, der dritte zeigte an d01 und d03 eine verminderte und an d07 und d14 eine unveränderte Expression.

Die auf den Microarrays auswertbaren differentiell exprimierten Hostgene zeigten die gleiche Tendenz wie die verändert exprimierten miRNAs. Unter den Hostgenen befanden sich keine osteorelevanten Gene.

### **3.3.2 miRNAs und ihre Zielgene**

Wie in Kapitel 3.1 angeführt ist für die wenigsten miRNAs die biologische Funktion geklärt. Die unvollständige Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA macht eine Vorhersage dieser Interaktionen schwierig. Von den zur Auswahl stehenden Computerprogrammen zur Vorhersage von Zielgenen wurde Miranda gewählt (über Sanger microRNA Datenbank, Stand Juli 2007).

Zu den oben genannten 13 miRNAs, die in USSC, MSC und teilweise in DH1 verändert exprimiert waren (Tabelle 3.8), wurden die vorhergesagten Zielgene nach Miranda im Vergleich zu den bei den globalen Genexpressionsanalysen verändert exprimierten Genen betrachtet. Die Anzahl der vorhergesagten Zielgene für jede miRNA sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Des Weiteren ist die Anzahl der Gene angegeben, die in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Experimenten verändert exprimiert gefunden wurden ( $S/N > 5$  und  $n = 2$ ). Dabei wurden nur die Gene berücksichtigt, die sowohl in SA479 und SA503 als auch in MSC ohne Beachtung der Signifikanzen verändert exprimiert waren.

Für die humanen miRNAs liegt die Anzahl der vorhergesagten Zielgene bei Miranda zwischen 638 und 1716. Für die 13 in der osteogenen Differenzierung differentiell exprimierten miRNAs lag die Anzahl zwischen 926 und 1426. Die Anzahl der vorhergesagten Zielgene, die in den Microarray-Experimenten differentiell exprimiert waren, lag zwischen vier und 15. Dabei wurde nicht berücksichtigt, ob die Änderung der Expression der miRNA und deren Zielgene gleich gerichtet oder gegenläufig war. Bei den insgesamt 111 Zielgenen traten einige Gene als Zielgene mehrerer miRNAs auf.

**Tabelle 3.9: Zielgene zu 13 verändert exprimierten miRNAs.**

Angegeben sind die differentiell exprimierten miRNAs mit der Anzahl ihrer vorhergesagten Zielgene nach Miranda und den in den Microarrays veränderten Genen.

miRNA	Anzahl der Zielgene	Anzahl der im Microarray veränderten Gene
miR-135a	1347	14
miR-135b	1373	12
miR-140	1152	5
miR-210	1034	7
miR-224	1092	6
miR-335	1049	9
miR-376a	1319	15
miR-26a	1114	12
miR-29c	1426	7
miR-30e	1381	9
miR-204	935	5
miR-328	926	4
miR-483	953	6

Es waren insgesamt 75 unterschiedliche Gene, die für bis zu vier miRNA-Bindestellen vorhergesagt wurden. Fünf dieser Gene, für die insgesamt acht miRNA-Zielgen-Interaktionen vorhergesagt wurden, besaßen nach Operon-Nomenklatur kein Gensymbol. Eine Übersicht über die Microarray-Daten der Zielgene mit Gensymbol ist im Anhang (Tabelle 8.2) zu finden. Da miRNAs als negative Regulatoren der mRNA-Translation auftreten, wurden die miRNA-Zielgen-Kombinationen herausgefiltert, die in der Expression gegenläufig waren, d. h. erhöhte Expression der miRNA mit gleichzeitig verminderter Expression des Zielgens und umgekehrt. Es wurden die Gene ausgewählt, die sowohl in SA503 als auch in MSC an je mindestens zwei Zeitpunkten tendenziell dieses Ergebnis zeigten. Für 17 miRNA-Zielgen-Interaktionen konnte ein solcher Trend bestätigt werden, eines davon war der Transkriptionsfaktor GATA6, der bereits in Kapitel 3.1.4.4 (Tabelle 3.7) als auffällig differentiell exprimiert beschrieben wurde. Die Ergebnisse der miRNA-

mRNA-Interaktionen sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst. In 13 Fällen konnte eine verringert exprimierte miRNA mit einem erhöht exprimierten Zielgen korreliert werden und viermal eine erhöht exprimierte miRNA mit einem verringert exprimierten Zielgen. Für FBXO32 und SERPINA3 waren alle Werte in MSC erhöht exprimiert, in SA503 war nur ein Zeitpunkt auswertbar, der aber deutlich erhöht war.

**Tabelle 3.10: MiRNAs und ihre Zielgene mit gegenläufig veränderter Expression.**

Dargestellt sind die 17 Zielgene mit entsprechenden miRNAs mit gegenläufiger Expression. Bei verringerter Expression sind die Felder grün, bei erhöhter Expression rot unterlegt. Der einzige Transkriptionsfaktor der Zielgene (GATA6) ist rot markiert.

miRNA	Zielgen
miR-135a	COPS8
miR-135a	FBXO32
miR-135b	FBXO32
miR-210	SERPINA3
miR-224	PTX3
miR-335	GADD45B
miR-335	GBP1
miR-335	NFKBIA
miR-376a	ANPEP
miR-376a	NP_054778.1
miR-376a	NP_071929.2
miR-376a	RAMP1
miR-376a	RPL13A
miR-26a	GATA6
miR-30e	DACT1
miR-30e	KRTHA4
miR-483	ODC1

Für weitere 19 miRNAs konnte in einer der beiden Zelltypen eine miRNA-Zielgen-Interaktion im Sinne der negativen Regulation durch miRNAs bestätigt werden (Daten siehe Tabelle 8.2 im Anhang).

Da GATA6 der einzige Transkriptionsfaktor war und miR-26a inzwischen in der Literatur als erhöht exprimiert während osteogener Differenzierung gefunden wurde (Palmieri et al., 2007), wurden für diese miRNA-Zielgen-Kombination Luciferase-Assays zur Überprüfung dieser Interaktion durchgeführt (Ergebnisse siehe Kapitel 3.4.1).

Die Auswertung filterte keine Zielgene heraus, die in der Literatur als osteorelevant beschrieben werden (Vergleich Kapitel 3.1.4.4). Für einige dieser Gene werden nach Miranda Interaktionen mit miRNAs vorhergesagt. Allerdings wurden keine der für BMP6, FGF2, IBSP, SPARC oder SPP1 vorhergesagten miRNAs im 330plex-microRNA-Assay als tendenziell differentiell exprimiert bestätigt. Für SMAD6 werden 55 miRNA-Bindestellen vorhergesagt. Eine davon für miR-335, eine der sieben auffällig vermindert exprimierten miRNAs (vgl. Tabelle 3.8). Die erhöhte Expression von SMAD6 während der osteogenen Differenzierung konnte in qPCR-Analysen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3.5).

## 3.4 Funktionelle Analysen

### 3.4.1 Luciferase-Assay zur Überprüfung von miRNA-mRNA-Interaktionen

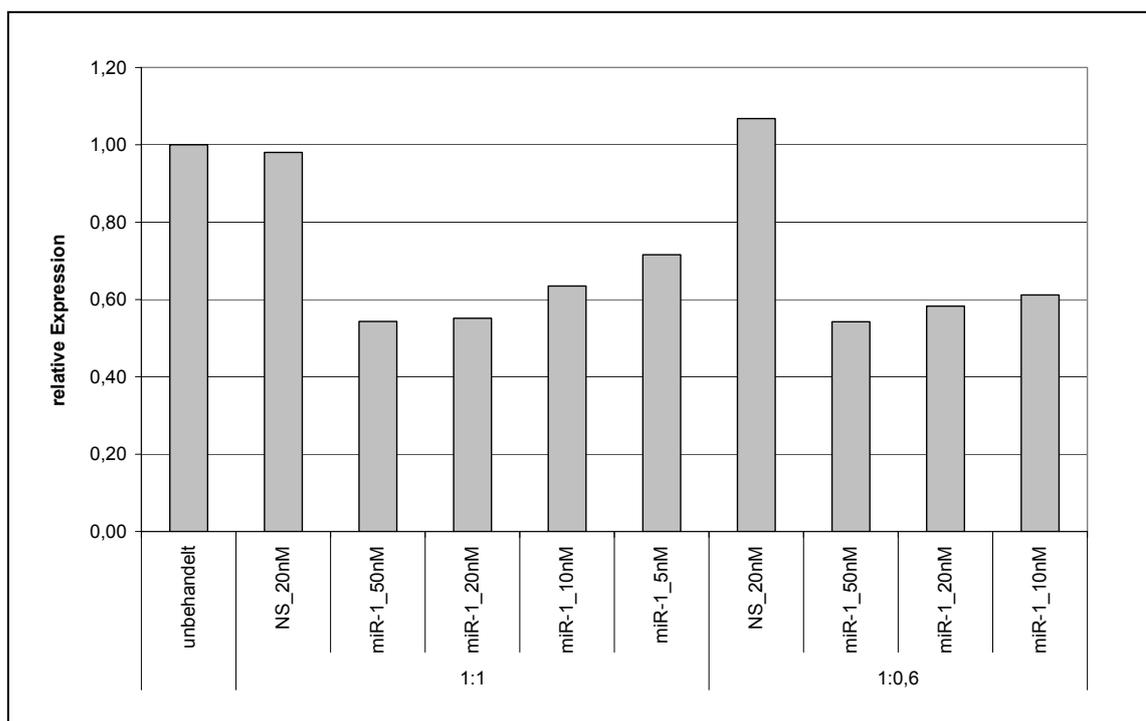
Aus der Analyse der globalen Genexpressionsanalyse ergab sich, dass die Expression des Transkriptionsfaktors GATA6 in beiden USSC und MSC im Laufe der osteogenen Differenzierung abnimmt. Die miRNA-Profile zeigten, dass miR-26a im Laufe der Differenzierung ab dem ersten Tag nach Induktion eine erhöhte Expression aufweist. Das Programm Miranda sagt für miR-26a eine Bindung an den 3'-UTR von GATA6 voraus. Mit Hilfe von Luciferase-Assays kann die Bindung einer bestimmten miRNA an eine vorhergesagte Ziel-mRNA überprüft werden. Zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs der Expression von miR-26a und GATA6 wurden Luciferase-Assays durchgeführt.

In den Vektor pMIR-REPORT miRNA Expression Vector wurde der Teil des 3'-UTR von GATA6 hinter die Luciferase kloniert, für den die Bindestelle von miR-26a beschrieben wird. Dabei wurden jeweils ca. 20 Basen vor und hinter der Bindungsstelle mitkloniert. Die Sequenz des fertigen Vektors („pMIR-GATA6“) wurde durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Von diesem Vektor sowie dem leeren Vektor („pMIR“) und dem Referenzvektor pMIR-REPORT Beta-gal Control Vector („pMIR- $\beta$ -Gal“) wurden Maxi-Plasmidpräparationen angesetzt.

Für die transiente Transfektion mussten zunächst die Bedingungen optimiert werden. Dazu wurden die leicht transfizierbaren HeLa-Zellen verwendet. Um die Effizienz zu bestimmen, wurden miR-1-Vorläufer transfiziert. MiR-1 hat PTK9 als nachgewiesenes Zielgen und bewirkt einen Abbau der PTK9-mRNA. Durch qPCR

kann somit indirekt die Transfektionseffizienz des miR-1-Vorläufers bestimmt werden. Als Kontrolle wurden parallel so genannte *Nonsense*(NS)-Vorläufer transfiziert. Dieser Vorläufer hat eine zufällige Sequenz und keine Auswirkungen in der Zelle.

Es wurden zum einen verschiedene Verhältnisse von Transfektionsmittel zu miRNA/NS-Vorläufer und zum anderen verschiedene Konzentrationen miRNA/NS-Vorläufer getestet. Als Referenzgen für die PTK9-Expression wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Die relativen Expressionslevel sind in Abbildung 3.15 zu sehen.



**Abbildung 3.15: Effizienz der miRNA/NS-Vorläufer-Transfektion in HeLa-Zellen nach 48 h.**

Es sind die relativen PTK9-Expressionen 48 h nach Transfektionsbeginn zu sehen. Transfiziert wurden verschiedene Konzentrationen an Vorläufer und verschiedene Verhältnisse von Transfektionsmittel zu Vorläufer. Die einzelnen Proben wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Diese Werte werden relativ zu unbehandelten Zellen (100 %) gezeigt.

Das Transfektionsmittel zeigte in den eingesetzten Mengen eine sehr geringe Toxizität. Die NS-Vorläufer zeigen keine Veränderung des PTK9-mRNA-Levels. Der Unterschied der verschiedenen Transfektionsmittel-Mengen ist bei hohen Konzentrationen an Vorläufer minimal. Für niedrige Vorläufer-Mengen zeigt das Verhältnis 1 : 0,6 eine bessere Wirkung. Für das Verhältnis 1 : 1 ist deutlich eine Konzentrationsabhängigkeit der PTK9-Expression zu sehen.

Für weitere Experimente wurde das Transfektionsmittel-Vorläufer-Verhältnis von 1 : 1 verwendet. Da die Vorläufer für Luciferase-Assays verwendet werden sollten, wurde eine Konzentration von 50 nM verwendet.

Für die Luciferase-Assays wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Zur Normalisierung der Luciferase-Messwerte wurde immer pMIR- $\beta$ -Gal-Vektor zeitgleich mit pMIR-GATA6- bzw. leerem pMIR-Vektor transfiziert. Die Transfektion der miR/NS-Vorläufer und der Vektoren erfolgte zeitgleich oder im Abstand von 24 h. Es wurden verschiedene Mengen miR/NS-Vorläufer und verschiedene Mengen der Vektoren transfiziert. An Stelle der Transfektion der miRNA-Vorläufer wurde außerdem die Transfektion des pCL5EG-miR-26a-Vektors (Kapitel 2.2.12) getestet. Auch hier wurden verschiedene Mengen des Vektors eingesetzt. Die Messung der Luciferasewerte erfolgte 24 oder 48 h nach der letzten Transfektion. Neben HeLa-Zellen wurden außerdem 293T-Zellen transfiziert. Eine Übersicht über die verschiedenen Experimente ist in Tabelle 3.11 gezeigt.

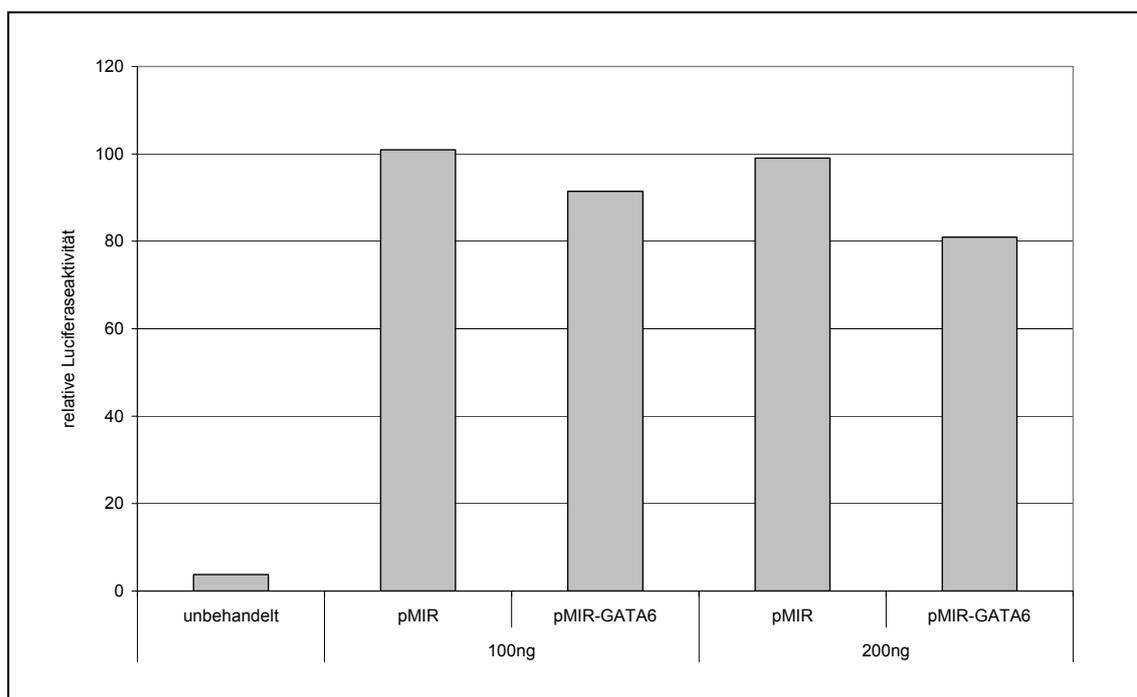
**Tabelle 3.11: Übersicht über alle Ansätze der Luciferase-Assays.**

Zusammengefasst sind die Konzentrationen der miRNA/NS-Vorläufer bzw. Mengen der pCL5EG-miR-26a/pCL5EG- bzw. pMIR-GATA6/pMIR-/pMIR- $\beta$ -Gal-Vektoren. Keine Inkubationszeitangabe bedeutet, dass gleichzeitig transfiziert wurde.

Zelle	miRNA/NS-Vorläufer	Inkubationszeit	pMIR-GATA6/ pMIR (pMIR- $\beta$ -Gal)	Inkubationszeit
HeLa	10 nM	24 h	200 ng	24 h
HeLa	50 nM	24 h	200 ng	24 h
HeLa	50 nM	24 h	100/200 ng	48 h
HeLa	100/200 nM	24 h	200 ng	48 h
HeLa	100/200 nM	---	200 ng	24 h
Zelle	pCL5EG-miR-26a/ pCL5EG	Inkubationszeit	pMIR-GATA6/ pMIR (pMIR- $\beta$ -Gal)	Inkubationszeit
HeLa	200 ng	---	100/200 ng	48 h
HeLa	300 ng	---	100/200 ng	48 h
293T	200 ng	---	20/50/100 ng	48 h
293T	300 ng	---	20/50/100 ng	48 h
293T	400 ng	---	100 ng	48 h

Zur Vermeidung von Pipettierungenauigkeiten ermöglicht das verwendete Kit, sowohl die Aktivität der Luciferase als auch der  $\beta$ -Galaktosidase im selben Aliquot der Proben zu messen. Dazu wird im Luminometer zuerst die Luciferaseaktivität gemessen und nach 60 min Inkubationszeit und Zugabe eines weiteren Reagenzes zu dieser Probe die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Für die relative Luciferaseaktivität und Normalisierung verschiedener Transfektionseffizienzen wurde der Quotient aus Luciferaseaktivität und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt.

In keinem der in Tabelle 3.11 gezeigten Experimente konnte mit Überexpression von miR-26a durch miR-26a-Vorläufer oder miR-26a-Expressionsvektor (pCL5EG-miR-26a) eine mehr als 20%ige Verringerung der relativen Luciferaseaktivität verglichen mit dem leerem Luciferasevektor oder Transfektion mit NS-Vorläufern bzw. leerem pCL5EG-Vektor nachgewiesen werden. Auch die stabil transfizierten HeLa-Zellen zeigten keine Effekte. In Abbildung 3.16 ist beispielhaft das Ergebnis einer Luciferasemessung gezeigt. In diesem Experiment wurden miR-26a-Vorläufer transfiziert.



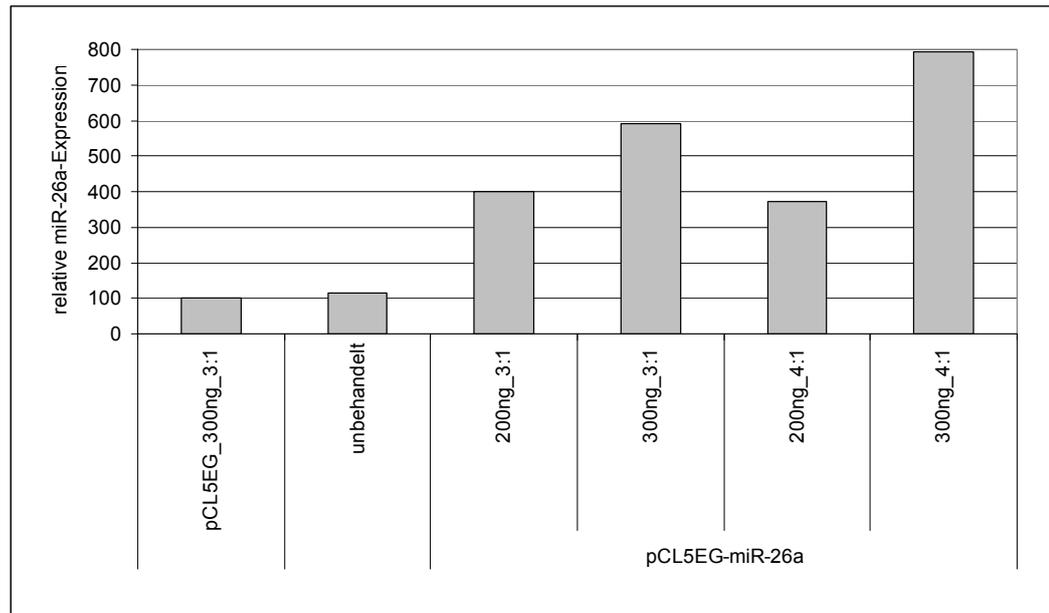
**Abbildung 3.16: Relative Luciferaseaktivität in HeLa-Zellen.**

Gezeigt sind die relativen Luciferaseaktivitäten bezogen auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Transfiziert wurden 50 nM miR-26a-Vorläufer und 24 h später 100 bzw. 200 ng der Vektoren (pMIR, pMIR-GATA6 und pMIR- $\beta$ -Gal). Die Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden weitere 48 h später gemessen.

### 3.4.2 Überexpression von miRNAs

Für die Überexpression von miRNAs wurden die natürlich vorkommenden miRNA-*Stemloops* in den Vektor kloniert. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide enthielten nach der Hybridisierung bereits die benötigten Restriktionsenzym-schnittstellen und konnten sofort verwendet werden. Von den Klonen, die in der Kolonie-PCR ein Insert der richtigen Größe zeigten, wurden Plasmid-Minipräparationen und anschließend Sequenzierungen durchgeführt. Von einem Klon mit der richtigen Sequenz wurde eine Plasmid-Maxipräparation gemacht, um genügend Plasmid-DNA für die transienten Transfektionen und die Herstellung viraler Überstände zu erhalten.

Für die Überexpression wurde mit dem Vektor pCL5EG gearbeitet (vgl. Abbildung 2.4). In pCL5EG wird EGFP und der miRNA-*Stemloop* von demselben Polymerase II-abhängigen Promoter reguliert. Der Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft und zunächst in einer transienten Transfektion auf seine Funktionalität getestet. Nach Transfektion mit siPORT XP-1 wurde die Expression von miR-26a von pCL5EG-miR-26a und entsprechenden Kontrollen (leerer Vektor, unbehandelte Zellen) mit Hilfe von TaqMan-MicroRNA-Assays überprüft. Die Expression von miR-26a in den Zellen wurde auf miR-16 normalisiert. Das Ergebnis der transienten Transfektion mit pCL5EG-miR-26a mit verschiedenen Verhältnissen Transfektionsmittel zu Vektormenge ist in Abbildung 3.17 zu sehen.



