**UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM**

**Klinik für Orthopädie**

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Heiko Reichel

**Aus der Sektion**
**Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen**

Leiter: Prof. Dr. R. Brenner

# Heparansulfatproteoglykane bei mesenchymalen Stammzellen und reifen differenzierten Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

Michael Brinck
Schwäbisch Gmünd

2011

**Amtierender Dekan:** **Prof. Dr. Thomas Wirth**

**1.Berichterstatter:** **PD Dr. Heinz-Jürgen Hausser**

**2.Berichterstatter:** **Prof. Dr. Anita Ignatius**

**Tag der Promotion:** **10.11.2011**

# Inhaltsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis** **II**

**1 Einleitung** **1**

**1.1 Mesenchymale Stammzellen** **2**

**1.2 Heparansulfatproteoglykane** **7**

1.2.1 Membranassoziierte Heparansulfatproteoglykane 9
1.2.1.1 Heparansulfatproteoglykane der Glypican-Familie 9
1.2.1.2 Heparansulfatproteoglykane der Syndecan-Familie 10
1.2.1.3 Betaglykan 11
1.2.2 Extrazelluläre Heparansulfatproteoglykane 11
1.2.2.1 Agrin 11
1.2.2.2 Perlecan 12

**1.3 Zielsetzung** **13**

**2 Material und Methoden** **14**

**2.1 Zellen** **14**

**2.2 Materialien** **14**

2.2.1 Geräte 14
2.2.2 Chemikalien 15
2.2.3 Sonstige Materialien 19

**2.3 Methoden** **20**

2.3.1 Stammzell-Isolierung 20
2.3.2 Osteoblasten- und Chondrozytenisolierung 20
2.3.3 Zellkultur 21
2.3.4 RNA-Isolierung 21
2.3.5 Reverse Transkription 22
2.3.6 PCR 23
2.3.7 Gelelektrophorese 23
2.3.8 Realtime-PCR 24
2.3.9 Färbungen 24
2.3.9.1 Kossa-Färbung 24
2.3.9.2 Oil Red-O- Färbung 25
2.3.10 Statistik 25

**3 Ergebnisse** **26**

**3.1 Heparansulfatproteoglykan-Expression mesenchymaler Stammzellen** **26**

**3.2 Heparansulfatproteoglykan-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen** **29**

**3.3 Die Heparansulfatproteoglykan-Expression bei unterschiedlichen differenzierten Zellen im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen** **40**

**4 Diskussion** **43**

**5 Zusammenfassung** **53**

**6 Literaturverzeichnis** **55**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| ALP | Alkalische Phosphatase |
| BSP | Bone Sialoprotein |
| bp | Basenpaar(e) |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EtBr | Ethidium-Bromid |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| g | Gramm |
| $g_n$ | Normalfallbeschleunigung |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase |
| GPC | Glypican |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| HSPG | Heparansulfatproteoglykan |
| l | Liter |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | mikromolar |
| M | molar |
| mg | Milligramm |
| mL | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mMol | Millimol |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MSC | Mesenchymal Stem Cell |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| ng | Nanogramm |

| | |
|---|---|
| nm | Nanometer |
| nM | nanomolar |
| OC | Osteocalzin |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PPARγ | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion |
| SDC | Syndecan |
| Tab. | Tabelle |
| TGF | transforming growth factor |
| U | Units |

# 1 Einleitung

Im Laufe des Lebens machen viele Gewebe degenerative Veränderungen durch. Gleichzeitig verliert der Körper seine Fähigkeit, verlorengegangenes Gewebe zu ersetzen bzw. Defekte in vollem Umfang zu reparieren. Dadurch kommt es häufig zu einem irreversiblen Verlust von Organ- bzw. Gewebefunktionen. Als Beispiele hierfür seien z.B. degenerative Veränderungen des Gelenkknorpels genannt. Durch Abnutzung wird der Knorpel zunehmend abgebaut, bis Knochen auf Knochen stößt. Eine Wiederherstellung der Knorpelmatrix ist nicht möglich. Es bleibt oft nur die Möglichkeit eines künstlichen Gelenkersatzes. Ein anderes Beispiel wäre die Frakturheilung beim Knochen. Während bei Kindern eine Fraktur nahezu problemlos innerhalb kürzester Zeit verheilt, stellt dies bei älteren Menschen ein großes Problem dar. Nicht nur, dass die Frakturheilung sehr viel mehr Zeit in Anspruch nimmt. Oftmals erfüllt das neue Gewebe auch nicht mehr seine eigentliche Funktion. So ist z.B. das bei der Frakturheilung entstandene Knochengewebe weniger stabil, der Knochen ist erneut frakturgefährdet.
Auch ohne traumatische äußere Einflüsse verliert Knochengewebe im Laufe der Jahre durch degenerative Prozesse an Stabilität. Als eine Krankheitsentität sei in diesem Zusammenhang die Osteoporose genannt. Bei dieser multifaktoriell bedingten systemischen Knochenerkrankung kommt es zu einer Reduktion der Knochenmasse sowie zu einer Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes. Neben einer Verminderung der Mineralisation und einer verminderten Neusynthese von Kollagenen und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix kommt es zu einer Reduktion der Osteoblastenzahl und Osteoblastenaktivität. Die Folge hieraus ist eine erhöhte Knochenbrüchigkeit sowie Frakturanfälligkeit.
Der volkswirtschaftliche Schaden dieser degenerativen Erkrankungen des Skelettsystems ist enorm. Neben operativer Versorgung und Präventionsmaßnahmen gibt es bisher nur wenige Therapieoptionen. Es ist daher sinnvoll, nach weiteren Therapiemöglichkeiten zu suchen, z.B. auch auf zellularer Ebene. Für die Regeneration von Geweben sind nämlich vor allem Stammzellen erforderlich, die durch Proliferation und nachfolgende Differenzierung schließlich zu reifen Zellen werden und entsprechend ihrer Funktionalität neues Gewebe bilden.
Möchte man das oben genannte Problem des Funktionsverlustes von Geweben lösen, so bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Zum einen könnte man mit Hilfe von entnommenen Stammzellen mittels Zellkulturen künstlich „körpereigenes Gewebe“ züchten und dieses dann reimplantieren (tissue engineering). Zum anderen könnte man jedoch auch versuchen, die bereits vorhandenen Stammzellen, z.B. unter Einsatz von Wachstumsfaktoren etc., dazu zu bewegen, die entsprechende Funktion zu übernehmen. Oftmals sind die erforderlichen Stammzellen nämlich noch vorhanden,

erfüllen aber aus verschiedenen Gründen die für sie vorgesehenen Aufgaben nicht mehr. So kommt es z.B. im Alter zu einer zunehmenden Verfettung des Knochenmarks. Die vorhandenen Stammzellen differenzieren vermehrt zu Adipozyten und stehen somit z.B. zur Frakturheilung oder zum Knochenaufbau nicht mehr zur Verfügung. Die Folge ist eine Veränderung der Knochenstruktur. Wie bereits oben beschrieben ist die Abnahme der Osteoblastenzahl u.a. auch ein Pathogeneseaspekt der Osteoporose. Aus der Beeinflussung der Differenzierungsrichtung von Stammzellen könnte man z.B. bereits eine Therapie der Osteoporose ableiten.

Zum besseren Verständnis dieser Veränderungen sowie zur zukünftigen Nutzung von Stammzellen für die Zucht von körpereigenem Gewebe ist es wichtig, zu wissen, welche Faktoren für Wachstums- und Differenzierungsprozesse von Bedeutung sind. Dabei sei vor allem an Wachstumsfaktoren (u.ä.) sowie erforderliche Rezeptoren gedacht. Gelingt es, diese zu beeinflussen, so ist man dem Ziel der kontrollierten Organ- und Geweberegeneration bzw. Züchtung ein großes Stück näher gekommen.

In den letzten Jahren sind Heparansulfatproteoglykane zunehmend ins Blickfeld geraten. Sie machen nicht nur einen Teil der extrazellulären Matrix aus, für sie wurden auch Rezeptor- und Co-Rezeptorfunktionen nachgewiesen. Außerdem wurde für einige Vertreter eine Bedeutung für das skeletale Wachstum nachgewiesen.
Diese Arbeit beschäftigt sich mit Heparansulfatproteoglykanen. Vor allem hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung für die Funktion von Zellen und Geweben wird in dieser Arbeit ihre Expression bei unterschiedlichen reifen Zellen sowie im Rahmen von Differenzierungsprozessen untersucht.

## 1.1 Mesenchymale Stammzellen

Im Knochenmark findet man neben den Stammzellen der Hämatopoese auch mesenchymale Stammzellen. Diese Zellen stellen eine heterogene Gruppe von multipotenten Vorläuferzellen dar, aus denen durch unterschiedliche Differenzierung eine Vielzahl von funktionellen reifen Zellen entstehen können. Erstmalig wurden diese Zellen bereits in den 70er Jahren beschrieben [26]. In erster Linie spielen sie eine wichtige Rolle beim Aufbau mesenchymaler Gewebe, wie zum Beispiel Knochen-, Knorpel- oder Fettgewebe [3,62]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit besitzen, die Eigenschaften von Zellen des Nervensystems anzunehmen [46,68].

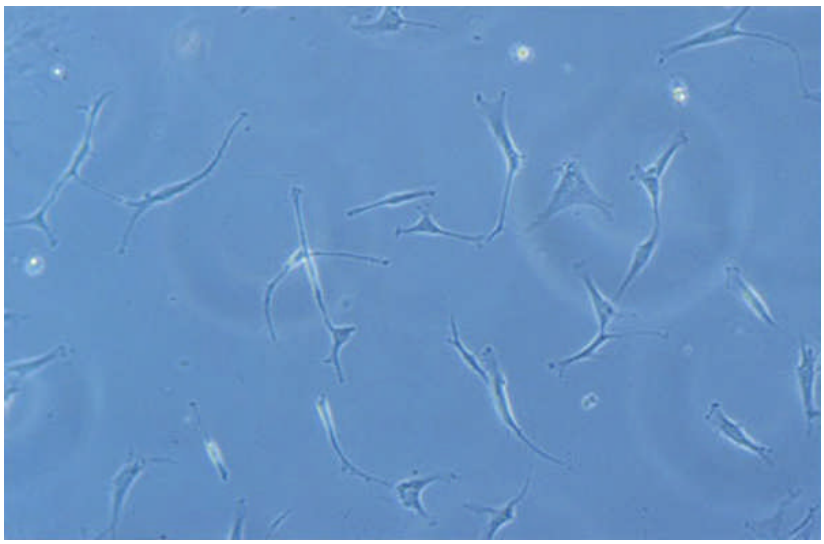


**Abbildung 1 : Mesenchymale Stammzellen in Monolayerkultur.** Phasenkontrastmikroskopie. 10fache Objektivvergrößerung.

Stammzellen sind für die ständige Selbsterneuerung von Körpergeweben erforderlich. Sie haben eine enorme Teilungsfähigkeit. Dies führt dazu, dass durch repetitive Zellteilung immer eine zum Selbsterhalt ausreichende Anzahl an Zellen mit den gleichen Eigenschaften erhalten bleibt, während ein anderer Teil für Differenzierungsprozesse zur Verfügung steht. Auf diese Weise können beschädigte Gewebe mit Hilfe neuer funktioneller Zellen regenerieren.
Stammzellen sind im Prinzip in der Lage, sowohl asymmetrische als auch symmetrische Zellteilungen einzugehen. Asymmetrisch bedeutet, dass bei der Teilung eine unreife Stammzelle und eine um einen Schritt differenziertere Zelle entsteht. Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen dagegen zwei identische Zellen. Es gibt jedoch nur wenige Studien, die eine asymmetrische Teilung belegen. Als Beispiel sei hier eine Studie über neurale Progenitorzellen genannt [14]. Die Tatsache, dass sich eine Population mesenchymaler Stammzellen innerhalb weniger Tage verdoppelt, spricht dagegen mehr für die symmetrische Zellteilung mit anschließender Differenzierung. Die Frage, unter welchen Bedingungen Stammzellen welche Teilungsmethode verwenden und ob sie diese wechseln können ist noch nicht geklärt.

Stammzellen produzieren viele Wachstumsfaktoren und Zytokine [59,34]. Außerdem exprimieren sie entsprechende Rezeptoren. Dies bedeutet, dass auch sie einer komplexen Regulation unterliegen. Zur Übermittlung der Signale extrazellulärer Faktoren an den Zellkern sind eine Vielzahl von Signalwegen möglich, von denen viele noch unbekannt sind. Einer der möglichen Signalwege, der auch die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen regulieren könnte, ist

der MAP-Kinase Signalweg (mitogen-aktivierte Protein Kinase) [38]. Neuere Studien zeigten, dass für die Regulation der Selbsterneuerung und der Differenzierungsprogramme auch Wnt Signalmoleküle mit deren entsprechenden Signalwegen eine wichtige Rolle spielen [25].
Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, die sowohl autokrin, parakrin als auch endokrin wirken können, verlieren Stammzellen ihre charakteristischen Eigenschaften, wie zum Beispiel ihre Multipotenz oder ihre Teilungsfähigkeit, und legen sich zunehmend auf eine bestimmte Differenzierungsrichtung fest. Sie werden zu Vorläuferzellen, auch Progenitorzellen genannt, für spezielle Zelltypen. So wurden zum Beispiel bei Untersuchungen des Differenzierungspotentials von Stammzellen Zellklone gefunden, die fähig waren, in 3 Richtungen zu differenzieren (osteogen, chondrogen und adipogen), es wurden aber auch Zellklone gefunden, die nur 2 verschiedene Zelllinien (osteogen, chondrogen) oder sogar nur noch eine (osteogen) bilden konnten [60].
Viele der zur Differenzierung führenden Faktoren sind noch unbekannt. Jedoch sind für einige Differenzierungsrichtungen in vitro bereits Induktoren ermittelt worden. So differenzieren Stammzellen in Gegenwart von Glukokortikoiden und Ascorbinsäure in osteogene Richtung [37], während sie bei Zugabe von Indometacin, Isobutylmethylxanthin und Deaxamethason in adipogene Richtung differenzieren [65]. Auch für eine chondrogene Entwicklung sind Induktoren bekannt. Werden Stammzellen aggregiert und TGF-β ausgesetzt, so beginnen sie, eine chondrogene Differenzierung einzugehen [65].

Die Tatsache, dass Stammzellen über viele Zwischenschritte differenzieren, einer komplex regulierten Zellteilung unterliegen und vermutlich auch zu asymmetrischen Zellteilungen in der Lage sind, erklärt das Vorkommen verschiedenster Zellen bzw. Zellklone nebeneinander. Stammzellpopulationen sind daher sehr heterogen.
Trotz der Vielzahl der von mesenchymalen Stammzellen gebildeten Proteine gibt es derzeit keine verlässlichen Marker, um eine absolute undifferenzierte Stammzelle zu charakterisieren. Erst die im Verlauf der Differenzierung zunehmende Spezialisierung der Zellen machen eine Bestimmung möglich. So produzieren Osteoblasten zum Beispiel als typischen Marker die alkalische Phosphatase.

Eine noch offen stehende Frage ist, ob diese Entwicklung auch in umgekehrter Richtung ablaufen kann, also ob reife Zellen einer Dedifferenzierung unterliegen können und wie weit diese Rückentwicklung gehen kann. Gerade hinsichtlich einer möglichen Osteoporosetherapie, bei der vermehrt Osteoblasten gebildet und eine bereits begonnene Knochenmarksverfettung rückgängig gemacht werden sollen, ist diese Frage von großem Interesse.

Zu einem kleinen Teil wird diese Frage durch Studien beantwortet, die belegen, dass reife Osteoblasten unter bestimmten Bedingungen zu Adipozyten transformieren können [71], also eine Transdifferenzierung durchlaufen. Dies ist vor allem daher erstaunlich, da die Adipozyten-Linie bereits sehr früh während der Differenzierung abzweigt (siehe auch Abbildung 2). Das heißt, die Entscheidung, adipogen zu differenzieren, muss von der entsprechenden Zelle bereits frühzeitig getroffen werden. Ein Faktor, der dabei eine wichtige Rolle spielt, ist PPARγ. Durch Inhibition von PPARγ wird die Osteoblastogenese gefördert [49,6].

Auch wenn noch viele Fragen ungeklärt sind, so sind doch bereits viele Zelldifferenzierungen erfolgreich in vitro durchführbar. Die Hoffnungen, mit Hilfe mesenchymaler Stammzellen Therapiestrategien zu entwickeln, zum Beispiel im Sinne eines Tissue Engineering, sind daher berechtigt.

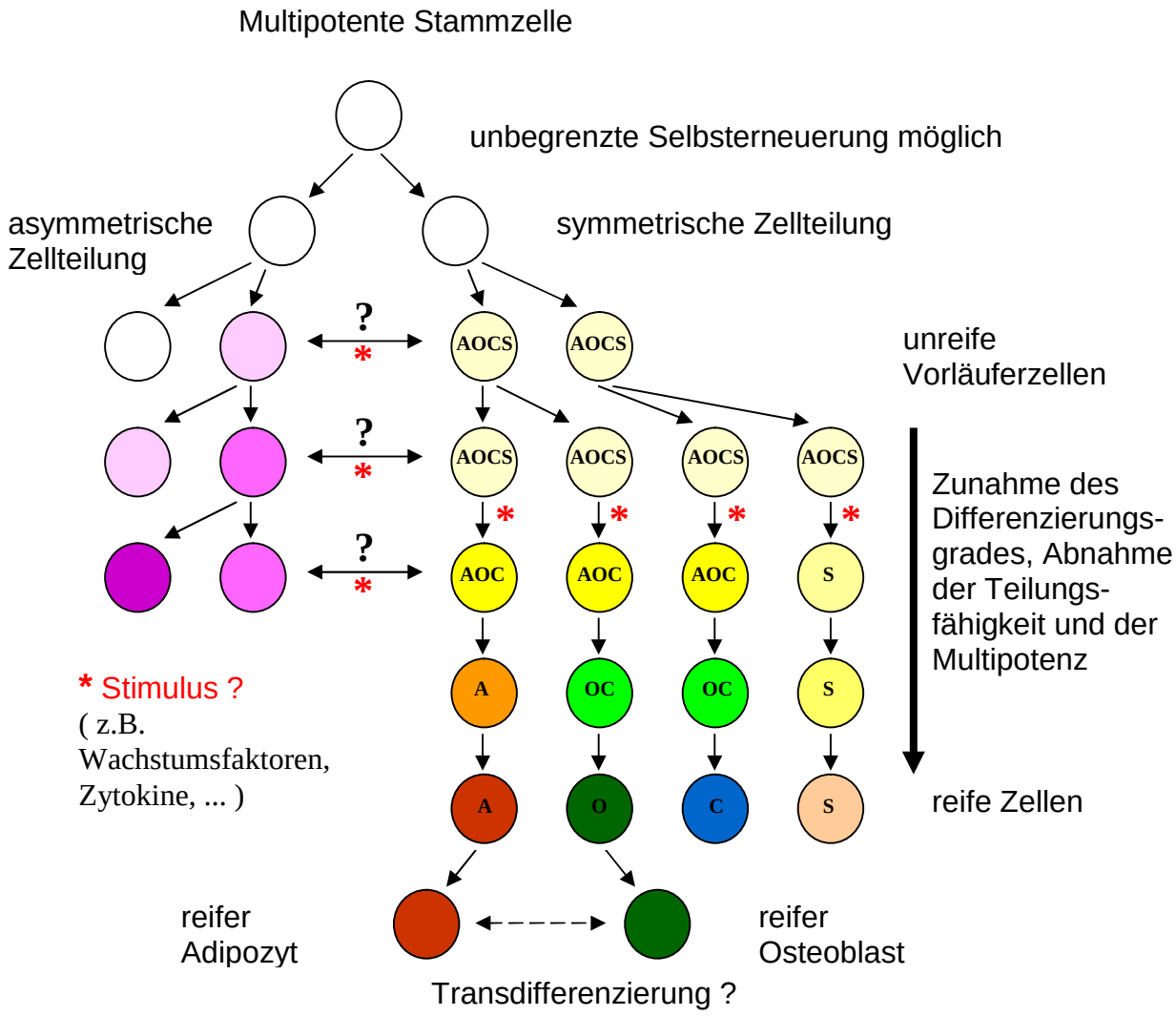



**Abbildung 2 : Mesenchymale Stammzellen und mögliche Differenzierungslinien**
Die Buchstaben in den Zellen geben an, welches Differenzierungspotential vorhanden ist: A=adipogen, O=osteogen, C= chondrogen, S= Skelettmuskel.
Dementsprechend sind verschiedene Zellklone vorhanden, die unterschiedliche Differenzierungseigenschaften aufweisen. Abbildung nach Aubin et al. 2002 [3].

## 1.2 Heparansulfatproteoglykane

Proteoglykane sind Makromoleküle, die sowohl funktionell als auch strukturell keine einheitliche Gruppe darstellen. Aufgebaut sind sie aus einem Coreprotein, an welches Glycosaminoglykanketten kovalent gebunden sind. Glykosaminoglykane sind aus repetitiven Disaccharideinheiten aufgebaut. Heparansulfatketten bestehen zum Beispiel aus N-Acetylglucosamin und D-Glucuronsäure bzw. seinem Epimer L-Iduronsäure, die an unterschiedlichen Positionen sulfatiert sein können.

