

Aus der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie
Klinik für Gastroenterologie II
Herrn Prof. Dr. med. V. Ellenrieder
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

**Der Einfluss der Überexpression des Enzyms
11- β Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 auf die
adipogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in vitro**

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Johannes Beismann

aus

Höxter

Göttingen 2014

Dekan: Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. H. K. Kroemer

- | | | |
|------|---------------------|------------------------------------|
| I. | Berichterstatterin: | Frau Prof. Dr. med. H. Siggelkow |
| II. | Berichterstatter: | Herr Prof. Dr. med. N. Miosge |
| III. | Berichterstatterin: | Frau Prof. Dr. hum. biol. M. Schön |

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2015

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
aP2	<i>adipocyte fatty acid binding protein</i>
11- β HSD1 / 2	11- β Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1, Typ 2
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein-2</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Cl	Cortisol
Cn	Cortison
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
C/EBP	CCAAT / enhancer binding protein
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GLUT-4	Glukosetransporter 4
GR	Glucocorticoid Rezeptor
h	Stunde
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
l	Liter
LCM	<i>liquid chromatograph - mass spectrometry</i> - Massenspektrometrie
LPL	Lipoproteinlipase
M	Molar
MSC	Mesenchymale Stammzelle
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µM	Mikromol
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
ms	Millisekunde
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadeninnukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NTD	N-terminale Bindungsstelle
Nr.	Nummer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
p-value	<i>probaility value</i>
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion
Pen. / Strep.	Penicillin / Streptomycin
pH -	log [H ⁺]

PPAR γ 2	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma 2</i>
RANKL	<i>ligand receptor for activation of nuclear factor kappa B-ligand</i>
Reg.	Regenerationsystem
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
RT	reverse Transkriptase
RUNX-2	<i>runt-related transcription factor-2</i>
s	Sekunde
s.u.	siehe unten
s.o.	siehe oben
SGK	Serum- und Glukokortikoid-abhängige Kinase
sog.	sogenanntes
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
T3	Trijodthyronin
U	Unit
U	Uracil
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vit.	Vitamin
Wnt	wingless / Int-1

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Das Knochensystem des Menschen.....	1
1.2	Mikroskopischer Knochenaufbau.....	1
1.2.1	Osteoblasten	2
1.2.2	Osteozyten	3
1.2.3	Osteoklasten	4
1.2.4	Bone Lining Cells.....	5
1.2.5	Bone Multicellular Units	5
1.3	Knochenmatrix und assoziierte Proteine	6
1.3.1	Osteocalcin	6
1.3.2	Alkalische Phosphatase (AP).....	7
1.4	Das Enzym 11- β Hydroxysteroid-Dehydrogenase	8
1.5	Transkriptionsfaktor PPAR γ	12
1.6	Die Transkriptionsfaktor Familie C/EBP	13
1.7	Der Transkriptionsfaktor α 2	14
1.8	Der Transkriptionsfaktor RUNX2 (Runt-related Transcription Factor 2).....	15
1.9	Stammzellendifferenzierung	16
1.9.1	Osteogenese.....	16
1.9.2	Adipogenese	17
1.9.3	Modulation des Wachstums.....	17
1.10	Glucocorticoide	17
1.11	Osteoporose	19
1.12	Ziel der Arbeit	21
2.	Material und Methoden	23
2.1	Zellmaterial.....	23
2.2	Zellkultur-Medien.....	23
2.3	Geräte und Verbrauchsmaterial	24
2.3.1	Transfektion	25
2.3.2	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)	25
2.4	Methoden.....	29
2.4.1	Zellkultur	29
2.4.2	Lebendzellzahlbestimmung	30
2.4.3	Zellkultivierung in Experimenten.....	30
2.4.4	Plasmid-Generierung	30
2.4.5	Klonierung.....	31
2.4.6	Ligation.....	31

2.4.7	Generierung einer Bakterienkultur	31
2.4.8	Transfektionsverfahren der mesenchymalen Vorläuferzellen	33
2.4.9	Fotometrische mRNA-Konzentrationsmessung	36
2.4.10	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	36
2.4.11	Quantitative Real-time-PCR.....	37
2.4.12	Auswertung der Real-time-PCR Daten	38
2.4.13	Protein-Isolierung adhärenter mesenchymaler Vorläuferzellen	39
2.4.14	Zelllysatherstellung	41
2.4.15	Statistik	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Übersicht der durchgeführten Experimente.....	42
3.2	Mesenchymale Vorläuferzellen und variable Cortisol-Konzentrationen über 7 Tage	43
3.2.1	Genexpression von 11- β HSD1 und variable Cortisol-Stimulation über 7 Tage	44
3.2.2	Genexpression von PPAR γ und variable Cortisol-Stimulation über 7 Tage	45
3.2.3	Genexpression von aP2 und variable Cortisol-Stimulation über 7 Tage.....	45
3.2.4	Fazit der Cortisol-Stimulation über 7 Tage	46
3.3	Vorexperiment transiente Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1- Plasmid und 24 Stunden Stimulation	46
3.3.1	Cortison-Stimulation für 24 h nach 11- β HSD1-Transfektion	47
3.3.2	Cortisol-Stimulation für 24 h nach 11- β HSD1-Transfektion	47
3.4	Cortison- und Cortisol-Inkubation für 24 h ohne Zellkultur	48
3.4.1	Cortisol-Inkubation bei variabler Temperatur	49
3.4.2	Cortison-Inkubation bei variabler Temperatur	49
3.4.3	Fazit der Cortison- und Cortisol-Inkubation für 24 h ohne Zellen.....	49
3.5	Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1-Plasmid und 7 Tage Kultivierung zur Analyse	49
3.5.1	Kontrolle der Transfektionseffizienz.....	50
3.5.2	Genexpression von 11- β HSD1 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation.....	50
3.5.3	Genexpression von PPAR γ nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation.....	51
3.5.4	Genexpression von C/EBP- α nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation.....	51
3.5.5	Genexpression von C/EBP- β nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation.....	52
3.5.6	Genexpression von aP2 und LPL nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation.....	52
3.5.7	Genexpression von RANKL nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation.....	53

3.5.8 Genexpression von SGK nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation	53
3.5.9 Cortison- und Cortisol-Direkt-Bestimmung im Medium von mesenchymalen Vorläuferzellen nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation	53
3.6 Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1-Plasmid und 28 Tage Kultivierung ohne Stimulation	55
3.6.1 Kontrolle der Transfektionseffizienz	55
3.6.2 RNA-Konzentration von mesenchymalen Vorläuferzellen von 7 bis 28 Tagen ohne Stimulation	57
3.6.3 Genexpression von 11- β HSD1 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen.....	57
3.6.4 Genexpression von PPAR γ nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen.....	58
3.6.5 Genexpression von C/EBP- α nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen.....	59
3.6.6 Genexpression von C/EBP- β nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen.....	60
3.6.8 Genexpression von RANKL nach 11- β HSD1-Plasmid Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen.....	62
3.6.9 Genexpression von RUNX2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen.....	63
3.6.10 Genexpression von 11- β HSD2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen.....	63
3.6.11 Fazit der 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion nach 28 Tagen ohne Stimulation.....	64
3.7 Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1-Plasmid, 48 Stunden Kultivierung und variable Stimulation	65
3.7.1 Kontrolle der Transfektionseffizienz	66
3.7.2 Genexpression von 11- β HSD1 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h zur Kontrolle der Transfektion.....	66
3.7.3 Genexpression von PPAR γ nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	67
3.7.4 Genexpression von C/EBP- α nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	67
3.7.5 Genexpression von C/EBP- β nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	68
3.7.6 Genexpression von C/EBP- δ nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	68
3.7.7 Genexpression von aP2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	69
3.7.8 Genexpression der SGK nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	69
3.7.9 Genexpression von RUNX2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	70

3.7.10 Genexpression von 11- β HSD2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	70
3.7.11 Genexpression von RANKL nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	71
3.7.12 Fazit der Transkription von mRNA nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	71
3.7.13 11- β HSD1-Immunoblot nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	72
3.7.14 11- β HSD2-Immunoblot nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h	73
3.8 Cortison- und Cortisol-Direkt-Bestimmung im Medium nach 11- β HSD1-Plasmid- Transfektion nach 48 h mit variabler Stimulation für 6 Stunden (Stunde 42 bis 48)	73
3.8.1 Fazit der Stimulation 48 h nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion mit variabler Stimulation für 6 Stunden (Stunde 42 bis 48)	78
4. Diskussion	79
4.1 Ausblick.....	90
5. Literaturanhang	91

1 Einleitung

1.1 Das Knochensystem des Menschen

Die Gesamtheit des Knochensystems ermöglicht dem Körper eine einzigartige Schützfunktion der inneren Organe unter den Aspekten der dynamischen Arbeit und statischen Funktionen. Der Stoffwechsel des Skeletts unterliegt einer fortlaufenden, hochmetabolischen und bedarfsadaptierten Plastizität. Im Inneren der langen Röhrenknochen, der *Cavitas medullaris* findet man das Knochenmark mit den multipotenten Stammzellen des blutbildenden Systems. Dies stellt die Grundlage für die Bildung der Hämatopoese dar. Die mikroskopische Struktur zeichnet sich durch die stoffwechselaktiven Zellen der Osteogenese und die sich adaptierende Knochenmatrix aus. So ist die Knochenmatrix kein endgültiges Gewebe, denn es wird durch die Funktion der Osteoblasten und Osteoklasten stets neugeformt und verändert. Belastungen des Stützapparates und auch Hormone greifen in die vielfältigen Steuerungsmechanismen ein, deren genauer Mechanismus häufig noch ungeklärt ist. Natürliche Alterungsprozesse unterwerfen den Knochen einer bedeutenden Minderung der Elastizität und Druckfestigkeit, deren Gipfel sich im Krankheitsbild der Osteoporose manifestiert. Osteoporose ist die häufigste Knochenkrankung des höheren Lebensalters. Diese Arbeit widmet sich der Grundlagenforschung an mesenchymalen Vorläuferzellen und deren Differenzierung in Zellen der osteoblastären (Knochenzellen) und adipozytären (Fettzell-)Reihe, wie auch deren Beeinflussung durch den Glucocorticoid-Stoffwechsel.

1.2 Mikroskopischer Knochenaufbau

Die Grundlage der histologischen Knochenstruktur des Erwachsenen ist der Lamellenknochen. Dieser findet sich in zwei Strukturen wieder, erstens in der Außenschicht mit 0,5 bis 3 mm Dicke, der *Substantia corticalis*. Die äußerste Schicht ist das Periost. Die zweite Form ist die Innenschicht mit Markraum, die sich in einer gitterförmigen Struktur aufzweigt, die sogenannte *Substantia spongiosa*. Ausweitungen der Trabekel bilden den Raum für die Markhöhle. Die äußere Oberfläche der Substantia spongiosa ist vom Endost umfasst (Drenkhahn und Kugler 2002).

Die Osteogenese kann in drei Stadien eingeteilt werden, die Proliferation (Assoziierte Proteine: cmyc, cfos und Histione), die Matrixreifung (Assoziierte Proteine: aP2 und Osteocalcin) und als letzter Schritt die Mineralisation (Assoziierte Proteine: Osteocalcin und Osteopontin) nach Stein und Lian (Stein und Lian 1993).

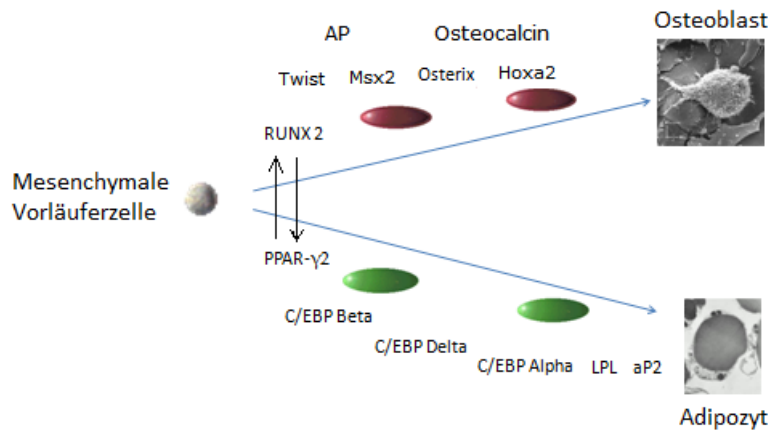


Abbildung 1. Grafische Darstellung der mesenchymalen Stammzellentwicklung mit wesentlichen Proteinen der Differenzierung zur Übersicht. Modifiziert und ergänzt nach McGee-Lawrence und Westendorf - (McGee-Lawrence und Westendorf 2012).

1.2.1 Osteoblasten

Die Osteoblasten sind die Grundlage des knochenbildenden Systems, denn sie synthetisieren und sezernieren die organischen Komponenten der Knochenmatrix und sind für diesen Prozess essenziell. Im stark entwickelten Golgi-Apparat werden die organischen Matrixproteine gebildet und an der Oberfläche sezerniert, wenn ein Kontakt zur Knochenmatrix gegeben ist. Die Konformation zum Osteoid geht dem Verknöcherungsprozess voraus. Es handelt sich um eine Substanz, die von Osteoblasten gebildet wird. Die Vollendung der Matrixmineralisation ist mit der Einlagerung von Kalziumphosphat in das Matrixgewebe abgeschlossen (Junqueira 2003). Der Prozess der Differenzierung geht von mesenchymalen Vorläuferzellen aus. Im vergangenen Jahrzehnt ist die Technik zur *in vitro*- und *in vivo*-Differenzierung und deren Untersuchung fortlaufend weiterentwickelt worden. Wegweisend für die Arbeit war die Entdeckung des Potentials zur adipogenen sowie zur osteogenen Differenzierung (Evans und Kaufman 1981). Proteine an der Zelloberfläche und Interleukine, die sogenannten *Bone Morphogenetic Proteins*, kurz BMPs, und das *Bone Gla Protein*, kurz BGP, die die Differenzierung steuern, wurden entdeckt und ermöglichen uns, diesen Vorgang besser zu verstehen (Lucas et al. 1988). Es sind bereits mehrere Signalwege bekannt, die die Differenzierung der Osteoblasten steuern, zum Beispiel der IGF-1, BMP oder der Wnt-Signalweg. In verschiedenen Stadien der Osteoblastenreifung ist es möglich, die Expression von assoziierten Proteinen, der oben genannten Signalwege zu verfolgen. Es zeigt sich ein stark heterogenes Bild der Expression, deren Signalwegmechanismus noch teilweise unverstanden erscheint. Die genaue Bedeutung der auftretenden Signal-Proteine, wie dem der Myozyten (α -Actin), der Dendritischen Zellen (*Adipose Fatty Acid-binding Protein*, AP2) und der Makrophagen-Osteoklastären-Reihe (*Macrophage-expressed Gene 1*) wurde diskutiert (Kalajzic et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten im Rahmen der Differenzierung Proteine wie Twist, Msx2 und Sox8 exprimieren (McGee-Lawrence und Westendorf 2012). Teilweise scheinen diese in der Differenzierung von Histon-Deacetylasen abhängig zu sein. Diese Deacetylasen können ebenso Nicht-Histon-Proteine deacetylieren, wie RUNX2 und p53 (McGee-Lawrence und Westendorf 2012).

Die Gruppe der BMPs ist Gegenstand intensiver Forschung, ihre Regulation ist teilweise unverstanden. BMPs beeinflussen die mesenchymalen Vorläuferzellen. So konnte gezeigt werden, dass durch BMPs (BMP 4 und 2) *in vitro* der Signalweg durch das Protein Smad und dadurch die osteoblastäre Differenzierung gehemmt wird (Kokabu et al. 2012). Während der Transformation in die Zielzelle durchlaufen die Osteoblasten eine extreme Veränderung, wie die vermehrte Bildung vom endoplasmatischen Retikulum und Ribosomen (Kalajzic et al. 2012).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des Wnt-Signalweg der osteoblastären Zelllinie und dem Ror2-Protein auf osteoklastäre Vorläufer-Zellen für den Knochenmetabolismus mit Induktion des RANKL (Osteoklasten-Aktivierung) essenziell ist (Maeda et al. 2012). Die osteoblastäre Differenzierung wird gesteuert durch die Wachstumsfaktoren des Knochens. Es konnte gezeigt werden, dass durch IGF-1 über mTOR die Differenzierung von Osteoblasten Vorläufer-Zellen direkt beeinflusst wird. So zeigten IGF-1 *Knock-out*-Mäuse eine niedrigere Knochenmasse und einen verminderten Osteoblasten-Nachweis, als der Wildtyp (Xian et al. 2012). Übereinstimmend fand sich in der gleichen Studie ebenfalls eine 40 % niedrigere IGF-1-Konzentration im Knochen von Osteoporose-Patienten (Xian et al. 2012).

Die fortschreitende Identifikation molekularer Steuerungsmechanismen unterstützt die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten zur allogenen Transplantation von mesenchymalen Vorläuferzellen. Dies könnte Patienten mit Muskeldystrophie oder Osteogenesis imperfecta neue Hoffnung geben (Caplan 2005).

1.2.2 Osteozyten

Die zweite Zellgruppe, die Osteozyten, sind eine Nachfolgestufe der Osteoblasten, die einen verminderten Zellstoffwechsel aufweisen. Es sind zehnmal mehr Osteozyten in einem Knochen vorhanden als Osteoblasten. Lange Fortsätze, die so genannten *Canaliculi*, reichen von einer Lakune in das umgebende verkalkte Knochengewebe und weisen dabei ein sternförmiges Wachstumsmuster auf (Aarden et al. 1994; Manolagas 2000). Der Innenraum der *Canaliculi* ist mit nichtmineralisierter Matrix ausgefüllt und zur Kommunikation dienen die sogenannten *Gap Junctions*. Es konnte hierbei eine erhöhte Expression neuronaler Gene nachgewiesen werden, die auf eine mechanosensitive Rolle des Osteozyten hindeuten (Paic et al. 2009). Unterschiedliche Druckformen werden auf die Osteozyten ausgeübt, so diskutiert man einen hydrostatischen Druck und einen pulsatilen fluiden Druck, durch den intra- und extrazelluläre Verbindungen eine schnelle Passage von Ionen und Signalmolekülen ermöglichen (Klein-Nulend et al. 2013). Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass in Vitamin-D-Rezeptor-negativen Mäusen eine verminderte Knochenmasse auftrat (Lieben und Carmeliet 2013).

Weiterhin sind mechanische Einflüsse auf den Osteoklasten-Calcium-Stoffwechsel bekannt, die zu einer Induktion der Osteoklasten-Aktivität führen und die Anpassungsfähigkeit des Knochens bei veränderter Belastung ermöglichen (Adachi et al. 2009). Die sensitiven Eigenschaften der Osteozyten machen sie zu entscheidenden Kandidaten in der Detektion weiterer Faktoren, wie des Östrogen-Spiegels oder der Glucocorticoide (Tomkinson et al. 1998; Weinstein et al. 1998).

Die Differenzierung zu Osteozyten geht mit einer Verminderung der Knochen-Marker einher (*Bone Sialoprotein*, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin). Weiterhin treten bei Fortschreiten der Differenzierung Proteine wie das *Dentin Matrix Protein 1*, CD44 und das *Matrix Extracellulär Phosphoglycoprotein* (MEPE), sowie eine Expression der Gene für Sclerostin und des *Fibroblast Groth Factor 23* auf (Kalajzic et al. 2012). Neuste Daten deuten eine Hemmung von Sclerostin durch das Parathormon an (Bellido et al. 2012). Sclerostin selbst hemmt so die Knochenbildung über die Osteoblasten. Des Weiteren beeinflussen Osteozyten auch die Osteoklasten. Man konnte eine erhöhte Rate an *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) (s. Kap. 1.2.3.) in Osteozyten nachweisen, die direkt aus dem Knochen von Mäusen isoliert wurden (Nakashima et al. 2011). Dabei zeigten RANKL-negative-Maus-Osteozyten eine verminderte Knochenmasse, was auf eine mögliche Quelle von RANKL im Knochen hindeuten könnte (Nakashima et al. 2011). RANKL wird in Osteozyten gebildet und steuert auf diese Weise die Osteoklastogenese. Man konnte in einem Maus-Modell mit RANKL-Defizit aufzeigen, dass dies in diesen Mäusen zu einer verminderten Knochenmasse und einem kompletten Fehlen an Osteoklasten führte (Bonewald 2011; Xiong und O'Brien 2012).

1.2.3 Osteoklasten

Die Osteoklasten sind wesentlich am Abbau der Knochenmatrix und Knochenmineralisation beteiligt. Es handelt sich um vielkernige Riesenzellen, die im Bereich der Trabekel Knochen resorbieren. Als Vorläuferzellen ist das monozytäre Phagozytensystem zu nennen, also die hämatopoetische Stammzellreihe. Zur Interaktion mit Zellen der osteoklastären Reihe sind die Osteoblasten befähigt, denn sie bilden den *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL), welcher über den RANK-Rezeptor am Osteoklasten bindet und die Differenzierung und Aktivierung des Osteoklasten induziert. Das Ausmaß der Resorption wird durch die Bindung des RANKL determiniert (Holick et al. 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Größe und Aktivität von Osteoklasten auch durch den c-Fos-Signalweg, sowie dessen Komponenten Fra-2 Gen (*Fos Related Protein*), den LIF und LIF-Rezeptor (*Leukemia Inhibiting Factor*) und den TGF- β determiniert ist (Bozec et al. 2008; Ruan et al. 2010). Des Weiteren scheint die Hypoxie-Adaptation von Osteoklasten mit diesem c-Fos / LIF-Signalweg vergesellschaftet zu sein. (Bozec et al. 2008). Des Weiteren wird RANKL durch M-CSF (*Colony Stimulating Factor*) aktiviert. M-CSF bindet an c-FMS, welche zur NF- κ B-Aktivierung an der Oberfläche die Aktivierung von TNF führt. ITAM und RANK gemeinsam aktivieren Phospholipase C γ , die zur Mobilisierung von Calcium führt. Diese ITAM-Aktivierung ist essenziell für die RANK-Aktivierung (Chiu et al. 2012). Die Aktivität des Osteoklasten wird durch den Nachweis von *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase* (TRAP) möglich, da dieses Protein auf der Oberfläche aktiver Osteoklasten im erhöhten Maße nachweisbar ist. Dieses Protein generiert reaktive Sauerstoffspezien, sog. oxidativen Stress, der zum Abbau von Kollagen und Proteinen führt (Halleen et al. 1999). Zum Abbau von Osteoklasten stehen der Zelle Phosphorylasen, genauer die *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase* (TRAPase) zur Verfügung, die durch histologische Schnittfärbung zur Identifikation von Osteoklasten dienen kann (Bossard et al. 1996). Darüber hinaus werden von den Osteoklasten Enzyme wie Cathepsine sezerniert, die einen hydrolytischen Abbau der extrazellulären Matrix bewirken.

Weitere Rezeptor-Proteine der Osteoklasten, wie das OC-STAMP sind für die Aktivierung von Osteoklasten notwendig. In STAMP-defizienten Mäuse-Osteoklasten konnte keine notwendige Zellfusion der Osteoklasten mit dem sog. *Foreign Body Giant Cells* nachgewiesen werden (beide entstammen der multizellulären Zelllinien) (Miyamoto et al. 2012). BMP2-Stimulation zeigte eine erhöhte Expression der mRNA von RANK und anderen proosteoklastischen Proteinen (Calcr, Acp5, MMP-9) (Granhholm et al. 2013). Übereinstimmend zeigte sich auch eine erhöhte Expression der Proteine in Osteoblasten durch BMP-2 Stimulation (Granhholm et al. 2013).

Der Osteoklast steht unter starkem Einfluss von Hormonen, wie Calcitonin, aktivem Vitamin D3 (1 α , 25-Dihydroxycholecalciferol) und Parathormon, die eine Inhibierung von RANKL und eine Minderregulierung von Osteoklastengen induzieren (O'Brien 2010; Wang et al. 2009).

Des Weiteren haben auch Glucocorticoide Einfluss auf die Mikrotubuli der Osteoklasten. Glucocorticoide hemmen die Bildung von Mikrotubuli von Osteoklasten im Knochen mittels Hemmung von Capn6 und mit der Folge einer Reduzierung des Beta3-Integrin Protein im Cytoskelett. Beta3-Integrin Protein ist essenziell für die Osteoklast-Zytoskelett-Funktion. Auf die Differenzierung der Osteoklasten scheint Capn6 jedoch keinen Einfluss zu haben (Hong et al. 2011).

1.2.4 Bone Lining Cells

Die *Bone Lining Cells* sind an der Oberfläche des Knochens und dessen innerer Schicht, der *Stratum corticalis* zu finden und stellen sich in einer abgeplatteten Struktur dar. Die Hauptaufgabe der *Bone Lining Cells* ist der Prozess des *Remodeling* von Knochenmatrix, mit Zellmigration durch den Knochen. Diese Zellen sind der Osteoblasten-Familie zuzurechnen, die eine von zwei Endpunkten der Spezialisierung von mesenchymalen Vorläuferzellen darstellt: Auf der einen Seite steht die Differenzierung zum Osteoblasten, auf der anderen die Differenzierung zur *Bone Lining Cell*. Zwischen der Zellgruppe der verkalkten Matrix findet man auch eine kollagenreiche und nicht verkalkte Matrix. Die Funktion der *Bone Lining Cells* zeichnet sich vermutlich durch die eines Regulators des *Matrix Remodelings* aus (Parfitt 1994). Man vermutet in diesem Zelltyp einen Aktivator des RANKL-Systems der Osteoklasten. Die *Bone Lining Cells* haben einen engen Kontakt zu Osteoklasten und sind über *Gap Junctions* miteinander verbunden, die die Kommunikation ermöglichen. *Bone Lining Cells* haben ebenfalls die Aufgabe die Oberfläche der Lakunen des Haversmann'schen Kanals von Matrix zu befreien und nach abgeschlossener Resorptionsphase das Abbaumaterial zu entfernen. Dieser Prozess wird reguliert via Protein Ephrin B2. Am Ende steht die vollständige Verkleidung der Oberfläche von neugebildeten Osteozyten mit *Bone Lining Cells* (Henriksen et al. 2009).

1.2.5. Bone Multicellular Units

Am Knochen wirken Osteoklasten und Osteoblasten zusammen als eine gemeinsame funktionelle Einheit, diese wird *Bone Multicellular Unit*, auch BMU genannt. Diese Einheiten sind 1 - 2 mm lang und 0,2 bis 0,4 mm im Durchmesser. Außerdem stehen sie im engen Kontakt zu Blutgefäßen, Nervenenden und dem assoziierten Weichgewebe (Parfitt 1994). Jeden Moment arbeiten im menschlichen Knochen ca. 1 Millionen BMUs. Die Lebensspanne einer BMU beträgt ca. 6 bis 9 Monate und sie ist

dazu befähigt, sich pro Tag ca. 25 µm zu bewegen. Im Skelettsystem führen die BMUs zu einer Neubildung von ca. 10 % des gesamten Skelettsystems im Laufe eines Jahres (Manolagas 2000).

Für die Dynamik zwischen den abbauenden und neubildenden Eigenschaften des Knochenstoffwechsels sind die BMUs der entscheidende Regulator. Die Auswirkungen des Alterns und der Glucocorticoide auf BMUs wird weiter unten detailliert beschrieben. Die Anzahl der BMUs wird auf noch nicht vollständig verstandene Weise reguliert. So diskutiert man die Induktion der BMU, reguliert durch Osteoklasten-Vorläufer via RANKL. Jedoch scheint die Aktivität durch Scerostin über Osteoblasten Vorläufer-Zellen reguliert (gehemmt) zu werden (Xiong und O'Brien 2012).

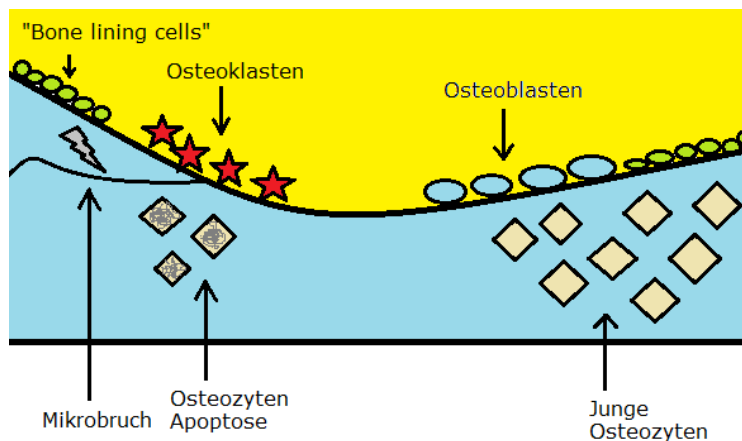


Abbildung 2. Grafische Darstellung der Dynamik von *Bone Remodeling Units*. Modifiziert nach McGee-Lawrence und Westendorf - (McGee-Lawrence und Westendorf 2012).

1.3 Knochenmatrix und assoziierte Proteine

Die Knochenmatrix besteht aus organischen und nichtorganischen Komponenten. Die Hauptkomponente des nichtorganischen Knochens besteht zum Großteil aus Hydroxylapatit-Kristallen ($\text{Ca}^{2+} (\text{PO}_4 \text{OH})^2$). Der Wasseranteil ist mit 20 % als gering einzuschätzen (Drenkhahn und Kugler 2002). Der organische Teil der Matrix besteht zum Großteil aus Kollagen Typ 1, das ein Muster aus Fibrillen bildet. Diese statische Form bedingt die Elastizität und die Druckfestigkeit des Knochens. In dem organischen Teil der Matrix sind Proteine eingebunden, die meist im anionischen Konformationszustand vorliegen, zum Beispiel Proteoglykane. Diese Proteine werden posttranslational mit der Einlagerung von Sialoprotein oder Biglycan modifiziert (Boskey 2003).

1.3.1 Osteocalcin

Das Protein Osteocalcin hat seinen Ursprung in Osteoblasten und dessen Vorläuferzellen, daher wird dieses Protein als ein spezifischer Indikator der osteoblastären Differenzierung angesehen (Seibel 2005). Man kann Osteocalcin als Vitamin-K-abhängiges Protein charakterisieren, das die Eigenschaft besitzt, freies Ca^{2+} und an Phospholipidmembranen gebundenes Ca^{2+} zu binden. Sein Nachweis ist von wesentlicher Bedeutung für die Interpretation des Aufbaus des Knochensystems *in vitro* (Hauschka et al. 1989).

Die lokale Wirkung von Osteocalcin besteht in einer Induktion von Metalloproteinkinasen, die wiederum von anderen Hormonen wie dem Trijodthyronin (T3) aus der Schilddrüse oder dem Cholecalciferol (1,25-D3), das in den Knochenstoffwechsel eingreift, induziert wird. Diese Induktion zeigte

sich bei osteoblastären Vorläuferzellen erhöht, sodass man annimmt, dass die Osteocalcin-Expression vom Stadium der osteoblastären Differenzierung abhängig ist (Siggelkow et al. 1999). Weiterhin gibt es Hinweise, dass Osteocalcin durch den Schilddrüsenstoffwechsels des T3 und des Cholecalciferol (1,25-D3) reguliert wird. Eng scheint die Vergesellschaftung des Osteocalcins mit dem Remodeling der *Matrix Metalloproteinasen* (MMPs) am Knochen zu sein. Man konnte eine Regulierung der MMPs im umgekehrten Verhältnis des Osteocalcin beschreiben. Bekannt ist, dass Osteocalcin-defizite Mäuse eine erhöhte Knochendichte aufweisen. Dieses deutet auf eine limitierende Rolle des Osteocalcins für die Mineralisation hin (Ducy et al. 1996). Des Weiteren konnte eine Verbindung zum Insulinstoffwechsel hergestellt werden. Man erkannte, dass Osteocalcin die Insulin codierenden Genabschnitte induzieren kann und die Proliferation von β -Zell-Markern *in vivo* hochregulieren kann. Heute kann man von einem anabolen Effekt des Osteocalcin auf die Adipozyten und den Stoffwechsel sprechen (Ferron et al. 2008). Außerdem wird angenommen, dass Insulin die osteoblastäre Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen via Twist2, einem RUNX2-Inhibitor (s.u.) negativ beeinträchtigt (Razzaque 2010). Aufgrund vieler noch unverstandener Aspekte ist Osteocalcin Gegenstand intensiver Forschung. Man kann sich des Osteocalcins zum Nachweis der speziellen osteoblastären Differenzierung des *in vitro*-Modells von mesenchymalen Vorläuferzellen bedienen.

1.3.2 Alkalische Phosphatase (AP)

Die Alkalische Phosphatase ist ein ubiquitär vorkommendes Protein (*Tissue-nonspecific Isoenzyme*, ALPL), der äußeren Zellmembran. Das Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert und umfasst 69048 Basenpaare. Ein Nachweis der AP ist im Serum möglich, hier wird zwischen gewebe-spezifischer AP und Gesamt-AP differenziert. Insbesondere in den osteoblastären Vorläuferzellen findet man eine hohe AP-Aktivität. Die Enzymaktivität scheint eine Assoziation mit dem Knochenbildenden Prozess zu besitzen, allerdings scheint die Aktivität auch stärkeren individuellen Schwankungen unterworfen (Siggelkow et al. 1998a). Eine weitere stark erhöhte Konzentration an AP ist in der Leber lokalisiert (Moss 1992). In kindlichen osteoblastären Vorläuferzellen ist die Expression von AP ist am höchsten und weist über 90 % des Serumanteils der AP auf (Van Hoof et al. 1990). Insgesamt scheint die physiologische Funktion der Alkalischen Phosphatase noch nicht hinreichend erklärt zu sein.

In der klinischen Praxis konnte sich die AP als ein spezifischer Marker von Erkrankungen des Knöchensystems (das spezielle Protein die *Bone-Alkaline Phosphatase*, kurz BAP) erweisen. Zu beachten sind bei der Interpretation eine 15 - 20 % Kreuzreaktivität zwischen spezifischer und allgemeiner AP, des Weiteren eine Störung der Ergebnisse bei vorhandener Lebererkrankungen (Seibel 2005).

Der Knochenstoffwechsel ist einer Steuerung durch Phosphorylierung, die den Genabschnitt der BAP betreffen, unterworfen. So konnte gezeigt werden, dass das endogene Phosphat der Zellen eine Inhibierung der Mineralisation durch die Osteoblasten bewirkt. Verschiedene Wege der Inhibierung konnten gefunden werden wie die direkte Beeinflussung von Mineralisationsprozessen, die Hemmung des BAP-Genabschnitts und die Induktion des Proteins Osteopontin (Addison et al. 2007). Die Erkrankung

Hypophosphatasie zeichnet sich durch einen Defekt der AP aus. Die Folge ist eine Anhäufung des organischen Pyrophosphats und eine verminderte Bruchfestigkeit des Knochens. Dies wird hervorgerufen durch eine Störung der Knochenmineralisation (Michigami et al. 2005; Mornet 2007).

1.4 Das Enzym 11- β Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Das Enzym 11- β Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11- β HSD) ist das Schlüsselenzym des Glucocorticoidstoffwechsels. Man findet das Enzym vornehmlich in Zellen, die vom Glucocorticoidstoffwechsel betroffen sind, so besonders in der Leber, aber auch in der Niere, der Nebenniere, im Zentralnervensystem, Lunge und im Fettgewebe (Seckl und Walker 2001). Aber auch der Knochen ist als Lokalisation von 11- β HSD in den Fokus geraten. So konnte man das Enzym auch im Knochen nachweisen (Cooper et al. 2000). Weiterhin greift das Enzym in die Regulation der osteoblastären Differenzierung und den Mineralisierungsprozess ein. Die Enzyme 11- β HSD1 und 11- β HSD2 sind Isoenzyme. 11- β HSD1 ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 kodiert und umfasst 48786 Basenpaare. 11- β HSD2 umfasst hingegen 6421 Basenpaare und ist auf dem langen Arm von Chromosom 16 kodiert. Allerdings ist zu beachten, dass beide Isoenzyme ubiquitär in vielen Gewebearten vorkommen (Bujalska et al. 1997), sie konkurrieren dort um ihr Substrat, das auch insbesondere synthetisierte Steroide umfasst. Aus diesem Grund ist das Enzym von besonderer pharmakologischer Bedeutung bei einer immunsuppressiven Therapie (Diederich et al. 2002). Die 11- β HSD1-Aktivität ist durch Glucocorticoide modulierbar, dies ist mit entscheidenden Konsequenzen für die osteoblastären Differenzierung verbunden. Dies konnte durch eine Induktion der osteoblastären Differenzierung durch Dexamethason nachgewiesen werden. In der Folge zeigt sich eine verminderte Expression von 11- β HSD1 (Eijken et al. 2005). Die Isoenzyme unterscheiden sich in Lokalisation, Substratspezifität und Cofaktoren. 11- β HSD1 reguliert eine NADPH-abhängige Enzymreaktion, während 11- β HSD2 NAD-abhängig aktiv ist (Balazs et al. 2009). Wesentlich für den Katalysierungsprozess ist die 11 β -Hydroxygruppe die für den antiinflammatorischen Effekt von Glucocorticoiden essenziell ist. Das Enzym 11- β HSD1 katalysiert eine reduktive Reaktion und eine oxidative Reaktion der Glucocorticoide *in vitro*. Vorherrschend ist die reduktive Aktivität des Enzyms und damit die Umwandlung vom inaktiven Cortison in aktives Cortisol. (Diederich et al. 2002). Das Enzym 11- β HSD2 besitzt eine verstärkte Affinität zur Oxidierung von Glucocorticoiden, also der Umwandlung in ein physiologisch nicht wirksames Produkt Cortison. Diese Funktion des Enzyms ist NAD-abhängig. Man schließt auf eine Schutzfunktion für Mineralokortikoidrezeptoren, da man das Enzym nur in Geweben findet, die Ziel von Mineralokortikoiden und Glucocorticoiden sind, wie zum Beispiel in der Nierenrinde (Leckie et al. 1995).

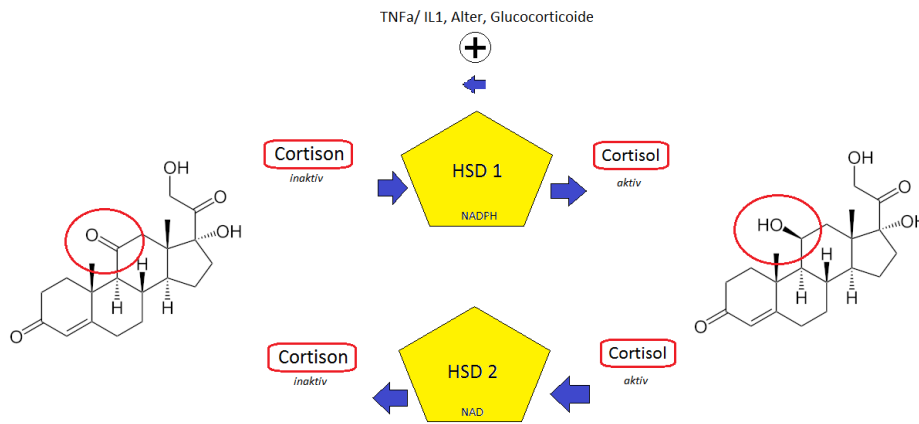


Abbildung 3. Grafische Darstellung der 11- β HSD-Enzymkinetik. 11- β HSD1 katalysiert eine reduktive und eine weniger effektive oxidative Konversion der Steroide. 11 β -HSD2 hat eine rein oxidative Funktion der Konversion von Cortisol in Cortison. Modifiziert nach Cooper et. al. 2008.

Die 11- β HSD-Isoenzyme sind von den Cofaktoren NADPH- und NAD-abhängig, genauer deren Quotient voneinander im endoplasmatischen Retikulum (Banhegyi et al. 2009; Bujalska et al. 2005; Quinkler et al. 1997). Weiterhin ist ein Regenerationssystem der Cofaktoren identifiziert worden, welches ein ausgeglichenes Verhältnis von Cofaktoren generiert. Beachtenswert ist die Wechselwirkung mit anderen anabolen Stoffwechselprodukten, wie zum Beispiel in Glucose- und Insulin-sensitiven Zellen wie den Adipozyten (Bujalska et al. 2008). Verantwortlich für die Regeneration von NADPH ist die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Zytosol und die Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich der Bereitstellung des NADPH von einander. Das Enzym Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase scheint eine maßgeblich regulierende Rolle für auf das Enzym 11- β HSD1 zu spielen. Es konnte bei Transfektion von 11- β HSD1 und Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Hamster Ovarialzellen eine Verstärkung der Reduktase-Aktivität von 11- β HSD1 demonstriert werden. Diese Verstärkung fiel signifikant höher aus, als bei alleiniger 11- β HSD1 Transfektion, bzw. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Transfektion. In der gleichen Arbeit konnte ebenfalls eine signifikant positive Korrelation zwischen 11- β HSD1-Reduktase Aktivität und Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase mRNA-Spiegeln in Zellkulturen von humanen Präadipozyten, isoliert aus dem Fettgewebe des Menschen aufgezeigt werden (Bujalska II et al. 2005). Das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase generiert NADPH im Zytosol durch Katalysation von Glucose-6-Phosphat.

Dies führte zur Überlegung der Implementierung eines Cofaktoren unterstützenden Regenerationssystems bei Überexpression des Enzyms 11- β HSD1. Wir wählten als Substitution Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, um eine optimalere Zugänglichkeit bei Substitution im Medium zu gewährleisten. Andere Autoren konnten bereits ähnliches bei Untersuchung der Enzymkinetik im zellfreien System beschreiben (Quinkler et al. 1997). Hierbei wurden auch Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase verwendet. In dieser Arbeit zeigte sich mit einer Cofaktoren-Unterstützung (NADPH, NAD, Glucose-6-Phosphat, Cortison und Cortisol) des Enzyms eine signifikant höhere Oxidation bzw. Reduktion durch die 11- β HSD-Isoenzyme. Jedoch erfolgte hierbei keine Überexpression von 11- β HSD1 im Zell-Modell. In dieser Arbeit sollte die Methodik zur Unterstützung der Enzymkinetik bei Überexpression von 11- β HSD1 in mesenchymalen Vorläuferzellen implementiert werden. Das Enzym 11- β HSD1 könnte mit seiner regulierenden Rolle für Cortison und Cortisol eine Schlüsselrolle für den Knochenmineralisationsprozess zufallen. Es ist bekannt, dass Glucocorticoide essenziell für einen positiven Mineralisationsprozess sind. Das Enzym könnte im Überschuss allerdings eine verminderte Wirkung aufzeigen (Tomlinson et al. 2004), denn es zeigt sich eine direkte dosisabhängige Induktion durch orale Glucocorticoide. Des Weiteren konnte auch eine altersabhängige Induktion des Enzyms gezeigt werden (Cooper et al. 2002). Dies unterstreicht eine mögliche Bedeutung des Enzyms für die Pathophysiologie der sekundär und primär induzierten Osteoporose und des Insulin-Stoffwechsels, deren Thematik Gegenstand dieser Arbeit ist. Weitere Cofaktoren der Induktion von 11- β HSD1 konnten identifiziert werden, proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL 1- β haben auch eine verstärkende Wirkung auf die Expression des Enzyms unabhängig von anderen Wachstumshormonen *in vitro*. Dem gegenüber wird 11- β HSD2 auch gehemmt (Cooper et al. 2001).

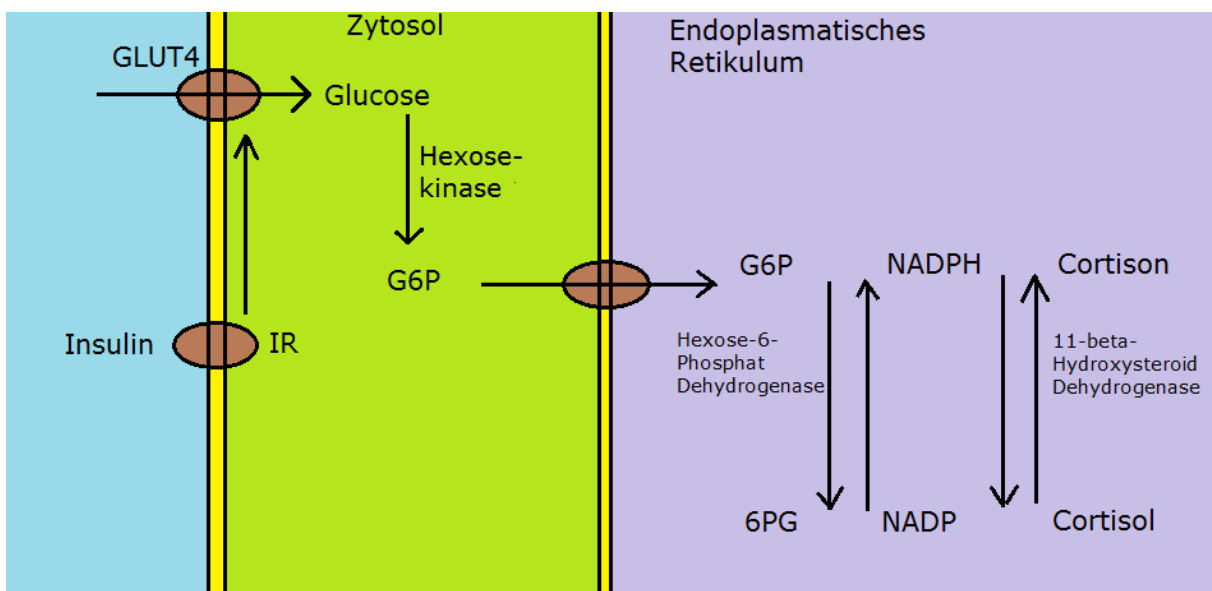


Abbildung 4. Grafische Darstellung des NADP und NADPH-Regenerationssystems. Insulin induziert über den Glucose-Transporter-4 die Aufnahme von Glucose in die Muskelzelle oder die Fettzelle. Über den Glucose-6-Phosphat-Transporter ins endoplasmatische Retikulum gelangt Glucose-6-Phosphat. Weiter im endoplasmatischen Retikulum, findet eine Redox-Reaktion statt. 11- β HSD1 konvertiert NADPH-abhängig Cortison in Cortisol. 11- β HSD2 hingegen ist spezifisch NAD abhängig. Modifiziert nach Banhegyi und Czegle et. al. - (Banhegyi et al. 2009; Czegle et al. 2012).