**Abbildung 3.17: Transiente Überexpression von miR-26a in HeLa-Zellen.**

Gezeigt sind die relativen Expressionen von miR-26a 48 h nach Transfektionsbeginn normalisiert auf miR-16. Der Mittelwert der relativen Expressionen der pCL5EG-transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

Bezogen auf die miR-26a-Expression in pCL5EG-transfizierten Zellen zeigten unbehandelte Zellen eine leicht erhöhte miR-26a-Expression (116 %). Die Transfektion des pCL5EG-miR-26a-Vektors zeigte je nach Menge und Verhältnis des Transfektionsmittels eine deutliche Überexpression von miR-26a. 200 ng des pCL5EG-miR-26a-Vektors bewirkten eine 3-4fache Überexpression bezogen auf Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert wurden. Die Transfektion mit 300 ng des pCL5EG-miR-26a-Vektors zeigte beim Verhältnis zum Transfektionsmittel von 3 : 1 eine fast sechsfach, beim Verhältnis 4 : 1 eine fast achtfach erhöhte Expression von miR-26a. Nach dem Nachweis der Funktionalität des pCL5EG-miR-26a-Vektors wurde dieser in viralen Transfektionen verwendet.

### 3.4.2.1 Virale Überstände und Infektion

Für die Überexpression von miRNAs sollten Zellen stabil transfiziert werden. Dazu wurden Foamyviren verwendet, die zur Gruppe der Retroviren gehören. Die für die Replikation der Viren essentiellen Gene *gag* (kodiert die strukturellen Komponenten des Virus: Matrix- und Nukleokapsidproteine), *pol* (kodiert die Enzyme

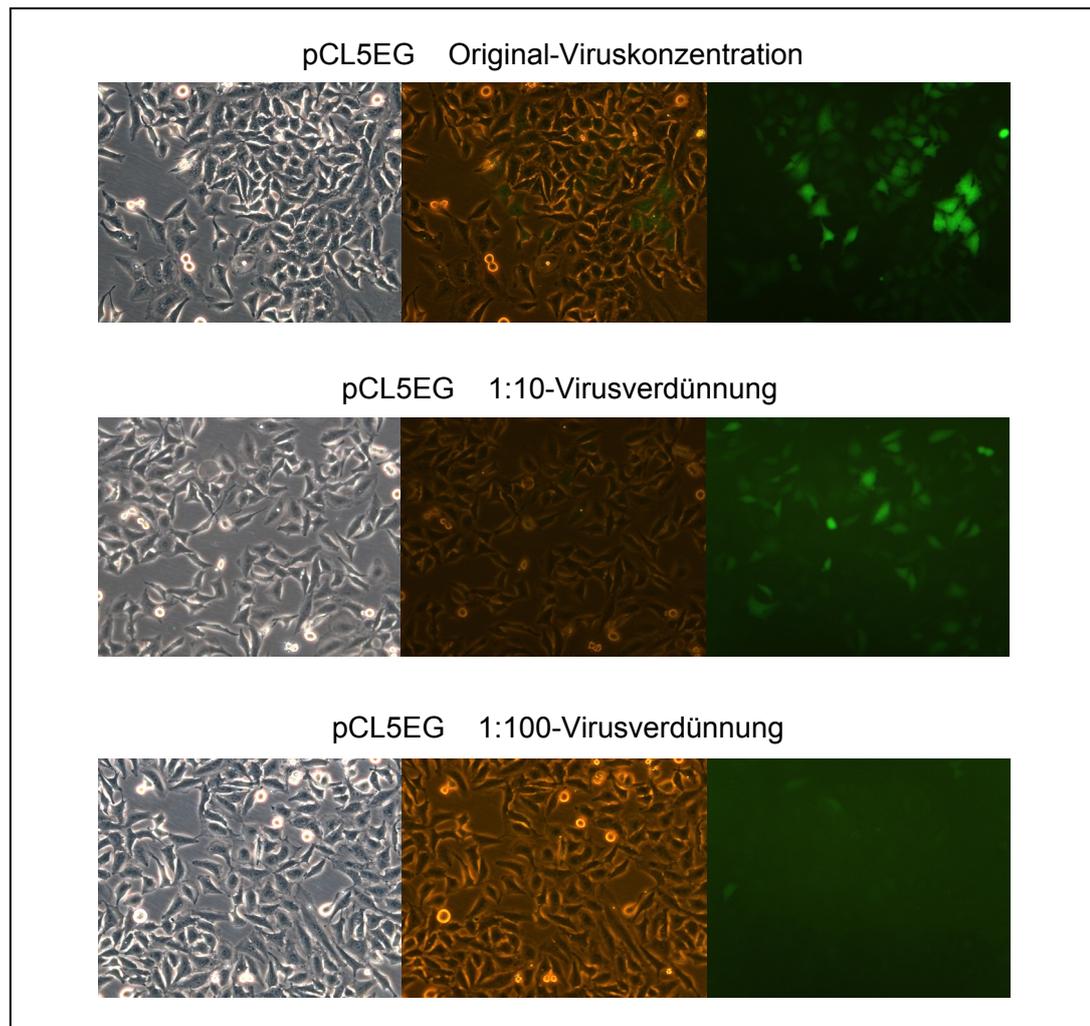
Reverse Transkriptase, Protease und Integrase) und *env* (kodiert die viralen Hüllproteine) waren auf zwei verschiedenen Plasmiden kodiert. Zur Herstellung der viralen Überstände wurden 293T-Zellen verwendet. Diese wurden zunächst transient mit drei Vektoren transfiziert: pCL5EG-miR-26a (kodiert den miR-26a-*Stemloop*), pczHFVenv EM140 (kodiert die Foamy-Hüllproteine) und pCD/NL-BH (kodiert die Helfergene). Die 293T-Zellen produzieren nach Induktion mit Natriumbutyrat Viren. Die so produzierten viralen Überstände wurden für die Infektion von HeLa- und USSC-Zellen verwendet. Die 293T-Zellen zeigten kurz vor Entfernung der Überstände eine grüne Fluoreszenz.

Für die Infektion der HeLa-Zellen wurde der Überstand in Originalkonzentration und verdünnt verwendet. Die Originalkonzentration verursachte bei den HeLa-Zellen eine erhöhte Sterberate. Die Verdünnungen waren weniger toxisch. Bei den pCL5EG-infizierten HeLa-Zellen waren im Mikroskop nur bei den Originalkonzentrationen und den 1:10-Verdünnungen eine grüne Fluoreszenz zu erkennen. Deshalb wurden nur die Zellen der drei höchstkonzentrierten Virusüberstände (Original, 1 : 10 und 1 : 100) durchflusszytometrisch untersucht. Die restlichen Zellen wurden verworfen.

#### **3.4.2.2 Analyse der infizierten HeLa-Zellen**

Untersucht wurden alle infizierten Zellen sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch am Durchflusszytometer. Die Infektion mit pCL5EG diente als Kontrolle. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten die unbehandelten HeLa-Zellen keine Grünfluoreszenz und in der Durchflusszytometrie konnte die lebende (unbehandelte) HeLa-Population klar abgegrenzt werden und das *Gate* entsprechend gesetzt werden. Die Zellen zeigten keine Eigenfluoreszenz.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte die Expression von EGFP in den Zellen nachgewiesen werden. Beispielhaft sind die Ergebnisse der pCL5EG-infizierten HeLa-Zellen in Abbildung 3.18 gezeigt. Die Original-Viruskonzentration zeigt die meisten grünfluoreszierenden Zellen. Bei der 1:10-Virusverdünnung leuchten die Zellen weniger stark und bei der 1:100-Virusverdünnung sind nur noch wenige fluoreszierende Zellen zu erkennen.



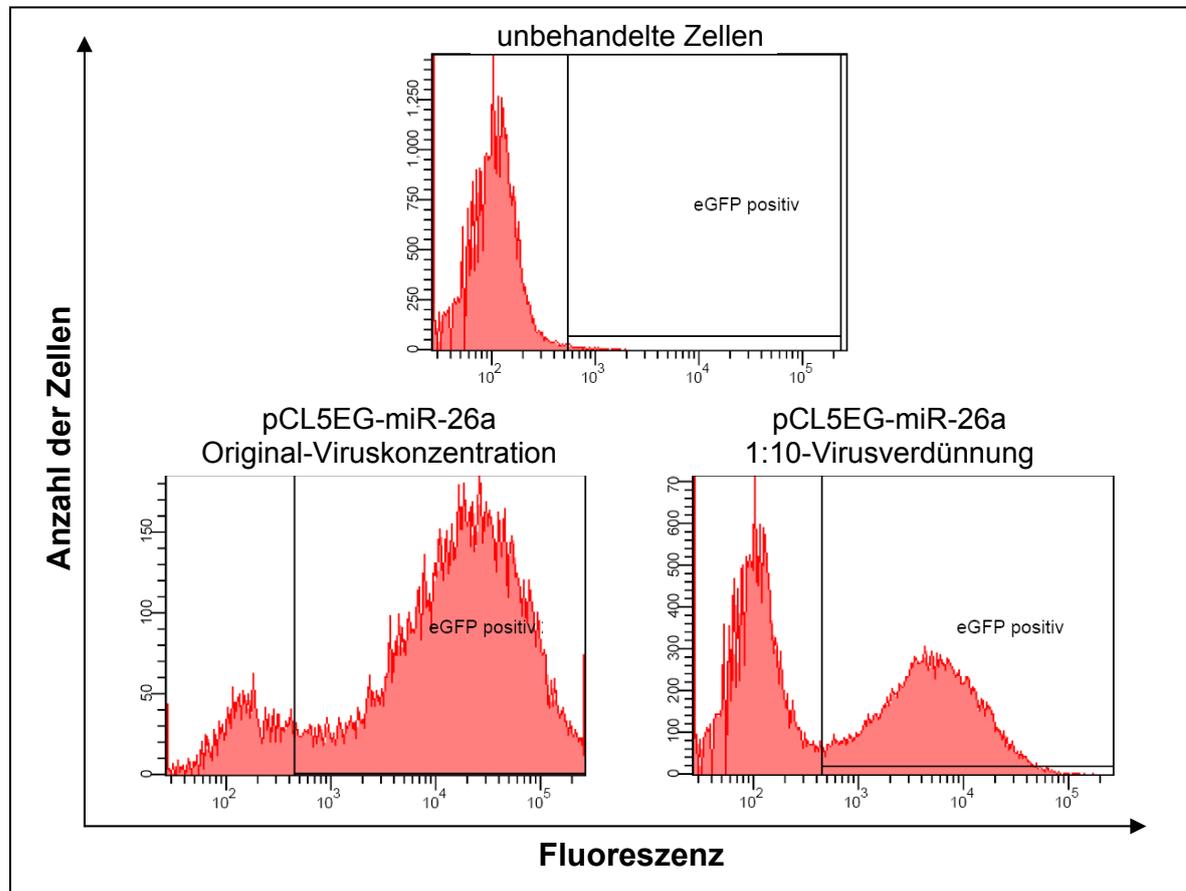
**Abbildung 3.18: Fluoreszenzmikroskopie pCL5EG-miR-26a-infizierter HeLa-Zellen.**

Zu sehen sind die Phasenkontrastbilder (links), Fluoreszenzbilder (rechts) und die Überlagerung der beiden (Mitte) von pCL5EG-miR-26a-infizierten Zellen. Infiziert wurde mit drei verschiedenen Viruskonzentrationen (Originalkonzentration, 1:10- und 1:100-Virusverdünnung). Die Vergrößerung beträgt 1 : 20.

Um die Effizienz der Infektion beurteilen zu können, wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Am Anteil der Zellen, die innerhalb des gesetzten Gates liegen, kann der Anteil lebender Zellen bestimmt werden. Mit abnehmender Viruskonzentration stieg der Anteil lebender Zellen. Bei der Original-Viruskonzentration lag der Anteil lebender Zellen bei 50-60 %. Die Verdünnungen resultierten in über 80 % lebender Zellen.

Die Messungen der infizierten HeLa-Zellen zeigten einen zweiten Peak und damit eine deutliche Grünfluoreszenz und die Population konnte klar von den nicht-markierten Zellen abgetrennt werden.

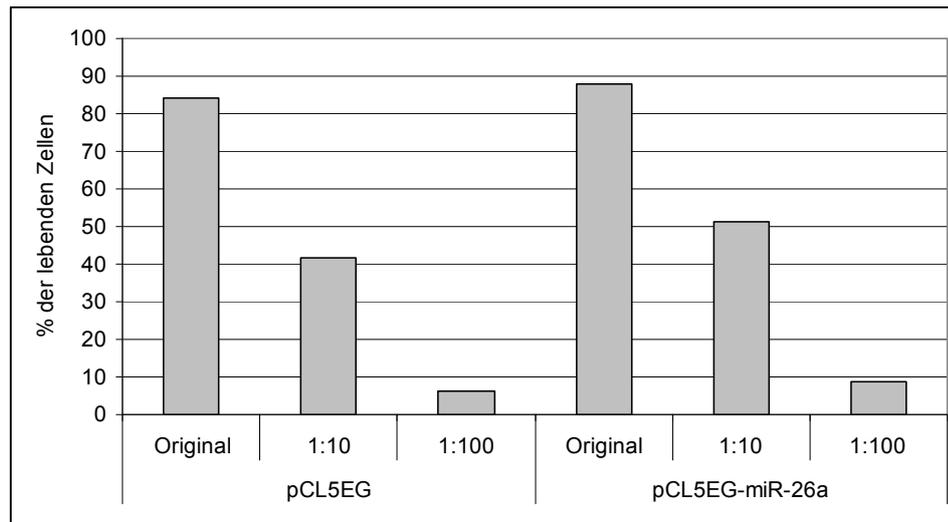
Beispielhaft sind in Abbildung 3.19 die durchflusszytometrischen Analysen der unbehandelten HeLa-Zellen und die Original-Viruskonzentration sowie die 1:10-Verdünnung für die Infektion mit pCL5EG-miR-26a dargestellt.



**Abbildung 3.19: Durchflusszytometrische Analysen der pCL5EG-miR-26a-transfizierten HeLa-Zellen.**

Zu sehen sind die Diagramme unbehandelter Zellen (oben) und den pCL5EG-miR-26a-transfizierten Zellen der Original-Viruskonzentration (unten links) und der 1:10-Verdünnung (unten rechts). Aufgetragen ist die Anzahl der Zellen gegen die Stärke der Fluoreszenz.

Der Anteil EGFP-markierter Zellen sank mit abnehmender Viruskonzentration deutlich. In Abbildung 3.20 sind die durchflusszytometrischen Analysen zusammengefasst. Zu sehen sind die Anteile EGFP-positiver Zellen bezogen auf den Anteil lebender Zellen.



**Abbildung 3.20: Anteile EGFP-positiver HeLa-Zellen bezogen auf lebende Zellen nach viraler Transfektion.**

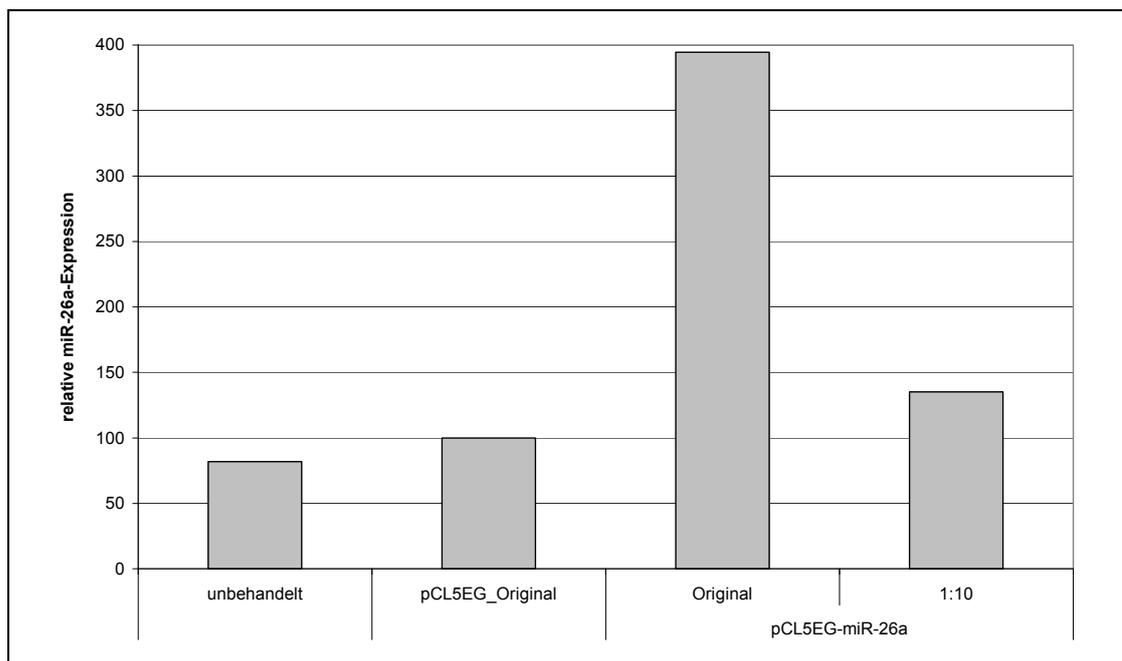
Die viralen Transfektionen erfolgten mit den Vektoren pCL5EG und pCL5EG-miR-26a. Die prozentualen Anteile der EGFP-positiven Zellen bezogen auf lebende Zellen ist für alle drei eingesetzten Virusverdünnungen gezeigt.

Der Anteil EGFP-positiver Zellen sank mit steigender Virusverdünnung deutlich. Die Original-Viruskonzentration resultierte in 80-90 % positiven Zellen. Die 1:10-Verdünnung erzeugte 40-50 % positive Zellen und die 1:100-Verdünnung noch 5-10 %.

### 3.4.2.3 qPCR-Analyse der infizierten HeLa-Zellen

Die grüne Fluoreszenz der Zellen bedeutete, dass EGFP und der miR-26a-*Stemloop* exprimiert wurden, aber nicht zwangsläufig, dass der miR-26a-Vorläufer korrekt zur funktionsfähigen reifen miR-26a prozessiert wurde. Die Überexpression wurde mittels qPCR analysiert. Bei den miRNA-qPCRs werden nur reife miRNAs und keine biologisch inaktiven miRNA-Vorläufer detektiert. Die Bestimmung der miR-16-Menge in den Zellen diente als Referenz. Abbildung 3.21 zeigt die relative miR-26a-Expression zehn Tage nach Infektion in HeLa-Zellen, die mit der Original-Viruskonzentration und der 1:10-Verdünnung von pCL5EG-miR-26a transfiziert wurden, bezogen auf pCL5EG-transfizierte Zellen (Original-Viruskonzentration). Zu diesem Zeitpunkt betrug der Anteil EGFP-positiver Zellen bezogen auf alle Zellen

68,0 % bzw. 36,8 % für die Original-Viruskonzentration an pCL5EG-miR-26a bzw. der 1:10-Verdünnung.



**Abbildung 3.21: Relative miR-26a-Expression in pCL5EG-miR-26a-transfizierten HeLa-Zellen.**

Zu sehen ist die miR-26a-Expression bezogen auf miR-16 für unbehandelte Zellen und mit pCL5EG- bzw. pCL5EG-miR-26a transfizierten HeLa-Zellen. Für letztere ist die Expression für die Original-Viruskonzentration und die 1:10-Verdünnung dargestellt. Die Expression in pCL5EG-infizierten Zellen ist auf 100 % gesetzt.

In den Zellen, die mit der 1:10-Verdünnung behandelt wurden, war eine leichte miR-26a-Überexpression nachweisbar (135 %) bezogen auf pCL5EG-transfizierte Zellen. Nach Behandlung mit der Original-Viruskonzentration war eine fast vierfache Überexpression von miR-26a nachweisbar.

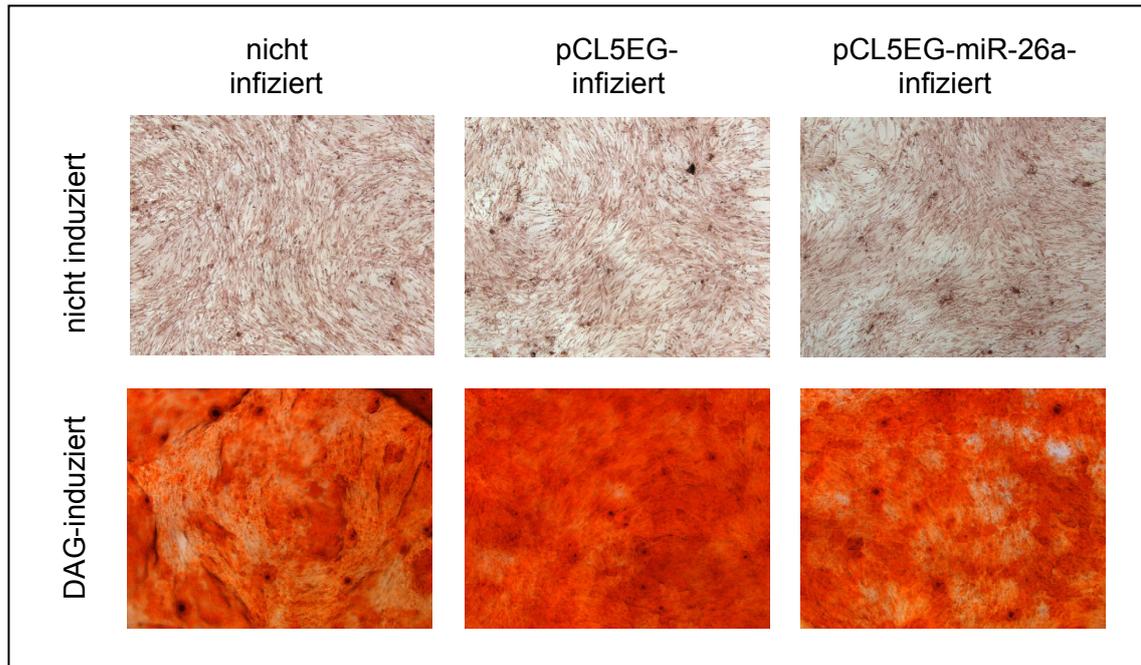
In einer unabhängigen Infektion wurden dieselben Virus-Überstände nach einmonatiger Lagerung bei -80 °C verwendet. Die Zellen zeigten in durchflusszytometrischen Analysen fünf Tage nach Infektion eine ähnliche Effizienz. Die Zellen wurden weitere neun Tage kultiviert und die Expression von miR-26a überprüft. Bezogen auf die Expression von miR-16 zeigten die HeLa-Zellen, die mit der Original-Viruskonzentration von pCL5EG-miR-26a behandelt wurden, eine 2,6fache Überexpression von miR-26a verglichen mit pCL5EG-behandelten Zellen.