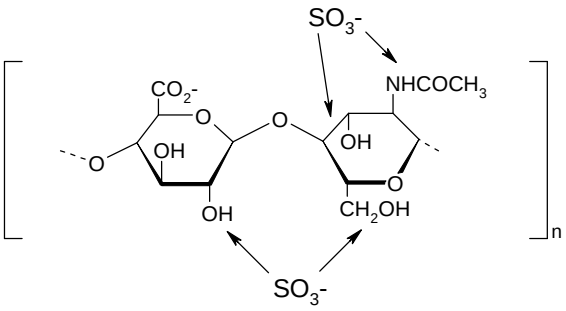



**Abbildung 3 : Beispiel einer repetitiven Einheit einer Heparansulfatkette**
GlcA-α(1,4)-GlcNAc mit möglichen Sulfatierungs-Positionen

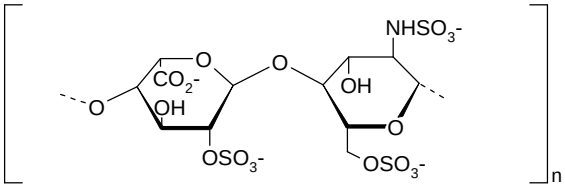



**Abbildung 4 : Beispiel einer repetitiven Einheit einer Heparansulfatkette**
IdoA(2-$OSO_3$)-α(1,4)-Glc$NSO_3$(6-$OSO_3$)

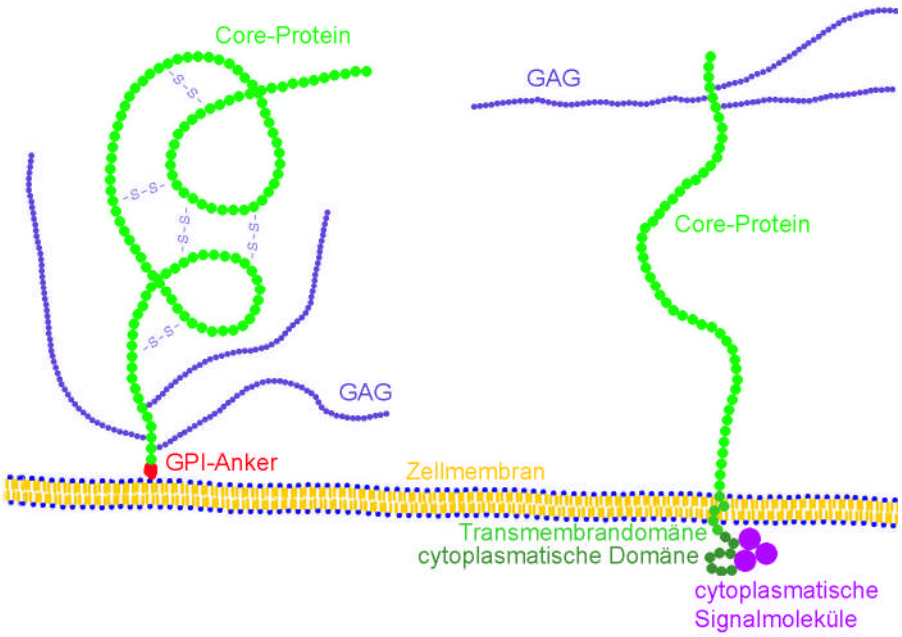



**Abbildung 5 : Schematische Darstellung zweier membrangebundener Heparansulfatproteoglykane.** Dargestellt ist ein Vertreter der Glypican-Familie, der über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (links) und ein Vertreter der Syndecan-Familie mit einem membrangängigen Proteinanteil (rechts). Die Heparansulfatketten sind bei den Glypicanen in der Nähe der Zellmembran kovalent gebunden, bei den Syndecanen befinden sich diese distal der Zellmembran. Abbildung nach Bernfield et al. 1999 [8].

Die Sulfatierung geschieht nicht einheitlich, so dass selbst innerhalb einer Gruppe von Heparansulfatketten bezüglich der Anzahl der Sulfatierungen sowie der Positionen eine große Variabilität besteht. Diese Variabilität wird auch durch Veränderung der äußeren Bedingungen bestimmt. So konnte zum Beispiel eine Altersabhängigkeit der Feinstruktur von Heparansulfatketten gezeigt werden [31]. Auch andere äußere Einflüsse können die Kettenstruktur verändern bzw. zur Synthese von Ketten mit veränderter Struktur führen [8].
Heparansulfatproteoglykane kommen sowohl membrangebunden als auch in der extrazellulären Matrix vor. Aufgrund ihrer unter physiologischen Bedingungen durch Sulfat- und Carboxylatgruppen entstehenden negativen Valenzen, können Heparansulfate neben weiteren Wechselwirkungen, wie z.B. hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Bindungen mit Proteinen eingehen. Diese Proteine können Bestandteil der extrazellulären Matrix sein, wie zum Beispiel Kollagene. Aber auch Wachstumsfaktoren (z.B. FGF-2) oder Enzyme (z.B. Thrombin) können gebunden werden. Inzwischen sind weit über 100 Proteine bekannt, die von Heparansulfaten gebunden und in ihrer Aktivität bzw. frei verfügbaren Konzentration verändert werden können [7,17,35,66].

**Tabelle 1:** Beispiele für Proteoglykane und Proteine, die von Heparansulfatproteoglykanen gebunden werden können

| |
|---|
| **Membranassoziierte Proteoglykane** : Betaglykan, CD44, Glypican-Familie (Glypican1-6), Syndecan-Familie (Syndecan 1-4)<br>**Extrazelluläre Proteoglykane:** Agrin, Perlecan, Testican |

| |
|---|
| **Proteine, die von Heparansulfaten gebunden werden können** (Auswahl):<br>BMP-2,-4, FGFs(1-15), Fibrin, Fibronectin, Laminin, IGF-II, Interleukine, Interferon γ, Pleiotrophin, TGF-β, TNF-α, VEGF, Wnts (1-13) |

Auch die Coreproteine können Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen. So hat zum Beispiel Betaglykan mehrere Bindungsstellen für TGF-β1 [40].
Viele ihrer komplexen Funktionen sind noch unbekannt. Jedoch wird ihre wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen durch Fehlbildungs-Syndrome, die bei Gendefekten bestimmter Proteoglykane auftreten, belegt. So führt zum Beispiel eine Mutation im Glypican-3 Gen zum Simpson-Golabi-Behmel Syndrom, welches unter anderem durch Hochwuchs, Polydaktylie, Brachydaktylie und weiteren Fehlentwicklungen gekennzeichnet ist [64].

Im weiteren seien einige wenige wichtige Vertreter der Heparansulfatproteoglykane genannt.

## 1.2.1 Membranassoziierte Heparansulfatproteoglykane

### 1.2.1.1 Heparansulfatproteoglykane der Glypican-Familie

Glypicane sind membranassoziierte Proteoglykane. Ihre Core-Proteine sind an ihrem C-terminalen Ende über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden. In unmittelbarer Nähe zur Zellmembran befinden sich die Anheftungsstellen für die Heparansulfatketten [20].
Von den Heparansulfatproteoglykanen der Glypican-Familie wurden inzwischen sechs Vertreter identifiziert. Mit Ausnahme von Glypican-2, welches ausschließlich im Nervengewebe vorkommt, sind Glypicane in vielen verschiedenen Geweben nachweisbar.
Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Core-Proteine innerhalb der Glypican-Familie zeigt eine Ähnlichkeit von 17-63 %. Dabei sind die Sequenzen von Glypican-4 und Glypican-6 mit 63% am ähnlichsten, während Glypican-2 und Glypican-5 mit 17% die geringste Ähnlichkeit aufweisen [21,74]. Auch im Vergleich mit den Glypicanen anderer Spezies finden sich starke Gemeinsamkeiten. Bei den einzelnen Vertebraten-Spezies beträgt die Ähnlichkeit zum Teil mehr als 90%. Die Tatsache dieser hohen Konservierung der Aminosäuresequenz legt die Vermutung nahe, dass Glypicane eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen könnten. Glypicane haben zwar keine direkte Verbindungen mit intrazellulären Komponenten, jedoch wären z.B. indirekte Signalwege über Partnermoleküle mit Transmembranproteinen möglich.
Welche spezifischen Aufgaben Glypicane erfüllen ist, abgesehen von der Fähigkeit der Glykosaminoglykan-Seitenketten, Wachstumsfaktoren zu binden, derzeit noch nicht bekannt. Man weiß jedoch, dass es bei Verlust von Glypican-3, zum Beispiel durch einen Gendefekt, zu Skelettfehlbildungen kommt. So kommt es z.B. beim bereits erwähnten Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom unter anderem zu Hochwuchs. Aufgrund der Bedeutung des IGF (insulin-like growth factor)- Signalweges bei embryonalen Wachstumsprozessen wurde hinsichtlich des Hauptsymptoms Hochwuchs beim Simpson-Golabi-Behmel Syndrom spekuliert, dass Glypican-3 über den IGF-Signalweg regulatorische Einflüsse ausübt. Neuere Studien jedoch widerlegen diese Hypothese und zeigen statt dessen, dass Glypican-3 in den Wnt-Signalweg eingreift. Dabei bewirkt es eine Stimulation des „non-canonical“ Wnt/JNK-Signalweges und eine Inhibition des „canonical“ Wnt/β-catenin - Signalweges [73] . Andere Studien zeigen, dass Wnt/β-catenin für die Bildung synovialer Gelenke erforderlich ist und bei der Chondrogenese eine wichtige Rolle spielt [32,1]. Inwieweit Glypican-3 bei den letztgenannten Prozessen beteiligt ist, ist noch nicht geklärt. Die Verknüpfung der bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Wnt-Signalweges läßt eine Beteiligung jedoch als nicht unwahrscheinlich erscheinen.

#### 1.2.1.2 Heparansulfatproteoglykane der Syndecan-Familie

Im Gegensatz zu den Glypicanen sind Syndecane nicht über GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden, sondern sie sind Transmembranproteine, die zusätzlich eine zytoplasmatische Komponente besitzen [44]. Das bedeutet, dass sie nicht nur in die Zellmembran integriert sind, sondern auch direkte Verbindung zum Intrazellularaum haben. Gerade hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung als Rezeptor bzw. Korezeptor spielt dies eine große Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Komponente an Proteine des Zytoskeletts und an Signalproteine bindet. Als Beispiele seien die zytosolischen Proteine Syntenin und Synbindin genannt [24,30].
Von der Syndecan-Familie sind bisher vier Vertreter identifiziert worden. Syndecane kommen ubiquitär vor. Allerdings gibt es eine gewebecharakteristische Häufigkeitsverteilung. So kommt im Gehirn z.B. überwiegend Syndecan-3 vor, während Syndecan-4 das quantitativ häufigste Heparansulfatproteoglykan in der Niere ist [42].
Die Heparansulfatketten sind bei den Syndecanen am membranfernen Ende angeheftet, allerdings besitzen Syndecan-1 und Syndecan-3 eine zusätzliche membrannahe Anheftungsstelle [70,45].
Ebenso wie Glypicane können Syndecane über ihre Heparansulfatketten Wachstumsfaktoren binden und mit der extrazellulären Matrix interagieren. So hemmt z.B. das Vorkommen von Syndecan-1 auf diese Weise das Einwandern von Zellen in Kollagen I – haltige extrazelluläre Matrix [50]. Gerade bei sich entwickelnden Geweben ist die Beeinflussung des chemotaktischen Verhaltens von großer Konsequenz.
Syndecan-2 ist von großer Bedeutung für die Bildung von Dendriten im Nervengewebe [23]. Dabei kommt es zur Akkumulation von Syndecan-2 an der Zellmembran und Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen [24].
Syndecan-3 spielt in der Entwicklung des Nervensystem ebenfalls eine große Rolle [43], es wurde aber auch eine Beteilung bei der Skelettentwicklung nachgewiesen. In diesem Fall ist Syndecan-3 für die Differenzierung von Knorpelvorläuferzellen nötig. Wird die extrazelluläre Proteindomäne von Syndecan-3 durch Antikörper blockiert, so wird die Differenzierung unterdrückt, die Zellen können nicht aggregieren und die für das Knochenwachstum erforderliche Knorpelmatrix wird nicht gebildet [72].
Syndecan-4 hat neben seiner Beteiligung bei der zellulären Adhäsion auch Signalfunktionen. Es konnte gezeigt werden, dass Syndecan-4 dimerisieren und dann Proteinkinase Cα binden kann. Die daraus resultierende Signalkaskade hat Auswirkungen auf das Zytoskelett und dadurch auch auf das Migrationsverhalten der Zelle [4,75,61]. In neuesten Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Syndecan-4 über Aktivierung von Metalloproteinasen direkt am Knorpelabbau bei Osteoarthritis

beteiligt ist. Bei Syndecan-4-defizienten Mäusen oder nach intraartikulärer Injektion von Syndecan-4-spezifischen Antikörpern kam es zu einem deutlich geringeren Proteoglykanverlust und damit zu geringeren Knorpelschäden [22].
Syndecane können also über verschiedene Mechanismen an Zellregulationen und Entwicklungsvorgängen Einfluss nehmen. Auch wenn bereits einige Funktionen aufgedeckt wurden, so ist doch das meiste noch unbekannt.

#### 1.2.1.3 Betaglykan

Betaglykan ist ebenfalls ein membran-assoziiertes Proteoglykan mit einer Transmembrankomponente und einem kurzen intrazellulären Proteinanteil [51]. Betaglykan kann neben Heparansulfatketten auch Chondroitinsulfatketten tragen.
Für Betaglykan wurde nachgewiesen, dass es für TGF- β die Funktion eines Korezeptors besitzt, indem es das an das Core-Protein gebundene TGF- β dem TGF- β Typ II Rezeptor präsentiert [52]. Die Heparansulfatketten sind hierbei nicht direkt beteiligt, allerdings können diese wie alle Heparansulfatketten ebenfalls Wachstumsfaktoren binden [13,19].
Obwohl Betaglykan eine kurze intrazelluläre Proteindomaine besitzt, sind bisher keine Interaktionen mit intrazellulären Proteinen im Sinne einer Signaltransduktion nachgewiesen worden.
Da TGF- β ein potenter Regulator der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Bildung extrazellulärer Matrix ist, kommt damit auch Betaglykan eine gewisse Bedeutung für Entwicklungsvorgänge zu [5,10,41,63].

### 1.2.2 Extrazelluläre Heparansulfatproteoglykane

#### 1.2.2.1 Agrin

Agrin ist ein in der extrazellulären Matrix vorkommendes Heparansulfatproteoglykan. Es gehört zu den quantitativ häufigsten Proteoglykanen bestimmter Basalmembranen, z.B. in den Glomeruli der Nieren [29] oder im synaptischen Spalt [58]. Dort geht es nicht nur lokale Interaktionen mit Komponenten der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren, im Sinne einer Bindung und Speicherung, ein, sondern es kann auch mit membran-assoziierten Proteinen von Zellen interagieren. So bewirkt Agrin z.B. im synaptischen Spalt an der postsynaptischen Membran eine

Aggregation von Acetylcholin-Rezeptoren [57]. In neueren Studien konnte auch gezeigt werden, dass Agrin von Chondrozyten in großer Menge exprimiert wird und dass es ohne Agrin zu einem retardierten skeletalen Wachstum kommt [33].

#### 1.2.2.2 Perlecan

Perlecan ist ebenfalls ein in Basalmembranen häufig vorkommendes Heparansulfatproteoglykan. Untersuchungen an Knock-out Mäusen durch Costell et al. (1999) brachten überraschende Ergebnisse [18]. So starben ein Grossteil der Mäuse während der Embryogenese an Blutungen in den Perikardsack, was die Vermutung nahe legte, dass Perlecan für die Integrität der Basalmembranen im Herzen eine kritische Rolle spielen. Die zweite Überraschung war, dass die Mäuse, die bis zur Geburt lebten, schwere Skelettfehlbildungen aufwiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Knorpelentwicklung und das enchondrale Wachstum ohne Perlecan entscheidend gestört sind.

## 1.3 Zielsetzung

Mesenchymale Stammzellen könnten bei einer Vielzahl degenerativer Erkrankungen des Stütz- und Bindegewebes therapeutisch zum Einsatz kommen. So wäre es zum Beispiel denkbar, Stammzellen bei der Behandlung der Osteoporose einzusetzen, bei welcher die Fehldifferenzierung von Stammzellen zu vermehrt Adipozyten anstelle von Osteoblasten einen Pathogeneseaspekt darstellt. Dazu müsste man „nur“ in den Differenzierungsprozess zu Gunsten der Osteoblasten eingreifen. Hierfür ist die genaue Kenntnis der Wachstums- und Differenzierungsbedingungen erforderlich. Besonders die Interaktionen der Stammzellen untereinander, mit der extrazellulären Matrix und mit Wachstumsfaktoren müssen verstanden werden.
Heparansulfatproteoglykane greifen in eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen ein. Sei es als Adhäsionsfaktor oder als Rezeptor bzw. Co-Rezeptor für Signalmoleküle. Eine wesentliche Beteiligung an Differenzierungsprozessen erscheint nicht unwahrscheinlich.
Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung mesenchymaler Stammzellen, osteogen differenzierter Zellen und reifer Zellen hinsichtlich Heparansulfatproteoglykane. Es soll untersucht werden:

- Welche Heparansulfatproteoglykane werden von mesenchymalen Stammzellen exprimiert ?

- Verändert sich die Heparansulfatproteoglykan-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung ?

- Unterscheidet sich die Heparansulfatproteoglykan-Expression der mesenchymalen Stammzellen von reifen Zellen ? Unterscheidet sich die Expression der osteogen differenzierten Zellen von der bei Osteoblasten ?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Zellen

Die mesenchymalen Stammzellen stammen von bei orthopädischen Operationen gewonnenen Knochenmarkaspiraten. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich dabei um Umstellungs-osteotomien bei Hüftdysplasie. Für diese Arbeit wurden dabei Zell-Proben von 8 Spendern verwendet. Tabelle 1 zeigt Alter und Geschlecht der Spender. Die verwendeten Osteoblasten und Chondrozyten stammen ebenfalls von Operationspräparaten, meistens Gelenkersatzoperationen bei Arthrose. Die Gewinnung aller Zellen erfolgte nach Aufklärung und nach Zustimmung der Patienten gemäß den Richtlinien der Ethik-Kommission der Universität Ulm.
Die Adipozyten wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Wabitsch von der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Ulm überlassen.

**Tabelle 2:** Alter und Geschlecht der Spender der verwendeten Stammzellen für die osteogene Differenzierung

| | **Alter** | **Geschlecht** |
|---|---|---|
| **1** | 37 | männlich |
| **2** | 48 | weiblich |
| **3** | 37 | männlich |
| **4** | 35 | weiblich |
| **5** | 16 | männlich |
| **6** | 37 | weiblich |
| **7** | 25 | weiblich |
| **8** | 35 | weiblich |

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Geräte

| | |
|---|---|
| ABI Prism SDS 7000 | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |
| Axiovert 35 Mikroskop | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| CASY-1 Zellzähler | Schärfe-System GmbH, Reutlingen, Deutschland |
| Centrifuge GS-15R | Beckman, Palo Alto, CA, USA |
| Centrifuge Allegra 64R | Beckman, Palo Alto, CA, USA |
| GeneAmp PCR System 2400 | Perkin Elmer, USA |
| ImageMaster VDS | Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland |
| Megafuge 1.0 | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Primus 96 plus | MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland |
| Reinraumwerkbank | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |
| Robocycler Gradient 96 | Stratagene |
| Ultrospec 3000 | Pharmacia Biotech , Freiburg, Deutschland |
| Wärmeschrank BBD 6220 | Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |

### 2.2.2 Chemikalien

| | |
|---|---|
| Anilinblauphosphormolybdänsäure | Chroma-Geselschaft, Schmid GmbH&Co, Köngen, D |
| Aqua B.Braun | B Braun, Melsungen, Deutschland |
| β-Glycerophosphat, | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Bicoll Separating Solution | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Bromphenolblau | |
| Casyton Verdünnungslösung | Schärfe-System GmbH, Reutlingen, Deutschland |
| Dexamethason | Thiemann Arzneimittel GmbH, Waltrop, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Dulbecco's MEM (1x) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) | PAA Laboratories, |
| Ethanol absolut | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Ethidium Bromid | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Fetales Kälberserum | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Formaldehyd | Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland |
| Hämatoxylin III nach Gill | Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| HotStarTaq MasterMix | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Kernechtrot | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz |
| L-Ascorbinsäure | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz |
| L-Glutamin (200mM) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumthiosulfat Pentahydrat | Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Oil-Red O | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| Omniscript RT Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Orange G | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |

| | |
|---|---|
| peqGOLD 100bp DNA-Leiter | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland |
| Platinum SYBR Green qPCR Supermix | Invitrogen |
| Primer | MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland |
| Protector RNase Inhibitor | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| Pyrogallol | Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| SeaKem LE Agarose | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Silbernitrat | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Tris-Puffer | Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland |
| Trypsin/EDTA Solution (10x) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |

**Tabelle 3 :** Verwendete Primer für konventionelle PCR und Realtime-PCR (RT). „Accession“ bezeichnet den entsprechenden Datenbankeintrag, „Amplifikat-Position“ bezeichnet die Position des Amplifikationsproduktes in der Sequenz („bp“ = Basenpaare).