Ein weiterer Aspekt der 11 β -HSD1 Enzymkinetik tritt aktuell in den Vordergrund, nämlich die individuelle Variabilität des Enzyms. Man konnte bereits in Epithelzellen Polymorphismen identifizieren, die zu einer erhöhten 11- β HSD1-Promotoraktivität führen (Malavasi et al. 2010). Noch unbekannte parakrine Signalwege der Glucocorticoide regulieren die Bildung von Osteoblasten aus Vorläuferzellen. So zeigten Glucocorticoide an Osteoblasten eine Induktion der Differenzierung durch den Wnt-Signalweg über RUNX2 (Zhou et al. 2008). Weiterhin konnten in Amnion-Fibroblasten-Kulturen eine dosisabhängige Induktion der 11- β HSD1-mRNA durch Dexamethason gezeigt werden. Diese Induktion konnte sogar durch einen Inhibitor von 11 β -HSD1 supprimiert werden (Sun und Myatt 2003). Bei Anwesenheit von aktiven Cortisol-Formen ist das Enzym weiterhin hochreguliert, dies ermöglicht eine effiziente Balance der osteoblastären Differenzierung zur Matrixmineralisation. Es konnte gezeigt werden, dass eine Nichtdifferenzierung der Osteoblasten mit einer Erhöhung der Expression von 11- β HSD1 einhergeht. Auf der anderen Seite zeigte sich eine verminderte 11- β HSD1-Aktivität mit fortschreitender Dexamethason-Konzentrierung in Osteoblasten (Eijken et al. 2005). So ist Dexamethason auf physiologischem Level für die Induktion der osteoblastären Differenzierung zur Matrixmineralisation essenziell (Bellows et al. 1987). Dexamethason-Vorbehandlung scheint zunächst notwendig für eine Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen *in vitro*-proosteogen zu wirken (Song et al. 2009). Weiterhin konnte durch Zugabe von Dexamethason beladene Nanopartikel eine proosteogene Differenzierung in mesenchymalen Vorläuferzellen mit vermehrter extrazellulärer Matrix demonstriert werden (Oliveira et al. 2009). Des Weiteren scheint Dexamethason und das Protein Sclerostin (Regulator Protein des Wnt-Signalwegs) in Wechselwirkung zu treten. Sclerostin ist ein negativer Regulator der Knochenbildung.

Bei Sclerostin-Antikörper und Dexamethason-Behandlung in Mäusen konnte eine höhere Steigerung der Dichte in corticalem und trabekulärem Knochen demonstriert werden, als ohne Sclerostin (Maranzana et al. 2011). Das umgewandelte Cortisol, das physiologische Korrelat von Dexamethason, führt am differenzierenden und mineralisierenden Osteoblasten zu einer verminderten osteoblastären Umwandlung. Dies hält die Vorläuferzellen in einem frühen Stadium der Differenzierung und führt zu einer einhergehenden antiapoptischen Charakteristik (Pereira et al. 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein *in vivo*-Maus-Modell mit 11- β HSD1-Defizit einen Mangel an Adipozyten im Knochenmark aufweist, jedoch mit normaler Knochenmineralisation der Knochen. Im *in vitro*-Modell hingegen bestand kein Unterschied in Mineralisation und adipozytärer Differenzierung (Justesen et al. 2004). 11- β HSD1 und 2 regulieren auf diese Weise das Gleichgewicht von Glucocorticoiden in der Zelle. Die Auswirkungen auf die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten scheint noch teilweise unverstanden. Man weiß zwar, dass Glucocorticoide für die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten im frühen Stadium der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen notwendig sind (s.u.), jedoch nicht ausschließlich verantwortlich sind. Im Falle von 11- β HSD2-transgenen Mäusen zeigte sich eine reduzierte Knochendichte, jedoch eine gleichbleibende Zellzahl von Osteoblasten und Osteoklasten. Diese transgenen Mäuse zeigten eine verstärkte osteoklastäre Differenzierung im Zuge einer Antwort auf RANKL-Stimulation (Yang et al. 2010).

1.5 Transkriptionsfaktor PPAR γ

Für die Betrachtung der Osteogenese ist der *Peroxisome Proliferator-activated Receptor* (PPAR), Subtyp γ 2, von besonderer Bedeutung. PPAR γ ist ein in drei Isoformen vorkommendes Protein mit besonderem proadipogenem Potential. Die Isoform PPAR γ 2 findet man insbesondere im Fettgewebe. PPAR γ 2 ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 kodiert und umfasst 146989 Basenpaare. Eine Besonderheit der Regulation besteht in der Eigenschaft von PPAR γ , selbstregulierend auf seine Transkription zu wirken (Mueller et al. 2002). Das Protein gehört zur Familie der ligandenaktivierenden Transkriptionsfaktoren. Die Regulierung findet durch Steroide und deren Liganden, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, statt (Chawla et al. 2001). Man konnte in PPAR γ den wichtigsten Schlüsselregulator von Fett- und Glukose-Stoffwechsel identifizieren, der auch weitreichende Auswirkungen auf die Plastizität des Knochenstoffwechsels hat (Rosen et al. 1999). Weitere Signalwege wie die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und eines adipösen Metabolismus deuten auf eine anabole Stoffwechselinduktion hin (Tontonoz et al. 1998). Weiterhin konnte belegt werden, dass PPAR γ -defiziente embryonale Fibroblasten nicht zu Adipozyten differenzieren können (Akune et al. 2004). Um die Wirkung von PPAR γ vollständig zu erfassen, muss man drei unterschiedliche Ansatzpunkte benennen: erstens wirkt das Protein stimulierend auf die Fettzellen selbst, zweitens greift es in die osteoblastäre Differenzierung ein. Der Faktor PPAR γ ist der einzige essenzielle Faktor für die Adipozyten-Differenzierung (Rosen und MacDougald 2006). So konnte durch die weitverbreitete Verwendung von PPAR γ -Agonisten, wie in Form von Thiazolidonen in der Diabetes-Behandlung, eine Verminderung der osteoblastären Entwicklung in mesenchymalen Vorläuferzellen gezeigt werden (Grey et al. 2007; Lecka-Czernik et al. 2002). Umgekehrt konnte die osteoblastäre Differenzierung von Vorläuferzellen mit einer Induktion der osteogenen Marker (Osterix und dem RUNX-Signalweg (s.u.)) und letztendlich einer vermehrten Knochendichte durch ein *Knock-out*-Maus-Modell gezeigt werden (Akune et al. 2004). Bereits differenzierte Osteoblasten blieben dabei unberührt. Als dritten Ansatz des Proteins am Knochenstoffwechsel ist die Wirkung auf Osteoklasten zu benennen. Man konnte eine Induktion der Osteoklasten-Vorläuferzellen und eine Verstärkung des Zellzusammenhaltes beobachten. Die entscheidende Regulation hierfür scheint der RANKL-Signalweg über c-Fos zu sein (Wan et al. 2007). Der Signalweg c-Fos ist Teil des proosteoklastären Signalwegs von RANKL und NF- κ B. Der Transkriptionsfaktor c-Fos induziert die Genexpression von Genen, die für ausgewachsene Osteoklasten essenziell sind (Cohen 2006). Signalinduktoren der PPAR γ -Aktivierung konnten identifiziert werden. Zum Beispiel, den TGF- β , den BMP-(via Smad-4 und p38) und den Wnt-Signalweg (via β -Catenin). Am Ende steht die Genexpressionsregulierung von PPAR γ und damit eine Konfiguration der Knochenmineralisation (Mishina et al. 2004; Muruganandan et al. 2009). Auch die Induktion von C/EBP (s.u.) und PPAR γ durch Glucocorticoide in adipozytären Vorläuferzellen konnte gezeigt werden (Pereira et al. 2002; Wu et al. 1996).

PPAR γ greift auf verschiedenen Ebenen in den Prozess der Stammzellendifferenzierung von Osteoblasten ein. Signalwege einer verminderten Transkription von Osteoblasten-spezifischen Regulatoren (u.a. Wisp1, BMP4 und DMP1) konnten identifiziert werden. Bei Adipozyten hingegen führte PPAR γ zu einer direkten Induktion als Transkriptionsfaktor am Promotor der Adipozyten-spezifischen Gene (Shockley et al. 2009). Als Gegenspieler von PPAR γ wirkt der Transkriptionsfaktor RUNX2 (s.u.), der bei PPAR γ -Insuffizienz im erhöhten Maße nachgewiesen worden ist. Hier konnte man eine gegenläufige Regulation von PPAR γ und RUNX2 beobachten (Akune et al. 2004). RUNX2 ist für die Regulierung der osteoblastären Differenzierung von wesentlicher Bedeutung. Es konnte eine Erhöhung des Zellwachstums und eine Suppression der Apoptose bei Minderexpression von RUNX in Osteosarkomzellen gezeigt werden (Olfa et al. 2010).

1.6 Die Transkriptionsfaktor Familie C/EBP

In Wechselwirkung mit PPAR γ tritt der Transkriptionsfaktor C/EBP, das *CCAAT / Enhancer Binding Protein*, das eine ligandenabhängige Aktivierung der Promotorregion von Genen ausführt, die spezifisch für die Adipogenese sind (Rosen und MacDougald 2006). Die Wechselwirkung zwischen dem Transkriptionsfaktor PPAR γ und C/EBP-Proteinen ist für den Signaltransduktionsweg von wesentlicher Bedeutung. Der Signaltransduktionsweg führt über C/EBP- β und C/EBP- δ zu C/EBP- α . Die Beta- und Delta-Isoformen können jeweils, auch bei Defizit des anderen, ein proadipogenetisches Potential entfalten. Die Induktion dieser Proteine ist allerdings nicht für den weiteren Signaltransduktionsweg essenziell (Tanaka et al. 1997). Man muss dem Protein C/EBP- α eine größere Bedeutung als den Proteinen C/EBP- β und C/EBP- δ zumessen, da dieses eine direkte Expression von Adipogenese assoziierten Proteinen, unabhängig von exogenen Faktoren, ermöglicht (Lin und Lane 1994). Die Transkriptionsfaktoren C/EBP- β und - δ sind insbesondere in den ersten Tagen der mesenchymalen Differenzierung für die Induktion von C/EBP- α und PPAR γ von besonderer Bedeutung. Weiterhin gelang auch der Nachweis von aP2 erst in der Folge ab dem 6. Tag (Yeh et al. 1995). Die Wechselwirkung von PPAR γ und C/EBP- α ist sehr bedeutsam für die Wirkung von C/EBP- α , so führt ein Defizit von C/EBP- α zu einem verminderten Fettgewebsanteil und es wird kein endogenes PPAR γ induziert (Wu et al. 1999). Die Kopplung zwischen diesen beiden Proteinen ist essenziell für die Wirkung von C/EBP- α , da ohne diese keine Expression von adipogenetischen Proteinen durch C/EBP- α gesteuert werden kann (Rosen et al. 2002). Der Transkriptionsfaktor PPAR γ benötigt zur Interaktion mit den Promotorregionen die synergistische Aktion mit dem Komplex *Thyroid Hormone Receptor-associated Protein*, TRAP-Komplex, bzw. mit der Untereinheit TRAP-220. Die Anwesenheit von diesem „direkten“ Transkriptionsfaktor ist für die Adipogenese notwendig, da sie nur durch diese Wechselwirkung induziert werden kann (Ge et al. 2002). Transkriptionsprodukte sind dabei die *Lipoprotein Lipase* LPL und das *Adipocyte Fatty Acid-binding Protein*, FABP4 oder aP2 genannt, die späten Adipogenese assoziierten Proteine sind (Rosen und Spiegelman 2000). Die Bedeutung der Wechselwirkung der Transkriptionsfaktoren-Kaskade für die Adipogenese und deren Vermittlung durch den Insulinstoffwechsel zeigt sich ebenfalls durch die gesteigerte Anzahl der Fettzellen und die Minderung der Knochendichte bei Implementierung eines C/EBP- β *Knock-out*-Maus-Modells bei gleichzeitiger Diabetes

mellitus Typ 1-Erkrankung. Hierbei zeigten sich im Verlauf Anzeichen einer kompensatorischen Regulierung durch C/EBP- α , C/EBP- δ und PPAR γ (Motyl et al. 2011). Demgegenüber greift C/EBP- β auch in die proosteoblastäre Differenzierung ein. So konnte eine synergistische Aktivierung von RUNX2 mit der gleichzeitigen Gabe von Vitamin-D3 und einer C/EBP- β -Expression beschrieben werden (Gutierrez et al. 2001).

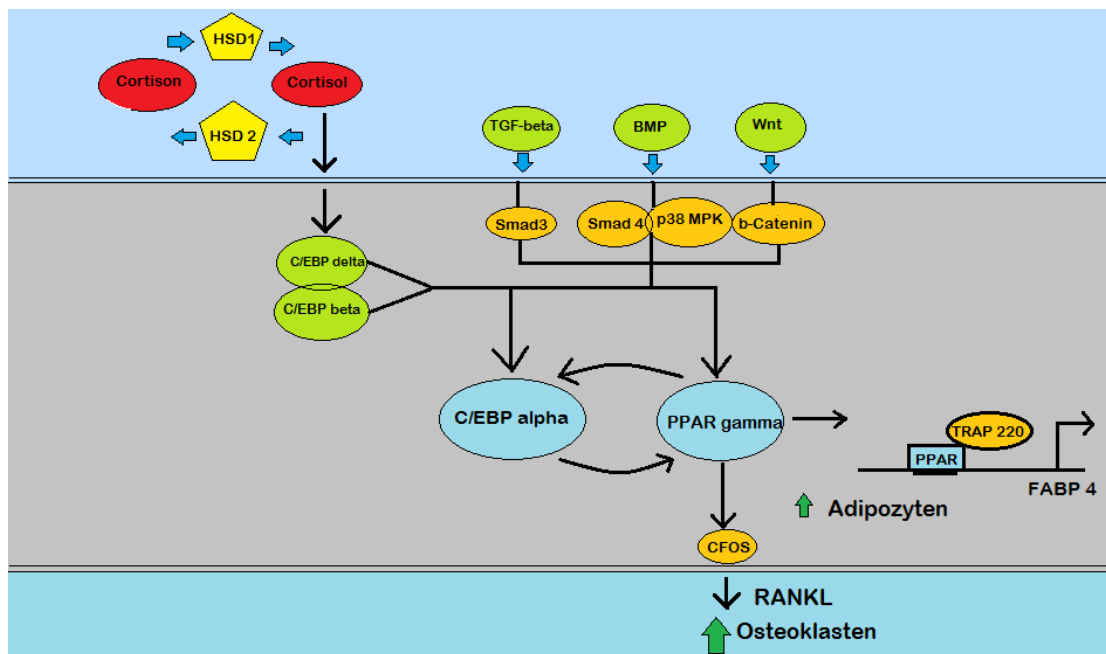


Abbildung 5. Grafische Darstellung des zellulären proadipogenen PPAR γ -Signalweges. Über C/EBP- δ und - β wird C/EBP- α induziert. TGF-beta, BMP und der Wnt-Signalweg haben einen negativen und positiven Einfluss auf den PPAR γ -Signalweg. Die Wechselwirkung von C/EBP- α und PPAR γ ist für Wirkung des PPAR γ wesentlich. Für eine Induktion der Adipogenese ist die Wechselwirkung von TRAP220 an Promotoren der proadipozytären Gene bedeutsam. PPAR γ induziert über den c-Fos Signalweg die Aktivierung von Osteoklasten. Modifiziert nach Farmer und Muruganandan (Farmer 2005; Muruganandan et al. 2009).

1.7 Der Transkriptionsfaktor aP2

Der Transkriptionsfaktor aP2, oder auch *Fatty Acid Binding Protein FABP4*, gehört zu der FABP-Superfamilie. Das kodierende Gen ist auf dem langen Arm des achten Chromosoms lokalisiert und umfasst 4845 Basenpaare. Dieses Protein ist im Fettgewebe und Makrophagen im hohen Maße exprimiert (Krusinovam und Pelikanovam 2008). Das Protein selbst wird als ein zytoplasmatisches Protein beschrieben, sein Nachweis gelingt jedoch ebenso im Blutsystem des Menschen (Xu et al. 2006). Für dieses Protein ist weiterhin eine Steuerungsfunktion für den Insulin- und Glucose-Stoffwechsel im Sinne eines proanabolischen und prodiabetischen Proteins beschrieben (Furuhashi et al. 2007). Überdies ist für aP2 eine proinflammatorische Regulierung von Zytokinen in Makrophagen beschrieben worden (Makowski et al. 2005). Weiterhin scheint das Protein in den Signaltransduktionsweg von proadipogenen Transkriptionsfaktoren, wie den von PPAR γ und der C/EBP-Familie, über den NF- κ B-Signalweg einzugreifen (s. Abbildung 5. S. 14) (Farmer 2005; Makowski et al. 2005; Pelton et al. 1999). Diesem Protein wird somit eine proadipogene Rolle in der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zugeschrieben.

1.8 Der Transkriptionsfaktor RUNX2 (Runt-related Transcription Factor 2)

Der Transkriptionsfaktor *Runt-related Transcription Factor 2*, oder auch RUNX2, CBFA1 oder *Acute Myeloid Leukemia 3 Protein* genannt, ist in der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen und zur osteogenen Spezialisierung von besonderem Interesse. Das Protein ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert und umfasst 222926 Basenpaare. Es ist bekannt, dass Mutationen des RUNX2-Gens eine pathologische Knochenformation induzieren - wie bei der Erkrankung der Cleidocraniale Dysplasie (Yoshida et al. 2002). Es gibt drei Isoformen von RUNX, wobei die Isoform RUNX2 ausschließlich in der Stammzelllinie des Knochens exprimiert wird (Olfa et al. 2010). Allerdings unterliegen auch andere Komponenten des Knochenmarks einer Steuerung durch RUNX2, denn auch die Differenzierung von endothelialen Zellen ist RUNX2-abhängig und hat somit Einfluss auf die Angiogenese, die Knochenmineralisation und ein mögliches neoplastischen Geschehen (Sun et al. 2001). Der Transkriptionsfaktor RUNX2 ist für eine osteoblastäre Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen bereits von der frühen Phase an ein essenzieller Bestandteil (Komori 2002). In *Knock-out*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von RUNX2 zu einem vollkommenen Ausbleiben der osteoblastären Differenzierung führt (Komori et al. 1997). Zu den Induktoren von RUNX2 gehören unter anderem TGF- β und BMP (Kang et al. 2005). Zu Faktoren, die die Signaltransduktion von RUNX2 hemmen, gehört unter anderem die TNF- und die PPAR γ -Proteinfamilie. Obwohl der Genabschnitt von RANKL eine RUNX2-affine Bindungsstelle beinhaltet gibt es keinen Anhalt für einen Signaltransduktionsweg von RANKL in mesenchymalen Vorläuferzellen, der durch RUNX2 kontrolliert wird. Dies könnte eine mögliche Verbindung in der Frage der Osteoblasten-Osteoklasten-Interaktion sein, denn diese ist für die Knochenbildung essenziell (O'Brien 2010). Viele weitere Signalwege spielen in der Expression von RUNX2 eine Rolle, die erst nach und nach verstanden werden. So ist RUNX2 z.B. durch eine Phosphorylierung durch die *Myogen Aktivated Kinase* (MAP-Kinase) reguliert. Dieser Signalweg wird durch multiple Faktoren stimuliert, wie zum Beispiel durch die extrazelluläre Matrix und durch osteogene Faktoren wie die BMPs und das Parathormon (Franceschi und Xiao 2003).

1.9 Stammzellendifferenzierung

Stammzellen sind Primärzellensysteme, deren Potenzial es ermöglicht, bestimmte Zellverbände neu zu gestalten und vorhandene Zellverbände zu regenerieren (Junqueira 2003). Grundlage der Arbeit von Stammzellen ist die Aufteilung in totipotente Stammzellen- (Differenzierung in jedes Gewebe), pluripotente Stammzellen (embryonales Stammzellgewebe) und multipotente Stammzellen (definierte Zelllinien) (Evans und Kaufman 1981). Man kann Stammzellen in pluripotente Stammzellen einteilen, die zu Zellen der hämatopoetischen und mesenchymalen Vorläuferzellen ausdifferenzieren (Grove et al. 2004; Kondo et al. 2003). Zellen der hämatopoetischen Reihe besitzen eine hohe Potenz zur Vervielfältigung, zwischen ca. 80 und 95 %, und folglich ist deren Transdifferenzierung genetisch determiniert (Morrison und Weissman 1994). Es ist allerdings noch unklar, inwieweit die Plastizität der Zellen durch ihre Pluripotenz geprägt ist (Wagers und Weissman 2004). Der Aspekt der Pluripotenz von mesenchymalen Vorläuferzellen ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung, da diese Plastizität von Stammzellen zum Thema hat. Die mesenchymalen Vorläuferzellen besitzen das Potenzial, in Zellen des Fettgewebes, des Knorpelgewebes und des Knochengewebes wie z.B. Osteoblasten zu differenzieren (Prockop 1997). Diese mesenchymalen Vorläuferzellen können aus dem Knochenmark isoliert werden (Friedenstein et al. 1976). Für das Potenzial zur Ausdifferenzierung ist die Plastizität von Stammzellen von wesentlicher Bedeutung. Bestimmte Gene werden exprimiert, und die gewebsspezifische Ausdifferenzierung findet statt (Blau et al. 2001). Man konnte Kriterien für eine mesenchymale Vorläuferzelle definieren, diese umfassen ein adhärentes Wachstum, Oberflächenmarker CD73, CD90, CD105, sowie das Fehlen von CD11, CD14, CD19 und HLA-DR. Darüber hinaus können diese mesenchymalen Vorläuferzellen in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren (Dominici et al. 2006).

1.9.1 Osteogenese

Die Differenzierung während der Osteogenese wird durch die Expression der Proteinfamilie der *Transforming Growth Factors* reguliert. Diese Proteine, die Untergruppe der *Bone Morphogenetic Proteins*, sind in der Lage, die osteogene Differenzierung positiv zu stimulieren (Gimble et al. 1995). Proteine, die im Verlauf der Differenzierung der Osteogenese auftreten, sind das Osteocalcin, Kollagen Typ I, und die BMP Familie (*Bone Morphogenetic Family*) (Dorheim et al. 1993). Diese Proteine ermöglichen die Anwendung als Marker der osteogenen Differenzierung. Der Status der Stammzelle, zu welchem Gewebetyp, ob Adipozyt oder Osteoblast, sie zu zählen ist, ist als unscharf zu beurteilen und für die Stammzelle flexibel. Ein Potenzial zum Wechsel des Phänotyps ist jeweils möglich (Caplan und Bruder 2001).

1.9.2 Adipogenese

Die mesenchymalen Vorläuferzellen können *in vitro* in weißes Fettgewebe differenzieren (Bjorntorp et al. 1982). Weiterhin ist PPAR γ der einzige essenzielle Marker der frühen Adipogenese und mit C/EBP- α wegweisend für die Transduktion der Adipogenese (Rosen et al. 2002; Rosen und MacDougald 2006). Bedeutsam für die Adipogenese sind die assoziierten Proteine wie LPL und aP2 als Marker der späten Adipogenese (Deslex et al. 1987). *In vitro* sind mesenchymale Vorläuferzellen in der Lage, sich in ektodermale (z.B. Epithelien) und endodermale (z.B. Hepatozyten) Zellen zu differenzieren. Man spricht von einer sog. Selbsterneuerung (Bianco et al. 2010). Es ist bekannt, dass mit fortschreitendem Alter eine vermehrte Adipozytendifferenzierung im Knochenmark stattfindet. Diese Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen hat auch regulatorische Auswirkungen auf die hämatopoetische Stammzellen (sog. HSC) (Takaku et al. 2010). Von Adipozyten sezernierte Faktoren sind beispielsweise das Leptin und Adiponectin, die auch die hämatopoetische Stammzellendifferenzierung beeinflussen (Fernández-Riejos et al. 2010; Mikhail et al. 1997). Assoziiert mit der Knochenmasse sowie der Adipozyten-Differenzierung im Alter ist das Hormon Perilipin. Dieses Hormon wird in großen Mengen im Fettgewebe exprimiert (Smith und Ordovás 2012). Man konnte von Perilipin vier Gen-Mutationen identifizieren, die eine positive Assoziation mit der Knochenlänge von Osteoporose Patienten aufweisen (Cusano et al. 2012). Die Steuerungsmechanismen der Adipogenese sind weiterhin unklar und Gegenstand intensiver Forschung, sowie Thema dieser Arbeit.

1.9.3 Modulation des Wachstums

Das Wachstum von Stammzellen kann durch externe Faktoren moduliert werden. So induziert das Wachstumshormon, auch *Growth Hormone* GH genannt, über den *Insulin-like Growth Factor*, IGF-1 die Differenzierung von adipozytären Stammzellen (Catalioto et al. 1992). Weiterhin wirkt IGF-1 in primären Präadipozyten-Kulturen hemmend auf die Differenzierung (Gaskins et al. 1990). Als weiterer bedeutsamer Signalfaktor der Differenzierung gilt TGF- β , der auf der anderen Seite eine starke Induktion der Transformation von mesenchymalen Stammzellen aufweist (Tenney und Discher 2009). Weiterhin sind die Faktoren wie der *Plated-derived Growth Factor* (PDGF) und der *Fibroblast Growth Factor* (FGF) steuerungsrelevant für den Prozess der Transformation von mesenchymalen Vorläuferzellen in das Zielgewebe (Ng et al. 2008; Tenney und Discher 2009).

1.10 Glucocorticoide

Die Anwendung von Glucocorticoiden (GC) steht im Vordergrund der immunsuppressiven Behandlung von vielfältigen chronischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, der chronisch obstruktive Lungenerkrankung sowie den entzündlichen Gefäßerkrankungen. Weiterhin kann man die Wirkung in Anabolische und Immunologische aufteilen. Die genaue Wirkung von Glucocorticoiden ist noch nicht genau bekannt, man geht von einer generalisierten Immunmodulation aus. Glucocorticoide wirken auf den Glucocorticoid Rezeptor (GR), der von Steroid- und Thyreoid-Hormonen stimuliert werden kann (De Bosscher 2010). Der Glucocorticoidrezeptor ist ein ubiquitär vorkommendes Protein und beinhaltet Regionen der N-terminalen Bindungsstelle (NTD), Zink-Finger

Bindungsstellen (DBB) sowie die C-terminal Liganden-gebundene Bindungsstellen (LBD) (Beck et al. 2011). Cofaktoren und Transkriptionsfaktoren binden die sog. transkriptionale Aktivierungs-Funktion (AF2), die die GR-LBD Region beinhaltet (Kumar 2005). Liganden und GR-Dimere binden im Kern an die DNA sowie an Palindrom Glucocorticoid-Antwort-Elemente (GRE) in den Promotor-Regionen der Ziel-Gene. In der Folge tritt eine direkte Gen-Aktivierung (Transaktivierung) ein. Im Chip-seq (Chromatin Immunopräzipitation) konnte bereits eine Reihe an GR-Bindungsstellen in verschiedenen Genen identifiziert werden (John et al. 2011). Glucocorticoide hemmen so nicht nur das Immunsystem, sondern kontrollieren auch die Stress-Antwort des Organismus, dessen Entwicklung und Metabolismus. Jedoch ergeben sich daraus vielfältige Nebenwirkungen in der Klinik. Beispiele hierfür sind ein induzierter Diabetes mellitus, eine Wachstums Retardierung, die induzierte Gluconeogenese und die induzierte Osteoporose (Kleiman und Tuckermann 2007). Für diese Arbeit war die Wirkung von Glucocorticoiden auf den Knochen von besonderem Interesse. Die Auswirkungen auf die Knochenmineralisation beginnen bereits bei der Aufnahme von Calcium aus dem Gastrointestinaltrakt, die durch Glucocorticoide gemindert ist. Des Weiteren ist die renale Ausscheidung von Calcium erhöht (Hattersley et al. 1994). Man weiß, dass Glucocorticoide einen Einfluss auf Zellen des Knochenapparates haben. Sie modulieren somit die Funktion und Lebensdauer und adipozytäre Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten (Canalis et al. 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide über die GC-Rezeptor-Dimerisation, wie auch unabhängig davon, via Interleukin 11 auf die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen wirken (Rauch et al. 2010). Zunehmend werden auch weitere Signalwege identifiziert, wie die Steuerung durch den *Selective Glucocorticoid Receptor Agonist Compound A* in mesenchymalen Vorläuferzellen. Die Modulation mit diesem Hormon zeigte eine Suppression, wie auch eine osteogene Differenzierung konform zur Dexamethason-Behandlung. Man konnte eine weitere Protein-Protein-Interaktion des GR aufzeigen, wie die Interaktion mit NF- κ B. So kann der GR mit Zieltranskriptionsfaktoren wirken, die keine Bindungsstellen für GR haben. NF- κ B selbst hemmt den GR an GR-Bindungsstellen (umgekehrte Hemmung) (De Bosscher et al. 2003) und NF- κ B hemmt den Promotor von GR. Aber nicht alle proinflammatorischen Proteine werden über NF- κ B gehemmt (Ogawa et al. 2004). Des Weiteren zeigte sich ein NF- κ B-unabhängiger Signalweg, der im Unterschied zur Steroid-Behandlung die Osteoklasten-Differenzierung unberührt ließ (Rauner et al. 2011). Glucocorticoide beeinflussen die Osteoklasten direkt zu einer erhöhten Knochenresorption. Dies geschieht über die Aktivierung des *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) sezerniert von Osteoblasten, der notwendig für die Differenzierung der Osteoklasten ist (s.o.) (Suda et al. 1999). Dieser aktiviert Osteoklasten über den RANK-Rezeptor an der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläuferzellen und induziert mit dem *Colony Stimulating Factor-1* (CSF-1), die Osteoklastendifferenzierung. Auf diese Weise regulieren Osteoblasten indirekt die Osteoklastendifferenzierung. Gehemmt wird dieser Prozess durch direkte Antagonisierung durch Osteoprotegerin am Rezeptor. Man spricht von der sogenannten RANKL / Osteoprotegerin-Ratio (Hofbauer 1999). Die Glucocorticoide führen zu einer verstärkten mRNA-Expression des RANKL und des CSF-1 (Rubin et al. 1998). Der Wnt-Signalweg ist für die osteoblastäre Differenzierung von entscheidender Bedeutung und bei Erkrankungen des Knochenstoffwechsels wie der Osteoporose, gestört. Dieser Wnt-Signalweg

ist wiederum über die *Dickkopf*- und *Notch*-Signalwege reguliert. Der Wnt-Signalweg wird durch Glucocorticoide gehemmt und der des *Dickkopf* wird induziert (Krishnan et al. 2006; Wang et al. 2008). Glucocorticoide sind für die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten im frühen Stadium notwendig, jedoch mit Fortschreiten der Differenzierung werden diese durch Glucocorticoide, wie Dexamethason, gehemmt (Beloti und Rosa 2005). Es zeigt sich, dass Cortisol die Zellen der osteoblastären Reihe an einer fortschreitenden Differenzierung hindert. Im frühen Stadium der Differenzierung zeigt sich eine Minderung der Mineralisationsmarker, wie der Alkalischen-Phosphatase sowie ein vermehrter Nachweis von Fettvakuolen im Knochen (Pereira et al. 2002). Glucocorticoide scheinen über Signalwege des PPAR γ und des C/EBP eine Expression von proadipogenetischen Genen herbeizuführen (Pereira et al. 2004; Wu et al. 1996). Dies ist ein wesentlicher theoretischer Ansatz dieser Arbeit. Glucocorticoide haben außerdem einen Einfluss auf die Matrixmineralisation des Knochens. Des Weiteren wird durch die Suppression des *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF1) ebenfalls die Kollagen - Typ 1 - Bildung gehindert (Canalis 1998; Delany et al. 1995). Es gibt Hinweise, dass dies über eine erhöhte Expression von C/EBP- β reguliert wird. C/EBP- β bindet an den IGF-1-Promotor und hemmt so die IGF-1-Synthese (Delany et al. 2001). C/EBP- β - Überexpression induziert weiterhin eine PPAR γ -Expression in Kooperation mit C/EBP- δ , und führt zu einer verstärkten proadipogenen Differenzierung (Wu et al. 1995). Des Weiteren scheint die systemische Wirkung von Glucocorticoiden auch durch Osteoblasten gesteuert zu sein. So konnte gezeigt werden, dass durch eine Osteoblasten gesteuerte Unterbrechung des Glucocorticoid-Signalweges die Osteocalcin-Synthese gemindert werden kann. Diese Unterbrechung wurde in einem Maus-Modell mit 11 β -HSD2-Überexpression in Osteoblasten (Cortisol Deaktivierung) ermöglicht. Folglich kam es zu einer höheren Glucose-Toleranz und einer geringeren Gewichtszunahme bei Cortison behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle (Brennan-Speranza et al. 2012).

1.11 Osteoporose

Die Volkskrankheit Osteoporose betrifft einen erheblichen Anteil der Bevölkerung Deutschlands, insbesondere den weiblichen, aber auch den männlichen Teil der Bevölkerung. Rund 30 % aller Frauen entwickeln nach der Menopause eine manifeste Osteoporose (Herold und Kollegen 2008). Die Prävalenz dieser Erkrankung betrug unter den mindestens 50 - Jährigen 7,8 Millionen Erkrankungsfälle in der Bundesrepublik Deutschland (Häussler et al. 2007). Man spricht bei der Osteoporose von einer Minderung der Knochenmasse, oft einhergehend mit einem erhöhten Sturz-Risiko. Man kann die Osteoporose in eine primäre postmenopausale (Typ I) - und altersbedingte, sog. senile (Typ II) - Form einteilen. Diese machen etwa 95 % aller Osteoporose Fälle aus. Weiterhin kann man in sekundäre Formen, wie zum Beispiel durch Glucocorticoide oder den Hyperparathyreoidismus induzierte, einteilen. Multifaktorielle Ursachen können zu einem Krankheitsbild der primären Form führen, auf die im Folgenden eingegangen wird und einen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt. Frauen, die älter als 50 Jahre sind, sind durch die postmenopausalen Veränderungen besonders gefährdet und stellen die meisten Patientinnen in dieser Altersgruppe. Bei der senilen Form ist das Risiko für beide Geschlechter angeglichen und auch die Fallzahlen in der Altersgruppe der > 70-Jährigen gleichen sich zum Ge-

schlechterverhältnis 2:1 an (Herold und Kollegen 2008). Die hormonellen Ursachen dieser Veränderungen sind auf einen osteoprotektiven Einfluss des Östrogens auf Osteoblasten zu erklären, der mit steigendem Alter bei Frauen wie bei Männern vermindert ist. Bei Frauen ist der verminderte Effekt des Östrogens in den ersten zehn Jahren nach der Menopause besonders hoch. Allerdings ist auch bei Männern wohl der Knochenstoffwechsel stark durch Östrogen reguliert, sodass auch dies mutmaßlich zur Genese der Osteoporose bei Männern beiträgt (Riggs et al. 1998). Des Weiteren ist bei Frauen bekannt, dass das fehlende Östrogen zu einem sekundären Calcium-Verlust und einer verminderten Calcium-Aufnahme durch Parathormon führt. Es stellt sich weiterhin ein Begleitbild eines langfristigen sekundären Hyperparathyreoidismus ein, mit den sich daraus ableitenden Folgen, wie einer verminderten Knochenmasse (Eastell et al. 1991). Die Altersosteoporose ist mit einem Vitamin-D3-Mangel häufig vergesellschaftet, denn man weiß, dass eine Vitamin-D3-Substitution mit paralleler Calcium-Gabe bei der Prävention der Alters-Osteoporose eine wichtige Rolle innehat. Diese Mangelerscheinung kann bei täglicher Verabreichung in Tablettenform schnell und konsequent behandelt werden und das Auftreten von Frakturen gesenkt werden kann (Avenell et al. 2009; Bacon et al. 2009). Eine verminderte Vitamin-D3-Stoffwechsellage ist wesentlich für ein erhöhtes Frakturrisiko verantwortlich. So kann man sagen, dass der Vitamin-D3-Status von älteren Patienten mit der Knochendichte korreliert (Bischoff-Ferrari et al. 2004). Durch die besonderen Lebensumstände sind gerade ältere Menschen durch verminderte Mobilität bei Außenaktivitäten von einem Vitamin-D3-Mangel gefährdet (Holick 1995). Die Auswirkung des sekundären Hyperparathyreoidismus wird durch den Vitamin-D3-Mangel noch verstärkt. Auf zellulärer Ebene kann man sagen, dass die Osteoporose sich aus einem Missverhältnis von Osteoblasten und Osteoklasten im knochenbildenden System entwickelt. Die Zellbiologie des Alterns konnte zeigen, dass ältere Individuen ein vermindertes Potenzial zur osteoblastären Differenzierung haben als im Vergleich zu jüngeren Individuen (Bergman et al. 1996). Auf der anderen Seite konnte man eine Verstärkung der Proliferation von Osteoklasten in gealterten Zellkulturen der osteogenen Differenzierung nachweisen (Perkins et al. 1994). Dies konnte weiterhin in einem Zellmodell für präosteoblastäre Vorläuferzellen von prä- und postmenopausalen Frauen nachgewiesen werden. Als Induktor einer möglichen Osteoclastogenese konnte RANKL in direkter negativer Korrelation mit den Knochenresorptionsmarkern gesetzt werden. Ebenfalls konnte im Falle eines Östrogen-Mangel-Zustandes eine RANKL-Erhöhung der Knochenmarks B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003; O'Brien 2010). Dies unterstreicht die osteoprotektive Wirkung des Östrogens. Die Altersosteoporose führt zu vielfältigen Veränderungen der knochenspezifischen Marker wie der AP, oder des Osteocalcins. Allerdings lässt sich keine diagnostische Validität aus diesen Veränderungen für eine Prognose der Krankheit ableiten (Szulc und Delmas 2008). Auch extrazelluläre Matrixbestandteile, wie Laminin, sind in einem gealterten Zellmodell vermindert. In einem *Knock-down* Laminin-Zell-Modell konnte eine Verminderung der osteoblastären Proliferation und der RUNX2-mRNA-Expression gezeigt werden (Rauner et al. 2009). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Annahme, dass Laminin-abhängige Erkrankungen, wie das Hutchinson-Gilford-Syndrom, mit einem Osteoporose-artigen Krankheitsbild und einem erhöhten Frakturrisiko vergesellschaftet ist (De Sandre-Giovannoli et al. 2003). Diese Veränderungen stehen auch im Ver-

dacht für einen altersbedingten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel verantwortlich und für die Osteoblastogenese essenziell zu sein (Duque und Rivas 2006; Rauner et al. 2009). So kann dem Intermediärfilament Lamin eine bedeutende Rolle im knochenbildenden Prozess zugeschrieben werden. Die negativen Veränderungen in der Knochenstruktur sind die Folgen einer Störung der *Bone Multicellular Unit*, deren Auswirkungen sich auf den Verlust der Knochenmatrix und einer erhöhten Aktivität des *Bone Remodeling* ergeben. Der Beginn der negativen Knochenbilanz beginnt wohl mit Abschluss des Knochenaufbaus im jungen Erwachsenenalter, beziehungsweise im mittleren Lebensalter (Parfitt et al. 2000). Man konnte bereits bis zum Alter des 20. Lebensjahres die höchste Knochendichte der Trabekel von Vertebraalknochen (Gilsanz et al. 1988) erreichen. Die Veränderungen zwischen positiver und negativer Knochenstrukturbilanz in der BMUs sind gering, allerdings ist diese Feststellung wichtig für den Therapieansatz mit Bisphosphonaten. Des Weiteren ist der Einfluss des Östrogen-Defizits auf das *Bone Remodeling* beachtenswert. So zeigen sich ein allgemeiner Anstieg der *Remodeling Rate* und ein erhöhter Verlust des Volumens von Knochenmatrix durch Osteoklasten. Verstärkend auf die negative Bilanz der Knochenmineralisation wirkt eine verminderte Lebensdauer der Osteoblasten. Verschiedene Interleukine werden als parakrine Induktoren des Östrogens vermutet, wie zum Beispiel das Interleukin 6, das die osteoblastäre Differenzierung vermittelt und eine Osteoklastogenese inhibiert (Jilka et al. 1998; Srivastava et al. 1998). Weiterhin werden im trabekulären Knochen weit mehr BMUs pro Volumen umgewandelt, als im kortikalen Knochen. Auf diese Art verliert der kortikale Knochen im Alter weit mehr Struktur, als der trabekuläre Knochen und wird im Alter instabiler. Dies zeigt sich in ausgeprägtem Verlust von Knochenmasse und Knochendichte, in Fällen der Altersosteoporose, aber auch im natürlichen Alterungsprozess. Man kann von einer „Trabekelisierung“ der Kortikalis sprechen (Brown et al. 1987; Legrand et al. 2000) und damit einer einhergehenden Bruchanfälligkeit. Die Knochenmasse und das Risiko einer Fraktur sind stark miteinander verbunden und bedingen die Klassifikation der Osteoporose und deren Verlauf durch die WHO (Kanis 1994). Eine wirkungsvolle Beeinflussung der BMU stellen antiresorptive Medikamente dar, wie zum Beispiel die Bisphosphonate, wie Alendronate und Risedonat. Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM), wie Raloxifen werden zur Prophylaxe der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt. Die Rate an BMU steigert sich innerhalb von Jahren des Behandlungszeitraumes und führt zu einer Erhöhung der Knochendichte (Delmas 2000). Weiterhin ist die monoklonale Antikörperbehandlung mit Denosumab eine wirkungsvolle Therapie der postmenopausalen Osteoporose. Denosumab hemmt direkt RANKL an RANK und senkt damit die Aktivität von Osteoklasten und vermindert somit die Knochenresorption. Durch die Behandlung mit Denosumab kann die Knochendichte in Hüftknochen, Radiusknochen und Wirbelsäule erhöht und die Frakturgefährdung gesenkt werden (Jamal et al. 2011).

1.12 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war die Etablierung eines Zellmodells von mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft. Die erhöhte Genexpression von 11- β HSD1, die mittels eines Plasmids erreicht wurde, soll ein *in vitro*-Modell der alterinduzierten Osteoporose darstellen. Dabei erfolgte der erhöhte Nachweis von 11- β HSD1 in mRNA und Protein in einer zeitabhängigen Betrachtung.

tung, 48 Stunden bis 28 Tage nach Transfektion in mesenchymalen Vorläuferzelle osteogener Herkunft. Als nächster Schritt sollte eine direkte Messung der Aktivität des Enzyms erfolgen. Dabei messen wir das Substrat und Produkt Cortison, bzw. Cortisol unter Modulation der jeweiligen Cofaktoren. Ziel war somit eine erhöhte Funktionalität des Enzyms 11- β HSD1 nachzuweisen. Insbesondere war die Frage von Interesse welche Konversion, also Reduktion oder Oxidation durch das Enzym vorherrschend ist. Und zweitens, welche Auswirkungen sich damit auf das Isoenzym 11- β HSD2, hinsichtlich dessen Funktionalität ergeben. Weiterhin sollte unter mRNA-Nachweis von proadipogenen Markern die proadipogene Differenzierung dieser mesenchymalen Vorläuferzellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellmaterial

Das verwendete Zellmaterial von mesenchymalen Vorläuferzellen wurde aus dem Knochen von Patienten isoliert. Der Kultivierung der Zellen ging die operative Entnahme und anschließende Explantation in Kulturmedien voraus. Die Biopsie der Gewebeproben erfolgte im Rahmen von Hüft- und Tibia Plateau-Operationen, des Weiteren infolge von Schulteroperationen. Die Entnahme wurde durch die Abteilung Orthopädie des Universitätsklinikums Göttingen und der Orthopädie des Krankenhauses Neu-Mariahilf in Göttingen ausgeführt. Ansprechpartner und Operateur war Herr Dr. med. Baums im Klinikum Göttingen. Herr Dr. med. Manthey war Operateur in Neu-Mariahilf. Der Ethikantrag Nummer 9/5/2001 zur Verwendung von Gewebeproben im Rahmen von wissenschaftlichen Experimenten für die Kultivierung von primären Zellkulturen lag vor.

Patient	Geburtsdatum	Geschlecht	Entnahmestelle
T.G.	21.06.1932	w	Hüfte
R.M.	29.09.1936	w	Schulter
H.B.	21.01.1944	w	Knie
G.D.	29.06.1942	w	Knie
A.P.	22.04.1939	w	Knie
U.L.	31.10.1964	w	Hüfte
W.R.	30.09.1948	m	Knie
L.J.	03.11.1950	m	Knie

Tabelle 1. Tabellarische Darstellung des verwendeten Knochenmaterials der Patienten.

Humane Osteosarkomzelllinie HOS-58

Diese stabile Zelllinie wurde aus dem Osteosarkom eines einzelnen Patienten entwickelt. Diese Zelllinie scheint eine hohe Vergleichbarkeit im Wachstum zu primären Ratten-Osteoblasten aufzuweisen (Siggelkow et al. 1998b). Diese Zelllinie wurde als schnell wachsende Zelllinie zur praktikablen Erprobung der Methodik verwendet.