#### 3.4.2.4 Virale Infektion von USSC SA503

Für die Infektion der SA503 wurden dieselben viralen Überstände verwendet, die einen Monat bei -80 °C gelagert wurden. Sie wurden in 1:5-, 1:50- und 1:500-Verdünnungen eingesetzt. Die Zellen wurden expandiert und nach fünf Tagen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen zeigten einen stark erhöhten Anteil toter Zellen, sodass keine quantitative Aussage über den Anteil markierter Zellen gemacht werden konnte. Die Zellen, die mit 1:5-Verdünnungen der Virusüberstände behandelt wurden, wurden weiter expandiert und nach weiteren 16 Tagen erneut durchflusszytometrisch analysiert und zur RNA-Isolierung eingesetzt. Außerdem wurde mit einem Teil der Zellen eine osteogene Differenzierung durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte in allen Proben erneut einen erhöhten Anteil toter Zellen. Der Anteil lebender Zellen lag bei 28 % für unbehandelte Zellen, 46 % für pCL5EG-infizierte Zellen (1:5-Verdünnung) und 40,7 % für pCL5EG-miR-26a-infizierte Zellen (1:5-Verdünnung). Der Anteil EGFP-positiver Zellen bezogen auf die lebenden Zellen betrug 59,0 % bzw. 78,7 % für pCL5EG- bzw. pCL5EG-miR-26a-infizierte Zellen respektive.

Um die Fähigkeit der osteogenen Differenzierung nach der viralen Infektion zu überprüfen, wurde nach sieben und 18 Tagen Kultivierung mit DAG eine Alizarinrot-Färbung durchgeführt. Nicht-induzierte Zellen dienten als Kontrolle. Sieben Tage nach Induktion war keine Rotfärbung der Zellen nachweisbar. Das Ergebnis nach 18 Tagen ist in Abbildung 3.22 gezeigt.



**Abbildung 3.22: Alizarinrot-Färbung osteogen induzierter SA503 nach Infektion.**

Die viral transfizierten Zellen wurden mittels DAG osteogen induziert. Nach 18 Tagen waren die Zellen rot gefärbt (unten). Die zur Kontrolle nicht induzierten Zellen zeigten in der Alizarinrot-Färbung keine Kalziumanlagerungen (oben).

Nach 18 Tagen waren alle mit DAG kultivierten Zellen deutlich rot gefärbt, d. h. osteogen differenziert. Die parallel kultivierten Zellen ohne DAG im Medium dagegen zeigten keine Kalziumanlagerungen.

Aus einem Teil der Zellen wurde die RNA mittels mirVana miRNA Isolation Kit isoliert, wobei die total- und smallRNA-Fractionen gemeinsam isoliert wurden. Zunächst wurde damit die Expression von miR-26a mittels qPCR überprüft. Normalisiert wurden die Werte auf die Expression von miR-16. Bezogen auf pCL5EG-infizierte Zellen betrug die relative miR-26a-Expression in pCL5EG-miR-26a-infizierten Zellen 171 % (1:5-Virusverdünnung).

Mit derselben RNA wurde dann eine globale Genexpressionsanalyse durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Insgesamt waren 6398 Gene auswertbar ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ). Eine Auftragung dieser Gene geordnet nach relativen Ratios ergab, dass sich Gene, die 1,3fach verändert waren, deutlich von den anderen Genen abhoben. Gefiltert wurden anschließend die Gene, die in einer Hybridisierung mindestens 1,3fach und in der technischen Wiederholung

---

mindestens 1,2fach verändert exprimiert waren. Jeweils 61 Gene waren in pCL5EG-miR-26a-infizierten erhöht bzw. vermindert exprimiert. Statistisch signifikant erhöht exprimiert waren davon 24 Gene, statistisch signifikant vermindert exprimiert waren davon 17 Gene. Eine Übersicht über die verändert exprimierten Gene, die nach Operon mindestens ein Gensymbol oder eine Genbeschreibung haben, ist im Anhang in Tabelle 8.3 gezeigt.

Die mit Abstand größte Veränderung in pCL5EG-miR-26a-transfizierten USSC zeigte der miR-26a-*Stemloop* mit einer fast 9fachen Überexpression. Auf den Operon-Microarrays befinden sich insgesamt 106 Oligos, die für miRNA-*Stemloops* stehen. Unter den verringert exprimierten Genen befand sich der miR-24-2-*Stemloop*. Für drei der verändert exprimierten Gene (CNBP, FIP1L1 und HSPA8) wird nach Miranda eine Interaktion mit miR-26a vorhergesagt. Korrelierend zur erhöhten Expression von miR-26a konnte für die Zielgene CNBP (*Cellular nucleic acid binding protein*) und HSPA8 (*Heat shock cognate 71 kDa protein*) eine verringerte Expression gemessen werden.

GATA6 war in beiden Hybridisierungen auswertbar und zeigte eine unveränderte Expression (Mittelwert der *Norm Ratio of Median*-Werte 0,988). Die Expression von GATA6 wurde mit qPCRs überprüft und zeigte ebenfalls eine unveränderte Expression.

Es konnte ein System zur Überexpression von miRNAs etabliert werden. Die Expression der biologisch aktiven miRNA konnte nach transients Transfektion mittels qPCR nachgewiesen werden. Das System ist außerdem für virale Transfektionen, d. h. stabile Integration ins Genom anwendbar. Die reife miRNA konnte über einen begrenzten Zeitraum überexprimiert werden. Eine deutliche Überexpression des miRNA-Vorläufers war auch drei Wochen nach Infektion noch nachweisbar.

---

## 4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der osteogenen Differenzierung verschiedener humaner Stammzelltypen hinsichtlich der Regulation. Aus diesem Grund wurden sowohl globale Genexpressionsanalysen durchgeführt als auch die Expression von microRNAs (miRNAs) untersucht. Dazu wurden die von Kögler et al. (2004) beschriebenen USSC, mesenchymale Stammzellen und eine potentielle Nierentumorzelllinie untersucht. Ergänzt wurden diese Daten durch Vorarbeiten mit einer weiteren USSC-Linie.

Alle verwendeten Zelltypen können nachweislich und reproduzierbar osteogen differenziert werden (Kögler et al., 2004; Bruder et al., 1998 und Dr. Rüdiger Sorg, persönliche Mitteilung). Die Induktion der Differenzierung mit Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat (DAG) wird für verschiedene Zelltypen verwendet. Um die Kalzifizierung und damit fortschreitende osteogene Differenzierung nachzuweisen, wurden für alle in dieser Arbeit durchgeführten Differenzierungen parallel Zellen für Alizarinrot-Färbungen, den Test auf Kalzifizierung der Zellen, kultiviert. Zu jedem Zeitpunkt der RNA-Isolierung erfolgte eine Kontrollfärbung. Nicht-induzierte Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Rotfärbung, d. h. keine der Zelllinien zeigte während der 14tägigen Kultivierung spontane osteogene Differenzierung. Die Induktion der osteogenen Differenzierung mit DAG zeigte in USSC SA503 nach fünf Tagen die ersten Kalziumanlagerungen, nach sieben Tagen eine deutliche Rotfärbung und nach 14 Tagen eine fast 100%ige Rotfärbung der Zellen. In MSC waren an Tag 7 die ersten Kalziumanlagerungen nachweisbar und die Zellen waren an Tag 14 komplett kalzifiziert (Abbildung 3.1). Die Differenzierung in DH1 erfolgte am langsamsten – bis Tag 7 war keine Kalzifizierung nachweisbar. An Tag 14 zeigten aber auch diese Zellen eine deutliche Rotfärbung als Nachweis der Kalzifizierung.

Die fortschreitende Kalzifizierung erschwerte zunehmend das Ernten der Zellen. Um einen eventuellen Qualitätsverlust der isolierten RNA auszuschließen, wurden alle Proben in RNA-Agarosegelen analysiert. Die Isolierung mittels mirVana miRNA Isolation Kit zeigte deutliche DNA-Kontaminationen, die in einem DNase-Verdau nachweislich entfernt wurden. In allen Proben waren die 28S- und 18S-

rRNA-Banden zu sehen. Die RNA der späteren Zeitpunkte zeigte in den RNA-Agarosegelen keinerlei Qualitätsverluste im Vergleich mit den frühen Zeitpunkten (Abbildung 3.2). Mit allen Proben wurden daraufhin globale Genexpressionsanalysen durchgeführt.

### **Globale Genexpressionsanalysen**

1995 erfolgte die erste Veröffentlichung zu DNA-Microarrays (Schena et al., 1995). Seitdem entwickelte sich diese Technologie rapide weiter. Obwohl allen Microarray-Plattformen das gleiche Prinzip der Hybridisierung von Nukleinsäuren zugrunde liegt, unterscheiden sie sich in der Art der immobilisierten Nukleinsäuren auf den Arrays. Diese können entweder cDNA oder Oligonukleotide sein und sich zudem in ihrer Länge unterscheiden. Es gibt Microarrays mit kurzen (25-30mere) oder langen (60-70mere) Oligonukleotiden. Auch die Art der Immobilisierung der Nukleinsäuren variiert. Sie können entweder direkt auf der Oberfläche synthetisiert oder auf die Oberfläche gespottet werden (Wilkes et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden die aktuellsten Microarrays von Operon (Version 4) verwendet. Diese Arrays haben über 35000 70mer-Oligonukleotide auf ihrer Oberfläche gespottet, die für über 25000 humane Gene kodieren. 106 dieser Oligonukleotide kodieren für miRNA-*Stemloops*, die Vorläufer der biologisch aktiven miRNAs. Hybridisiert werden gleichzeitig zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte RNA-Proben, sodass ein direkter Vergleich der Expression erfolgen kann.

Für die globalen Genexpressionsanalysen wurden die osteogen differenzierten Zellen (d01 bis d14) jeweils direkt mit undifferenzierten Zellen (d0) verglichen. Unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 wurde jeweils eine Probe Rot und die andere Grün markiert. Um falsch-positive Ergebnisse minimal zu halten, wurde zu jeder Hybridisierung eine technische Wiederholung mit vertauschten Fluoreszenzfarbstoffen (*colour-swap*) durchgeführt. Ausgewertet wurden nur die Gene, die in beiden Hybridisierungen ein mindestens 5faches Signal für eine der beiden Fluoreszenzfarben über Hintergrund hatten. Aufgrund der sehr niedrigen Eigenfluoreszenz der Operon-Microarrays konnten mit diesem Kriterium auch schwach exprimierte Gene in die Auswertung involviert werden.

Von Beginn der ersten Veröffentlichung von Microarray-Experimenten wurde die schlechte Reproduzier- und Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Array-Plattformen diskutiert, die zu großer Unsicherheit und Skepsis gegenüber der Microarray-Technologie führte. Die Ursachen sind vielfältig und waren vor allem in den letzten Jahren Inhalt vieler Veröffentlichungen (Übersicht in Yauk and Berndt, 2007).

Neben dem prinzipiellen Array-Design gibt es viele Variablen, die zu unterschiedlichen Resultaten führen können. Angefangen mit der Probenaufarbeitung und Qualität über Amplifizierungsmethoden, die Methode des Markierens, Hybridisierens, Waschens und Scannens bis zur Bildverarbeitung, Datennormalisierung und -analyse und zuletzt der Dateninterpretation.

Jeder Array ist so gut wie die Annotation seiner Sonden. Falsche Annotationen führten anfangs zu geringen Übereinstimmungen zwischen unterschiedlichen Array-Plattformen (Halgren et al., 2001 und Kuo et al., 2002). Im Laufe der Zeit und mit Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurde die Annotation korrekter und damit auch die Korrelation unterschiedlicher Array-Experimente besser. Trotz dessen kann die Detektion unterschiedlicher Splicevarianten eines Gens zu Diskrepanzen führen.

Um Microarray-Ergebnisse trotz verschiedener experimenteller Möglichkeiten vergleichbarer zu machen, wurde der *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME)-Standard eingeführt (Brazma et al., 2001). Dieser Standard der genauen Protokollierung aller Experimente wird auch in der institutsinternen Datenbank angewendet, um allen Nutzern die nötigen Informationen bereitzustellen.

Seit 2004 überwiegt die Anzahl der Publikationen mit moderaten bis hohen Korrelationen der Ergebnisse verschiedener Array-Plattformen deutlich (Yauk and Berndt, 2007). Und auch das kürzlich beendete *Microarray Quality Control* (MAQC)-Projekt bestätigt die Konsistenz der Ergebnisse verschiedener Array-Plattformen (MAQC Consortium (Shi et al., 2006)). Diese Resultate wurden durch verschiedene Erkenntnisse erreicht. So ist die Ermittlung von Expressionsratios verlässlicher als die der Expressionsintensitäten (Park et al., 2004) und erhöht die Korrelation der Ergebnisse aus verschiedenen Array-Experimenten. Gene mit starken Signalen waren verlässlicher auswertbar und vergleichbarer als Gene mit niedrigen Signalen (Draghici et al., 2006).

Des Weiteren zeigten Molas and Kiss (2007), dass die Ergebnisse eines Microarray-Experimentes abhängig vom verwendeten RNA-Isolierungs-Kit sind. Nicht nur für die initiale RNA-Isolierung, sondern auch für die Aufreinigung bei der Amplifizierung wurden in der vorliegenden Arbeit kommerzielle Kits verwendet. Außer bei der aus Vorarbeiten stammenden USSC SA479 wurde die RNA aller Zellen mit dem gleichen Kit isoliert. Eventuelle Diskrepanzen mit USSC SA479 können also aus der initialen RNA-Isolierung stammen. Ansonsten wurden die Schritte der Amplifizierung für alle Zelllinien nach demselben Protokoll durchgeführt.

Sawada et al. (2007) empfahlen außerdem eine Lowess-Normalisierung nach Zweifarbenhybridisierungen und das Fragmentieren der RNA vor der Hybridisierung. Letzteres verbesserte die Ergebnisse durch geringere Sekundärstrukturen und erhöhte Diffusionsrate und Spezifität. Die Daten in der vorliegenden Arbeit wurden mit der Software Acuity 3.1 Lowess-normalisiert, allerdings wurden die Proben nicht fragmentiert. Dieser Punkt sollte aber für unabhängige Hybridisierungsexperimente anderer Fragestellungen berücksichtigt werden, um die bestmöglichen Ergebnisse zu erzielen.

Ein kritischer und viel diskutierter Aspekt ist die mögliche lineare Amplifizierung der RNA im Vergleich zu direkt markierter RNA. Sawada et al. (2007) verglichen die beiden Methoden mit dem Ergebnis, dass die Reproduzierbarkeit der amplifizierten Proben höher war. Im Gegensatz dazu fanden van Haften et al. (2006), dass die differentielle Expression vor allem der schwach exprimierten Gene nach der Amplifizierung nicht mehr nachweisbar war.

Da USSC SA479 im Vorfeld aufgrund geringer Zellmengen amplifiziert wurde, wurden alle weiteren Zellen zur besseren Vergleichbarkeit ebenfalls amplifiziert. Die lineare Amplifizierung der RNA birgt allerdings neue Fehlerquellen. Die Effizienz der T7-Polymerase ist nicht für alle Gene gleich, sondern ist u. a. vom GC-Gehalt und der Sekundärstruktur der Gene abhängig (Duftner et al., 2008). Steht nur sehr wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung, kann zwei Runden amplifiziert werden (Luzzi et al., 2003 und Kaposi-Novak et al., 2004). Boelens et al. (2007) fanden aber heraus, dass nach der zweiten Amplifizierungsrunde 30 % weniger differentiell exprimierte Gene detektierbar waren. Außerdem resultiert die Amplifizierung in weniger hohen Ratios von verändert exprimierten Genen (Wadenbäck et al., 2005). In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurde deutlich, dass Gene mit 1,4fach erhöhter bzw. verminderter Expression sich schon deutlich vom Hauptteil der

unverändert exprimierte Gene abhoben und als differentiell exprimiert gelten konnten. Mit der Bedingung, dass Gene in beiden Hybridisierungsexperimenten in die gleiche Richtung verändert exprimiert sein müssen, wurden die vereinzelt auftretenden Gene ausgeschlossen, deren Expression zwar verändert war, aber die Tendenzen gegenläufig waren. Steht genügend RNA-Material zur Verfügung, sollten die Vor- und Nachteile einer Amplifizierung vs. direktem Labeling genau abgewogen werden.

Um den bekannten systematischen Unterschied beim Markieren mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 (Dobbin et al., 2005) zu relativieren, wurden die von Dabney and Storey (2007) empfohlenen technischen Wiederholungen (*colour-swap*-Hybridisierungen) für jedes Experiment durchgeführt.

Diese Darstellung zeigt deutlich, dass kein Microarray-Experiment die absolute Wahrheit der Genexpression einer Probe liefern kann. Einige dieser diskutierten Fehlerquellen wurden innerhalb der letzten 2-3 Jahre veröffentlicht – nachdem die in dieser Arbeit gezeigten Microarray-Experimente durchgeführt wurden. Trotzdem wurden viele mögliche Fehler vermieden.

Um möglichst viele differentiell exprimierte Gene identifizieren zu können, wurden alle Microarrays mit zwei verschiedenen Intensitäten gescannt. Wie Skibbe et al. (2006) zeigten, führt dieser oft vernachlässigte Parameter eines Microarray-Experiments zu einer erhöhten Detektion differentiell exprimierter Gene. Der schwächere Scanvorgang sollte gewährleisten, dass stark exprimierte Gene nicht in der Sättigung liegen. Der stärkere Scanvorgang sollte ermöglichen, dass auch relativ schwach exprimierte Gene auswertbar sind. Dies ermöglichte trotz des Mehraufwandes bei der Auswertung eine maximale Nutzung der erzeugten Daten.

### **Vergleich undifferenzierter USSC und MSC**

Der Vergleich der undifferenzierten USSC SA503 und der MSC ergab 8481 auswertbare Gene, von denen 1107 differentiell exprimiert waren (Kapitel 3.1.3). 438 der Gene waren statistisch signifikant verändert. Das Gen ID1 war in SA503 3,4fach höher exprimiert als in MSC. Ein ID1-Verlust führt in hämatopoietischen Stammzellen zu einer Beeinträchtigung der Selbsterneuerung (Jankovic et al., 2007). Obwohl ID1 noch nicht im Zusammenhang mit USSC oder MSC beschrieben wurde, könnte die erhöhte Expression in USSC auf eine höhere Selbsterneuerungskapazität schließen

lassen. SERPINB2, auch bekannt als PAI-2 ist in MSC 5,3fach höher exprimiert als in USSC. PAI-2 wurde aus der Plazenta und Monozyten isoliert und wird im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen und Schwangerschaft beschrieben (Smith et al., 2007 und Astedt et al., 1998). Lijnen et al. (2007) zeigten, dass PAI-2 in Mäusen die Entwicklung von Fettgewebe fördert und bringen das Gen damit in Zusammenhang mit einer der möglichen Differenzierungsrichtungen von MSC.

Ein Vergleich von USSC und MSC hinsichtlich ihrer Zytokin-Produktion wurde 2005 von Kögler et al. veröffentlicht. Darin wird u. a. gezeigt, dass MSC mehr IL-6 und IL-8 produzieren als USSC, wenn auch nicht statistisch signifikant. Diese Tendenz konnte in den Microarray-Experimenten bestätigt werden, wo IL-6 dreifach und IL-8 2,5fach stärker in MSC exprimiert waren. Zudem konnte die erhöhte Expression von VEGF in MSC (1,6fach) bestätigt werden.

Von den 438 signifikant exprimierten Genen kodieren 24 Gene für Transkriptionsfaktoren. Deutliche Expressionsunterschiede zeigten CITED2, HOXC9 und PITX2. Außerdem waren zwei der aus der Literatur bekannten, osteorelevanten Gene bereits in undifferenzierten Zellen unterschiedlich stark exprimiert. SPP1 (Osteopontin) zeigte in MSC eine knapp 3,2fach höhere Expression und SMAD6 war in SA503 fast 1,7fach höher exprimiert. Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten von Kögler et al. (2005) zeigte die USSC im Microarray die höhere LIF-Produktion (2,5fach).

Die typischen Stammzellmarker Nanog, Oct-4 und Sox2 waren aufgrund zu schwacher Fluoreszenzsignale nicht auswertbar, wobei die Detektion von Transkriptionsfaktoren in Microarray-Experimenten im Allgemeinen schwierig ist, weil die Expression auf einem relativ niedrigen Level erfolgt (Quackenbush, 2006). Auch in PCR-Analysen zeigten USSC und MSC im Vergleich zur embryonalen Tumorzelllinie nTERA nur eine sehr schwache Expression von Oct-4 und Nanog (Dr. Stefanie Liedke, persönliche Mitteilung). Auch eine Telomerase-Expression konnte in keiner der beiden Zelltypen nachgewiesen werden. Aufgrund der differentiell exprimierten Gene konnte keine Aussage zum Stammzellcharakter der beiden Zelltypen und die Stellung der USSC als Vorläufer der MSC (Kögler et al., 2006) gemacht werden.

---

## Osteogene Differenzierung im Microarray-Experiment

Bei den globalen Genexpressionsanalysen der osteogen differenzierten Zellen der USSC SA503, MSC und DH1 waren zu den einzelnen Zeitpunkten 7500-12000 Gene auswertbar ( $S/N > 5$ ,  $n=2$ ) (Tabelle 3.1, Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3).

Bei der MSC waren weniger Gene auswertbar und auch die Anzahl der differenziell exprimierten Gene war am niedrigsten. Während in SA503 mit zunehmender Differenzierung auch die Anzahl der differenziell exprimierten Gene stieg, konnte dieser Trend in DH1 nicht bestätigt werden. Trotz dieses Unterschiedes zeigten die GO-Nomenklaturen ähnliche Tendenzen (Abbildung 3.5 und Abbildung 3.7). Aus den jeweils über 500 verschiedenen Beschreibungen zu biologischen Prozessen und molekularen Funktionen waren die zehn häufigsten Gruppen in allen Zelllinien mit geringen Unterschieden in der Reihenfolge identisch. Bei den biologischen Prozessen waren in allen drei Zelltypen die meisten Gene im Zusammenhang mit Metabolismus differenziell exprimiert. Übereinstimmend waren zudem Gene verändert exprimiert, die bei der Zellkommunikation, der Entwicklung und des Zellwachstums und der -erhaltung eine Rolle spielen. Gene der Transkription waren in allen drei Zelllinien unter den siebthäufigsten Gruppen. Die Betrachtung der molekularen Funktionen der differenziell exprimierten Gene zeigte ebenfalls große Ähnlichkeiten. Bindung im Allgemeinen und speziell die Metallionenbindung sowie die katalytische Aktivität waren übereinstimmend unter den vier häufigsten Beschreibungen. Auch die Signaltransduktionsaktivität spielte eine große Rolle. Offen bleibt, ob die Verteilung ähnlich aussehen würde, wenn alle Gene GO-klassifiziert wären. Alle diese biologischen Prozesse und molekularen Funktionen können in Zusammenhang mit osteogen differenzierenden Zellen gebracht werden.