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Adlican** | | Accession | NM_015419 |
| Ampflifikat-Position | 7677-7924 bp | Amplifikat-Länge | 248 bp |
| 5’-Primer | 5’-CAT CAG CCT CAA CTG CTC TG-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GCT TGT TTG CTT CTG GCT TC-3’ | | |
| **Agrin** | | Accession | NM_198576 |
| Ampflifikat-Position | 5712-5943 bp | Amplifikat-Länge | 232 bp |
| 5’-Primer | 5’-CTG CAG AGC AAC CAC TTT GA-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-AAC CTT CCC TCT GCT CCC TA-3’ | | |
| Ampflifikat-Position RT | 5655-5742 bp | Amplifikat-Länge RT | 88 bp |
| 5’-Primer RT | 5’-TTT GAC GGG CGG ACC TT-3’ | | |
| 3’-Primer RT | 5’-GCA GGC TCA GTT CAA AGT GGT T-3’ | | |
| **Betaglykan** | | Accession | NM_003243 |
| Ampflifikat-Position | 2450-2697 bp | Amplifikat-Länge | 248 bp |
| 5’-Primer | 5’-GAG CTG ACG CTG TGT ACT AA-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-ATC ACG GTT AGG GTG TCC AG-3’ | | |
| Ampflifikat-Position RT | 2154-2233 bp | Amplifikat-Länge RT | 80 bp |
| 5’-Primer RT | 5’-CCC AGG GCG TCT TCT CTG T-3’ | | |
| 3’-Primer RT | 5’-TCC CAG TTC TTG TTC AGC CTT AG-3’ | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **CD 44 - 2** | | Accession | NM_000610 |
| Ampflifikat-Position | 2318-2443 bp | Amplifikat-Länge | 126 bp |
| 5’-Primer | 5’-TGG GAG TCA AGA AGG TGG AG-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-ACT GCA ATG CAA ACT GCA AG-3’ | | |
| **Glypican 1** | | Accession | NM_002081 |
| Ampflifikat-Position | 1728-1938 bp | Amplifikat-Länge | 211 bp |
| 5’-Primer | 5’-GTC AGC AGG AAG AGC TCC AG-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-AAG TCA GTC CTT GGC CTC TG-3’ | | |
| **Glypican 2** | | Accession | AY093588 |
| Ampflifikat-Position | 1694-1766 bp | Amplifikat-Länge | 73 bp |
| 5’-Primer | 5’-AAC GTG GTT CGT GGC TGT CT-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GAA TCC CCT CAC CCA GAT AGT TG-3’ | | |
| **Glypican 3** | | Accession | NM_004484 |
| Ampflifikat-Position | 1698-1869 bp | Amplifikat-Länge | 172 bp |
| 5’-Primer | 5’-ATG AGT GCA TTG GAG GCT CT-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GAA TGA ACG TTC CCG AGG T-3’ | | |
| **Glypican 4** | | Accession | NM_001448 |
| Ampflifikat-Position | 239-478 bp | Amplifikat-Länge | 240 bp |
| 5’-Primer | 5’-TCT CTG CAC CCT GGC AGT-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-TCG CTG ACC ACA CTT TTG AA-3’ | | |
| Ampflifikat-Position RT | 1582-1667 bp | Amplifikat-Länge RT | 86 bp |
| 5’-Primer RT | 5’-CAG ACA TAC TGA TCC TTC GTC AAA TC-3’ | | |
| 3’-Primer RT | 5’-GTC CAC GTC GTT CCC ATT G-3’ | | |
| **Glypican 5** | | Accession | NM_004466 |
| Ampflifikat-Position | 430-666 bp | Amplifikat-Länge | 237 bp |
| 5’-Primer | 5’-CTC CTT CTG GCC CTG GTT-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GGA CGT TTG AAG AAA CTG CTG-3’ | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Glypican 6** | | Accession | NM_005708 |
| Ampflifikat-Position | 636-859 bp | Amplifikat-Länge | 224 bp |
| 5’-Primer | 5’-TGT GAT TCT TCC CCT CTT GG-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-CGA GTT TGC TTT GTT GGC TTA-3’ | | |
| Ampflifikat-Position RT | 2002-2082 bp | Amplifikat-Länge RT | 81 bp |
| 5’-Primer RT | 5’-CAG ATT ATG GCT CTC CGT GTG AT-3’ | | |
| 3’-Primer RT | 5’-ACT TGT GTC CTG GAA ATT GAC ATC-3’ | | |
| **Perlecan** | | Accession | NM_005529 |
| Ampflifikat-Position | 12456-12673 bp | Amplifikat-Länge | 218 bp |
| 5’-Primer | 5’-TGT GTG AGC ACG AGG AGA AC-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GAG GCC ATC ATC GTG GAA AT-3’ | | |
| **Syndecan 1** | | Accession | NM_001006946 |
| Ampflifikat-Position | 467-664 bp | Amplifikat-Länge | 198 bp |
| 5’-Primer | 5’-GCT ACT AAT TTG CCC CCT GA-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GGA GGT GGA GGC AGC TGT AG-3’ | | |
| **Syndecan 2** | | Accession | NM_002998 |
| Ampflifikat-Position | 149-351 bp | Amplifikat-Länge | 203 bp |
| 5’-Primer | 5’-CGC TGC TCT CCA GAT ACC C-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GGG AAG GCT GCT CTC TGA A-3’ | | |
| **Syndecan 3** | | Accession | NM_014654 |
| Ampflifikat-Position | 859-1102 bp | Amplifikat-Länge | 244 bp |
| 5’-Primer | 5’-GAC ATC CCT GAG AGG AGC AC-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-GTG TCC CAG CTG GAG ATG AT-3’ | | |
| **Syndecan 4** | | Accession | NM_002999 |
| Ampflifikat-Position | 159-397 bp | Amplifikat-Länge | 239 bp |
| 5’-Primer | 5’-GAG CCC TAC CAG ACG ATG AG-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-AAC GGG TGA GAT TCT CTT GG-3’ | | |
| **Testican 1** | | Accession | NM_004598 |
| Ampflifikat-Position | 818-1042 | Amplifikat-Länge | 225 bp |
| 5’-Primer | 5’-AGA GTC ATC AAG CCC ACC AG-3’ | | |
| 3’-Primer | 5’-AGA AAG CTT GCC ATC CTT GA-3’ | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase** | | Accession | NM_002046 |
| Ampflifikat-Position | 391-578 bp | Amplifikat-Länge | 188 bp |
| 5'-Primer | 5'-GAG TCC ACT GGC CTC TTC AC-3' | | |
| 3'-Primer | 5'-GGT GCT AAG CAG TTG GTG GT-3' | | |
| Ampflifikat-Position RT | 606-661 bp | Amplifikat-Länge RT | 56 bp |
| 5'-Primer RT | 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT G-3' | | |
| 3'-Primer RT | 5'-TCT TCT GGG TGG CAG TGA TG-3' | | |
| **Alkalische Phosphatase** | | Accession | NM_000478 |
| Ampflifikat-Position | 998-1186 | Amplifikat-Länge | 189 bp |
| 5'-Primer | 5'-ACC TCG TTG ACA CCT GGA AG-3' | | |
| 3'-Primer | 5'-CCA CCA TCT CGG AGA GTG AC-3' | | |
| **Bone Sialoprotein** | | Accession | NM_004967 |
| Ampflifikat-Position | | Amplifikat-Länge | |
| 5'-Primer | 5'-ACA CTG GGC TAT GGA GAG GA-3' | | |
| 3'-Primer | 5'-CTG CCT CTG TGC TGT TGG TA-3' | | |
| **Osteocalcin** | | Accession | NM_199173 |
| Ampflifikat-Position | 142-335 | Amplifikat-Länge | 194 bp |
| 5'-Primer | 5'-GGC AGC GAG GTA GTG AAG A-3' | | |
| 3'-Primer | 5'-AGC AGA GCG ACA CCC TAG A-3' | | |

### 2.2.3 Sonstige Materialien

| | |
|---|---|
| 0,2ml Plastibrand Reaktionsgefäße, | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland |
| 96-well Platte | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |
| Costar Stripette 5,10,25,50ml | Corning Incorporated, USA |
| Multiwell 6-well | Becton Dickinson , Heidelberg, Deutschland |
| Optical Adhesive Covers | Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland |
| PP-Röhrchen 14ml | Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Tip-Racks, Plastibrand | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland |
| Tissue Culture Flask 250ml / 75cm² | Becton Dickinson , Heidelberg, Deutschland |
| Tubes 15ml / 50ml | Becton Dickinson , Heidelberg, Deutschland |

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Stammzell-Isolierung

Die Isolation mesenchymaler Stammzellen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation sowie selektiver Adhärenz an Plastikoberflächen wie bereits in mehreren Studien beschrieben [64].
Zur Erzeugung des Dichtegradienten für die Zellseparation wurden 8ml der Trenn-Lösung (Bicoll Separating Solution) in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und 30 Minuten bei 13500$g_n$ zentrifugiert. Je nach Ausgangsmenge des Knochenmarkaspirats wurden mehrere Gradientenröhrchen vorbereitet.
Das Aspirat wurde in einer Petrischale mit DMEM gemischt und gründlich resuspendiert. Bereits entstandene Koagel wurden durch vorsichtiges Pipettieren gelöst. Die Proben mussten schnell verarbeitet werden, um eine komplette Koagulation zu vermeiden. Die Zugabe von Antikoagulantien (wie z.B. Heparin) zur Vermeidung der Gerinnung konnte wegen möglicher Beeinflussung des Differenzierungsverhaltens der Zellen nicht verwendet werden. 2 ml der Zellsuspension wurden auf den Gradienten pipettiert und anschließend 30 Minuten bei 600$g_n$ zentrifugiert. Die obere Zellen enthaltende Schicht wurde entnommen, in eine 75cm² - Zellkultur-Flasche gegeben und mit 8ml Nährmedium aufgefüllt. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, nicht-adhärente Zellen durch zweimaliges Spülen mit PBS abgewaschen und wieder frisches Nährmedium hinzugegeben.

### 2.3.2 Osteoblasten- und Chondrozytenisolierung

Die Osteoblasten und Chondrozyten wurden mir von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die jeweilige Zellgewinnung erfolgte zuvor nach folgenden Methoden:
Das bei Hüft- oder Kniegelenksersatzoperationen gewonnene Knochenmaterial wurde mit Kollagenase versetzt und 2 Stunden inkubiert. Die daraus gelösten Zellen wurden in Standardnährmedium (DMEM, 10% hitzeinaktiviertes FKS sowie 2mM L-Glutamin-Lösung und 100U/ml Penicillin/Streptomycin) suspendiert und kultiviert.
Knorpelpräparate wurden 45-60 Minuten mit Pronase 9 U/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) inkubiert. Nach entsprechenden Spülvorgängen erfolgte eine erneute Inkubation mit Kollagenase 80 U/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) für 14-16 Stunden. Nach erneutem Waschen mit DMEM und Filtrieren durch einen 70µm-Zellsieb wurden die gewonnenen Zellen in

Komplettnährmedium (Ham's F12-Medium und DMEM im Verhältnis 1:1, 10% FKS, 0.5% Penicillin/Streptomycin, 0.5% L-Glutamin und 10µg/ml Ascorbat-2-phosphat) kultiviert.

### 2.3.3 Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37°C, 5% $CO_2$ und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Nährmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Das Standardnährmedium bestand aus DMEM, 10% hitzeinaktiviertes FKS sowie 2mM L-Glutamin-Lösung und 100U/ml Penicillin/Streptomycin. Das Nährmedium für die osteogene Differenzierung enthielt zusätzlich 10nM Dexamethason, 50µg/ml Ascorbat-2-phosphat sowie 10mM β-Glycerophosphat.
Zur Vermeidung einer vorzeitigen Differenzierung der Stammzellen auf Grund von Zell-Zell-Interaktionen wurden die Zellen vor Erreichen einer zu starken Zelldichte passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gespült und mit Trypsinlösung versetzt, bis der gesamte Zellrasen gleichmäßig mit einem feinen Flüssigkeitsfilm benetzt war. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen lösten sich ab und konnten durch Hinzugeben von Nährmedium (10ml) resuspendiert und auf mehrere neue Zellkulturflaschen bei geringerer Zelldichte (Splitting-Verhältnis 1:2 bis 1:3) verteilt werden.

### 2.3.4 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus den kultivierten Zellen wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit gemäß Vorgaben des Herstellers isoliert. Bei diesem Verfahren binden RNA-Moleküle ab einer Länge von ca. 200 Nukleotiden an eine Silikat-Gel enthaltende Membran. Durch mehrfache Spülungen mit teilweise hydrophoben Lösungen werden andere Substanzen und Kontaminationen herausgewaschen.
Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- Lysieren der Zellen in 600 µl RLT-Puffer welchem zuvor 6 µl Mercaptoethanol zugegeben wurde
- Zum Homogenisieren Lysat direkt auf QIAshredder-Säule pipettieren und 2 min mit 13000 rpm zentrifugieren
- 600 µl 70%-igen Ethanol zu homogenisiertem Lysat zugeben und vorsichtig mischen;

- Bis zu maximal 700 µl auf RNeasy Mini Spin Säule auftragen und 15 sek mit 13000 rpm zentrifugieren; bei größeren Probenvolumina mehrmals auftragen und zentrifugieren;
- 700 µl Puffer RW1 auf RNeasy-Säule pipettieren und 15 sek mit 13000 rpm zentrifugieren;
- RNeasy-Säule in neues 2ml-Sammelröhrchen überführen; 500µl Puffer RPE in die Säule pipettieren und 15 sek mit 13000 rpm zentrifugieren;
- Erneut 500 µl Puffer RPE in die Säule pipettieren und 2 min mit 13000 rpm zentrifugieren; Durchbruch entfernen; Erneut 1 min zentrifugieren;
- RNeasy-Säule in 1,5 ml Sammelröhrchen überführen; zur Elution der RNA 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der RNeasy-Säule pipettieren; 1min mit 13000 rpm zentrifugieren;

Die Quantifizierung der gewonnenen RNA erfolgte durch Messung der Extinktion im Photometer bei 260 nm Wellenlänge nach folgendem Protokoll:

- 5 µl Eluat mit RNase-freiem Wasser auf 70 µl auffüllen (Verdünnung 1:14);
- 70 µl RNase-freies Wasser in Küvette geben und Photometer damit auf Null setzen;
- Bestimmung der Extinktion bei 260 nm;
- Berechung der Konzentration der RNA unter der Annahme, dass eine Extinktion von E=1 ungefähr 40 µg RNA pro ml entsprechen;

  → $c_{RNA}$ [ng/µl] = 40 * $E_{260}$ * 14

Wenn die RNA nicht sofort weiterverarbeitet wurde, so wurde sie nach Zugabe von 1µl RNase-Inhibitor bei –20°C eingefroren.

### 2.3.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mittels Omniscript RT gemäß Hersteller-Vorgaben.
Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- Für die reverse Transkription wurde jeweils 1µg RNA verwendet, in Ausnahmefällen 0,5µg RNA bei nachfolgender Korrektur der Konzentration durch geringere Verdünnung.
- Das Volumen, welches 1µg RNA enthält, wird auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 5 min bei 64°C im Heizblock denaturiert;
- sofortiges Überführen auf einen Kühlblock;

- Zugabe von 8 µl des Reaktionsgemisches (2 µl 10x RT-Puffer, 2µl dNTP-Mix (5mM), 1 µl Oligo-dT Primer (20µM), 1 µl Random-Hexamer Primer (0,1 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (10 U/µl), 1 µl Omniscript RT (4 U/µl) ); sorgfältig mischen; kurz abzentrifugieren;
- 60 min bei 37°C inkubieren;
- 60 min bei 42°C inkubieren;
- gewonnene cDNA mit 80µl (bzw. 30µl bei 0,5µg RNA) RNase-freiem Wasser auffüllen;

### 2.3.6 PCR

Die Amplifikation mittels PCR erfolgte mit 32 Zyklen nach untenstehendem Programm. Es wurden Ansätze zu je 20 µl verwendet: 10µl HotStarTaq MasterMix, 8 µl Aqua dest. , 1 µl Primer-Mix (reverse primer, forward primer, je 20µM), 1µl cDNA.

| | Temperatur | Zeit | |
|---|---|---|---|
| Aktivierung der HotStarTaq Polymerase | **96° C** | **15 min** | |
| Denaturierung der Doppelstrang-DNA | **94° C** | **45 sek** | **32 Zyklen** |
| Anheften der Primer | **60° C** | **45 sek** | |
| Komplementierung zu neuen Doppelsträngen | **72° C** | **45 sek** | |
| Komplementierung unvollständiger Amplikons | **72° C** | **20 min** | |

### 2.3.7 Gelelektrophorese

Die Darstellung der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dafür wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet, welches 2µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) pro 100ml enthält. Zu den 20µl der Amplifikationsprodukte wurden 5 µl Bromphenolblau-haltiger Auftragspuffer gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 72°C im Heizblock inkubiert und anschließend 1 min mit 1000 rpm zentrifugiert. 10µl je Ansatz wurden in eine Geltasche pipettiert. Die Gelelektrophorese lief 30 min bei 120 V. Die Banden wurden im UV-Bildgeber sichtbargemacht und fotografiert.

### 2.3.8 Realtime-PCR

Zur genaueren Quantifizierung der Veränderungen auf mRNA Ebene bei Differenzierungsvorgängen wurde für den Start- und den Endpunkt der Differenzierungsversuche eine Realtime-PCR durchgeführt. Das Reaktionsgemisch besteht aus 12,5µl SYBR Green Mastermix, 5,5 µl Aqua, 5 µl verdünnter (1:5) cDNA und 2 µl Primer-Mix (reverse primer, forward primer, je 4µM).
Die PCR wurde nach untenstehendem Programm durchgeführt.

| | Temperatur | Zeit | |
|---|---|---|---|
| | **50° C** | **2 min** | |
| Aktivierung der TaqPolymerase | **95° C** | **10min** | |
| Denaturierung der Doppelstrang-DNA | **95° C** | **15 sek** | **45 Zyklen** |
| Anheften der Primer und Komplementierung | **60° C** | **60 sek** | |

Es wurde eine relative Quantifizierung bezogen auf eine serielle Standardverdünnungsreihe durchgeführt. Diese bestand aus 4 Verdünnungsstufen, jeweils 1 : 10.
Untersucht wurden die Heparansulfatproteoglykane Glypican-4, Glypican-6, Syndecan-3, Betaglykan und Agrin. Es wurden jeweils 3-fach-Bestimmungen durchgeführt. Die Mittelwerte wurden auf GAPDH bezogen, dessen Expression als sogenanntes Housekeeping-Gene im Rahmen der hier verwendeten Versuchsanordnung als nahezu konstant angenommen wurde.

### 2.3.9 Färbungen

#### 2.3.9.1 Kossa-Färbung

Zum Nachweis der erfolgten Mineralisation wurden einzelne Zellkulturen mittels der Kossa-Färbung nach folgendem Protokoll gefärbt:

- 1 Woche vor geplanter Färbung Zugabe von β-Glycerophosphat (falls nicht bereits im Differenzierungsmedium vorhanden)
- Zellen spülen mit PBS
- Fixieren in 4%igem Formalin nach Lillie über 15 min
  ( 1 Liter gepufferte 4%ige Formalinlösung besteht aus 4g Natriumdihydrogenphosphat,

6,5g Dinatriumhydrogenphosphat, 900ml Aqua dest. und 100ml Formaldehyd (37%) )

- Silbernitratlösung (5g $AgNO_3$ auf 100ml Aqua) über 60 min
- Pyrogalluslösung (1g Pyrogallol auf 100ml Aqua) über 10 min
- Fixiernatriumlösung (5g Natriumthiosulfat Pentahydrat auf 100ml Aqua) über 5 min
- Kernechtrotfärbung (5g Aluminiumsulfat + 0,1g Kernechtrot auf 100ml Aqua) über 10 min
- Zwischen dem Fixieren bzw. Färben jeweils spülen mit Aqua dest.

#### 2.3.9.2 Oil Red-O- Färbung

Zur Sichtbarmachung von Fettzellen wurde die Oil Red-O –Färbung in vereinfachter Form nach folgendem Protokoll angewendet:

- Zellen spülen mit PBS
- Fixieren in 4%igem Formalin nach Lillie über 10 min
- Färben in verdünnter, frisch filtrierter Färbelösung über 10 min
    - Stammlösung: 0,5g Oil Red-O in 100ml Isopropanol
    - verdünnte Lösung: 3 Teile Stammlösung mit 2 Teilen Aqua dest. mischen

Die Fett-Vakuolen der Fettzellen färbten sich in kräftigem rot.

### 2.3.10 Statistik

Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung wurden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Ein zweiseitiger t-Test wurde durchgeführt um statistische signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung zu bestimmen. Ein Wert von $p<0.05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Heparansulfatproteoglykan-Expression mesenchymaler Stammzellen

Wie bereits oben aufgeführt sind Heparansulfatproteoglykane an einer Vielzahl von Entwicklungsvorgängen in unterschiedlichen Geweben beteiligt. Geht man davon aus, dass sie auch bei Differenzierungsvorgängen bei mesenchymalen Stammzellen eine Rolle spielen, dann müssen sie zumindest bei diesen Zellen nachweisbar sein. Mit diesem ersten Teil der Arbeit soll überprüft werden, welche Heparansulfatproteoglykane von mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden. Dazu wurden mesenchymale Stammzellen früh nach ihrer Isolierung verwendet. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, dass diese Zellen bei geringer Zelldichte kultiviert wurden (siehe Abbildung 6) und somit so gut wie keinen Kontakt untereinander hatten, um mögliche Zell-Zell-Interaktionen zu verhindern. Dies sollte gewährleisten, dass diese Zellen noch weitgehend undifferenziert waren und nicht schon selbständig Differenzierungsschritte eingegangen sind. Dementsprechend waren die Differenzierungsmarker ALP, OC und BSP nicht bzw. kaum nachweisbar, wie in Abbildung 7 zu erkennen ist.