2.2 Zellkultur-Medien

Reagenz	Hersteller
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA, Cölbe
L-Glutamin-Lösung (200nM)	Life Technologies (früher: Gibco), Carlsbad, California, USA
Penicillin / Streptomycin-Fertiglösung (Pen. / Strep.-Lösung)	Life Technologies (früher: Gibco), Carlsbad, California, USA
BSA (Bovine Serum Albumin 35 % Lösung)	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's MEM (DMEM)	PAA, Cölbe
Iscove-Medium (IMDM)	PAA, Cölbe

Tabelle 2. Tabellarische Darstellung der Reagenzien des Kulturmediums.

pHOB FCS	500 ml DMEM + 50 ml FCS (10 %) + 5 ml Pen. / Strep.-Lösung + 5 ml L-Glutamin-Lösung
pHOB BSA	500 ml DMEM + 50 ml BSA (0,1 % BSA) + 5 ml Pen. / Strep.-Lösung + 5 ml L Glutamin-Lösung
HOS-58	500 ml IMDM + 50 ml FCS (10 %) + 2,5 ml Pen. / Strep.-Lösung + 5 ml L-Glutamin-Lösung

Tabelle 3. Zusammenfassung des zusammengestellten Nährmediums für die Kultivierung von mesenchymalen

Reagenzien und Kits	Hersteller
Phosphatgepufferte Salzlösung D-PBS (- CaCl ² , - MgCl ²)	PAA H15-002
Trypsin-EDTA-Lösung	Life Technologies (früher: Gibco), Carlsbad, California, USA
Trypanblau	Serva, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Aqua destilliert, steril	Fresenius, Bad Homburg

Tabelle 4. Reagenzien und „Kits“ zur Zellgewinnung und RNA-Aufarbeitung.

2.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Pipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen 20 µl	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen 100 µl	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Kryoröhrchen	Nalgene, Hereford, England
Flüssigstickstoff-Kontainer	Cryoson, Schöllkrippen
Behälter für Kryoröhrchen	Nalgene, Hereford, England
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Mikroplatte 6-Well	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ USA
Petrischale 9,4 x 1,6 cm	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ USA
Kulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Falconröhrchen 50 ml	Becton-Dickinson, Mountain View, USA
Real-Time-PCR System „StepOne Plus“	Life Technologies (früher: Applied Biosystems), Carlsbad, California, USA
Eppendorfcups 500 µl	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Sterilfilter „Minisart“	Sartorius, Göttingen
Absaugpumpe	Schütt, Göttingen
Thermomixer „Comfort 1.5 ml“	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop CK 2 mit Kamera SC 35	Olympus, Tokyo, Japan
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Fireboy S-1000	Tecnomara, Fernwald
Pipetboy	Hirschmann, Eberstadt
Inkubator „Sanyo“	Sanyo Biomedical, Bad Nenndorf
Kühlzentrifuge „Rotixa“	Hettich, Tuttlingen
Sterilbank	Schirp, Bork, Westfalen
Wasserbad	Gebr. Rettberg, Göttingen
Tischzentrifuge „Eppendorf 5415 C“	Eppendorf, Hamburg
Rührer	Gerhardt, Bonn

Minishaker	IKA Works, Wilmington, USA
Skalpell	Techno cut, Horsham, U.K.

Tabelle 5. Tabellarische Darstellung Gefäße, Geräte und Hilfsmittel der Zellkultur.

2.3.1 Transfektion

Reagenz	Hersteller
Lipofektamin 2000	Life Technologies (früher: Invitrogen), Carlsbad, California, USA
Opti MEM	Life Technologies (früher: Gibco), Carlsbad, California, USA

Tabelle 6. Reagenzien für Transfektion.

DNA- und RNA-Isolierung

2.3.2 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)

Kit	Hersteller
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Endofree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 7. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.

Reagenzien	Hersteller und Bezugsstelle
β-Mercaptoethanol in H ₂ O	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt
Trypsin	Merck, Darmstadt
PBS	Merck, Darmstadt
RNA Protect	Qiagen, Hilden

Tabelle 8. Material All Prep DNA / RNA Mini Kit.

Reagenzien	Hersteller
Ampuwa, dest. H ₂ O	Fresenius, Bad Homburg
RNase Inhibitor 40 U / µl	Roche, Basel
RT-Puffer „First Stand Puffer“	Roche, Basel
Primer pdT ₁₅ cDNA (8 nmol)	Roche, Basel
M-MLV Primer (200 U / µl)	Life Technologies (früher: Invitrogen), Carlsbad, California, USA
Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	Life Technologies (früher: Invitrogen), Carlsbad, California, USA
dNTPs (0,1 µmol / µl)	Roche, Basel
RT-PCR Gerät „Primus 96“	Peq-Lab, Erlangen
Thermomix comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 9. Materialien der Reverse Transkriptase (RT)-PCR.

Reagenzien	Hersteller
Sense Primer	Eurofins MWG-Operon, Ebersberg
Antisense Primer	Eurofins MWG-Operon, Ebersberg
Fast SYBR® Green Master Mix beinhaltet: dNTP Mix Taq-Polymerase	Life Technologies (früher: Applied Biosystems), Carlsbad, California, USA

Glykogen Mg ²⁺ -Ionen PCR Puffer	
Ampuwa, dest. H ₂ O	Fresenius, Bad Homburg
Thermomix „Comfort 1,5 ml“	Eppendorf, Hamburg
Real-time-PCR Gerät „Step-One Plus“	Life Technologies (früher: Applied Biosystems), Carlsbad, California, USA

Tabelle 10. Materialien der Real-time-PCR.

Oligonukleotide

Primer	Sequenz von 5` zu 3`	Acc. Nummer
β-Actin Sense	CTG GAA CGG TGA AGG TGA	NM_001101
β-Actin Antisense	CG AGT CTT CGG CCA CAT TGT GA	
HSD 11 B1 Sense	AAA TCC ATG CAG GAA	NM_005525
HSD 11 B1 Antisense	GATCC CAG GTG TGA CCC ATG ACT TG	
HSD 11 B2 Sense	TTC ACT GCA GCC TTT CAC	NM_000196.3
HSD 11 B2 Antisense	AG TGT GGC AAT TGG GAA GTA CA	
PPAR-γ2 Sense	CTTTTGGTGACTTTATGGA	NM_138711
PPAR-γ2 Antisense	CTTGTAGCAGGTTGTCTTG	
aP2 Sense	TAC TGG GCC AGG AAT TTG	NM_001442
aP2 Antisense	AC GTGGGAAGTGACGCCTTTCAT	
LPL Sense	AGT GGC CAA ATA GCA CAT	NM_000237
LPL Antisense	CC C CGA AAG ATC CAG AAT TCC A	
OPG Sense	CTC AGG CAC TTG AGG CTT	NM_002546
OPG Antisense	TC T GCA AGC AGT AAT AAG GGA AAA	
CEBP Alpha Sense	CCC CTC CCT TCC TCT GCG	NM_004364.3
CEBP Alpha Antisense	AGC CCT CCTCCT GCC ACG G	
CEBP Beta Sense	GAC AAG CAC AGC GAC GAG	NM_005194.2
CEBP Beta Antisense	TA G TGC TGC GTC TCC AGG T	
CEBP Delta Sense	AGC GGC GCA ACC AGG AG	NM_005195
CEBP Delta Antisense	GCT GAG TCT CTC CC CGC C	
RUNX2 Sense	TTC CAG ACC AGC AGC ACT	NM_004348
RUNX2 Antisense	C CA GCG TCA ACA CCA TCA TT	
RANKL Sense	ACC AGC ATC AAA ATC CCA	NM_033012
RANKL Antisense	AG T AAG GAG GGG TTG GAG ACC T	
SGK1 Sense	GCA GAA GGA CAG GAC AAA	NM_001143676
SGK1 Antisense	GC CAG GCT CTT CGG TAA ACT CG	

Tabelle 11. Oligonukleotidsequenzen der untersuchten Gene (gebrauchsfertig bezogen).

Plasmidvervielfältigung

Medium	Reagenzien
Standard Medium „Luria Bertani“ (1 Liter)	Trypton 10g Hefe 5 g NaCl 10 g Maltose 2 g Antibiotikum Ampillicin (100 mg/ml) 973 ml dest. H ₂ O

Tabelle 12. Material für LB-Medium („Luria Bertani“ Kulturmedium)

Typ	Produkt	Bezugsstelle
Chem. komp. Bakterienkultur	DH5- α -Stamm	Universitätsklinikum, Göttingen

Tabelle 13. Bakterienkultur eines chemisch kompetenten E.coli Stamms.

Material	Hersteller, Bezugsstelle
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Soft Agarplatten	Abt. Biochemie, Universität Göttingen
Orbital Inkubator	Krannich, Göttingen
Ultrahochgeschw. Zentrifuge	Abt. Biochemie, Universität Göttingen
Antibiotikum Ampicillin	Universitätsklinikum, Göttingen
Endo Free® Plasmid Maxi Purification Kit	Qiagen, Hilden
UVette	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 14. Reagenzien und Ausrüstung.

Plasmid	Verwendung	Anmerkungen	Hersteller und Bezugsstelle
p.c. DNA 3	Kontroll Plasmid	Ampicillinresistenz, Neomycinresistenz, 5400 Bp	Klin. Pharmakologie, Göttingen
p.c. DNA 3.1	11- β HSD1 Überexpression	Ampicillinresistenz, Neomycinresistenz, 5358 Bp	Charité, Berlin
GFPtpz	Transfektionseffizienzkontrolle	Ampicillinresistenz, 3486 Bp	Klin. Pharmakologie, Göttingen

Tabelle 15. Verwendete Plasmide

Material	Hersteller und Bezugsstelle
GFP Plasmid	Universitätsklinikum Göttingen
Mini Chamberslide	Labtek GmbH, Ahaus
Axio Vision Kamera 200 M	Carl Zeiss, Jena
AxioVison Software	Carl Zeiss, Jena

Tabelle 16. Material für GFP-Kontrolle

Reagenzien und Materialien	Hersteller, Bezugsstelle
Mikrowelle Micromat	AEG, früher Frankfurt am Main
Spannungsgerät, EPS 500 / 400	Sartorius, Göttingen
Gelkammer, wide mini subgel	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Mikrowaage, 2354	Sartorius, Göttingen

Ethidiumbromid	Universitätsklinikum, Göttingen
Agarose	Biozym, Hes. Oldendorf
Bildgebende Apparate	Stratagene europe, Amsterdam

Tabelle 17. Materialien der Agarose Gelelektrophorese

Immunoblot

Reagenzien	Hersteller
NuPage LDS Sample Puffer	Life Technologies (früher: Invitrogen), Carlsbad, California, USA
Bis Tris Gele 4 % bis 12 %	Life Technologies (früher: Invitrogen), Carlsbad, California, USA
Nu Page MOPS SDS Running Buffer	Life Technologies (früher: Invitrogen), Carlsbad, California, USA
Ponceau S	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Detection Solution, ECL™	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Color Plus Prestained Protein Ladder	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Nitrocellulose Transfermembran	Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Magermilchpulver	Carl Roth Chemie, Berlin
Re-Blot Plus Strong Solution (10 x)	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

Tabelle 18. Tabelle Reagenzien des Immunoblots

Geräte	Hersteller
Power supply, Model 1000-500	Bio-Rad, Hercules, California, USA
X-Cell surface lock novex mini-cell	Life Technologies (früher: Invitrogen), Carlsbad, California, USA

Tabelle 19. Geräte für Immunoblot

Proteinbestimmung

Reagenz	Stammlösung
50 mM Hepes pH 7,5	1 ml (0,5 M) in kalter Lösung pH einstellen!
150 mM NaCl	300 μ l (5 M)
1,5 mM MgCl ₂	15 μ l (1 M)
1 mM EGTA	56 μ l (180 mM)
10 % Glycin	1 ml, 87 %
10 % Triton-X 100	100 mg
oder 0,5 % NP-40	0,5 ml 10 % NP-40
Proteaseinhibitor (optional)	Tablette

Tabelle 20 Tabelle Lysispuffer

Die Stammlösung wird auf 10 ml H₂O aufgefüllt.

Antikörper

Paratrop	Hersteller	Produkt-Nr.	Description	Größe
11- β HSD1	Abcam	ab39364	Rabbit polyclonal, IgG	32 kDa
11- β HSD2	Abcam	ab80317	Rabbit polyclonal, IgG	44 kDa

β -Actin	Sigma	A5441	Mouse clone AC-15	42 kDa
Da Ko Cytomation	Amersham	po399	AntirabbitIgG/HRP	

Tabelle 21. Verwendete Antikörper für Immunoblot

Verwendete Substrate

Reagenz	Hersteller	Produkt-Nr.	Mengen und Konzentrationen
Cortisol	Sigma, Taufkirchen	H6909	50 μ Mol, Lösung in 0,0036 g Ethanol
Cortison	Sigma, Taufkirchen	C2755-1G	Pulverform, 98 %
NADPH	Sigma, Taufkirchen	N991015VL	0,3 mg pro vial, Lösung in NaOH, Tetra sodium
NAD	Sigma, Taufkirchen	N8285	10 mg pro vial
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Taufkirchen	G7879-500mg	Pulverform, sodiumsalt
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von leuco. mesenteroides E.coli	Sigma, Taufkirchen	G8404	0,1 ml mit 110 bis 1600 units

Tabelle 22. Materialien, Cofaktoren, NAD- und NADPH-Regenerationssystem für 48 h Versuch

Material	Hersteller
Eppendorfgefäße	Nalgene Cryoware, Nunc Int. Corp. USA
Zellschaber, Cellscrapper 25 cm	Sarstedt, Newton, North Carolina, USA

Tabelle 23. Materialien Zellysatherstellung

Zellzahlbestimmung

Reagenz	Menge und Volumen
NaCl	9,9 g
Trypanblau	0,5 g
Ampuwa H ₂ O	100 ml

Tabelle 24. Trypanblau Färbelösung

2.4 Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die Zellen wurden im Zelllabor in einem CO₂-Inkubator bei 5 % CO₂, 37° C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Lagerung erfolgte in einer Petrischale mit 10 ml FCS-haltigem Nährmedium. Das Ursprungsknochenmaterial befand sich in Form von Knochenfragmenten auf dieser Petrischale. Ein Wechsel des Mediums musste zweimal wöchentlich erfolgen. Das Verfahren der mesenchymalen Zellkultivierung und Gewinnung erfolgte nach dem beschriebenen Verfahren (Siggelkow et al. 1999). Das Knochenmaterial, dessen Kultivierung sich unmittelbar an die Explantation anschließen muss, wurde bei der Entnahme in sterile 0,9 % NaCl-Lösung überführt. Eine Kühlung bei 4° Celsius und Lagerung in einem Nährmedium ermöglichte eine Aufarbeitung des Materials innerhalb von 24 Stunden. Zu Beginn der Kultivierung der mesenchymalen Vorläuferzellen musste sämtliches Fettgewebe vom Knochen entfernt werden. Anschließend erfolgte eine Zerkleinerung der Fragmente mittels or-

thopädischem OP-Besteck und eine Waschung mit PBS (beinhaltet kein Ca^{2+} und Mg^{2+}) zur restlosen Entfernung von Blutbestandteilen. Kleine Knochensplitter (2 - 5 mm) wurden auf Petrischalen aufgeteilt und mit Nährmedium (DMEM Medium, 10 % FCS, 58,5 $\mu\text{g/ml}$ Glutamin und jeweils 100 U/ml Penicillin und Streptomycin) versorgt. Hieraus wuchsen die Zellen in der Petrischale. Die weitere Versorgung mit 10 ml FCS-haltigem Nährmedium erfolgte zweimal pro Woche.

2.4.2 Lebendzellzahlbestimmung

Bei der Verwendung von mesenchymalen Vorläuferzellen in einem Experiment war es notwendig, die Lebendzellzahl zu bestimmen. Die hierfür verwendete Methode ist das Färben mit Trypanblau. Diese Färbung ermöglichte die Unterscheidung zwischen vitalen und abgestorbenen mesenchymalen Vorläuferzellen. Da die Zellmembran lebendiger Zellen für diesen Farbstoff nicht permeabel ist, wurden tote Zellen blau angefärbt, auch *Dye-exclusion Method* genannt. Es erfolgte die Bestimmung der gemittelten Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop. Mit folgender Formel erfolgte die Berechnung der Zellzahl:

$$\text{Konzentration der Zellen } [\text{ml}^{-1}] = \frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 2 \times 10^4$$

Durch Multiplikation der ermittelten Konzentration mit dem Volumen der Zellsuspension wurde die Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Im Versuchsaufbau wurden 10 μl der Zelllösung mit 10 μl 0,5 %iger Trypanblau-Lösung vermischt und davon 10 μl im Gitternetz der Neubauer-Zählkammer unter 10-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.4.3 Zellkultivierung in Experimenten

Zur Verwendung bei wissenschaftlichen Experimenten mussten die mesenchymalen Vorläuferzellen standardisiert aufgeteilt werden. Dazu wurden die Zellen bei ausreichender Zelldichte, wenn ein storiformes (fischzugartiges) Wachstumsmuster mikroskopisch erkennbar ist, von der Petrischale gelöst und in 6-Well-Platten überführt. Hierzu wurden die Knochenfragmente gelöst, die adhären Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und nach Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung für 4 min. bei 37° C von der Petrischale gelöst. Es folgte eine Zentrifugation bei 1400 UpM für 10 min und anschließend eine Resuspension der Zellpellets in 1 bis 3 ml Medium. Zur Lebendzellzahlbestimmung wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Anschließend wurde die standardisierte Gabe der Zellen (ca. 38.000 bis 150.000 Zellen pro Well) auf einer 6-Well-Platte durchgeführt.

2.4.4 Plasmid-Generierung

Zur Regulation der Genexpression in Säugetierzellen wurden Plasmide (niedermolekulare zirkuläre DNA) verwendet, die es ermöglichten gentechnisch veränderte Sequenzen in das Genom einer Zelle einzuschleusen. Plasmide kommen häufig in Mikroorganismen vor, aus denen sie isoliert werden. Diese DNA-Abschnitte tragen eine unterschiedliche Anzahl an Genen, die meist ein Resistenzgen für Ampicillin und unterschiedliche Promotorregionen umfassen. Bei der unten aufgeführten Plasmid-Generierung wählten wir den Bakterienstamm *Escherichia coli* 5-DHA- α . Die Überexpression des

Enzyms 11- β HSD1 ist Gegenstand dieser Arbeit. Das Plasmid p.c. DNA 3.1 trug das entsprechende Gen in der MCS (Multicloningsite) und wurde in Kooperation mit Dr. Volker Bähr von der Charité Berlin im Labor etabliert. Als negativer Kontrollvektor diente das Plasmid p.c.DNA 3, das keine entsprechende Genmodifikation umfasste. Mit dem *Green Fluorescent Protein* (GFP) tragenden Plasmid wird ermöglicht, die Biolumineszenz für eine objektive Kontrolle der Transfektionseffizienz (s. Transfektion) zu nutzen. Die erfolgreiche Zunahme der Aktivität des Enzyms 11- β HSD1 durch ein Plasmid ist bereits bei Diederich und Kollegen beschrieben worden (Diederich et al. 2002).

2.4.5 Klonierung

Das Ziel dieser Klonierung war die Integration der 11- β HSD1-Gensequenz in das Plasmid p.c. DNA3.1, die die Überexpression des Enzyms zur Folge hatte. Als Vektor wurde das Plasmid p.c.DNA 3.1 und als Kontrolle das p.c.DNA 3 gewählt. Neben Resistenzgenen gegen Antibiotika tragen diese Plasmide bestimmte Schnittstellen für Restriktionsenzyme, sogenannte Palindromsequenzen. Die Ziel-DNA, die in das Plasmid integriert werden sollte, verfügte über komplementäre Enden zu den überstehenden Enden des Plasmids (*Sticky Ends*). Zwischen den Enden der Plasmid - und der Ziel - DNA erfolgte erst eine Hybridisierung, dann schloß die Ligation an.

2.4.6 Ligation

Die Ligation bezeichnet die kovalente Bindung von zwei komplementären DNA-Abschnitten durch eine enzymatische Reaktion. Das Enzym Ligase verknüpft diese DNA-Abschnitte durch Phosphodiesterbindungen.

2.4.7 Generierung einer Bakterienkultur

Vor der Isolierung des Plasmids aus Bakterienzellen musste eine ausreichende Anzahl an Bakterien gezüchtet werden. Aus Vorexperimenten wurden zwei in Glycerol-Stocks eingefrorene Bakterienkulturen des Stammes DH5- α verwendet. Es wurde die Größe der Kulturflaschen nach Menge der zu kultivierenden Bakterien gewählt und das „Luria Bertani“ (kurz LB) Kulturmedium hinzugegeben. Zur Vervielfältigung der Bakterienzahl wurden die Bakterien bei 37° C in einem Schüttler bei minimal geöffnetem Deckel geschwenkt. Zur Generierung unserer Hauptkulturen wurden 0,5 Liter Erlenmeyerkolben gewählt. Die Anzucht erfolgte auf Soft-Agar Platten, auf dem die Bakterien mit dem LB-Medium ausgestrichen wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C.

Glycerolstocks

Die Langzeitlagerung der E. coli Bakterienkultur erfolgte in sogenannten Glycerolstocks. Eine Asservierung war für ca. 2 bis 3 Jahre bei - 80° C möglich und erfolgte in einem 1:1 Verhältnis von LB-Medium zu 100 % Glycerol. Das verwendete autoklavierte Eppendorf-Cup musste vor der Überführung der Bakterienkultur vorgekühlt werden und Glycerol enthalten. Es erfolgte die Lagerung bei -80° C in einem Gefrierschrank.

Transformation von chemisch kompetenten E. coli Bakterien

Die vorliegenden Plasmide p.c. DNA 3.1 und 3 wurden zum oben genannten E. coli-Stamm, welcher in einem Calcium-Chlorid-Medium vorliegt, hinzugegeben. Es folgte eine halbstündige Inkubation auf Eis. Nach kurzzeitiger Erhitzung, in diesem Zeitraum erfolgt die Penetration der Plasmid-DNA in das Bakterium (90 Sekunden) und eine anschließende schockartige Kühlung. Es erfolgte die Resuspension in LB-Medium in folgendem Verhältnis: 100 µl chem. kompetenten E.coli Stamm DH5- α zu 300 µl LB-Medium, das kein Antibiotikum enthält. Die Bakterien inkubierten für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Selektion wurde der Mix auf mehreren Agarplatten ausgestrichen, die ein Antibiotikum enthielten. Diese Agarplatten wurden mehrere Tage in wachstumspositiver Umgebung aufbewahrt, bis eine ausreichende Bakteriendichte erreicht war. Im Sinne der positiven Selektion wurden die Antibiotika-resistenten Kolonien zur weiteren Kultivierung herangezogen, da nur diese die Ampicillin-Resistenz und damit das Plasmid enthalten. Zur weiteren Vervielfältigung wurden die Bakterienkolonien in mehreren Erlenmeyerkolben mit jeweils 1000 ml LB-Medium (bei 37° C) gegeben und bei leichtem Verschluss über 15 Stunden in einem Schwenkinkubator belassen. Zur weiteren Unterdrückung fremden Bakterienwachstums wurde dem LB-Medium zusätzlich Ampicillin hinzugefügt (Konzentration 100 µg / 1 ml). Abschließend wurde die Bakterienkultur in einer Ultrahochgeschwindigkeitszentrifuge im Erlenmeyerkolben bei 10.000 UpM zentrifugiert und das LB-Medium entfernt. Weiterführend wurde aus der Bakterienkultur unter Verwendung des Endofree® Plasmid Purification Maxi Kits das Plasmid isoliert. Diese Isolierung umfasste den Arbeitsschritt der präparativen Plasmidisolierung (Maxiprep).

Präparative Plasmidisolierung

Unter Verwendung des Endofree® Plasmid Kits wurden die Bakterien bei 10.000 UpM für 15 min bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml Puffer P1 resuspendiert, der RNase enthielt und zu einer Lyse der Zellwand führte. Dem Ansatz wird nun Puffer P2 (10 ml) zugeführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächster Schritt wurde dem Ansatz 10 ml Puffer P3 hinzugefügt und die Lösung geschwenkt. Unmittelbar im Anschluss wurde das Lysat in den beigefügten QIAFilter überführt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Der Ansatz wurde durch den Filter in das beigefügte 50 ml Tube gefiltert. Dem filtrierten Ansatz wurde der mitgeführte Puffer ER hinzugeführt und für 30 min auf Eis inkubiert, um das zellschädigende Endotoxin zu neutralisieren. Zur Bindung und Waschung des Plasmids wurde Puffer-QBT hinzugefügt, und abgewartet, bis sich die Zellen gesetzt haben. Nun wurde das Zelllysat zur Eliminierung von Kontaminationen mit Puffer-QC gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde nun wie folgt eluiert: Es wurde 15 ml Puffer QN und 10,5 ml Isopropanol hinzugegeben und für 30 min bei 15.000 UpM und 4° C zentrifugiert, um die DNA zu isolieren und zu pelletieren. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % endotoxinfreie Ethanol Lösung (enthält *Endotoxinfree water*) gewaschen und bei 15.000 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde an der Luft für 5 bis 10 min getrocknet. Es erfolgte eine Resuspension mit 200 µl Endotoxinfree Puffer TE und eine anschließende Aufbewahrung bei -20° C. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine fotometrische Messung bei 260 nm gegen den Leerwert durchgeführt.

Kontrolle der Plasmidgenerierung

Zum Nachweis der erfolgreichen Plasmid-DNA-Isolierung wurde ein Restriktionsenzymverdau und eine anschließende Gelelektrophorese durchgeführt. Die speziellen Enzyme XbaI und BclI binden an ihrer Erkennungssequenz und schnitten das Plasmid. Dies ermöglichte die Linearisierung des Plasmids und eine Visualisierung nach Färbung mit Ethidium-Bromid. Ethidium-Bromid ist ein interkalierender Farbstoff, dessen emittierte Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Reagenzien	Menge (µl)
1 µg DNA	2
1 µl XbaI	1
1 µl bclI	1
Puffer Tango (10x konzentriert)	2
H ₂ O	14
Gesamtmenge	20

Tabelle 25. Ansatz für Restriktionsenzymverdau

Der Probenansatz wurde für 90 min bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl *Loading Buffer* wurden von den 25 µl jeweils 13 µl in die Taschen eines Agarosegels gegeben und für 40 min bei 80 Volt laufen gelassen. Weitere Informationen zur Gelelektrophorese (s. u. Gelelektrophorese).

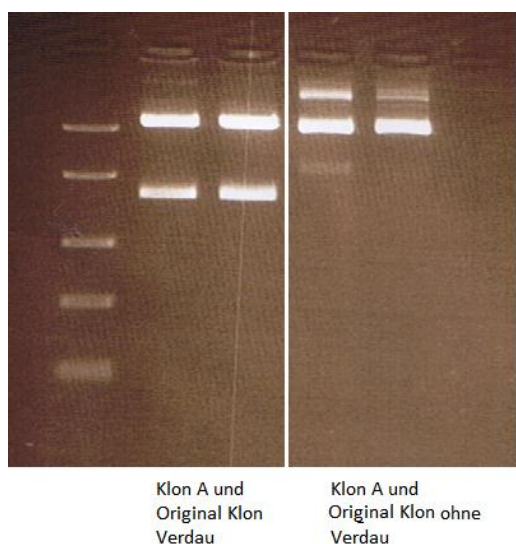


Abbildung 6. Restriktionsenzymverdau in der Gelelektrophorese. Visualisiert mit Ethidiumbromid. Links Darstellung des erfolgreichen Plasmid-Verdau mit Restriktionsenzymen in jeweils zwei Klon Ansätzen. Klon A war der generierte Klon. Als Original Klon ist der extern bezogene Klon der Arbeitsgruppe aus Berlin bezeichnet worden.

2.4.8 Transfektionsverfahren der mesenchymalen Vorläuferzellen

Als Methode der Wahl wurde das Verfahren der Lipotransfektion eingesetzt. Diese Technik wurde bereits im Labor etabliert und stellt seit vielen Jahren eine bewährte Methode der Transfektion von genetischem Material dar (Felgner et al. 1987). Dieses Verfahren ermöglichte die Transfektion, also das Eindringen von Plasmid-DNA in mesenchymale Vorläuferzellen. Grundlage des Verfahrens ist die Affinität von kationisch geladenen Lipidvesikeln an DNA-Stränge. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA interagieren mit den kationischen Lipiden, auch Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOTMA) genannt, diese führen zu einer Komplexbildung. Die Interaktion von Lipidvesikeln und

Nukleinsäuren wird bestimmt durch hydrophobe Ladungsverhältnisse und Konzentrationen von DNA und Plasmid und Lipidvesikeln (Wong et al. 1996). Des Weiteren ist die Effektivität der Transfektion von multiplen Faktoren abhängig, wie dem DNA / Lipid - Verhältnis und dem elektrischen Potenzial (Zeta-Potential) der Lipidvesikel, welches leicht positiv sein sollte. Diese Faktoren haben einen wesentlichen Einfluss auf die Effektivität der Transfektion und bereits kleine Änderungen des Versuchsaufbaus führen zu variablen Ergebnissen (Pires et al. 1999). Es ist in vielen Studien belegt, dass die Transfektion durch kationische Lipide mit einer hohen Zelltoxizität vergesellschaftet ist, die die Anwendung dieser Methode limitiert (Dass 2004). Dies zeigte sich auch im Verlauf der durchgeführten Experimente dieser Arbeit.

Das Transfektionsverfahren wurde im Labor an den mesenchymalen Vorläuferzellen durchgeführt. Eine Transfektion der Zellkultur erfolgte 24 h nach Aussaat der Zellen auf die 6-Well-Platten. Die Transfektionsreagenzien stellten sich wie weiter oben beschrieben dar. Grundlage war die Verwendung von 6-Well-Platten mit einer Fläche von ca. 9 cm² / Well. Die detaillierte Zusammensetzung und Vorgehensweise der Transfektion verlief nach folgendem Protokoll:

Reaktionsansatz A	Reaktionsansatz B
4 µg DNA Plasmid (1 µg / µl Plasmidkonzentration) und 250 µl Opti MEM	10 µl Lipofectamin und 250 µl Opti MEM

Tabelle 26. Übersicht der Versuchsansätze

Die beiden Reaktionsansätze wurden separat für 5 Minuten inkubiert und anschließend miteinander vereinigt. Die Inkubation erfolgte für 20 min unter Umweltbedingungen des Inkubators (37° C und 5 % CO₂-Inkubator-Umgebung). In der Zwischenzeit wurden die Wells zweimal mit PBS gewaschen und pro Well 2 ml Vollkulturmedium vorgelegt. Der Lipofectamin-Zell-Mix verblieb 6 Stunden in der Kulturschale und wurde anschließend durch Vollmedium nach vorheriger zweimaliger PBS-Waschung ersetzt.

Transfektionseffizienzkontrolle

Um eine Aussage über die Transfektionseffizienz treffen zu können, war es notwendig, eine separate Kontrolle mit Grün-fluoreszierendem Protein, auch GFP genannt anzulegen. GFP ist ein Protein, das in der naturwissenschaftlichen Bildgebung breite Verwendung findet und dessen cDNA zum ersten Mal 1992 von D. Prasher isoliert und kloniert wurde (Prasher et al. 1992). In dem beschriebenen Transfektionsversuchen wurden dafür Zellen auf sogenannten *Chamber Mini Slides* mit einer Konzentration des jeweiligen Experiments verteilt und entspricht jeweils einem Zehntel der Größe der in Kulturschalen verwendeten Größen. Das GFP-Plasmid wurde auf diese Zellen verteilt. Das GFP eignet sich ausgezeichnet für die Transfektionskontrolle, da es nur 238 Aminosäuren groß ist und ausschließlich beim Zebrafisch vorkommt (Chalfie 2009). Des Weiteren ermöglicht GFP eine Fusion von weiteren Proteinen, ohne eine Oligomerisierung, und führt zu einer geringeren Modulation der experimentellen Ergebnisse und somit deren Interpretationen (Shaner et al. 2005). Ein entsprechendes Mikroskop zur Detektion und Anregung bei den spezifischen Wellenlängen (s.u.) war in der Abteilung Gastroenterologie der Universität Göttingen vorhanden. Die Kontrolle der Transfektion erfolgte frühestens

nach 24 Stunden. Des Weiteren wurde in den folgenden Tagen immer wieder der Verlauf der Emission verfolgt. Die Transfektionseffizienzkontrolle ermöglichte es somit an der lebenden Zelle, eine Aussage darüber zu treffen, wieviel Prozent der Gesamtzellen transfiziert sind. Damit kann eine Aussage getroffen werden inwieweit die Real-time-PCR Ergebnisse für die Gesamtzellkultur repräsentabel sind.

Die Anregungsmaxima vom GFP liegen bei etwa bei 395 nm und 475 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei ca. 509 nm (Chalfie 2009). Das Verfahren und die Mengen wurden äquivalent an die Versuchsbedingungen mit 11- β HSD1-Plasmid angepasst, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.

Isolierung von genomischer DNA und zytoplasmatischer RNA des gleichen Gewebes

Zur Analyse der Nukleinsäuren musste deren komplexe Struktur verändert werden, um sie einer qualitativen Untersuchung zugänglich zu machen. Grundlage der Arbeit mit Nukleinsäuren der mesenchymalen Vorläuferzellen, war die Anwendung von standardisierten Kits der Firma Qiagen®. Mit dem AllPrep DNA / RNA-Mini-Kit wurde die Isolierung von mRNA und RNA mit weniger als 200 Nukleotiden (5.8 S RNA, 5SRNA, tRNAs, die 15 - 20 % der totalen RNA ausmachen) ermöglicht. Die isolierte RNA konnte zu weiteren bioanalytischen Verfahren herangezogen werden, wie cDNA Synthese und Sybr-Green® Real-time-PCR. Nach Bestimmung des Zellwachstums und Zellzahl wurde der Zellverband aufgebrochen und isoliert. Hierzu wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellkultur mit PBS gewaschen und Trypsin hinzugegeben, um die Adhärenz der Zellen zu lösen. Die Zellsuspension wurde in ein *Collection Tube* überführt und zentrifugiert (1400 UpM für 5 min). Anschließend wurde der Überstand verworfen. Durch Hinzugabe einer adäquaten Menge RLT Puffer Plus (350 oder 650 μ l), welcher 1 % β -Mercaptoethanol als RNase-Inhibitor enthielt, wurden die Zellen aufgebrochen und die im Zellkern vorliegende mRNA freigesetzt. Anschließend folgten die Arbeitsschritte zur Aufreinigung des Lysats. Die Verwendung von speziellen Drehsäulen ermöglichten eine Auftrennung von DNA und RNA des aufgearbeiteten Zellmaterials. Die gesamte Zellsuspension wurde in die All-Prep Säule für DNA-Isolierung gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 UpM zentrifugiert. Im sog. *Flow-through* des unteren Cups war nun die eluierte RNA enthalten. Die DNA-Säule wurde bis zur Wiederverwendung bei einer Kühlung von ca. 7° C gelagert. Zur Isolierung der totalen RNA wurde zum eluierten *Flow-through* jeweils 350 μ l 70 % Ethanol hinzugegeben und auf die im Kit mitgeführte MinElute-Säule gegeben. Nach mehreren Arbeitsschritten mit Hinzugabe von RWI Puffer (500 μ l), RPE-Puffer (500 μ l) und 80 % Ethanol auf die Säule, schloß sich eine Zentrifugation bei 10.000 UpM an. Mit offenem Deckel wurde die Säule erneut zentrifugiert (für 5 min bei 13.000 UpM), um sie von restlichen Ethanolrückständen zu befreien. Dann wurde die „RNeasy spincolumn“ in ein neues *Collection Tube* gegeben und die RNA wird mit 30 - 50 μ l *RNase-free water* eluiert. Es wurde eine Minute bei 10.000 UpM zentrifugiert, um die RNA vollständig zu eluieren.

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde der folgende Arbeitsteil angewendet. Die DNA befand sich in der *Spin Column* Membran, die mit 500 μ l Puffer AW1 bei 10.000 UpM für 15 sec. gewaschen

wurde. Im nächsten Schritt wurde mit AW2 Puffer (500 µl) 2 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Säulenmembran zu waschen. Zur Eluierung der DNA wurde die Säule in ein neues *Collection Tube* gegeben und nach Hinzugabe von 100 µl EB-Puffer (70° C) für eine Minute zentrifugiert. Gegebenenfalls konnte eine erneute Eluierung durch Zugabe weiterer Mengen EB-Puffer erfolgen.

2.4.9 Fotometrische mRNA-Konzentrationsmessung

Zur Untersuchung der Nukleinsäuren mussten deren Reinheit und Konzentration bestimmt werden. Dies geschah durch eine fotometrische Messung bei 230, 260, 280 und 320 nm gegen einen Leerwert. Es wurde pro Küvette je 100 µl (1:100 verdünnte RNA) eingesetzt. Die Messung erfolgte im Vergleich zu 100 µl H₂O Leerwert. Zur Konzentrationsbestimmung von dsDNA wurden Küvetten mit 100 µl (1:50 verdünnte DNA) benutzt. Auch diese Messung erfolgte im Vergleich gegen 100 µl H₂O als Leerwert. Eine Besonderheit bei der Arbeit mit mesenchymalen Vorläuferzellen bestand in der auftretenden geringen RNA-Konzentrationen. Es konnte notwendig sein, die vorliegende RNA einzuzengen, um synthetisierbare Mengen zu erreichen.

2.4.10 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Analyse von RNA stellte besondere Anforderungen an bioanalytische Verfahren, da sie nur in geringer Konzentration im Zytoplasma vorhanden ist. Die RT-PCR ermöglichte das Umschreiben von mRNA in cDNA (komplementäre DNA). Für die nachfolgende Real-time-PCR war es notwendig, die mRNA in cDNA umzuschreiben, da die RNA nicht als Matrize der Polymerase genutzt werden konnte. Diese Aufgabe übernahmen die sog. Reverse Transkriptasen (RTasen) oder die RNA-abhängige-DNA-Polymerasen. Der neu gebildete DNA-Strang wurde als komplementärer DNA-Strang (cDNA) bezeichnet. Als Enzym, das den Schritt der Reversen Transkriptase katalysiert, wurde die MMLV-RTase gewählt. Dieses Enzym besaß ein Temperaturoptimum bei 37 °C, ein pH Optimum bei 8,3 und zeichnete sich durch eine hohe Prozessivität aus. Es konnte sein, dass trotz großer Primerspezifität kein Produkt entstand, da die Primer durch Sekundärstrukturen der DNA nicht binden können. Es ist zu beachten, dass trotz der großen Sensibilität und Spezifität der RT-PCR nur eine Umschreibung von 10 bis 30 % der vorhandenen RNA in cDNA erreicht wurde. Als Primer wurden Oligo (dt)-Primer mit einer Basenpaarlänge von 12-18 dTs ausgewählt, die spezifisch an den Poly-A-Schwanz von eukaryotischer mRNA binden. Die Wahl des Primers ist von großer Wichtigkeit und es sollte zum Vergleich immer mehrere Primer gegeneinander getestet werden.

Zeit (min)	Temperatur (° C)	Zyklen
60	38	1
10	72	1
∞	4	

Tabelle 27. Amplifizierungszyklen der RT-PCR

2.4.11 Quantitative Real-time-PCR

Das Verfahren der PCR dient zur Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen. Die PCR ist das empfindlichste Verfahren in der Bioanalytik, das es theoretisch ermöglicht einen einzigen Nukleinsäureabschnitt zur Analyse zu vielfältigen. Die PCR bedient sich der Eigenschaft der DNA-Polymerasen DNA, zu amplifizieren. Voraussetzung ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA (dsDNA) mit einem freien 3'-OH- Ende.

Im ersten Schritt wurde die dsDNA durch eine Temperaturerhöhung auf 95° C denaturiert. Es lagen nun zwei Einzelstränge vor, wovon beide als Matrize benutzt wurden. Die für das Zielgen spezifischen Primer banden an ihre komplementären DNA-Abschnitte (eng. *Annealing*). Dann erfolgte die Amplifikation durch den Einbau von dNTPs durch die Polymerase (eng. *Extension*). Durch erneute Denaturierung, mittels Temperaturerhöhung und nachfolgendem *Annealing* und *Extension*, konnte dieser Prozess vielfach wiederholt werden. So erfolgte pro Zyklus eine Verdopplung des DNA-Abschnitts und eine exponentielle Zunahme der DNA-Matrizen stellte sich ein. Durch die Verwendung von thermostabilen Polymerasen (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, Arbeitstemperatur 70 - 72 °C) war es möglich, die Reaktion ohne Unterbrechung ablaufen zu lassen, sodass für 20 - 40 Zyklen nur ca. 90 min. Zeit benötigt wird.

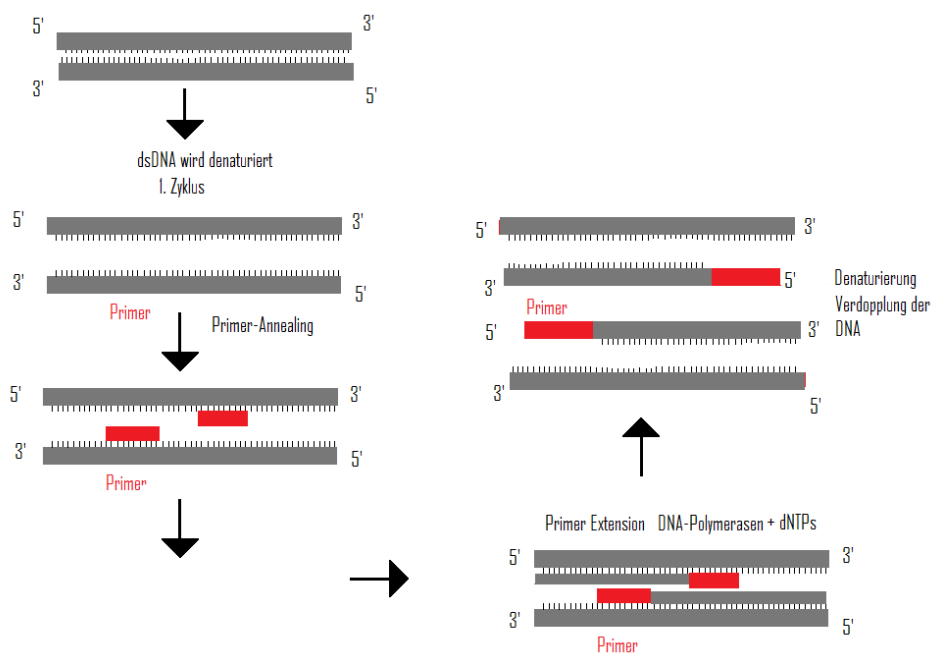


Abbildung 7. Grafische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion

Das Verfahren der sogenannten quantitativen Genexpressionsanalyse ist ein sensitives Verfahren, das breite Anwendung findet. Zur quantitativen Transkriptionsanalyse bedient man sich der Verwendung von fluoreszierenden PCR-Produkten, wie zum Beispiel der Nukleinsäurebindende Fluoreszenz Farbstoff Sybr-Green®, der in den Laboratorien der Arbeitsgruppe etabliert ist. Mit zunehmender Menge an PCR-Produkten stieg die Emittierung der Fluoreszenz, da sich Sybr-Green® nur in doppelsträngige DNA einlagern kann. Die Fluoreszenz wurde am Ende eines jeden Amplifikationsabschnitts gemessen, bei einer Anregung bei 497 nm und einer Emission bei 520 nm. Nachteile sind eine mögliche Entste-

hung von unspezifischen Produkten wie sog. Primer-Dimeren und die subjektive Analyse der Schmelzkurve, die von Untersucher zu Untersucher variabel sein kann. In der Durchführung der relativen Quantifizierung von Genprodukten, wie der Real-time-PCR, wurde das Verfahren der „One-step“-Real-time-PCR angewandt, sodass pro Analyseansatz nur ein spezifisches Gen analysiert werden konnte. Um eine maximale Amplifikation und Spezifität der Sybr Green® Real-time-PCR zu erreichen, sind bestimmte Anforderungen an die Primer zu stellen. So besitzen die Primer eine maximale Länge von 19 bis 22 Basenpaaren und wiesen ein Guanin und Cytosin Nukleotidgehalt von 40 % bis 60 % auf. Das Ziel ist eine Amplifikation von relativ kurzen Produkten mit einer Länge von ca. 100 bis 200 Basenpaaren.

Instrumenteneinstellung	20 Sekunden bei 95° C 3 Sekunden bei 95° C 30 Sekunden für 60° C für 40 Zyklen und Dissoziation
Schmelzkurve	0,5 °C

Tabelle 28. Temperatureinstellungbeider Real-time-PCR “Step One”

Reagenz	Volumen
SYBR Green®	4,5 µl
H ₂ O	2,5 µl
Sense Primer (5 pmol / µl)	1 µl
Antisense Primer (5 pmol / µl)	1 µl
cDNA	1 µl
Gesamt Volumen	10 µl

Tabelle 29. Aufstellung des Reaktionsansatz für eine Sybr Green® Real-time PCR Probe

2.4.12 Auswertung der Real-time-PCR Daten

Nach der Schmelzkurvenanalyse erfolgte die Quantifizierung der Amplifikation. Dies geschah durch die Ermittlung, der Ct-Werte, das heißt die Anzahl der Zyklen, die benötigt wurden, um eine ausreichende Fluoreszenz zu emittieren. Als ausreichende Fluoreszenz wurde die relative Emission bei einem festgelegten, sog. Grenzwert, oder englisch *Threshold* bezeichnet. Der *Threshold* war zur Analyse standardisiert definiert. Der Ct-Wert wurde in der relativen Genexpressionsbestimmung zur Analyse in einem mathematisch statistischen Verfahren angewendet und zur Aussage der Vervielfältigung im Vergleich zu einem standardisierten Gen, auch *House Keeping Gene* genannt (Murphy et al. 1990) benutzt. Diese *House Keeping Gene* diente dem zellinternen Vergleich. In dieser Arbeit war das Vergleichs-gen das β-Actin, welches ubiquitär in mesenchymalen Vorläuferzellen zu finden ist. Der Ct-Wert ist der logarithmische lineare Wert der PCR-Emission im Vergleich zur Anzahl der PCR-Zyklen. Aus diesem Grund sollte eine Interpretation der isolierten Ct-Werte vermieden werden und der statistischen Analyse zugeführt werden. Es macht Sinn, Mehrfachwerte zu ermitteln und die Ct-Werte auf eine Nachkommastelle zu runden. Nach Subtraktion des Ct-Wertes der Vergleichsgene von dem Ct Wert des untersuchten Gens erhielt man den ΔCt Wert.