Ohne Beachtung der Signifikanzen war die Anzahl der Gene, die an je mindestens einem Zeitpunkt differenziell exprimiert waren, in SA503, MSC und DH1 ähnlich hoch (2500 bis knapp 3000). In SA479 wurden aufgrund der fehlenden Zeitpunkte d05 und d14 weniger Gene differenziell exprimiert gefunden. Viele Veränderungen können auf spender- oder zelltypspezifische Schwankungen zurückgeführt werden und stehen nicht im Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung. Um möglichst die für die osteogene Differenzierung spezifischen Veränderungen herauszufiltern, wurden deshalb nur die Gene weiter untersucht, die

sowohl in SA479 und SA503 als auch in MSC verändert exprimiert waren ohne Beachtung der Erhöhung oder Verminderung ihrer Expression. Es konnten ohne Beachtung der Signifikanzen 451 Gene identifiziert werden und davon 67 Gene, die statistisch signifikant verändert waren. SA479 und SA503 zeigten größere Übereinstimmungen untereinander als jeweils im Vergleich mit MSC.

Wie oben bereits ausgeführt wird die Verlässlichkeit von Microarray-Experimenten kritisch diskutiert und es gibt viele Variablen bei der Durchführung. Um die Ergebnisse der Microarray-Experimente zu validieren, wurden quantitative *Real-time*-PCRs (qPCRs) durchgeführt. Dabei war die Wahl des Referenzgens wichtig, weil die so genannten „Haushaltsgene“ während biologischen Prozessen differenziell exprimiert sein können. GAPDH galt viele Jahre als Haushaltsgen, ist aber inzwischen umstritten (Vandesompele et al., 2002). Auffällig war, dass sich GAPDH unter den vermindert exprimierten Genen befand (Abbildung 3.10). Das zeigt, dass die Auswahl des Referenzgens für qPCRs kritisch geprüft werden muss, wenn biologische Prozesse untersucht werden, um Fehler bei der Interpretation der Daten zu vermeiden. Differentielle Expressionen können auch auf die veränderte Expression des Referenzgens zurückzuführen sein.  $\beta$ -Aktin war auf den Arrays mit einem Spot vertreten, in allen Hybridisierungen auswertbar und im Mittel unverändert exprimiert, aber mit einer relativ hohen Standardabweichung. PBGD ist inzwischen als Haushaltsgen verbreitet und zeigte eine durchschnittlich unveränderte Expression bei 114 auswertbaren Spots und im Vergleich zu GAPDH und  $\beta$ -Aktin die geringste Standardabweichung (Tabelle 3.4). Um die relativen Expressionen bestimmen zu können, müssen die Effizienzen der PCR möglichst hoch sein, was für die verwendeten Primer nachgewiesen wurde.

Die Übereinstimmung der Microarray- und qPCR-Daten war insgesamt gut, zeigte aber auch die typischen Schwächen des Microarrays (Tabelle 3.5). Während in den qPCRs alle bis auf ein Gen in DH1 detektierbar waren, war ein Drittel der Microarray-Werte nicht auswertbar. Auch die Verringerung der Ratios in amplifizierten Proben wurde sehr deutlich. Die Veränderung der Expression war in den qPCRs deutlicher als in den Microarray-Daten. Nur 3 % der Datenpunkte zeigten in den qPCRs eine gegenläufige Tendenz verglichen mit den Array-Daten. Diskrepanzen zwischen Microarray- und qPCR-Werten können auch auf die verschiedene Aufarbeitung der RNA-Proben zurückgeführt werden. Während für

qPCRs eine Reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern durchgeführt wird, werden die Proben für die Microarrays nach der Reversen Transkription in weiteren Schritten amplifiziert und mehrmals aufgereinigt. Da sich sämtliche Werte sowohl im Microarray als auch in qPCRs auf undifferenzierte Zellen beziehen, ist die Aufarbeitung dieser Proben besonders kritisch. Da aber die Proben einer Zelllinie immer gleichzeitig bearbeitet wurden und für alle Reaktionen Mastermixe verwendet wurden, kann diese Fehlerquelle vernachlässigt werden.

Als Überblick über veränderte Genexpressionen ist ein Microarray-Experiment ein erster Anhaltspunkt, die einzelnen Werte müssen aber in allen Fällen mit qPCRs verifiziert werden.

### **Osteorelevante Gene**

Die Regulation der osteogenen Differenzierung ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt eine Reihe von Genen, die als Marker für die osteogene Differenzierung gelten. Zu diesen gehören u. a. ALPL, BMP6, FGF2, IBSP, PMF1, Runx2, SMAD6, SP7, SPARC und SPP1. Einige dieser Marker zeigten in den Microarray-Experimenten keine auswertbaren Signale oder waren unverändert exprimiert, während andere eine deutliche differentielle Expression aufwiesen (Tabelle 3.5). Im Weiteren werden daher nur die qPCR-Daten diskutiert.

ALPL war in USSC und MSC im Laufe der osteogenen Differenzierung an allen Zeitpunkten mindestens sechsfach erhöht exprimiert. DH1 zeigte zumindest an d14 eine 1,75fach erhöhte Expression. Die Expression von ALPL in Osteoblasten (Bonucci and Nanci, 2001) wird über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg induziert (Rawadi et al., 2003). ALPL ist essentiell für die osteogene Differenzierung, da durch die Spaltung von anorganischem Pyrophosphat Phosphat für den Knochenaufbau gewonnen wird.

Die Familie der BMPs wurde im Zusammenhang mit osteogener Differenzierung beschrieben (Wan and Cao, 2005). Offensichtlich können BMP-2, -4 und -6 die Differenzierung zu Knochenzellen induzieren, während BMP-7 die Fettdifferenzierung fördert (Neumann et al., 2007). Die unterschiedliche Effizienz der Induktion durch BMP-2, -4 und -6 ist nicht einheitlich. Während Friedman et al. (2006) BMP-6 als potentesten Regulator beschreiben und Simic et al. (2006) zeigten, dass die Applikation von BMP-6 in Ratten zu einer erhöhten Knochenbildung und

verringertes Knochenresorption führt, fanden Yamaguchi et al. (1996) BMP-2 am effizientesten. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen die wichtige Rolle von BMP-6, denn es war in SA503, MSC und DH1 an allen drei Zeitpunkten mindestens drei- bis 45fach erhöht exprimiert.

IBSP, auch *Bone sialo protein 2* genannt, ist ein später Marker der osteogenen Differenzierung (Bianco et al., 1991). MSC zeigte nur an d14 eine erhöhte Expression, während die anderen Zellen und Zeitpunkte eine unveränderte oder verringerte Expression zeigen.

PMF1 (Osteocalcin) zeigte in SA503 und DH1 jeweils an d07 und d14 die erwartete erhöhte Expression (Lian et al., 1998), während dieser Marker in MSC an allen Zeitpunkten unverändert exprimiert war. Die fehlende Erhöhung der PMF1-Expression während der osteogenen Differenzierung kann nicht erklärt werden.

Die für die osteogene Differenzierung essentiellen Transkriptionsfaktoren Runx2 (Komori, 2008) und SP7 (Osterix) zeigten die erwartete erhöhte Expression. Diese konnte in allen drei Zelllinien an allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die Beobachtung, dass SP7-defiziente Mäuse keine Knochen ausbilden, in den Zellen aber Runx2 exprimiert wird, zeigt, dass SP7 notwendig ist und dem Runx2-Protein nachgeschaltet ist (Nakashima et al., 2002). SP7 war in SA503 und MSC an allen Zeitpunkten deutlich erhöht (mindestens 6,8fach), konnte allerdings in DH1 nicht nachgewiesen werden.

SPARC (Osteonectin) und SPP1 (Osteopontin) sind ebenfalls Marker der osteogenen Differenzierung. SPARC ist für die Erhaltung der Knochen und den Knochenumbau nötig wie SPARC-defiziente Mäuse verdeutlichten, die eine verringerte Osteoblastenzahl und Knochenbildung zeigten (Delany et al., 2003). SPARC war in SA503 und MSC wie erwartet erhöht exprimiert, zeigte aber in DH1 eine gegenläufige Tendenz. Die Rolle von SPP1 ist nicht vollständig geklärt. Frank et al. (2002) zeigten eine erhöhte Expression von SPP1 während der osteogenen Differenzierung. Huang et al. (2004) diskutieren SPP1 als negativen *Feedback*-Regulator der osteogenen Differenzierung. Eine erhöhte SPP1-Expression resultierte in verminderter PMF1- und IBSP-Expression und Proliferation. Das erklärt die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verminderte Expression in allen drei Zelllinien an allen Zeitpunkten.

Auch die SMAD-Gene spielen als Teil des TGF $\beta$ -Signalwegs eine wichtige Rolle für die osteogene Differenzierung. Die Expression von SMAD6 konnte in allen drei Zelllinien als erhöht nachgewiesen werden.

Für SA503 und MSC konnten damit die wichtigsten Marker der osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Die veränderte Expression dieser beiden Zelllinien war außer für PMF1 stets gleich. DH1 hingegen zeigte teilweise deutliche Abweichungen. Zum einen die gegensätzliche Expression von SPARC und zum anderen gar keine Detektion von SP7, dem zweitwichtigsten Marker. Die Ursache könnte in der Definition der Zelle liegen. Diese ist keine, wie zu Beginn der Arbeiten angenommen, potentielle Nierentumorzelllinie, sondern eine Stromazelllinie. Im Gegensatz zu anderen generierten Zelllinien aus Nierenkarzinomen ist die DH1 chromosomal normal und zeigt in Tierversuchen keine Tumorbildung. Dennoch ist sie in der Lage, osteogen zu differenzieren, was der Nachweis mit Alizarinrot und die Expression einiger osteogener Marker zeigt.

Um weitere prinzipielle Regulationen der osteogenen Differenzierung zu untersuchen bzw. potentielle Gene der Stammzellerhaltung zu identifizieren, wurden die Gene genauer analysiert, die in USSC SA479, SA503 und MSC differentiell exprimiert waren (Abbildung 3.9). Aus diesen 67 signifikant veränderten Genen wurden diejenigen herausgefiltert, deren Veränderung in allen drei Zelllinien in die gleiche Richtung zeigte. Zwölf der Gene waren erhöht und 14 vermindert exprimiert (Abbildung 3.10).

Des Weiteren waren unter diesen 67 Genen vier Transkriptionsfaktoren: DLX2 und GATA6, die während der osteogenen Differenzierung vermindert exprimiert und CEBPD und SIX1, die erhöht exprimiert waren. Filtert man die ohne Beachtung der Signifikanzen in SA479, SA503 und MSC verändert exprimierten 451 Gene nach Transkriptionsfaktoren, erhält man weitere 24. In der Clusteranalyse zeigten zusätzlich zu CEBPD und SIX1 weitere fünf Gene eine einheitlich erhöhte Expression (GILZ, ID3, NFYB, TCEAL1 und ZFP36L2) und zusätzlich zu DLX2 und GATA6 ebenfalls weitere fünf Gene eine einheitlich verminderte Expression (BACH1, C12orf7, FOXP1, JUN und TB114) (Abbildung 3.11). Von diesen signifikant veränderten Genen und Transkriptionsfaktoren wurden neun Gene in qPCRs auf ihre

Expression hin untersucht. Die Übereinstimmung war bis auf wenige Ausnahmen sehr gut.

DLX5 und DLX6 sind als Regulatoren der osteogenen Differenzierung beschrieben worden (Komori, 2006). Harris et al. (2003) zeigten, dass DLX2 und DLX5 in Mauszellen in Anwesenheit von BMP-2 erhöht exprimiert waren, eine Rolle in DLX2 im Menschen ist bisher nicht beschrieben worden.

Die Proteine der GATA-Familie sind dagegen für ihre Rolle in der Entwicklung und Differenzierung bekannt (Patient and McGhee, 2002). GATA6-defiziente Mäuse sterben frühzeitig aufgrund eines Defekts der endodermalen Differenzierung. In der späteren Embryonalentwicklung ist GATA6 für die Entwicklung des Bronchialepithels nötig (Morrisey et al., 1998). Des Weiteren ist GATA6 wichtig für die Herzentwicklung (Lepore et al., 2006) und die Expression im zentralen Nervensystem wurde nachgewiesen (Kamnasaran and Guha, 2005). Erst kürzlich beschreiben Alexandrovich et al. (2008) eine mögliche Rolle von GATA6 in der Knorpeldifferenzierung. Die Beispiele zeigen, dass GATA6 nur für nicht-osteogene Differenzierungen eine Rolle zu spielen scheint und es daher nicht überraschend ist, dass GATA6 in allen drei Zelllinien für die osteogene Differenzierung herunterreguliert wird.

Für BACH1 beschreiben Nishizuka et al. (2002), dass in murinen Prä-Adipozyten die Expression von BACH1 zu Beginn der Adipozytendifferenzierung erhöht ist. Das lässt vermuten, dass auch BACH1 in der osteogenen Differenzierung keine Rolle spielt und deshalb vermindert exprimiert wird, wie in USSC und MSC nachgewiesen. Ebenso wie FOXP1, das essentiell für die Entwicklung des Herzens, der Lunge und von B-Zellen ist (Koon et al., 2007) und in der osteogenen Differenzierung nicht benötigt wird.

Ein in den Microarray-Daten auffällig in allen drei Zelllinien erhöht exprimiertes Gen ist GILZ. Die erhöhte GILZ-Expression konnte in den qPCRs bestätigt werden. 2003 beschrieben Shi et al., dass GILZ die Fettdifferenzierung inhibiert. Ende 2007 konnten Zhang et al. zeigen, dass die Überexpression von GILZ in murinen MSC eine erhöhte ALPL-, Typ I-Kollagen- und PMF1-Expression und Knochenbildung und gleichzeitig eine verringerte PPAR $\gamma$ 2- und CEBP $\alpha$ -Expression verursacht. GILZ fördert damit die osteogene Differenzierung, während die Adipozytendifferenzierung gehemmt wird.

Gene, die während der osteogenen Differenzierung verringert exprimiert werden, können eine Rolle in der Erhaltung des undifferenzierten Zustandes der Zellen spielen. Für embryonale Stammzellen gehören z. B. Oct-4 und Nanog zu diesen Genen. Zu den in der vorliegenden Arbeit vermindert exprimierten Genen sind keine in der Literatur im Zusammenhang mit dieser Eigenschaft diskutiert. Weiterführende Experimente (*Knock-out*- bzw. Überexpressions-Experimente) können die Rolle dieser Gene genauer verifizieren.

Um einen Überblick über die Signalwege zu bekommen, in die die verändert exprimierten Gene involviert sind, wurde die DAVID-Datenbank verwendet. Durch Eingabe einer Liste von Genen werden die relevanten Signalwege herausgefiltert. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Gene zu identifizieren. Operon gibt zu den Genen sowohl RefSeq- als auch GenBank-Accession-Nummern an. Da 9893 der gespotteten Oligonukleotide keine RefSeq-Nummer und 12519 keine GenBank-Accession-Nummern haben, wurden erstere zur Identifikation der verändert exprimierten Gene verwendet.

391 der 451 differentiell exprimierten Gene in SA479, SA503 und MSC hatten eine RefSeq-Nummer. Die Analyse mittels DAVID-Datenbank ergab, dass in den folgenden Signalwegen die meisten Gene involviert waren: Fokale Adhäsion, ECM-Rezeptor Interaktion, Zellkommunikation, Komplement- und Koagulations-Kaskade, und *Gap Junction*. Fast alle sind bekannt dafür, in der osteogenen Differenzierung eine Rolle zu spielen. In der Auswertung mittels DAVID-Datenbank waren zwei weitere wichtige Signalwege nicht auffällig: der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Hedgehog-Signalweg. Kang et al. (2007) zeigten, dass Wnt/ $\beta$ -Signale das Zellschicksal von MSC in Richtung der osteogenen Differenzierung verschieben. Wnt10b-Expression hemmt das Mastergen der Adipozytendifferenzierung PPAR $\gamma$ 2 und erhöht die Expression von Runx2 und SP7. Außerdem blockt die Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin die osteogene Differenzierung komplett (Day et al., 2005). *Indian hedgehog* (Ihh)-defiziente Mäuse bilden keine Osteoblasten und zeigt die essentielle Rolle des Hedgehog-Signalweges (St-Jacques et al., 1999). Der wichtigste Signalweg ist der TGF $\beta$ -Signalweg. Über BMPs und verschiedene SMAD-Proteine wird schließlich die Differenzierung reguliert (Moses and Serra, 1996).

Der Kontakt zur extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) ist notwendig, um die osteogene Differenzierung über den ERK (*Extracellular-signal*

*regulated kinase*)-abhängigen Signalweg zu induzieren (Salasznyk et al., 2004 und Klees et al., 2005). Salasznyk et al. (2007) beschrieben die Beteiligung des FAK (*Focal adhesion kinase*)-Signalwegs in der osteogenen Differenzierung als Bindeglied zwischen der ERK1/2-Aktivierung durch ECM und Phosphorylierung von Runx2. Die Inhibierung dieses Signalweges zeigte eine Blockierung der SP7-Aktivität und osteogenen Differenzierung in humanen MSC.

*Gap Junctions* sind Zell-Zell-Kanäle, die benachbarte Zellen direkt miteinander verbinden und somit zur Signalvermittlung zwischen Zellen dienen. Dass diese auch eine bedeutende Rolle während der osteogenen Differenzierung spielen, zeigten Jiang et al. (2007).

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten beinhalten die erste detaillierte Analyse der osteogenen Differenzierung der USSC. Aufgrund des Vergleichs zweier USSC-Linien und die zusätzlichen Analysen der MSC konnten die osteorelevanten Veränderungen von spenderspezifischen Veränderungen abgegrenzt werden. Neben den bekannten osteorelevanten Genen und Signalwegen konnten auch neue differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Vor allem die während der osteogenen Differenzierung vermindert exprimierten Gene bedürfen wegen ihrer potentiell stammzellerhaltenden Wirkung einer weiteren Analyse. In Betracht kommen dabei die Gene DLX2, FOXP1, GATA6 und PLAUR.

### **Analyse der miRNA-Expression**

MiRNAs sind kleine, nicht-proteinkodierende, regulatorische RNAs, die durch Bindung an mRNAs die Translation hemmen können und somit in die Genregulation eingreifen. Die Rolle der miRNAs gewinnt mit der Erforschung ihrer Wirkungsweise in vielen Gebieten zunehmend an Bedeutung, u. a. bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen. Somit lag die Vermutung nahe, dass miRNAs auch in der osteogenen Differenzierung eine Rolle spielen.

Für die Erstellung der miRNA-Profile wurde ein qPCR-Assay verwendet, der 330 verschiedene miRNAs detektiert. Da die RNA der USSC SA479 mit einem Kit isoliert wurde, das die RNA <200 nt nicht anreichert, konnte mit diesen Proben keine miRNA-Analyse durchgeführt werden. Von den restlichen Zelllinien wurde die SA503 zweimal analysiert, um die Reproduzierbarkeit des Assays zu testen.

Das Problem der fehlenden Haushalts-miRNA wurde mit einer globalen Normalisierung gelöst. Bei der Festlegung des Cut-offs musste die Balance zwischen gering exprimierten miRNAs und „Rauschen“ gefunden werden. Unter Berücksichtigung der Menge der Ausgangs-RNA und der Prä-Amplifizierung wurden alle miRNAs mit  $Ct < 35$  für die weiteren Auswertungen berücksichtigt (Abbildung 3.12).

Seit kurzem können einzelne qPCR-Assays für verschiedene Referenz-RNAs kommerziell erworben werden. Für humane Zellen wird die Normalisierung von miRNA-Expressionen auf RNU6B, RNU44, RNU48 oder RNU47 empfohlen. Für diese RNAs wurde eine relativ konstante Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien nachgewiesen (Wong et al., 2007). Die Verwendung dieser Referenz-RNAs kann die globale Normalisierung ersetzen und die Normalisierung vereinfachen. In dieser Arbeit konnte die beschriebene Normalisierung nicht verwendet werden, da der verwendete Assay dies nicht ermöglichte.

Der zunächst ebenfalls untersuchte Zeitpunkt d05 zeigte verglichen mit d01 und d14 erhebliche Diskrepanzen. Ein möglicher Grund ist die Heterogenität der Zellen. Das unterschiedliche Differenzierungspotential der Zellen innerhalb einer Population zeigte sich bereits bei den Alizarinrot-Färbungen, wo bei den Zellen nur teilweise Kalziumanlagerungen nachzuweisen waren. In der Praxis ist es schwierig, die Homogenität einer Zellpopulation zu gewährleisten. Das Einsetzen einzelner Zellen als Ausgangsmaterial ist für die wenigsten Methoden möglich. Der verwendete 300plex-Assay zur Bestimmung der miRNA-Expressionsprofile wurde auf Einzelzellebene getestet (Daten nicht gezeigt). Die Schwankungen der miRNA-Expressionen waren allerdings so erheblich, dass diese Experimente nicht weitergeführt wurden und stattdessen mit der isolierten RNA gearbeitet wurde.

Insgesamt waren 170 miRNAs in mindestens einer Zelllinie an mindestens einem Zeitpunkt exprimiert (Abbildung 3.13). Es war keine eindeutige Tendenz der Anzahl exprimierter miRNAs in differenzierten im Vergleich zu undifferenzierten Proben zu erkennen. Die Differenz der Anzahl exprimierter miRNAs lag bei maximal sechs. Dr. S. Weinhold konnte bei der Analyse der miRNA-Profile verschiedener Zellen der Hämatopoiese eine klare Abnahme der Anzahl exprimierter miRNAs mit zunehmender Differenzierung feststellen (Dissertation S. Weinhold (2007)).

---

Die doppelte Messung der miRNA-Expression in SA503 zeigte zum Teil gegenläufige Werte der differentiell exprimierten miRNAs. Wie bei den globalen Genexpressionsanalysen hängt auch hier die relative Expression von den Werten der undifferenzierten Zellen ab. Bei unterschiedlichen Effizienzen der Reversen Transkription, Prä-PCR oder qPCR ändert sich die relative Expression. Von den in gleicher Weise differentiell exprimierten miRNAs in beiden Ansätzen konnten einige in MSC und DH1 bestätigt werden. Da die DH1 nicht mehr als Nierentumorstammzelle gilt, wurden die Ergebnisse zum Teil getrennt betrachtet und hauptsächlich miRNAs herausgefiltert, die in SA503 und MSC differentiell exprimiert sind. Darunter befanden sich miRNAs, die mit osteogener Differenzierung erhöht oder vermindert exprimiert werden. Das Cluster der miRNA-Profile von SA503 und MSC zeigt, dass diese zwei Zelllinien eine Ähnlichkeit von nur 32 % haben. Diese Analyse ist auf die Expression von 170 miRNAs beschränkt und die Ähnlichkeit der Proben würde bei der Analyse aller 330 miRNAs deutlich ansteigen.