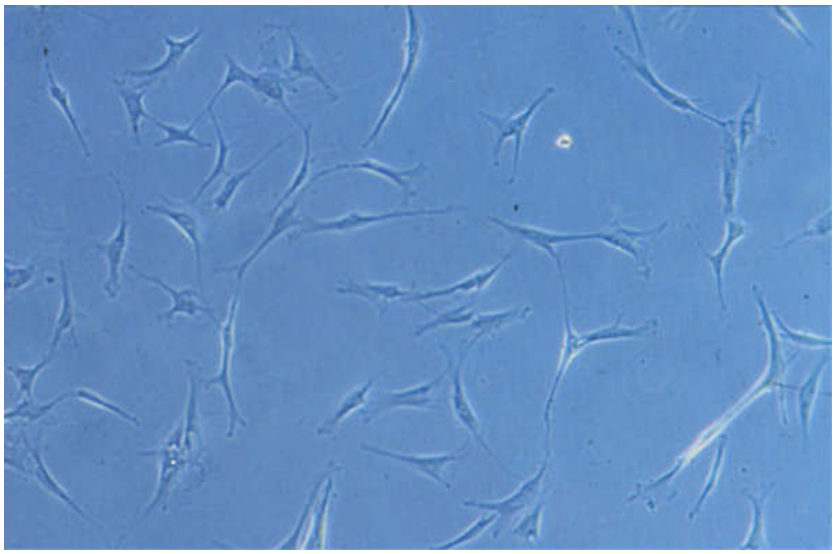


**Abbildung 6: Stammzellkultur mit geringer Zelldichte.** Phasenkontrastmikroskopie mit 10-facher Objektivvergrößerung. Sichtbar sind mesenchymale Stammzellen mit ihrer typischen spindelförmigen Morphologie. Bei geringer Zelldichte bestehen kaum Zell-Kontakte untereinander.

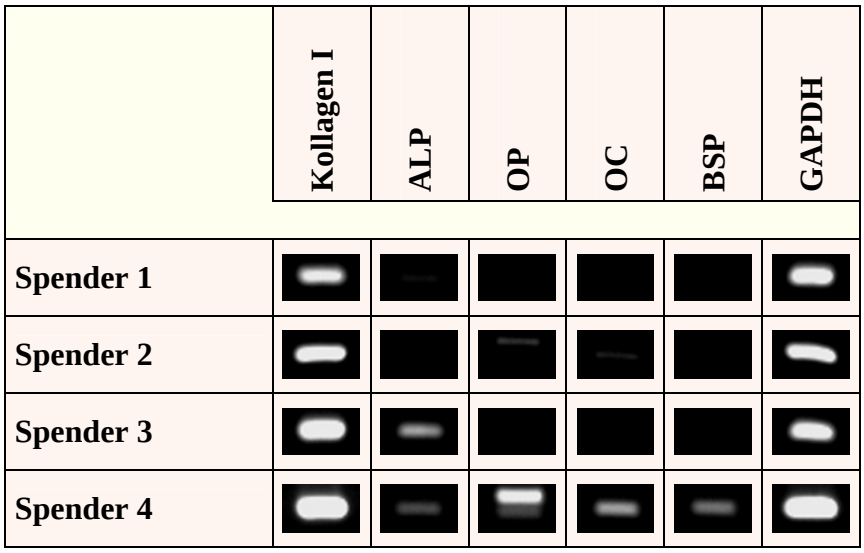



**Abbildung 7: Differenzierungsmarker von mesenchymalen Stammzellen.** ALP = alkalische Phosphatase, OP = Osteopontin, OC = Osteocalcin, BSP = Bone-Sialo-Protein, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Darstellung mittels Gelelektrophorese. Während Kollagen I und GAPDH bei allen Spendern nachweisbar waren, konnten die osteogenen Differenzierungsmarker ALP, OP, OC und BSP nicht bzw. kaum nachgewiesen werden.

Mittels PCR und nachfolgender Gelelektrophorese konnte weiter gezeigt werden, dass diese Zellen, die von verschiedenen Probanden unterschiedlichen Alters und Geschlechts stammen, zahlreiche Heparansulfatproteoglykane auf mRNA-Basis exprimieren. Dabei zeigten alle ein ähnliches Expressionsmuster. Abbildung 8 zeigt exemplarisch einige Expressionsprofile.
Glypican-1, Syndecan-2, Syndecan-3, Syndecan-4, Perlecan, Agrin, Testican und Adlican wurden von allen untersuchten Stammzellproben stark exprimiert. Glypican-4, Glypican-6, Betaglykan und CD44-2 wurden schwächer exprimiert. Die Expression von Glypican-2 und Glypican-5 konnte bei mesenchymalen Stammzellen nicht nachgewiesen werden. Glypican-3 und Syndecan-1 zeigten ein uneinheitliches Expressionsmuster, und waren, wenn vorhanden, nur sehr schwach nachweisbar.

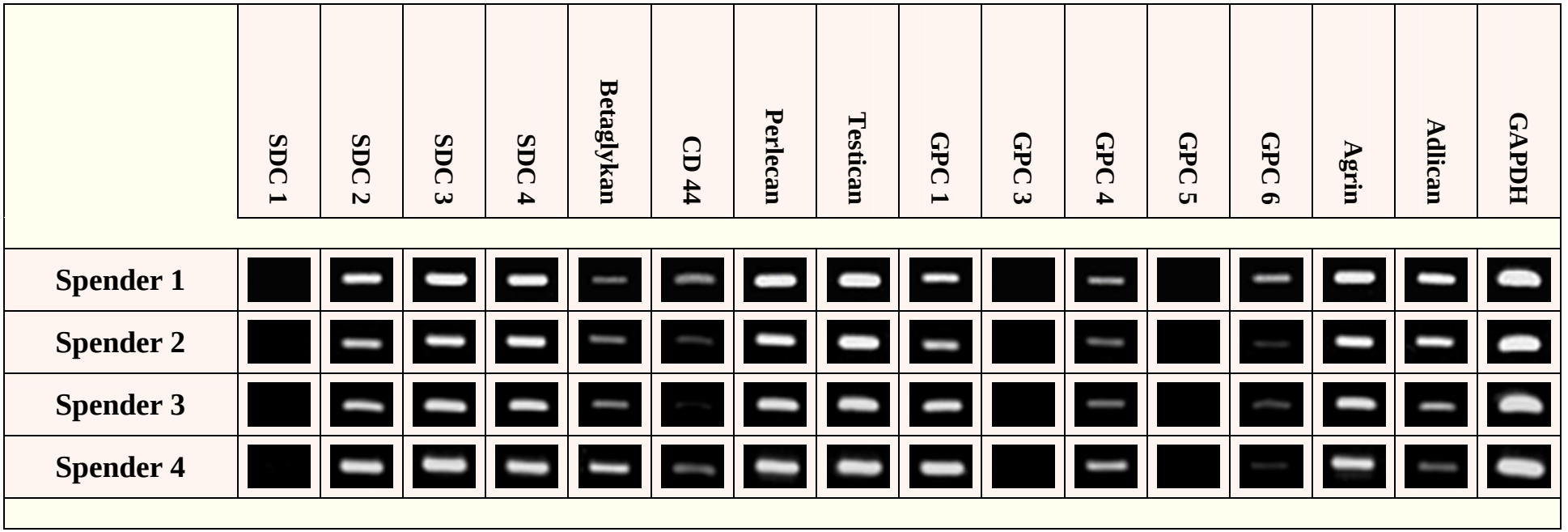



**Abbildung 8: Heparansulfatproteoglykanexpression mesenchymaler Stammzellen.** SDC = Syndecan, GPC = Glypican, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Darstellung mittels Gelelektrophorese.
Dargestellt sind exemplarisch vier Expressionsprofile von Heparansulfatproteoglykanen bei mesenchymalen Stammzellen. Es zeigte sich jeweils ein relativ ähnliches Expressionsverhalten.

## 3.2 Heparansulfatproteoglykan-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

In der vorangegangenen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen Heparansulfatproteoglykane exprimieren. Um zu überprüfen, ob es im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu Veränderungen im Heparansulfatproteoglykan-Expressionsmuster kommt, wurden diese anhand einer osteogenen Differenzierungslinie untersucht.
Dazu wurde aus weitgehend undifferenzierten Stammzellen die RNA gewonnen und die Expression zum Zeitpunkt $T_0$ untersucht. Zum Nachweis der Expression in differenzierten Zellen wurden die Stammzellen 3-4 Wochen lang in osteogenem Differenzierungsmedium wie im Material und Methodenteil 2.3.2 beschrieben, kultiviert. Die hieraus gewonnene RNA repräsentiert den Zeitpunkt $T_1$.
Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen die Unterschiede bezüglich der Mineralisation der extrazellulären Matrix zu einem frühen Zeitpunkt (nach 14 Tagen) und zum Zeitpunkt $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierung).

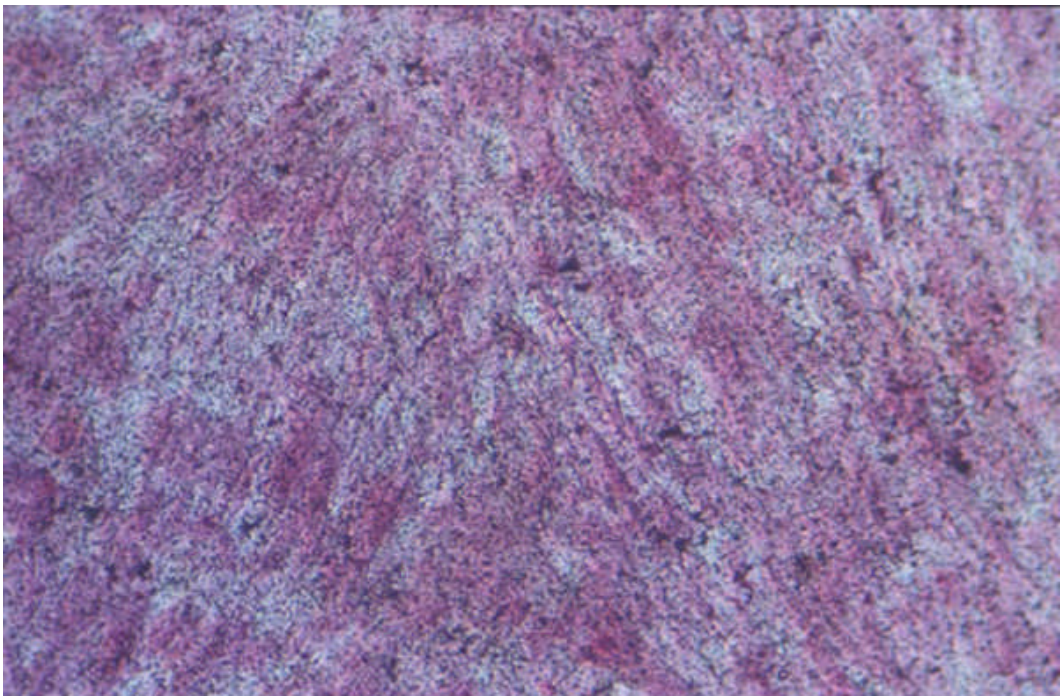


**Abbildung 9: von Kossa–Färbung einer Zellkultur nach 14 Tagen Kultivierung.** 10-fache Objektivvergrößerung.
Die mesenchymalen Stammzellen wurden 14 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Nach Färbung stellt sich mineralisiertes Gewebe schwarz dar.

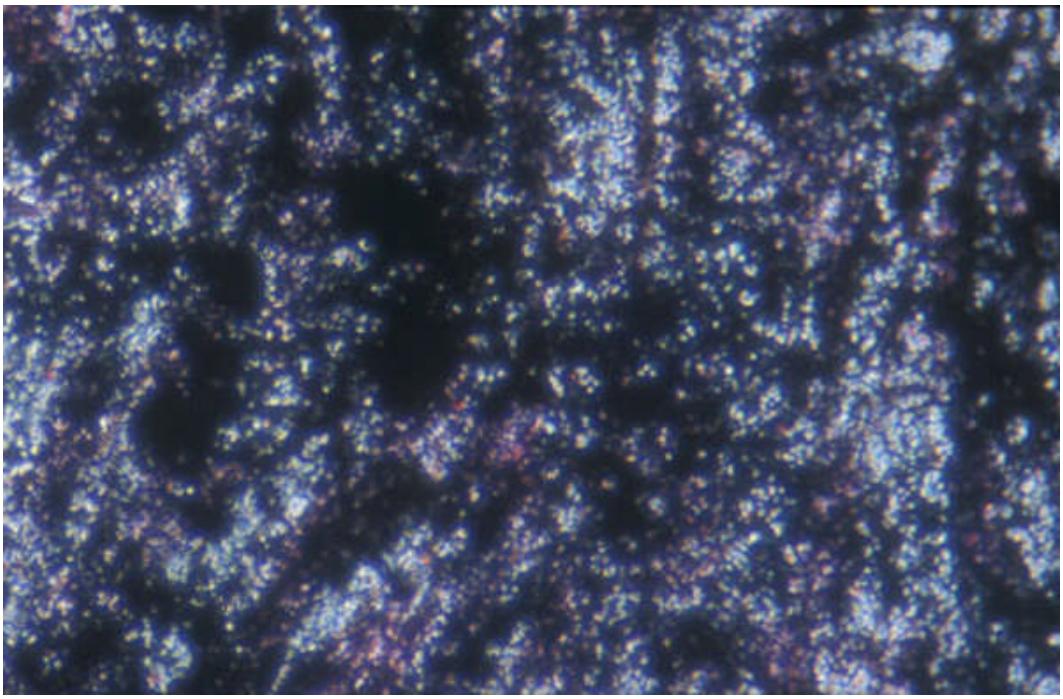


**Abbildung 10: von Kossa-Färbung einer Zellkultur nach 28 Tagen Kultivierung.** 32-fache Objektivvergrößerung.
Die Stammzellkultur wurde 28 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Nach Färbung stellt sich mineralisiertes Gewebe schwarz dar.
Es zeigt sich nun im Vergleich zu Abbildung 9 eine sehr viel stärkere Färbung als Nachweis einer erfolgten Mineralisation. Doch auch hier zeigen sich unvollständig gefärbte Areale.

Neben den mikroskopischen Veränderungen der Zellkulturen wurden auch molekularbiologische Veränderungen als Differenzierungskriterium herangezogen, nämlich die Expressionsänderungen der Differenzierungsmarker alkalische Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC) und Bone Sialoprotein (BSP).

Abbildung 11 zeigt den Vergleich der Differenzierungsmarker zu den Zeitpunkten $T_0$ und $T_1$.

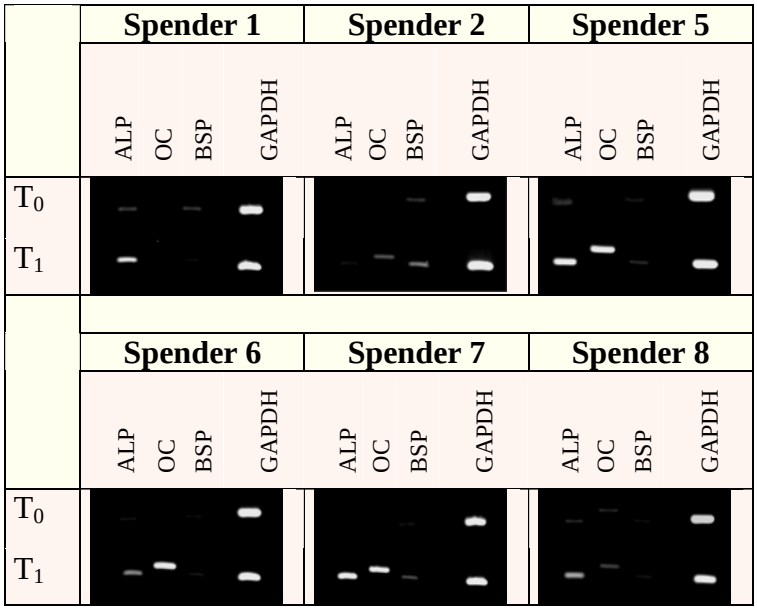



**Abbildung 11 : Nachweis der osteogenen Diferenzierungsmarker** ALP = alkalische Phosphatase, OC = Osteocalcin, BSP = Bone Sialoprotein. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Darstellung mittels Gelelektrophorese. Dargestellt sind jeweils die Differenzierungsmarker sowie GAPDH als Vergleichsparameter zu den Zeitpunkten $T_0$ (undifferenzierte Zellen) und $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierung mit einem osteogenen Differenzierungsmedium).

Dieser Vergleich zeigt, dass die genannten Differenzierungsmarker zum Zeitpunkt $T_0$ praktisch nicht nachweisbar sind, wohingegen sie zum Zeitpunkt $T_1$ vorhanden sind. Die Expression der Differenzierungsmarker ist nicht nur vom Differenzierungszustand abhängig, sondern wird z.B. auch vom Mineralisationsgrad und der Komplexität der extrazellulären Matrix beeinflusst, welche letztlich mit den Untersuchungsbedingungen variieren können. Es müssen daher nicht alle Marker gleichermaßen ausgeprägt nachweisbar sein.

Der Nachweis der zunehmenden Expression der Differenzierungsmarker sowie die Bildung einer mineralisationskompetenten Matrix belegen eine abgelaufene osteogene Differenzierung.

Eine Ausnahme macht Spender 2. Die Kultivierungszeit bis zum Nachweis der extrazellulären Matrix mittels Färbung betrug hier 40 Tage (im Vergleich zu den 28 Tagen der restlichen Spender). Trotz der langen Differenzierungszeit sind die Differenzierungsmarker kaum nachweisbar. Jedoch zeigte die von Kossa-Färbung eine deutlich mineralisierte Matrix, so dass auch hier von einer osteogenen Differenzierung gesprochen werden kann.

Nachdem bei den untersuchten Zellen (Spender 1,2,5,6,7,8) die hinreichenden Bedingungen für eine durchlaufene osteogene Differenzierung erfüllt waren, konnte nun die Untersuchung der Heparansulfatproteoglykan-Expression erfolgen. Es wurden jeweils die Zeitpunkte $T_0$ und $T_1$ miteinander verglichen.

Mittels PCR von zu beiden Zeitpunkten gewonnenen Proben lassen sich diese Unterschiede auf mRNA –Ebene nachweisen. Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Gegenüberstellung der Heparansulfatproteoglykan-Expression zweier Spender zu den Zeitpunkten $T_0$ und $T_1$ .

Folgende Heparansulfatproteoglykane fallen durch deutliche Unterschiede auf: Glypican-4, Glypican-6, Syndecan-3 und Betaglykan mit Zunahmen und Agrin mit Abnahme der Expression. Wenig Änderungen bzw. konstante Signale zeigten hingegen Glypican-1, Syndecan-4, CD 44, Perlecan und Testican. Syndecan-2 scheint bei der Differenzierung der Zellen der beiden Spender 7 und 8 ebenfalls einer starken Änderung zu unterliegen. Allerdings ließ sich dies in den anderen Fällen nicht bestätigen. Glypican-3 und Syndecan-1 wiesen, wie bereits bei der Darstellung der Heparansulfatproteoglykan-Profile bei mesenchymalen Stammzellen festgestellt, uneinheitliche Expressionsmuster auf.

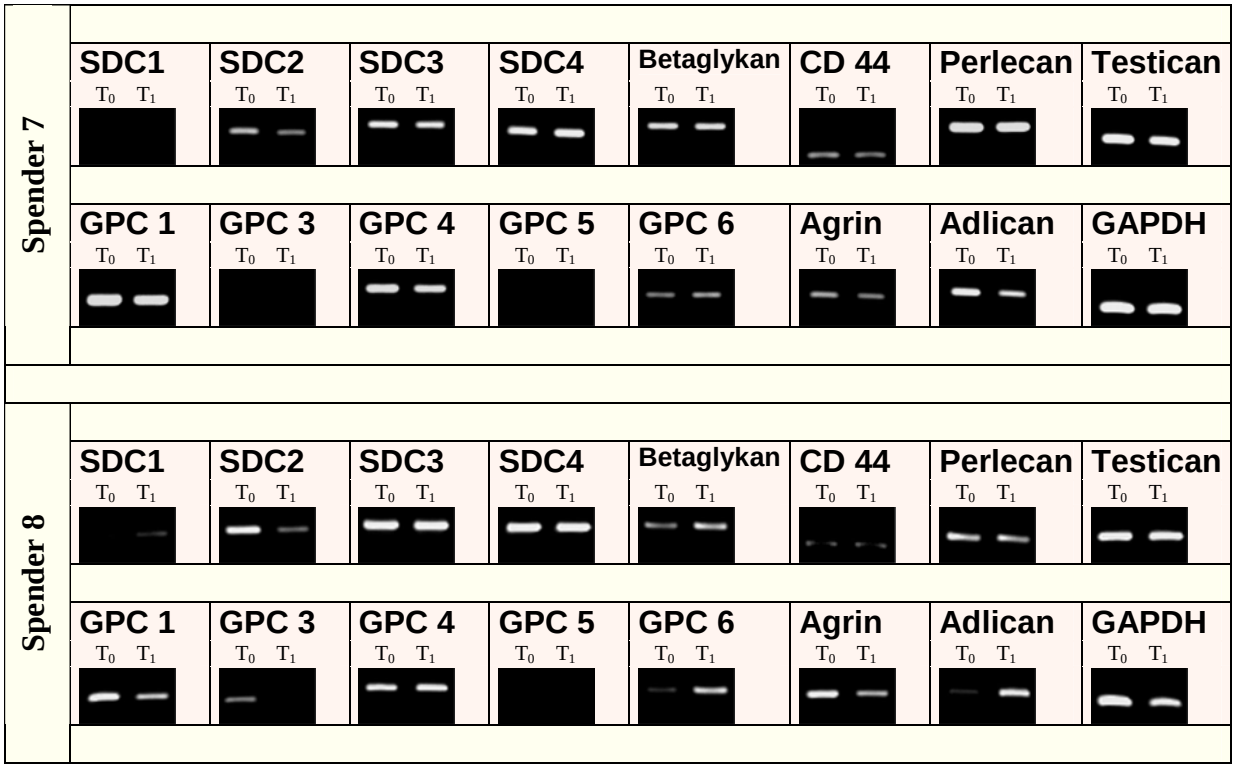



**Abbildung 12 : Gegenüberstellung der Heparansulfatproteoglykan-Expression.**
SDC = Syndecan, GPC = Glypican. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Darstellung mittels Gelelektrophorese.
Dargestellt sind jeweils die Heparansulfatproteoglykane im Vergleich der beiden Zeitpunkte $T_0$ (undifferenzierte mesenchymale Stammzellen) und $T_1$ (nach 28 Tagen

Mittels konventioneller PCR lassen sich lediglich Hinweise auf quantitative Unterschiede in der Expression einzelner Gene erhalten. Zur Quantifizierung der oben aufgeführten Unterschiede wurde daher eine Realtime-PCR für die Heparansulfatproteoglykane Glypican-4, Glypican-6, Syndecan-3, Betaglykan und Agrin durchgeführt. Als Bezugsgröße diente GAPDH, für welches als Housekeeping-Gene eine nahezu konstante Expression angenommen wird, und somit ein Vergleich bei unterschiedlichen Proben-Konzentrationen möglich ist.