Unter Verwendung der Formel:

$$Ratio = 2^{-\Delta Ct}$$

wurde der $\Delta\Delta Ct$ -Wert ermittelt, welcher die relative Vermehrung eines Genproduktes darstellte (Livak und Schmittgen 2001). In der Auswertung der Daten wurden die Ratio-Werte von Mehrfachwerten zur statistischen Auswertung herangezogen. Die Auswertung umfasste die Bestimmung von Mittelwerten, sowie die Standardabweichung und Bestimmung des p-Wertes, auch *p-value* genannt.

2.4.13 Protein-Isolierung adhärenter mesenchymaler Vorläuferzellen

Die Petrischale wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit 60° C aufgewärmten Lysispuffer (Tb. s.o.) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ca. 200 µl Lysispuffer pro 6-Well-Platte behandelt und in der Folge mittels eines Zellschabers von der Platte entfernt. Es erfolgte die Kontrolle unter einem Mikroskop, ob das gesamte Zellmaterial entfernt wurde. In einem Eppendorf-Cup wurde anschließend mit einer 100 µl Pipettenspitze das Zellmaterial mehrmals gemischt. Es erfolgte letztlich die Inkubation für 15 min auf Eis und eine Zentrifugation mit 14.000 UpM bei 4° C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup gefüllt.

Immunoblot-Analyse

Die Immunoblot-Analyse (auch: Western Blot) bestand aus der Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und dem Transfer des Proteins vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Anschließend erfolgte der visualisierte Nachweis der zu untersuchenden Proteine auf einer Nitrozellulosemembran mit Hilfe spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz.

Physikalische Grundlagen der SDS-PAGE

Die Gel-Elektrophorese bedient sich des Verhaltens der Bewegung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Positiv geladene Teilchen (Kationen) unterschiedlicher Größe und Ladung wandern unterschiedlich schnell in diesem Feld zur Kathode. In einem konstanten pH-Milieu bilden diese Teilchen diskrete Banden, die durch UV-Fotografie visualisiert werden können. Die erste Gel-Elektrophorese wurde in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts von Arne Tiselius entwickelt.

Zur Beschreibung der Mobilität, die durch die Feldstärke und die Ladung bestimmt wird, diente die folgende Formel: $F^e = q * E$.

Dabei ist F^e die beschleunigende Kraft, q die Ladung des Teilchens und E die elektrische Feldstärke. Die Mobilität ist eine substanzspezifische Größe, die für die Trennung im Feld entscheidend ist.

Durch das Anlegen der elektrischen Spannung wurde eine Impulsübertragung der Gegenladungen auf das Lösungsmittel induziert. Diese Impulsübertragung war in Richtung der Kathode gerichtet, und wurde auch als Elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet. Dieser EOF wirkte als Fluss in der liquiden Phase des Lösungsmittels, der in der Gelelektrophorese als Elektroendosmose bezeichnet wurde. Diese Elektroendosmose war der Bewegung der freien Ionen entgegengesetzt und führte zu Verzerrungen der Trennung. Um diese zu reduzieren, verwendete man ladungsfreie Medien und Lösungsmittel.

SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE handelte es sich um eine sog. diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), bei der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden. Das SDS-Gel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel. In dem Sammelgel bildeten die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilitäten einen Stapel (sog. Stapeleffekt), dadurch erfolgte eine Vortrennung und Konzentrierung der Proteine. Durch die engen Maschen des Trenngels kam es dann zur Auftrennung des Proteingemisches nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine. Es zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Wanderungstrecke (in cm).

Transfer

Beim Transfer (auch: *Westernblotting*) wurden die aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld (Richtung: Kathode zu Anode) eluiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wobei die lokale Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung erhalten blieb. Die Standardapparaturen waren vertikale Puffertanks, an deren Seitenwänden mäanderförmig Platindrähte als Elektroden dienten (sog. Nassblot). Beim Aufbau des Blots war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Komponenten befanden, die den Transfer beeinträchtigen konnten. In den Puffertank wurde Transferpuffer und in einen äußeren Tank gekühltes H₂O gegeben, um die Temperatur möglichst niedrig zu halten.

Detektion des Proteins mittels Antikörperfärbung

Um Proteine auf der Membran spezifisch zu detektieren, wurde ein immunchemischer Nachweis, die sog. Antikörper-Färbung durchgeführt. Es handelte sich hierbei um einen monoklonalen Primärantikörper, der mit seinem Paratop spezifisch an das Epitop des gesuchten Proteins band. Der Sekundärantikörper erkannte spezifisch die Spezies des Primärantikörpers. Zusätzlich war er an ein Enzym gebunden, das in diesem Fall mittels Katalysation eine Lichtemission per Elektrochemilumineszenz (ECL) abgab. Diese Eigenschaft ermöglichte eine Detektion in einer Röntgenkassette auf einem Röntgenfilm. Es war möglich die Membran mehrere Male nach erneuter Blockierung und Antikörper-Inkubation zu verwenden (*Re-Blot*).

Praktische Durchführung der Immunoblots

Die Beschreibung der folgenden Arbeitsschritte wurde im Labor zur Immunoblot-Analyse verwendet. Die Gesamtmenge an Protein wurde in einem 1,5 ml Cup mit der entsprechenden Menge H₂O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Hinzu wurde 10 µl NuPAGE LDS Sample Buffer (*Loading Buffer*) und β-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. Nach kurzzeitiger Zentrifugation wurden die Proben erst für 5 min bei 95° C, und dann für eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut kurzzeitig zentrifugiert, um das Kondensat zu sammeln und die Proben anschließend auf das Gel aufzutragen.

Nun erfolgte die Gelelektrophorese nach dem Invitrogen-Verfahren, um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Dazu wurde das NuPAGE Gel in einer Kammer positioniert und zwischen den Gelen und außen auf die Kammern wurde der Laufpuffer, auch *Electrophoresis Buffer* eingefüllt. Zusätzlich wurde in eine Geltasche 5 µl *Rainbow Marker* (Standardisierte Kontrolle) gegeben, sodass den Banden später Molekulargewichte zugeordnet werden konnten. Das Sammelgel lief nun bei 100 Volt ca. 1 Stunde, bis die Grenze zum Trenngel erreicht war. Anschließend wurde für eine weitere Stunde 120 Volt angelegt. Das Verfahren wurde gestoppt, sobald die blauen Banden des Laufpuffers das Ende des Gels erreicht haben.

Der Transfer lief in einem Eisbehälter bei folgenden Bedingungen: Spannung: 30 V für die Zeit von 2 Stunden. Nach dem Blotten erfolgte eine Färbung der Membran mit Ponceau S, um die Transfereffizienz und auch eventuelle Schwankungen in der Proteinkonzentration zu überprüfen. Dazu wurde die Membran in Ponceau S für ca. 2 min inkubiert und anschließend in TBS-Tween 0,1 % wieder entfärbt. Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 %iger Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Die Membran wurde anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4° C über Nacht inkubiert. Der Antikörper wurde in einer 5 %igen Milchlösung verdünnt und die Membran in einer Folie eingeschweißt. Die Membran wurde anschließend mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper, der in 2,5 % Milchpulver verdünnt war, für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend ein weiteres Mal mit PBS und 5 % -Milchpulverlösung gewaschen. Für die anschließende Visualisierung inkubierte man die Membran für 5 Minuten mit der sog. *Detection Solution A und-B*. Je nach Stärke des Signals wurde die Membran in einer Röntgen-Kassette für ein paar Minuten oder bis zu einer Stunde belichtet.

2.4.14 Zellysatherstellung

Die Zellysatherstellung diente der Aufbereitung von Zellmaterial, um Cortison und Cortisol einer direkten Bestimmung innerhalb der Zellen zugänglich zu machen. Die Messung erfolgte in der Abteilung für Klinische Chemie der Universität Göttingen mittels LCM-Massenspektrometrie. Hierzu wurden die Zellen mit 200 µl PBS und einem Zellschaber abgetragen. Es erfolgte die Kontrolle unter dem Mikroskop. Für jeden Ansatz wurde ein neuer Zellschaber verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, in einem Kryogefäß mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und einem Wärmebad (37° C) wieder aufgetaut. Das Zellmaterial wurde gevortext, um die Zellenwände restlich aufzubrechen. Anschließend wurde das Zellysate in einer Zentrifuge bei 14.000 UpM und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet verworfen. Die Proben wurden bei -80° C asserviert.

2.4.15 Statistik

Für die Statistik der Real-time-PCR, die Bestimmung des p-Werts, der Standardabweichung sowie für die Erstellung grafischer Darstellungen wurde das Statistikprogramm „GraphPad Prism 4©“ der Firma Graphpad Software verwendet. Weiterhin wurde das Tabellenkalkulationsprogramm „Excel©“ der Firma Microsoft für Mittelwerte und Formelberechnungen genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht der durchgeführten Experimente

Versuch	Zellkultur	Medium	Stimulation	Messzeitpunkte	Immunoblot	Analysierte Genexpression
Mesenchymale Vorläuferzellen und variable Cortisol-Konzentrationen über 7 Tage	Mesenchymale Vorläuferzellen	DMEM Medium + 10 % FCS + L-Glutamin + Pen. / Streptomycin 0,1 % BSA 48 Stunden vor Versuchsende	Variable Cortisol-Konzentrationen und Nährmedium	Tage: 0 7		11-β HSD1 aP2 PPAR γ
Vorexperiment Transiente Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11-β HSD1-Plasmid und 48 Stunden Stimulation	HOS-58	IMDM-Medium + L-Glutamin + Pen. / Streptomycin	5 μmol Cortisol, Cortison und Nährmedium	Stunden: 24		
Cortison und Cortisol Inkubation bei variablen Temperaturen	Keine Zellkultur	DMEM-Medium	5 μmol Cortison, Cortisol und Nährmedium	Stunden: 24		
Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11-β HSD1-Plasmid und 7 Tage Kultivierung ohne Stimulation	Mesenchymale Vorläuferzellen	DMEM Medium 10 % FCS 0,1 % BSA 48 Stunden vor Versuchsende und Mediumabnahme + L-Glutamin + Pen. / Streptomycin	Nährmedium	Tage: 0 1 2 3 5 7		11-β HSD1 PPAR γ C/EBP- α C/EBP- β aP2 RANKL SGK LPL
Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11-β HSD1-Plasmid und 28 Tage Kultivierung ohne Stimulation	Mesenchymale Vorläuferzellen	DMEM-Medium 10 % FCS 0,1 % BSA 48 Stunden vor Versuchsende + L-Glutamin + Pen. / Streptomycin	Nährmedium	Tage: 0 7 14 28	11-β HSD1 von Kultur 1	11-β HSD1 11-β HSD2 PPAR γ aP2 C/EBP- α C/EBP- β RUNX2 RANKL Osteoprotegerin LPL
Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11-β HSD1-Plasmid, 48 Stunden Kultivierung und variable Stimulation	Mesenchymale Vorläuferzellen	DMEM-Medium	Nährmedium, Cortison, Cortisol, variable Cofaktoren und NADPH-Regenerationssystem	Stunden: 0 48	11-β HSD1 11-β HSD2	11-β HSD1 11-β HSD2 PPAR γ C/EBP- α C/EBP- β C/EBP- δ aP2 RANKL RUNX2 SGK

Tabelle 30. Übersicht der durchgeführten Experimente.

Das Nährmedium mit 10 % FCS wurde 48 h vor Ende des Versuchs durch 0,1 % BSA-Medium zur direkten Cortison und Cortisol-Messung ersetzt. Das Nährmedium wurde in Zellkulturen alle 3 Tage durch Neues ersetzt.

3.2 Mesenchymale Vorläuferzellen und variable Cortisol-Konzentrationen über

7 Tage

Zur Klärung der Frage, ob die Umwandlung von Cortisol in Cortison von variablen Cortisol-Konzentrationen abhängig ist, wurde dieser Zeit-Konzentration-Versuchsaufbau durchgeführt. Es ist bekannt, dass die Konversion von Cortisol zu Cortison durch 11- β HSD2, wie auch durch 11- β HSD1, selbst generiert werden kann (Krozowski 1999; Seckl und Walker 2001). Diese Konversionsfähigkeit ist für die Fragestellungen des zu wählenden Stimulationsmediums von besonderer Bedeutung, also ob eine Reduktion oder Oxidation vorliegt (s. Abbildung 8, S. 44). Es erfolgte daher die Durchführung eines Experimentansatzes mit der Fragestellung, ob eine Induktion von proadipogenen Proteinen und des Enzyms selbst auf mRNA-Ebene durch die externe Stimulation mit Cortisol ermöglicht werden kann. Es wurden pro Messwert jeweils drei Werte parallel angesetzt und 80.000 Zellen pro Well angelegt. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte 7 Tage später die Cortisol-Stimulation. In demselben Versuch wurde das Experiment anhand des Zellmaterials von zwei unterschiedlichen Kulturen von Patienten gleichzeitig durchgeführt. Es wurde eine Differenzierung in Kontrolle mit und ohne 0,2 % Ethanol angelegt, um den Einfluss des in der Cortisol-Lösung enthaltenen Ethanols zu betrachten. Das Kontrollmedium enthielt kein Cortisol. Die Versuchsdauer betrug 7 Tage in 37° C und 5 % CO₂-Umgebung. Die Cortisol-Konzentrationen betragen 5 nMol, 50 nMol, 5 μ Mol und 10 μ Mol. Wir wählten 10er, 100er und 2er Schritte, um eine Konzentrationsabhängigkeit der Konversion auf niedrigem Konzentrationsniveau und der praktischen Durchführbarkeit zu ermöglichen. Es erfolgte keine Transfektion mit dem 11- β HSD1-Plasmid. Der Fokus lag auf auf einer Untersuchung des spontanen Nachweises des Enzyms. Die Stimulation der Zellen erfolgte über 7 Tage mit Cortisol. Am 5. Tag wurde das FCS enthaltene DMEM-Medium durch BSA-haltiges DMEM-Medium mit allen Nährmediumszusätzen mit Cortisol ersetzt, um die Möglichkeit einer späteren Cortison- und Cortisol-Direktbestimmung zu ermöglichen.

DMEM Medium	DMEM Medium zur Cortison und Cortisol Messung
Zusatz mit 10 % FCS, 10.000 IE Penicillin, 100.000 IE Streptomycin, L-Glutamin	Zusatz mit 0,1 % BSA, 10.000 IE Penicillin, 100.000 IE Streptomycin, L-Glutamin

Tabelle 31. Zusammensetzung der Stimulationsmedien.

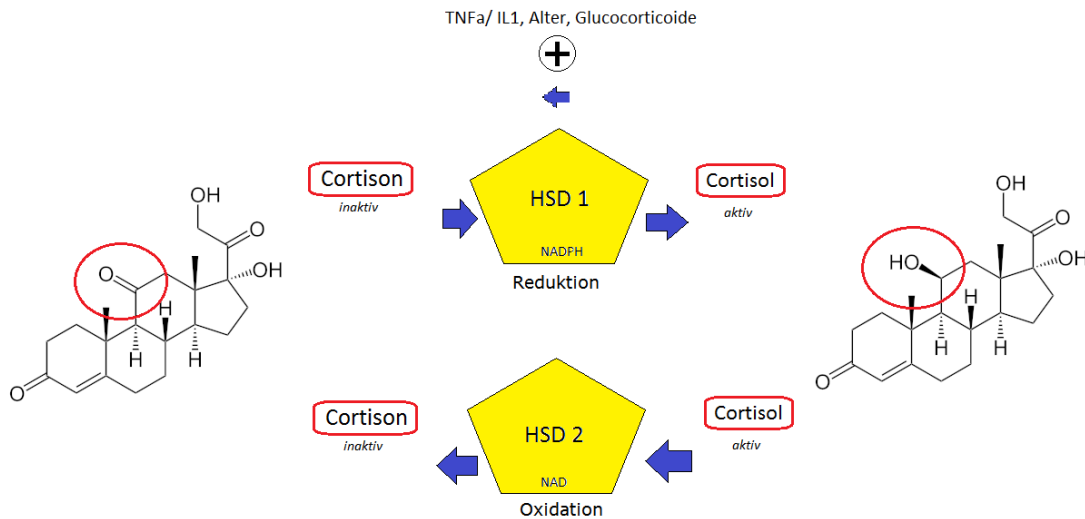


Abbildung 8. Grafische Darstellung der 11- β HSD-Enzymkinetik. 11- β HSD1 katalysiert eine reduktive und weniger effektive oxidative Konversion der Steroide. 11- β HSD2 hat eine rein oxidative Funktion von Cortisol zu Cortison. Modifiziert nach Cooper et. al. 2008.

3.2.1 Genexpression von 11- β HSD1 und variable Cortisol-Stimulation über 7 Tage

Die verwendete Methode der Genanalyse ist die Sybr Green[®] Real-time-PCR. Die Genexpression wurde im Vergleich zum *House-keeping* Gen β -Actin durchgeführt und ist im Folgenden dargestellt.

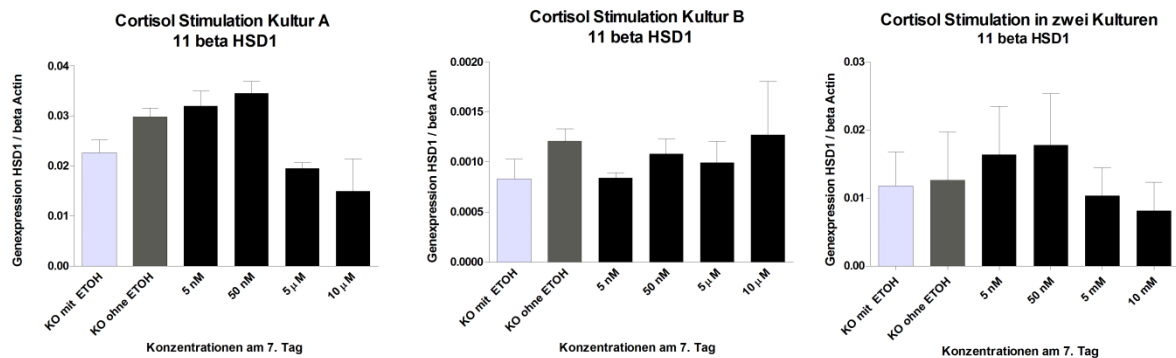


Abbildung 9. Grafische Darstellung der Genexpression des Enzyms 11- β HSD1 von Kultur A, B und als Mittelwerte unter Cortisol-Stimulationsbedingungen in mesenchymale Vorläuferzellen, ohne Transfektion. Es zeigte sich keine signifikante Induktion der mRNA des Enzyms. Die mRNA-Expression verblieb gleichbleibend auf einem Expressions-Niveau. Analysiert mittels Sybr Green[®] Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test. Es stellten sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression für 11- β HSD1 dar.

Es konnte keine signifikante Induktion des Enzyms 11- β -HSD1 unter variablen Cortisol-Stimulationsbedingungen gezeigt werden. Diese fehlende gesteigerte Stimulation bezieht sich auf die Kontrolle mit und ohne Ethanol. Des Weiteren zeigte sich auch unter unterschiedlichen externen Cortisol-Stimulationsbedingungen kein signifikanter Unterschied in der Genexpression des Cortisol konvertierenden Enzyms 11- β HSD1 bei den Zellkulturen.

3.2.2 Genexpression von PPAR γ und variable Cortisol-Stimulation über 7 Tage

Es konnte keine signifikante Induktion des Proteins PPAR γ bei Kultur A und B nachgewiesen werden. Weder im Vergleich bei unterschiedlichen Cortisol-Konzentrationen, noch im Vergleich zur Kontrolle mit und ohne Ethanol.

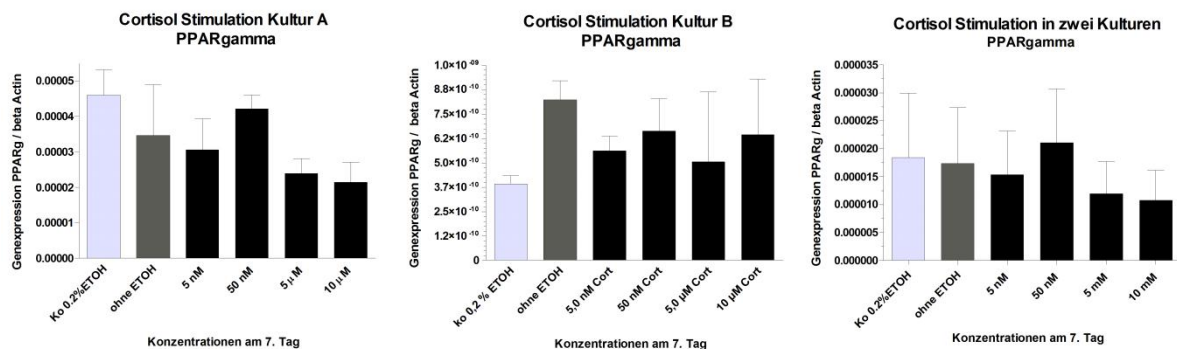


Abbildung 10. Grafische Darstellung der Genexpression von PPAR γ in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen unter Cortisol-Stimulationsbedingungen in mesenchymalen Vorläuferzellen, ohne Transfektion. Es zeigte sich keine signifikante Induktion des proadipogenen Markers bei externer Cortisol-Stimulation. Die Expression verblieb gleichbleibend unabhängig der Zugabe von Cortisol. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.2.3 Genexpression von aP2 und variable Cortisol-Stimulation über 7 Tage

Als weiterer Marker der adipogenen Differenzierung wurde das Protein aP2 analysiert. Dieses Protein dient dem Vergleich zu PPAR γ als Marker der späten adipogenen Differenzierung.

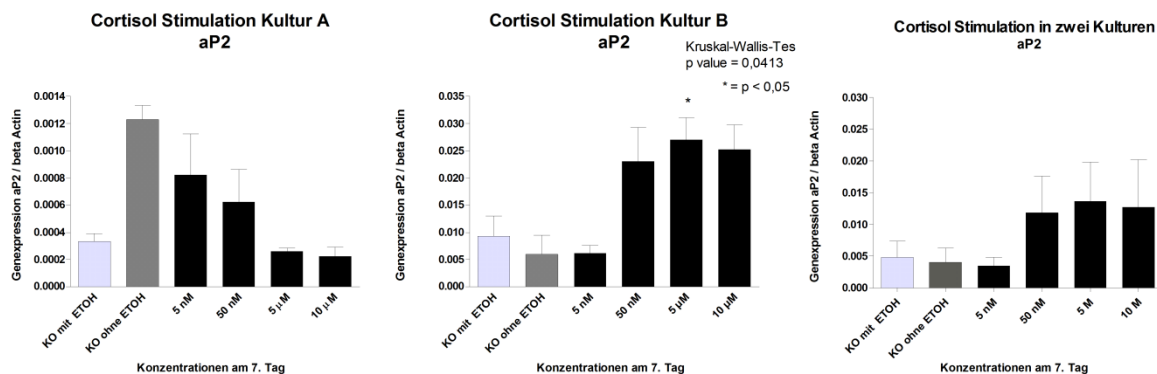


Abbildung 11. Grafische Darstellung der Genexpression von aP2 in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen unter Cortisol-Stimulationsbedingungen in mesenchymalen Vorläuferzellen, ohne Transfektion. Es zeigte sich eine signifikante proadipogene Induktion von aP2 in Kultur B bei 5 μ M Cortisol-Stimulation zur Kontrolle ohne Ethanol. Insgesamt für beide Kulturen zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg von aP2 bei höheren Konzentrationen. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test und Kruskal-Wallis-Test. * = p -value < 0,05.

Es zeigte sich ein heterogenes Bild einer Induktion von aP2 ab einer Konzentration von 50 nM ab dem 7. Tag im Vergleich zur Kontrolle. In Kultur A ergab sich eine nicht signifikante Suppression auf das 4,7-Fache (p -value 0,0014, $n=2$ bis 3) bei höheren Messwerten von 5 μ M im Vergleich zur Kontrolle ohne Ethanol. Die Stimulation mit 10 μ M erbrachte eine 5,5-fache Suppression ($n=2$) von aP2 im Vergleich zur Kontrolle ohne Ethanol. Die statistische Analyse ergab bei Kultur B ein Kruskal-Wallis

p-value von 0,0413 (n=3) und damit eine Tendenz von mehreren Mittelwerten der Stichproben zu höheren aP2 Messwerten in höheren Konzentrationen. Weiterhin zeigte sich im Vergleich einer Kontrolle mit Ethanol zu 10 μM eine Tendenz der Suppression (*p-value* 0,0153; n=2). Allerdings ist die Aussagefähigkeit bei Zweierwerten statistisch eingeschränkt. Es ergab sich bei Kultur B eine statistisch signifikante Induktion von aP2 mit dem 2,91- bzw. 4,54-Fachen im Vergleich Kontrolle, mit und ohne Ethanol bei 5 μM Zugabe (Kontrolle mit Ethanol zu 5 μM mit *p-value* 0,0317; n=3; Kontrolle ohne Ethanol zu 5 μM mit *p-value* 0,0165; n= 3). Die Messergebnisse für die Mittelwerte für beide Kulturen ergab keine signifikanten Unterschiede für aP2.

3.2.4 Fazit der Cortisol-Stimulation über 7 Tage

Es zeigte sich bei den gegebenen Konzentrationen kein Anhalt einer signifikanten 11- β HSD1 Induktion bei Kultivierung mit extern zugegebenem Cortisol über 7 Tage zur Analyse. Weiterhin ergab sich ein Anhalt für eine nicht signifikante Steigerung der Expression des proadipogenen aP2 durch externe Cortisol-Zugabe bei Zugabe höherer Cortisol-Konzentrationen. Eine proadipogenen Differenzierung lässt sich durch den mRNA-Nachweis von PPAR γ und aP2 nicht bestätigen.

3.3 Vorexperiment transiente Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1-Plasmid und 24 Stunden Stimulation

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Enzymkinetik des Enzyms 11- β HSD1 und die Direkt-Bestimmung des Substrates Cortison und Produktes und Cortisol. Von besonderem Interesse war hierbei die Kinetik von Substrat und Produkt, bzw. Oxidation und Reduktion unter Stimulation und 11- β HSD1-Überexpressionsbedingungen in mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft. Aus dieser Überlegung entstand die Anlage eines Vorexperimentes zur Überprüfung der Durchführbarkeit und der Fragestellung einer Messbarkeit des Schlüsselenzyms des Cortison und Cortisol Stoffwechsels, zunächst in einer HOS-58-Zellkultur. Die HOS-58-Zellkultur wurde aufgrund eines schnellen Zellwachstums gewählt. Zur Untersuchung eines Enzym-Stimulationsmodells erfolgte die Erstellung eines Substrat- und Produkt-Modells des Enzyms 11- β HSD1. Hierzu erfolgten die Anlage eines MSCs-Transfektionsmodells und deren Stimulationsmedien in unterschiedlichen Wells. Als weitere Untersuchungsvariable wurden pro Well jeweils 200.000 und 400.000 HOS-58-Zellen verwendet. Die Transfektion erfolgte 24 h nach Aussaat der Zellen in der Kultur. 24 h nach Transfektionsbeginn (inkl. 6 h Transfektion) war das Ende des Versuchsaufbaus erreicht und die Zellsuspension und der Medium-Überstand wurden analysiert. Die Fragestellung lautete, ob eine mögliche Cortisol-Konzentration proportional zu der Zellzahl ist, und ob die Transfektion erfolgreich war. Im Versuchsaufbau erfolgte der Vergleich zwischen mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfizierten Zellen und mit einem Kontrollplasmid transfizierten Zellen, im Folgenden Null-Transfektion genannt. Es erfolgte die Anlage von jeweils Zweierwerten je Messreihe. Als Transfektionsmethode wählten wir die Lipofectaminmethode. Der Lipofectamin-Mix verblieb 6 Stunden auf der Zellkultur und wurde nach zweimaliger Waschung mit PBS durch ein IMDM-Medium, ohne FCS ersetzt. Dem IMDM-Nährmedium wurde jeweils 5 μmol Cortison oder 5 μmol Cortisol hinzugefügt. Der abschließende Cortison- und Cortisol-Gehalt

wurde jeweils in der Zellsuspension und im Medium-Überstand durch die Abteilung Klinische Chemie mittels LCM-Massenspektrometer bestimmt. Durch die erfolgte Zellsuspensionsherstellung konnte keine mRNA-Isolierung in dem gegebenen Material erfolgen. Die Nachweisgrenze von Cortison und Cortisol in Medium und Zellsuspension wurde mit 2 µg/l angegeben.

3.3.1 Cortison-Stimulation für 24 h nach 11-β HSD1-Transfektion

Es erfolgte die statistische Auswertung der Messergebnisse, die allerdings bei Anlage von Zweierwerten im Versuchsaufbau keine Aussagen hinsichtlich von Signifikanzniveaus zulassen. Bei Bestimmung der Cortisol-Konzentration, unter 5 µmol Cortison-Stimulation, zeigte sich eine 2,1-fache Erhöhung der Mittelwerte für Cortisol im Medium und eine 1,66-fache Erhöhung in der Zellsuspension, jeweils im Vergleich zu den mit dem Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen (Null-Transfektion) für 200.000 Zellen. Bei Anlage von 400.000 Zellen stellte sich im Medium eine 34 % Steigerung des Produkts Cortisol dar. Es zeigte sich eine Produkt-Erhöpfung des Cortisols bei Verdopplung der Zellzahl, um ca. 50 % im Vergleich. Die Auswertung ergab bei Anlage von 200.000 Zellen eine Steigerung von Reduktion zu Cortisol auf das 1,66-Fache in Zellsuspension für Zellen die transfiziert worden sind. Für das Medium ergab sich eine Steigerung der Reduktion auf das 2,15-Fache bei 200.000 Zellen und das 1,34-Fache bei 400.000 Zellen.

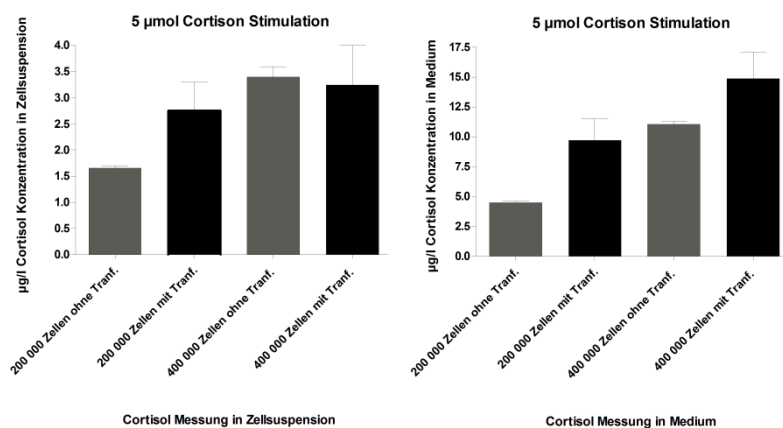


Abbildung 12. Grafische Darstellung der Cortisol-Konzentration in Zellsuspension und im Medium in µg/l unter Cortison-Stimulationsbedingungen in einer HOS-58-Zellkultur über 24 h. Es zeigte sich eine zellzahlabhängige und transfektionsabhängige Steigerung der Reduktion in das Produkt Cortisol. Diese erhöhte Umwandlung scheint in Medium und Zellsuspension nachweisbar zu sein, jedoch für Medium in insgesamt höherer Konzentration. Weiterhin scheint die Konzentration proportional zur Zellzahl des Mediums nachweisbar. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Angaben zu Signifikanzniveaus waren bei Anlage von Zweierwerten nicht möglich.

3.3.2 Cortisol-Stimulation für 24 h nach 11-β HSD1-Transfektion

Unter Cortisol-Stimulationsbedingungen zeigte sich kein signifikanter Effekt der Überexpression auf die Cortisolsynthese im Vergleich zwischen 11-β HSD1-Überexpressionsbedingungen und Null-Transfektion in der Zellsuspension. Des Weiteren stellte sich kein Unterschied zwischen 200.000 und 400.000 Zellen (ob transfiziert oder nicht transfiziert) dar. Auch im Medium-Überstand konnte sich keine Differenz der Cortison-Konzentration im Vergleich zwischen Transfektion und Null-Transfektion aufgezeigt werden. Auch bei einem extremen Messwert bei 200.000 Zellen in Messreihe

2 stellte sich kein statistischer Unterschied dar. Allerdings fand sich in der Analyse der 200.000 Zellen eine Verdoppelung der Cortisol-Konzentration. Dabei könnte es sich um ein methodisches Problem handeln. Bei der Auswertung ohne einen Extrem-Messwert bei 200.000 Zellen in Messreihe 2 ist kein Unterschied erkennbar. Es zeigten sich im Allgemeinen bei Cortisol-Zugabe sehr viel niedrigere Messwerte, als bei der Cortison-Zugabe. Die Auswertung ergab somit für die Transfektion für das Enzym 11- β HSD1 in diesem System eine Cortisol aktivierende, aber keine inaktivierende Funktion.

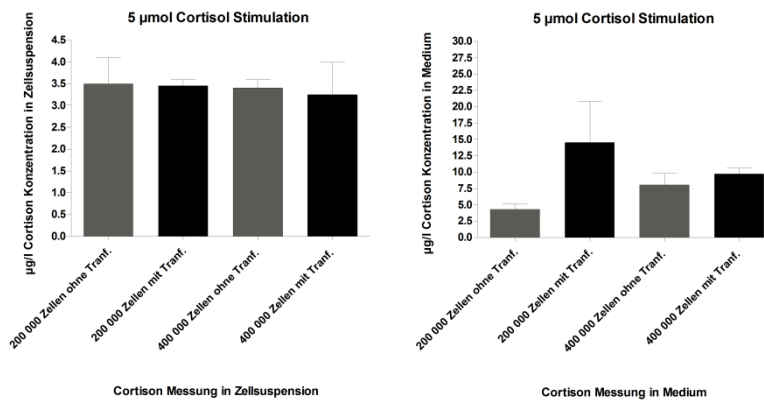


Abbildung 13. Grafische Darstellung der Cortison-Konzentration in Zellsuspension und im Medium in $\mu\text{g/l}$ unter Cortisol-Stimulationsbedingungen in einer HOS-58-Zellkultur für 24 h. Es stellte sich kein Anhalt für eine gesteigerte Cortison-aktivierende Aktivität, bzw. Zellzahlabhängigkeit dar. Dies galt für Medium und Zellsuspension im gleichen Maße. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Angaben zu Signifikanzniveaus waren bei Anlage von Zweierwerten nicht möglich.

3.4 Cortison- und Cortisol-Inkubation für 24 h ohne Zellkultur

Zur Interpretation der Ergebnisse vom vorherigen Versuch ist die Frage nach einer spontanen Umwandlung von Cortison zu Cortisol und umgekehrt erforderlich. Hierzu wurde ein Nährmedium ohne Zellen für 24 h bei verschiedenen Temperaturen kultiviert und mit Cortison- und Cortisol-Konzentrationen äquivalent zu den im vorherigen Experiment behandelt. Im Versuchsaufbau wurden jeweils Zweierwerte für eine Messreihe erstellt. Für jeden Zweierwert wurde je eine andere Versuchslösung erstellt. Die erste Lösung war in 0,0036 g/ml Ethanol gelöst mit je 10 mM Cortison und je 10 mM Cortisol. Die zweite Lösung wurde in Pulverform mit 1 mM Cortisol und 10 mM Cortison in Medium gelöst. Die Bestimmung erfolgte erneut mittels LCM-Massenspektrometrie. Hintergrund der verschiedenen Lösungen war die Fragestellung einer Abhängigkeit von dem gelösten Ethanol, bzw. mit der Pulverform eine bessere Löslichkeit des Cortisons und Cortisols in Nährmedium zu erreichen. Die Kultivierung erfolgte bei in 4°C Kühlschrank oder bei 37°C und 5 % CO_2 - Umgebung im Inkubator. Die Cortison- und Cortisol-Mengen betragen jeweils $5\ \mu\text{mol}$ pro Well.

3.4.1 Cortisol-Inkubation bei variabler Temperatur

Medium Kultivierung mit Cortisol	Messung von Cortison (in Pulver gelöst) $\mu\text{g/l}$	Messung von Cortison (in Ethanol gelöst) $\mu\text{g/l}$	Messung von Cortisol (in Pulver gelöst) $\mu\text{g/l}$	Messung von Cortisol (in Ethanol gelöst) $\mu\text{g/l}$
4° C	5,5	2,8	1850	2204
37° C und 5 %-CO ₂	20,2	3,2	1812	2376

Tabelle 32. Darstellung der Cortisol- und Cortison-Konzentration im Medium in $\mu\text{g/l}$ unter Cortisol-Stimulationsbedingungen ohne Zellkultur für 24 h. Es zeigte sich eine spontane temperaturabhängige Oxidation von Cortisol in Cortison.

3.4.2 Cortison-Inkubation bei variabler Temperatur

Medium Kultivierung mit Cortison	Messung von Cortisol (in Pulver gelöst) $\mu\text{g/l}$	Messung von Cortisol (in Ethanol gelöst) $\mu\text{g/l}$	Messung von Cortison (in Pulver gelöst) $\mu\text{g/l}$	Messung von Cortison (in Ethanol gelöst) $\mu\text{g/l}$
4° C	unwg	unwg	7438	2086
37° C und 5 %-CO ₂	unwg	unwg	6690	1902

Tabelle 33. Darstellung der Cortisol- und Cortison-Konzentration im Medium in $\mu\text{g/l}$ unter Cortisol-Stimulationsbedingungen ohne Zellkultur. „unwg“ entspricht: „unterhalb der Nachweisgrenze von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ “. Es zeigte sich keine temperaturabhängige oder spontane Reduktion von Cortison in Cortisol, unabhängig von der Zugabeform des Cortisons.

3.4.3 Fazit der Cortison- und Cortisol-Inkubation für 24 h ohne Zellen

Die Messergebnisse zeigten einen Anhalt für ist eine spontane temperaturabhängige Oxidation von Cortisol zu Cortison. Es stellte sich eine mittlere Steigerung der Cortison Konzentration auf das 2,8-Fache unter 37° C dar (s. Tabelle 32, S. 49). Diese temperaturabhängige Inaktivierung von Cortisol ist bei der Interpretation der Messergebnisse von besonderem Interesse, da sie die Ergebnisse der Inkubation mit Cortison bei der Messung von Cortisol beeinflussen. Es fand sich kein Anhalt für eine spontane oder temperaturabhängige Reduktion von Cortison in Cortisol (s. Tabelle 33, S. 49).

3.5 Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1-Plasmid und 7 Tage Kultivierung zur Analyse

Die oben genannten Ergebnisse führten zu einer weiterführenden Anlage eines Experimentes zur Klärung der Fragestellung, ob eine Umwandlung von Cortison und Cortisol auch ohne eine Zugabe von den betreffenden Substraten möglich ist. Hierzu wurde ein Versuchsaufbau über 7 Tage mit 11- β HSD1-Überexpression entworfen. Auf eine weitere Stimulation der Zellen wurde verzichtet. Hintergrund war die Frage, ob eine spontane bzw. endogene Aktivität des Enzyms in mesenchymalen Vorläuferzellen vorliegt, die man an der Cortison- und Cortisol-Konzentration des Mediums und des Zellsuspension messen kann, ohne das eine externe Stimulation erfolgt. Dies sollte durch eine Transfektion mit einem 11- β HSD1-Plasmid generiert werden. Die Kultivierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in zwei unterschiedlichen Kulturen mit jeweils 100.000 Zellen pro Well erfolgte für die Messzeitpunkte: 0 Tage ohne Transfektion zur Kontrolle, 1, 2, 3, 5 und 7 Tage nach Transfektion der Zellen.

Die Transfektion erfolgte 24 h nach Aufbringen der Zellen in die 6-Well-Platten. Mediumüberstand wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 3 und 7 Tage für die spätere Analyse asserviert. Am 5. Tag wurde das Vorläuferzell-Medium, das 10 % FCS enthielt durch 0,1 % BSA-Medium, zur direkten Cortison- und Cortisol-Bestimmung ersetzt. Die 11- β Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Transfektion erfolgte nach der Lipofectamin-Methode, wie sie in Kapitel 2. beschrieben worden ist. Es wurde eine Kontrolle der Transfektionseffizienz mit dem *Grün fluoreszierenden Protein* durchgeführt.

3.5.1 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Nach 24 h erfolgte die Kontrolle der Transfektionseffizienz durch ein *Grün fluoreszierendes Protein*-Plasmid, auch GFP-Plasmid genannt. Die Methodik ist im Kapitel 2. detailliert beschrieben. Die Auswertung ergab eine visuell geschätzte Transfektionsrate von ca. 80 % des Zellverbandes.

3.5.2 Genexpression von 11- β HSD1 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

Die Analyse der Genexpression zeigte eine signifikante Überexpression der mRNA von 11- β -HSD1 für Kultur 1 über alle angegebenen Messzeitpunkte. Detailliert stellt sich eine hochsignifikante Überexpression für den Messzeitpunkt 24 h auf das 3856-Fache (*p-value* von 0,0001; n=4) dar. Weiterhin eine signifikante Überexpression nach 48 h auf das 17139-Fache (*p-value* 0,007; n=4) nach 3 Tagen auf das 1053-Fache (*p-value* 0,00473; n=3), nach 5 Tagen auf das 36119-Fache (*p-value* 0,0046; n=3), bis hin zu dem 7-Tage-Messzeitpunkt auf das 23405-Fache (*p-value* 0,0176; n=3).

Für Kultur 2 stellt sich für 24 h und 48 h ein hoch signifikanter Anstieg der Genexpression dar (24 h: 73-Fach, *p-value* 0,0004, n=4; 48 h: 2011-Fach, *p-value* 0,0005; n=4). Weiterhin ein signifikanter Anstieg der Expression auf mRNA-Ebene für 3 Tage und 5 Tage (3 d: 22,8-Fach, *p-value* 0,0206; n=3; 5 d: 1954-Fach, *p-value* 0,0481; n=3) des Schlüsselenzyms. Am 7. Tag stellte sich bei Kultur 2 eine Tendenz der Induktion der mRNA-Expression dar (292-Fach, *p-value* 0,0691; n=3).

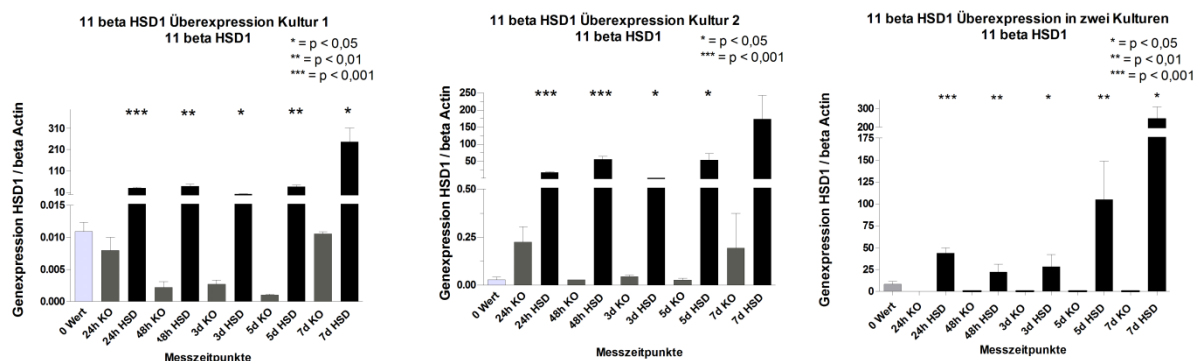


Abbildung 14. Grafische Darstellung der mRNA-Genexpression des Enzyms 11- β HSD1 in Kultur 1, 2 und als Mittelwerte beider Kulturen, ohne Stimulation. Der Nullwert wurde nicht transfiziert und zeigt Tag 0 des Versuchsaufbaus an. Die mRNA-Expression des Enzyms zeigte sich stabil signifikant erhöht von 24 h bis hin zu 7 Tagen im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = *p-value* < 0,05, ** = *p-value* < 0,01, *** = *p-value* < 0,001.

Die Mittelwerte für beide Patienten Kulturen ergaben dabei eine signifikante Induktion der mRNA für 11- β HSD1 nach 24 h (p -value < 0,0001; n=8) auf das 2417-Fache, nach 48h (p -value < 0,001; n= 7) auf das 1116-Fache. Nach 3 Tagen eine statistisch nicht signifikante 1884-fache Induktion (p -value 0,0748; n=6) im Vergleich zur Kontrolle. Nach 5 Tagen eine signifikante Induktion auf das 1078-Fache (p -value 0,037; n=6) und für den 7-Tage-Messzeitpunkt auf das 23405-Fache (p -value 0,0176; n=3). Im zeitlichen Verlauf kam es zu einer stetigen Steigerung der relativen mRNA-Expression bis zu 7 Tage nach Transfektion.

3.5.3 Genexpression von PPAR γ nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

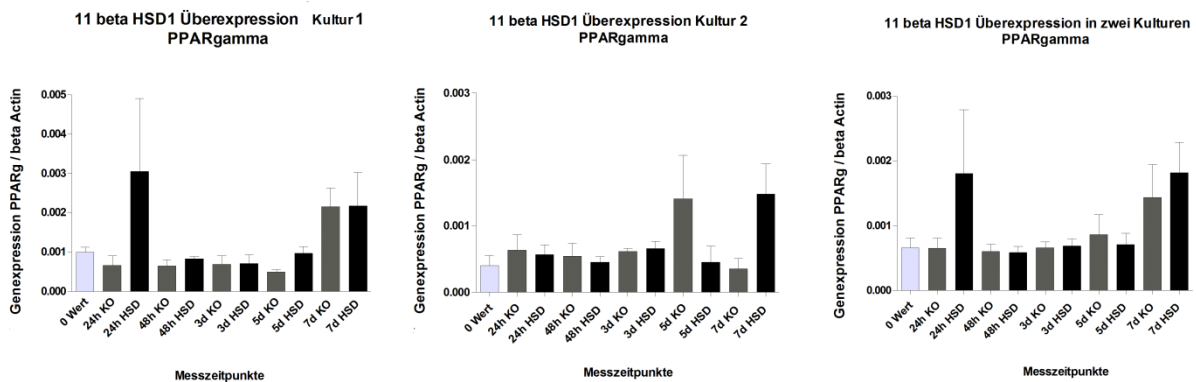


Abbildung 15. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins PPAR γ in Kultur 1, 2 und als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 7 Tage, ohne Stimulation. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Es zeigte sich kein Anhalt für eine statistische Induktion der mRNA von PPAR γ im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Die allgemeine Expression war stabil auf einem Niveau im Vergleich zum Kontroll-Plasmid über alle Messzeitpunkte. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test. Für eine signifikante Trendentwicklung zeigte sich kein Anhalt.