Zu den vermindert exprimierten miRNAs gehören miR-135a, miR-135b, miR-140, miR-210, miR-224, miR-335 und miR-376a (Tabelle 3.8). Sie sind alle übereinstimmend an Tag 14 differentiell exprimiert. Für Tag 1 konnte keine einheitlich vermindert exprimierte miRNA gezeigt werden. Die Expression von miR-135a, miR-135b, miR-210 und miR-335 konnte in DH1 an Tag 14 bestätigt werden. Palmieri et al. (2007) zeigten acht vermindert exprimierte miRNAs bei der osteogenen Differenzierung von MG63-Zellen. Keine dieser miRNAs in den Osteoblasten-ähnlichen Zellen war übereinstimmend mit den hier gezeigten Daten. In USSC und MSC wurden außerdem sechs erhöht exprimierte miRNAs gefunden (miR-26a, miR-29c, miR-30e, miR-204, miR-328 und miR-483). Von diesen war miR-26a eine von drei miRNAs, die auch in MG63-Zellen erhöht exprimiert waren.

MiRNAs, die während einer Differenzierung vermindert exprimiert werden bzw. komplett abgeschaltet werden, können eine Rolle in der Selbsterneuerung von Stammzellen spielen. In SA503 waren miR-453 und miR-205 in undifferenzierten Zellen stärker exprimiert als in den osteogen differenzierten Zellen, während diese miRNAs in MSC und DH1 zu keinem Zeitpunkt exprimiert waren. MiR-453 ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Bei Mäusen wurde eine erhöhte miR-205-Expression in epithelialen Progenitorzellen in der Brust nachgewiesen (Ibarra et al., 2007). Diese Zellen können sich selbst erneuern und bestätigen damit eine potentielle Rolle von miR-205 bei der Erhaltung von Stammzellen. Außer in

Ösophaguskarzinomen (Feber et al., 2008), wo eine verringerte Expression von miR-205 nachgewiesen wurde, wird miR-205 in verschiedenen Tumoren als erhöht exprimiert beschrieben: im Blasenkarzinom (Gottardo et al., 2007), im Ovarialtumor (Iorio et al., 2007) und in Kopf- und Halstumorzellen (Tran et al., 2007). In Hinblick auf die Theorie der Tumorstammzelle könnte die Expression auch hier auf eine Rolle in der Stammzellerhaltung schließen lassen.

Für ES-Zellen sind miRNAs bekannt, die als stammzellerhaltend gelten. So konnte die Expression von miR-200c, miR-368 und miR-154\* sowie das Cluster von miR-371, -372 und -373 als exklusiv für humane ES-Zellen definiert werden (Suh et al., 2004). Für keine der während der osteogenen Differenzierung vermindert exprimierten und damit potentiell stammzellerhaltenden miRNAs in der vorliegenden Arbeit konnte diese Rolle mit Hilfe der Literatur bestätigt werden. Einige der humanen miRNAs waren lange Zeit nur aufgrund ihrer Homologie zur Maus oder anderen Lebewesen vorhergesagt (Sanger Datenbank). Ein weitreichendes Screening vieler verschiedener humaner Zellen und Gewebe wurde 2007 von Landgraf et al. veröffentlicht. Hier wurden viele der theoretisch vorhergesagten miRNAs tatsächlich detektiert. Trotzdem ist zu den wenigsten humanen miRNAs mehr als ihre eigentliche Existenz veröffentlicht. Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Identifikation tumorspezifischer miRNAs, sodass auch die in der vorliegenden Arbeit differentiell exprimierten miRNAs meist in Zusammenhang mit Tumoren beschrieben sind. Z. B. wurde miR-135b in Darmtumoren als erhöht exprimiert beschrieben (Bandrés et al., 2006). In Ovarialtumoren wurde miR-140 erhöht exprimiert gefunden (Iorio et al., 2007). MiR-29c ist mehrfach im Zusammenhang mit Leukämien beschrieben (Zanette et al., 2007) und miR-376a ist in Bauchspeicheldrüsenkrebs erhöht exprimiert (Lee et al., 2007). Eine Analyse fötaler und adulter Lungengewebe zeigte, dass miR-29c, miR-135b und miR-335 unterschiedlich stark exprimiert sind (Williams et al., 2007). MiR-335 gilt zudem als Metastasen-Suppressor in Brustkrebs (Tavazoie et al., 2008).

Die ersten Veröffentlichungen, die miRNAs in Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung humaner Zellen beschreiben, gab es ab Oktober 2007. Palmieri et al. (2007) beschreiben miR-26a im Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung. Des Weiteren wurde SMAD1 als Zielgen von miR-26a identifiziert (Luzi et al., 2008). Ganz aktuell ist die Veröffentlichung von Wong and Tellam (2008), die miR-26a als Regulator der Myogenese in Mauszellen beschreiben. Somit ist die

differentielle Expression von miR-26a die einzige, die mit der bisher veröffentlichten Literatur in Zusammenhang gebracht werden kann. Das wiederum zeigt die Schwierigkeit der Aufklärung der genauen Funktion bestimmter miRNAs.

Auch bei den miRNA-Analysen erfolgte eine Verifizierung der Daten mit einer unabhängigen Methode. Dazu wurden Northern Blots verwendet. Dass auch miRNAs mit dieser Methode detektiert werden können, zeigte die Detektion von miR-16 (Abbildung 3.14). Aufgrund der mitgeführten Ladekontrolle U6 konnte eine Abnahme der Qualität der smallRNA-Fractionen an Tag 7 und 14 gezeigt werden. Für diese Zeitpunkte waren sowohl die miR-16- als auch die U6-Bande deutlich schwächer, obwohl die gleiche Menge RNA eingesetzt wurde. Offensichtlich ist die RNA-Isolierung mit zunehmender Kalzifizierung für die smallRNA-Fraktion weniger effizient, während bei totalRNA keine Qualitätsverluste zu beobachten waren.

Die deutlichste Erhöhung in der Expression zeigte miR-483. Die differentielle Expression konnte trotz wiederholter Northern Blots ebenso wenig bestätigt werden wie die deutlich verminderte Expression von miR-335. Keine der beiden miRNAs war im Northern Blot detektierbar. Zurzeit werden am ITZ verschiedene Variationen des Northern Blots getestet. Neben der Verwendung von LNA (*locked nucleic acid*)-Oligonukleotiden, die die Spezifität erhöhen sollen (Valoczi et al., 2004), wird eine chemische *Crosslinking*-Methode als Alternative zum UV-*Crosslinking* getestet (Pall et al., 2007). Außerdem erhöht die Verwendung eines Phosphoimagers die Sensitivität weiter.

Die erhöhte Expression von miR-26a während der osteogenen Differenzierung, die schon Palmieri et al. (2007) zeigten, konnte auch mit den bisher verwendeten Bedingungen bestätigt werden.

### **Korrelation der mRNA- und miRNA-Daten**

Da einige miRNAs in Introns proteinkodierender Gene liegen, werden sie mit diesen zusammen transkribiert. Es bedeutet nicht zwangsläufig, dass die miRNA-Vorläufer nach dem Spleißen zu biologisch aktiven miRNAs prozessiert werden. Neun der 13 in der vorliegenden Arbeit differentiell exprimierten miRNAs liegen in Introns und die Expression der dazugehörigen Hostgene in den globalen Genexpressionsanalysen wurde überprüft (Tabelle 8.1). Die wenigsten Hostgene

waren überhaupt auswertbar. Nur für ein Hostgen (MEST) konnte sowohl für USSC als auch für MSC eine gleichgerichtete Expression zur dazugehörigen miR-335 nachgewiesen werden. Ein weiteres Hostgen (IGF2) zeigte in MSC die erhöhte Expression analog zur erhöhten Expression von miR-483, in USSC war IGF2 dagegen unverändert bzw. vermindert exprimiert. Für zwei weitere Hostgene konnte die tendenziell gleichgerichtete Expression gezeigt werden. Auch hier muss beachtet werden, dass aufgrund der Amplifizierung der RNA eine unveränderte Expression im Microarray in qPCRs eventuell eine differentielle Expression zeigt. Prinzipiell konnte aber eine gute Übereinstimmung der miRNA- und ihrer Hostgen-Expression gezeigt werden.

Die Vorhersage der Zielgene von miRNAs ist nicht ohne weiteres möglich. Im September 2007 gab es 71 experimentell nachgewiesene humane miRNA-Zielgen-Interaktionen (Sanger Datenbank). Das ist eine sehr geringe Anzahl, wenn man davon ausgeht, dass jede der 541 humanen miRNAs zwischen 600 und 1700 vorhergesagte Zielgene hat und verdeutlicht gleichzeitig die Schwierigkeit der funktionellen Aufklärung. Diverse Computerprogramme ermöglichen eine *In-silico*-Vorhersage der Bindung der miRNAs an die mRNA. Es stehen aber zu wenig experimentell bestätigte Interaktionen zur Verfügung, um dadurch die Programme zu verbessern und die Vorhersagen treffsicherer zu machen.

Trotzdem ist mit diesen Programmen eine Grundlage für funktionelle Analysen vorhanden, die auch in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde. Da ein mRNA-Abbau nach miRNA-Bindung nicht ausgeschlossen ist und die veränderten mRNA-Level durchaus in Microarray-Experimenten gezeigt werden können (siehe Kapitel 1.3), wurden die vorliegenden Daten der globalen Genexpressionsanalyse und miRNA-Profile miteinander verglichen. Dazu wurden die Vorhersagen nach Miranda (John et al., 2004) verwendet. Für die 13 während der osteogenen Differenzierung differentiell exprimierten miRNAs waren wie erwartet relativ wenige vorhergesagte Gene (zwischen 4 und 15) in USSC und MSC in den Microarray-Experimenten differentiell exprimiert (Tabelle 8.2). Da miRNAs die Translation negativ regulieren, vermindert sich der mRNA-Level bzw. die Protein-Expression mit steigender miRNA-Expression. Filtert man die Daten nach den Interaktionen, bei denen mRNA und miRNA gegenläufig differentiell exprimiert sind, bleiben 17 übrig, wenn man berücksichtigt, dass sowohl für USSC als auch für MSC diese Bedingung erfüllt sein

muss (Vergleich Tabelle 3.10). Einige dieser Gene sind in der Literatur in Zusammenhang mit osteogener Differenzierung beschrieben worden. PTX3 wurde in der Differenzierung zu Osteoblasten und Adipozyten als erhöht exprimiert beschrieben (Chiellini et al., 2008). Es wird aber auch in neuraler Differenzierung erhöht exprimiert (Zeng et al., 2004). GADD45B-defiziente Mäuse zeigten eine nicht-funktionierende Mineralisierung und vermindertes Knochenwachstum (Ijiri et al., 2005). Eine erhöhte RAMP1-Expression in Osteoblasten wurde von Uzan et al. (2004) gezeigt. Die Rolle von GATA6 in Differenzierungen wurde bereits diskutiert.

Dass diese Auflistung keine der typischen Osteomarker enthält, liegt daran, dass fast keine davon in den Microarray-Experimenten auswertbar waren, weil die Signale für diese Gene zu niedrig waren.

Auf Grund dieser Analysen wurde die potentielle Interaktion zwischen miR-26a als in der Literatur beschriebene osteorelevante miRNA und GATA6, einem in der Differenzierung wichtigen Regulator, in funktionellen Analysen genauer untersucht.

### **Funktionelle Analysen**

Um die Bindung einer miRNA an den 3' untranslatierten Bereich (3'-UTR) einer mRNA zu verifizieren, wird üblicherweise ein Luciferase-Assay verwendet. Dieser musste für die hier benötigte Anwendung zunächst etabliert werden. Dazu wird der relevante Teil des 3'-UTR einer mRNA-Sequenz mit der vorhergesagten miRNA-Bindestelle in den 3'-UTR einer Luciferase in einem entsprechenden Vektor kloniert. Bindet die miRNA, spiegelt sich diese Interaktion in einer verminderten relativen Luciferaseaktivität wider. Dazu wird zusätzlich die entsprechende miRNA in den Zellen überexprimiert. Dies erfolgte u. a. durch die Transfektion der miR-26a-Vorläufer. Die Optimierung erfolgte mit einem kommerziellen Kit, das den PTK9-mRNA-Abbau durch Interaktion mit miR-1 ausnutzt, um sowohl Menge des Transfektionsmittels als auch Menge der miRNA-Vorläufer anpassen zu können. Die Vorversuche zeigten, dass eine Konzentration von 50 nM an miR-1-Vorläufern die Menge an PTK9-mRNA um fast die Hälfte reduziert, sodass diese Konzentration für die ersten Luciferase-Assays verwendet wurde (Abbildung 3.15). Die Kontrollen (*Nonsense*/NS-Vorläufer) zeigten wie erwartet keinen Effekt auf den mRNA-Level

und wurden auch in allen Luciferase-Assays als Kontrollen mitgeführt. Greco und Rameshwar (2007) verwendeten bei ihren Experimenten die gleichen Vektoren und das gleiche Kit zur Messung der Luciferaseaktivität. Sie setzten 200 ng pro Vektor ein, sodass diese Menge als Anhaltspunkt für die ersten Versuche gewählt wurde.

Variabel sind bei diesen Versuchen die Inkubationszeiten, sowohl zwischen den Transfektionen der miRNA-Vorläufer und der Vektoren als auch vor der Messung der Luciferaseaktivität. Der Vorteil des verwendeten Kits zur Messung der Luciferaseaktivität war, dass dasselbe Aliquot der Proben zur Messung der Aktivität der Luciferase und der  $\beta$ -Galactosidase als Referenz verwendet wird. Dadurch werden Pipettierungenauigkeiten und eine Proteinbestimmung zur Normierung als Fehlerquelle ausgeschlossen.

Die Verifizierung der Interaktion von miR-26a und GATA6 wurde sowohl in HeLa- als auch in 293T-Zellen getestet. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Vorläufer (10-200 nM) und Vektoren (20-200 ng) eingesetzt (Tabelle 3.11). Außerdem wurden beide Inkubationszeiten variiert. Trotzdem zeigte keiner dieser Versuche eine mehr als 20%ige Verringerung der relativen Luciferaseaktivität verglichen mit dem leerem Luciferasevektor oder Transfektion mit NS-Vorläufern bzw. leerem pCL5EG-Vektor (Abbildung 3.16). Eine Interaktion zwischen miR-26a und GATA6 kann daher trotz *In-silico*-Vorhersage ausgeschlossen werden, was die Limitierung dieser Vorhersagen zeigt. Nakamoto et al. (2005) isolierten die Polyribosom-Fraktion aus Zellen nach miR-30a-3p-Überexpression, um die Zielgene dieser miRNA zu identifizieren. Der Vergleich der gefundenen Zielgene mit den Genen, die verschiedene Computerprogramme vorhersagten, zeigte, dass die wenigsten in den *In-silico*-Vorhersagen auftauchen. Das verdeutlicht die Komplexität der miRNA-Regulation und Schwierigkeit der Vorhersage der Zielgene. Eine weitere Möglichkeit, Zielgene von miRNAs zu identifizieren, ist die Immunopräzipitation mit Ago-Antikörpern (Beitzinger et al., 2007; Easow et al., 2007 und Karginov et al., 2007). Die an Ago gebundenen mRNAs werden copräzipitiert und die Gene mittels Klonierung oder Microarray identifiziert. Die ermittelten Zielgene zeigen zum Teil sehr gute Übereinstimmungen mit den *In-silico*-Vorhersagen. Dieser neue, biochemische Ansatz kann die Ermittlung der Zielgene vereinfachen und beschleunigen. Damit wiederum könnten durch genügend nachgewiesene miRNA-mRNA-Interaktionen die Algorithmen der Computerprogramme und somit die *In-silico*-Vorhersagen verbessert werden.

---

## miRNA-Überexpression

Um die Funktion von miRNAs genauer zu untersuchen, sind zwei prinzipielle Vorgehensweisen möglich: *Knock-out*- und Überexpressionsexperimente. Die Hemmung kann mit chemisch modifizierten *Antisense*-Oligonukleotiden erfolgen (Hutvagner et al., 2004). Diese Methode kann auch *in vivo* in Mäusen angewendet werden (Krutzfeldt et al., 2005). Auch die stabile Inhibierung von miRNAs ist durch lentivirale Expression von *Antisense*-miRNAs möglich (Scherr et al., 2007).

Eine miRNA-Überexpression kann durch transiente Transfektion von miRNA-Vorläufern erfolgen, wie es auch in der vorliegenden Arbeit für die Luciferase-Assays durchgeführt wurde. Um die Rolle von miR-26a in der osteogenen Differenzierung zu untersuchen, sollte diese miRNA stabil überexprimiert werden. Dazu wurde zunächst ein foamyvirales System etabliert. Da miRNAs in der Natur von Typ II-Polymerasen transkribiert werden, wurde ein Vektor mit Pol-II-Promotor gewählt (pCL5EG). Dieser Vektor enthält außerdem das Gen für EGFP, das die Detektion infizierter Zellen erleichtert (Abbildung 2.4). In den Vektor wurde der natürlich vorkommende miR-26a-*Stemloop* kloniert und die miR-26a-Expression in HeLa-Zellen nach optimierter transienter Transfektion mittels miRNA-qPCR überprüft. Um einen Einfluss der Transfektion auf die Zellen auszuschließen, wird in jedem Experiment parallel der leere Vektor zur Kontrolle transfiziert. 48 h nach Transfektionsbeginn war eine deutlich erhöhte Expression von miR-26a nachweisbar (Abbildung 3.17). Die relative Expression lag je nach Menge des Transfektionsmittels bei 6-8fach bezogen auf Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert wurden. Diese transiente Transfektion zeigte, dass die Überexpression von miR-26a mit diesem Vektor funktioniert und der Vektor für stabile Überexpressionen verwendet werden kann.

Die Herstellung der viralen Überstände erfolgte nach einem Standardprotokoll mit 293T-Zellen. Auch hier wurde zur Kontrolle parallel der leere Vektor infiziert. Die viralen Überstände wurden zunächst in verschiedenen Konzentrationen an HeLa-Zellen getestet. Eine erste Begutachtung der Zellen unter dem Mikroskop zeigte grünfluoreszierende Zellen, d. h. die Expression des im Vektor lokalisierten EGFP (Abbildung 3.18). Die unterschiedlich starke Fluoreszenz in den einzelnen Zellen ließ darauf schließen, dass der Vektor zum Teil mehrfach integriert wurde. Um den Teil der transfizierten Zellen zu quantifizieren, wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt (Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20).

Erwartungsgemäß stieg der Anteil lebender Zellen mit abnehmender Viruskonzentration. Im Histogramm ließ sich eine Population EGFP-positiver Zellen definieren, die sich von den nicht transfizierten Zellen abgrenzte. Der Anteil der positiven Zellen sank wie erwartet mit abnehmender Viruskonzentration. Bei viralen Transfektionen muss immer die optimale Konzentration der Virusüberstände bestimmt werden, wo möglichst wenig Zellen sterben, aber möglichst viele Zellen infiziert werden. Höhere Konzentrationen fördern zudem Mehrfachintegrationen ins Genom, wie bei der Infektion der HeLa-Zellen deutlich wurde. Das Histogramm zeigt deutlich, dass bei der Original-Viruskonzentration mehr Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität gezählt wurden als bei den Virusverdünnungen.

Der Nachweis grünfluoreszierender Zellen nach der Infektion zeigte, dass EGFP in den Zellen exprimiert wird. Um die Expression von miR-26a und damit die Expression und korrekte Prozessierung des miR-26a-*Stemloops* nachzuweisen, wurden qPCRs durchgeführt. Zehn Tage nach Infektion war mit der Original-Viruskonzentration eine vierfache Überexpression von miR-26a detektierbar, sodass auch die stabile Überexpression nachweisbar war (Abbildung 3.21).

Mit diesem etablierten System sollte miR-26a nun in USSC SA503 überexprimiert werden. Parallel wurden erneut HeLa-Zellen infiziert mit Virusüberständen, die zwischenzeitlich aliquotiert bei -80 °C gelagert wurden. Der Anteil EGFP-positiver Zellen war ähnlich wie im vorhergehenden Experiment. Trotzdem zeigten die HeLa-Zellen nach neun Tagen Kultivierung nur eine 2,6fache Überexpression. Dieser Unterschied zeigt, dass die Virus-Überstände immer frisch hergestellt werden sollten.

Für die USSC wurden weniger hohe Virus-Konzentrationen verwendet als für HeLa-Zellen, da USSC allgemein empfindlicher sind und in anderen Experimenten bei USSC auch mit höheren Virusverdünnungen gute Effizienzen erreicht wurden (Gregor von Levetzow, persönliche Mitteilung). Die durchflusszytometrischen Analysen der USSC zeigten einen sehr hohen Anteil toter Zellen in allen Proben, sodass eine Quantifizierung EGFP-positiver Zellen innerhalb der lebenden Zellen nicht sinnvoll erschien. Das zeigte die Empfindlichkeit der Zellen im Zuge der Vorbereitung für die Messungen, da die Zellen bei der mikroskopischen Begutachtung der Zellen vor dem Ernten nicht auffällig waren. Nach weiteren 16 Tagen Kultivierung wurden die Zellen geteilt und durchflusszytometrisch analysiert

bzw. für die RNA-Isolierung lysiert. Der Anteil EGFP-positiver Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation lag bei 27,1 % für pCL5EG bzw. 32 % für pCL5EG-miR-26a.

Die qPCR-Messungen ergaben, dass in den pCL5EG-miR-26a-infizierten Zellen miR-26a 1,7fach überexprimiert war. Dieser geringe Wert kann unter anderem auf die Verwendung tiefgefrorener Virusüberstände zurückgeführt werden, analog zu den Ergebnissen in HeLa-Zellen.

Mit dieser RNA aus USSC wurden zudem globale Genexpressionsanalysen durchgeführt. Verglichen wurden die pCL5EG-miR-26a-infizierten Zellen mit Zellen, die mit dem leeren pCL5EG-Vektor transfiziert wurden. Die Amplifizierung und Auswertung erfolgte wie bei allen anderen Experimenten. Mit 6398 Genen waren weniger Gene auswertbar als bei den osteogen differenzierten Zellen. Zudem waren nur sehr wenige Gene differentiell exprimiert. Jeweils 61 Gene zeigten in pCL5EG-miR-26a-infizierten USSC eine erhöhte bzw. verringerte Expression. Von den verändert exprimierten Genen waren nur zwei Gene, für die eine Bindung von miR-26a vorhergesagt wird. Überraschend war die deutliche Expressionsveränderung des miR-26a-*Stemloops*. Die fast neunfache Überexpression lag deutlich über den Werten der anderen differentiell exprimierten Gene. Da miRNAs wie proteinkodierende Gene zunächst polyadenyliert werden, werden sie auch im Zuge der Probenvorbereitung für die globalen Genexpressionsanalysen mit amplifiziert. Dieses Ergebnis steht allerdings im Widerspruch mit der nur 1,7fachen Überexpression der biologisch aktiven miRNA, die in den qPCRs detektiert wird. Das zeigt, dass die miR-26a-Vorläufer zwar überexprimiert werden, diese aber entweder nicht zu reifen miRNAs prozessiert werden oder die Expression der reifen miRNA aktiv gehemmt wird. Mechanismen dazu sind in der Literatur bisher nicht bekannt.