Die Abbildungen 13 – 17 zeigen die Ergebnisse. Es wurden jeweils die relativen Mengen bezogen auf GAPDH sowie die prozentualen Änderungen zwischen Zeitpunkt $T_0$ und Zeitpunkt $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierung) dargestellt.

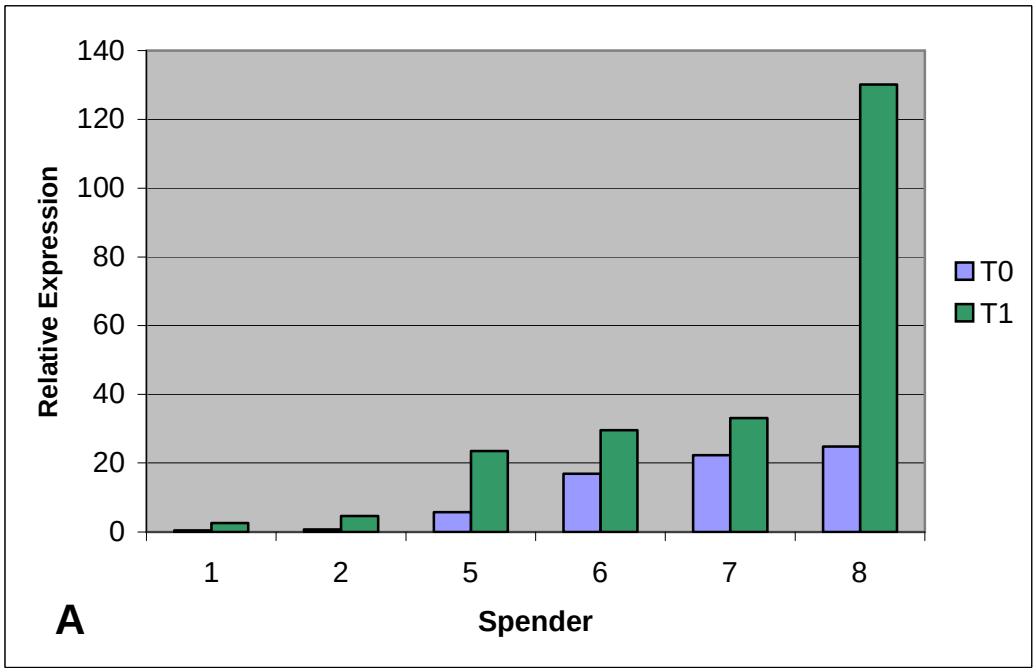
Von allen Heparansulfatproteoglykanen zeigt Betaglykan die deutlichste Änderung. Abbildung 13 zeigt einheitlich Zunahmen der Expression um bis zu 500%. Für $p<0.05\%$ liegt hier eine statistisch signifikante Expressionszunahme vor.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, unterliegt Glypican-4 einer deutlichen Expressionszunahme. Mit Ausnahme von Spender 1, bei dem die Expression von Glypican-4 im Verlauf der osteogenen Differenzierung leicht zurückgeht, sind Zunahmen auf etwa das doppelte, bei einem Spender sogar auf das sechsfache des Ausgangswertes nachzuweisen.

Die Expression von Syndecan-3 nimmt im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu. Mit Ausnahme von Spender 1, bei dem ein leichter Rückgang zu erkennen ist, zeigt Abbildung 15 Zunahmen von 80-350%. Besonders auffallend ist die Zunahme bei Spender 5 (1100%).

Entgegen den großen Expressionsunterschieden, welche in der Gegenüberstellung der Gelelektrophorese-Befunde für Glypican-6 erkennbar waren, ließen sich mit Hilfe der Realtime-PCR keine deutlichen Unterschiede nachweisen (Abbildung 16). Teilweise gehen die Werte zurück (Spender 2 und 8), teilweise nehmen sie leicht zu (Spender 5,6 und 7). Für Glypican-6 lassen sich zusammengefasst keine signifikanten Veränderungen im Expressionsverhalten nachweisen.

Die Expression von Agrin ist sehr uneinheitlich. So fallen in Abbildung 17 Expressionsabnahmen von 50% (Spender 1, 6 und 8) sowie Zunahmen um 100-200% (Spender 5 und 7) auf.
Agrin wird also im Verlauf der osteogenen Differenzierung unterschiedlich exprimiert. Es lässt sich jedoch kein einheitliches Expressionsmuster feststellen.



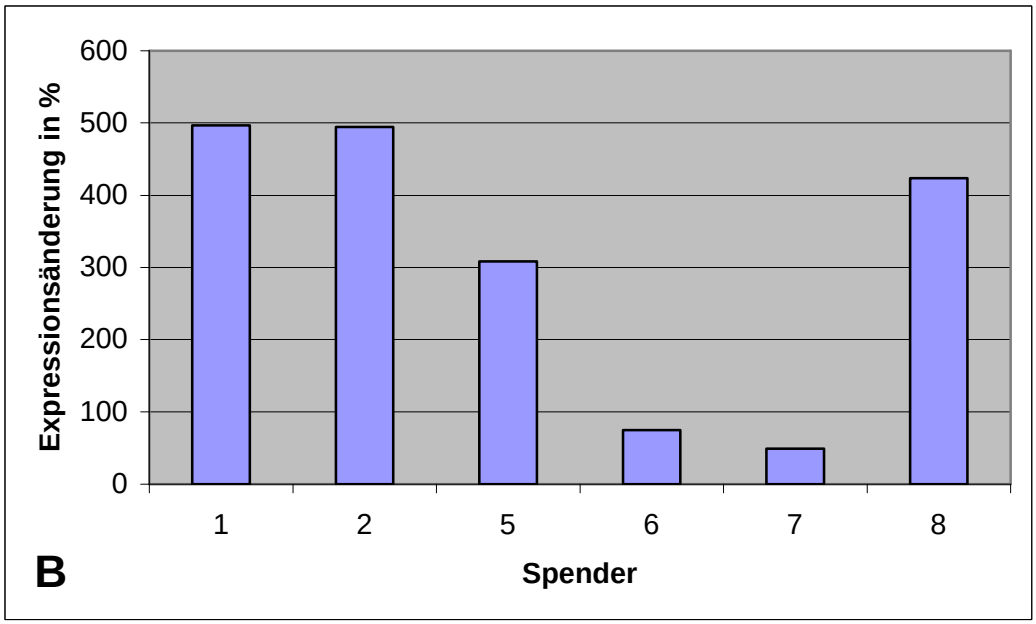




**Abbildung 13: Veränderung der Betaglykan-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.**
(A) Relative Quantifizierung von Betaglykan. Dargestellt sind jeweils die Betaglykan/GAPDH-Quotienten unter der Annahme einer konstanten GAPDH-Expression zu den Zeitpunkten $T_0$ (undifferenzierte Zellen) und den Zeitpunkten $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierungszeit mit einem osteogenen Differenzierungsmedium). Die Absolutwerte wurden mittels Realtime-PCR gewonnen. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.
(B) Prozentuale Änderung der Betaglykan-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.

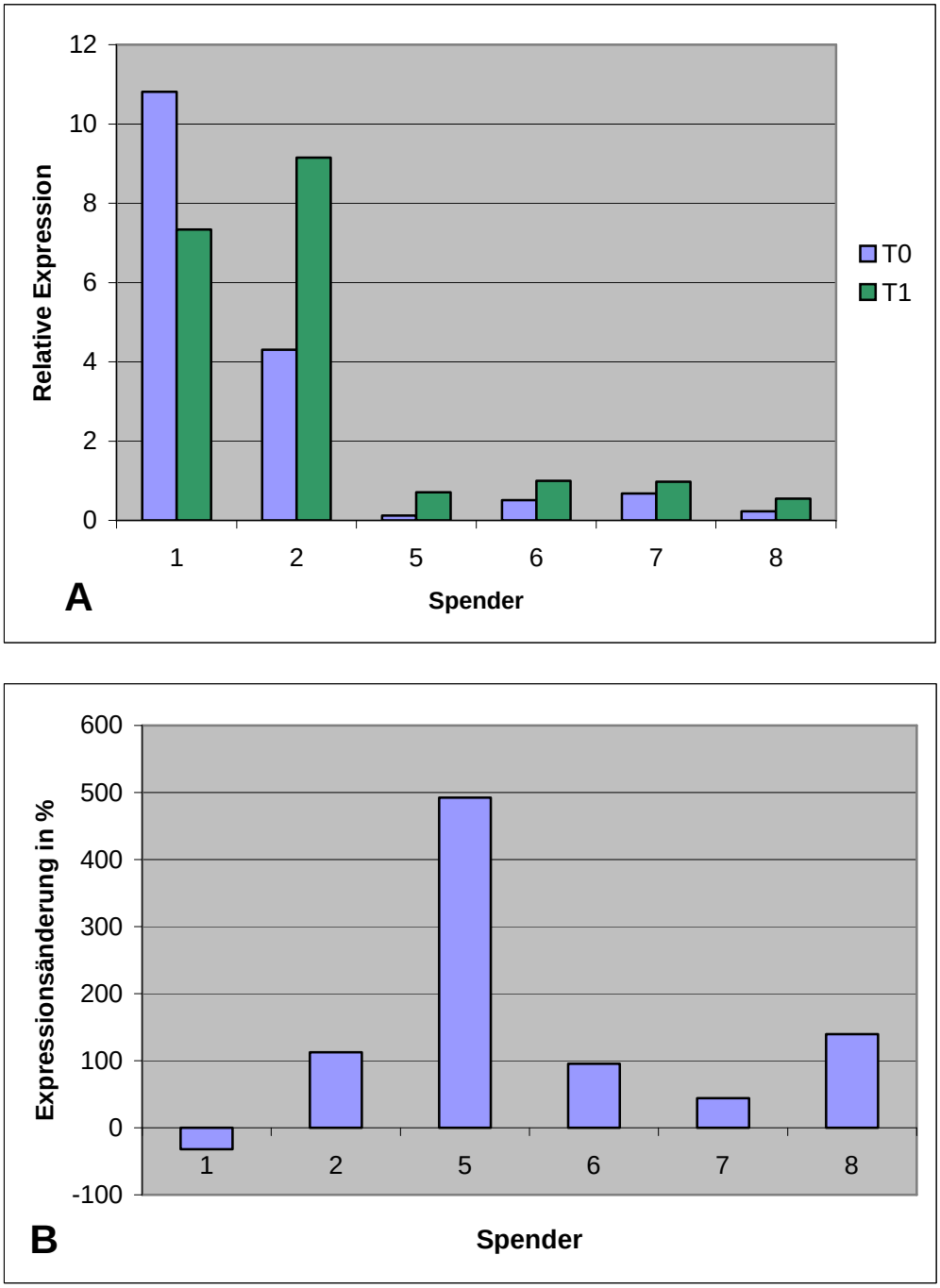
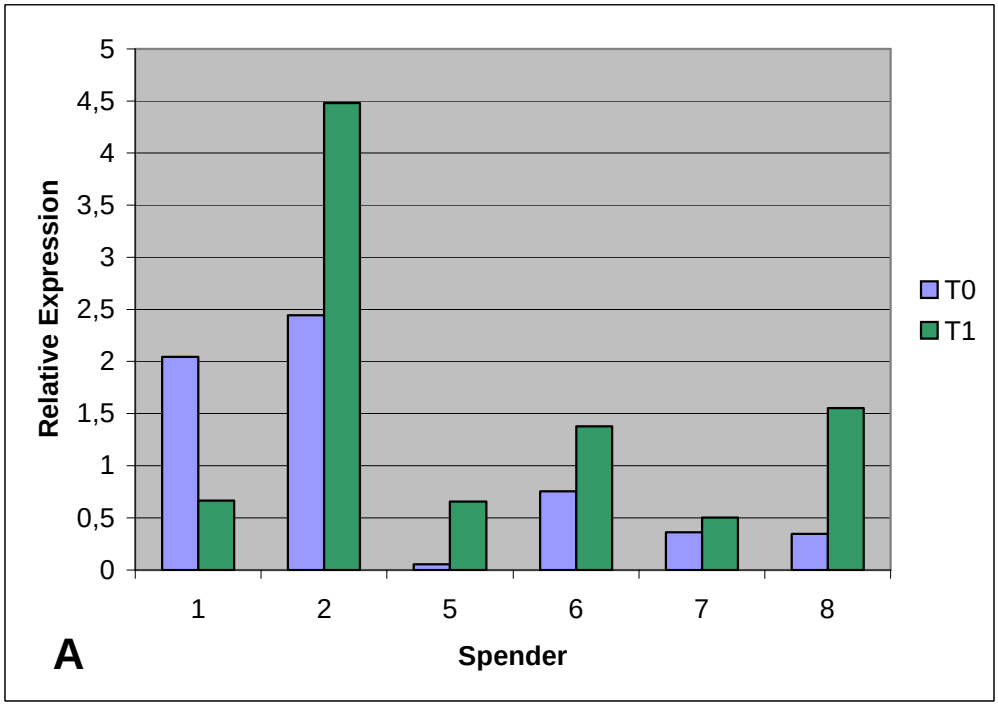



**Abbildung 14: Veränderung der Glypican-4-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.**
(A) Relative Quantifizierung von Glypican-4. Dargestellt sind jeweils die Glypican-4/GAPDH-Quotienten unter der Annahme einer konstanten GAPDH-Expression zu den Zeitpunkten $T_0$ (undifferenzierte Zellen) und den Zeitpunkten $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierungszeit mit einem osteogenen Differenzierungsmedium). Die Absolutwerte wurden mittels Realtime-PCR gewonnen. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.
(B) Prozentuale Änderung der Gylpican-4-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.



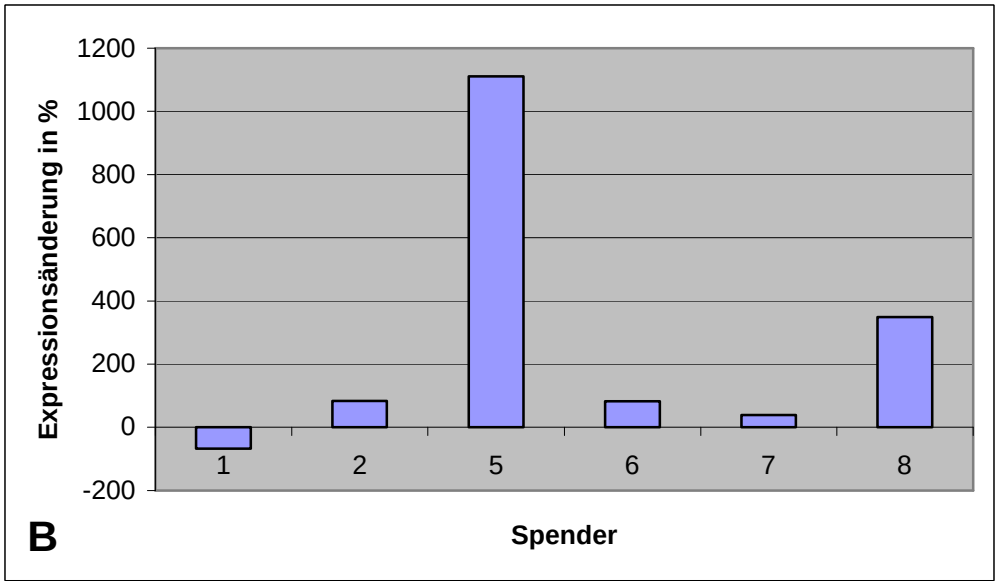
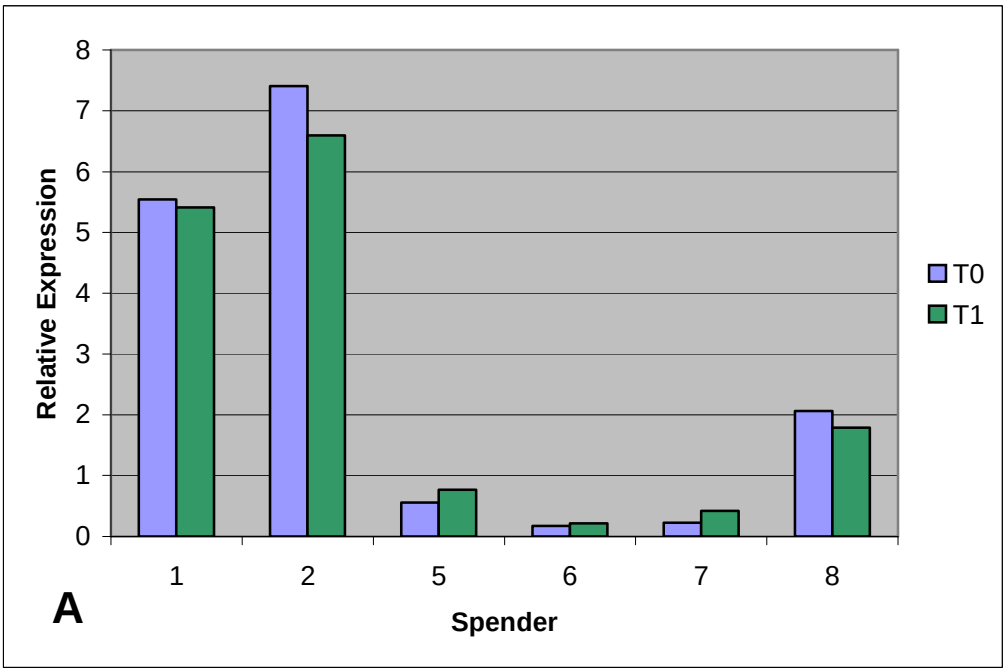




**Abbildung 15: Veränderung der Syndecan-3-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.**
(A) Relative Quantifizierung von Syndecan-3. Dargestellt sind jeweils die Syndecan-3/GAPDH-Quotienten unter der Annahme einer konstanten GAPDH-Expression zu den Zeitpunkten $T_0$ (undifferenzierte Zellen) und den Zeitpunkten $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierungszeit mit einem osteogenen Differenzierungsmedium). Die Absolutwerte wurden mittels Realtime-PCR gewonnen. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.
(B) Prozentuale Änderung der Syndecan-3-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.



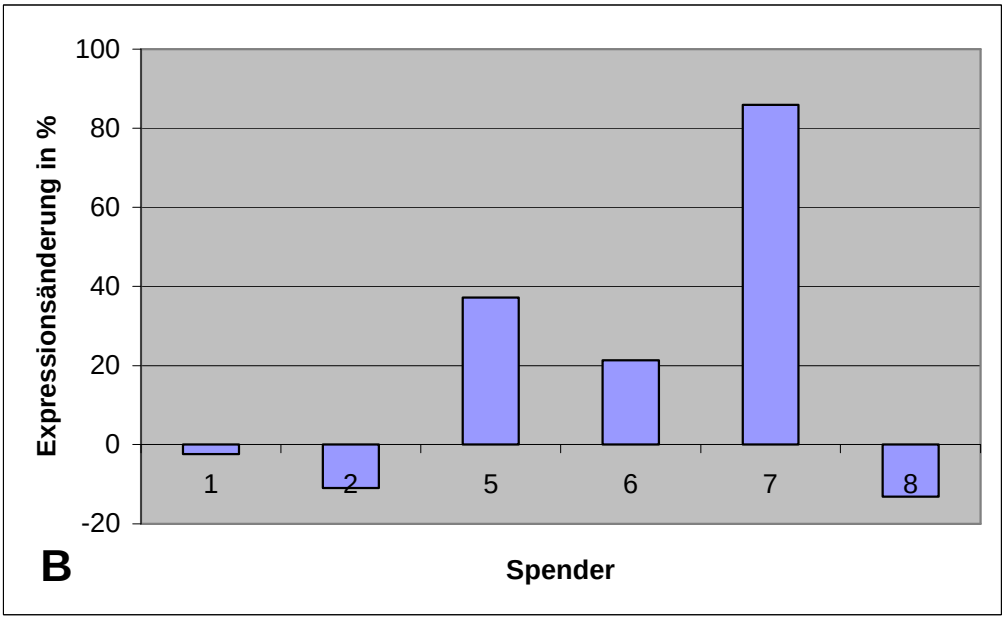
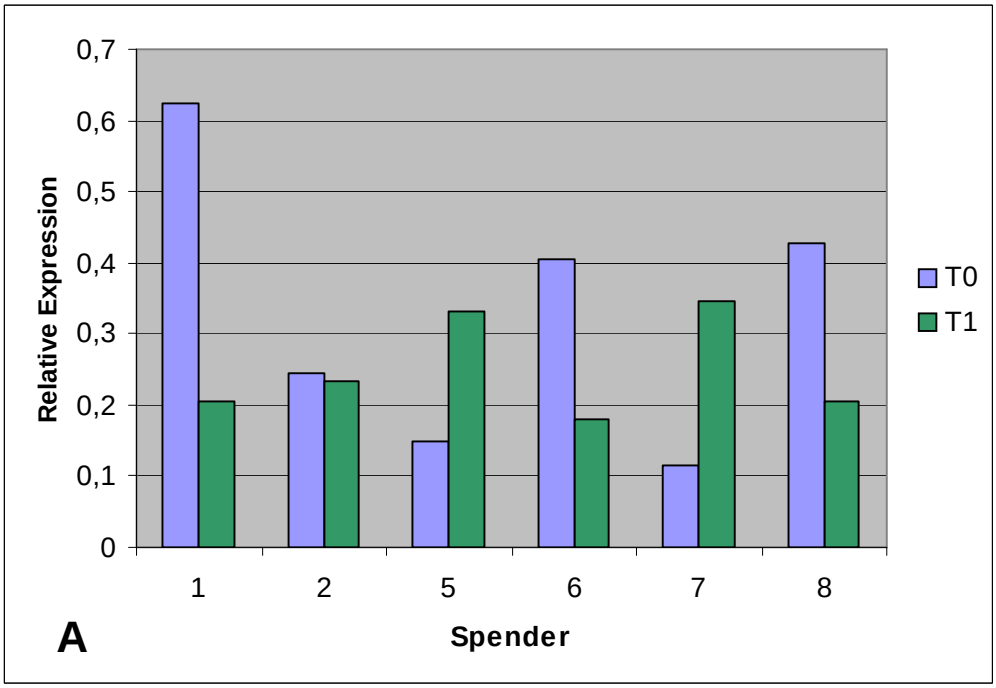




**Abbildung 16: Veränderung der Glypican-6-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.**
(A) Relative Quantifizierung von Glypican-6. Dargestellt sind jeweils die Glypican-6/GAPDH-Quotienten unter der Annahme einer konstanten GAPDH-Expression zu den Zeitpunkten $T_0$ (undifferenzierte Zellen) und den Zeitpunkten $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierungszeit mit einem osteogenen Differenzierungsmedium). Die Absolutwerte wurden mittels Realtime-PCR gewonnen. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.
(B) Prozentuale Änderung der Gylpican-6-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.