Eine signifikante Induktion der Genexpression von PPAR γ bei 11- β HSD1-Überexpression konnte nicht nachgewiesen werden. Eine erhöhte Expression stellte sich bei Kultur 1 zum Messzeitpunkt 24 h, auf das 4,6-Fache (p -value 0,246; n=4) und nach 5 Tagen auf das 1,95-Fache (p -value 0,065; n=3) dar. Für eine allgemeine statistisch stabile Trendentwicklung zeigte sich kein Anhalt in der Patienten Kultur 2. Es zeigte sich in Kultur 2 eine grenzwertige Tendenz der Induktion am 7. Tag, auf das 4,17-Fache (p -value 0,159; n=2 bis 3) im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Die allgemeine Expression ist stabil auf einem Niveau im Vergleich zum Kontroll-Plasmid über alle Messzeitpunkte.

3.5.4 Genexpression von C/EBP- α nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

Das proadipogene Protein C/EBP- α tritt mit PPAR γ in Wechselwirkung und ist für die Signaltransduktion von PPAR γ essenziell. Allerdings konnte sich keine signifikante gesteigerte Genexpression im Vergleich Kontroll-Plasmid und 11- β -HSD1-Plasmid bei Kultur 1 zeigen (Werte nicht dargestellt). Auf eine fortführende Analyse von Kultur 2 wurde verzichtet.

3.5.5 Genexpression von C/EBP- β nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

Das Protein C/EBP- β ist im intrazellulären Signaltransduktionsweg eng mit PPAR γ vergesellschaftet. Nach dem negativen Befund der Induktion von PPAR γ wurde anschließend die Genexpression von C/EBP- β analysiert, da diese im Signaltransduktionsweg der von PPAR γ vorgeschaltet zu sein scheint.

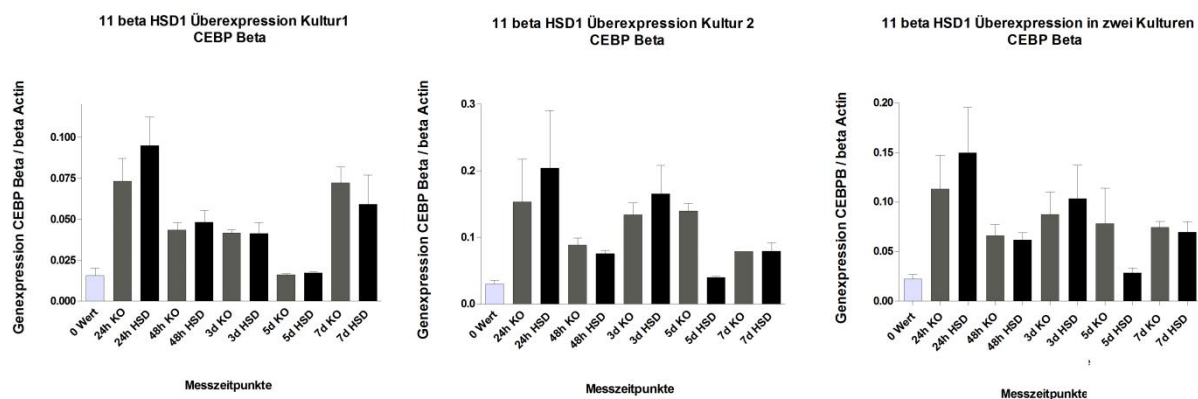


Abbildung 16. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins C/EBP- β in Kultur 1, 2 und als Mittelwerte in mesenchymalen Vorläuferzellen über 7 Tage, ohne Stimulation. Es zeigte sich keine statistische Steigerung der mRNA-Expression für C/EBP- β . Die allgemeine Expression war stabil auf einem Niveau im Vergleich zum Kontroll-Plasmid über alle Messzeitpunkte. Am 24 h Messzeitpunkt schien der Höhepunkt der Expression erreicht zu sein. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

Es konnte keine signifikante Induktion von C/EBP- β demonstriert werden. Dennoch stellte sich im 24-Stunden-Messzeitpunkt in beiden Kulturen eine Tendenz der Erhöhung dar. 29 % (p -value 0,3836; $n=3$) für Kultur 1 und 33 % (p -value 0,6622; $n=3$) für Kultur 2. Die Mittelwerte für beide Kulturen wiesen auf eine nicht signifikante Erhöhung auf das 1,35-Fache (p -value 0,544; $n=6$) der relativen Genexpression am 24-h-Messzeitpunkt hin. Bei Betrachtung des Verlaufs über die Zeit stellte die Auswertung einen Höhepunkt der Gesamtexpression am 24-Stunden-Messzeitpunkt mit Abfall zum letzten Zeitpunkt dar.

3.5.6 Genexpression von aP2 und LPL nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

Zur Klärung der Fragestellung, ob eine Induktion dieser proadipogenen Marker im Versuchsverlauf eintritt, wurde deren relative Genexpression ermittelt. Eine sinnvolle Auswertung der Genexpression von aP2 war nicht möglich, da trotz der hohen Sensibilität der Sybr Green® Real-time-PCR kein Nachweis gelang. Weiterhin war eine signifikante Induktion der mRNA von LPL über 7 Tage im Vergleich zum Kontroll-Plasmid und 11- β HSD1-Plasmid nicht nachweisbar (Messwerte nicht dargestellt). Somit zeigt sich in diesem kurzen Zeitraum kein Anhalt für eine Induktion der Adipogenese nach Transfektion mit dem 11- β HSD1-Plasmid, ohne Stimulation über 7 Tage.

3.5.7 Genexpression von RANKL nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

Eine signifikante Induktion des Osteoklasten aktivierenden Proteins auf mRNA-Ebene lässt sich nicht nachweisen. Anhand der Mittelwerte stellt sich am Messzeitpunkt 24 h eine Steigerung der Induktion von 20 % (*p-value* 0,865; *n*=3) für Kultur 1 und von 423 % (*p-value* 0,375; *n*=3) für Kultur 2. dar, im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Kontroll-Plasmid transfiziert wurden (Messwerte nicht dargestellt).

3.5.8 Genexpression von SGK nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

Als indirekter Nachweis einer intrazellulären Induktion durch Cortison und Cortisol bedient man sich des Nachweises des Enzyms SGK. Es zeigt sich jedoch keine statistisch signifikante Tendenz der Induktion nach 24 Stunden und weiterführend zum 7. Tag. Eine Steigerung stellt sich zum Messzeitpunkt 24 h um 72 % (*p-value* 0,197; *n*=4) für Patienten Kultur 1 und für Patienten Kultur 2 um 21 % (*p-value* 0,417; *n*=4) durch die statistischen Mittelwerte dar. Die Mittelwerte für beide Kulturen ergaben dabei für den 24 h Messzeitpunkt der Höhepunkt der relativen Genexpression mit einer Steigerung um 46,7 % (*p-value* 0,111; *n*=8) im Vergleich zur Kontrolle, die sich somit als grenzwertig statistische Tendenz darstellt. Im Verlauf des gesamten Versuchsaufbaus bleibt die mRNA von SGK über den Nullwert hinaus exprimiert und weist auf einen Höhepunkt am 24-Stunden-Messzeitpunkt hin.

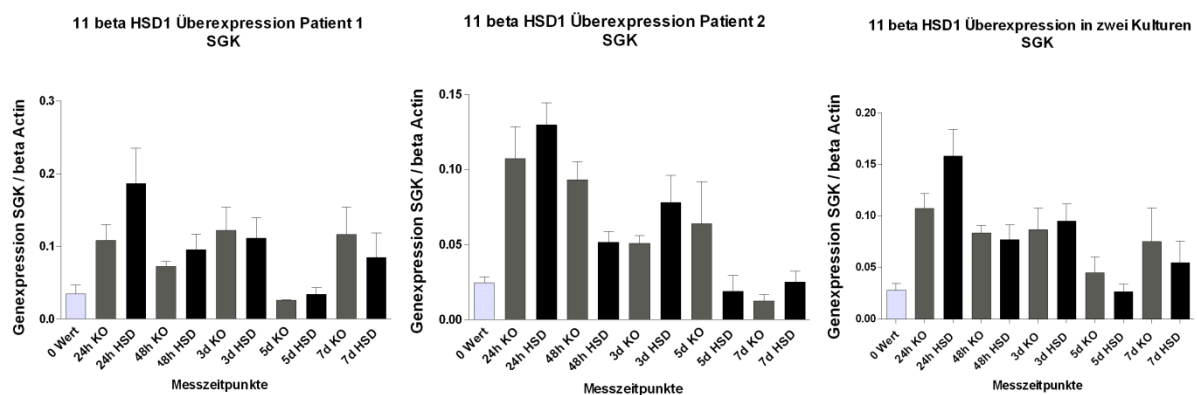


Abbildung 17. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins SGK in Kultur 1, 2 und für beide Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 7 Tage ohne Stimulation. Es zeigte sich kein Anhalt für eine statistisch gesteigerte Expression im Verlauf. Die allgemeine Expression war stabil auf einem Niveau im Vergleich zum Kontroll-Plasmid über alle Messzeitpunkte. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.5.9 Cortison- und Cortisol-Direkt-Bestimmung im Medium von mesenchymalen Vorläuferzellen nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion über 7 Tage ohne Stimulation

Die Cortison- und Cortisol-Bestimmung fand für die Messwerte Nullwert und bis zum 5. Tag in 10 % FCS-Medium statt. Für den 7-Tage-Messwert wurde das Medium 48 Stunden vorher durch 0,1 % BSA-Medium ersetzt. Weiterhin sind häufig hohe unspezifische Messwerte in FCS von knochenspezifischen Makern bekannt. Ein hoher Messwert in der Kontrolle bezüglich Cortisol und Cortison ist für

FCS zu erwarten, jedoch nicht für BSA. Da die Zellkultur-Nährstoffe des FCS benötigen, kam es im Verlauf der BSA-Inkubation möglicherweise zur Veränderung der Zellreaktion mangels Nährstoffen. In diesen Versuchen wurde eine 48-Stunden-Kultivierung mit dem BSA-Medium durchgeführt. Die Cortison- und Cortisol-Messung erfolgte durch die Abteilung Klinische Chemie, mittels der exakten LCM-Massenspektrometrie. Diese ergab folgendes Ergebnis, Abbildung 18, S. 54.

Die Messgrenze wurde am 7. Tag unterschritten, allerdings ist die Messgenauigkeit mit 5,7 % bis 8,87 % für Cortison auch in niedrigen Bereich als recht genau anzunehmen. Bei Messzeitpunkt Nullwert, bis zum 5-Tage-Messzeitpunkt, zeigte sich eine hohe Cortison- und Cortisol-Hintergrund-Messung bereits in den Kontrollen. Am 7-Tage-Messzeitpunkt fielen sehr niedrige Messwerte im BSA-Medium auf. Weder konnte im FCS, noch konnte im BSA-Medium ein signifikanter Unterschied, oder eine Tendenz in der Expression von Cortison im Vergleich zwischen Kontroll-Plasmid und 11- β HSD1-Plasmid gezeigt werden.

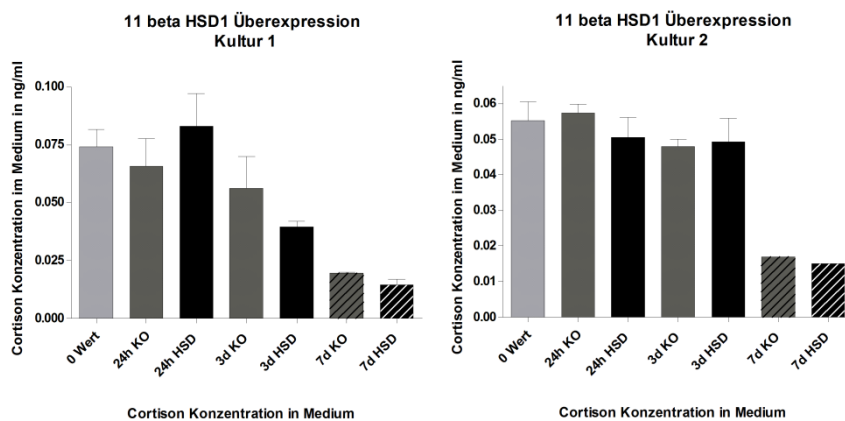


Abbildung 18. Grafische Darstellung der Cortison-Konzentration in Kultur 1 und 2 im Medium in ng/ml in mesenchymalen Vorläuferzellen, ohne Stimulation. Für das FCS-Medium ergab sich in den Messwerten bis zum 3. Tag eine erhöhte Hintergrundbelastung mit Cortisol und Cortison. Die schraffierten Messwerte am 7. Tag entsprachen einer Messung in BSA-Medium. Es zeigte sich kein Anhalt einer gesteigerten Synthese des Produkts Cortisol, unabhängig von den gewählten Medienzusätzen. Messgrenze bei 0,06 μ g/l. Statistische Darstellungen der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

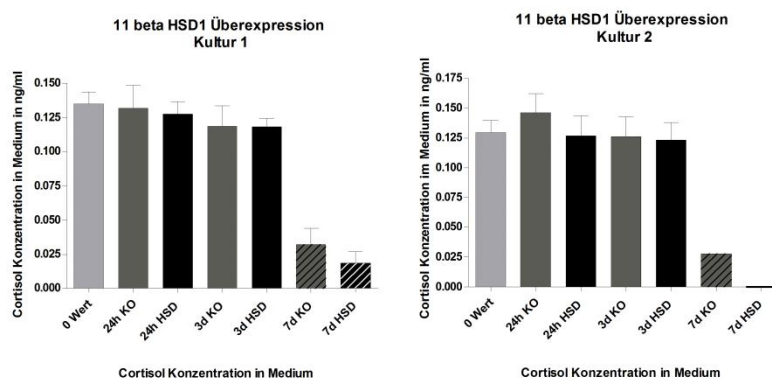


Abbildung 19. Grafische Darstellung der Cortisol-Konzentration in Kultur 1 und 2 im Medium in ng/ml in mesenchymalen Vorläuferzellen über 7 Tage, ohne Stimulation. Messgrenze bei 0,08 μ g/l. Für das FCS-Medium ergibt sich in den Messwerten bis zum 3. Tag eine erhöhte Hintergrundbelastung mit Cortisol und Cortison. Die schraffierten Messwerte am 7. Tag entsprechen einer Messung in BSA-Medium. Es zeigte sich kein Anhalt einer gesteigerten Synthese des Produkts Cortisol. Für Mediumzusatz BSA ergibt sich eine deutlich niedrigere Kon-

zentration des Produkts Cortisol. Statistische Darstellungen der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

Die Messgenauigkeit ist mit 4,7 % und 10,85 % im niedrigen Bereich relativ genau und für den 7-Tage-Messwert, trotz der Unterschreitung der Messgrenze, als genau anzunehmen. Eine weitere Aufkonzentrierung des Mediums wurde somit als nicht notwendig erachtet. Auch die Cortisol-Bestimmung ergab im FCS-Medium und BSA-Medium keinen signifikanten Unterschied der Cortisol-Konzentration im Vergleich Kontroll-Plasmid und 11- β HSD1-Plasmid. Da am 7-Tage-Messwert nur sehr niedrige Einzelwerte zu ermitteln waren, gehen wir von einer minimalen Umwandlung, aufgrund eines Substratmangels aus. Wie in Vorversuchen nachgewiesen, ist die spontane Oxidation zu Cortison in einer 37° C warmen Umgebung zu erwarten. Die höheren Messwerte im Vorfeld vom 1. bis zum 5. Tag sind durch die Hintergrundmessung in FCS-Medium zu erklären. Des Weiteren spricht dafür, dass bei einem Vergleich der Messwerte, unter Substratzugabe wesentlich höhere Cortison- und Cortisol-Konzentrationen erzielt wurden. Insgesamt zeigte sich kein Anhalt für eine gesteigerte endogene Reduktion oder Oxidation der Substrate des Enzyms 11- β HSD1 nach Transfektion über 7 Tage, ohne externe Zugabe der Substrate.

3.6 Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1-Plasmid und 28 Tage Kultivierung ohne Stimulation

Die oben genannten Ergebnisse führten zu der Fragestellung, ob der Effekt einer spontanen Umwandlung eventuell erst nach einer Dauer von 7 Tagen mit dem möglichen Nachweis von proadipogenen Markern sichtbar werden könnte. Möglicherweise führte die 11- β HSD1-Überexpression erst nach längerer Kulturzeit zu Differenzierungsveränderungen in mesenchymalen Vorläuferzellen. Als Versuchsaufbau fand die Inkubation in 10 % FCS-Medium für die Messzeitpunkte: 0 Tage, 7, 14 und 28 Tage statt. Die Zellkultur wurde 24 Stunden nach Kultivierung der Zellen auf einer 6-Well-Platte nach der Lipofectamin-Methode transfiziert. Tag 1 des Versuchsaufbaus bedeutete 24 h nach Ende der Transfektion. 48 h Stunden vor Versuchsende wurde das Medium, das 10 % FCS enthält durch 0,1 % BSA-Medium, zur direkten Cortison- und Cortisol-Bestimmung des 28. Tages ersetzt. Es fand keine Stimulation mit Cortison oder Cortisol statt. Es erfolgte die Anlage von jeweils 4 Wells pro Versuchsansatz.

3.6.1 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Zur Transfektionskontrolle wurden auch in diesem Fall die Zellkultur mit dem *Grün fluoreszierenden Protein* separat vom Versuchsaufbau transfiziert und die Lichtemitterung der mesenchymalen Vorläuferzellen gemessen. Die Transfektionseffizienzrate wurde mit 95 % des Zellverbandes angegeben. Aus Mangel an Zellmaterial konnte nur an Patient 1 eine Transfektionseffizienz-Kontrolle durchgeführt werden.

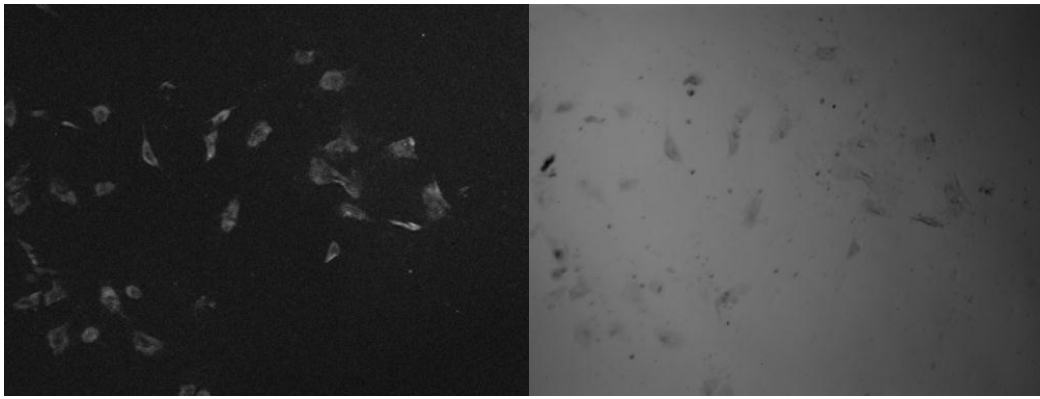


Abbildung 20. Beispielhafte Darstellung Transfektionseffizienz-Kontrolle mit GFP-Plasmid für Kultur 1. Links GFP-Plasmid Anregung durch Licht bei Bilddarstellung, rechts Durchlichtdarstellung des gleichen Zellverbands.

Immunoblot-Analyse der Grundexpression und Induktion von 11- β HSD1 in mesenchymalen Vorläuferzellen nach 7 Tagen und 28 Tagen ohne Stimulation

Nach 7 und 28 Tagen wurde das Protein 11- β HSD1 in den transfizierten Zellen mittels Immunoblot (wie in Kap. 2 erläutert) detektiert. Es fand in diesem Experiment eine orientierende Implementierung für die Durchführbarkeit des Westernblottings für das Protein von 11- β -HSD1 statt. Daher erfolgte der Immunoblot mit Protein von nur einem Patienten und es gibt es keine Anlage eines vergleichenden Aktin-Blots bei Spektrometernessung des Proteins. Anhand der Immunoblot-Analyse zeigte sich eine erhöhte Expression des Proteins in Zellen die mit dem 11- β -HSD1 tragenden Plasmid transfiziert wurden. Des Weiteren stellte sich eine Suppression des Proteins zum Messzeitpunkt 7. Tag im Vergleich zum Nullwert und 28-Tage-Messzeitpunkt dar. In der Densitometrie zeigte sich eine mittlere Steigerung des 11- β HSD1-Proteins auf das 1,92-Fache für den 28-Tage-Messzeitpunkt bei 11- β HSD1-Plasmid transfizierten Zellen. Der 7-Tage-Messzeitpunkt ist eingeschränkt aussagefähig, wir nehmen einen toxischen Effekt des Transfektionsmediums oder ein methodisches Problem bei der Aufarbeitung an. Übereinstimmend stellte sich die deutlich erniedrigte ermittelte RNA-Konzentration der Zellkultur am 7-Tage-Messzeitpunkt dar (s.u.).

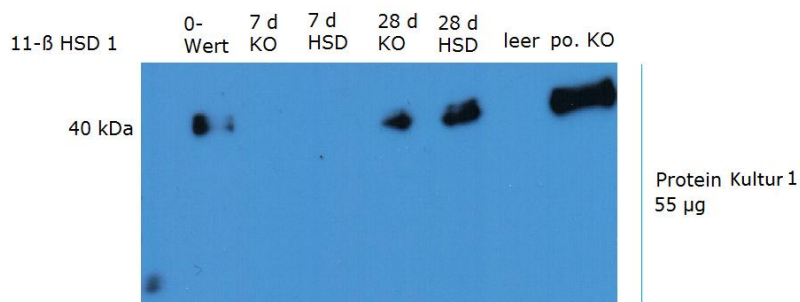


Abbildung 21. 11- β -HSD1-Überexpression in mesenchymalen Vorläuferzellen nach Transfektion mit 11- β -HSD1 Plasmid-Immunoblot-Analyse der Expression nach Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit dem 11- β HSD1-Plasmid. Die Zellen wurden nicht stimuliert und nach 7 und 28 Tagen analysiert. Es ergab sich ein erhöhter Nachweis des Proteins von 11- β HSD1 nach 28 Tagen im Vergleich zum Nullwert und dem Kontrollplasmid. Nach 7 Tagen gelang kein Nachweis des Proteins im Vergleich zum Nullwert. Ein Aktinblot liegt nicht vor, die Daten sind nur als orientierende Untersuchung zu verwenden.

3.6.2 RNA-Konzentration von mesenchymalen Vorläuferzellen von 7 bis 28 Tagen ohne Stimulation

Zur weiteren Untersuchung der Zellkultur wurde eine RNA-Isolierung durchgeführt, die grafische Darstellung konnte eine Minderung der mittleren RNA-Gesamtmenge in den frühen Messzeitpunkten nachweisen. Dies spricht für einen toxischen Einfluss der durchgeführten Transfektion. Weiterhin spricht die Steigerung der mittleren RNA-Gesamtmenge für eine im Rahmen für ein allgemein gesteigertes Zellwachstum. Es zeigte sich eine mittlere lineare Steigerung der RNA-Gesamtmenge mit Trendlinie für Kultur 1 von 0,04 µg/µl am ersten Tag bis hin zu 0,12 µg/µl am 28. Tag der Zellkultur. Für Kultur 2 am ersten Tag von 0,075 µg/µl bis hin zu 1,3 µg/µl am 28. Tag nach Transfektion.

3.6.3 Genexpression von 11-β HSD1 nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

Durch die mRNA-Isolierung und das Umschreiben in cDNA, konnte die Genexpression mithilfe des Sybr Green® - Verfahren erfolgen, um einen mRNA-Nachweis der angestrebten 11-β-HSD1-Überexpression zu erbringen (Abbildung 22, S. 58). Kultur 1 zeigte statistisch eine signifikante Überexpression der mRNA auf das 8,2-Fache im 7-Tage-Messzeitpunkt (*p-value* 0,0074; n=4) der mRNA und in der Folge eine signifikante Überexpression zu den 14- und 28-Tage-Messzeitpunkten auf das 3,44-Fache bzw. auf das 1,72-Fache (14 Tage: *p-value* 0,0329, n=4; 28 Tage: *p-value* 0,0316, n=4). Hier zeigte sich eine Diskrepanz zu den Ergebnissen des Immunoblotverfahrens, da sich erst am 28. Tag eine vermehrte Überexpression auf Proteinebene nachweisen ließ. Bei Kultur 2 stellte sich eine grenzwertige Tendenz der Induktion auf das 12,9-Fache der Überexpression (*p-value* 0,1087; n=3) am 7. Tag der Messzeitpunkte im Vergleich zum Kontroll-Plasmid dar. In den folgenden Messzeitpunkten, wie am 14. und 28. Tag zeigte sich keine signifikante Induktion der Überexpression auf mRNA-Ebene. Am 14-Tage-Messzeitpunkt zeigte sich eine eingeschränkte Aussagefähigkeit bei Einzelwert der Kontrolle eine um das 2,71-fach (n=1 bis 4) verstärkte Expression für das 11-β HSD1-Plasmid. Am 28. Tag des Experiments stellte sich eine nicht signifikante Suppression auf das 2,70-Fache (*p-value* 0,199; n=2 bis 3) in der 11-β HSD1-Plasmid-Kultur dar. Zusammenfassend demonstrierten für die Mittelwerte beider Kulturen eine stabile signifikante Induktion des Enzyms 11-β HSD1 zum 7-Tage-Messzeitpunkt auf das 12,7-Fache und am 14-Tage-Zeitpunkt auf das 52,3-Fache in mesenchymalen Vorläuferzellen beider Kulturen (7 Tage: *p-value* 0,0262, n=7; 14 Tage: *p-value* 0,029, n=4). Für den 28-Tage-Messzeitpunkt zeigte sich ein Anhalt für eine nicht signifikante Steigerung auf das 1,24-Fache (*p-value* 0,474; n=6 bis 7) der Expression. In der Gesamtbetrachtung ergab die Auswertung eine Expression von 11-β HSD1, die sich stabil erhöht im Vergleich zur Kontrolle über alle Zeitpunkte darstellte. Am 7. Tag des Versuchs wies die Statistik einen Höhepunkt der relativen Expression für 11-β HSD1 mit nachfolgender Minderung der Genexpression über die Zeit auf.

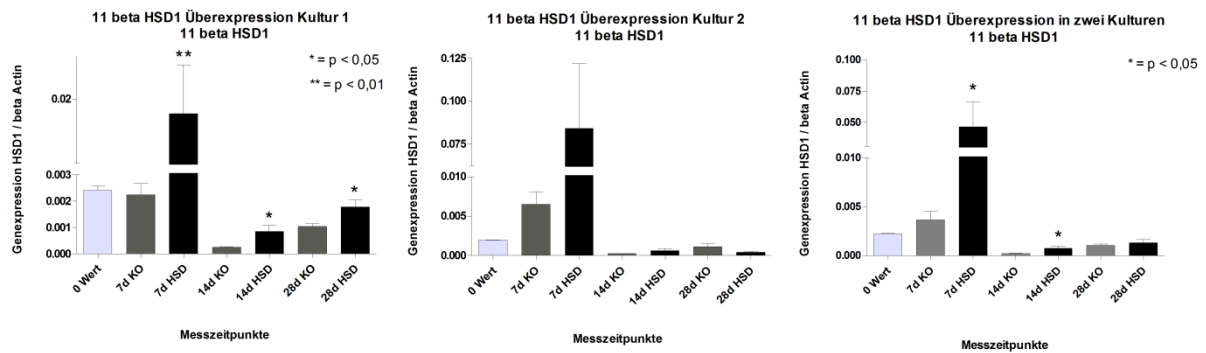


Abbildung 22. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins 11- β HSD1 in Kultur 1, 2 und als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage, ohne Stimulation. Es stellte sich eine stabile signifikant gesteigerte Expression des Enzyms in den Mittelwerten beider Kulturen bis zum 14. Tag nach Transfektion dar. Insgesamt ist der Höhepunkt der mittleren Expression am 7-Tage-Messzeitpunkt erreicht. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = p -value < 0,05, ** = p -value < 0,01.

3.6.4 Genexpression von PPAR γ nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

Nach dem Nachweis einer 11- β HSD1-Überexpression auf mRNA-Ebene wurde die Genexpression des Proteins PPAR γ als wichtiger proadipogener Marker untersucht.

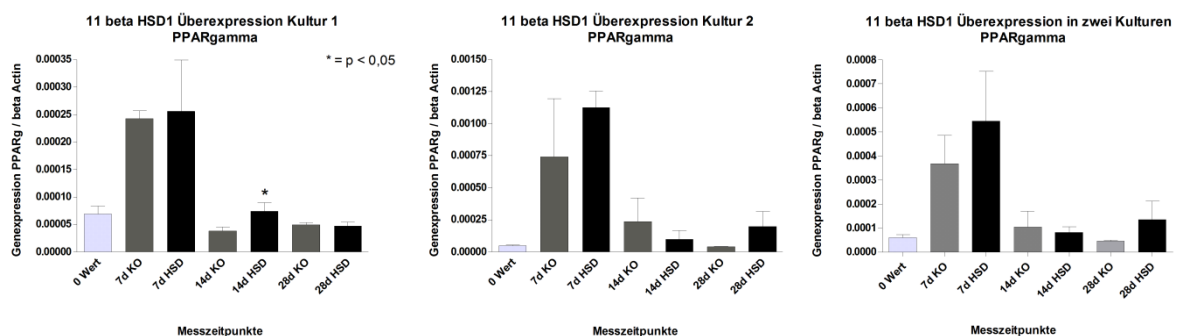


Abbildung 23. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins PPAR γ in Kultur 1, 2 und als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage ohne Stimulation. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Es zeigte sich eine Tendenz der Induktion für PPAR γ am 7. Tag der Kultur nach Transfektion mit 11- β HSD1-Plasmid, ohne Stimulation im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Insgesamt ist am 7-Tage-Messzeitpunkt der Höhepunkt der allgemeinen Expression. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = p -value < 0,05.

Bei Kultur 1 zeigte sich zum 14-Tage-Messzeitpunkt eine signifikante mRNA-Induktion des proadipogenen Proteins PPAR γ (p -value 0,0458; $n=4$) auf dem ersten Signifikanz-Niveau in Vergleich zu den Zellen, die mit dem Kontroll-Plasmid transfiziert wurden. Kultur 1 ergab weiterhin im Verlauf der Differenzierung eine Tendenz der Induktion des Markers PPAR γ im Vergleich zum nicht transfizierten Nullwert auf das 3,7-Fache (p -value 0,066; $n=8$ - Signifikanz in Abb. nicht dargestellt). Im weiteren Verlauf fällt diese hingegen konsequent ab. Im Falle der Kultur 2 zeigte sich am Messzeitpunkt 7. Tag eine nicht signifikante Tendenz der Erhöhung auf das 12,9-Fache (p -value 0,1087; $n=2$). Am 14-Tage-Messzeitpunkt stellte sich eine nicht signifikante Suppression auf das 2,41-Fache (p -value 0,55; $n=2$) dar. Am 28-Tage-Messzeitpunkt wiederum eine Erhöhung der Expression auf das 4,7-Fache (p -

value 0,3934; n=2 bis 3) im Vergleich zu den Zellen die mit dem Kontroll-Plasmid transfiziert wurden. Zusammengefasst stellte sich für die Mittelwerte beider Kulturen eine signifikante Induktion am 7. Tag auf das 9-Fache (*p-value* 0,027; n=7) gegen den nicht transfizierten Nullwert dar. Im Vergleich zum Kontroll-Plasmid ergab sich für beide Kulturen eine nicht signifikante vermehrte Expression auf das 1,48-Fache (*p-value* 0,442; n=6 bis 8) am 7. Tag nach Transfektion, sowie auf das 3-Fache (*p-value* 0,265; n=5) am 28. Tag nach Transfektion. Am Messzeitpunkt des 14. Tages hingegen ergab die Auswertung eine nicht signifikante Suppression auf das 0,788-Fache (*p-value* 0,752; n=6) für die 11- β HSD1-Plasmid-Zellkultur. Bei Betrachtung des Gesamtverlaufs über die Zeit ergab der 7. Tag nach Transfektion den Höhepunkt der relativen Gesamtexpression von PPAR γ . Im Verlauf fiel die Gesamtexpression ab und zeigte sich am 28. Tag statistisch nicht signifikant höher als die des Kontroll-Plasmids.

3.6.5 Genexpression von C/EBP- α nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

Das C/EBP- α ist an der Induktion von proadipogenen Prozessen der Zelle wesentlich beteiligt und eine Wechselwirkung mit PPAR γ ist für diese ebenso notwendig. Eine signifikante Erhöhung der Expression von C/EBP- α konnte im Vergleich zum Kontroll-Plasmid nicht nachgewiesen werden. Für Kultur 1 ergab sich eine nicht signifikante Steigerung auf das 1,34-Fache (*p-value* 0,4558; n=4) und für Kultur 2 auf das 2-Fache (*p-value* 0,3242; n=3) für den 7-Tage-Messzeitpunkt. In der Folge zeigte sich bei Kultur 2 zum 14-Tage-Messzeitpunkt eine nicht signifikante Erhöhung der Expression auf das 4-Fache (*p-value* 0,37; n=2 bis 3). Hingegen ergab sich für Kultur 1 am 7. und 28. Tag der Kultur eine signifikante Induktion auf das 20,9-Fache bzw. 9,52-Fache, zum nicht transfizierten Nullwert (7 Tage: *p-value* 0,021; n=4 - 28. Tage: *p-value* 0,0112; n=4 – Signifikanz in Abb. nicht dargestellt). Die Mittelwerte für beide Kulturen ergab die Auswertung eine statistisch nicht signifikante vermehrte Expression der mRNA auf das 1,9-Fache (*p-value* 0,38; n=7) am 7. Tag, auf das 3,59-Fache (*p-value* 0,308; n=6 bis 7) am 14. Tag und auf das 1,4-Fache (*p-value* 0,41; n=6 bis 7) am 28. Tag nach Transfektion mit dem Plasmid. Im Gesamtverlauf über die Zeit ergab die Auswertung eine vermehrte Expression von aP2 mit Höhepunkt am 7. Tag der Kultur. In der Folge Abfall der Gesamtexpression ab dem 7. Tag nach Transfektion bis hin zum 28. Tag des Experimentes, die sich nicht signifikant erhöht zum Kontroll-Plasmid zeigte.

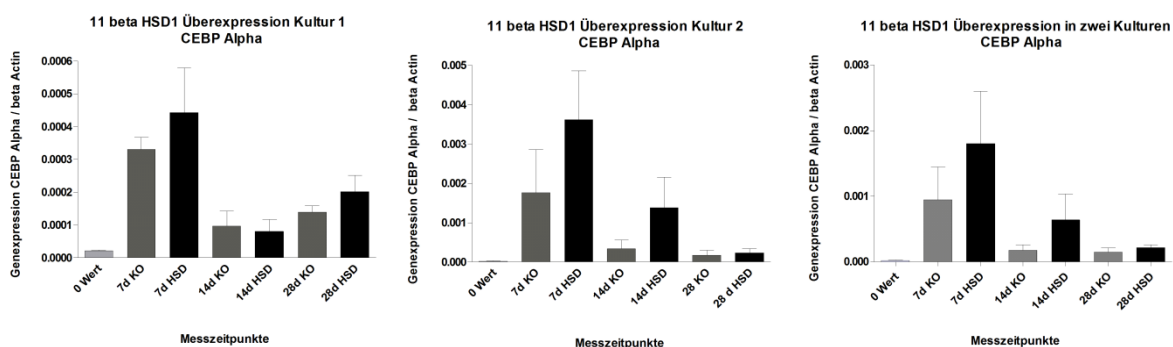


Abbildung 24. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins C/EBP- α in Kultur 1 und 2 als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage ohne Stimulation. Es ergab sich eine nicht signifikante Erhöhung der Expression für das proadipogene Protein C/EBP- α über alle gegebenen Zeitpunkte im Vergleich zur Kontrolle (mit Ausnahme der Kultur 1 am 14. Tag). Am 7-Tage-Messzeitpunkt war der Höhepunkt der relativen mRNA-Expression erreicht. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.6.6 Genexpression von C/EBP- β nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

Das Protein C/EBP- β ist Teil des PPAR γ Signaltransduktionsweges. Dieses Protein zeigte in den Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert wurden, eine Tendenz der Suppression. Für den 7-Tage und 14-Tage-Messzeitpunkt ergab die Statistik keine signifikanten Unterschiede in der Expression. Bei Kultur 1 stellte sich nach 28 Tagen eine statistisch signifikante (*p-value* 0,0422; n=4) 0,667-fache mRNA-Suppression für die 11 β HSD1-Plasmid-Zellkultur dar. Für Kultur 2 zeigte sich bereits nach 7 Tagen eine Tendenz der Suppression auf das 0,52-Fache (*p-value* 0,098; n=3). Die Mittelwerte für beide Kulturen ergaben am 7-Tage-Messzeitpunkt eine signifikante Suppression auf das 0,527-Fache, (*p-value* 0,0069, n=6) im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Zum 14- und 28-Tage-Messzeitpunkt zeigten sich keine signifikanten Differenzen der Expression im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Bei Betrachtung des Verlaufs über die Zeit zeigte sich ein Höhepunkt der Suppression am 7. Tag nach Transfektion. In der Folge verblieb die Expression auf gleichbleibendem Niveau.

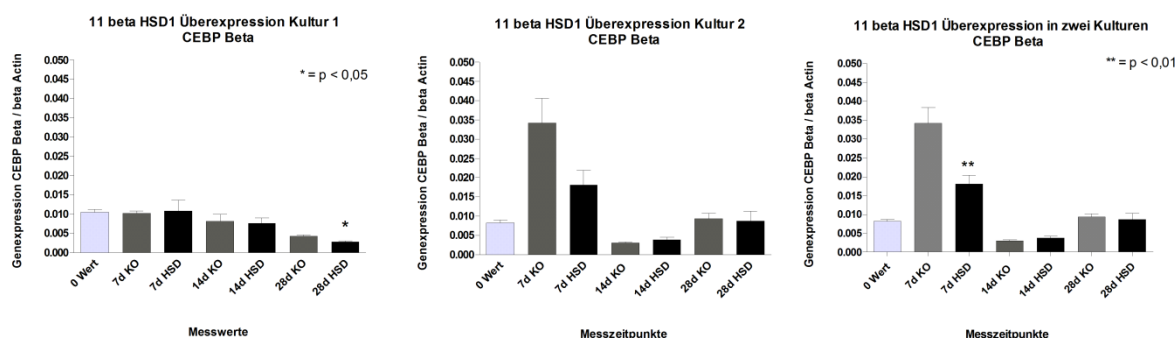


Abbildung 25. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins C/EBP- β in Kultur 1 und 2 als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Insgesamt schien am ersten Tag des Messzeitpunktes der Höhepunkt der relativen Genexpression erreicht. Im Verlauf stellte sich für die 11- β HSD1-Plasmid-Zellkultur am 7-Tage-Messzeitpunkt eine signifikante Suppression im Vergleich zum Kontroll-Plasmid dar. Statistische Analyse mittels t-Test. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = *p-value* < 0,05; ** = *p-value* < 0,01.

3.6.7 Genexpression von aP2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

Mit fortschreitender Differenzierung im Sinne des 11- β HSD1-Überexpressionsmodells zeigte der Langzeitversuch über 28 Tage einen Anhalt für erhöhte Expression des proadipogenen Proteins aP2 im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Bei Kultur 1 zeigte bei 14 Tagen eine nicht signifikante Steigerung auf das 1,41-Fache (*p-value* 0,332; n=3) und nach 28 Tagen eine 1,6-fache Steigerung (*p*=0,23; n=3). Problematisch scheint die Interpretation der Genexpression von Kultur 2. Hier liegen teilweise

nur Einzelwerte vor. Diese statistisch nicht gültigen Einzelwerte ergaben jedoch einen Anhalt für eine Steigerung der Expression für 11- β HSD1 auf das 4,2-Fache am 7. Tag, auf das 4891-Fache am 14. Tag und auf das 1,9-Fache am 28. Tag im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Zusammenfassend für die Mittelwerte beider Kulturen konnte eine nicht signifikante Steigerung der Expression auf das 4,2-Fache am 7-Tage-Messzeitpunkt (keine Statistik möglich da am 7. Tag der HSD-Plasmid-Kultur nur Einzelwerte vorliegen), auf das 3930-Fache (p -value 0,292 mit weiter statistischer Streuung der Standardabweichung; $n=4$ bis 5) am 14-Tage-Zeitpunkt und am 28-Tage-Messzeitpunkt eine Tendenz der Induktion auf das 2,3-Fache (p -value 0,109; $n=4$ bis 5) für die Zellen die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind. Betrachtet man die Messwerte unabhängig des Messzeitpunktes in einer Zusammenfassung (s. Abbildung 27, S. 62), so ergab sich eine nicht signifikante Steigerung auf das 3735-Fache (Bei einem Extrem-Einzelwert von 11- β HSD1-Plasmid Messwert; p -value 0,23; $n=9$ bis 13) für das proadipogene aP2. Bei der Gesamtbetrachtung über die Zeit kam es zu einem stetigen Anstieg der relativen mRNA-Expression des proadipogenen Proteins zu fortgeschrittenen Messzeitpunkten mit einem Maximum am 14.Tag der Kultivierung.

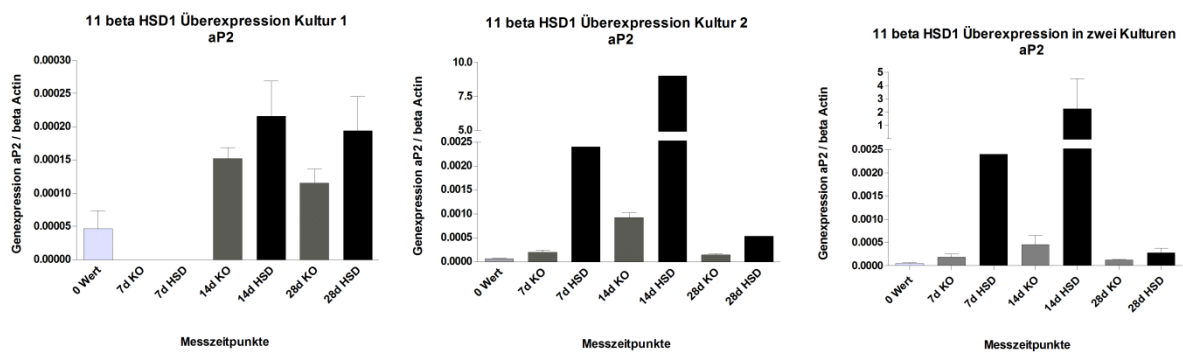


Abbildung 26. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins aP2 in Kultur 1 und 2 als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage, ohne Stimulation. Das proadipogene aP2 deutete auf eine nicht signifikante Erhöhung der Expression im Verlauf der fortschreitenden Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen hin. Dies galt im Vergleich zum Nullwert und zum Kontroll-Plasmid über die Zeit. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

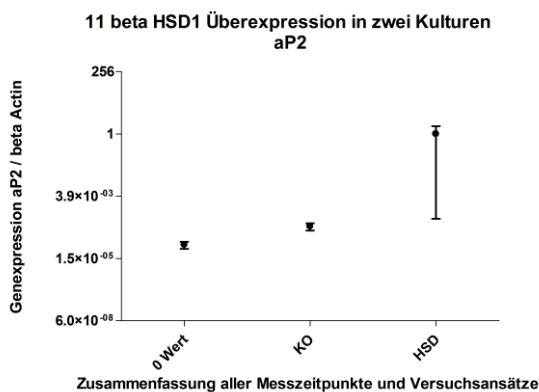


Abbildung 27. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins aP2 als Mittelwerte beider Kulturen unabhängig der Messzeitpunkte in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage, ohne Stimulation. Mittelwerte aller Messzeitpunkte nach Kontrolle und Plasmid-Kultur. Die Ergebnisse des proadipogenen aP2 deuten auf eine nicht signifikante Erhöhung der Expression im Verlauf der fortschreitenden Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen bei Transfektion mit dem Plasmid von 11- β HSD1 hin. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler in logarithmischer Darstellung. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.6.8 Genexpression von RANKL nach 11- β HSD1-Plasmid Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

Die mRNA des Osteoklasten aktivierenden Faktors, kurz RANKL, ergab für beide Kulturen einen Nachweis am 7. Tag des Experiments mit hoher statistischer Streuung der Standardabweichungen. Für Kultur 1 zeigte sich eine nicht signifikante mittlere Steigerung auf das 1,97-Fache (p -value 0,2939; $n=4$) am 7. Tag und auf das 1,8-Fache (p -value 1,431; $n=3$) am 14. Tag des Experiments. Im Falle der 2. Kultur stellten sich teilweise nur Einzelwerte in der statistischen Auswertung dar, daher ist eine vollständige statistische Auswertung nicht möglich. Es zeigte sich eine mittlere Steigerung um 282 % am 7. Tag (p -value 0,2939; $n=1$ bis 4; HSD 7. Tag nur Einzelwert), wie auch eine Steigerung um 239 % (p -value 0,4006; $n=2$) am 14. Tag des Experiments. Zusammenfassend zeigte sich für beide Kulturen am 7. Tag und 14. Tag der Kultur eine nicht signifikante Expression auf das 1,35-Fache (p -value 0,73; $n=5$ bis 7) bzw. 2,28-Fache (p -value 0,39; $n=5$) im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Für den 28. Tag der Kultur nach Transfektion stellte sich eine nicht signifikante 1,71fach erhöhte (p -value 0,345, $n=5$ bis 7) Expression im Vergleich zur Kontrolle ein. Der Spontanverlauf über die Zeit demonstrierte eine 1085fach erhöhte Expression gegenüber dem Nullwert am 7. Tag (p -value 0,198; $n=5$ bis 7). Danach Abfall der relativen Expression bis zum letzten Tag. Die relative mRNA-Expression von RANKL blieb in der 11- β HSD1 Kultur im gesamten Verlauf höher als in der Kontrolle.