Da in HeLa-Zellen zehn Tage nach Infektion eine deutliche miR-26a-Überexpression nachweisbar war, kann auch die lange Kultivierung der USSC über 16 Tage einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Offensichtlich ist es nicht ohne weiteres möglich, miRNAs permanent über einen längeren Zeitraum zu überexprimieren, ohne dass die Zelle aktiv darauf reagiert. Dieses Problem könnte mit regulierbaren Vektoren gelöst werden. Enthält der verwendete Vektor ein tet-Operon, kann durch parallele Infektion eines Repressorvektors die Expression von EGFP und der miRNA gehemmt werden, bis diese Repression durch Zugabe von Doxycyclin ins Medium aufgehoben wird (Wiznerowicz and Trono, 2003). So

könnten die Zellen expandiert werden, ohne dass die miRNA bereits überexprimiert wird.

Die Expression von GATA6, das wegen seiner verringerten Expression während der osteogenen Differenzierung und der vorhergesagten Bindestelle für miR-26a zunächst auffällig war, war unverändert. Dieses Ergebnis wurde durch qPCRs bestätigt und widerlegt parallel zu den durchgeführten Luciferase-Assays einen Zusammenhang der GATA6- und miR-26a-Expression.

Die osteogene Induktion der infizierten USSC zeigte nach 18 Tagen eine deutliche Rotfärbung als Nachweis der Kalziumanlagerungen (Abbildung 3.22). Die zur Kontrolle nicht DAG-induzierten Zellen zeigten keine Rotfärbung. Die virale Transfektion führt also nicht zum Verlust der Fähigkeit, osteogen differenzieren zu können. Da die Überexpression biologisch aktiver miR-26a über einen längeren Zeitraum nicht möglich war, kann die Frage, ob die miR-26a-Überexpression alleine ausreicht, eine osteogene Differenzierung zu induzieren, nicht beantwortet werden. Andererseits hat die foamyvirale Infektion allein nicht zur Folge, dass die Zellen spontan osteogen differenzieren, sodass das etablierte System grundsätzlich geeignet ist.

### **Ausblick**

Die in den globalen Genexpressionsanalysen vermindert exprimierten proteinkodierenden Gene können auf ihre Rolle bei der Erhaltung des undifferenzierten Zustandes der Zellen getestet werden. Durch *Knock-out*- oder Überexpressions-Analysen kann die Bedeutung dieser Gene weiter aufgeklärt werden.

Um die Rolle von miRNAs in der osteogenen Differenzierung weiter aufzuklären, sollten die funktionellen Analysen weitergeführt werden. Dabei sollten weitere Kombinationen von miRNAs und Zielgenen in Luciferase-Assays untersucht werden. Des Weiteren sollte das System der miRNA-Überexpression um die Regulation erweitert werden, um die Überexpression biologisch aktiver miRNAs zu erreichen, nachdem die Zellen ausreichend expandiert wurden. Mit diesem System können dann miRNAs überexprimiert werden, die während der osteogenen Differenzierung verändert exprimiert gefunden wurden. Die erhöht exprimierten Gene sollten auf ihre Fähigkeit der Induktion der osteogenen Differenzierung ohne DAG

geprüft werden. Bei vermindert exprimierten miRNAs könnte die potentielle stammzellerhaltende Wirkung getestet werden. Nach Überexpression dieser miRNAs sollten die Zellen nicht mehr in der Lage sein, osteogen zu differenzieren.

Außerdem kann die Tatsache der überexprimierten miRNA-Vorläufer, aber nicht prozessierten reifen miRNA bzw. die Gegenregulation der Zellen genauer untersucht werden, um den Syntheseweg der miRNAs und dessen Regulation weiter aufzuklären.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die osteogene Differenzierung unterliegt einem komplizierten Regulationsmechanismus. Trotz Identifikation einiger Transkriptionsfaktoren und osteospezifischer Markergene ist die Regulation nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurden daher umfassende globale Genexpressionsanalysen osteogen differenzierter Stammzellen durchgeführt. Verwendet wurden dafür Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (USSC), mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC) und eine potentielle Nierentumorstammzelllinie. Die erhaltenen Daten wurden mittels qPCR verifiziert, wobei eine gute Übereinstimmung gezeigt werden konnte. Neben den bekannten osteospezifischen Genen wurden weitere potentiell stammzellerhaltende Gene identifiziert (DLX2, FOXP1, GATA6 und PLAUR).

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht-proteinkodierende RNAs, die die Proteinexpression durch Bindung an den 3'-untranslatierten Bereich der mRNA negativ regulieren können. Das kann entweder über RNA-Abbau oder Hemmung der Translation geschehen. Von den wenigsten der 541 humanen miRNAs ist die genaue Funktion bekannt. Jedoch werden einige miRNAs im Zusammenhang mit Entwicklung, Proliferation und Differenzierung von Zellen bzw. der Deregulation von miRNAs in diversen Krankheiten beschrieben. Um die mögliche Rolle von miRNAs während der osteogenen Differenzierung genauer zu untersuchen, wurden daher miRNA-Expressionsprofile der osteogen differenzierten Zellen mittels miRNA-qPCR erstellt. Diese Analysen ergaben insgesamt 13 differentiell exprimierte miRNAs, wovon sieben miRNAs im Laufe der osteogenen Differenzierung vermindert und sechs erhöht exprimiert waren. Über *In-silico*-Zielgenvorhersagen wurden die globalen Genexpressionsanalysen und die miRNA-Expressionsprofile auf potentielle mRNA-miRNA-Interaktionen überprüft, die in mRNA-Abbau resultiert – es wurden 17 übereinstimmende Resultate gefunden. Für die funktionelle Analyse dieser Interaktionen wurde zunächst ein Luciferaseassay etabliert. Die vorhergesagte Bindung von miR-26a an das differenzierungsrelevante Gen GATA6 konnte allerdings nicht bestätigt werden, was die Limitierung dieser computergestützten Vorhersagen verdeutlicht.

Um die Rolle von miRNAs in der osteogenen Differenzierung weitergehend untersuchen zu können, wurde ein System zur Überexpression von miRNAs etabliert. Das System kann für transiente und stabile Überexpressionen verwendet werden. Es wurde deutlich, dass miRNAs nicht unbegrenzt überexprimiert werden können und nach ca. drei Wochen nur noch die Überexpression der miRNA-Vorläufer nachweisbar war, während die Expression der biologisch aktiven miRNA nur leicht erhöht war.

## 6 SUMMARY

The osteogenic differentiation is subject to a complex mechanism of regulation. Despite the identification of some relevant transcription factors and osteogenic specific genes, the whole regulation is not yet fully understood.

Therefore, in this thesis extensive global gene expression analyses of osteogenic differentiated stem cells were made. Unrestricted somatic stem cells from cord blood (USSC), mesenchymal stem cells from bone marrow (MSC), and a potential renal tumour stem cell line were used. The results from these experiments were verified using qPCR which showed a good overall correlation. In addition to the known osteo-specific genes also new potentially stem cell renewing genes were identified (DLX2, FOXP1, GATA6 and PLAUR).

MicroRNAs (miRNAs) are small, noncoding RNAs which negatively regulate protein expression by binding to the 3' untranslated region of mRNAs. The mRNAs can then either be cleaved or translation can be inhibited. Only a few out of the 541 human miRNAs have a known biological function. However, miRNAs were found to be linked to many biological processes such as development, proliferation, and differentiation of cells as well as to deregulation in multiple diseases like cancer. To further examine the possible role of miRNAs in osteogenic differentiation, miRNA expression profiles of the same osteogenic differentiated cells were determined using miRNA-qPCR. These data showed 13 differentially expressed miRNAs of which seven were downregulated and six were upregulated during osteogenic differentiation.

Using *in silico* target prediction, global gene expression analyses and miRNA expression profiles were screened for potential mRNA-miRNA interactions which led to mRNA cleavage – 17 consistent results were found. To validate these mRNA-miRNA interactions a luciferase assay was established. However, the predicted binding of miR-26a to the differentiation relevant gene GATA6 could not be confirmed which demonstrated the limitations of these computer based predictions.

To further investigate the role of miRNAs during osteogenic differentiation, a system for overexpressing miRNAs was established. It can be used for both transient and stable overexpression. It became apparent that miRNA overexpression is temporary. After approximately three weeks only miRNA precursor were detected while expression of biological active miRNAs was only slightly increased.

---

## 7 LITERATUR

### Verwendete Internetseiten

- w1 <http://www.bmbf.de/pub/stammzellgesetz.pdf>  
w2 [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)  
w3 [www.genome.ad.jp/kegg/](http://www.genome.ad.jp/kegg/)

- Ailles L. E. and Weissman I. L. (2007) Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 18: 460-6
- Alexandrovich A., Qureishi A., Coudert A. E., Zhang L., Grigoriadis A. E., Shah A. M., Brewer A. C. and Pizzey J. A. (2008) A role for GATA-6 in vertebrate chondrogenesis. *Dev Biol* 314: 457-70
- Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J. and Clarke M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983-8
- Andrews P. W., Matin M. M., Bahrami A. R., Damjanov I., Gokhale P. and Draper J. S. (2005) Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 33: 1526-30
- Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M. and Sherlock G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-9
- Assady S., Maor G., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Skorecki K. L. and Tzukerman M. (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 50: 1691-7.
- Astedt B., Lindoff C. and Lecander I. (1998) Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy. *Semin Thromb Hemost* 24: 431-5
- Aubin J. E. and Triffitt J. T. (2002) *Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation*. Principles of Bone Biology Academic Press, 59-82
- Bach S. P., Renehan A. G. and Potten C. S. (2000) Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21: 469-76
- Bandres E., Cubedo E., Agirre X., Malumbres R., Zarate R., Ramirez N., Abajo A., Navarro A., Moreno I., Monzo M. and Garcia-Foncillas J. (2006) Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 5: 29
- Beitzinger M., Peters L., Zhu J. Y., Kremmer E. and Meister G. (2007) Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* 4: 76-84
- Bernstein E., Kim S. Y., Carmell M. A., Murchison E. P., Alcorn H., Li M. Z., Mills A. A., Elledge S. J., Anderson K. V. and Hannon G. J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35: 215-7
- Bhatia M., Wang J. C., Kapp U., Bonnet D. and Dick J. E. (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5320-5
- Bianco P., Fisher L. W., Young M. F., Termine J. D. and Robey P. G. (1991) Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 49: 421-6
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S. and Robey P. G. (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-92

- 
- Bieback K., Kern S., Kluter H. and Eichler H. (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22: 625-34
- Bielby R. C., Boccaccini A. R., Polak J. M. and Buttery L. D. (2004) In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 10: 1518-25
- Boelens M. C., te Meerman G. J., Gibcus J. H., Blokzijl T., Boezen H. M., Timens W., Postma D. S., Groen H. J. and van den Berg A. (2007) Microarray amplification bias: loss of 30% differentially expressed genes due to long probe - poly(A)-tail distances. *BMC Genomics* 8: 277
- Bonnet D. and Dick J. E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-7
- Bonucci E. and Nanci A. (2001) Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone. *Ital J Anat Embryol* 106: 129-33
- Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C. A., Causton H. C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F. C., Kim I. F., Markowitz V., Matese J. C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J. and Vingron M. (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29: 365-71
- Bruder S. P., Fink D. J. and Caplan A. I. (1994) Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56: 283-94
- Bruder S. P., Jaiswal N., Ricalton N. S., Mosca J. D., Kraus K. H. and Kadiyala S. (1998) Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*: S247-56
- Cai X., Hagedorn C. H. and Cullen B. R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-66
- Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F. and Croce C. M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15524-9
- Calin G. A., Sevignani C., Dumitru C. D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M. and Croce C. M. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2999-3004
- Carpenter M. K., Inokuma M. S., Denham J., Mujtaba T., Chiu C. P. and Rao M. S. (2001) Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 172: 383-97
- Chambers T. J. (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 192: 4-13
- Chen C. Z. (2005) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 353: 1768-71
- Chen K. and Rajewsky N. (2007) The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 8: 93-103
- Chiellini C., Cochet O., Negrini L., Samson M., Poggi M., Ailhaud G., Alessi M. C., Dani C. and Amri E. Z. (2008) Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol* 9: 26
- Chung U. I., Schipani E., McMahon A. P. and Kronenberg H. M. (2001) Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 107: 295-304
- Ciafre S. A., Galardi S., Mangiola A., Ferracin M., Liu C. G., Sabatino G., Negrini M., Maira G., Croce C. M. and Farace M. G. (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1351-8
- Clarke M. F., Dick J. E., Dirks P. B., Eaves C. J., Jamieson C. H., Jones D. L., Visvader J., Weissman I. L. and Wahl G. M. (2006) Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339-44
-

- 
- Coles B. L., Angenieux B., Inoue T., Del Rio-Tsonis K., Spence J. R., McInnes R. R., Arsenijevic Y. and van der Kooy D. (2004) Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15772-7
- Collins A. T., Berry P. A., Hyde C., Stower M. J. and Maitland N. J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946-51
- Conget P. A. and Minguell J. J. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67-73
- Dabney A. R. and Storey J. D. (2007) A new approach to intensity-dependent normalization of two-channel microarrays. *Biostatistics* 8: 128-39
- Dalerba P., Dylla S. J., Park I. K., Liu R., Wang X., Cho R. W., Hoey T., Gurney A., Huang E. H., Simeone D. M., Shelton A. A., Parmiani G., Castelli C. and Clarke M. F. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10158-63
- Dawn B. and Bolli R. (2005) Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol* 100: 494-503
- Day T. F., Guo X., Garrett-Beal L. and Yang Y. (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8: 739-50
- Delany A. M., Kalajzic I., Bradshaw A. D., Sage E. H. and Canalis E. (2003) Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology* 144: 2588-96
- Dexter T. M. (1979) Haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. A review. *Acta Haematol* 62: 299-305
- Dezawa M., Kanno H., Hoshino M., Cho H., Matsumoto N., Itokazu Y., Tajima N., Yamada H., Sawada H., Ishikawa H., Mimura T., Kitada M., Suzuki Y. and Ide C. (2004) Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113: 1701-10
- Dobbin K. K., Kawasaki E. S., Petersen D. W. and Simon R. M. (2005) Characterizing dye bias in microarray experiments. *Bioinformatics* 21: 2430-7
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. and Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7
- Draghici S., Khatri P., Eklund A. C. and Szallasi Z. (2006) Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet* 22: 101-9
- Duftner N., Larkins-Ford J., Legendre M. and Hofmann H. A. (2008) Efficacy of RNA amplification is dependent on sequence characteristics: implications for gene expression profiling using a cDNA microarray. *Genomics* 91: 108-17
- Easow G., Teleman A. A. and Cohen S. M. (2007) Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA* 13: 1198-204
- Eisen M. B., Spellman P. T., Brown P. O. and Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-8
- Eramo A., Lotti F., Sette G., Pilozzi E., Biffoni M., Di Virgilio A., Conticello C., Ruco L., Peschle C. and De Maria R. (2007) Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 30: 30
- Erdo F., Buhrle C., Blunk J., Hoehn M., Xia Y., Fleischmann B., Focking M., Kustermann E., Kolossov E., Hescheler J., Hossmann K. A. and Trapp T. (2003) Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 780-5
- Esau C., Kang X., Peralta E., Hanson E., Marcusson E. G., Ravichandran L. V., Sun Y., Koo S., Perera R. J., Jain R., Dean N. M., Freier S. M., Bennett C. F., Lollo B. and Griffey R. (2004) MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279: 52361-5
-

- 
- Evans M. J. and Kaufman M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6
- Fazi F., Rosa A., Fatica A., Gelmetti V., De Marchis M. L., Nervi C. and Bozzoni I. (2005) A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 123: 819-31
- Feber A., Xi L., Luketich J. D., Pennathur A., Landreneau R. J., Wu M., Swanson S. J., Godfrey T. E. and Little V. R. (2008) MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 135: 255-60
- Felsenberg D. (2001) Struktur und Funktion des Knochens. *Pharm Unserer Zeit* 30: 488-94
- Franceschi R. T., Xiao G., Jiang D., Gopalakrishnan R., Yang S. and Reith E. (2003) Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 44: 109-16
- Frank O., Heim M., Jakob M., Barbero A., Schafer D., Bendik I., Dick W., Heberer M. and Martin I. (2002) Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 85: 737-46
- Friedenstein A. J., Petrakova K. V., Kurolesova A. I. and Frolova G. P. (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-47
- Friedman M. S., Long M. W. and Hankenson K. D. (2006) Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 98: 538-54
- Fujikawa T., Oh S. H., Pi L., Hatch H. M., Shupe T. and Petersen B. E. (2005) Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol* 166: 1781-91
- Giraldez A. J., Cinalli R. M., Glasner M. E., Enright A. J., Thomson J. M., Baskerville S., Hammond S. M., Bartel D. P. and Schier A. F. (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308: 833-8
- Gottardo F., Liu C. G., Ferracin M., Calin G. A., Fassan M., Bassi P., Seignani C., Byrne D., Negrini M., Pagano F., Gomella L. G., Croce C. M. and Baffa R. (2007) Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 25: 387-92
- Greco S. J. and Rameshwar P. (2007) MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15484-9
- Guillot P. V., O'Donoghue K., Kurata H. and Fisk N. M. (2006) Fetal stem cells: betwixt and between. *Semin Reprod Med* 24: 340-7
- Halgren R. G., Fielden M. R., Fong C. J. and Zacharewski T. R. (2001) Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 29: 582-8
- Harris S. E., Guo D., Harris M. A., Krishnaswamy A. and Lichtler A. (2003) Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors. *Front Biosci* 8: s1249-65
- He L., Thomson J. M., Hemann M. T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S. W., Hannon G. J. and Hammond S. M. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828-33
- Herrera M. B., Bruno S., Buttiglieri S., Tetta C., Gatti S., Deregibus M. C., Bussolati B. and Camussi G. (2006) Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 24: 2840-50
- Horwitz E. M., Prockop D. J., Fitzpatrick L. A., Koo W. W., Gordon P. L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J. C., Pyeritz R. E. and Brenner M. K. (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5: 309-13
- Houbaviy H. B., Murray M. F. and Sharp P. A. (2003) Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5: 351-8
-

- 
- Hu H., Hilton M. J., Tu X., Yu K., Ornitz D. M. and Long F. (2005) Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132: 49-60
- Huang da W., Sherman B. T., Tan Q., Kir J., Liu D., Bryant D., Guo Y., Stephens R., Baseler M. W., Lane H. C. and Lempicki R. A. (2007) DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res* 35: W169-75
- Huang W., Carlsen B., Rudkin G., Berry M., Ishida K., Yamaguchi D. T. and Miller T. A. (2004) Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone* 34: 799-808
- Hutvagner G., Simard M. J., Mello C. C. and Zamore P. D. (2004) Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2: E98
- Ibarra I., Erlich Y., Muthuswamy S. K., Sachidanandam R. and Hannon G. J. (2007) A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev* 21: 3238-43
- Ijiri K., Zerbini L. F., Peng H., Correa R. G., Lu B., Walsh N., Zhao Y., Taniguchi N., Huang X. L., Otu H., Wang H., Wang J. F., Komiya S., Ducey P., Rahman M. U., Flavell R. A., Gravallese E. M., Oettgen P., Libermann T. A. and Goldring M. B. (2005) A novel role for GADD45beta as a mediator of MMP-13 gene expression during chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* 280: 38544-55
- Iorio M. V., Visone R., Di Leva G., Donati V., Petrocca F., Casalini P., Taccioli C., Volinia S., Liu C. G., Alder H., Calin G. A., Menard S. and Croce C. M. (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67: 8699-707
- Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I. and Bruder S. P. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64: 295-312
- Jankovic V., Ciarrocchi A., Boccuni P., DeBlasio T., Benezra R. and Nimer S. D. (2007) Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1260-5
- Jiang J. X., Siller-Jackson A. J. and Burra S. (2007) Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci* 12: 1450-62
- Johansson C. B., Momma S., Clarke D. L., Risling M., Lendahl U. and Frisen J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25-34
- John B., Enright A. J., Aravin A., Tuschl T., Sander C. and Marks D. S. (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2: e363
- Jopling C. L., Yi M., Lancaster A. M., Lemon S. M. and Sarnow P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309: 1577-81
- Kamnasaran D. and Guha A. (2005) Expression of GATA6 in the human and mouse central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 160: 90-5
- Kang S., Bennett C. N., Gerin I., Rapp L. A., Hankenson K. D. and Macdougald O. A. (2007) Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 282: 14515-24
- Kaposi-Novak P., Lee J. S., Mikaelyan A., Patel V. and Thorgeirsson S. S. (2004) Oligonucleotide microarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. *Biotechniques* 37: 580-8
- Karginov F. V., Conaco C., Xuan Z., Schmidt B. H., Parker J. S., Mandel G. and Hannon G. J. (2007) A biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19291-6
- Karube Y., Tanaka H., Osada H., Tomida S., Tatematsu Y., Yanagisawa K., Yatabe Y., Takamizawa J., Miyoshi S., Mitsudomi T. and Takahashi T. (2005) Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 96: 111-5
- Kasashima K., Nakamura Y. and Kozu T. (2004) Altered expression profiles of microRNAs during TPA-induced differentiation of HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 403-10
-