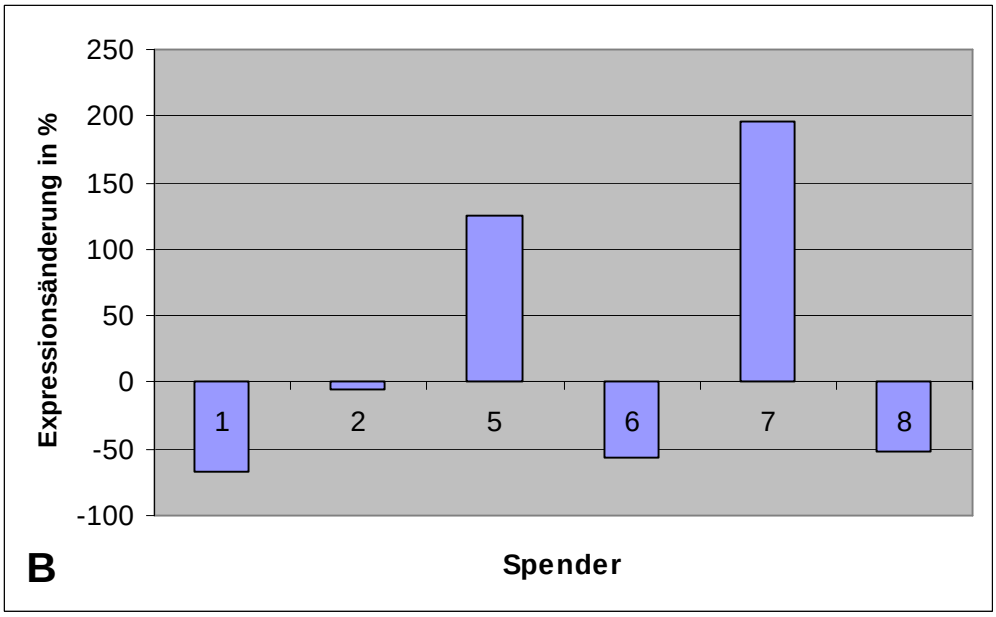




**Abbildung 17: Veränderung der Agrin-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.**
(A) Relative Quantifizierung von Agrin. Dargestellt sind jeweils die Agrin/GAPDH-Quotienten unter der Annahme einer konstanten GAPDH-Expression zu den Zeitpunkten $T_0$ (undifferenzierte Zellen) und den Zeitpunkten $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierungszeit mit einem osteogenen Differenzierungsmedium). Die Absolutwerte wurden mittels Realtime-PCR gewonnen. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.
(B) Prozentuale Änderung der Agrin-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung.

Abbildung 18 fasst die Expressionsänderungen der untersuchten Heparansulfatproteoglykane zusammen.

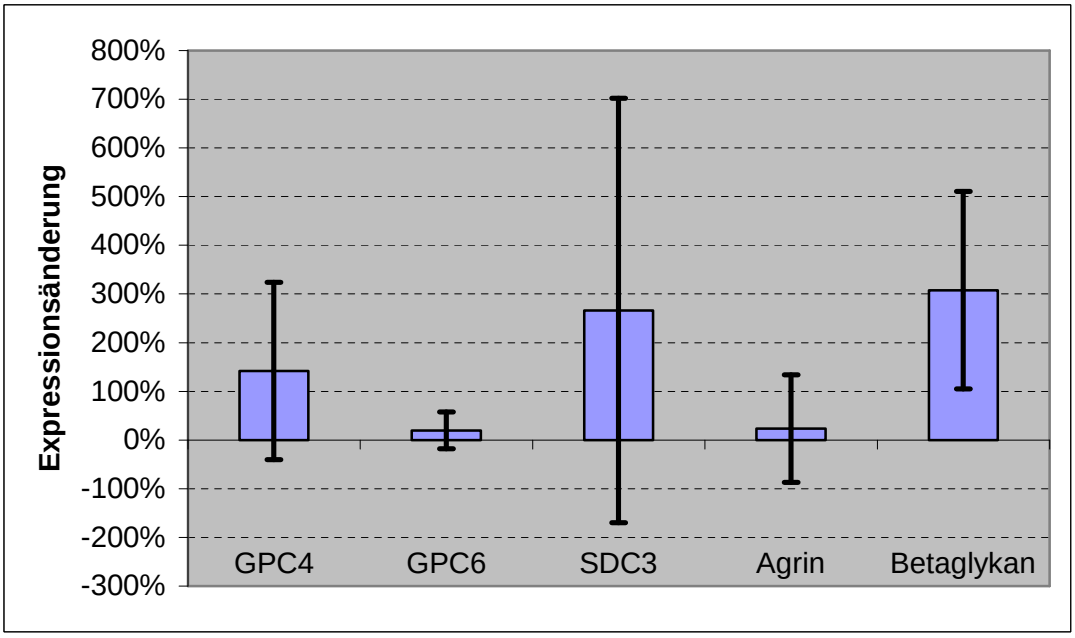



**Abbildung 18: Mittelwerte der prozentualen Expressionsänderungen sowie die zugehörigen Standardabweichungen**. GPC = Glypican, SDC = Syndecan. Dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Expressionsänderungen beim Vergleich der Zeitpunkte $T_0$ (undifferenzierte Zellen) mit den Zeitpunkten $T_1$ (nach 28 Tagen Kultivierungszeit mit einem osteogenen Differenzierungsmedium). Die Absolutwerte wurden zunächst mittels Realtime-PCR gewonnen und hierbei zu GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), für welches eine konstante Expression angenommen wird, in Relation gesetzt.
Auf Grund der extremen Expressionszunahmen für Glypican-4 und Syndecan-3 bei Spender 5 sind diese Standardabweichungen außerordentlich groß.
Für Betaglykan ergibt sich eine signifikante Expressionszunahme ($p < 0.05$), für die übrigen Parameter konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

## 3.3 Die Heparansulfatproteoglykan-Expression bei unterschiedlichen differenzierten Zellen im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen

Nachdem gezeigt wurde, dass mesenchymale Stammzellen zahlreiche Heparansulfatproteoglykane exprimieren und dass es im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu Änderungen im Expressionsmuster kommt, wurde abschließend untersucht, ob sich die Heparansulfatproteoglykan-Expression von verschiedenen differenzierten mesenchymalen Zellen, also z.B. Osteoblasten und Adipozyten, ebenfalls unterscheidet.
Um dies zu untersuchen wurden reife Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten verwendet. Die Untersuchung erfolgte erneut auf mRNA-Basis.

Ähnlich wie die mesenchymalen Stammzellen exprimieren auch die reifen mesenchymalen Zellen eine ganze Reihe von Heparansulfatproteoglykanen (siehe Abbildung 19).
Wieder ließen sich Glypican-2 und Glypican-5 nicht nachweisen. Besonders auffällig ist die starke Glypican-3 – Bande bei Adipozyten. Bei mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Chondrozyten wird Glypican-3 dagegen kaum exprimiert. Ebenso fallen Agrin und Glypican-1 auf, welche bei mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten stärker exprimiert zu werden scheinen als bei Osteoblasten und Adipozyten. Glypican-6 und Adlican wiederum werden bei Chondrozyten am stärksten exprimiert. Syndecan-2 scheint bei Adipozyten geringer exprimiert zu werden.
Für die anderen Heparansulfatproteoglykane ergaben sich keine deutlichen Unterschiede.

Zum Vergleich wurden auch die Expressionsmuster der osteogen differenzierten Zellen aufgeführt. Es zeigten sich zum Teil auch deutliche Unterschiede zwischen reifen Osteoblasten und osteogen differenzierten Zellen. Für Gylpican-4, Glypican-6 und Adlican schien die Heparansulfat-proteoglykan-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung zuzunehmen, während bei reifen Osteoblasten wiederum eine geringere Expression auftrat. Ebenso zeigten die Osteoblasten eine geringere Betaglykan-Expression als die osteogen differenzierten Zellen.

Abbildung 20 zeigt die Heparansulfatproteoglykane mit den deutlichsten Unterschieden.

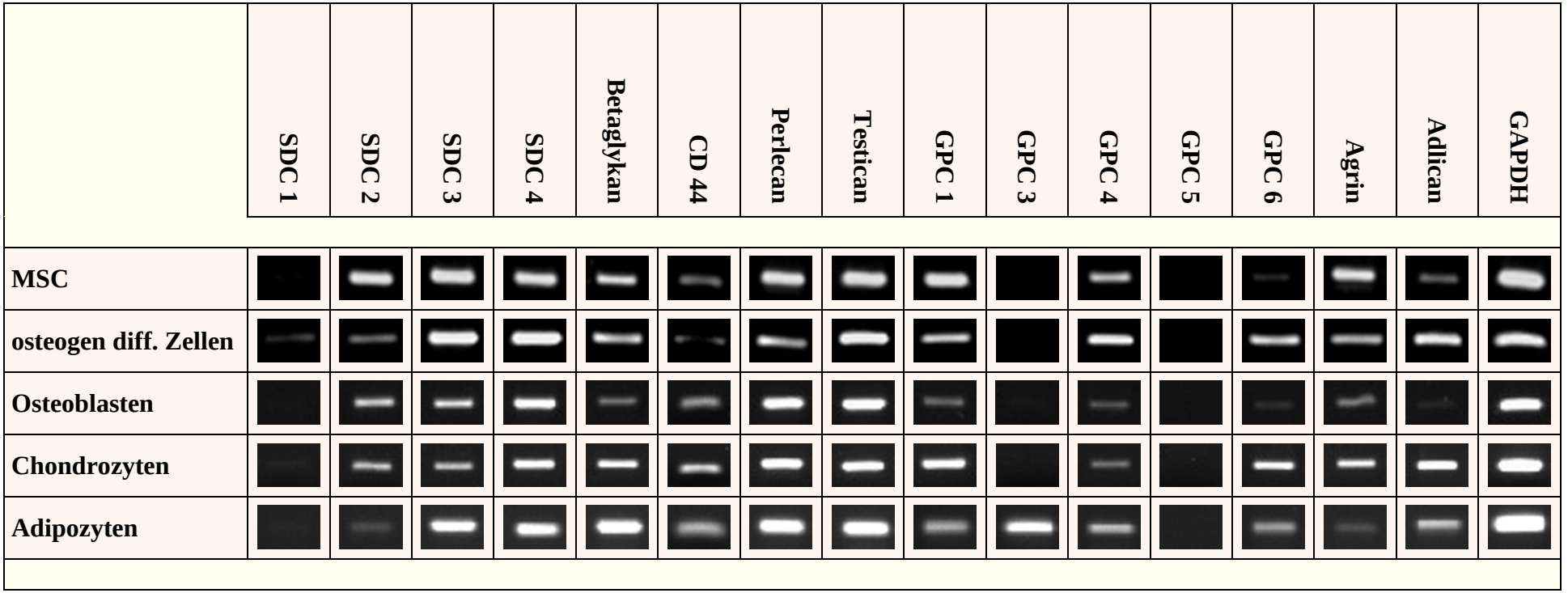



**Abbildung 19: Heparansulfatproteoglykan-Expression bei mesenchymalen Stammzellen, osteogen differenzierten Zellen, Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten.** SDC = Syndecan, GPC = Glypican, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. MSC = mesenchymale Stammzellen. Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Darstellung mittels Gelelektrophorese.
Dargestellt sind die Heparansulfatproteoglykan-Expressionsprofile bei undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen, osteogen differenzierten Zellen (ursprünglich undifferenzierte Zellen, die 28 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden), Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Die Expression wurde jeweils mittels PCR aus Gesamt-RNA der entsprechenden Zellen nachgewiesen.

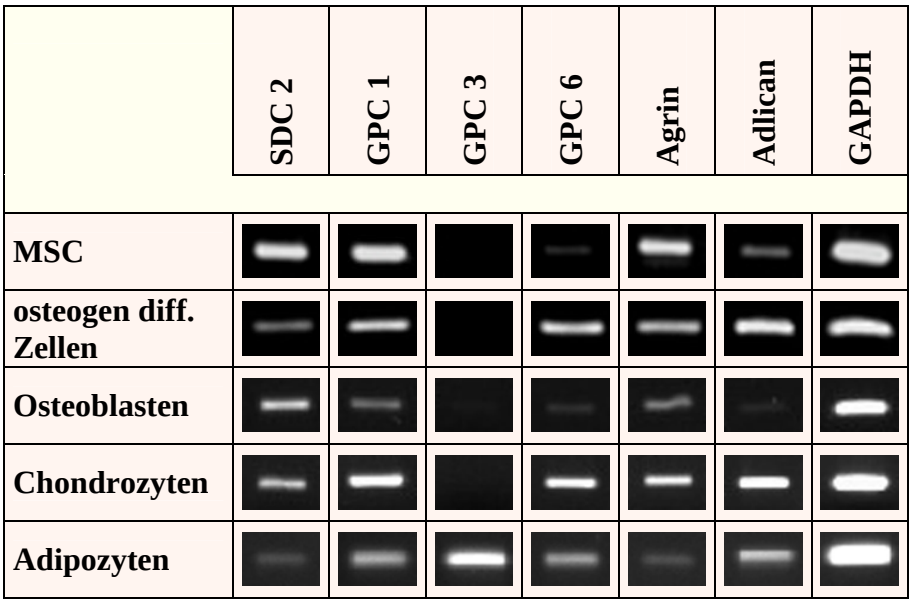



**Abbildung 20: Heparansulfatproteoglykan-Expression bei mesenchymalen Stammzellen, osteogen differenzierten Zellen, Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten.** SDC = Syndecan, GPC = Glypican, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. MSC = mesenchymale Stammzellen.
Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Darstellung mittels Gelelektrophorese.
Dargestellt sind die Heparansulfatproteoglykan-Expressionsprofile bei undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen, osteogen differenzierten Zellen (ursprünglich undifferenzierte Zellen, die 28 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden), Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Im Vergleich zu Abbildung 19 werden hier nur die Heparansulfatproteoglykane mit den deutlichsten Expressionsunterschieden zwischen den einzelnen Zellen aufgeführt.

# 4 Diskussion

Mesenchymale Stammzellen besitzen ein großes therapeutisches Potential für eine Vielzahl von Erkrankungen, sei es durch Gewebezüchtung in vitro oder direkte Stammzellbeeinflussung zur gezielten Geweberegeneration in vivo. So könnte zum Beispiel bei der Osteoporose die pathologisch verstärkte adipogene Differenzierung verhindert werden. Allerdings ist immer noch recht wenig über Zell-Zell-Interaktionen, erforderliche Wachstumsfaktoren sowie Signalwege bekannt, die an der Stammzell-Differenzierung beteiligt sind. Eine mögliche Rolle könnten dabei auch Heparansulfatproteoglykane spielen, die eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu binden vermögen [17] und zum Teil selbst Rezeptor- bzw. Co-Rezeptoreigenschaften besitzen. Diese Arbeit sollte zunächst einen Überblick über die Expression von Heparansulfat-proteoglykanen bei mesenchymalen Stammzellen sowie bei den aus ihnen durch Differenzierung hervorgehenden verschiedenen reifen Zellen schaffen. Dazu wurde mittels PCR die Expression der verschiedenen bekannten Heparansulfatproteoglykane in den verschiedenen Zellen untersucht. Auf Grund der besonderen Bedeutung der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen hinsichtlich der Osteoporose-Pathogenese und ggf. Therapie wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob es im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu einer Änderung der Heparansulfatproteoglykan-Expression kommt. Dazu wurden mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark gewonnen und mittels Differenzierungsmedium nach bekanntem Protokoll [37] zur osteogenen Differenzierung geführt. Untersucht wurde jeweils der Startzeitpunkt $T_0$ und ein definierter Zeitpunkt $T_1$ gegen Ende der Differenzierung, nämlich nach 28 Tagen. Dabei erwies sich als Hauptproblem, dass die Stammzellpopulationen unterschiedliche Differenzierungseigenschaften aufzeigten. Eine höhere Proliferationsneigung bedeutete eine geringere Differenzierungsneigung mit verlängerter Differenzierungsdauer und umgekehrt. Das bedeutet, dass zu den definierten Zeitpunkten nicht exakt die gleichen Differenzierungszustände vorgelegen haben mussten. Dies dürfte im Wesentlichen damit zu begründen sein, dass im Knochenmark viele verschieden Klone von mesenchymalen Stammzellen bzw. Vorläuferzellen vorkommen, die zum Teil bereits auch schon eine Differenzierungsrichtung eingegangen sein könnten. Nach bisherigen Studien ist jedoch davon auszugehen, dass nahezu alle Zellklone das Potential besitzen, osteogen zu differenzieren [60]. Schwieriger ist es, eine adipogene Differenzierung zu erreichen, da diese Zelllinie bereits frühzeitig abzweigt. So konnte gezeigt werden, dass nur 30% der Klone in 3 Richtungen (osteogen, chondrogen und adipogen) differenzieren konnten, während der Rest lediglich das Potential für chondrogene bzw. osteogene Differenzierung aufwies. Trotzdem tauchten bei dieser Arbeit im

Verlauf der osteogenen Differenzierung in einzelnen Zellkulturen Adipozyten auf. Diese Kulturen blieben für weitere Untersuchungen unberücksichtigt. Dies zeigt eindrücklich, welche Heterogenität eine Stammzellkultur bezüglich des Differenzierungszustandes aufweisen kann.
Entsprechendes gilt letztlich auch für die hier verwendeten und mit den Stammzellen verglichenen reifen Osteoblasten. Denn auch für Osteoblasten sind verschiedene Differenzierungszustände beschrieben, so dass Osteoblast nicht gleich Osteoblast ist. Mehrere Studien lassen vermuten, dass selbst reife Osteoblasten bzw. reife Zellen mit osteoblastärem Phänotyp aus einer heterogenen Gruppe zahlreicher Subpopulationen mit unterschiedlichen Genexpressionsprofilen bestehen [2,39]. Ein Beispiel für verschiedene Differenzierungszustände der Osteoblasten ist, dass die hier isolierten und verwendeten Osteoblasten nicht in der Lage sind, eine mineralisationskompetente Matrix zu bilden. Auch sie bedürfen erst einer gewissen Kultivierungszeit in osteogenem Differenzierungsmedium. Möglicherweise liegen die hier beschriebenen Osteoblasten bezüglich ihres Differenzierungszustandes sogar näher bei mesenchymalen Stammzellen als bei reifen matrixbildenden Osteoblasten.
Stammzellkulturen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Differenzierungseigenschaften, sondern auch in ihrem Proliferationsverhalten. Colter et al. konnten zeigen, dass in Stammzellkulturen mit sehr geringer Zelldichte kleine Zellen nachweisbar waren, die sich durch eine sehr hohe Replikationsrate auszeichneten und die ein hohes Differenzierungspotential aufwiesen [16]. Umgekehrt nimmt die Zahl dieser Zellen bei zunehmender Zelldichte ab. Gleichzeitig nimmt die Proliferationsrate sowie das Differenzierungspotential ab [15].
Es ist leicht verständlich, dass bei dieser Komplexität der auf eine Stammzellkultur einwirkenden Faktoren eine exakte Definition des Differenzierungszustandes der Kultur nicht möglich ist. Es gilt daher immer zu bedenken, dass es sich um heterogene Zellpopulationen handelt. Entsprechend muss auch bei dem Differenzierungsversuch dieser Arbeit die potentielle Heterogenität berücksichtigt werden. Diese zeigt sich bereits bei näherer Betrachtung der unterschiedlichen Differenzierungszeiten, der uneinheitlichen Expression der Differenzierungsmarker oder der inhomogenen Färbung bei Sichtbarmachung der Mineralisation mittels Kossa-Färbung. Es sollte daher bei dieser Arbeit lediglich untersucht werden, ob es zu einer Änderung der Heparansulfatproteoglykan-Expression während der osteogenen Differenzierung kommt. Eine Aussage über die tatsächlichen quantitativen Verhältnisse ist mit diesem Vorgehen nicht möglich.
Schließlich gilt es noch zu bedenken, dass es sich hierbei um in vitro Untersuchungen handelt. Die Zellen liegen nicht in ihrer natürlichen Umgebung mit entsprechendem Kontakt mit anderen Zellen oder Wachstumtsfaktoren etc. vor. Außerdem bleiben auf Grund der Untersuchung auf mRNA-Ebene weitere enzymatische Prozesse der „Protein-Weiterverarbeitung“ unberücksichtigt. Dies

muss bei Heparansulfatproteoglykanen besonders bedacht werden, da die Synthese der Heparansulfat-Ketten erst zu einem späteren Zeitpunkt, u.a. auch im Golgi-Apparat [67], stattfindet. Eine mRNA muss auch nicht zwangsläufig in ein Protein umgeschrieben werden. Außerdem sind Heparansulfat-Ketten in ihrer Feinstruktur von vielen äußeren Einflüssen abhängig. Unter anderem scheint das Alter der Zellen eine Rolle zu spielen [31]. Auch wenn für Interaktionen mit Wachstumsfaktoren etc. im Wesentlichen die Feinstruktur der Ketten verantwortlich ist, so stehen jedoch hinsichtlich der möglichen Bedeutung der Heparansulfatproteoglykane als Rezeptor bzw. Co-Rezeptor die Core-Proteine im Vordergrund, so dass in dieser Arbeit lediglich ihre Expression von Interesse ist. Die Heparansulfatketten bleiben im Weiteren unberücksichtigt.