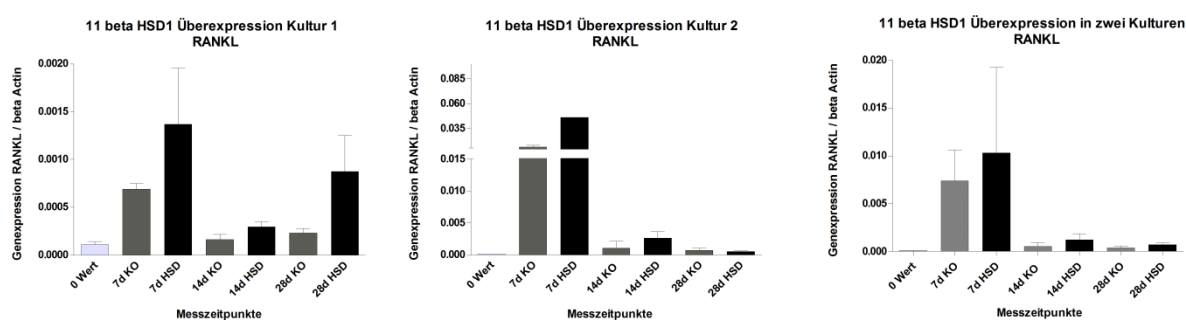


Abbildung 28. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins RANKL in Kultur 1 und 2 als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage, ohne Stimulation. Es zeigte sich ein Trend für eine gesteigerte nicht signifikante Expression des Osteoklasten aktivierenden Proteins bei hoher statistischer Standardabweichung am 7-Tage-Messzeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.6.9 Genexpression von RUNX2 nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

Die mRNA-Konzentration für RUNX2 ergab in der statistischen Auswertung für die Kultur 1 eine nicht signifikante Tendenz der Induktion, auf das 1,46-Fache (p -value 0,093; $n=4$ bis 6) für den 7-Tage-Messzeitpunkt. Kultur 1 zeigte für den 14-Tage - und 28-Tage-Messzeitpunkt eine Suppression um 33,2 % (p -value 0,27; $n=4$) bzw. um 24 % (p -value 0,14; $n=4$). In Kultur 2 ergab sich für den 28-Tage-Messzeitpunkt eine statistisch signifikante Suppression der Expression auf das 1,9-Fache, (p -value 0,0179, $n=3$) im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Zusammenfassend für beide Kulturen zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Suppression um 28 % (p -value 0,307; $n=5$ bis 6) am 14-Tage-Zeitpunkt und eine statistisch signifikante Suppression für das 11-β HSD1-Plasmid auf das 0,65-Fache (p -value 0,0035, $n=7$) am 28-Tage-Messzeitpunkt.

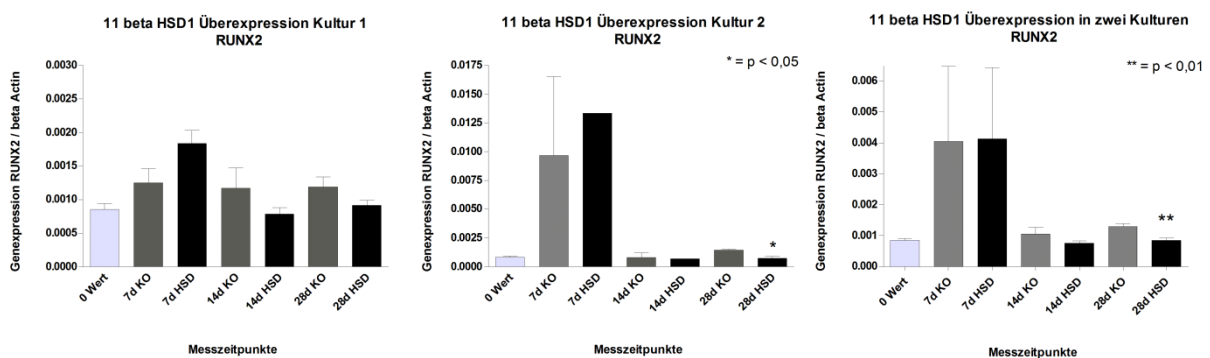


Abbildung 29. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins RUNX2 in Kultur 1 und 2 als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage, ohne Stimulation. Zu den gegebenen Messzeitpunkten zeigte sich eine signifikante Suppression von RUNX2 am 28. Tag der Kultivierung. Am 7-Tage-Messzeitpunkt ergab sich der Höhepunkt der relativen mRNA-Gesamt-Expression. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = p -value < 0,05; ** = p -value < 0,01.

3.6.10 Genexpression von 11-β HSD2 nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 28 Tagen

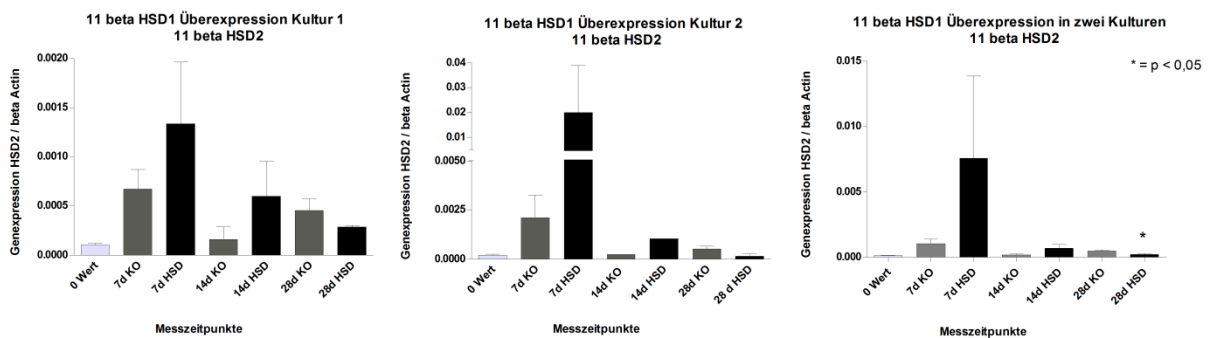


Abbildung 30. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins 11-β HSD2 in Kultur 1 und 2 als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen über 28 Tage, ohne Stimulation. Die Expression deutete auf eine nicht signifikante erhöhte Expression am 7. Tag nach Transfektion hin und in der Folge eine signifikante Suppression von 11-β HSD2, 28 Tage nach Transfektion. Der 7-Tage-Messzeitpunkt zeigte den Höhe-

punkt der relativen mRNA-Expression an. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = p -value < 0,05.

Der Nachweis des 11- β HSD2 zeigte keine statistisch signifikante Induktion für die einzelnen Kulturen. Für Kultur 1 stellten sich am 7-Tage-Messzeitpunkt eine 1,98-fache Erhöhung (p -value 0,27; $n=4$) und eine 3,72-fache Erhöhung der Expression (p -value 3,185; $n=3$) der mittleren mRNA-Expression nach 14 Tagen dar. Patienten Kultur 2 zeigte am 7. Tag nach Transfektion eine Erhöhung auf das 9,47-Fache (p -value 0,44; $n=2$) der mRNA im Vergleich mit dem Kontroll-Plasmid (eine statistische Auswertung war bei Zweierwerten nicht möglich). Für den 14-Tage-Messzeitpunkt lagen hingegen nur Einzelwerte vor, so ergab sich auch hier keine statistische Auswertung. Es zeigte sich bei Einzelwerten eine 4,26-fache Erhöhung der mRNA-Expression für Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert worden sind. Am 28. Tag nach Transfektion stellte sich eine Suppression um 70,1 % (p -value 0,17; $n=3$) von 11- β HSD2 in der 11- β HSD1-Kultur im Vergleich zum Kontroll-Plasmid dar. Die Mittelwerte für beide Kulturen stellten eine nicht signifikante Erhöhung der Expression am 7. bzw. 14. Tag, auf das 7,3-Fache (p -value 0,25; $n=6$ bis 8) und das 3,9-Fache (p -value 0,12; $n=4$) dar. Am 28. Tag nach Transfektion ergab die statistische Auswertung eine signifikante Suppression auf das 0,48-Fache (p -value 0,039; $n=7$) für die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfizierten Zellen im Vergleich zum Kontrollplasmid hin. Bei Betrachtung des Gesamtverlaufs über die Zeit zeigte sich ein Anhalt für eine verstärkte Expression für die mRNA des Proteins der transfizierten Kulturen mit Höhepunkt am 7. Tag nach Transfektion und in der Folge Abfall der Expression im Vergleich zur Kontrolle in diesen Kulturen.

3.6.11 Fazit der 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion nach 28 Tagen ohne Stimulation

In der Gesamtbetrachtung des 28-Tage-Versuchsaufbaus zeigte sich die maximale signifikante Induktion der mRNA des 11- β HSD1-Gens bis auf das 52-Fache am 7. und 14. Tag nach Transfektion. In der Folge kam es zu einer Anahme der der Gesamt-Expression, jedoch weiterhin erhöhten Expression im Vergleich zum Kontroll-Plasmid - der Effekt der Überexpression lies nach. Auf der analytischen Ebene des Proteins wird eine vermehrte Expression des Enzyms am 28-Tage-Messzeitpunkts für Kultur 1 aufgezeigt. Anders als auf der mRNA-Ebene konnte am 7. Tag des Versuchsaufbaus kein Nachweis von Protein in Kultur 1 gelingen. Für eine proadipogene Differenzierung der Kulturen zeigte sich die mRNA-Expression mit einem Trend der Induktion von aP2 auf das 2,2-Fache am 28. Tag nach Transfektion. Weiterhin stellte sich für C/EBP- α eine statistisch nicht signifikante vermehrte Expression der mRNA über den gesamten Versuchsaufbau mit Höhepunkt am 7. Tag nach Transfektion dar. Auch das Protein PPAR γ demonstrierte eine nicht signifikante Tendenz der Expression mit Höhepunkt am 7. Tag nach Transfektion mit dem 11- β HSD1-Plasmid. Hingegen ergab sich für das proadipogene C/EBP- β eine statistisch signifikante Suppression am 7. Tag nach Transfektion. Die osteogene Differenzierung dargestellt durch den mRNA-Nachweis von RANKL und RUNX2, war ebenfalls von Veränderungen der Expression betroffen. Übereinstimmend mit dem Tiefpunkt der Expression von osteogenen Markern am 28. Tag, ergab sich hier eine signifikante Suppression von RUNX2. Weiterhin ergab sich eine signifikante Suppression des Gegenspieler-Enzyms 11- β HSD2 am 28. Tag der Kultur.

Es konnte ein nicht signifikanter Trend des vermehrten mRNA-Nachweises von RANKEL zu frühen Zeitpunkten aufgezeigt werden.

3.7 Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit 11- β HSD1-Plasmid, 48 Stunden Kultivierung und variable Stimulation

Mit dem folgenden Experiment sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Induktion des Enzyms 11- β HSD1 in einem kurzzeitigen Versuch auf Protein - und mRNA-Ebene nachzuweisen ist und auch funktionell durch die Enzymaktivität nachzuweisen ist. Da die Überexpression nach 48 h maximal war, wurde der Versuch entsprechend geplant. 42 Stunden nach Transfektions-Ende erfolgte die 5 μ mol Cortison- und 5 μ mol die Cortisol-Zugabe. Die Inkubation erfolgte dann für 6 Stunden. Darüber hinaus wurden variable Stimulationsmedien verwendet. Die mesenchymalen Vorläuferzellen wurden mit den Substraten Cortisol oder Cortison, sowohl getrennt davon mit unterstützenden Cofaktoren des Schlüsselenzyms 11- β HSD1 (NADPH, Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase), sowie ebenfalls separat für das Gegenspieler Enzym 11- β HSD2 (NAD) stimuliert.

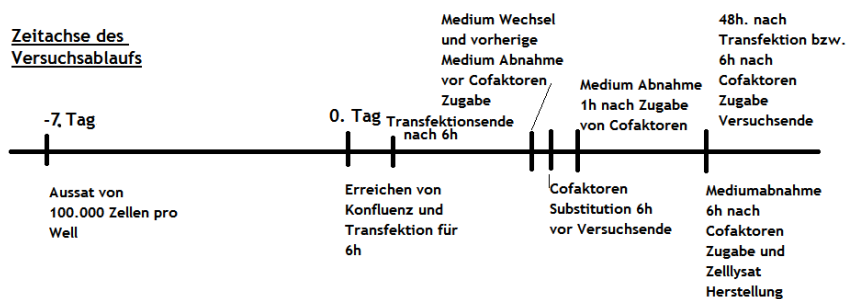


Abbildung 31. Schematische Darstellung des 48 h Versuchsablaufs mit Cofaktoren-Zugabe.

Wir wählten einen Versuchsaufbau für jeweils 100.000 Zellen bis 200.000 Zellen in Viereransätzen pro Versuchsansatz. Eine anschließende Zellzahlbestimmung ergab 150.000 Zellen pro Well. Die mRNA- und Protein-Isolierung erfolgte mit Dreieransätzen, die LCM-Messenspektrometrie erfolgte mit Zweierwerten pro Versuchsansatz der Cofaktoren-Zugabe. Es wurde der Aufbau für jede sinnvolle Kombination von Cofaktoren-Zugaben für die zwei Isoenzyme und mit dem jeweiligen Substrat durchgeführt. Dabei erfolgte eine Cofaktoren-Zugabe zur 11- β HSD1-Reduktion von Cortison zu Cortisol. Dafür wurde NADPH, Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eingesetzt. Diese Zugabekombination wurde in der Folge als sog. NADPH-Regenerationssystem (Abk. entsprechend: Reg) bezeichnet. Weiterhin führten wir eine Unterstützung der Oxidation (Reaktion von Cortisol zu Cortison) mit NAD durch. Als Vergleich diente die Inkubation ohne Cofaktoren, nur mit der Zugabe von jeweils 5 μ M Cortison und Cortisol. Die 100.000 Zellen pro Well wurden nach Aussaat für 5 Tage in Standardmedium, bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit 11- β HSD1 Plasmid und Kontroll-Plasmid für 6 Stunden nach der Lipofectamin-Methode. Es wurde die Stimulation mit dem sog. NADPH-Regenerationssystem, NAD und Cortison und Cortisol jeweils separat 42 Stunden nach Transfektionsbeginn für 6 h (um eine optimale Proteinexpression des Enzyms zu erreichen) durchgeführt. 48 Stunden nach Transfektionsbeginn erfolgte

dann die mRNA-Isolierung und Protein-Isolierung der Zellkulturen. Zur Bestimmung von Cortison und Cortisol erfolgte die Medium-Überstand-Entnahme zu den Zeitpunkten vor Zugabe der Cofaktoren und des Cortison und Cortisols. Des Weiteren 1 Stunde nach und schließlich 6 Stunden nach Cofaktoren-Zugabe. Dieses Vorgehen sollte während der 6 Stunden Inkubationszeit die Aktivität der Enzyme unterstützen. Mittels LCM-Massenspektrometrie wurde die Cortison und Cortisol-Konzentration im Medium nach 6 Stunden bestimmt. Die weiteren Überstände wurden für weitere Analysen eingelagert. Eine mRNA- und Protein-Isolierung war aus dem mit Cofaktoren oder Cortison und Cortisol stimulierten Zellmaterial nicht möglich, da wir eine Cortison und Cortisol-Bestimmung auch direkt aus dem Zelllysat durchführten und daher keine Zellen für die erwähnten Analysen übrig war. Die mRNA- und Protein-Isolierung erfolgte an nicht mit Cofaktoren stimulierten Zellkulturen, die allein mit Medium ohne Zusätze inkubiert worden waren. Ein Effekt auf die mRNA und Proteinsynthese war natürlich nicht auszuschließen, aber nach den Voruntersuchungen nicht unbedingt zu erwarten.

3.7.1 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Die Transfektionskontrolle wurde mit dem *grün fluoreszierenden Protein* für die Kulturen von zwei Patienten Kulturen durchgeführt und die Lichtemittierung der mesenchymalen Vorläuferzellen gemessen. Die Transfektionseffizienzrate wurde mit jeweils ca. 80 % visuell geschätzt angegeben.

3.7.2 Genexpression von 11- β HSD1 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h zur Kontrolle der Transfektion

Es handelt sich um eine Nativ-Kultur ohne Cofaktoren-Stimulation mit 11- β HSD1-Überexpression. Es fand keine Stimulation mit Cortison, Cortisol, Cofaktoren oder dem NADPH-Regenerationssystem statt. Bei Kultur A konnte ein Tend der mRNA-Induktion auf das ca. 30-Fache (*p-value* 0,0861; n=3) nachgewiesen werden. In Kultur B zeigte sich eine signifikante Überexpression der mRNA, auf das 117-Fache (*p-value* 0,0175; n=3) für die Zellen, die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert wurden. Die Mittelwerte für beide Kulturen wiesen eine signifikante Steigerung der Expression auf das 72-Fache (*p-value* 0,0116; n=6) nach 48 h auf.

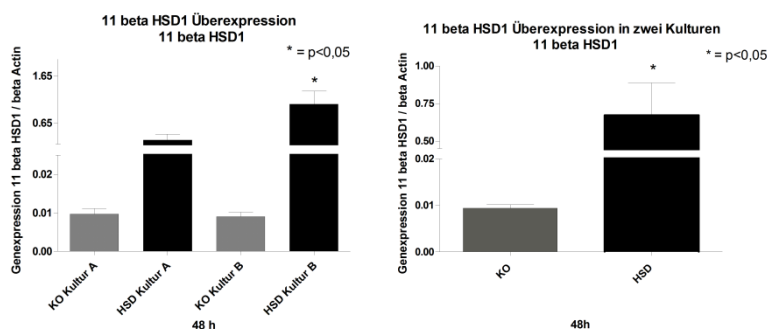


Abbildung 32. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins 11- β HSD1 in Kultur A,B und als Mittelwerte beider Kulturen von mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion ohne Stimulation. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Steigerung der Expression für die Mittelwerte der beiden Zellkulturen, die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = *p-value* < 0,05.

3.7.3 Genexpression von PPAR γ nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten bzw. nennenswerten Differenzen in der relativen mRNA-Expression für PPAR γ in den Kulturen.

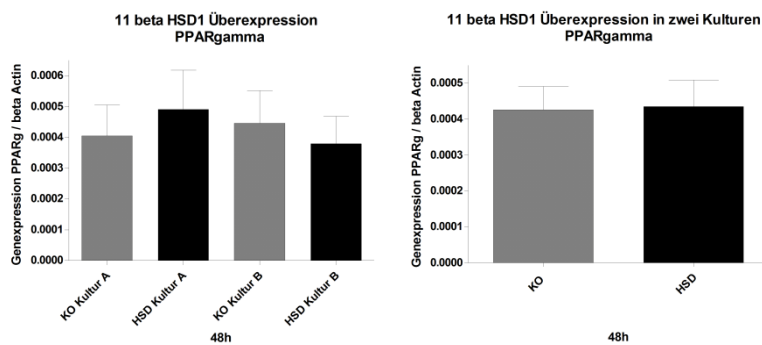


Abbildung 33. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins PPAR γ in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion ohne Stimulation. In der statistischen Auswertung stellte sich keine signifikante Induktion von PPAR γ dar. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.7.4 Genexpression von C/EBP- α nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Die mRNA-Expression des proadipogenen Markers C/EBP- α stellte sich mit einer statistisch signifikanten Überexpression auf das 4,4-Fache (p -value 0,0045; $n=3$) bei Kultur A auf dem zweiten Signifikanz-Niveau dar. Diese Induktion fand sich jedoch nicht in Kultur B wieder, wo sich lediglich eine nicht signifikante 1,6-fache Erhöhung (p -value 0,25, $n=3$) des Markers im Falle der Kontroll-Kultur von Kultur B zeigte. Bei Betrachtung beider Kulturen als Mittelwerte ergab die Auswertung eine statistisch nicht signifikanten Trend der Steigerung der Expression auf das 1,7-Fache (p -value 0,152; $n=6$) im Vergleich zum Kontroll-Plasmid.

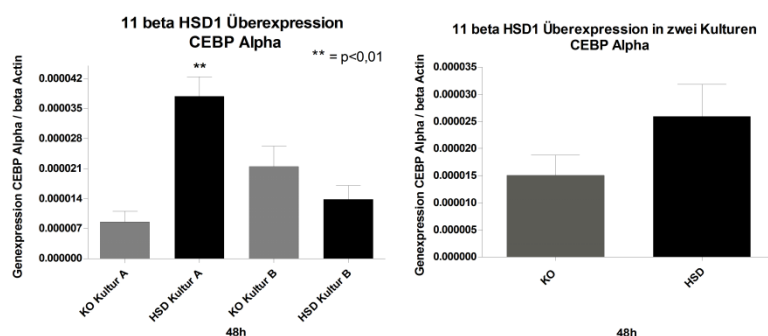


Abbildung 34. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins C/EBP- α in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion ohne Stimulation. Das proadipogene C/EBP- α zeigte eine nicht signifikante Erhöhung der Expression der Mittelwerte in beiden Kulturen mit dem 11- β HSD1-Plasmid. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. ** = p -value < 0,01.

3.7.5 Genexpression von C/EBP-β nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Der Transkriptionsfaktor C/EBP-β zeigte eine statistisch signifikante Überexpression des proadipogenen Markers auf das 3,8-Fache bei Kultur A auf dem ersten Signifikanz-Niveau (p -value 0,028; $n=3$). Dieses Ergebnis einer Induktion von C/EBP-β ist im Falle von Kultur B nicht wiederholbar, es ergab sich eine nicht signifikante Erhöhung der Kontrolle auf das 1,45-Fache (p -value 0,15; $n=3$) im Vergleich zur 11β HSD1-Zellkultur. Beide Kulturen als Mittelwerte zeigten eine nicht signifikante Steigerung auf das 1,54-Fache (p -value 0,195; $n=6$) der Expression im Vergleich zum Kontroll-Plasmid.

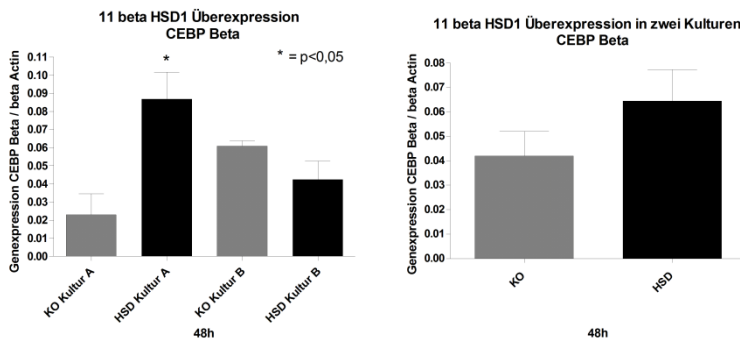


Abbildung 35. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins C/EBP-β in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen von mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion, ohne Stimulation. Das proadipogene C/EBP-β zeigte eine nicht signifikante Erhöhung der Expression für beide 11-β HSD1-Plasmid-Kulturen. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = p -value < 0,05.

3.7.6 Genexpression von C/EBP-δ nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

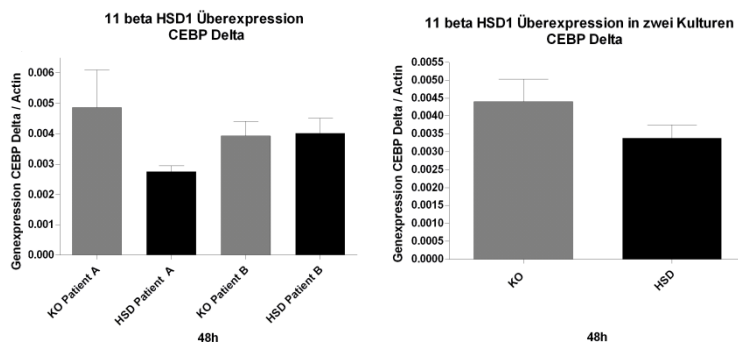


Abbildung 36. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins C/EBP-δ in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen von mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion, ohne Stimulation. Die Analyse demonstrierte keine signifikante Induktion des proadipogenen Proteins. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

Die mRNA-Analyse zeigte keine statistisch signifikante Erhöhung des proadipogenen Markers C/EBP-δ in den Zellen die mit dem 11-β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind. Für die Mittelwerte

beider Kulturen zeigte sich eine nicht signifikante Suppression auf das 0,77-Fache (p -value 0,195; $n=6$) für die Zellen, die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind.

3.7.7 Genexpression von aP2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Es liegen für beide Kulturen nur Zweierwerte des späten proadipogenen aP2 vor, sodass keine gültige statistische Auswertung für einzelne Kulturen möglich ist. Die mRNA-Expression Markers aP2 stellt sich für Kultur A mit einer Erhöhung der Expression auf das 114-Fache (p -value 0,019; $n=2$) für die Zellen, die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind, dar. Für Kultur B stellte sich eine Steigerung der Expression um 76 % (p -value 0,14; $n=2$) dar. Zusammengefasst für die Mittelwerte beider Kulturen ergab sich eine statistisch signifikante Induktion auf das 2,6-Fache (p -value 0,037; $n=4$) im Vergleich zur Kontrolle.

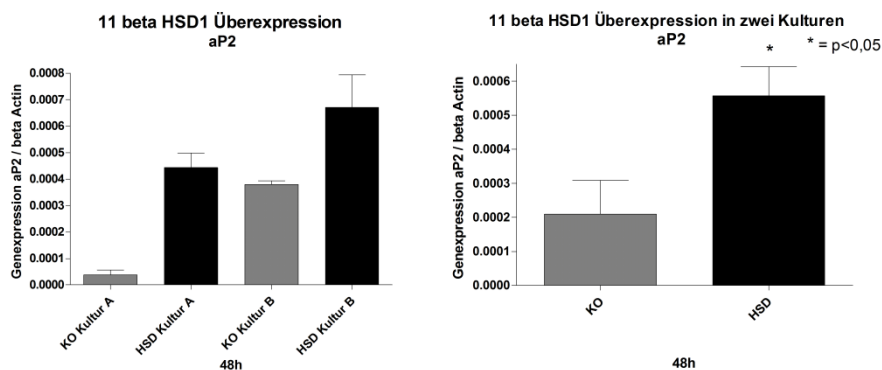


Abbildung 37. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins aP2 in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion, ohne Stimulation. Die Analyse demonstrierte eine signifikante proadipogene Induktion für die Mittelwerte beider Kulturen 48 h nach Transfektion. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz-Niveaus. Statistische Analyse mittels t-Test. * = p -value < 0,05.

3.7.8 Genexpression der SGK nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

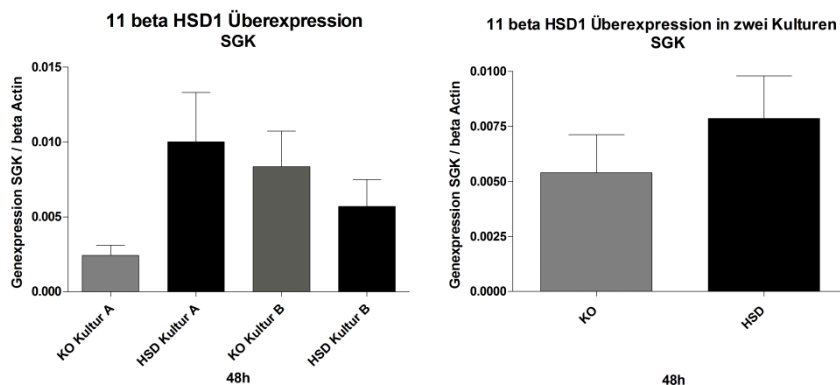


Abbildung 38. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins SGK in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen in mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion, ohne Stimulation. Es zeigte sich keine signifikante Steigerung der Expression. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

Die mRNA-Expression in den Zellen mit endogener proinsulinogener Serum Glucocorticoidkinase-Expression zeigte für Kultur A eine Tendenz der Steigerung auf das 4,1-Fache (p -value 0,088; $n=3$) der Expression an. Für Kultur B stellte sich diese Tendenz jedoch nicht dar, hier fiel eine 0,68-fache Suppression (p -value 0,43; $n=3$) für die 11- β HSD1-Zellkultur auf. Für beide Kulturen als Mittelwerte ergab sich eine 1,46-fache (p -value 0,36; $n=6$) Expression der 11- β HSD1-Plasmid-Zellkultur im Vergleich zum Kontroll-Plasmid.

3.7.9 Genexpression von RUNX2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Die mittlere mRNA-Expression des Markers RUNX2 der proosteogenen Differenzierung zeigte keine statistische Signifikanz der Differenz in den Zellkulturen bei Überexpression von 11- β HSD1.

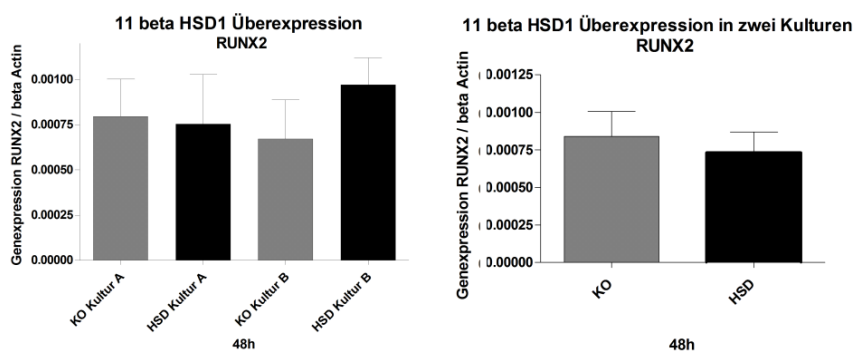


Abbildung 39. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins RUNX2 in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen von mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion ohne Stimulation. Die Auswertung ergab für beide Kulturen keinen signifikanten Unterschied in osteogenen Markern der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.7.10 Genexpression von 11- β HSD2 nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Die mRNA-Expression des Gegenspielers von 11- β HSD1 zeigte auf der mRNA-Ebene eine Tendenz der Induktion auf das 3,6-Fache (p -value 0,06; $n=3$) für die Zellen von Kultur A, die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind. Im Falle von Kultur B zeigte sich keine signifikant erhöhte Menge einer mRNA-Expression von 11- β HSD2. In Zusammenfassung für die Mittelwerte beider Kulturen stellte sich keine signifikante Erhöhung der Expression für 11- β HSD2, bei 1,98-fach erhöhter (p -value 0,201; $n=5$) relativer Genexpression dar.

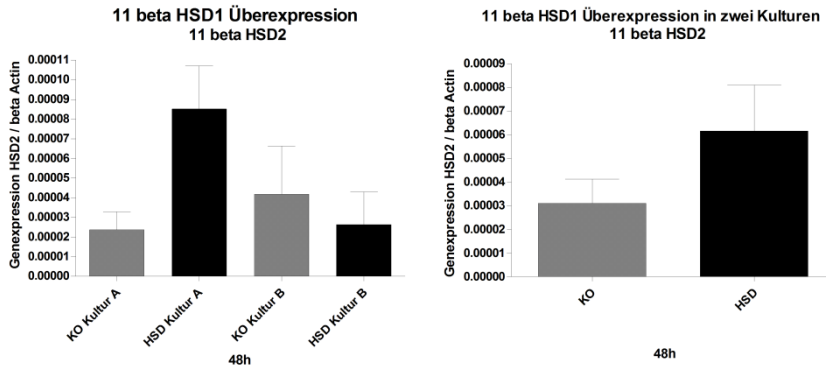


Abbildung 40. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins 11- β HSD2 in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen von mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion, ohne Stimulation. Eine nicht signifikante Erhöhung der Expression des Gegenspielers von 11- β HSD1 ergab sich in der Analyse der mRNA 48 h nach Transfektion. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.7.11 Genexpression von RANKL nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

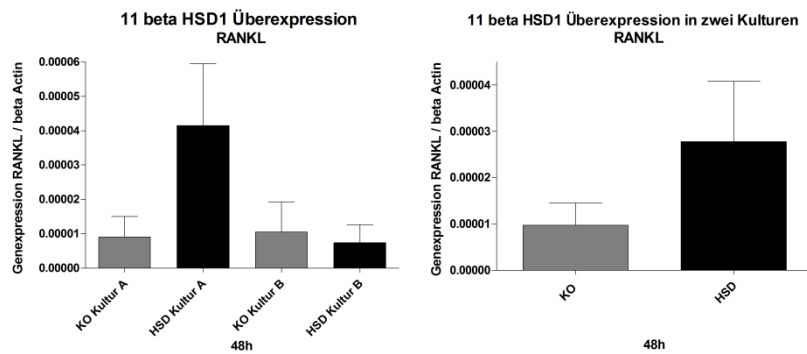


Abbildung 41. Grafische Darstellung der Genexpression des Proteins RANKL in Kultur A, B und als Mittelwerte beider Kulturen von mesenchymalen Vorläuferzellen 48 h nach Transfektion, ohne Stimulation. Eine nicht signifikante Erhöhung der Expression von RANKL ergab sich in der Analyse der mRNA-Expression 48 h nach Transfektion. Analysiert mittels Sybr Green® Real-time-PCR. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler. Statistische Analyse mittels t-Test.

Die Expression der mRNA des Osteoklasten aktivierenden Liganden RANKL zeigte auf der mRNA-Ebene eine nicht signifikante mittlere Erhöhung der Expression auf das 4,6-Fache (p -value 0,164; $n=3$) für Kultur A. Dieses Ergebnis war jedoch für Kultur B nicht nachweisbar (p -value 0,81; $n=2$ bis 3). Die Mittelwerte für beide Kulturen ergaben eine nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Es zeigte sich hierbei eine nicht signifikante 2,83-fach höhere Expression (p -value 0,196; $n=5$ bis 6) von RANKL mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfizierten Zellen.

3.7.12 Fazit der Transkription von mRNA nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Die Genexpression von 11- β HSD1 im Vergleich zum Kontroll-Plasmid stellte sich nach 48 h als teilweise signifikant bis zu 72-fach erhöht dar. Damit konnte gezeigt werden, dass die Transfektion erfolgreich war. Weiterhin zeigte sich die proadipogene Expression von aP2 als signifikant erhöht. Hin-

sichtlich weiterer proadipogener Marker konnte C/EBP- α und - β als tendenzielle Induktion im Vergleich zum Kontroll-Plasmid nachgewiesen werden. Für RANKL und 11- β HSD2 konnte eine nicht signifikante Tendenz der erhöhten Expression in 11- β HSD1-Plasmid-Zellkultur aufgezeigt werden. Osteogene Marker zeigten im kurzen Versuchsablauf weder den Nachweis einer erhöhten Expression noch der Suppression.

3.7.13 11- β HSD1-Immunoblot nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Es erfolgte die Protein-Analyse im Immunoblotverfahren zur Detektion der 11- β HSD1-Überexpression. Hierzu wurde das Protein nach 48 Stunden isoliert. Es handelt sich um eine Native-Kultur mit 11- β HSD1-Überexpression. Es fand keine Stimulation mit Cortison, Cortisol, Cofaktoren oder dem NADPH-Regenerationssystem statt. Das Protein ist im erhöhten Maße in Kolon-Zellmaterial nachweisbar, so bedient man sich dieser Zelllinie als Positivkontrolle (Tomlinson et al. 2004). Als Positivkontrolle diente die Kolon Ca Zelllinie 205. Kontrolle 2 sind mesenchymale Vorläuferzellen von einer nicht transfizierten Kontroll-Kultur.

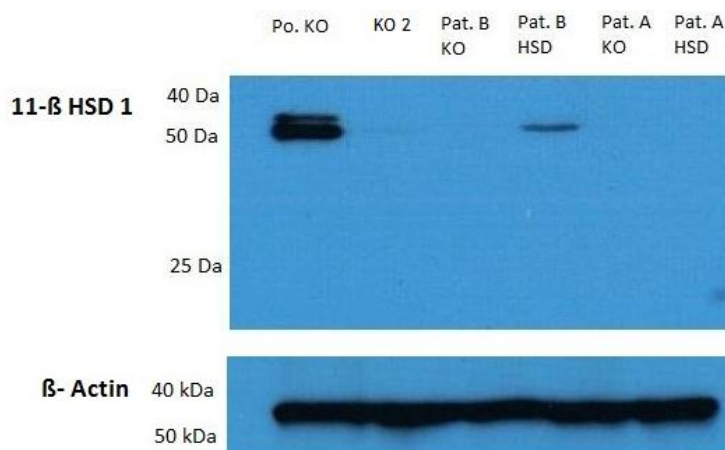


Abbildung 42. 11- β HSD1-Überexpression in mesenchymalen Vorläuferzellen nach Transfektion mit 11- β HSD1-Plasmid nach 48 h, ohne Stimulation. Immunoblot-Analyse der Expression nach Transfektion von von mesenchymalen Vorläuferzellen mit dem 11- β HSD1-Antikörper. Es stellte sich ein erhöhter Nachweis von 11- β HSD1-Protein in den Zellen dar, die mit dem Plasmid transfiziert worden sind. Po. KO entspricht einer reinen Positivkontrolle von 11- β HSD1, KO2 ist eine Kontrolle von nicht transfizierten mesenchymalen Vorläuferzellen. Die Zellen wurden nach 48 Stunden analysiert und nicht stimuliert. Entwicklungszeit 60 min.

Die statistische Analyse des Immunoblots erfolgte mittels Densitometrie. Diese zeigte für den Antikörper von 11- β HSD1 eine nicht visuell sichtbare mittlere Protein Erhöhung auf das 2,46-Fache für Kultur A im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Für Kultur B stellte sich eine sichtbare mittlere Steigerung auf das 24,5-Fache im Vergleich zum Kontroll-Plasmid dar.

3.7.14 11-β HSD2-Immunoblot nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion ohne Stimulation nach 48 h

Die Densitometrie-Analyse mit dem 11-β HSD2-Antikörper zeigte eine mittlere Steigerung für Patienten Kultur A auf das 10,3-Fache im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Bei Patienten Kultur B ergab sich eine mittlere Steigerung der Proteinmenge auf das 36,9-Fache für das 11-β HSD2-Protein.

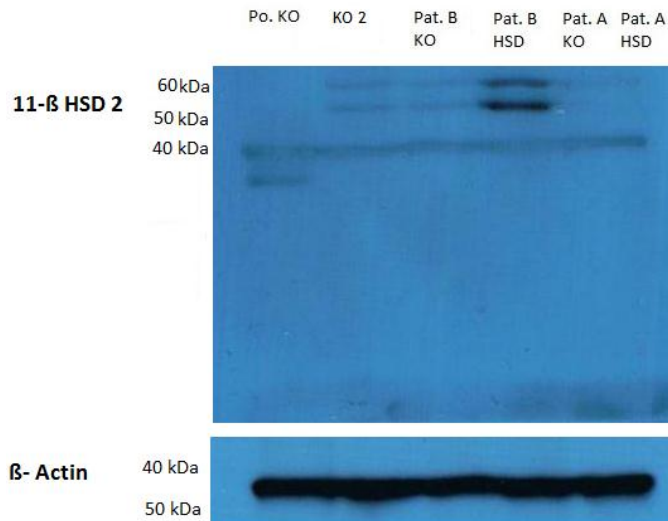


Abbildung 43. 11-β HSD1-Überexpression in mesenchymalen Vorläuferzellen nach Transfektion mit 11-β HSD1-Plasmid nach 48 h, ohne Stimulation. Immunoblot-Analyse der Expression nach Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen mit dem 11-β HSD2-Antikörper. Es stellte sich ein erhöhter Nachweis von 11-β HSD2-Protein für die Zellen dar, die mit dem 11-β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind. Po. KO entspricht einer reinen Positivkontrolle von 11-β HSD1, KO2 ist eine Kontrolle einer nicht transfizierten von mesenchymalen Vorläuferzellen. Die Zellen wurden nach 48 Stunden analysiert und nicht stimuliert. 40 Minuten Entwicklungszeit.

3.8 Cortison- und Cortisol-Direkt-Bestimmung im Medium nach 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion nach 48 h mit variabler Stimulation für 6 Stunden (Stunde 42 bis 48)

Nach erfolgreicher 11-β HSD1-Überexpression auf genetischer Ebene sollte nun auch eine kinetische Bestimmung von Substraten und Produkten durchgeführt werden. Es ist bekannt, dass 11-β HSD1 eine Reduktion und Oxidation katalysieren kann, 11-β HSD2 hingegen nur die Oxidation (s. Abbildung 44, S.74, s.u.). Die Fragestellung lautete, ob auch eine erhöhte Reduktion der Steroide durch die Überexpression des 11-β HSD1 im Medium messbar ist. Es wurde die Stimulation mit Cofaktoren, die die jeweiligen Richtungen positiv unterstützen sollten, durchgeführt. Zusätzlich wurde das jeweilige Substrat (Cortison oder Cortisol) im Überschuss separat hinzugefügt. Weiterhin erfolgte die Cortisol und Cortison-Direktbestimmung, mittels der analytisch exakten LCM-Massenspektrometrie in variablen Stimulationsmedien für Kultur A und B durch die Abteilung Klinische Chemie der Universität Göttingen. Der Versuch wurde orientierend mit zwei Wells pro Messreihe durchgeführt, somit ergibt sich keine gültige statistische Auswertung der Messergebnisse. Die angewandten Stimulationsmedien sind detailliert in Tabelle 34 (S. 74, s.u.) dargestellt. Auf eine Analyse in der Zellsuspension wurde verzichtet, da in Voruntersuchungen die Werte im Medium-Überstand höhere und genauere Messwerte

als in der Zellsuspension ergaben. Weiterhin erfolgte die Etablierung eines sog. Cofaktoren generierenden NADPH-Regenerationssystems mit Glucose-6-Phosphat und NADPH. Das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase generiert unter Verwendung von Glucose-6-Phosphat NADPH. Weiterhin wurde das proreduktive NADPH zusätzlich hinzugegeben. Diese Stimulation sollte eine unterstützende reduktive Enzym-Kinetik für 11- β HSD1 darstellen. Im Vergleich dazu erfolgte die Zugabe von NAD im Sinne einer prooxidativen 11- β HSD2 unterstützenden Kinetik. Weiterhin erfolgte die Zugabe allein mit den Substraten Cortison und Cortisol, ohne diese Cofaktoren.

Medien Ansätze	NADPH, Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Cortison, Plasmid oder Kontroll-Plasmid	NADPH, Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Cortisol, Plasmid oder Kontroll-Plasmid	NAD, Cortison, Plasmid oder Kontroll-Plasmid	NAD, Cortisol, Plasmid oder Kontroll-Plasmid	Cortison, Plasmid oder Kontroll-Plasmid	Cortisol, Plasmid oder Kontroll-Plasmid
Cofaktoren proreduktiv	X	X				
Cofaktoren prooxidativ			X	X		
Inkubation mit Cortisol		X		X		X
Inkubation mit Cortison	X		X		X	

Tabelle 34. Übersicht der Stimulationsmedien.

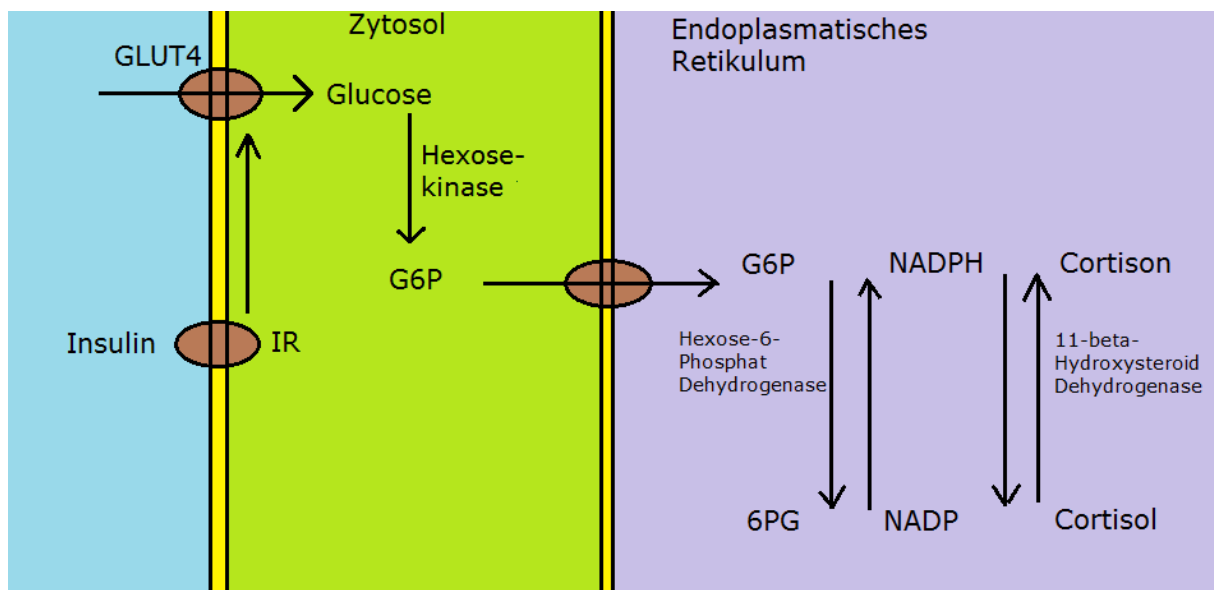


Abbildung 44. Grafische Darstellung des NADP und NADPH-Regenerationssystems. Insulin induziert über den Glucose-Transporter-4 die Eingabe von Glucose in die Muskelzelle oder die Fettzelle. Im endoplasmatischen Retikulum ist der Glucose-6-Phosphat-Transporter, der Glucose-6-Phosphat in das endoplasmatische Retikulum

transportiert. Dort findet eine Redox-Reaktion, katalysiert durch NADPH statt. 11- β HSD1 konvertiert, mittels NADPH, Cortison in Cortisol. 11- β HSD2 hingegen ist spezifisch NAD-abhängig. Modifiziert nach Banhegyi et. al. und Czegle et. al. - (Banhegyi et al. 2009; Czegle et al. 2012).