- 
- Kim H. K., Lee Y. S., Sivaprasad U., Malhotra A. and Dutta A. (2006) Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* 174: 677-87
- Klees R. F., Salaszyk R. M., Kingsley K., Williams W. A., Boskey A. and Plopper G. E. (2005) Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 16: 881-90
- Kleinsmith L. J. and Pierce G. B., Jr. (1964) Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 24: 1544-51
- Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L., Johnson J., West M. D. and Lanza R. (2005) Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* 365: 1636-41
- Knight S. W. and Bass B. L. (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269-71
- Kogler G., Sensken S., Airey J. A., Trapp T., Muschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R. V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A. I., Colletti E. J., Almeida-Porada G., Muller H. W., Zanjani E. and Wernet P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200: 123-35
- Kogler G., Radke T. F., Lefort A., Sensken S., Fischer J., Sorg R. V. and Wernet P. (2005) Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 33: 573-83
- Kogler G., Sensken S. and Wernet P. (2006) Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* 34: 1589-95
- Komori T. (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99: 1233-9
- Komori T. (2008) Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* 13: 898-903
- Koon H. B., Ippolito G. C., Banham A. H. and Tucker P. W. (2007) FOXP1: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 11: 955-65
- Krek A., Grun D., Poy M. N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E. J., MacMenamin P., da Piedade I., Gunsalus K. C., Stoffel M. and Rajewsky N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37: 495-500
- Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K. G., Tuschl T., Manoharan M. and Stoffel M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438: 685-9
- Kulterer B., Friedl G., Jandrositz A., Sanchez-Cabo F., Prokesch A., Paar C., Scheideler M., Windhager R., Preisegger K. H. and Trajanoski Z. (2007) Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 8: 70
- Kuo W. P., Jenssen T. K., Butte A. J., Ohno-Machado L. and Kohane I. S. (2002) Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 18: 405-12
- Kuznetsov S. A., Krebsbach P. H., Satomura K., Kerr J., Riminucci M., Benayahu D. and Robey P. G. (1997) Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 12: 1335-47
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W. and Tuschl T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-8
- Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice A., Kamphorst A. O., Landthaler M., Lin C., Socci N. D., Hermida L., Fulci V., Chiaretti S., Foa R., Schliwka J., Fuchs U., Novosel A., Muller R. U., Schermer B., Bissels U., Inman J., Phan Q., Chien M., Weir D. B., Choksi R., De Vita G., Frezzetti D., Trompeter H. I., Hornung V., Teng G., Hartmann G., Palkovits M., Di Lauro R., Wernet P., Macino G., Rogler C. E., Nagle J. W., Ju J., Papavasiliou F. N., Benzing T., Lichter P., Tam W., Brownstein M. J., Bosio A., Borkhardt A., Russo J. J., Sander C., Zavolan M. and Tuschl T. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129: 1401-14
-

- 
- Lao K., Xu N. L., Sun Y. A., Livak K. J. and Straus N. A. (2007) Real time PCR profiling of 330 human microRNAs. *Biotechnol J* 2: 33-5
- Leaman D., Chen P. Y., Fak J., Yalcin A., Pearce M., Unnerstall U., Marks D. S., Sander C., Tuschl T. and Gaul U. (2005) Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Cell* 121: 1097-108
- Lee E. J., Gusev Y., Jiang J., Nuovo G. J., Lerner M. R., Frankel W. L., Morgan D. L., Postier R. G., Brackett D. J. and Schmittgen T. D. (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 120: 1046-54
- Lee R. C., Feinbaum R. L. and Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-54
- Lehninger Biochemie (2001) Springer Verlag, 3. Auflage
- Lepore J. J., Mericko P. A., Cheng L., Lu M. M., Morrisey E. E. and Parmacek M. S. (2006) GATA-6 regulates semaphorin 3C and is required in cardiac neural crest for cardiovascular morphogenesis. *J Clin Invest* 116: 929-39
- Lewis B. P., Shih I. H., Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P. and Burge C. B. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-98
- Lewis B. P., Burge C. B. and Bartel D. P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20
- Lewis J. P. and Trobaugh F. E., Jr. (1964) Haematopoietic Stem Cells. *Nature* 204: 589-90
- Li C., Heidt D. G., Dalerba P., Burant C. F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M. F. and Simeone D. M. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030-7
- Lian J. B., Stein G. S., Stein J. L. and van Wijnen A. J. (1998) Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 30-31: 62-72
- Lijnen H. R., Frederix L. and Scroyen I. (2007) Deficiency of plasminogen activator inhibitor-2 impairs nutritionally induced murine adipose tissue development. *J Thromb Haemost* 5: 2259-65
- Lim L. P., Lau N. C., Garrett-Engele P., Grimson A., Schelter J. M., Castle J., Bartel D. P., Linsley P. S. and Johnson J. M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-73
- Lin S. L., Chang D. and Ying S. Y. (2005) Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene* 356: 32-8
- Lindow M. and Gorodkin J. (2007) Principles and limitations of computational microRNA gene and target finding. *DNA Cell Biol* 26: 339-51
- Liu J. (2008) Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 7: 7
- Lu S. J., Feng Q., Caballero S., Chen Y., Moore M. A., Grant M. B. and Lanza R. (2007) Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat Methods* 4: 501-9
- Luk J. M., Wang P. P., Lee C. K., Wang J. H. and Fan S. T. (2005) Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods* 305: 39-47
- Luzi E., Marini F., Sala S. C., Tognarini I., Galli G. and Brandi M. L. (2008) Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J Bone Miner Res* 23: 287-95
- Luzzi V., Mahadevappa M., Raja R., Warrington J. A. and Watson M. A. (2003) Accurate and reproducible gene expression profiles from laser capture microdissection, transcript amplification, and high density oligonucleotide microarray analysis. *J Mol Diagn* 5: 9-14

- 
- Marks S. C., Jr. and Popoff S. N. (1988) Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 183: 1-44
- Marks S. C., Jr. and Odgren P. R. (2002) *Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation*. Principles of Bone Biology Academic Press, 3-16
- Mizuno Y., Yagi K., Tokuzawa Y., Kanesaki-Yatsuka Y., Suda T., Katagiri T., Fukuda T., Maruyama M., Okuda A., Amemiya T., Kondoh Y., Tashiro H. and Okazaki Y. (2008) miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 28: 28
- Molas M. L. and Kiss J. Z. (2007) The effect of column purification on cDNA indirect labelling for microarrays. *Plant Methods* 3: 9
- Morrisey E. E., Tang Z., Sigrist K., Lu M. M., Jiang F., Ip H. S. and Parmacek M. S. (1998) GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* 12: 3579-90
- Moses H. L. and Serra R. (1996) Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev* 6: 581-6
- Nakamoto M., Jin P., O'Donnell W. T. and Warren S. T. (2005) Physiological identification of human transcripts translationally regulated by a specific microRNA. *Hum Mol Genet* 14: 3813-21
- Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R. and de Crombrughe B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29
- Neumann K., Endres M., Ringe J., Flath B., Manz R., Haupt T., Sittlinger M. and Kaps C. (2007) BMP7 promotes adipogenic but not osteo-/chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived stem cells in high-density micro-mass culture. *J Cell Biochem* 102: 626-37
- Nishizuka M., Tsuchiya T., Nishihara T. and Imagawa M. (2002) Induction of Bach1 and ARA70 gene expression at an early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biochem J* 361: 629-33
- Ohgushi H., Goldberg V. M. and Caplan A. I. (1989) Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 60: 334-9
- Pall G. S., Codony-Servat C., Byrne J., Ritchie L. and Hamilton A. (2007) Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* 35: e60
- Palmieri A., Pezzetti F., Brunelli G., Zollino I., Scapoli L., Martinelli M., Arlotti M. and Carinci F. (2007) Differences in osteoblast miRNA induced by cell binding domain of collagen and silicate-based synthetic bone. *J Biomed Sci* 14: 777-82
- Park P. J., Cao Y. A., Lee S. Y., Kim J. W., Chang M. S., Hart R. and Choi S. (2004) Current issues for DNA microarrays: platform comparison, double linear amplification, and universal RNA reference. *J Biotechnol* 112: 225-45
- Park S. R., Oreffo R. O. and Triffitt J. T. (1999) Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone* 24: 549-54
- Patient R. K. and McGhee J. D. (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* 12: 416-22
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. and Marshak D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (2002) Walter de Gruyter Verlag, 259. Auflage
- Quackenbush J. (2006) Weighing our measures of gene expression. *Mol Syst Biol* 2: 63
- Rawadi G., Vayssiere B., Dunn F., Baron R. and Roman-Roman S. (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18: 1842-53

- Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R. and Ruvkun G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-6
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L. and Bradley A. (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-10
- Salasznyk R. M., Williams W. A., Boskey A., Batorsky A. and Plopper G. E. (2004) Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 2004: 24-34
- Salasznyk R. M., Klees R. F., Williams W. A., Boskey A. and Plopper G. E. (2007) Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 313: 22-37
- Sawada A., Mizufune S., Kaji N., Tokeshi M. and Baba Y. (2007) Evaluation of amplified cRNA targets for oligonucleotide microarrays. *Anal Bioanal Chem* 387: 2645-54
- Schena M., Shalon D., Davis R. W. and Brown P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-70
- Scherr M., Venturini L., Battmer K., Schaller-Schoenitz M., Schaefer D., Dallmann I., Ganser A. and Eder M. (2007) Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res* 35: e149
- Schwartz R. E., Linehan J. L., Painschab M. S., Hu W. S., Verfaillie C. M. and Kaufman D. S. (2005) Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 14: 643-55
- Shamblott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R. and Gearhart J. D. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13726-31
- Shi L., Reid L. H., Jones W. D., Shippey R., Warrington J. A., Baker S. C., Collins P. J., de Longueville F., Kawasaki E. S., Lee K. Y., Luo Y., Sun Y. A., Willey J. C., Setterquist R. A., Fischer G. M., Tong W., Dragan Y. P., Dix D. J., Frueh F. W., Goodsaid F. M., Herman D., Jensen R. V., Johnson C. D., Lobenhofer E. K., Puri R. K., Schrf U., Thierry-Mieg J., Wang C., Wilson M., Wolber P. K., Zhang L., Amur S., Bao W., Barbacioru C. C., Lucas A. B., Bertholet V., Boysen C., Bromley B., Brown D., Brunner A., Canales R., Cao X. M., Cebula T. A., Chen J. J., Cheng J., Chu T. M., Chudin E., Corson J., Corton J. C., Croner L. J., Davies C., Davison T. S., Delenstarr G., Deng X., Dorris D., Eklund A. C., Fan X. H., Fang H., Fulmer-Smentek S., Fuscoe J. C., Gallagher K., Ge W., Guo L., Guo X., Hager J., Haje P. K., Han J., Han T., Harbottle H. C., Harris S. C., Hatchwell E., Hauser C. A., Hester S., Hong H., Hurban P., Jackson S. A., Ji H., Knight C. R., Kuo W. P., LeClerc J. E., Levy S., Li Q. Z., Liu C., Liu Y., Lombardi M. J., Ma Y., Magnuson S. R., Maqsoodi B., McDaniel T., Mei N., Myklebost O., Ning B., Novoradovskaya N., Orr M. S., Osborn T. W., Papallo A., Patterson T. A., Perkins R. G., Peters E. H., Peterson R., Philips K. L., Pine P. S., Pusztai L., Qian F., Ren H., Rosen M., Rosenzweig B. A., Samaha R. R., Schena M., Schroth G. P., Shchegrova S., Smith D. D., Staedtler F., Su Z., Sun H., Szallasi Z., Tezak Z., Thierry-Mieg D., Thompson K. L., Tikhonova I., Turpaz Y., Vallanat B., Van C., Walker S. J., Wang S. J., Wang Y., Wolfinger R., Wong A., Wu J., Xiao C., Xie Q., Xu J., Yang W., Zhong S., Zong Y. and Slikker W., Jr. (2006) The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24: 1151-61
- Shi X., Shi W., Li Q., Song B., Wan M., Bai S. and Cao X. (2003) A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep* 4: 374-80
- Si M. L., Zhu S., Wu H., Lu Z., Wu F. and Mo Y. Y. (2007) miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26: 2799-803
- Simic P., Culej J. B., Orlic I., Grgurevic L., Draca N., Spaventi R. and Vukicevic S. (2006) Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J Biol Chem* 281: 25509-21
- Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., Bonn V. E., Hawkins C., Squire J. and Dirks P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-8

- 
- Skibbe D. S., Wang X., Zhao X., Borsuk L. A., Nettleton D. and Schnable P. S. (2006) Scanning microarrays at multiple intensities enhances discovery of differentially expressed genes. *Bioinformatics* 22: 1863-70
- Skottman H. and Hovatta O. (2006) Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction* 132: 691-8
- Slack J. M. (2000) Stem cells in epithelial tissues. *Science* 287: 1431-3
- Smith R., Xue A., Gill A., Scarlett C., Saxby A., Clarkson A. and Hugh T. (2007) High expression of plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) is a predictor of improved survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg* 31: 493-503
- Sottile V., Thomson A. and McWhir J. (2003) In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells* 5: 149-55
- St-Jacques B., Hammerschmidt M. and McMahon A. P. (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13: 2072-86
- Sugatani T. and Hruska K. A. (2007) MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 101: 996-9
- Suh M. R., Lee Y., Kim J. Y., Kim S. K., Moon S. H., Lee J. Y., Cha K. Y., Chung H. M., Yoon H. S., Moon S. Y., Kim V. N. and Kim K. S. (2004) Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 270: 488-98
- Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T. and Takahashi T. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64: 3753-6
- Tavazoie S. F., Alarcon C., Oskarsson T., Padua D., Wang Q., Bos P. D., Gerald W. L. and Massague J. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451: 147-52
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. and Jones J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7
- Tran N., McLean T., Zhang X., Zhao C. J., Thomson J. M., O'Brien C. and Rose B. (2007) MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 12-7
- Tuddenham L., Wheeler G., Ntounia-Fousara S., Waters J., Hajihosseini M. K., Clark I. and Dalmay T. (2006) The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett* 580: 4214-7
- Uzan B., de Vernejoul M. C. and Cressent M. (2004) RAMPs and CRLR expressions in osteoblastic cells after dexamethasone treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 802-8
- Valoczi A., Hornyik C., Varga N., Burgyan J., Kauppinen S. and Havelda Z. (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 32: e175
- Van Gelder R. N., von Zastrow M. E., Yool A., Dement W. C., Barchas J. D. and Eberwine J. H. (1990) Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1663-7
- van Haaften R. I., Schroen B., Janssen B. J., van Erk A., Debets J. J., Smeets H. J., Smits J. F., van den Wijngaard A., Pinto Y. M. and Evelo C. T. (2006) Biologically relevant effects of mRNA amplification on gene expression profiles. *BMC Bioinformatics* 7: 200
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. and Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.
- Waese E. Y., Kandel R. R. and Stanford W. L. (2008) Application of stem cells in bone repair. *Skeletal Radiol* 12: 12
- Wagner E. F. (2002) Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 61: ii40-2
- Wan M. and Cao X. (2005) BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 651-7
-

- 
- Weinhold, S. (2007) *Analyse der Expression von microRNAs im hämatopoietischen System*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Wernet P. (2006) *Increasing Impact of MicroRNAs in Stem Cell Biology and Medicine*. Stem Cell Transplantation. Biology, Processing and Therapy Wiley-VCH Verlag, 43-52
- Wienholds E., Koudijs M. J., van Eeden F. J., Cuppen E. and Plasterk R. H. (2003) The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat Genet* 35: 217-8
- Wilkes T., Laux H. and Foy C. A. (2007) Microarray data quality - review of current developments. *Omics*. 11: 1-13.
- Williams A. E., Moschos S. A., Perry M. M., Barnes P. J. and Lindsay M. A. (2007) Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. *Dev Dyn* 236: 572-80
- Winslow T. (2001) *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions (NIH Stem Cell Report)*. National Institut of Health
- Wiznerowicz M. and Trono D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77: 8957-61
- Wong C. F. and Tellam R. L. (2008) microRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *J Biol Chem* 15: 15
- Wong L., Lee K., Russel I. and Chen C. (2007) Endogenous Controls for Real-time Quantification of miRNA Using TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays, Application Note, Applied Biosystems
- Wu L., Fan J. and Belasco J. G. (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4034-9
- Xie X., Lu J., Kulbokas E. J., Golub T. R., Mootha V., Lindblad-Toh K., Lander E. S. and Kellis M. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434: 338-45
- Xu C., Police S., Rao N. and Carpenter M. K. (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91: 501-8
- Yamaguchi A., Ishizuya T., Kintou N., Wada Y., Katagiri T., Wozney J. M., Rosen V. and Yoshiki S. (1996) Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 366-71
- Yauk C. L. and Berndt M. L. (2007) Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. *Environ Mol Mutagen* 48: 380-94
- Yekta S., Shih I. H. and Bartel D. P. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304: 594-6
- Zanette D. L., Rivadavia F., Molfetta G. A., Barbuzano F. G., Proto-Siqueira R. and Silva-Jr W. A. (2007) miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res* 40: 1435-40
- Zeng X., Cai J., Chen J., Luo Y., You Z. B., Fotter E., Wang Y., Harvey B., Miura T., Backman C., Chen G. J., Rao M. S. and Freed W. J. (2004) Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22: 925-40
- Zhang W., Yang N. and Shi X. M. (2007) Regulation of MSC osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *J Biol Chem* 14: 14
- Zubler R. H. (2006) Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells and gene therapy development. *Swiss Med Wkly* 136: 795-9
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P. and Hedrick M. H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-28
-

## 8 ANHANG

### Microarray-Daten der Hostgene verändert exprimierter miRNAs

**Tabelle 8.1: Übersicht der Microarray-Daten der Hostgene.**

Neun der 13 verändert exprimierten miRNAs liegen in Introns proteinkodierender Gene. Die Microarray-Werte zu diesen Hostgenen sind aufgelistet. War mehr als ein Oligo pro Gen in den Microarrays vorhanden, ist dieses Gen mehrfach pro miRNA aufgeführt. Rot und grün markierte miRNAs bedeuten erhöht bzw. vermindert exprimiert respektive. Erhöht exprimierte Zielgene (Microarray, Werte  $\geq 1,2$ ) sind rot markiert, vermindert exprimierte Zielgene (Werte  $\leq 0,83$ ) grün. Leere Zellen bedeuten keine auswertbaren Microarray-Werte ( $S/N > 5$ ,  $n = 2$ ).

miRNA	Hostgen-symbol	USSC SA503					MSC				
		d01	d03	d05	d07	d14	d01	d03	d05	d07	d14
miR-135b	LEMD1										
miR-140	WWP2	0,97	0,76	0,82		0,75		0,88			
miR-224	GABRE										
miR-335	MEST	0,81	0,60	0,71	0,45	0,42	0,76	0,95	0,83	0,59	0,64
miR-26a	CTDSPL	1,07	1,14	1,18	0,95	1,23	0,89	0,96	1,00	0,89	1,21
miR-30e	NFYC										
miR-204	TRPM3										
miR-328	ELMO3										
miR-483	IGF2							1,43	1,23	1,41	1,26
miR-483	IGF2	0,70	0,71		0,91	0,97	1,21	1,36	1,43	2,02	1,57

### Microarray-Daten zu miRNA-Zielgen-Interaktionen

**Tabelle 8.2: Übersicht der Microarray-Daten zu 104 vorhergesagten miRNA-Zielgen-Interaktionen.**

13 verändert exprimierte miRNAs und ihre vorhergesagten Zielgene (Miranda). Es sind nur Gene mit Gensymbol (nach Operon) aufgelistet. War mehr als ein Oligo pro Gen in den Microarrays vorhanden, ist dieses Gen mehrfach pro miRNA aufgeführt. Rot und grün markierte miRNAs bedeuten erhöht bzw. vermindert exprimiert respektive. Erhöht exprimierte Zielgene (Microarray, Werte  $\geq 1,2$ ) sind rot markiert, vermindert exprimierte Zielgene (Werte  $\leq 0,83$ ) grün. Leere Zellen bedeuten keine auswertbaren Microarray-Werte ( $S/N > 5$ ,  $n = 2$ ).

miRNA	Gen-symbol	USSC SA503					MSC				
		d01	d03	d05	d07	d14	d01	d03	d05	d07	d14
miR-135a	ALPK2	0,97	0,59	1,05	1,06	0,43	1,39	1,34	1,37	1,08	0,77
miR-135a	ANXA1	0,84	0,78	0,76	0,75	0,72	1,09	0,81	1,03	1,18	1,06
miR-135a	C1QBP	1,02	1,07	0,92	0,77	0,78	1,07	0,84	0,62	0,82	0,95

miRNA	Gen-symbol	USSC SA503					MSC				
		d01	d03	d05	d07	d14	d01	d03	d05	d07	d14
miR-135a	CDH13	0,79	0,72	0,78	0,82	0,63	0,96	0,79	0,81	0,95	0,70
miR-135a	COPS8	1,02	1,17	1,18	1,53	1,26	1,19	1,10	1,12	1,25	1,32
miR-135a	FBXO32			1,40			1,23	1,32	1,45	1,38	1,31
miR-135a	H2AFZ	0,84	0,90	0,60	0,59	0,57	1,02	1,37	0,95	0,94	1,34
miR-135a	HBEGF	0,88	0,55	0,48	0,47	0,48	0,60	0,80	0,70	0,77	0,85
miR-135a	KRTHA4	0,56	0,49	0,56	0,52	0,46	0,48	0,35	0,48	0,31	0,56
miR-135a	MCM5	1,00	0,82	0,60	0,64	0,50	1,06	0,86	0,96	1,25	1,34
miR-135a	NP_612143.1	0,99		0,75	0,88	0,84		1,18	1,07	1,41	1,51
miR-135a	RRM1	0,88	0,72	0,56	0,60	0,55	1,10	1,17	1,15	1,27	1,59
miR-135a	SFPQ	1,03	1,11	0,71	0,74	0,79			1,15	1,70	1,30
miR-135b	ALPK2	0,97	0,59	1,05	1,06	0,43	1,39	1,34	1,37	1,08	0,77
miR-135b	ANXA1	0,84	0,78	0,76	0,75	0,72	1,09	0,81	1,03	1,18	1,06
miR-135b	C1QBP	1,02	1,07	0,92	0,77	0,78	1,07	0,84	0,62	0,82	0,95
miR-135b	CDH13	0,79	0,72	0,78	0,80	0,63	0,96	0,79	0,81	0,95	0,70
miR-135b	FBXO32			1,40			1,23	1,32	1,45	1,38	1,31
miR-135b	H2AFZ	0,84	0,90	0,60	0,59	0,57	1,02	1,37	0,95	0,94	1,34
miR-135b	HBEGF	0,88	0,55	0,48	0,47	0,48	0,60	0,80	0,70	0,77	0,85
miR-135b	KRTHA4	0,56	0,49	0,56	0,52	0,46	0,48	0,35	0,48	0,31	0,56
miR-135b	NP_612143.1	0,99		0,75	0,88	0,84		1,18	1,07	1,41	1,51
miR-135b	RRM1	0,88	0,72	0,56	0,60	0,55	1,10	1,17	1,15	1,27	1,59
miR-135b	UACA	0,94	1,29	1,36	1,17	1,80	0,79	0,69	0,73	0,80	0,80
miR-140	ALPK2	0,97	0,59	1,05	1,06	0,43	1,39	1,34	1,37	1,08	0,77
miR-140	ELTD1	0,84	0,74	0,72	0,90	0,74	0,64	0,67	0,70	0,84	0,91
miR-140	FEN1	0,77	0,61	0,46	0,52	0,51				3,71	
miR-140	MCM5	1,00	0,82	0,60	0,64	0,50	1,06	0,86	0,96	1,25	1,34
miR-140	NUPR1	0,68	0,55	1,03	1,05	1,19	0,90	1,72	1,08	1,03	1,22
miR-210	ACTG	0,82	0,59	0,63	0,57	0,56	1,67	1,23	1,07	1,82	1,15
miR-210	C6orf139	0,98	0,81	0,59	0,67	0,76	0,99	0,84	0,62	0,88	0,85
miR-210	NP_848602.1	0,92	0,83	0,74	0,63	0,68	0,55	0,41	0,41	0,53	0,64
miR-210	PFKP	0,91	0,84	0,57	0,66	0,56	0,87	1,01	0,67	0,64	0,85
miR-210	SERPINA3			1,50			1,75	2,47	1,57	1,77	1,63
miR-210	SLC20A1	0,81	0,94	0,70	0,70	0,69	1,03	1,00	0,83	1,02	0,96
miR-210	TK1	0,99	1,08	0,62	0,65	0,38					1,61
miR-224	HLA-H	1,03	1,04	1,54	1,18	1,62	1,06	0,81	0,96	1,01	1,12
miR-224	NP_005508.1	0,97	1,27	0,84	0,66	0,60	1,15	0,85	1,09	1,02	1,28
miR-224	PTX3	1,28	1,56	1,12	1,22	1,36	1,38	1,50	1,49	1,36	1,26
miR-224	SERPINE1	0,73	0,58	0,50	0,55	0,40	0,69	0,99	1,01	0,92	1,00
miR-335	CNN1	0,66	0,34	0,33	0,32	0,37	1,69	2,29	1,94	1,83	1,48
miR-335	GADD45B	1,84	1,23	1,28	2,55	2,75	2,16	2,26	1,85	1,82	1,78
miR-335	GALNT1	1,68	1,41	1,76	1,37	2,13	1,07	0,91	1,12	1,11	1,23
miR-335	GBP1	1,20	1,24	1,19	1,43	1,51	2,04	2,07			
miR-335	JAG1	1,46	2,44	1,11	1,26		0,40	0,40	0,46	0,37	0,50
miR-335	M6PR	1,09	0,95	0,96	0,75	1,08	1,29	1,13	0,90	0,94	0,96
miR-335	NFKBIA	1,58	1,35	1,72	2,09	1,93	1,91	1,76	1,21	1,49	1,60