Sämtliche untersuchte Zellen exprimieren eine überraschend große Anzahl von Heparansulfat-proteoglykanen. Dabei ist die Expression für die meisten Heparansulfatproteoglykane bei den verschiedenen Zelltypen gleich.
Trotz der Ähnlichkeiten in ihrem Expressionsprofil bezüglich der Heparansulfatproteoglykane gibt es bei den verschiedenen Zellen doch auch Unterschiede. Den auffälligsten Unterschied findet man dabei für Glypican-3, welches von mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Chondrozyten kaum bzw. nicht exprimiert wird, während es bei Adipozyten in großem Maße exprimiert wird. Weitere Unterschiede gibt es für Syndecan-2 welches bei Adipozyten im Vergleich zu den anderen Zellen geringer exprimiert wird, für Gylpican-6, welches bei Chondrozyten verstärkt exprimiert wird, sowie für Agrin und Adlican.
Frühere Studien zeigten, dass membrangebundene Heparansulfatproteoglykane auf die Aktivität von Transmembran-Rezeptoren Einfluss nehmen [35]. Für Glypican-3 wurde zusätzlich ein Eingreifen in den Wnt-Signalweg beschrieben. So bewirkt Glypican-3 eine Inhibition des „canonical Wnt/β-catenin-Signalweges“ [73]. Wie weitere Studien belegen, ist gerade der „canonical Wnt-Signalweg“ für die Entwicklung von Vorläuferzellen in Osteoblasten bzw. Adipozyten von Bedeutung [28,48,69]. Wnt10b hemmt die adipogene Differenzierung, vermutlich durch Suppression von PPARγ, und stimuliert die Osteoblastogenese [6]. Wenn also Glypican-3 den „canonical Wnt-Signalweg“ inhibiert, während dieser eine Hemmung der Adipogenese bewirkt, so resultiert daraus eine Förderung der Adipogenese. Umgekehrt würde demnach ein Mangel an Glypican-3 zu einer Steigerung der Osteoblastogenese führen. Dies könnte als eine Ursache des Symptoms Hochwuchs beim Simpson-Golabi-Behmel Syndrom, bei welchem eine Mutation im Glypican-3-Gen vorliegt, angesehen werden [64]. Das Ergebnis dieser Arbeit, dass Glypican-3 bei Adipozyten im Gegensatz zu mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Chondrozyten, deutlich exprimiert wird um damit möglicherweise die Adipogenese zu fördern sowie vermehrt

adipogene Eigenschaften zu erlangen, würde demnach zu den Ergebnissen der anderen Studien gut passen.

Syndecan-2 kommt am häufigsten auf mesenchymalen Zellen vor. Allerdings wurde es auch im Gehirn nachgewiesen, wo es an der Entwicklung von Nervenzellen, im Besonderen deren Dendriten, von Bedeutung ist. Es wird vermutet, dass die Synbindin-Syndecan-Interaktion zu einer Rekrutierung $Ca^{2+}$-reicher Membrananteile führt und es so zu einer Änderung der zellulären Struktur, also zur Ausbildung von Dendriten, kommt [23,24]. Möglicherweise spielt Syndecan-2 bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur mesenchymaler Zellen eine ähnliche Rolle. Ob dies der Fall ist und welche Auswirkungen die geringere Expression bei Adipozyten auf deren räumliche Struktur hat, sollte sicherlich noch Thema zukünftiger Arbeiten sein.

Einen weiteren deutlichen Unterschied in der Expression zeigte Glypican-6, welches von Chondrozyten am stärksten exprimiert wird. Für Glypican-6 sind derzeit keine spezifischen Funktionen bekannt. Bei Mutationen im Glypican-6-Gen, welche zu einem Funktionsverlust führen, kommt es beim Menschen nach bisherigem Wissensstand nicht zu Beeinträchtigungen der Entwicklung [21]. Möglicherweise können andere Vertreter der Glypican-Familie einen Glypican-6-Verlust kompensieren. Zumindest ist Glypican-6 in seiner Sequenz zu 63% mit Glypican-4 identisch [21].

Agrin wurde bei mesenchymalen Stammzellen sowie bei Chondrozyten nachgewiesen. Dies bestätigt die Befunde einer neueren Studie, die zeigte, dass Chondrozyten Agrin in großem Ausmaß exprimieren [33]. Diese Studie belegt die Bedeutung von Agrin für das normale skeletale Wachstum. Ein Agrin-Mangel führte dabei zu einem retardierten Wachstum. Unter anderem wurde auch gezeigt, dass Agrin-defiziente Mäuse bzgl. der Chondrozyten eine reduzierte Proliferationsrate aufwiesen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zu untersuchen, ob mesenchymale Stammzellen, die ja wie Chondrozyten Agrin stark exprimieren, bei Agrin-Defizienz ebenfalls eine geringere Proliferationsrate aufweisen. Interessant ist weiter, dass Osteoblasten und Adipozyten im Gegensatz zu Chondrozyten Agrin nur sehr schwach exprimieren.

Die Tatsache, dass sich die Expression der Heparansulfatproteoglykane beim Vergleich von mesenchymalen Stammzellen und der hier verwendeten reifen Osteoblasten kaum unterscheidet, bedeutet nicht zwangsläufig, dass es während der osteogenen Differenzierung zu keiner Veränderung kommt. Dies zeigt sich eindrucksvoll beim Vergleich der osteogen differenzierten

Zellen mit den Osteoblasten. Besonders für Glypican-4, Glypican-6 und Adlican zeigten sich deutliche Unterschiede, in geringerem Ausmaß auch für Betaglykan. Dies könnte zum einen auf die oben beschriebene Heterogenität auf Grund unterschiedlicher Differenzierungszustände der Osteoblasten zurückzuführen sein. Zum anderen können im Verlauf einer Differenzierung aber auch nur zu bestimmten Zeitpunkten Veränderungen auftreten und sich später wieder zurückbilden. Bei ausschließlicher Betrachtung des Start- und Endpunktes würden diese Veränderungen nicht bemerkt werden.

Festzuhalten bleibt, dass es zwar nur geringe Unterschiede in der Heparansulfatproteoglykan-Expression im Vergleich von mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten gibt, dass es aber zu deutlichen Veränderungen derselben während der osteogenen Differenzierung kommt. Es zeigten sich dabei Expressionsänderungen zum Teil auf das bis zu 6-fache. Auf Grund der niedrigen Versuchsanzahl (n=6) sind die Ergebnisse unter statistischen Gesichtspunkten, zum Beispiel bei Verwendung eines Student's T-Tests bei einem Signifikanzniveau von 5% ($p <= 0,05$) lediglich für Betaglykan signifikant. Für die anderen untersuchten Heparansulfatproteoglykan-Expressionen wären entsprechend keine signifikanten Änderungen nachweisbar, obwohl zum Teil Expressionszunahmen von über 100% nachweisbar sind, wie zum Beispiel bei Gylpican-4.
Die gemessenen Expressionsänderungen sind dennoch beeindruckend, vor allem wenn man bedenkt, dass diese Änderungen wegen oben beschriebener Heterogenität letztlich nur von einer kleinen Population getragen werden, nämlich der Zellen, die wie gewünscht ausreichend differenziert sind. Alle anderen „unreifen" Zellen, deren mRNA auf Grund der gegebenen Untersuchungsbedingungen ebenfalls mitgemessen wurde, schwächen das Ergebnis eher noch ab. Man kann sich also vorstellen, dass bei Annahme einer homogenen Differenzierung die Ergebnisse noch viel deutlicher wären!

Die stärkste Expressionsänderung zeigte Betaglykan, dessen Expression auf das bis zu 6-fache anstieg. Dies ist besonders interessant, da Betaglykan durch seine Bindungsfähigkeit für TGF-β, einem potenten Regulator der Zell-Proliferation, Differenzierung und der Produktion der extrazellulären Matrix [41,55,56,63], als Co-Rezeptor an der Signaltransduktion indirekt beteiligt ist. Betaglykan wurde daher auch als TGF-β Typ III-Rezeptor bezeichnet [12,54]. Es präsentiert das gebundene TGF-β dem direkt an der Signaltransduktion beteiligten TGF-β Typ II-Rezeptor [52]. Auch wenn Studien belegen, dass Betaglykan nicht zwingend erforderlich ist, um eine zelluläre Antwort auf TGF-β zu erhalten, wie es zum Beispiel bei Endothelzellen oder hämatopoetischen Zellen der Fall ist, die auch in Abwesenheit von Betaglykan TGF-β empfindlich sind [56], so ist

doch davon auszugehen, dass Betaglykan für die Feinabstimmung zwischen Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. Wie wichtig das Zusammenspiel von Proteoglykanen der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren ist, zeigt eine andere Studie. In dieser wurden Stammzellen von Biglycan- und Decorin-defizienten Mäusen untersucht [9]. Der Mangel dieser beiden kleinen leucin-reichen Proteoglykane führte zu einer Zunahme der Apoptoserate und damit zu einer Abnahme der Zellzahl. Als Ursache dafür wurde angenommen, dass durch die fehlende Interaktion des TGF-β mit den Chondroitin/- Dermatansulfatproteoglykanen der extrazellulären Matrix, Biglycan und Decorin, eine größere Menge an freiem TGF-β zur Bindung an den Rezeptoren zur Verfügung stand und damit zu einer Überaktivierung der Signalkaskade führte. Auch wenn es sich in dieser Studie um Chondrotinsulfat-/Dermatansulfatproteoglykane handelte und diese auf Grund der Unterschiede in den Glykosaminoglykanketten nicht ohne weiteres mit Heparansulfaten vergleichbar sind, so kann man sich dennoch vorstellen, dass Heparansulfatketten in ähnlicher Weise auf Wachstumsfaktoren und deren Interaktionen Einfluss nehmen könnten.

TGF-β stimuliert die Proliferation von Osteoprogenitor-Zellen und inhibiert die Differenzierung und Mineralisierung reifer Osteoblasten [10,41]. Es wirkt einer osteogenen Differenzierung eher entgegen. Man sollte daher annehmen, dass im Verlauf der osteogenen Differenzierung TGF-β-Rezeptoren und deren Interaktionspartner, zum Beispiel dem TGF-β Typ III –Rezeptor Betaglykan, herunterreguliert werden. Die Tatsache, dass Betaglykan jedoch im Gegenteil verstärkt exprimiert wird, spricht dafür, dass Betaglykan eine regulierende Rolle für den TGF-β-Signalweg besitzt. Möglicherweise spielen dabei auch die Heparansulfatketten eine Rolle, auch wenn TGF-β nachgewiesener Weise an das Core-Protein bindet. Interessant ist, dass Betaglykan auch während der Skelettmuskel-Differenzierung hochreguliert wird [53], obwohl TGF-β ebenfalls ein Inhibitor der myogenen Differenzierung ist [55].

In der Familie der Glypicane kam es nur bei Glypican-4 zu einer deutlichen Änderung. Glypican-1 und Glypican-6 blieben relativ konstant, Glypican-2 und Glypican-5 waren nicht nachweisbar. Obwohl Glypican-6 beim Vergleich der Expression mesenchymaler Stammzellen und osteogen differenzierter Zellen deutliche Unterschiede zeigte, waren diese Unterschiede im direkten Vergleich im Rahmen der osteogenen Differenzierung nicht nachweisbar. Möglicherweise ist auch dies auf die oben beschriebene Inhomogenität der Zellkulturen zurückzuführen. Dass Glypican-6 bei Zellen mit bestimmtem Differenzierungsgrad eine Rolle spielt kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Glypican-3 wurde nur sehr gering exprimiert und verhielt sich auch dabei recht uneinheitlich. Mal nahm die Expression zu, mal ab. Wie bereits oben beschrieben scheint Glypican-3 eine größere Rolle für die Adipogenese zu spielen und wäre demnach eher ein Gegenspieler der osteogenen Differenzierung. Unter diesem Gesichtspunkt wäre am ehesten eine Abnahme der Expression von Glypican-3 zu erwarten. Bei den hier gegebenen Versuchsbedingungen und der vorliegenden Inhomogenität der Stammzellkulturen ist eine genauere Untersuchung der ohnehin schon geringen Expression bei ungenügender Aussagekraft jedoch nicht sinnvoll.
Über spezifische Funktionen der Glypicane, die über die Interaktion mit Wachstumsfaktoren etc. hinausgehen, ist, mit Ausnahme von Glypican-3, immer noch recht wenig bekannt. Es ist daher interessant, dass Glypican-4 als einziger Vertreter der Glypican-Familie eine Änderung aufweist, auch wenn diese nicht so ausgeprägt wie die der Betaglykan-Expression erscheint. Jedoch ist eine Zunahme von durchschnittlich 100% durchaus bemerkenswert. Auffällig ist der enorme Anstieg der Expression bei Spender 5 mit über 500%. Bezüglich der Differenzierungszeit oder der Differenzierungsmarker fanden sich hier keine Auffälligkeiten. Eine Erklärung für diesen extremen Unterschied, der sich auch bei der Syndecan-3 Expression findet, könnte sein, dass Spender 5 mit 16 Jahren der jüngste im Spenderkollektiv ist. Zellen von jüngeren Menschen können einer viel schnelleren Reproduktion und Differenzierung unterliegen als Zellen von älteren Menschen. Dies zeigt sich z.B. an einer viel schnelleren und präziseren Wundheilung. Man kann sich leicht vorstellen, dass regulierende Faktoren dementsprechend in größerer (oder kleinerer) Konzentration vorliegen müssen, so dass das Alter eine plausible Erklärung darstellt. Aber auch mögliche Begleiterkrankungen, die hier nicht näher untersucht bzw. berücksichtigt wurden, können als Ursache dafür nicht ausgeschlossen werden.
Ähnlich wie bei Glypican-4 verhielt sich die Expression von Syndecan-3, wieder mit einer extremen Expressions-Zunahme von Spender 5 (1100% !) sowie Zunahmen von 80-350% bei den übrigen. Für Syndecan-3 konnte schon mehrfach eine Beteiligung an der Skelettentwicklung nachgewiesen werden. So spielt es zum Beispiel eine große Rolle bei der Differenzierung von Knorpelvorläuferzellen [72]. Des weiteren findet es sich im Periost, wo Osteoblasten, zum Beispiel im Rahmen einer Frakturheilung, zur Proliferation, Differenzierung und Migration in das sich neu gebildete Knochengewebe angeregt werden [47]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Syndecan-3 über seine Heparansulfatketten Pleiotrophin bindet (auch HB-GAM = heparin binding growth assoziatet molecule genannt), welches in der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle spielt [43] und in diesem Zusammenhang erstmals beschrieben wurde. Da Pleiotrophin auch in der Knochenmatrix zu finden ist, wird vermutet, dass Osteoblasten über die Bindung von Pleiotrophin an Syndecan-3 zur Migration angeregt werden [36]. Des weiteren konnte gezeigt

werden, dass Pleiotrophin auf die Knochendichte Einfluss hat. Eine Überexpression sorgte für eine verstärkte kortikale Knochenbildung [36]. Mit der osteogenen Differenzierung nimmt eine Stammzelle zunehmend Eigenschaften eines reifen Osteoblasten an. Dazu gehört neben der Bildung der extrazellulären Matrix auch die räumliche Anordnung und die Interaktion mit anderen Zellen sowie mit der extrazellulären Matrix. Da Syndecan-3 für diese Belange eine Rolle zu spielen scheint, ist es nicht unerwartet, dass die Syndecan-3-Expression während der osteogenen Differenzierung zunimmt. Interessanterweise wird Syndecan-3 bei der Skelettmuskel-Differenzierung, im Gegensatz zum Betaglykan, herunterreguliert [27].

Agrin wird während der osteogenen Differenzierung sehr unterschiedlich exprimiert. Ein einheitliches Expressionsverhalten konnte nicht nachgewiesen werden. Da mesenchymale Stammzellen stark, Osteoblasten jedoch nur noch schwach Agrin exprimieren, ist anzunehmen, dass es im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu einer Abnahme kommt. Die Tatsache, dass diese Abnahme nicht nachgewiesen werden konnte, sondern im Gegenteil vereinzelt Zunahmen der Expression beobachtet wurden, kann zum Teil durch die bereits beschriebene Inhomogenität erklärt werden. Zum anderen lässt dieses Ergebnis jedoch auch vermuten, dass es bei Veränderungen im Rahmen von Differenzierungsprozessen auf den genauen Zeitpunkt ankommt. Auf Grund der oben beschriebenen Problematik der verschiedenen Differenzierungszeiten lassen sich zum Beispiel Veränderungen, die erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Differenzierung eintreten nur ungenügend erfassen. Dies würde zum Beispiel bedeuten, dass, auch wenn alle Zellen soweit osteogen differenziert sind, dass sie eine mineralisationskompetente Matrix bilden können, immer noch Zellen vorhanden sein könnten, die den Differenzierungsschritt „Änderung der Agrin-Expression“ noch nicht vollzogen haben. Ebenso würde eine anfängliche Expressionszunahme mit einer im erst späteren Verlauf auftretenden Abnahme nicht erkannt werden. Unter der Annahme, dass Agrin bei mesenchymalen Stammzellen eine ähnliche Bedeutung für das Proliferationsverhalten hat wie bei Chondrozyten [33], würde letztere Erklärung durchaus Sinn machen: Die Agrin-Expression wird hochgefahren während der Proliferationsphase und bei abnehmender Proliferation und zunehmender Differenzierung wieder herunterreguliert.

**Schlussfolgerung und Ausblick**

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen und die aus ihnen durch Differenzierung hervorgehenden mesenchymalen Zellen eine große Zahl verschiedener Heparansulfatproteoglykane exprimieren. Obgleich die meisten Heparansulfatproteoglykane in den verschiedenen untersuchten Zellen ähnlich exprimiert werden, wurden für einzelne Vertreter charakteristische Unterschiede beobachtet. Besonders deutlich erwies sich dabei der Unterschied in der Glypican-3-Expression. Gerade hinsichtlich seiner Bedeutung in der Adipogenese und seines Eingreifens in den Wnt-Signalweg wird Glypican-3 zu einem sehr interessanten Vertreter der Glypican-Familie. Die Tatsache, dass Glypican-3 von Adipozyten vermehrt exprimiert wird, passt daher gut zu den bisherigen Studien. Interessant wäre noch, zu untersuchen, ob sich die Glypican-3-Expression während der adipogenen und der osteogenen Differenzierung ändert. Zu erwarten wäre eine Zunahme während der adipogenen und eine Abnahme während der osteogenen Differenzierung. Leider war diese Untersuchung auf Grund der geringen Expression von Glypican-3 bei mesenchymalen Stammzellen und der vorliegenden Inhomogenität der Zellkultur nicht möglich.

Auch Glypican-4 und Glypican-6 scheinen spezifische Funktionen zu besitzen, trotz ihrer Sequenzübereinstimmung von 63%. Zumindest wäre dies eine Erklärung dafür, dass Glypican-6 bei Chondrozyten in sehr viel größerem Ausmaß exprimiert wird als bei den anderen untersuchten Zellen, während die Expression von Glypican-4 während der osteogenen Differenzierung zunimmt bei näherungsweise konstanter Glypican-6-Expression. Zwar sind noch keine Entwicklungsbeeinträchtigungen bei Mutationen im Glypican-6-Gen bekannt. Allerdings wurde Glypican-6 auch noch nicht in aller Ausführlichkeit untersucht. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die Glypican-6-Expression während der Chondrogenese ändert und ob Glypican-6 an dieser unmittelbar beteiligt ist.