Cortison-Stimulation unter 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion mit variabler Stimulation für 6 Stunden (Stunde 42 bis 48)

Es erfolgte die Zugabe von Cortison im Überschuss in das Medium. Hierbei wurden Messwerte für Cortison im Mittel von 576 $\mu\text{g/l}$ (Standardabweichung von 10,2 $\mu\text{g/l}$) gefunden. Die Messungen ergaben für Kultur A keinen Nachweis des Produkts Cortisol für Zellen die mit dem 11- β HSD1-Plasmid und dem proreduktiven NADPH-Regenerationssystem behandelt wurden (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zum Kontroll-Plasmid zeigte sich kein Anhalt für einen Nachweis im Rahmen der Messwertgrenze. Auch für die Zellen die mit prooxidativen NAD-Cofaktoren inkubiert worden sind, findet sich in Kultur A kein Nachweis für das Produkt Cortisol innerhalb der Messwertgrenzen. Bei Inkubation der Zellen, denen allein Cortison zugegeben worden ist und keine Cofaktoren-Zugabe erfolgte, zeigte sich eine Steigerung der Umwandlung in Cortisol auf das 1,1-Fache für 11- β HSD1-Plasmid transfizierte Zellen. Kultur B (Daten nicht gezeigt) ergab wiederum eine 1,54-fache Erhöhung des Produkts Cortisol (HSD + Cn im Vergleich zu KO + Cn). Bei Kultur B stellte sich für das NADPH-Regenerationssystem eine mittlere Erhöhung der Umwandlung in das Produkt Cortisol auf das 4,83-Fache ($n=2$) dar (HSD + Reg + Cn im Vergleich zu KO + Reg + Cn). Dies galt für die Zellen die mit dem 11- β HSD1-Plasmid im Vergleich zur Kontrolle transfiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Für die Zellen von Kultur B, die mit den NAD-Cofaktoren einer prooxidativen Konversion mit inkubiert wurden, ergab die Auswertung eine 1,5-fache ($n=2$) Erhöhung der Konzentrationen. Für Kultur B mit alleiniger „Cortison Zugabe“ (ohne Cofaktoren), stellte sich ein 1,54-fach erhöhter Nachweis des Produkts Cortisol für Zellen mit dem 11- β HSD1-Plasmid dar (HSD + Cn im Vergleich zu KO + Cn).

Bei Betrachtung der Mittelwerte von beiden Kulturen (s. Abbildung 45) mit einem proreduktiven NADPH-Regenerationssystem ergab die Statistik eine Steigerung auf das 2,7-Fache (p -value 0,41; $n=2$ bis 4) für den Nachweis von Cortisol gegen die Kontrolle (HSD + Reg + Cn im Vergleich zu KO + Reg + Cn). Hingegen eine Steigerung auf das 1,34-Fache (p -value 0,23; $n=4$) für das Produkt Cortisol, ohne Zugabe von Cofaktoren (HSD + Cn im Vergleich zu KO + Cn). Bei prooxidativen Cofaktoren mit NAD ergab die Statistik eine Steigerung auf das 1,5-Fache (p -value 0,067; $n=2$) für die mit dem Plasmid transfizierten Zellen (HSD + NAD + Cn im Vergleich zu KO + NAD + Cn). Vergleicht man nun die Zellen mit 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion und mit, bzw. ohne NADPH-Regenerationssystem, so zeigte die Auswertung einen 1,84-fach (p -value 0,36; $n=4$) höheren Nachweis von Cortisol für die Zellen die mit Regenerationssystem stimuliert worden sind (HSD + Reg + Cn im Vergleich zu HSD + Cn). Weiterhin scheint die alleinige NAD-Zugabe keine erhöhte Expression (1,07-fach höhere Umwandlung, p -value 0,74; $n=2$ bis 4) zu induzieren (HSD + Cn im Vergleich zu HSD + NAD + Cn).

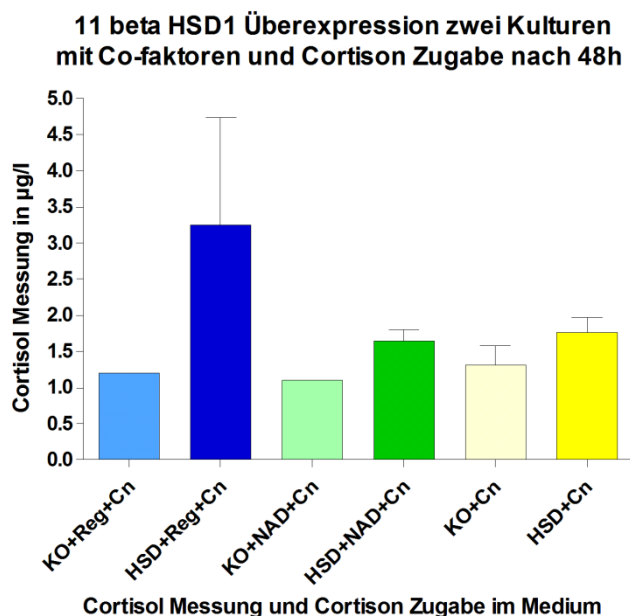


Abbildung 45. Grafische Darstellung der Cortisolmesswerte als Mittelwerte beider Kulturen, ohne Darstellung des Überschusses von Cortison in DMEM-Medium in µg/l von mesenchymalen Vorläuferzellen nach 48 h, bzw. 6 h nach Stimulation. Darstellung der Zugabe mit proreduktiven Cofaktoren (blau), prooxidativen Cofaktoren (grün) und ohne Cofaktoren (gelb), allein mit dem Substrat Cortison im Überschuss und dem Produkt Cortisol. Blasse Farbe steht für Kontroll-Plasmid und kräftige Farbe für das 11-β HSD1-Plasmid. Vergleiche hierzu die Übersichtstabelle 34, S. 74. Erhöhter Nachweis des Produkts Cortisol bei Zugabe von Substrat Cortison und gleichzeitig NADPH-Regenerationssystem. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler in linearen Einheiten. Statistische Analyse mittels t-Test.

Cortisol-Stimulation unter 11-β HSD1-Plasmid-Transfektion mit variabler Stimulation für 6 Stunden (Stunde 42 bis 48)

Es erfolgte die Zugabe von Cortisol im Überschuss in das Medium. Hierbei wurden Messwerte für Cortisol im Mittel von 1604 µg/l (Standardabweichung von 134,4 µg/l) gefunden. Für Kultur A (Daten nicht gezeigt) ergaben die Mittelwerte bei Cortisol-Stimulation im Falle einer Zugabe des gegengerichteten reduktiven NADPH-Regenerationssystems eine Steigerung auf das 1,47-Fache (n=2) der Oxidation von Cortisol in inaktives Cortison (HSD + Reg + Cl im Vergleich zu KO + Reg + Cl). Bei Unterstützung der Konversion in Form einer prooxidativen NAD-Cofaktoren-Zugabe in Richtung Oxidation, stellte sich eine Steigerung auf das 1,69-Fache der Umwandlung von Cortisol in Cortison dar (HSD + NAD + Cl im Vergleich zu Ko + NAD + Cl). Bei der alleinigen Zugabe von Cortisol, ohne Cofaktoren, zeigte sich ein 1,87-facher (n=2) Anstieg der Messwerte im Vergleich zur Kontrolle für die Konversion in Cortison in der 11-β HSD1-Zellkultur (HSD + Cl im Vergleich zu KO + Cl). Für Kultur B (Daten nicht gezeigt) demonstrierte die Auswertung im proreduktiven NADPH-Regenerationssystem und gleichzeitiger gegengerichteter Cortisol-Stimulation eine 1,47-fach (n=2) erhöhte Konversion in das Produkt Cortison. Bei Inkubation mit NAD, als Cofaktoren der prooxidativen Konversion gegen die Kontrolle, stellte sich eine Erhöhung auf das 2,71-Fache (n=2) für Cortisol dar (HSD + NAD + Cl im Vergleich zu KO + NAD + Cl). Bei der Stimulation mit Cortisol, ohne zusätzliche Cofaktoren ergab sich ein erhöhter Nachweis der oxidativen Umwandlung auf das 1,21-

Fache (n=2), für die Zellen, die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert wurden (HSD + Cl im Vergleich zu KO + Cl).

Zusammenfassend für die Mittelwerte beider Kulturen zeigte sich für das NADPH-Regenerationssystem eine 1,47-fach (*p-value* 0,51; n=4) erhöhte Expression für die Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert worden sind, im Vergleich zur Kontrolle (s. Abbildung 46, HSD + Reg + Cl im Vergleich zu KO + Reg + Cl). Weiterhin ergab sich für die prooxidative NAD-Zugabe ein 2,41-fach (*p-value* 0,154; n=4) erhöhter Nachweis für das Produkt Cortison gegen die Kontrolle (HSD + NAD + Cl im Vergleich zu KO + NAD + Cl). Ohne Zugabe von Cofaktoren, allein mit dem Substrat Cortisol, ergab sich 1,3-fach (*p-value* 0,63; n=4) erhöhte Messwerte für Cortison gegen die Kontrolle (HSD + Cl im Vergleich zu KO + Cl). Vergleicht man die Steigerung von reduktivem NADPH-Regenerationssystem gegen oxidative Cofaktoren (ohne Kontrolle), somit ergab sich eine nicht signifikante Steigerung auf das 1,34-Fache (*p-value* 0,58; n=4) für das proreduktive Regenerationssystem mit Plasmid im Vergleich für die Zellen, die mit prooxidativen Cofaktoren substituiert worden sind (HSD + Reg + Cl im Vergleich zu HSD + NAD + Cl). Vergleicht man die Umwandlung in Cortison in Zellen, die mit Plasmid und Regenerationssystem, bzw. ohne Regenerationssystem inkubiert worden sind, so zeigte sich eine 2,1fach höhere Expression (*p-value* 0,22; n=4) der Cortison-Konzentration für die Zellen die mit Regenerationssystem (HSD + Reg + Cl gegen HSD + Cl). Mit Unterstützung einer prooxidativen NAD-Zugabe, ergab sich eine 1,57-fach höhere Umwandlung (*p-value* 0,40; n=4) in Cortison, als ohne (HSD + NAD + Cl im Vergleich zu HSD + Cl).

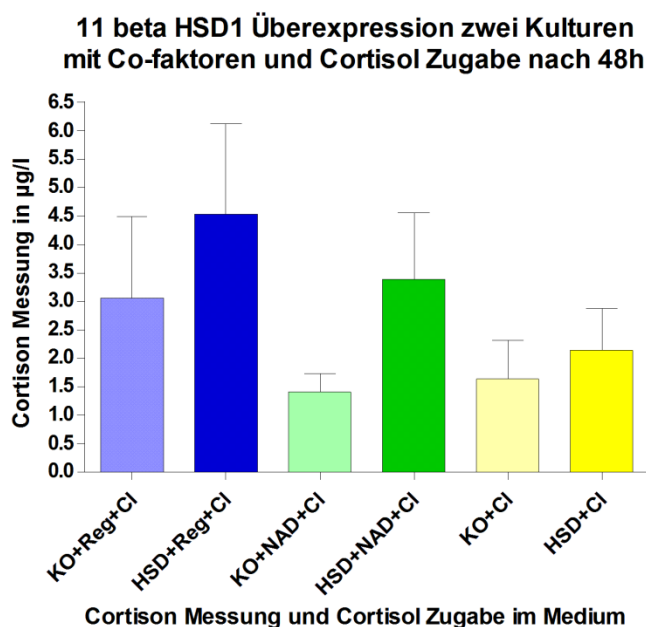


Abbildung 46. Grafische Darstellung der Cortison-Messwerte als Mittelwerte beider Kulturen, ohne Darstellung des Überschusses von Cortisol in DMEM-Medium $\mu\text{g/l}$ von mesenchymalen Vorläuferzellen nach 6 h Stimulation und 48 h nach Transfektion. Darstellung der Zugabe mit proreduktiven Cofaktoren (blau), prooxidativen Cofaktoren (grün) und ohne Cofaktoren (gelb) allein mit dem Substrat Cortisol im Überschuss und dem Produkt Cortison. Blasse Farbe steht für Kontroll-Plasmid und kräftige Farbe für das 11- β HSD1-Plasmid. Vergleiche hierzu die Übersichts-Tabelle 34, S. 42. Statistische Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler in linearen Einheiten. Statistische Analyse mittels t-Test.

3.8.1 Fazit der Stimulation 48 h nach 11- β HSD1-Plasmid-Transfektion mit variabler Stimulation für 6 Stunden (Stunde 42 bis 48)

Zusammenfassend kann man bei der 11- β HSD1-Überexpression in unserem Versuchsmodell von einer verstärkten reduktiven und oxidativen Konversion ausgehen. Die Richtung der erhöhten Konversion wird determiniert durch die jeweilige Substrat-Zugabe. Eine endgültige Antwort, ob diese Oxidation allein auf die Aktivität von 11- β HSD1 zurückzuführen ist, oder durch eine erhöhte Expression von 11- β HSD2 verursacht ist, lässt sich in diesem Versuchsaufbau nicht abschließend beantworten. Hierzu müsste mit Hemmstoffen für 11- β HSD1 oder 11- β HSD2 gearbeitet werden. Allerdings scheint die reduktive Konversion bei 11- β HSD1-Transfektion und proreduktiver Cofaktoren Zugabe maximal im Sinne einer erfolgreich gesteigerten Enzymkinetik zu sein. Das in diesem Aufbau etablierte Versuchsverfahren eines NADPH-Regenerationsmodells zeigte einen deutlichen Anhalt stärkerer Reduktion durch 11- β HSD1, als ohne ein entsprechendes Modell, und ist somit geeignet, die Enzymkinetik des Schlüsselenzyms zu maximieren. Weiterhin ergab die Analyse einer Stimulation mit einem proreduktiven NADPH-Regenerationssystem Hinweise auf eine erhöhte Umwandlung, auf das 2,7-Fache in den 11- β HSD1-Plasmid transfizierten Kulturen, als im Vergleich zur Kontrolle. Die Messung des Cortisons zeigte eine erhöhte Umwandlung, auf das 2,41-Fache für die Kulturen, die mit einem prooxidativen Cofaktor (Cortisol plus NAD) inkubiert worden sind, als im Vergleich zur Kontrolle. Es stellte sich somit ebenfalls eine verstärkte Oxidation, die sich allein durch die spontane Umwandlung von Cortisol in Cortison im Vergleich zur Kontrolle nicht erklären lässt, dar. Übereinstimmend zu diesem Messzeitpunkt gelang auch der Nachweis einer erhöhten 11- β HSD2-Protein und mRNA-Expression.

4. Diskussion

Die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Fett- und Knochengewebe ist ein Gegenstand intensiver Forschung. Eng mit diesem Konzept der adipogenen und osteogenen Differenzierung scheint die Pathophysiologie der Osteoporose des älteren Patienten vergesellschaftet zu sein, da das Fettgewebe im Knochen mit dem Alter und osteoporotischen Prozessen zunimmt (Justesen et al. 2004; Siggelkow et al. 2004). Das Schlüsselenzym des endogenen Cortison- und Cortisol-Stoffwechsels 11- β HSD1 scheint maßgeblich für die Entwicklung des Konzepts eines Induktors der adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen beteiligt - die Aktivität nimmt mit dem Alter zu (Cooper et al. 2002). Dies würde eine erhöhte Cortisolsynthese im Alter bedeuten. Die erhöhte Cortisolsynthese könnte zu einer erhöhten Bildung von Fettzellen im Knochen führen, da Glucocorticoide zumindest *in vitro* die Adipogenese induzieren. Dies entspricht dem Konzept der Pathogenese einer altersinduzierten Osteoporose (Braun P et al. 2009; Pierotti et al. 2007). Die Aufgabe dieser wissenschaftlichen Arbeit war zunächst die Überexpression des Enzyms 11- β HSD1 im Zellmodell der humanen mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft in einem längeren Versuchszeitraum. Erste Versuche diesbezüglich wurden bereits im Labor der Arbeitsgruppe etabliert. Weiterhin war es Ziel dieser Arbeit eine genaue Analyse des Einflusses auf die Differenzierung der Zellen unter besonderer Berücksichtigung der osteogenen und adipogenen Differenzierung, sowie die Messung der Funktionalität des Enzyms auf Substrat- und Produkt-Ebene zu messen. Dafür erfolgten der mRNA-Nachweis von proadipogenen Markern und der Protein-Nachweis von 11- β HSD1 und 2. Zur genauen Analyse der Funktion des Enzyms fand die Bestimmung der Umwandlung von Substrat (Cortison) und Produkt (Cortisol) (s. Abbildung 47, S. 80) im Medium, sowie in Zellysatt statt. Abschließend erfolgten die Erprobung einer Cofaktoren-Stimulation und deren Einfluss auf die Produktsynthese. Hierbei war die Fragestellung von Interesse, ob eine oxidative oder eine reduktive 11- β HSD1-Funktion vorherrschend ist, bzw. ob eine oxidative 11- β HSD2-Funktion vorliegt.

Es zeigte sich eine erfolgreiche Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft verschiedener Patienten. Die vorliegenden Experimente demonstrieren eine erfolgreiche Methodik der Transfektion von mesenchymalen Vorläuferzellen, mittels der Lipofectamin-Methode. Im Verlauf der Transfektion zeigte sich der Großteil der Zellen in der Kultur mit einer erfolgreichen Einbringung von genetischem Material in den Zellverband, beispielhaft visualisiert mittels GFP-Plasmid. In einer zuvor durchgeführten Arbeit der Arbeitsgruppe war die Lipofectamin-Methode bereits als geeignet beschrieben worden, 11- β HSD1 in HOS-58-Zellkulturen und mesenchymalen Vorläuferzellen in einem 24-Stunden-Messzeitraum erfolgreich zu exprimieren (Braun P et al. 2009). Die Daten konnten in den Ergebnissen dieser Arbeit wiederholt werden. In den vorgestellten Daten dieser Arbeit fand eine stabile Überexpression von 11- β HSD1 auf mRNA-Ebene in mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft für eine Dauer von 48 h bis zu 28 Tagen statt.

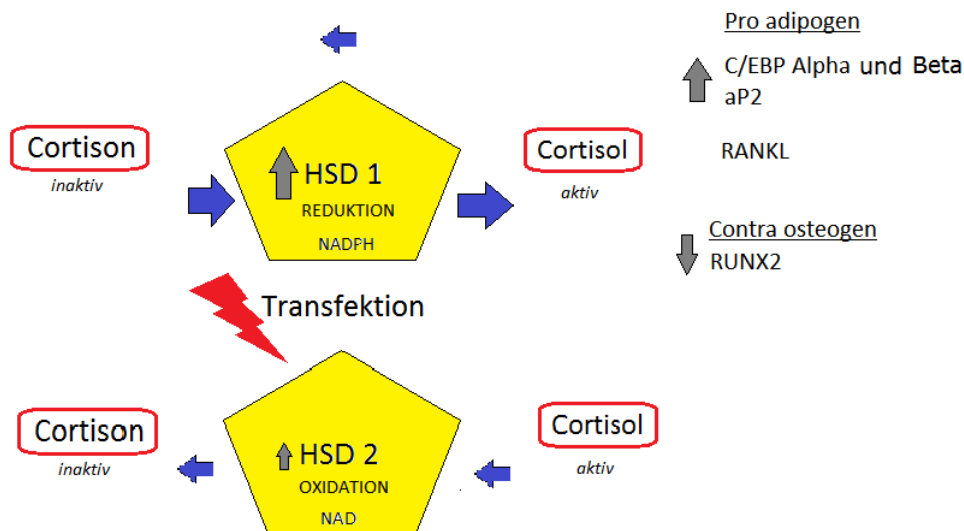


Abbildung 47. Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse.

Eine erhöhte Syntheserate des Enzyms 11- β HSD1 in mesenchymalen Vorläuferzellen ist *in vitro* induzierbar. Eine genetische Überexpression des Enzyms 11- β HSD1 mittels Plasmid zeigte sich in den gegebenen Messzeitpunkten von 24 h bis zu über 7 Tagen auf mRNA-Ebene auf allen Signifikanz-Niveaus als signifikant, oder wenigstens als Tendenz nach 14 und 28 Tagen - je nach Versuchsaufbau. Diese Induktionsrate stellte sich abhängig von den verschiedenen durchgeführten Experimenten ohne Stimulationsmedien dar. Weiterhin zeigte sich diese mRNA-Expression als unabhängig von der bei der Transfektion aufgetretenen Zelllyse. Übereinstimmende Beobachtungen ergaben sich ebenfalls in bisherigen Veröffentlichungen für das humane und das tierische Zellsystem (Bujalska IJ et al. 2005). Bei diesen Autoren konnte eine 11- β HSD1-Überexpression auf der mRNA-Ebene über den gegebenen Zeitraum vom ersten Tag, bis zu 14 Tagen in der Zellkultur von humanen Präadipozyten induziert werden. Eine Transfektion von 11- β HSD1 erfolgte hierbei nicht, jedoch schien in diesen Daten die oxidative Funktion von 11- β HSD1 im zeitlichen Verlauf abzunehmen und die reduktive Funktion zuzunehmen. Begleitend sah man eine Zunahme der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase-mRNA (H6PD). In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Beschreibung der Überexpression von 11- β HSD1 in mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft verschiedener Patienten. Bisherige Veröffentlichungen bezogen teilweise auch die Aufstellung einer Enzymkaskade ein, die eine Bereitstellung von Cofaktoren des Enzyms ermöglichte (Bujalska IJ et al. 2005; Quinkler 1997). Dieses Modell wurde in den Experimenten dieser Arbeit in das Zellmodell von transfizierten mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft etabliert.

Die Expression von 11- β HSD1 konnte ebenfalls mittels Immunoblot mit erhöhter Detektion des Proteins 11- β HSD1 aufweisen. Beeinträchtigend zeigte sich die erhöhte Zytotoxizität mit Auftreten von Zelllyse, welche in Abhängigkeit von den verschiedenen Experimenten zu einer verminderten Proteindetektion führte. Daher konnte in dem orientierend durchgeführten Immunoblot über 28 Tage am ersten Messzeitpunkt kein Proteinnachweis erfolgen. Im orientierenden Immunoblot 28-Tage-Versuch

zeigte sich eine erhöhte Protein-Induktion von 11- β HSD1 im Langzeitverlauf bei gleichzeitig abfallender mRNA-Expression. Zu diskutieren für diese negative Korrelation wäre eine verspätete Antwort der Biosynthese und Translation des Proteins, wie dies bereits für eine Reihe von Proteinen beschrieben worden ist (Gry M et al. 2009). Zum 48-h-Stunden-Messzeitpunkt zeigte sich eine Induktion von Protein- und mRNA des 11- β HSD1. Im Gegensatz zum 28-Tage-Versuchsansatz stellte sich in diesem Fall keine erhöhte Zytotoxizität bei stabiler RNA-Konzentration in den Proben dar. Als mögliche Fehlerquelle der erhöhten Zelllyse bei Transfektion wäre ein mit 24 h zu kurz gewählter Zeitraum zur Kultivierung der Zellen im Vorfeld des Experimentes zu diskutieren. Es zeigte sich bereits in der Zellkultur eine deutlich geringere RNA-Konzentration im Vergleich zu den länger kultivierten Zellen. Im Falle des 48-Stunden-Versuches erfolgte die Transfektion nach einer bis zu 7tägigen Anzucht und 80 %iger Konfluenz-Rate vor Transfektion. Folglich konnte eine erfolgreiche Protein-Detektion bereits 48 h nach Transfektion nachgewiesen werden.

Nach erfolgreicher Transfektion auf mRNA-Ebene erfolgte der Nachweis einer erhöhten Funktion des Enzyms. Bei potentiell oxidativer und reduktiver Funktion wurde als Vorversuch im 24-h-Stunden-Stimulationsexperiment ein Nachweis des Cortisons und Cortisols im Zelllysate und im Mediumüberstand gemessen. Dabei zeigte sich eine zellzahlabhängige erhöhte Reduktion von Cortison in Cortisol von Zellen, die mit dem Plasmid transfiziert worden sind. Problematisch scheint hierbei die geringe Anzahl der Einzelmesswerte bei Zweieransätzen pro Versuchsreihe zu sein. Dies war als Screening-Versuch, ohne Verwendung für eine weitere statistische Auswertung angelegt. Weiterhin ist bei Interpretation der Ergebnisse eine spontane temperaturabhängige Umwandlung von Cortisol in Cortison (über 24 h ohne Zellkultur im Medium) zu beachten. Für eine spontane Umwandlung von Cortison in Cortisol fand sich kein Anhalt. Die erhöhte Reduktion von Cortison zu Cortisol lässt sich somit direkt im Zellmodell der Transfektion des 11- β HSD1-Plasmids mittels LCM-Massenspektrometrie nachmessen. Die Cortisol-Konzentration im Medium höher, als im lysierten Zellmaterial. Deshalb wurde im weiteren Verlauf nur noch mit Mediumüberständen gearbeitet. Zur Differenzierung einer erhöhten Konversion in Cortison oder Cortisol durch 11- β HSD1 oder 11- β HSD2, erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Cofaktoren.

Diese Cofaktoren wurden hinzugegeben, um eine gesteigerte Funktion des Enzyms zu ermöglichen. Weiterhin sollte eine Erschöpfung des Enzym-Systems verhindert werden und eine Abgrenzbarkeit zwischen der Wirkung von 11- β HSD1 und 11- β HSD2 ermöglicht werden. Dabei ergaben die Ergebnisse bei Zugabe von Cortison und proreduktiven Cofaktoren nach Transfektion mit dem Plasmid einen erhöhten Nachweis von Cortisol. Es gelang im Vergleich ein geringerer Nachweis des Cortisols bei prooxidativer Cofaktoren-Zugabe, bzw. der Kontrolle. Wir werten dies als eine erfolgreiche messbare Erhöhung der Funktion des Enzyms 11- β HSD1 durch die Transfektion des Plasmids. Einschränkend scheinen hierbei die niedrige Versuchsanzahl, der erniedrigte Nachweis von Produkt und Substrat in einer Kultur bei 11- β HSD1-Transfektion, sowie eine höhere Standardabweichung der Messergebnisse zu sein.

Auf der anderen Seite ergab sich bei Cortisol-Zugabe ein Anstieg des Produkts Cortison bei proreduktiver Unterstützung. Zu diskutieren ist hierfür eine vorbeschriebene temperaturabhängige, oder eine spontane Umwandlung. Andere Autoren konnten bereits eine Substrat-Spezifität von NAD für 11- β HSD2 beschreiben (Quinkler 1997; Yamaguchi et al. 2012). Weiterhin konnten andere Autoren eine gesteigerte Reduktion durch 11- β HSD1 bei Generierung eines proreduktiven Systems unter erhöhten NADPH- und Cortisol-Stimulationsbedingungen in Leberzellen von Ratten aufzeigen (Wang et al. 2011). Dies ergab eine gesteigerte Synthese von NADPH bei Modulation der H6PD-abhängigen Faktoren (Cortisol mit NADPH und Glucose-6-Phosphat). NADPH und Glucose-6-Phosphat alleine scheinen dabei keine gesteigerte NADPH-Konversion zu generieren. Übereinstimmend dazu sprechen die Daten dieser Arbeit für eine erfolgreich gesteigerte reduktive Funktionalität von 11- β HSD1 mit Hilfe der Cofaktoren NADPH, Glucose-6-Phosphat und Cortison in unserem Modell des Regenerationsystems für NADPH in mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft. Zu diskutieren ist jedoch eine mögliche eingeschränkte Zugänglichkeit der Cofaktoren zum endoplasmatischen Retikulum der Zellen. Bei alleiniger externer Zugabe ist unklar inwieweit die Cofaktoren die Enzyme erreichen. Möglicherweise ist eine Unterstützung des 11- β HSD1 im frühen Signalweg, wie zum Beispiel die Substitution von Glucose und Insulin, ebenfalls sinnvoll.

Im Verlauf der genetischen Überexpression des Enzyms 11- β HSD1 zeigte sich auch das Isoenzym 11- β HSD2 auf einer frühen mRNA- und Protein-Ebene in Tendenz vermehrt exprimiert. Dieser Anstieg der Expression stellte sich auf mRNA-Ebene im kurzzeitigen Versuchsaufbau bis 48 h und in der Proteinanalyse im 48-h-Stunden-Messzeitpunkt dar. In Langzeitbetrachtung hingegen ergab sich eine signifikante Suppression der mRNA-Expression nach 28 Tagen. Weiterhin zeigte sich hinsichtlich der Funktionalität des 11- β HSD2 bei prooxidativer Cofaktoren-Zugabe, auch eine höhere Umwandlung in Cortison, als ohne Cofaktoren-Zugabe. Die Ergebnisse geben Hinweise auf eine frühe erhöhte Expression des Enzyms 11- β HSD2 auf mRNA- und Protein-Ebene. Eine spontane Umwandlung von Cortison in Cortisol ist hierbei jedoch zu diskutieren. Für das Isoenzym 11- β HSD2 konnte bei 11- β HSD2-Überexpression in mesenchymalen Vorläuferzellen, isoliert aus einem Maus-Modell, die Überexpression von Tag 1 bis Tag 7 erfolgen. Dabei konnte ebenfalls ein vermehrter Nachweis proadipogener Proteine von PPAR γ und C/EBP- α aufgezeigt werden. RUNX2 war hierbei signifikant supprimiert (Zhou et al. 2008). Problematisch erscheint der Vergleich, da die Autoren als Methodik ein *in vitro*-Mauszellensystem wählten.

Wir sahen in den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit eine erhöhte oxidative Funktion bei 11- β HSD1-Überexpression, unter prooxidativen Cofaktoren. Zu diskutieren ist eine mögliche reaktive Induktion von 11- β HSD2, als Kompensation durch die 11- β HSD1-Induktion, wie dies eventuell durch die vermehrte Cortisol-Menge in den Zellen erzeugt wird. Dafür spricht eine Assoziation des Glucocorticoid-Rezeptors mit 11- β HSD2, der eine mögliche Schutzfunktion durch 11- β HSD2 innehat (Cole TJ 1995; Kalak R et al. 2009). Darüber hinaus konnte bereits eine verminderte Aktivität des Promotors MMTV-CAT, der für die Aktivierung von synthetisierten und endogenen Glucocorticoiden

verantwortlich ist, in einem *in vitro*-Modell von mesenchymalen Vorläuferzellen bei 11- β HSD2-Überexpression beschrieben werden (Woitge et al. 2001). Dies deutet auf eine Art Schutzfunktion der Zelle durch Oxidation, mittels 11- β HSD2 hin. Die Inaktivierung von Glucocorticoiden durch 11- β HSD2 führt zu verschiedenen Effekten auf die Knochenentwicklung. Erstens zeigte sich im frühen Stadium der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen eine verminderte Kollagen-Synthese und eine verminderte Osteoblasten-Differenzierung (Pierotti et al. 2007; Sher et al. 2004). Entsprechend ist in den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit eine erhöhte 11- β HSD2 Induktion, mit verminderter Osteoblastogenese, auch möglich. Im späteren Stadium der Entwicklung von mesenchymalen Vorläuferzellen zeigte sich bei Inaktivierung der Glucocorticoide durch 11- β HSD2-Induktion zwar eine normale Knochenmineralisation, jedoch ein Schutz der gereiften Osteoblasten und Osteozyten (O'Brien et al. 2004). Übereinstimmend ergaben die Daten der hier vorliegenden Arbeit einen frühen Nachweis von 11- β HSD2 auf Protein-Ebene und eine Verminderung im späteren Stadium der Differenzierung auf mRNA-Ebene nach 28 Tagen. Zu diskutieren ist eine erhöhte initiale Expression zur Inaktivierung des Cortisols. Durch die Inaktivierung kann 11- β HSD2 im Verlauf der Differenzierung wieder abfallen. Jedoch liegt für den 28-Tage-Messzeitpunkt kein Protein-Nachweis für das 11- β HSD2-Protein vor, sodass die Ergebnisse nur für mRNA-Ebene gültig sind. Bisherige Veröffentlichungen ergaben auch eine differenzierungsabhängige Expression und Aktivität von 11- β HSD1. Eine 11- β HSD1-Reduktase-Aktivität zeigte im Verlauf der Differenzierung von osteoblastären Vorläuferzellen einen Anstieg der Aktivität hin zur terminalen Differenzierung. Hingegen imponierte die oxidative 11- β HSD1-Dehydrogenase-Aktivität in osteoblastären Vorläuferzellen gleichbleibend vermindert im Verlauf hin zur terminalen Differenzierung (Bujalska 2002; Pierotti et al. 2007). Folglich könnte 11- β HSD2 eine entsprechende Gegenregulation innehaben und eine Erschöpfung im Verlauf eingetreten sein.

Weiterhin ist die erhöhte Expression von 11- β HSD2 eng an den Wnt-Signaltransduktionsweg gebunden. Es konnte in diesem Zusammenhang die erhöhte adipogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen, isoliert aus dem Schädelknochen in einem Maus-Modell, bei 11- β HSD2-Überexpression, beschrieben werden (Zhou H et al. 2009). Im Falle der 11- β HSD2-Überexpression im Maus-Modell, zeigte sich die mRNA-Expression von 11- β HSD1, als nicht relevant erhöht. Weiterhin konnten Veröffentlichungen bei erhöhter 11- β HSD2-Expression in Osteoblasten eines Maus-Modells eine verminderte Knochenmineralisation aufzeigen (Sher et al. 2004). Im Vergleich dazu beschreiben andere Autoren (Bujalska IJ et al. 2005) bereits bei 11- β HSD1-Überexpression in Mauszellsystem und humanen Präadipozyten eine 11- β HSD2-abhängig induzierte oxidative Dehydrogenase-Reaktion, die keinen Hinweis auf eine 11- β HSD1-abhängige Dehydrogenase-Reaktion zeigte. Somit eine erhöhte Umwandlung von Cortisol in Cortison durch 11- β HSD2, weniger durch 11- β HSD1. Wir nehmen in unseren Experimenten des humanen Systems eine reaktive Induktion des Enzyms 11- β HSD2 im Sinne des physiologischen Glucocorticoid Stoffwechsels an. Unterstützend für diese Annahme ergaben die Ergebnisse dieser Arbeit, die Erhöhung des Produktes Cortison im Medium bei Inkubation mit den Cofaktoren einer unterstützenden oxidativen 11- β HSD2-Funktion bei 11- β HSD1-

Überexpressionsbedingungen. Ob diese Reaktion allein durch eine oxidative Konversion durch 11- β HSD1 (Cooper et al. 2002), oder durch 11- β HSD2 allein generiert wird, ist letztendlich nicht zu beurteilen. Es müsste hinsichtlich dieser Fragestellung mit Hemmstoffen von 11- β HSD1 und 11- β HSD2 gearbeitet werden. Klinische Studien zeigten eine positive Korrelation eines erhöhten physiologischen 11- β HSD1-Nachweis, sowie proadipogener Faktoren im peripheren Fettgewebe des Menschen, und in Leber-Zellen des Menschen bei Adipositas-bedingter 11- β HSD1-Induktion. Diese Studien demonstrierten gleichzeitig eine erhöhte insulinabhängige Schutzfunktion, durch eine erhöhte oxidative Aktivität von 11- β HSD1 in Leberzellen, um Cortisol in inaktive Metabolite des Steroidstoffwechsels umzuwandeln (Baudrand R et al. 2011). In Leberzellen scheint eine oxidative Schutzfunktion vorherrschend zu sein, in unserem Zellsystem osteogener Herkunft scheint die reduktive Funktion im Vordergrund zu stehen. Die basale oxidative 11- β HSD1-Aktivität in osteoblastären mesenchymalen Vorläuferzellen ist als sehr gering vorbeschrieben worden (Pierotti et al. 2007). In Zusammenschau unterstreichen diese Daten die essenzielle Wechselwirkung von 11- β HSD1 und 11- β HSD2 für die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen, unter dem Einfluss von Glucocorticoiden. Weiterhin demonstrieren die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit die Induktion in Richtung adipogener Differenzierung, wie die mRNA-Expression von α P2 und C/EBP- α , bei 11- β HSD1-Überexpression in humanen mesenchymalen Vorläuferzellen. Das hier vorgestellte Modell der 11- β HSD1-Induktion scheint für die wissenschaftliche Arbeit mit mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft *in vitro* geeignet zu sein.

Die Überexpression von 11- β HSD1 führte zu einer späteren 11- β HSD2-mRNA-Suppression. Dabei zeigte sich am 28-Tage-Messzeitpunkt eine signifikante Abnahme der mRNA von 11- β HSD2. Übereinstimmend dazu folgte eine signifikante Abnahme des osteogenen Markers RUNX2 nach 28 Tagen auf mRNA-Ebene, im Sinne einer verminderten osteogenen Differenzierung. Es zeigte sich am 7-Tage-Messzeitpunkt eine allgemein hohe relative mRNA-Expression von RUNX2, unabhängig der Expression, im Vergleich zum Kontroll-Plasmid. Es ist bekannt, dass RUNX2 einen Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferzellen besitzt. So konnte durch die weiterführende posttranslationale Modifikation von Proteinen durch RUNX2 eine erhöhte Differenzierung von Osteoblasten aufgezeigt werden (Franceschi und Xiao 2003). Weiterhin konnte bereits in einem Maus-Modell von mesenchymalen Vorläuferzellen bei *Bone Sialo Protein Knock-out*-Mäusen (wesentlich für die osteogene Differenzierung) eine verminderte osteogene Differenzierung demonstriert werden. Dabei stellte sich auch in der frühen Phase der Differenzierung kein Unterschied in der Expression von RUNX2, jedoch ein erhöhter Nachweis von RANKL, dar. Dies konnte auch in den Ergebnissen anderer Arbeiten aufgezeigt werden, die ebenfalls einen frühen Nachweises der mRNA von RANKL ergaben (Wade-Gueye et al. 2012). Diese Daten ergaben, dass in der frühen Differenzierungsphase keine relevante Änderung der RUNX2-Expression nicht ungewöhnlich ist. Zusammenfassend spricht dies in den Daten der vorliegenden Arbeit für eine gehemmte osteogene Differenzierung.

Für die enzymatische Aktivität von 11- β HSD1, wie auch von 11- β HSD2, ist die Cofaktoren-Abhängigkeit im Vorfeld oft beschrieben worden (Bujalska et al. 2005; Cooper 2008; Mercer und

Krozowski 1992; Tomlinson et al. 2004). Unsere Ergebnisse demonstrieren eine Etablierung eines NADPH-Regenerationssystems (Bujalska IJ et al. 2005; Quinkler et al. 1997), im Sinne einer gesteigerten reduktiven Enzymkatalysation durch 11- β HSD1 in mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft bei 11- β HSD1-Überexpression. Die Ergebnisse konnten eine Tendenz der Konversion vom Substrat Cortison in das Produkt Cortisol in der Zellkultur nachweisen, für Zellen die mit dem 11- β HSD1-Plasmid transfiziert wurden und mit proreduktiven Cofaktoren kultiviert worden sind. Ebenfalls bei den Autoren Bujalska und Kollegen (Bujalska et al. 2005) war die Cofaktoren-Zugabe auf enzymatischer Ebene durch das Enzym Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase (H6PD) Teil der Inkubation nach Transfektion in Hamster-Ovarial-Zellen. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der reduktiven Aktivität bei Cotransfektion des Cofaktoren unterstützenden Enzyms Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben übereinstimmend in humanen mesenchymalen Vorläuferzellen eine Tendenz der erhöhten Umwandlung von Cortison in Cortisol bei Transfektion von 11- β HSD1 und Zugabe von proreduktiven Cofaktoren. Weiterhin konnten Bujalska und Kollegen auch eine positive Korrelation von H6PD-mRNA-Expression und 11- β HSD1-Enzym-Aktivität in humanen omentalen Präadipozyten nachweisen. Eine Transfektion erfolgte hierbei jedoch nicht, auch erfolgte kein erhöhter Nachweis proadipogener Proteine. Bei anderen Autoren zeigten sich Hinweise einer Assoziation von 11- β HSD1-Expression und H6PD-Expression in humanen Leberfettzellen (Konopleska et al. 2009). Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen in Zusammenschau die Notwendigkeit einer Einbeziehung des Cofaktoren-Modells von NAD und NADPH in die Kultivierung von mesenchymalen Vorläuferzellen bei Betrachtung der proadipogenen Differenzierung. NADPH ist der alleinige essenzielle Cofaktor des Enzyms 11- β HSD1 für die Oxidation und Reduktion. Ebenso ist NAD für die Oxidation des Isoenzym 11- β HSD2 essenziell. Ein NADPH-Regenerationssystem wurde in dieser Arbeit in die Kultivierung von 11- β HSD1-transfizierten Zellen miteinbezogen. Bei Betrachtung der Ergebnisse im Verlauf einer Cortisol-Stimulation zeigte sich in den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit auch Hinweise auf eine erhöhte oxidative Umwandlung von Cortisol in Cortison für mesenchymale Vorläuferzellen, die mit 11- β HSD1-Plasmid transfiziert worden sind, und mit dem NADPH-Regenerationssystem und Cortisol stimuliert worden sind - gleichzeitig scheint eine erhöhte oxidative Umwandlung bei gleichzeitiger 11- β HSD2-Expression aufzutreten. Für die Annahme einer sekundären 11- β HSD2-Induktion spricht, dass sich bei anderen Autoren sogar eine Abnahme der oxidativen Reaktion (Konopleska et al. 2009) gab, bzw. keine Hinweise einer 11- β HSD1-Expression bei 11- β HSD2-Induktion in mesenchymalen Vorläuferzellen darstellte (Zhou et al. 2008). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Richtung der Konversion determiniert wird, durch die jeweilige Substrat-Zugabe, wie es sich im maximalen Produktnachweis ergibt (ob nun Cortison oder Cortisol zugegeben wird). Man kann die Spezifität des Enzyms für das jeweilige Substrat auch bei 11- β HSD1-Induktion diskutieren. Möglicherweise scheint 11- β HSD1 im humanen Modell eine bedeutendere Bedeutung zu spielen, hingegen 11- β HSD2 eventuell eher im Tiermodell. Die vorliegenden Ergebnisse scheinen geeignet, ein physiologisches Modell des humanen Cortisolstoffwechsels im mesenchymalen Vorläuferzellensystem bereitzustellen. Insbesondere demonstrieren die Ergebnisse, dass 11- β HSD1 in der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft im Kno-

chen eine größere Bedeutung zu haben scheint, als dies bisher gezeigt werden konnte. Im Vergleich dazu lassen unsere Ergebnisse der Etablierung des NADPH-Regenerationssystems als Cofaktoren Bereitstellung auf eine bedeutsame Eigenschaft des Zellmodells von mesenchymalen Vorläuferzellen schließen und motivieren zu einer weiterführende mRNA- und Protein-Analyse von stimulierten Zellen, um eine Aussage über die Expression von proadipogenen Proteinen und der Funktion dieser Schlüsselenzyme treffen zu können.

Zusätzlich zeigte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit eine signifikante Suppression von C/EBP- β -mRNA zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierung nach 7 Tagen. Andere Autoren konnten bereits im frühen Stadium der Differenzierung dem C/EBP- β , eher eine proosteogene Differenzierung zuschreiben. Dabei ergab sich ein Anstieg der osteogenen Marker bei Anstieg von C/EBP- β im frühen Stadium der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen (Akavia UD et al. 2006; Chang PL 2006). Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass C/EBP- β direkt den Promotor von RUNX2 in präosteoblastischen mesenchymalen Vorläuferzellen bindet und so zu einer präosteoblastischen Differenzierung führt (Henriquez B 2011). Diese Ergebnisse könnten somit zusammen für eine mögliche Suppression der osteogenen Differenzierung in mesenchymalen Vorläuferzellen unter Überexpressionsbedingungen zu einem frühen Zeitpunkt sprechen. Jedoch sind die Aussagen auf die mRNA-Ebene beschränkt. Übereinstimmend mit der Annahme einer präadipogenen Differenzierung bei RUNX2-Abnahme und C/EBP- β -Zunahme konnten andere Autoren eine gegenseitige Regulation im späteren Verlauf der Differenzierung aufzeigen. Ein eindeutiger vermehrter mRNA-Nachweis von CEBP- β konnte in den Ergebnissen dieser Arbeit nicht erfolgen. Zumindest zeigte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit eine Tendenz der Induktion von C/EBP- β nach 48-Stunden. Die Knochenmineralisation scheint im späteren Stadium der Differenzierung durch eine verminderte IGF-1-Synthese mit einer gesteigerten C/EBP- β -Synthese gesteuert zu werden. Zusammenfassend spricht dies im Falle einer C/EBP- β -Zunahme und RUNX2-Abnahme für eine gehemmte osteogene Differenzierung, im späteren Stadium der Differenzierung. Weiterhin scheint auch bei C/EBP- β -Expression die Osteoklastogenese via RANKL gehemmt zu sein (Williams et al. 2011)

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten zumindest eine Tendenz des Anstiegs proadipogener mRNA von aP2 und C/EBP- α . Der Osteoklasten aktivierende RANKL konnte ebenfalls in Tendenz vermehrt nachgewiesen werden. Somit weisen die Ergebnisse auf eine Zunahme der osteoklastischen Aktivität hin. Glucocorticoide können den RANKL / Osteoprotegerin-Quotienten beeinflussen. Dies führt in der frühen Phase der Differenzierung von Osteoklasten zu einer erhöhten Aktivierung mit einer erhöhten Knochenresorption (Hofbauer 1999). Übereinstimmend fanden sich Hinweise eines erhöhten RANKL-mRNA-Nachweises in der Kultur zu frühen Messzeitpunkten. Die Hinweise einer frühen adipogenen Induktion konnten jedoch nicht durch den Nachweis von PPAR γ auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Zumindest ergab sich eine Tendenz der Induktion von PPAR γ am 7. Tag der Kulturen. Eine proinflammatorische Induktion durch aP2 konnte in Makrophagen durch die Autoren auch mit einem erhöhten Nachweis des Signalweges NF- κ B gezeigt werden (Makowski et al. 2005). In den

Ergebnissen dieser Arbeit war aP2 zunächst ein Marker der späten Adipogenese. Übereinstimmend zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit im kurzzeitigen Versuchsaufbau, über 48 h mit Transfektion des 11- β HSD1-Plamids eine erhöhte Expression von RANKL, der Teil des Signaltransduktionsweges von NF- κ B ist und somit die Osteoklasten-Differenzierung und Aktivität induziert. Ein vermehrter Nachweis von aP2 konnte in den Ergebnissen dieser Arbeit demonstriert werden. Es ist bekannt, dass der Signaltransduktionsweg von C/EBP- α eng an den PPAR γ -Signalweg gebunden ist. So konnte für mesenchymale Vorläuferzellen der Maus gezeigt werden, dass sich unter Suppression von PPAR γ eine auch eine Suppression von C/EBP- α darstellte (Zuo et al. 2006). Umgekehrt konnte demonstriert werden, dass für die Aktivierung von C/EBP- α eine PPAR γ -Aktivierung notwendig ist. Dies zeigte sich übereinstimmend in den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine Tendenz des erhöhten C/EBP- α -Nachweises auf mRNA-Ebene ergaben. Ebenfalls konnten Zou und Kollegen eine CEBP- α -Induktion über den essenziellen Faktor PPAR- γ durch C/EBP- β aufzeigen. Die Transkriptionsfaktoren C/EBP- α und PPAR γ sind in ihrem Signaltransduktionsweg eng miteinander verknüpft und unterliegen auch auf genetischer Ebene noch nicht vollständig geklärter regulatorischer Signalwege. Beide Transkriptionsfaktoren sind in über 60 % ihrer genetischen Bindungsstellen miteinander übereinstimmend und über 60 % aller Gene die mit der Adipogenese vergesellschaftet sind, haben Bindungsstellen für diese Transkriptionsfaktoren (Lefterova et al. 2008). Weitere Veröffentlichungen konnten bei CEBP- β -Induktion ebenfalls eine PPAR γ -Induktion mit Stimulation der Adipogenese im Zellsystem mesenchymalen Vorläuferzellen beschreiben (Pierotti et al. 2007).

Die von uns aufgestellte Hypothese einer vermehrten Adipogenese in mesenchymalen Vorläuferzellen bei Überexpression des Schlüsselenzyms des endogenen Cortisol-Stoffwechsels, demonstrierte sich in einer Signifikanz der mRNA-Induktion von der proadipogenen Proteine für C/EBP- α und aP2. Eine Induktion des frühen proadipogenen Markers PPAR γ ließ sich in diesem humanen Zellsystem nicht eindeutig nachweisen, zumindest jedoch in einer Tendenz am 7. Tag der Kultur. Andere Autoren beschrieben bereits eine erhöhte aP2, C/EBP- α und - δ mRNA-Induktion durch die externe Behandlung von humanen mesenchymalen Vorläuferzellen mit dem synthetisierten stärkeren Cortisol-Äquivalent Dexamethason nach 48 h (Tomlinson et al. 2006). In unserem Vorexperiment mit externer Cortisol-Behandlung von mesenchymalen Vorläuferzellen verschiedener Patienten konnte aufgezeigt werden, dass die Expression dieser Proteine in mesenchymalen Vorläuferzellen osteogener Herkunft nicht durch die externe Stimulation getriggert werden konnte. Andere Autoren konnten bereits bei Dexamethason und Cortisol-Zugabe eine gleichbleibende Abnahme der spontanen 11- β HSD1-Aktivität zeigen, unabhängig davon, welches Steroid verwendet wurde (Balachandran A et al. 2008). Auf physiologischer Ebene wäre dem Cortisol eine höhere Aussagefähigkeit mit jedoch deutlich niedrigerer Äquivalenzdosis im Vergleich zu Dexamethason zuzuschreiben. Dabei zeigte sich in unserem Experiment keine PPAR γ -Induktion. Auf der anderen Seite gelang auch kein Nachweis der Induktion anderer proadipogener mRNA bei externer Cortisol-Zugabe, ohne Transfektion, wie wir dies in unserem Vorexperiment (Mesenchymale Vorläuferzellkultur und variable Cortisol-Konzentration über 7 Tage)

sahen. Zu diskutieren ist dabei, dass mit dem Zellmaterial der mRNA von analysierten Zellen bei 11- β HSD1-Überexpression keine externe Cortisol Zugabe erfolgte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die besondere Bedeutung von 11- β HSD1 für das humane Zellsystem. Tierische Maus- und Zellsysteme wiesen bisher dem 11- β HSD2 eine größere Bedeutung zu, wie unter anderem in dem 11- β HSD2-Wnt-Signalweg beschrieben (Zhou et al. 2008). Weiterhin ist die Interaktion der Transkriptionsfaktoren untereinander beachtenswert. Dabei zeigte sich C/EBP- α als ein Kandidat des Hauptregulators für die Induktion von PPAR γ (Tomaru et al. 2009), auch diesbezüglich konnten wir eine Tendenz der C/EBP- α -Induktion in den hier vorliegenden Ergebnissen demonstrieren. Andere Arbeiten konnten eine signifikant hohe Übereinstimmung von C/EBP- α an PPAR γ genetischen Bindungsstellen in der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) in humanen Adipozyten demonstrieren. Dies gilt insbesondere in genetisch hochaktiven Abschnitten, die mit der Adipogenese assoziiert sind (Schmidt et al. 2011). Umgekehrt gelang dies für PPAR γ jedoch nicht. Ein erhöhter PPAR γ -Nachweis bei 11- β HSD1-Induktion, ohne Stimulation, scheint somit weiterführenden regulatorischen Mechanismen unterworfen zu sein. Zunehmend sind die Subtypen PPAR β und - δ für den Signalweg des Knochenstoffwechsels in den Fokus gerückt. So konnten neuere Veröffentlichungen eine enge Regulierung des Osteoprotegerins und RANKL über den Wnt-Signalweg durch PPAR β und - δ in einem PPAR β und - δ *Knock-out*-Maus-Modell aufzeigen. Hierbei konnte in der Knochenstruktur des PPAR β und - δ *Knock-out*-Maus-Modells eine Erhöhung der Osteoklastenzahl und eine verminderte Knochensubstanz nachgewiesen werden (Scholtysek et al. 2013). Es konnte somit eine mögliche stärkere Bedeutung des Wnt-Signalwegs für den Knochenstoffwechsel, via 11- β HSD1, demonstriert werden. Weiterhin ist eine zusätzliche Steuerung über andere Mitglieder der C/EBP-Familie zu diskutieren, wie zum Beispiel das C/EBP- β zunehmend als weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für die adipogene Differenzierung in den ersten Stunden der Differenzierung diskutiert wird (Muruganandan et al. 2009; Siersbaek et al. 2011). Dieser Transkriptionsfaktor unterliegt auch einer besonders engen Regulierung durch endogene Steroide, deren erhöhte Konversion Teil des implementierten Enzymmodells in dieser Arbeit ist. Die Autoren Siersbaek und Kollegen konnten in diesem Zusammenhang ebenfalls eine hohe Übereinstimmung der Bindungsstellen des Glucocorticoid-Rezeptor, mittels ChIP aufzeigen, insbesondere ist C/EBP- β in den ersten vier Stunden der adipogenen Differenzierung aktiv (Siersbaek et al. 2011). Weiterhin konnte in diesen Veröffentlichungen eine enge Verknüpfung der Interaktion in der Kaskade der adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen demonstriert werden. Konform mit unseren Ergebnissen konnten Hinweise der Induktion des Promotors von C/EBP- β , eine regulatorische Induktion von PPAR γ , C/EBP- α und schließlich von aP2 nachgewiesen werden (Tang QQ et al. 2004). Weiterhin zeigten neuere Veröffentlichungen eine enge Regulierung von C/EBP- β durch Actetylierung, die über Glucocorticoide durch den C/EBP- α -Promotor vermittelt wird. Folglich kam es zu einer vermehrten Adipogenese in der mesenchymalen Stammzellkultur (Abdou HS et al. 2013). Unsere Experimente zeigten übereinstimmend eine Tendenz der Induktion des Transkriptionsfaktors C/EBP- α auf mRNA-Ebene. Die Ergebnisse waren für C/EBP- β in der hier vorliegenden Arbeit nicht eindeutig, es zeigte sich sogar eine

Suppression nach 7 Tagen bzw. eine Tendenz der Erhöhung nach 48 h. Zu diskutieren wäre hier ein zu lang gewählter Versuchszeitraum, da wohl eine C/EBP- β -Expression möglicherweise schon nach 4 Stunden auftritt (Siersbaek et al. 2011). Ein vermehrter mRNA-Nachweis von RANKL, der mit dem Glucocorticoid-Rezeptor über das Protein NF- κ B interagiert, konnte ebenfalls, wie bereits in anderen Veröffentlichungen, in diesen Versuchen demonstriert werden (Ke S et al. 2001). Darüber hinaus ergab sich teilweise eine Signifikanz, doch zumindest eine Tendenz der Induktion der mRNA für aP2, als Marker der späten Adipogenese im Verlauf des 28-Tage-Langzeitversuchs und 48-h-Stimulationsexperiment. Ein Nachweis zu frühen Zeitpunkten konnte im 7-Tage-Versuch, ohne Stimulation mit Transfektion nicht erfolgen. Jedoch erfolgte im Versuchsaufbau des 48-h-Stimulationversuchs eine 7tägige Kultivierung bis zur Konfluenz der Zellen im Vorfeld. Dies scheint mit der Annahme von aP2 als Marker der späten Adipogenese und einer vermehrten Expression bei erfolgreicher 11- β HSD1-Transfektion vereinbar.

4.1 Ausblick

Es wäre sinnvoll weitere Experimente zur Betrachtung einer mesenchymalen Differenzierung unter dem Aspekt der adipogenen Differenzierung zu untersuchen. Dazu sollte im Rahmen der Differenzierung die Funktion 11- β HSD1 und 11- β HSD2 weiter analysiert werden. Es sind mRNA-Analysen weiterer Proteine der Signalkaskade einer adipogenen Differenzierung zu empfehlen, wie die Einbeziehung von Proteinen des Wnt-Signalweges. Weiterführend ist die Proteinanalyse von proadipogenen Proteinen, wie aP2, C/EBP- α , - β und PPAR γ auch im Immunoblot mit Antikörpern sinnvoll, um Aussagen hinsichtlich der Menge an nachweisbarem Protein machen zu können. Weiterhin sollte auch im Immunoblot die RANKL-Analyse erfolgen. Die Stimulationsmedien müssten unter Einbeziehung eines NADPH-Regenerationssystems mit ggf. Modifikation einer Glucose und Insulin-Stimulation erfolgen, da auch der Insulin-Stoffwechsel für die Bereitstellung der Glucose-6-Phosphat und dem Transport in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist. Es sollte eine Transfektion mit Unterstützung des NADPH-Cofaktoren-Systems mit gleichzeitiger mRNA-Analyse erfolgen, um eine Analyse auf mRNA-Ebene der transfizierten und stimulierten Zellen zu ermöglichen. In weiteren Versuchsansätzen sollte auch die zeitliche Betrachtung miteinbezogen werden. Es sollte ein 48-h- und 7-Tage-Vergleich erfolgen, jedoch mit ausgeprägter Konfluenz der Zellen vor Transfektion (ca. 7 Tage), um den toxischen Effekt des Lipofectamin zu reduzieren. Weiterhin sollten Hemmstoffe von 11- β HSD1 und HSD2 verwendet werden, um eine valide Aussage hinsichtlich der Funktionalität der Enzyme (Oxidation oder Reduktion) bei Überexpression mit Cortison-Zugabe geben zu können.

5. Literaturanhang

- Aarden E, Burger E, Nijweide P** (1994): Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55(3):287-99
- Abdou HS, Atlas E, Hache JG** (2013): A positive regulatory domain in CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPB) is required for the glucocorticoid-mediated displacement of histone deacetylase1 (HDAC1) from the C/EBP alpha promotor and maximum adipogenesis. *Endocrinology* 154(4):1454-64
- Adachi T, Aonuma Y, Ito S, Tanaka M, Hojo M, Takano-Yamamoto T, Kamioka H** (2009): Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation. *J Biomech* 42(15):2507-12
- Addison W, Azari F, Sorensen E, Kaartinen M, McKee M** (2007): Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem* 282(21):15872-83
- Akavia UD, Shur I, Rechavi G, Benaayahu D** (2006): Transcriptional profiling of mesenchymal stromal cells from young and old rats in response to Dexametasone. *BMC Genomics* 7(95):13
- Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K und andere** (2004): PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113(6):846-55
- Avenell A, Gillespie W, Gillespie L, O'Connell D** (2009): Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involutional and post-menopausal osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* 15(2):CD000227
- Bacon C, Gamble G, Horne A, Scott M, Reid I** (2009): High-dose oral vitamin D3 supplementation in the elderly. *Osteoporos Int* 20(8):1407-15
- Balachandran A, Guan H, Sellan M, van Uum S, Yang K** (2008): Insulin and dexamethason dynamically regulate adipocyte 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* 149(8):4069-79
- Balazs Z, Nashev L, Chandsawangbhuwana C, Baker M, Odermatt A** (2009): Hexose-6-phosphate dehydrogenase modulates the effect of inhibitors and alternative substrates of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Mol Cell Endocrinol* 301(1-2):117-22
- Banhegyi G, Csala M, Benedetti A** (2009): Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. *J Mol Endocrinol* 42(4):283-9
- Baudrand R, Dominguez JM, Carvajal CA, Riquelme A, Campino C, Macchiavello S, Bonzinovic M, Morales M, Pizzaro M, Solis N und andere** (2011): Overexpression of hepatic 5-alpha-reduktase and 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in visceral adipose tissue is associated with hyperinsulinemia in morbidly obese patients. *Metabolism* 60(12):1775-80
- Beck I, De Bosscher K, Haegeman G** (2011): Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research. *Trends Endocrinol Metab* 22(8):295-310
- Bellido T, Saini V, Pajevic P** (2012): Effects of PTH on osteocyte function. *Bone* 54(2):250-7
- Bellows C, Aubin J, Heersche J** (1987): Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 121(6):1985-92
- Beloti M, Rosa A** (2005): Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J* 16(2):156-61
- Bergman R, Gazit D, Kahn A, Gruber H, McDougall S, Hahn T** (1996): Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *J Bone Miner Res* 11(5):568-77
- Bianco P, Robey P, Saggio I, Riminuci M** (2010): Mesenchymal stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther* 21(9):1057-66
- Bischoff-Ferrari H, Dietrich T, Orav E, Dawson-Hughes B** (2004): Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med* 116(9)
- Bjorntorp P, Karlsson M, Pettersson P** (1982): Expansion of adipose tissue storage capacity at different ages in rats. *Metabolism* 31(4):366-73
- Blau H, Brazelton T, Weimann J** (2001): The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105(7):829-41
- Bonewald L** (2011): The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26(6):229-238
- Boskey A** (2003): Biomineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:5-9

- Bossard M, Tomaszek T, Thompson S, Amegadzie B, Hanning C, Jones C, Kurdyla J, McNulty D, Drake F, Gowen M und andere** (1996): Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* 271(21):12517-24
- Bozec A, Bakiri L, Hoebertz A, Eferl R, Schilling A, Komnenovic V, Scheuch H, Priemel M, Stewart C, Amling M und andere** (2008): Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature* 454(7201):221-5
- Braun P, Ritz V, Bähr V, Diederich S, Hüfner M, Siggelkow H** (2009): Transfection of 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human osteosarcoma cells mesenchymal progenitor cells the role of high 11betaHSD1-levels on osteoblastic and adipogenic differentiation. *Bone* 44(2):S316
- Brennan-Speranza T, Henneicke H, Gasparini S, Blankenstein K, Heinevetter U, Cogger V, Svistounov D, Zhang Y, Cooney G, Buttgerit F und andere** (2012): Osteoblasts mediate the adverse effects of glucocorticoids on fuel metabolism. *J Clin Invest* 122(11):4172-89
- Brown J, Delmas P, Arlot M, Meunier P** (1987): Active bone turnover of the cortico-endosteal envelope in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 64(5):954-9
- Bujalska I, Hewitt K, Hauton D, Lavery G, Tomlinson J, Walker E, Stewart P** (2008): Lack of hexose-6-phosphate dehydrogenase impairs lipid mobilization from mouse adipose tissue. *Endocrinology* 149(5):2584-91
- Bujalska I, Kumar S, Stewart P** (1997): Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 349(9060):1210-3
- Bujalska IJ, Draper N, Michailidou Z, Tomlinson JW, White PC, Chapman KE, Walker EA, Stewart PM** (2005): Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Mol Endocrinol* 34(3):675-84
- Bujalska IJ, Draper N, Michailidou Z, Tomlinson JW, White PC, Chapman KE, Walker EA, Stewart PM** (2005): Hexose-6-phosphate dehydrogenase confers oxo-reductase activity upon 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Mol Endocrinol* 34(3):675-84
- Bujalska W, Hewison and Stewart** (2002): A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3):1205-10
- Canalis E** (1998): Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth. Is local insulin-like growth factor I to blame? *Endocrinology* 139(7):3041-2
- Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian J** (2007): Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int* 18(10):1319-28
- Caplan A** (2005): Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11(7-8):1198-211
- Caplan A, Bruder S** (2001): Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7(6):259-64
- Catalioto R, Gaillard D, Ailhaud G, Negre IR** (1992): Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: the mitogenic-adipogenic role of growth hormone is mediated by the protein kinase C signalling pathway. *Growth Factors* 6(3):255-64
- Chalfie M** (2009): GFP: Lighting up life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(25):10073-80
- Chang PL BH, Zhao X, Chien YW, Chen D, Tilden AB, Chang Z, Cao X, Faye-Petersen OM, Hicks P** (2006): Comparison of fetal and adult marrow stromal cells in osteoclastogenesis with and without glucocorticoids. *Connect Tissue Res* 47(2):67-76
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ** (2001): Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294(5548):1866-70
- Chiu Y, Mensah K, Schwarz E, Ju Y, Takahata M, Feng C, McMahon L, Hicks D, Panepento B, Keng P und andere** (2012): Regulation of Human Osteoclast Development by Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP). *J Bone Miner Res* 27(1):79-92
- Cohen MJ** (2006): The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140(23):2646-706
- Cole TJ** (1995): Cloning of mouse 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene: tissue specific expression and localization in distal convoluted tubules and collecting ducts of the kidney. *Endocrinology* 136:4693-4696
- Cooper M** (2008): 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase: a regulator of glucocorticoid response in osteoporosis. *J Endocrinol Invest* 31(7 Suppl):16-21

- Cooper M, Bujalska I, Rabbitt E, Walke E, Bland R, Sheppard M, Hewison M, Stewart P** (2001): Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 16(6):1037-44
- Cooper M, Rabbitt E, Goddard P, Bartlett W, Hewison M, Stewart P** (2002): Osteoblastic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Miner Res* 17(6):979-86
- Cooper M, Walker E, Bland R, Fraser W, Hewison M, Stewart P** (2000): Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone* 27(3):375-81
- Cusano N, Kiel D, Demissie S, Karasik D, Adrienne Cupples L, Corella D, Gao Q, Richardson K, Yiannakouris N, Ordovas J** (2012): A Polymorphism in a gene encoding Perilipin 4 is associated with height but not with bone measures in individuals from the Framingham Osteoporosis Study. *Calcif Tissue Int* 90(2):96-107
- Czegle I, Csala M, Mandl J, Benedetti A, Karádi I, Bánhegyi G** (2012): G6PT-H6PDH-11βHSD1 triad in the liver and its implication in the pathomechanism of the metabolic syndrome. *World J Hepatol* 4(4):129-38
- Dass C** (2004): Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med* 82(9):579-91
- De Bosscher K** (2010): Selective Glucocorticoid Receptor modulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120(2-3):96-104
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G** (2003): The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24(4):488-522
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M und andere** (2003): Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300(5628):2055
- Delany A, Durant D, Canalis E** (1995): Cortisol downregulates osteoblast alpha 1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biochem* 57(3):488-94
- Delany A, Durant D, Canalis E** (2001): Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol* 15(10):1781-9
- Delmas P** (2000): How does antiresorptive therapy decrease the risk of fracture in women with osteoporosis? *Bone* 27(1):1-3
- Deslex S, Negrel R, Ailhaud G** (1987): Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res* 168(1):15-30
- Diederich S, Eigendorff E, Burkhardt P, Quinkler M, Bumke-Vogt C, Rochel M, Seidelmann D, Esperling P, Oelkers W, Bahr V** (2002): 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: an important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 87(12):5695-701
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E** (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7
- Dorheim M, Sullivan M, Dandapani V, Wu X, Hudson J, Segarini P, Rosen D, Aulthouse A, Gimble J** (1993): Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 154(2):317-28
- Drenkhahn D, Kugler P** (2002): Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban und Fischer Verlag / Elsevier GmbH (Stuttgart / Jena) 16
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C und andere** (1996): Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382(6590):448-452
- Duque G, Rivas D** (2006): Age-related changes in lamin A/C expression in osteoarticular system: laminopathies as a potential new aging mechanism. *Mech Ageing Dev* 127(4):378-383
- Eastell R, Yergey A, Vieira N, Cedel S, Kumar R, Thompson E, Riggs B** (1991): Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function, and age in women: evidence of an age-related intestinal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D action. *J Bone Miner Res* 6(2):125-32

- Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle W, Lacey D, Riggs B** (2003): Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 111(8):1221-30
- Eijken M, Hewison M, Cooper M, de Jong F, Chiba H, Stewart P, Uitterlinden A, Pols H, van Leeuwen J** (2005): 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase expression and glucocorticoid synthesis are directed by a molecular switch during osteoblast differentiation. *Mol Endocrinol* 19(3):621-31
- Evans M, Kaufman M** (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-6
- Farmer S** (2005): Regulation of PPARgamma during adipogenesis. *International Journal of Obesity* 29:13-16
- Felgner P, Gadek T, Holm M, Roman R, Chan H, Wenz M, Northrop J, Ringold G, Danielsen M** (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(21):7413-7
- Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V** (2010): Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. *Mediators Inflamm* 2010:8
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P** (2008): Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13):5266-70
- Franceschi R, Xiao G** (2003): Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 88(3):446-54
- Friedenstein A, Gorskaja J, Kulagina N** (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4(5):267-74
- Furuhashi M, Tucman G, Gorun C, Makowski L, Atsumi G, Vailancourt E, Kono K, Babaev V, Fazio S, Linton M und andere** (2007): Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2 *Nature* 447:959-965
- Gaskins H, Kim J, Wright J, Rund L, Hausman G** (1990): Regulation of insulin-like growth factor-I ribonucleic acid expression, polypeptide secretion, and binding protein activity by growth hormone in porcine preadipocyte cultures. *Endocrinology* 126(1):622-30
- Ge K, Guermah M, Yuan C, Ito M, Wallberg A, Spiegelman B, Roeder R** (2002): Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* 417(6888):563-7
- Gilsanz V, Gibbens D, Carlson M, Boechat M, Cann C, Schulz E** (1988): Peak trabecular vertebral density: a comparison of adolescent and adult females. *Calcif Tissue Int* 43(4):260-2
- Gimble J, Morgan C, Kelly K, Wu X, Dandapani V, Wang C, Rosen V** (1995): Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 58(3):393-402
- Granhölm S, Henning P, Lindholm C, Lerner L** (2013): Osteoclast progenitor cells prepresent in significant amounts in mouse osteoblast isolations and osteoclastogenesis increased by BMP-2. *Bone* 52:83-92
- Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, Reid I** (2007): The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 92(4):1305-10
- Grove J, Bruscia E, Krause D** (2004): Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22(4):487-500
- Gry M, Rimini R, Strömberg S, Asplund A, Ponten F, Uhlen M, P N** (2009): Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 cell lines. *BMC Genomics* 10
- Gutierrez S, Javed A, Tennant D, van Rees M, Montecino M, Stein G, Stein J, Lian J** (2001): CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J Biol Chem* 277(2):1316-23
- Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Vaananen HK** (1999): Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 274(33):22907-10

- Hattersley A, Meeran K, Burrin J, Hill P, Shiner R, Ibbertson H** (1994): The effect of long- and short-term corticosteroids on plasma calcitonin and parathyroid hormone levels. *Calcif Tissue Int* 54(3):198-202
- Hauschka P, Lian J, Cole D, Gundberg C** (1989): Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69(3):990-1047
- Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D** (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany- the Bone EVA Study. *Osteoporos Int* 18(1):77-84
- Herold G, Kollegen** (2008): *Innere Medizin*. Gerd Herold (Verlag) Köln
- Hofbauer L, Gori, F., Riggs, BL., Lacey, DL., Dunstan, CR., Spelsberg, TC., Khosla, S.,** (1999): Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140(10):4382-9
- Holick M** (1995): Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 61(3 Suppl):638S-645S
- Holick M, Dawson-Hughes B, Raisz L** (2004): *Nutrition and Bone Health*. Humana Press
- Hong J, Teitelbaum S, Kim T, Ross F, Kim S, Kim H** (2011): Calpain-6, a target Molekule of Glucocorticoids, Regulates Osteoclastic Bone Resorption via Cytoskeletal Organization and Microtubule Actylation. *J Bone Miner Res* 26(3):657-665
- Jamal S, Ljunggren O, Stehman-Breen C, Cummings S, McClung M, Goemaere S, Ebeling P, Franek E, Yang Y, Egbuna O und andere** (2011): Effects of denosumab on fracture and bone mineral density by level of kidney function. *J Bone Miner Res* 26(8):1829-35
- Jilka R, Takahashi K, Munshi M, Williams D, Roberson P, Manolagas S** (1998): Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J Clin Invest* 101(9):1942-50
- John S, Sabo P, Thurman R, Sung M, Biddie S, Johnson T, Hager G, Stamatoyannopoulos J** (2011): Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet* 43(3)
- Junqueira L** (2003): *Histologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg 6.
- Justesen J, Mosekilde L, Holmes M, Stenderup K, Gasser J, Mullins J, Seckl J, Kassem M** (2004): Mice deficient in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 lack bone marrow adipocytes, but maintain normal bone formation. *Endocrinology* 145(4):1916-25
- Kalajzic I, Matthews B, Torreggani E, Harris M, Divieti Pajevic P, Harris S** (2012): In vitro and in vivo approaches to study osteocyte biology. *Bone* 54(2):296-306
- Kalajzic I, Staal A, Yang W, Wu Y, Johnson S, Feyen J, Krueger W, Maye P, Yu F, Zhao Y und andere** (2005): Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 280(26):24618-26
- Kalak R, Zhou H, Street J, Day RE, Modzelewski JR, Spies CM, Liu P, Li G, Dunstan CR, Seibel MJ** (2009): Endogenous glucocorticoid signalling in osteoblasts is necessary to maintain normal bone structure in mice. *Bone* 45(1):61-7
- Kang J, Alliston T, Delston R, Derynck R** (2005): Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J* 24(14):2543-55
- Kanis J** (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 4(6):368-81
- Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y** (2001): Mechanism of suppression of cytochrome p-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276(43):39638-44
- Kleiman A, Tuckermann J** (2007): Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 275(1-2):98-108
- Klein-Nulend J, Bakker A, Bacabac R, Vatsa A, Weinbaum S** (2013): Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 54(2):182-90
- Kokabu S, Gamer L, Cox K, Lowery J, Tsuji K, Raz R, Economides A, Katagiri T, Rosen V** (2012): BMP3 Supressus Osteoblast Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells via Interaction with Acvr2b. *Mol Endocrinol* 26:87-94
- Komori T** (2002): Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem* 87(1):1-8

- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson R, Gao Y, Inada M und andere** (1997): Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**(5):755-64
- Kondo M, Wagers A, Manz M, Prohaska S, Scherer D, Beilhack G, Shizuru J, Weissman I** (2003): Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* **21**:759-806
- Konopleska S, Kienitz T, Hughes T, Pirlich M, Bauditz J, Lochs H, Strasburger C, Stewart P, M. Q** (2009): Hepatic 11beta-HSD1 mRNA expression in fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Endocrinol* **70**(4):554-560
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA** (2006): Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* **116**(5):1202-9
- Krozowski Z** (1999): The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects. *Mol Cell Endocrinol* **151**(1-2):121-7
- Krusinovam E, Pelikanovam T** (2008): Fatty acid binding protein in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes Res Clin Pract* **82**:127-134
- Kumar R, Thompson, EB.** (2005): Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* **94**(5):383-94
- Lecka-Czernik B, Moerman E, Grant D, Lehmann J, Manolagas S, Jilka R** (2002): Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* **143**(6):2376-84
- Lefterova M, Zhang Y, David J, Steger D, Schupp M, Schug J, Christancho A, Zhou D, Stoeckert C, Liu X und andere** (2008): PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* **22**:2941-2952
- Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, Duquenne M, Krebs S, Rohmer V, Basle MF, Audran M** (2000): Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. *J Bone Miner Res* **15**(1):13-9
- Lieben L, Carmeliet G** (2013): Vitamin D signaling in osteocytes: Effects on bone and mineral homeostasis. *Bone* **54**(2):237-43
- Lin F, Lane M** (1994): CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(19):8757-61
- Livak K, Schmittgen T** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4):402-8
- Lucas P, Price P, Caplan A** (1988): Chemotactic response of mesenchymal cells, fibroblasts and osteoblast-like cells to bone Gla protein. *Bone* **9**(5):319-23
- Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ischihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Kato S, Kani S, Nishita M und andere** (2012): Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* **18**:405-412
- Makowski L, Brittingham K, Reynolds J, Shuttles J, Hotamisligil G** (2005): The fatty acid binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity *J Biol Chem* **280**:12888-12895
- Malavasi E, Kelly V, Nath N, Gambineri A, Dakin R, Pagotto U, Pasquali R, Walker B, Chapman K** (2010): Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11 beta-HSD1 alters enzyme levels. *Endocrinology* **151**(1):195-202
- Manolagas S** (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**(2):115-37
- Marenzana M, Greenslade K, Eddleston A., Okoye R, Marshall D, Moore A, Robinson M** (2011): Sclerostin antibody treatment enhances bone strength but does not prevent growth retardation in young mice treated with dexamthasone. *Arthritis Rheum* **63**(8):2385-2395
- McGee-Lawrence M, Westendorf J** (2012): Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene* **474**(1-2):1-11
- Mercer W, Krozowski Z** (1992): Localization of an 11 beta Hydroxysteroid dehydrogenase activity to the distal nephron. Evidence for the existence of two species of dehydrogenase in rat kidney. *Endocrinology* **130**(1):540-543
- Michigami T, Uchihashi T, Suzuki A, Tachikawa K, Nakajima S, Ozono K** (2005): Common mutations F310L and T1559del in tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene are related to distinct phenotypes in Japanese patients with hypophosphatasia. *Eur J Pediatr* **164**(5):277-282

- Mikhail A, Beck E, Shafer A, Barut B, Gbur J, Zupancic T, Schweitzer A, Cioffi J, Lacaud G, Ouyang B und andere** (1997): Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood* 89(5):1507-12
- Mishina Y, Starbuck M, Gentile M, Fukuda T, Kasparcova V, Sedor J, Hanks M, Amling M, Pinero G, Harada S und andere** (2004): Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling. *J Biol Chem* 279(26):27560-6
- Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S und andere** (2012): Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dentritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclast and foreign body giant cells. *J Bone Mineral Res* 27(6):1289-97
- Mornet E** (2007): Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis* 2(40)
- Morrison S, Weissman I** (1994): The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1(8):661-73
- Moss D** (1992): Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 38(12):2486-92
- Motyl K, Reatz M, Tekalur S, Schwartz R, McCabe L** (2011): CCAAT/enhancer binding proteins beta-deficiency enhances type 1 diabetic bone phenotype by increasing marrow adiposity and bone resorption. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol* 300(5):1250-1260
- Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen E, Ge K, Roeder R und andere** (2002): Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem* 277(44):41925-30
- Murphy L, Herzog C, Rudick J, Fojo A, Bates S** (1990): Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. *Biochemistry* 29(45):10351-6
- Muruganandan S, Roman A, Sinal C** (2009): Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 66(2):236-53
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng J, Bonewald L, Kodamam T, Wutz A, Wagner E und andere** (2011): Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17(10)
- Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshminpathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri M, Rao M und andere** (2008): PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112(2):295-307
- O'Brien C** (2010): Control of RANKL gene expression. *Bone* 46(4):911-9
- O'Brien C, Jia D, Plotkin L, Bellido T, Powers C, Stewart S, Manolagas S, Weinstein R** (2004): Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 145(4):1835-41
- Ogawa S, Lozach J, Jepsen K, Sawka-Verhelle D, Perissi V, Sasik R, Rose D, Johnson R, Rosenfeld M, Glass C** (2004): A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(40):1446-1
- Olfa G, Christophe C, Philippe L, Romain S, Khaled H, Pierre H, Odile B, Jean-Christophe D** (2010): RUNX2 regulates the effects of TNFalpha on proliferation and apoptosis in SaOs-2 cells. *Bone* 46(4):901-10
- Oliveira J, Sousa R, Kotobuki N, Tadokoro M, Hirose M, Mano J, Reis R, Ohgushi H** (2009): The osteogenic differentiation of rat bone-marrow stromal cells cultured with dexamethasone-loaded carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles. *Biomaterials* 30(5):804-813
- Paic F, Igwe J, Nori R, Kronenberg M, Franceschetti T, Harrington P, Kuo L, Shin D, Rowe D, Harris S und andere** (2009): Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone* 45(4):682-92
- Parfitt A** (1994): Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55(3):273-86
- Parfitt A, Travers R, Rauch F, Glorieux F** (2000): Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. *Bone* 27(4):487-94

- Pelton P, Zhou L, Demarest K, Burris T** (1999): PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 261(2):456-458
- Pereira R, Delany A, Canalis E** (2001): Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 28(5):484-90
- Pereira R, Delany A, Canalis E** (2002): Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone* 30(5):685-91
- Pereira R, Delany A, Canalis E** (2004): CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology* 145(4):1952-60
- Perkins S, Gibbons R, Kling S, Kahn A** (1994): Age-related bone loss in mice is associated with an increased osteoclast progenitor pool. *Bone* 15(1):65-72
- Pierotti S, Gandini L, Lenzi A, Isidori A** (2007): Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: Insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108(3-5):292-299
- Pires P, Simoes S, Nir S, Gaspar R, Duzgunes N, Pedroso de Lima M** (1999): Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1418(1):71-84
- Prasher D, Eckenrode V, Ward W, Prendergast F, Cormier M** (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2):229-33
- Prockop D** (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276(5309):71-4
- Quinkler K, Bähr, Oelkers and Diederich** (1997): Evidence for Isoforms of 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase in the liver and kidney of guinea pig. *J Endocrinol* 153(2):291-8
- Quinkler M, Kosmale B, Bahr V, Oelkers W, Diederich S** (1997): Evidence for isoforms of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the liver and kidney of the guinea pig. *J Endocrinol* 153(2):291-8
- Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schiling A, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R und andere** (2010): Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab* 11(6):517-531
- Rauner M, Goetsch C, Stein N, Thiele S, Bornhaeuser M, De Bosscher K, Haegeman G, Tuckermann J, Hofbauer L** (2011): Dissociation of osteogenic and immunological effects by the selective glucocorticoid receptor agonist, compound A in human marrow stromal cells. *Endocrinology* 152(1):102-112
- Rauner M, Sipos W, Goettsch C, Wutzl A, Foisner R, Pietschmann P, Hofbauer L** (2009): Inhibition of lamin A/C attenuates osteoblast differentiation and enhances RANKL-dependent osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 24(1):78-86
- Razzaque M** (2010): Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism. *Nephrol Dial Transplant* 26(1):42-45
- Riggs B, Khosla S, Melton Lr** (1998): A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13(5):763-73
- Rosen E, Hsu C, Wang X, Sakai S, Freeman M, Gonzalez F, Spiegelman B** (2002): C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 16(1):22-6
- Rosen E, MacDougald O** (2006): Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12):885-96
- Rosen E, Sarraf P, Troy A, Bradwin G, Moore K, Milstone D, Spiegelman B, Mortensen R** (1999): PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4(4):611-7
- Rosen E, Spiegelman B** (2000): Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:145-71
- Ruan M, Pederson L, Bradley E, Bamberger A, Oursler M** (2010): Transforming Growth Factor-beta Coordinately Induces Suppressor of Cytokine Signaling 3 and Leukemia Inhibitory Factor to Suppress Osteoclast Apoptosis. *Endocrinology* 151(4):1713
- Rubin J, Biskobing D, Jadhav L, Fan D, Nanes M, Perkins S, Fan X** (1998): Dexamethasone promotes expression of membrane-bound macrophage colony-stimulating factor in murine osteoblast-like cells. *Endocrinology* 139(3):1006-12

- Schmidt S, Jørgensen M, Chen Y., Nielsen R, Sandelin A, Mandrup S** (2011): Cross species comparison of C/EBP α and PPAR γ profiles in mouse and human adipocytes reveals interdependent retention of binding sites. *BMC Genomics* 12
- Scholtyssek C, Katzenbeisser J, He F, Uderhardt S, Ipseiz N, Stoll C, Zaiss M, Stock M, Donhauser L, Böhm C und andere** (2013): PPAR β und δ governs Wnt signaling and bone turnover. *Nat Med* 19(5):608-613
- Seckl J, Walker B** (2001): Minireview: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142(4):1371-6
- Seibel M** (2005): Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 26(4):97-122
- Shaner N, Steinbach P, Tsien R** (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2(12):905-9
- Sher L, Woitge H, Adams D, Gronowicz G, Krozowski Z, Harrison J, Kream B** (2004): Transgenic expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in osteoblasts reveals an anabolic role for endogenous glucocorticoids in bone. *Endocrinology* 145(2):922-9
- Shockley K, Lazarenko O, Czernik P, Rosen C, Churchill G, Lecka-Czernik B** (2009): PPAR γ 2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106(2):232-46
- Siersbaek R, Nielsen R, John S, Sung M, Baek S, Loft A, Hager G, Mandrup S** (2011): Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *The EMBO Journal* 30(8):1459-72
- Siggelkow H, Hilmes D, Robenstorff K, Kurre W, Engel I, Hufner M** (1998a): Analysis of human primary bone cells by fluorescence activated cell scanning: methodological problems and preliminary results. *Clin Chim Acta* 272(2):111-25
- Siggelkow H, Niedhart C, Kurre W, Ihbe A, Schulz A, Atkinson M, Hüfner M** (1998b): In vitro differentiation potential of a new human osteosarcoma cell line (HOS 58). *Differentiation* 63(2):81-91
- Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson M, Hufner M** (1999): Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 75(1):22-35
- Siggelkow H, Schmidt E, Hennies B, Hufner M** (2004): Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts. *Bone* 35(2):570-6
- Smith C, Ordovás J** (2012): Update on perilipin polymorphisms and obesity. *Nutr Rev* 70(10):611-21
- Song I, Caplan A, Dennis J** (2009): In vitro dexamethasone pre-treatment enhances bone formation of human stem cells in vivo. *J Orthop Res* 27(7):916-921
- Srivastava S, Weitzmann M, Kimble R, Rizzo M, Zahner M, Milbrandt J, Ross F, Pacifici R** (1998): Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest* 102(10):1850-9
- Stein G, Lian J** (1993): Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 14(4):424-42
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie M, Martin T** (1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3):345-57
- Sun K, Myatt L** (2003): Enhancement of glucocorticoid-induced 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by proinflammatory cytokines in cultured human amnion fibroblasts. *Endocrinology* 144(12):5568-77
- Sun L, Vitolo M, Passaniti A** (2001): Runt-related gene 2 in endothelial cells: inducible expression and specific regulation of cell migration and invasion. *Cancer Res* 61(13):4994-5001
- Szulc P, Delmas P** (2008): Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 19(12):1683-704
- Takaku T, Malide D, Chen J, Calado R, Kajigaya S, Young N** (2010): Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy. *Blood* 116(15):e41-55
- Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S** (1997): Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. *EMBO J* 16(24):7432-43

- Tang QQ, Zhang JW, Daniel Lane M** (2004): Sequential gene promotor interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis *Biochem Biophys Res Commun* 319(1):235-9
- Tenney R, Discher D** (2009): Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation. *Curr Opin Cell Biol* 21(5):630-5
- Tomaru T, Steger D, Lefterova M, Schupp M, Lazar M** (2009): Adipocyte-specific Expression of Murine Resistin Is Mediated by Synergism between Peroxisome Proliferator-activated Receptor and CCAAT/Enhancer-binding Proteins. *J Biol Chem* 284(10):6116-6125
- Tomkinson A, Gevers E, Wit J, Reeve J, Noble B** (1998): The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 13(8):1243-50
- Tomlinson J, Boudreau A, Wu D, Atlas E, Hache R** (2006): Modulation of early human preadipocyte differentiation by glucocorticoids. *Endocrinology* 147(11):5284-5293
- Tomlinson J, Walker E, Bujalska I, Draper N, Lavery G, Cooper M, Hewison M, Stewart P** (2004): 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25(5):831-66
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez J, Thomazy V, Evans R** (1998): PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93(2):241-52
- Van Hoof V, Hoylaerts M, Geryl H, Van Mullem M, Lepoutre L, De Broe M** (1990): Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clin Chem* 36(6):875-8
- Wade-Gueye N, Boudiffa M, Vanden-Bossche A, Laroche N, Aubin J, Vico L, Lafage-Proust M, Malaval L** (2012): Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone* 50(5):1064-73
- Wagers A, Weissman I** (2004): Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116(5):639-48
- Wan Y, Chong L, Evans R** (2007): PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med* 13(12):1496-503
- Wang F, Ko J, Yeh D, Ke H, Wu H** (2008): Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology* 149(4):1793-801
- Wang X, Mick G, Maser E, McCormick K** (2011): Manifold effects of palmitoylcarnitine on endoplasmic reticulum metabolism: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, flux through hexose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH concentration. *Biochem* 437(1):109-15
- Weinstein R, Jilka R, Parfitt A, Manolagas S** (1998): Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102(2):274-82
- Woitge H, Harrison J, Ivkovic A, Krozowski Z, Kream B** (2001): Cloning and in Vitro Characterization of Alpha1(I)-Collagen 11-beta Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Transgenes as Model for Osteoblast-Selective Inactivation of Natural Glucocorticoids. *Endocrinology* 142(3):1341-1348
- Wong F, Reimer D, Bally M** (1996): Cationic lipid binding to DNA: characterization of complex formation. *Biochemistry* 35(18):5756-63
- Wu Z, Bucher N, Farmer S** (1996): Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16(8):4128-36
- Wu Z, Rosen E, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy A, McKeon C, Darlington G, Spiegelman B** (1999): Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3(2):151-8
- Wu Z, Xie Y, Bucher N, Farmer S** (1995): Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* 9(19):2350-63
- Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen C, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguex J und andere** (2012): Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in menchxmal stem cells. *Nat Med* 18:1095-1101
- Xiong J, O'Brien C** (2012): Osteocyte RANKL: new Insights Into the Controll of Bone Remodeling. *J Bone Miner Res* 27(3):499-505
- Xu A, Wang Y, Xu J, Stejeskal D, Tam S, Zhang S, Wat Wong N, Lam K** (2006): Adiocyte fatty acid binding protein is a plasma biomarker closley associated with obsity and metabolic syndrome *Clin Chem* 52(3):405-413

- Yamaguchi H, Akitaya T, Yu T, Kidachi Y, Kamiie K, Noshita T, Umetsu H, Ryoyama K** (2012): Molecular docking and structural analysis of cofactor-protein interaction between NAD⁺ and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Mol Model* 18(3):1037-48
- Yang M, Trettel L, Adams D, Harrison J, Canalis E, Kream B** (2010): Col3.6-HSD2 transgenic Mice: A Glucocorticoid Loss-of Funktion Modell Sapping Early and Late Onset Osteoblast Differentiation. *Bone* 47(3):573-582
- Yeh W, Cao Z, Classon M, McKnight S** (1995): Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes & Dev* 9:168-181
- Yoshida T, Kanegane H, Osato M, Yanagida M, Miyawaki T, Ito Y, Shigesada K** (2002): Functional analysis of RUNX2 mutations in Japanese patients with cleidocranial dysplasia demonstrates novel genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 71(4):724-38
- Zhou H, Mak W, Kalak R, Street J, Fong-Yee C, Zheng Y, Dunstan CR, MJ S** (2009): Glucocorticoid-dependent Wnt signaling by mature osteoblasts is a key regulator of cranial skeletal development in mice. *Development* 136(3):427-36
- Zhou H, Mak W, Zheng Y, Dunstan C, Seibel M** (2008): Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J Biol Chem* 283(4):1936-45
- Zuo Y, Qiang L, Farmer S** (2006): Activation of CCAAT/Enhancer-binding protein α expression by C/EBP β during adipogenesis requires a PPAR γ -associated repression of HDAC1 at the C/EBP α gene promoter. *J Biol Chem* 281(12):7960-7967

Danksagung

Insbesondere möchte ich an erster Stelle herzlich Frau Prof. Dr. med. Heide Siggelkow dafür danken, dass ich die Möglichkeit bekam, im Labor der Arbeitsgruppe diese Arbeit anzufertigen. Vielen Dank für die jederzeit vorhandene freundliche Unterstützung und anregende Diskussionen. Besonderen Dank möchte ich auch Frau Regine Köpp für Ihre Unterstützung im Labor aussprechen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge ein riesengroßes Dankeschön sagen, für die Möglichkeit am Journal Club seines Labors teilzunehmen, sowie für seine Unterstützung für die Cortisol und Cortison Messungen dieser Arbeit.