miRNA	Gen-symbol	USSC SA503					MSC				
		d01	d03	d05	d07	d14	d01	d03	d05	d07	d14
miR-335	PLAUR	0,56	0,38	0,39	0,33	0,31	0,44	0,64	0,61	0,60	0,55
miR-335	TTK	1,14	0,78	0,66	0,56	0,45					1,50
miR-376a	ANPEP	1,47	1,21	1,45	1,18	1,15	1,74	0,86	0,99	1,17	1,27
miR-376a	H2AFZ	0,84	0,90	0,60	0,59	0,57	1,02	1,37	0,95	0,94	1,34
miR-376a	IL6	0,90	0,71	0,63			0,49	0,50	0,41	0,46	0,51
miR-376a	MT2A	1,13	1,13	0,82	1,22	0,82	1,67	1,69	1,40	1,65	1,45
miR-376a	NP_054778.1	1,57	2,00	1,79	2,26	2,16			2,30	2,45	2,21
miR-376a	NP_071929.2	1,32	1,37	1,29	1,20	1,65	1,29	1,30	1,08		1,40
miR-376a	NP_922932.1	0,84	0,88	0,80	0,75	0,51	0,71	0,61	0,63	0,63	0,70
miR-376a	NP_995327.1	0,65	0,42	0,42	0,45	0,57	0,65	0,89	1,09	1,16	1,37
miR-376a	NUP205	1,03	1,03	0,75	0,75	0,68	0,95	0,65	0,76	0,84	0,87
miR-376a	RAMP1	2,29	2,03	2,28	2,51	3,49	0,99	1,31	1,85	1,73	1,75
miR-376a	RPL13A	1,01	1,14	1,31	1,31	1,60	1,03	1,24	1,12	0,92	1,04
miR-376a	RPL13A	0,96		1,37	1,76	1,56		1,24	1,22	0,92	1,67
miR-376a	TBA3	0,96	0,86	0,56	0,67	0,61	0,93	0,97	0,40	0,59	0,69
miR-376a	UAP1	0,84	0,73	0,64	0,56	0,51	0,91	0,74	0,77	0,83	0,81
miR-376a	XP_015717.5	1,05	0,95	0,92	1,03	1,23	0,99	1,44	1,06	0,91	1,01
miR-26a	ASPN			2,69	5,91	3,39					2,81
miR-26a	EIF4G2	0,91	1,01	0,80	0,74	0,78	0,83	0,86	0,98	0,94	0,95
miR-26a	FEN1	0,77	0,61	0,46	0,52	0,51				3,17	
miR-26a	GADD45B	1,84	1,23	1,28	2,55	2,75	2,16	2,26	1,85	1,82	1,78
miR-26a	GATA6	0,61	0,52	0,57	0,61		0,66	0,51	0,52	0,56	0,53
miR-26a	NP_077016.1	0,62	0,64	0,84	1,01	0,87		0,91	0,98	0,56	0,74
miR-26a	NUPR1	0,68	0,55	1,03	1,05	1,19	0,90	1,72	1,08	1,03	1,22
miR-26a	RPL13A	1,01	1,14	1,31	1,31	1,60	1,03	1,24	1,12	0,92	1,04
miR-26a	RPL13A	0,96		1,37	1,76	1,56		1,24	1,22	0,92	1,67
miR-26a	RRM1	0,88	0,72	0,56	0,60	0,55	1,10	1,17	1,15	1,27	1,59
miR-26a	SFPQ	1,03	1,11	0,71	0,74	0,79			1,15	1,70	1,30
miR-26a	TTK	1,14	0,78	0,66	0,56	0,45					1,50
miR-29c	C5orf13	1,19	1,53	1,10	1,33	0,81	1,05	0,83	0,81	0,86	0,69
miR-29c	CHST2	1,46	1,50	1,37	1,83	1,77	1,09	1,20	1,42	1,86	1,21
miR-29c	H19	1,48	1,48	1,42	1,20	1,31	0,86	1,23	1,39	1,84	1,09
miR-29c	ID3	1,37	1,46	1,01	1,02	1,13	1,53	1,51	1,15	1,54	1,23
miR-29c	PTX3	1,28	1,56	1,12	1,22	1,36	1,38	1,50	1,49	1,36	1,26
miR-30e	ACTN1	1,01	1,10	0,78	0,74	0,78	1,24	1,44	1,51	1,50	1,22
miR-30e	C6orf139	0,98	0,81	0,59	0,67	0,76	0,99	0,84	0,62	0,88	0,85
miR-30e	CCNB1	0,93	1,18	0,56	0,48	0,35		1,33	1,01		1,49
miR-30e	CHST2	1,46	1,50	1,38	1,83	1,77	1,09	1,20	1,42	1,86	1,21
miR-30e	DACT1	0,48		0,74	0,79	0,75	0,51	0,64	0,56	0,56	0,52
miR-30e	KRTHA4	0,56	0,49	0,56	0,52	0,46	0,48	0,35	0,48	0,31	0,56
miR-30e	NP_054778.1	1,57	2,00	1,79	2,26	2,16			2,30	2,46	2,21
miR-30e	NP_071929.2	1,32	1,37	1,29	1,20	1,65	1,29	1,30	1,08		1,40
miR-30e	Q6NZ63	1,08	0,87	0,68	0,85	0,88			1,43		1,31
miR-204	CHST2	1,46	1,50	1,38	1,83	1,77	1,09	1,20	1,42	1,86	1,21

miRNA	Gen-symbol	USSC SA503					MSC				
		d01	d03	d05	d07	d14	d01	d03	d05	d07	d14
miR-204	GADD45B	1,84	1,23	1,28	2,55	2,75	2,16	2,26	1,85	1,82	1,78
miR-204	O43838	0,79	0,73	0,75	0,81	0,78	1,15	1,07	1,30	1,45	1,38
miR-204	RAMP1	2,29	2,03	2,28	2,51	3,49	0,99	1,31	1,85	1,73	1,75
miR-204	SEC11L3	0,69				0,97			1,50		
miR-328	ANPEP	1,47	1,21	1,45	1,18	1,15	1,74	0,86	0,99	1,17	1,27
miR-328	CHI3L1			1,39	1,44	1,41		1,73			
miR-328	LMCD1	1,49						3,07	2,73	2,35	2,72
miR-328	NP_00100170 1.1	1,21	1,01	1,35	1,40	1,81	0,75	0,81	0,96	0,89	0,79
miR-483	CHSP1	1,02		0,86	0,59	0,67		1,81			
miR-483	GADD45B	1,84	1,23	1,28	2,55	2,75	2,16	2,26	1,85	1,82	1,78
miR-483	ID3	1,37	1,46	1,01	1,02	1,13	1,53	1,51	1,15	1,54	1,23
miR-483	NP_00101172 5.1	0,82	0,84	0,81	0,75	0,71	1,21	1,24	1,22	1,40	1,31
miR-483	ODC1	0,79	0,75	0,67	0,62	0,61	0,83	0,80	0,78	0,72	0,88

## Verändert exprimierte Gene nach stabiler miR-26a-Überexpression in SA503

**Tabelle 8.3: Verändert exprimierte Gene nach stabiler Überexpression von miR-26a in SA503.**

Im Vergleich zu Zellen, die mit leerem pCL5EG-Vektor transfiziert wurden, sind in pCL5EG-miR-26a-transfizierten Zellen jeweils 61 Gene erhöht bzw. verringert exprimiert. Die 45 bzw. 36 Gene mit Gensymbol und/oder Genbeschreibung und ihre Veränderungen und p-Werte sind aufgelistet. Bedingung für die Auswertbarkeit war S/N>5 und n=2. Für die rot markierten Gene ist eine Interaktion mit miR-26a vorhergesagt. (Alle Angaben nach Operon)

Gensymbol	Genbeschreibung	relative Expression	p-Wert
miR-26a	Homo sapiens microRNA miR-26a-1 stem-loop	8,96	0,087
TXNIP	Thioredoxin interacting protein	3,68	0,028
RS25	40S ribosomal protein S25	2,00	0,195
UBE1	Ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9 protein)	1,87	0,124
EN1	Homeobox protein engrailed-1 (Hu-En-1)	1,74	0,189
ACTA	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin 2)	1,54	0,064
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase 1 (EC 1.6.99.2) (Quinone reductase 1) (QR1) (DT-diaphorase) (DTD) (Azoreductase) (Phylloquinone reductase) (Menadione reductase)	1,47	0,111
HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase 2 (EC 2.7.1.-)	1,42	0,100
COL11A1	Collagen alpha 1(XI) chain precursor	1,42	0,066
ZC3HDC7	Zinc finger CCCH type domain containing 7	1,42	0,068
P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase alpha-1 subunit precursor (EC 1.14.11.2) (4-PH alpha-1) (Procollagen-proline,2-oxoglutarate-4-dioxygenase alpha-1 subunit)	1,40	0,0000001
KNS2	Kinesin light chain 1 (KLC 1)	1,40	0,126
FAM38A	Protein FAM38A	1,39	0,116
NDUFB4	NADH-ubiquinone oxidoreductase B15 subunit (EC 1.6.5.3)	1,39	0,032

Gensymbol	Genbeschreibung	relative Expression	p-Wert
POLR2A	DNA-directed RNA polymerase II largest subunit (EC 2.7.7.6) (RPB1)	1,38	0,030
KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18) (K18) (CK 18)	1,38	0,110
G1P2	Ubiquitin cross-reactive protein precursor (Interferon-induced 17 kDa protein) (Interferon-induced 15 kDa protein)	1,37	0,067
FIP1L1	FIP1-like 1	1,36	0,120
ADAMTSL3	ADAMTS-like	1,36	0,103
TYB10	Thymosin beta-10	1,36	0,004
COTL1	Coactosin-like protein	1,36	0,037
RPS12	40S ribosomal protein S12	1,34	0,114
FN1	Fibronectin precursor (FN) (Cold-insoluble globulin) (CIG)	1,33	0,007
Q9BV43	Protein disulfide-isomerase A5 precursor (EC 5.3.4.1) (Protein disulfide isomerase-related protein)	1,33	0,001
PPP2R3A	Serine/threonine protein phosphatase 2A, 72/130 kDa regulatory subunit B (PP2A, subunit B, B"-PR72/PR130) (PP2A, subunit B, B72/B130 isoforms) (PP2A, subunit B, PR72/PR130 isoforms) (PP2A, subunit B, R3 isoform)	1,33	0,098
ANGPTL4	Angiopoietin-related protein 4 precursor (Angiopoietin-like 4) (Hepatic fibrinogen/angiopoietin-related protein) (HFARP) (Angiopoietin-like protein PP1158)	1,33	0,088
AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1 (EC 1.1.1.-) (Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase) (EC 1.3.1.20)	1,32	0,072
MRPL3	Mitochondrial 39S ribosomal protein L3 (L3mt) (MRP-L3)	1,31	0,037
NQO2	NRH dehydrogenase 2 (EC 1.6.99.-) (Quinone reductase 2) (QR2) (NRH:quinone oxidoreductase 2)	1,31	0,099
TPIS	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) (TIM) (Triose-phosphate isomerase)	1,31	0,065
C3orf4	(Membrane protein GENX-3745) (HSPC174)	1,31	0,089
Q96K89	Hemicentin	1,30	0,056
CA5B	Carbonic anhydrase VB, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase VB) (CA-VB)	1,30	0,095
CHI3L1	Chitinase-3 like protein 1 precursor (Cartilage glycoprotein-39) (GP-39) (39 kDa synovial protein) (HCgp-39) (YKL-40)	1,30	0,037
TLOC1	Translocation protein 1	1,30	0,041
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (MIF) (Phenylpyruvate tautomerase) (EC 5.3.2.1) (Glycosylation-inhibiting factor) (GIF)	1,30	0,075
RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1	1,29	0,019
ADAM9	ADAM 9 precursor (EC 3.4.24.-) (A disintegrin and metalloproteinase domain 9)	1,29	0,031
ID4	DNA-binding protein inhibitor ID-4	1,28	0,025
EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1) (eIF4E-binding protein 1) (Phosphorylated heat- and acid-stable protein regulated by insulin 1) (PHAS-I)	1,28	0,051
MAT2A	S-adenosylmethionine synthetase gamma form (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase) (AdoMet synthetase) (MAT-II)	1,28	0,047
ALPK2	Heart alpha-kinase	1,28	0,041
RS11	40S ribosomal protein S11	1,27	0,048
TTYH3	Tweety 3	1,26	0,041
PCNT1	Pericentrin 1	1,26	0,065
P2AA	Serine/threonine protein phosphatase 2A, catalytic subunit, alpha isoform (PP2A-alpha) (Replication protein C) (RP-C)	0,79	0,063
SEL1L	Sel-1 homolog precursor (Suppressor of lin-12-like protein)	0,79	0,053
NP_114414.2	CDA02 protein	0,78	0,072
CYP24A1	Cytochrome P450 24A1, mitochondrial precursor (EC 1.14.-.-) (P450-CC24) (Vitamin D(3) 24-hydroxylase)	0,78	0,075
Q96IN8	MGC16121 protein	0,77	0,071
PTP4A2	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2 isoform 2	0,77	0,008
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	0,77	0,004

Gensymbol	Genbeschreibung	relative Expression	p-Wert
ZNFN1A4	Zinc finger protein, subfamily 1A, 4	0,77	0,062
MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12 (EC 2.7.1.37) (Extracellular signal-regulated kinase 6) (ERK-6) (ERK5)	0,77	0,093
EIF1AY	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal (eIF-1A Y isoform) (eIF-4C)	0,76	0,059
TMP21	Transmembrane protein Tmp21 precursor (21 kDa Transmembrane trafficking protein) (p24delta) (S3111125) (S311125) (Tmp-21-l)	0,76	0,091
RPL6	60S ribosomal protein L6 (TAX-responsive enhancer element binding protein 107) (TAXREB107) (Neoplasm-related protein C140)	0,76	0,021
TRA1	Endoplasmic precursor (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP94) (gp96 homolog) (Tumor rejection antigen 1)	0,76	0,062
HNRPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L) (P/OKcl.14)	0,75	0,037
ZNFEB	Epstein-Barr virus-induced zinc finger protein (ZNF-EB) (CT-ZFP48) (Zinc finger protein dp) (ZNF-dp)	0,75	0,038
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8) (HGPRT) (HGPRTase)	0,74	0,001
ADAM10	ADAM 10 precursor (EC 3.4.24.81) (A disintegrin and metalloproteinase domain 10) (Mammalian disintegrin-metalloprotease) (Kuzbanian protein homolog)	0,74	0,016
NP_660309.1	NudC domain containing 2	0,74	0,045
PLAA	Phospholipase A-2-activating protein (PLAP) (PLA2P)	0,74	0,106
TTBK1	Tau tubulin kinase 1	0,73	0,039
U33K	UBA/UBX 33.3 kDa protein	0,73	0,091
DUET	Serine/threonine-protein kinase Duet (EC 2.7.1.37) (Serine/threonine kinase with Dbl- and pleckstrin homology domain)	0,72	0,000004
ANKMY1	Ankyrin repeat and MYND domain protein 1 (Testis specific ankyrin-like protein 1) (Zinc-finger MYND domain protein 13)	0,71	0,044
NP_149024.1	Thymic stromal lymphopoietin isoform 2	0,70	0,045
SOX21	Transcription factor SOX-21 (SOX-A)	0,69	0,071
NR0B1	Nuclear receptor 0B1 (Nuclear receptor DAX-1) (DSS-AHC critical region on the X chromosome protein 1)	0,68	0,090
miR-24-2	Homo sapiens microRNA miR-24-2 stem-loop	0,68	0,034
THBS1	Thrombospondin-1 precursor	0,68	0,113
CNBP	Cellular nucleic acid binding protein (CNBP) (Zinc finger protein 9)	0,68	0,079
CD63	CD63 antigen (Melanoma-associated antigen ME491) (Lysosome-associated membrane glycoprotein 3) (LAMP-3)	0,63	0,129
VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 isoform 1	0,63	0,090
PKP1	Plakophilin 1 (Band-6-protein) (B6P)	0,62	0,084
FCHO2	FCH domain only 2	0,62	0,124
OR1F1	Olfactory receptor 1F10 (Olfactory receptor 3-145) (OR3-145) (Fragment)	0,59	0,147
TMC4	Transmembrane channel-like 4	0,52	0,083
BPIL3	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 3 precursor	0,49	0,126

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. P. Wernet, der die Betreuung für diese Arbeit übernommen hat und der es mir ermöglichte, selbständig zu arbeiten. Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. D. Willbold aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die kurzfristige Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. G. Kögler danke ich für die zwischenzeitliche Finanzierung und die Bereitstellung der Zellen.

Kai Lao und Simone Günther von Applied Biosystems danke ich für die Bereitstellung des TaqMan-Assays.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des ITZ, die mir in irgendeiner Weise weitergeholfen haben – sei es mit Sequenzierungen (Danke an Gabi Tillmann und Co.), beim Mikroskopieren (Danke an Julia Beckmann und Dr. Bernd Giebel), Hilfe bei den viralen Infektionen inklusive der Vektoren und für Zellen, wenn ich Zellen brauchte (Danke an Christophe Klumb), diversen (viralen) Informationsaustausch (Danke an Gregor von Levetzow), Korrekturlesen der Arbeit (Danke an Dr. Thorsten Trapp) oder Einführung in radioaktives Arbeiten (Dr. Ingo Trompeter).

Außerdem danke ich Aurélie Lefort, Mathab Maleki und Nathalie Walter für die Pflege der Zellen, die die Grundlage dieser Arbeit bilden.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Tino Polen, der mich in der großen Welt der Microarrays und vor allem deren Auswertung immer auf den richtigen Weg gebracht hat und mir immer und immer und immer wieder geholfen hat.

Ein großes Dankeschön geht an die Uhrberg-Gruppe, die immer für mich da war – weil gerade mal wieder was fehlte im Labor oder privat. Danke an PD Dr. Markus Uhrberg für die „Adoption“, Dr. Sandra Weinhold, Kathrin Schönberg, Julia Christ, ChristophE Klumb (ich kaufe ein E), Dr. Martina Sribar, Judith Springer, Teodora „Dorotea“ Ribarska, Nina Graffmann und natürlich die Apothekerin meines Vertrauens und Ex-Uhrberg-Adoptierte Dr. Jin Mann. Danke für die Jogging-Runden, lustige Abende, Nikolaus-Waffelessen, Telefon-Sitzungen mitten in der Nacht, Häagen-Dazs-Eis (beim Wetten gewonnen/verloren oder einfach so), seelische und moralische Unterstützung (hat jemand Schokolade?!), offene Ohren, Frühstück (ich fang mit nem Schweineohr an), Neuigkeitenaustausch im S1-Labor, Meditationen im S2-Labor oder einfach nur Vitamine (ich liebe Erdbeeren).

---

---

Danke an alle Dresdner und Dresdner auf Zeit für viele lustige Stunden während des Studiums bei den Mathe-Lern-Sessions, beim Kochen von doppelten Ansätzen in OC (nur nicht erwischen lassen), der Weitergabe der Physikfragen, im Biergarten mit 10 % Aufschlag bei Livemusik, beim Nachtskatzen, bei „A night to remember“, einer Flasche Geburtstagssekt im CM und diversen anderen Partys. Und auch nach dem Studium irgendwo in Deutschland (Ich buch einen Flug – holst du mich ab?!). Ich hoffe, das funktioniert auch weiter so mit Alex, Bino, Daniel, Katha, Kristin, Mandy, Nadine und Oli.

Ein Dank auch an alle (Wahl-)Düsseldorfer (und Umgebung), mit denen ich sehr viel Spaß habe: Ingo, Nicole, Sandra, Steffi, Stephan und Tom und ganz besonders an Sandy und Benni. Danke für lustige Spieleabende mit Kartentauschen unterm Tisch, Partys und Salsaabende.

Und natürlich ein Dank an Dr. Antje Lindecke für Ratschläge, kurzfristigen Chemikalien- und Informationsaustausch, Dr. Sascha Raschke für Mittagessen und Diskussionen (fachlich und nicht-fachlich) und PD Dr. Marc Cronauer für die neuesten Informationen und moralische Unterstützung per Telefon.

Danke an meine Brüder für die Lösung von Fahrrad- und Computerproblemen, Besuche in der Hölle und bei Iffes, diverse Chauffeurdienste, gemeinsames Mittagessen und weltweite Infos.

Aber der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich bei allen bisherigen Entscheidungen in meinem Leben unterstützt haben und die immer da sind, wenn ich sie brauche – mit Ratschlägen bei alltäglichen Problemen, als Mutmacher, Sonnen- und Notgroschenspender, Knusperflockenlieferant und bei der Suche nach letzten Rächtschraibfälern! Danke für alles!!!

---

---

## **Erklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 02.05.2008

Sabine Krause

---