Betaglykan scheint auf jeden Fall eine Rolle bei der osteogenen Differenzierung zu spielen. Dafür spricht nicht nur die enorme Expressionszunahme, sondern auch die in anderen Studien belegten Funktionen von Betaglykan, zum Beispiel die Bindungsfähigkeit für TGF-β, einem Regulator der Zell-Differenzierung. Da Betaglykan auch bei der Skelettmuskeldifferenzierung hochreguliert wird, scheint es generell eine Bedeutung bei Differenzierungsvorgängen zu besitzen. Es wäre daher interessant, Betaglykan auch bei anderen Differenzierungslinien zu untersuchen.

Die Beteiligung von Syndecan-3 an der Skelettentwicklung ist bereits seit längerem bekannt. Ebenso seine Interaktion mit Pleiotrophin. Während der osteogenen Differenzierung nimmt die Syndecan-3-Expression leicht zu. Ob dies zur Differenzierung beiträgt, oder zur Erfüllung von

Aufgaben der Zielzelle, also zum Beispiel der Migration osteoblastärer Zellen nach Stimulation mit Pleiotrophin, benötigt wird, ist noch unklar. Die Tatsache, dass Syndecan-3 während der osteogenen Differenzierung vermehrt exprimiert wird, reife Osteoblasten sich in ihrer Syndecan-3-Expression jedoch nicht von mesenchymalen Stammzellen unterscheiden, spricht zumindest dafür, dass Syndecan-3 während der Osteogenese eine Rolle spielt.

Zusammengefasst sind zahlreiche Heparansulfatproteoglykane auf den untersuchten Zellen nachweisbar mit zum Teil spezifischen Unterschieden bezüglich der Expression. Diese könnte sich möglicherweise in einer unterschiedlichen Interaktionsfähigkeit mit Signalmolekülen sowie daraus resultierender unterschiedlicher Reaktion auswirken. Sie könnten daher auch für die Entwicklung von Geweben von Bedeutung zu sein. Der nächste Schritt wäre nun zu untersuchen, ob und wie sich die Entwicklung von Geweben durch Über- oder Unterexpression der Heparansulfatproteoglykane beeinflussen lässt. Auch der Einsatz von spezifischen Antikörpern, die z.B. relevante Regionen der Heparansulfatproteoglykane blockieren, wäre denkbar. Möglicherweise wird sich daraus in Zukunft auch eine medizinische Nutzung ergeben. Allein für die Therapie der Osteoporose gäbe es mehrere Ansatzmöglichkeiten, nämlich bei allen Heparansulfatproteoglykanen, die an der osteogenen Differenzierung direkt oder indirekt beteiligt zu sein scheinen. Insbesondere Glypican-3 und Betaglykan dürften in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Studien lohnenswerte Forschungsziele sein.

# 5 Zusammenfassung

Wie bereits in vielen Studien gezeigt werden konnte, spielen Heparansulfatproteoglykane eine wichtige Rolle in vielen Prozessen des Aufbaus und der Reparatur von Geweben. Dazu gehören neben der Bildung der extrazellulären Matrix z.B. auch Zelldifferenzierungsprozesse mit Ausbildung der für die Zellfunktion erforderlichen Zellstruktur (wie z.B. Dendriten bei neuronalen Zellen) sowie die funktionelle Anordnung der Zellen innerhalb der Gewebe durch Zell-Zell-Interaktionen bzw. Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren. Gerade mit dem medizinischen Hintergrund, durch Beeinflussung dieser Mechanismen die Wundheilung zu verbessern, beschädigte Gewebe ohne eingreifende Operationen reparieren zu können oder gezielt in degenerative Prozesse, wie z.B. die Osteoporose, einzugreifen ist eine weitere Untersuchung der Heparansulfatproteoglykane von großem Interesse.

Mit dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Heparansulfatproteoglykane von mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden und wie sich dieses Expressionsprofil von reifen Zellen, nämlich Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten, unterscheidet. Hinsichtlich der möglichen Bedeutung der Heparansulfatproteoglykane für Zelldifferenzierungsprozesse wurde des Weiteren untersucht, wie sich das Expressionsprofil von mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der osteogenen Differenzierung verändert.

Es konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zahlreiche Heparansulfatproteoglykane exprimieren. Dabei war die Expression für die meisten Heparansulfatproteoglykane bei den verschiedenen Zelltypen gleich. Auffällige Unterschiede gab es z.B. für Glypican-3, welches bei Adipozyten sehr stark exprimiert wird, während es bei mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Chondrozyten dagegen kaum exprimiert wird. Ebenso fielen Agrin und Glypican-1 auf, welche bei mesenchymalen Stammzellen und Chondrozyten stärker exprimiert zu werden scheinen, als bei Osteoblasten und Adipozyten. Glypican-6 und Adlican wiederum werden bei Chondrozyten am stärksten exprimiert.

Der interessanteste Unterschied ist vermutlich die stärkere Expression von Glypican-3 bei Adipozyten im Vergleich zu Osteoblasten. Mehrere Studien haben mittlerweile gezeigt, dass Glypican-3 in den Wnt-Signalweg eingreift. Da die Adipogenese bzw. Osteoblastogenese unter anderem auch über Wnt-Signalmoleküle gesteuert wird, erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass Glypican-3 auch bei der Adipogenese eine wichtige Rolle spielt.

Mit dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass es trotz der geringen Unterschiede in der Heparansulfatproteoglykan-Expression im Vergleich von mesenchymalen Stammzellen und

Osteoblasten zu deutlichen Veränderungen derselben während der osteogenen Differenzierung kommt.
Die stärkste Änderung zeigte dabei Betaglykan, dessen Expression auf das bis zu 6-fache anstieg. Dies ist besonders interessant, da Betaglykan durch seine Bindungsfähigkeit für TGF-β (transforming growth factor β), einem potenten Regulator der Zell-Proliferation und Differenzierung, als Co-Rezeptor an der Signaltransduktion indirekt beteiligt ist.
Weitere deutliche Unterschiede bezüglich der Expression im Vergleich von mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten zeigten sich für Glypican-4 und Syndecan-3, welche im Verlauf der osteogenen Differenzierung jeweils verstärkt exprimiert wurden. Mit Ausnahme von Glypican-3 ist über spezifische Funktionen der einzelnen Vertreter der Gylpican-Familie immer noch wenig bekannt. Dass es zu einem separaten Anstieg der Glypican-4-Expression kommt ist daher sehr interessant. Die übrigen Vertreter der Glypican-Familie waren entweder nicht nachweisbar oder blieben konstant. Die Beteiligung von Syndecan-3 an der Skelettentwicklung ist bereits seit längerem bekannt. Neben seiner Rolle bei der Differenzierung von Knorpelvorläuferzellen wurde für Syndecan-3 z.B. eine Interaktion mit Pleiotrophin nachgewiesen. Es wird vermutet, dass Osteoblasten über die Bindung von Pleiotrophin an Syndecan-3 zur Migration angeregt werden. Die Tatsache, dass Syndecan-3 während der osteogenen Differenzierung hochreguliert wird, ist daher keinesfalls unerwartet.
Zusammengefasst scheinen Heparansulfatproteoglykane für die Entwicklung von Geweben von Bedeutung zu sein. Für die weitere medizinische Nutzung wäre der nächste Schritt nun, zu untersuchen, ob und wie sich die Entwicklung von Geweben mit Hilfe der Heparansulfat-proteoglykane beeinflussen lässt. Neben einer genetischen Manipulation könnten z.B. auch spezifische Antikörper gegen Heparansulfatproteoglykane zum Einsatz kommen. Sollte dies erfolgreich sein, stünde der Medizin eine potente Therapieoption bei einer Vielzahl von Gewebeerkrankungen zur Verfügung.

# 6 Literaturverzeichnis


1. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Min Deng J, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrugghe B, Interactions between Sox9 and β-catenin control chondrocyte differentiation, Genes Dev. 18:1072–1087 (2004).
2. Aubin JE, Advances in the osteoblast lineage, Biochem. Cell. Biol. 76:899-910 (1998).
3. Aubin JE, Triffitt JT, Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: Bilezikan JP, Raisz LG, Rodan GA (Hrsg.), Principles of Bone Biology, Band 1, 2. Auflage, Academic Press San Diego, London, Seiten 59-81 (2002).
4. Baciu PC, Goetinck PF, Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts, Mol. Biol. Cell. 6:1503–1513 (1995).
5. Beck LS, DeGuzman L, Lee W, Xu Y, McFatridge LA, Gillett NA, Amento EP, TGFβ induces bone closure of skull defects. J. Bone Miner Res. 6:1257-1265 (1991).
6. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA, Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b, Proc. Natl. Acad. Sci. 102:3324-3329 (2005).
7. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ, Biology of the Syndecans: A Family of Transmembrane Heparan Sulfate proteoglycans, Annu. Rev. Cell Biol. 8:365-393 (1992).
8. Bernfield M, Götte M, Woo Park P, Reizes O, Fitzgerald ML, Linecum J, Zako M, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, Annu. Rev. Biochem. 68:729-777 (1999).
9. Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, Chen XD, Young MF, Extracellular Matrix Proteoglycans Control the Fate of Bone Marrow Stromal Cells, J. Biol. Chem. 280:30481-30489 (2005).
10. Bonewald LF, Dallas SL, Role of active and latent transforming growth factor β in bone formation, J. Cell. Biochem. 55:350-357 (1994).
11. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, J. Cell. Biochem. 64:278–294 (1997).
12. Cheifetz S, Andres JL, Massagué J, The Transforming Growth Factor-β Receptor Type III Is a Membrane Proteoglycan, J. Biol. Chem. 263:16984-16991 (1988).

13. Cheifetz S, Massague J, Transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor proteoglycan. Cell surface expression and ligand binding in the absence of glycosaminoglycan chains, J**.** Biol. Chem. 264:12025 – 12028 (1989).
14. Chenn A, McConnell SK, Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell 82**:**631–641 (1995).
15. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ, Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow, Proc. Natl. Acad. Sci. 97:3213-3218 (2000).
16. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ, Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:7841-7845 (2001).
17. Conrad, H.E. Heparin-binding proteins. San Diego, Academic Press. (1998).
18. Costell M, Gustafsson E, Aszódi A, Mörgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fässler R, Perlecan Maintains the Integrity of Cartilage and Some Basement Membranes, J. Cell Biol. 147:1109-1122 (1999).
19. Dallas SL, Miyazono K, Skerry TM, Mundy GR, Bonewald LF, Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein , J. Cell Biol. 131:539-549 (1995).
20. David G, Lories V, Decock B, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts, J. Cell Biol. 111:3165-3176 (1990).
21. De Cat B, David G, Developmental roles of the glypicans, Cell & Dev. Biol. 12:117-125 (2001).
22. Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, Jong Lee Y, Wook Song Y, Herzog C, Theilmeier G, Pap T, Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis, Nat. Med. 5:1072-1076 (2009).
23. Ethell IM, Yamaguchi Y, Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycan Syndecan-2 Induces the Maturation of Dendritic Spines in Rat Hippocampal Neurons, J. Cell Biol. 144:575 - 586 (1999).
24. Ethell IM, Hagihara K, Miura Y, Irie F, Yamaguchi Y, Synbindin, A Novel Syndecan-2–binding Protein in Neuronal Dendritic Spines, J. Cell Biol. 151:53-68 (2000).

25. Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, Genever PG, Expression Profiling and Functional Analysis of Wnt Signaling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells, Stem Cells 22:849-860 (2004).
26. Friedenstein AJ, Gorskaja U, Kalugina NN, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp. Hematol. 4:267-274 (1976).
27. Fuentealba L, Carey DJ, Brandan E, Antisense Inhibition of Syndecan-3 Expression during Skeletal Muscle Differentiation Accelerates Myogenesis through a Basic Fibroblast Growth Factor-dependent Mechanism , J. Biol. Chem. 274:37876-37884 (1999).
28. Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, Prockop DJ, How Wnt Signaling Affects Bone Repair by Mesenchymal Stem Cells from the Bone Marrow , Ann NY Acad. Sci. 1049:97-106 (2005).
29. Groffen AJ, Ruegg MA, Dijkman,H, van de Velden TJ, Buskens CA, van den Born J., Assmann, KJ, Monnens LA, Veerkamp, JH, van den Heuvel LP, Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. J. Histochem. Cytochem. 46:19-27 (1998).
30. Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Durr J, David G, Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:13683–13688 (1997).
31. Grzesik WJ, Frazier CR, Shapiro JR, Sponseller PD, Robey PG, Fedarko NS, Age-related Changes in Human Bone Proteoglykan Structure, J. Biol Chem. 277:43638-43647 (2002).
32. Guo X, Day TF, Jiang X,Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y, Wnt/β-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation, Genes Dev. 18:2404–2417 (2004).
33. Hausser HJ, Ruegg MA, Brenner RE, Ksiazek I, Agrin is highly expressed by chondrocytes and is required for normal growth, Histochem. Cell Biol. 127:363-374 (2007).
34. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 alpha. J. Cell Physiol. 166:585–592 (1996).
35. Hoogewerf AJ, Kuschert GSV, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, Wells TNC, Glycosaminoglycans Mediate Cell Surface Oligomerization of Chemokines, Biochemistry, 36:13570 – 13578 (1999).

36. Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Osteoblast Recruitment and Bone Formation Enhanced by Cell Matrix-associated Heparin-binding Growth-associated Molecule (HB-GAM) , J. Cell Biol. 143:1113-1128 (1998).
37. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP, Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro, J. Cell. Biochem 64:295-312 (1997).
38. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF, Adult Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation to the Osteogenic or Adipogenic Lineage Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase, J. Biol. Chem. 275:9645-9652 (2000).
39. Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JHM, Krueger W, Maye P, Yu F, Zhao Y, Kuo L, Gupta RR, Achenie LEK, Wang HW, Shin DK, Rowe DW, Expression Profile of Osteoblast Lineage at Defined Stages of Differentiation, J. Biol. Chem. 280:24618-24626 (2005).
40. Kaname S, Ruoslahti E, Betaglycan has multiple binding sites for transforming growth factor-beta 1, Biochem J., 315:815–820 (1996).
41. Kato Y, Imamoto M, Koike T, Suzuk F, Takano Y, Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor beta and serum factors, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9552-9556 (1988).
42. Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M, Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns, Mol. Biol. Cell. 5:797–805 (1994).
43. Kinnunen A, Kinnunen T, Kaksonen M, Nolo R, Panula P, Rauvala H, N‐Syndecan and HB-GAM (Heparin‐Binding Growth‐Associated Molecule) associate with early axonal tracts in the rat brain, Eur. J. Neurosci. 10:635-648 (1998).
44. Kjellen L, Oldberg A, Höök M, Cell-surface heparan sulfate. Mechanisms of proteoglycan-cell association. J. Biol. Chem. 255:10407-413 (1980).
45. Kokenyesi R, Bernfield M, Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1, J. Biol. Chem. 269:12304 – 12309 (1994).

46. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:10711-10716 (1999).
47. Koyama E, Shimazu A, Leatherman JL, Golden EB, Nah HD, Pacifici M, Expression of syndecan-3 and tenascin-C: Possible involvement in periosteum development, J. Orthop. Res. 14:403-412 (1996).
48. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA, Regulation of bone mass by Wnt signalling **,** J. Clin. Invest. 116:1202 – 1209 (2006).
49. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL, Divergent Effect of Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ2 Ligands on Adipocyte Versus Osteoblast Differentiation, Endocrinology 143:2376-2384 (2002).
50. Liebersbach BF, Sanderson RD, Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type I collagen, J. Biol. Chem. 269**:**20013 – 20019 (1994).
51. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J, Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-β receptor system. Cell 67:785-795 (1991).
52. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague: Betaglycan presents ligand to the TGFβ- signaling receptor, Cell 73:1435-1444 (1993).
53. López-Casillas F, Riquelme C, Pérez-Kato Y, Ponce-Castañeda MV, Osses N, Esparza-López J, González-Núñez G, Cabello-Verrugio C, Mendoza V, Troncoso V, Brandan E, Betaglycan Expression Is Transcriptionally Up-regulated during Skeletal Muscle Differentiation. J. Biol. Chem. 278:382-390 (2003).
54. Massagué J, Like B, Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines, J. Biol. Chem. 260:2636-2645 (1985).
55. Massagué J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B, Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:8206–8210 (1986).
56. Massagué J, The Transforming Growth Factor-beta Family , Annu. Rev. Cell. Biol. 6:597-641 (1990).
57. McMahan UJ, The agrin hypothesis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 55:407-418 (1990).

58. McMahan UJ, Horton SE, Werle MJ, Honig LS, Kröger S, Ruegg MA, Escher G, Agrin isoforms and their role in synaptogenesis, Curr. Opin. Cell Biol., 4:869-874 (1992).
59. Minguell JJ, Erices A, Conget P, Mesenchymal Stem Cells (Minireview), Exp. Biol. Med. 226:507-520 (2001).
60. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R, Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchival model, J. Cell Sci. 113:1161-1166 (2000).
61. Oh ES, Woods A, Couchman JR, Multimerization of the Cytoplasmic Domain of Syndecan-4 Is Required for Its Ability to Activate Protein Kinase C, J. Biol. Chem. 272**:**11805 - 11811 (1997).
62. Owen M, Friedenstein AJ, Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp. 136:42-60 (1988).
63. Pfeilschifter J, Mundy GR, Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:2024- 2028 (1987).
64. Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, Neri G, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D, Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, Nature genetics 12:241 – 247 (1996).
65. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, Science 284:143-147 (1999).
66. Rapraeger AC, In the clutches of proteoglycans: how does heparan sulfate regulate FGF binding?, Chem. Biol. 2:645-649 (1995).
67. Ratcliffe A, Fryer PR, Hardingham TE, Proteoglycan biosynthesis in chondrocytes: Protein A-gold localisation of proteoglycan core protein and chondroitin sulphate within Golgi subcompartments, J. Cell. Biol. 101:2355-2365 (1985).
68. Reyes M, Verfaille CM. Turning marrow into brain: Generation of glial and neuronal cells from adult bone marrow mesenchymal stem cells. Blood 94:377 (1999).
69. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA, Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling, Science 289:950-953 (2000).
70. Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S, Bernfield M, Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan, J. Cell Biol. 108:1547-1556 (1989).
71. Schiller PC, D'Ippolito G, Brambilla R, Roos BA, Howard GA, Inhibition of Gap-Junctional Communication Induces the Trans-differentiation of Osteoblasts to an Adipocytic Phenotype in Vitro, J. Biol. Chem. 276:14133-14138 (2001).

72. Seghatoleslami MR, Kosher RA, Inhibition of in vitro limb cartilage differentiation by syndecan-3 antibodies, Dev. Dyn. 207:114-119 (1996).
73. Song HH, Shi W, Xiang YY, Filmus J, The Loss of Glypican-3 Induces Alterations in Wnt Signaling, J. Biol. Chem. 280:2116-2125 (2005).
74. Veugelers M, De Cat B, Ceulemans H, Bruystens AM, Coomans C, Dürr J, Vermeesch J, Marynen P, David G, Glypican-6, a New Member of the Glypican Family of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans, J. Biol. Chem. 274:26968-26977 (1999).
75. Volk R, Schwartz JJ, Li J, Rosenberg RD, Simons M, The Role of Syndecan Cytoplasmic Domain in Basic Fibroblast Growth Factor-dependent Signal Transduction, J. Biol. Chem. 274**:**24417 - 24424 (1999).

# Abbildungsverzeichnis:


Abbildung 1: Mesenchymale Stammzellen in Monolayerkultur Seite 3
Abbildung 2: Mesenchymale Stammzellen und mögliche Differenzierungslinien Seite 6
Abbildung 3: repetitive Einheit einer Heparansulfatkette Seite 7
Abbildung 4: repetitive Einheit einer Heparansulfatkette Seite 7
Abbildung 5: Schematische Darstellung zweier membrangebundener HSPG Seite 7
Abbildung 6: Stammzellkultur mit geringer Zelldichte Seite 26
Abbildung 7: Differenzierungsmarker von mesenchymalen Stammzellen Seite 27
Abbildung 8: Heparansulfatproteoglykan-Expression mesenchymaler Stammzellen Seite 28
Abbildung 9: von Kossa –Färbung einer Zellkultur nach 14d Kultivierung Seite 29
Abbildung 10: von Kossa-Färbung einer Zellkultur zum Zeitpunkt $T_1$ (28d) Seite 30
Abbildung 11: Nachweis der osteogenen Differenzierungsmarker zu Beginn und am Ende der Differenzierung Seite 31
Abbildung 12: Gegenüberstellung der Heparansulfatproteoglykan-Expression zu den beiden Zeitpunkten Beginn und Ende der Differenzierung Seite 32
Abbildung 13: Veränderung der Betaglykan-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung Seite 34
Abbildung 14: Veränderung der Glypikan-4-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung Seite 35
Abbildung 15: Veränderung der Syndecan-3-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung Seite 36
Abbildung 16: Veränderung der Glypican-6-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung Seite 37
Abbildung 17: Veränderung der Agrin-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung Seite 38
Abbildung 18: Mittelwerte der prozentualen Expressionsänderungen sowie die zugehörigen Standardabweichungen Seite 39
Abbildung 19: Heparansulfatproteoglykan-Expression bei Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen Seite 41
Abbildung 20: Heparansulfatproteoglykan-Expression bei Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen Seite 42

# Danksagung:

Am Ende möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir während der ganzen Zeit immer wieder hilfreich zur Seite standen.

- An erster Stelle bei Herrn PD Dr. rer. nat. H.-J. Hausser für die Überlassung des Themas und für die geduldige, tatkräftige und zu jedem Zeitpunkt gewährte Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

- Bei dem medizinisch-technischem Personal des Forschungslabors, Frau Schulz, Frau Mettenleiter, Frau Schubert-Schmitt und Herrn Ravalli für die Unterstützung während des praktischen Teils dieser Arbeit.

- Und schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mich stets unterstützt und mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben.