

Die Rolle des wnt-5a in der Determinierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Roman Bilkovski

aus Dneproderschinsk, Ukraine

Köln 2009

Berichtersteller:

Prof. Dr. Jens C. Brüning

Prof. Dr. Wilhelm Krone

Tag der mündlichen Prüfung:

12.01.2010

1. Einleitung	1
1.1 Adipogenese	3
1.2 <i>transkriptionelle Regulation der Adipogenese</i>	4
1.3 <i>Signalwege in der Adipogenese</i>	6
1.3.1 Notch-Signalweg.....	6
1.3.2 Insulinsignalweg	6
1.3.3 Wnt-Signalweg.....	7
1.4 Adipokine	9
1.5 <i>Weisses und braunes Fettgewebe</i>	10
1.6 <i>Ziel der Doktorarbeit</i>	11
2. Material und Methoden	12
2.1 <i>Chemikalien</i>	13
2.1.1 Puffer und Lösungen	15
2.1.2 Gele	18
2.2 <i>Material</i>	18
2.2.1 Primäre Antikörper.....	20
2.2.2 Sekundäre Antikörper	21
2.2.3 Konstrukte.....	22
2.2.4 Kommerzielle Kits	22
2.2.5 Primer und Oligonukleotide	22
2.3 <i>Methoden</i>	23
2.3.1 Zellkultur.....	23
2.3.2 Zelllinien.....	23
2.3.3 Isolierung humaner primärer Zellen.....	23
2.3.4 Passagieren von Zellen	25
2.3.5 Differenzierung der Zellen	25
2.3.6 Anfärben von Zellen.....	26
2.3.7 Fluorescence activated cell sorting (FACS)	26
2.4 <i>Proteinaufarbeitung</i>	27
2.4.1 Gewinnung von Kernextrakten	27
2.4.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford.....	28

2.4.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.4.4	Western Blot	29
2.5	Reverse Transkriptase (RT-PCR)	30
2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.7	Real-Time quantitative PCR.....	33
2.8	Klonieren	34
2.8.1	Ligation	34
2.8.2	Transformation.....	34
2.9	Immunfluoreszenz	35
2.9.1	Immunhistologie.....	36
2.10	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	37
2.11	Promotor-Reporter-Gen-Analyse	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	<i>Humane mesenchymale Stammzellen zeigen im Gegensatz zu humanen Preadipozyten ein multipotentes Differenzierungspotential.....</i>	41
3.2	<i>Mesenchymale Stammzellen und Preadipozyten zeigen unterschiedliche wnt-5a Expression.....</i>	43
3.3	<i>Wnt-5a aktiviert die Osteogenese und inhibiert die Adipogenese.....</i>	45
3.4	<i>Humane mesenchymale Stammzellen exprimieren zentrale Moleküle des kanonischen und der nicht kanonischen Signalwege.....</i>	46
3.5	<i>Wnt-5a aktiviert den JNK Signalweg in humanen mesenchymalen Stammzellen.....</i>	48
3.6	<i>Wnt-5a reguliert die Osteopontin Promotoraktivität in den mesenchymalen Stammzellen.....</i>	54
3.7	<i>Wnt-5a wird von den zirkulierenden Blutmonozyten und von fettgewebeständigen Makrophagen im menschlichen Organismus exprimiert....</i>	55
3.8	<i>Makrophagen haben einen negativen Effekt auf die Adipogenese</i>	57
3.9	<i>Das von den Makrophagen sezernierte wnt-5a inhibiert die Adipogenese.....</i>	58
3.10	<i>Die wnt-5a Expression in Makrophagen wird durch extrazelluläre Glukosekonzentration reguliert.</i>	59
4.	Diskussion	62
4.1	Zusammenfassung	69
4.2	Summary	70

5. Anhang	72
5.1 Literaturverzeichniss.....	73
5.2 Erklärung	79
5.3 Lebenslauf.....	80
5.4 Danksagung	82

Abbildung 1. Verlauf der Adipogenese.....	4
Abbildung 2. Morphologie der humanen primären Zellen.....	41
Abbildung 3. Expression mesenchymaler Oberflächenmarker.....	42
Abbildung 4. Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen und Preadipozyten..	43
Abbildung 5. Wnt-5a Expression in mesenchymalen Stammzellen und Preadipozyten.....	44
Abbildung 6. Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen im Osteogenese-Medium	46
Abbildung 7. Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen im Adipogenese-Medium	47
Abbildung 8. Expression der zentralen Signalmoleküle verschiedener Wnt-Signalwege in humanen mesenchymalen Stammzellen.	48
Abbildung 9. Einfluss von wnt-5a auf die CamKII-Aktivität in C3H10T1/2 Zellen.	49
Abbildung 10. Einfluss von wnt-5a auf den kanonischen Signalweg in C3H10T1/2 Zellen..	49
Abbildung 11. Immunfärbung von β -catenin in C3H10T1/2 Zellen.....	50
Abbildung 12. β -catenin Luciferase-Reporterplasmid-Analyse in C3H10T1/2 Zellen.....	50
Abbildung 13. Einfluss des wnt-5a auf den JNK Signalweg in C3H10T1/2 Zellen.	51
Abbildung 14. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in C3H10T1/2 Zellen.....	52
Abbildung 15. AP-1 Luciferase-Reporterplasmid-Analyse in C3H10T1/2 Zellen.....	52
Abbildung 16. Einfluss des wnt-5a auf die zentralen Moleküle der Wnt-Signalwege in humanen mesenchymalen Stammzellen	53
Abbildung 17. Osteopontin Luciferase-Reporterplasmid-Analyse in C3H10T1/2 Zellen.	55
Abbildung 18. Wnt-5a Expression in humanen Monozyten und Makrophagen.....	56
Abbildung 19. Real Time PCR.....	57
Abbildung 20. Einfluss des Makrophagen konditionierten Mediums auf den Verlauf der Adipogenese.	58
Abbildung 21. Makrophagen hemmen die Adipogenese über wnt-5a.	60
Abbildung 22. Glukoseabhängige wnt-5a Expression in den Makrophagen.	61

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine serum albumin
BMI	Body mass index
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding-Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	copyDNA
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FCS	Fetal calf serum
Grb-2	Growth factor receptor binding protein 2
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseredish peroxidase
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin
KCl	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Newborn calf serum
NP-40	Nonidet-P40
PMSF	Phenylmethylsulfonylflorid
PPAR	Peroxisome Proliferator activated Receptor
SH2	Src homoly 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	Son of sevenless
NaF	Natriumflorid

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

Tetranatriumdiphosphat

Na_3VO_4

Natriumorthovanadat

TEMED

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin

1. EINLEITUNG

Die Möglichkeit, überschüssige Energie in Form von Fettgewebe speichern zu können und in Hungerzeiten als Reserve zu nutzen, war von der Natur als ein Überlebensvorteil für den Menschen gedacht. Dieser Vorteil ist seit der Industrialisierung zu einem weltweiten Problem geworden. Mangel an Bewegung und eine kalorienreiche Ernährung führen zu Adipositas. Adipositas wird durch ein Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieabgabe ausgelöst und ist als ein *body-mass-index* (BMI) Wert $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ charakterisiert. Dabei sind neben der Adipositas selbst auch deren Folgeerkrankungen ein immer größer werdendes medizinisches Problem. So leiden immer mehr übergewichtige Menschen an Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, Hypertonie und Fettstoffwechselerkrankungen. Eine Korrelation zwischen dem BMI und der Lebensspanne wurde bereits 1988 festgestellt. Zudem sinkt gleichzeitig die Lebenserwartung, wenn der BMI 20% über dem Normalbereich ($20\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$) liegt (Harris et al., 1988).

Daneben stellen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 auch ein zunehmendes gesundheitsökonomisches Problem dar. Da die Inzidenz des Diabetes in Deutschland um ca. 5 % pro Jahr zunimmt, wurde 2001 eine Studie über die anfallenden Kosten pro Diabetespatient pro Jahr durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlungskosten der Grunderkrankung bei rund 542€/Jahr liegen. Zu diesen Behandlungen zählen die Beratung sowie das Verschreiben von antidiabetischen Medikamenten. Dagegen fallen für Patienten mit einer Behandlung der Komplikationen, die mit der Grunderkrankung einhergehen, bereits 1563€ an. Insgesamt entstehen so Kosten von rund 4000€ pro Patient pro Jahr (Hauner, 2006). Wenn man diese Kosten auf die gesamten 6 Millionen bekannten Diabetiker in Deutschland hochrechnet, so ergeben sich rund 60 Mrd. € im Jahr. Nur 23 Mrd. € lassen sich auf die Erkrankung Diabetes zurückführen. Mit den restlichen 37 Mrd. € werden die vom Diabetes hervorgerufenen Folgeerkrankungen behandelt. Laut einer CoDiM Studie aus dem Jahre 2000 stellen die Kosten für Diabetesbehandlungen 14,2 % der gesamten Gesundheitskosten in der Bundesrepublik dar (Koster et al., 2006).

Wie sich das Essverhalten und das Körpergewicht in den letzten 40-50 Jahren entwickelt haben, zeigt eine Studie aus den USA. In den Jahren 1960-1962 betrug der Anteil von Übergewichtigen 13,4%. Nur 40 Jahre später lag dieser Wert bei 30,9% mit einer stetig steigenden Tendenz. Deshalb ist es sehr wichtig, nicht nur die Auswirkung des überschüssigen Fettgewebes, sondern auch dessen Entstehung zu untersuchen, um bessere Therapien zur Bekämpfung der Adipositas entwickeln zu können.

1.1 ADIPOGENESE

Der Prozess bei dem Fettzellen, so genannte Adipozyten, entstehen, wird allgemein als Adipogenese bezeichnet. Diese kann man in zwei Schritte einteilen. Zum Einen in die Determinierung von mesenchymalen Stammzellen zu Preadipozyten und zum Anderen in die Differenzierung dieser zu ausgereiften Adipozyten. Im Zuge der Determinierung werden aus multipotenten mesenchymalen Zellen Preadipozyten. Diese können morphologisch zwar nicht von ihren Vorläuferzellen unterschieden werden, haben aber die multipotente Fähigkeit in diesem Stadium eingebüßt, was gleichzeitig bedeutet, dass diese Zellen nur noch zu Adipozyten, nicht aber z.B. zu Osteozyten differenzieren können. Die Differenzierung selbst kann ebenfalls in zwei Schritte eingeteilt werden: In eine klonale Expansion der Preadipozyten und eine anschließende terminale Differenzierung dieser zu ausgereiften Adipozyten (Rosen and MacDougald, 2006).

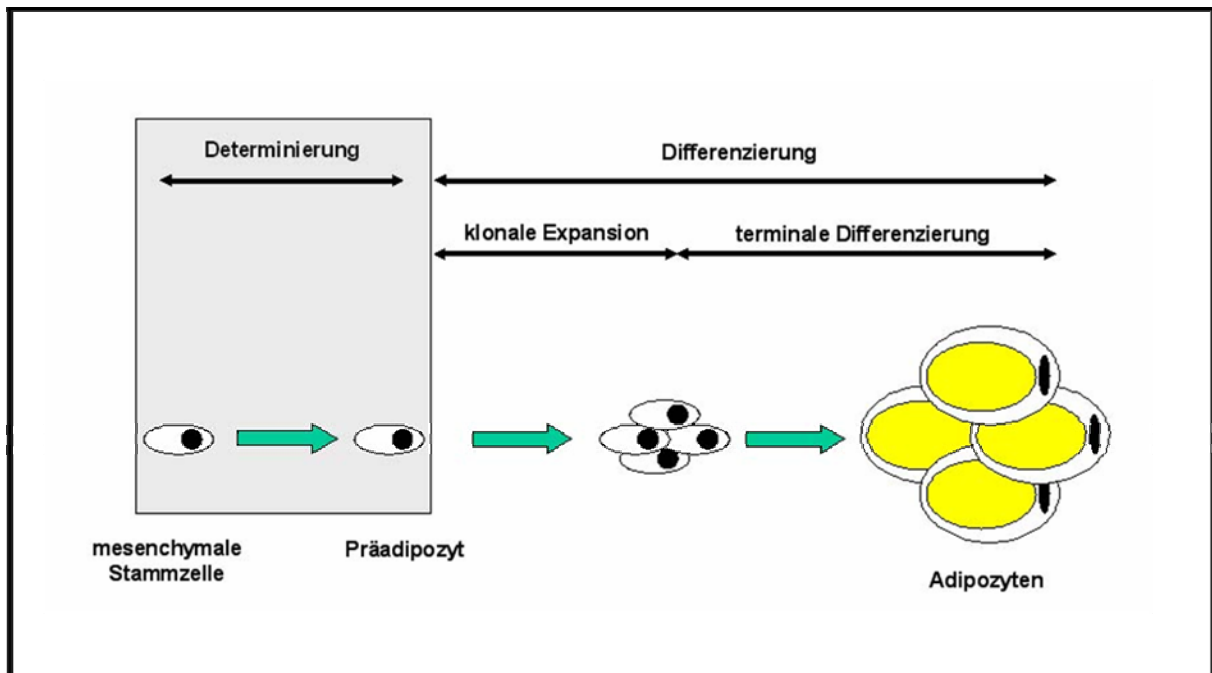


Abbildung 1. Verlauf der Adipogenese.

Im ersten Schritt erfolgt die Determinierung der mesenchymalen Stammzellen zu Preadipozyten. Anschließend findet die Differenzierung der Preadipozyten zu reifen Adipozyten statt.

1.2 TRANSKRIPTIONELLE REGULATION DER ADIPOGENESE

Die höchst komplexe Steuerung der Adipogenese unterliegt der strengen Kontrolle von Hormonen, Zytokinen, Nährstoffen und Signalmolekülen, die die Expression und die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren verändern (Feve, 2005). Wichtige proadipogene Faktoren sind die CCAAT-enhancer-binding-Proteine (C/EBP- α , - β , - δ) und der Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR- γ , - β , - δ). Wird die Adipogenese eingeleitet, so werden zunächst C/EBP- β und - δ aktiviert. C/EBP- β und - δ stimulieren die Expression des Cyclin D Kinase (CDK) Inhibitors p21, indem C/EBPs direkt an die Promotorregion des p21 Gens binden und diesen aktivieren (Cram et al., 1998). Die erhöhte p21 Expression führt zu einer Hypophosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (Rb), was letztendlich den Zellzyklus und damit die Proliferation arretiert (Hiebert et al., 1992). Wird der Zellzyklus gestoppt, führt die Aktivität von C/EBP- β und - δ gleichzeitig zur erhöhten Expression von PPAR- γ und C/EBP- α (Elberg et al., 2000; Schwarz et al., 1997), welche für die Ausbildung des adipogenen Phenotyps essentiell sind. PPAR γ liegt im Organismus in Form von zwei Splice-

Varianten vor, PPAR γ 1 und PPAR γ 2 (Zhu et al., 1995), wobei PPAR γ 2 für die Adipogenese unabdingbar ist (Ren et al., 2002). Der zweite wichtige proadipogene Faktor, C/EBP α , wird durch PPAR γ 2 aktiviert. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen eines dieser Faktoren zur gestörten Adipogenese führt (Rosen et al., 1999; Wang et al., 1995).

Neben den proadipogenen Faktoren gibt es eine Reihe antiadipogener Faktoren, die die Entstehung neuer Adipozyten im Gleichgewicht halten. So können z.B. Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin6 (IL6), IL4 und IL1 die Entstehung neuer Adipozyten inhibieren. Dies geschieht entweder durch Inhibierung der Differenzierung, wie im Fall von TNF α (Suzawa et al., 2003) oder durch die Inhibierung der Proliferation, wie im Fall von IL4 (Hua et al., 2004). Die Zytokine können letztendlich zur gestörten Adipogenese führen, was für die Entwicklung einer Insulinresistenz von Bedeutung ist (Weisberg et al., 2003). Ein weiterer Faktor, factor that binds IST-1 (FBI-1), der zur Gruppe der Poxvirus Zinkfingerfamilie Proteine (POZ) gehört, hat in der Adipogenese eine zentrale Funktion. FBI-1 wird während der Adipogenese am Tag drei und vier besonders stark exprimiert. Hohe mRNA Expressionslevel wurden vor allem bei stark übergewichtigen Patienten beobachtet. Bei einer Überexpression von FBI-1 zeigte die Zelllinie 3T3-L1 (Maus-Preadipozyten) eine reduzierte Cyclin A Aktivität sowie eine reduzierte DNA-Synthese (Laudes et al., 2004). 2008 konnte FBI-1 eine duale Funktion während der Adipogenese zugeordnet werden. Es wurde gezeigt, dass FBI-1 die Proliferation von Preadipozyten durch Hemmung von Cyclin A inhibiert. Gleichzeitig wird nach der Arretierung des Zellzyklus die Adipogenese durch FBI-1 über eine Hemmung des PPAR γ -Inhibitors, E2F4, gefördert. Neben vielen weiteren antiadipogenen Faktoren wie z.B. Interferon- γ , TNF β , Pref-1 wurde auch eine Involvierung verschiedener Signalwege, die für die Adipogenese wichtig sind, beobachtet.

1.3 SIGNALWEGE IN DER ADIPOGENESE

1.3.1 NOTCH-SIGNALWEG

Notch ist ein transmembranständiger Rezeptor, der als Ligand für Delta und Serrate/Jagged fungiert. Nach einer Bindung der Liganden an den Notch Rezeptor erfolgt eine proteolytische Spaltung von Notch mit einer anschließenden Translokation in den Nukleus. Der Notch Signalweg hat bei der Preadipozyten-Differenzierung eine wichtige Funktion. Eine Inhibierung dieses Signalweges induziert die Expression eines bekannten Inhibitors der Differenzierung, DLK1/Pref-1 (Ross et al., 2004). Ähnlich wie Notch wird auch DLK1/Pref1 proteolytisch gespalten. Nach der Spaltung entsteht ein extrazellulärer Rest, der die Adipogenese inhibiert. Mäuse, denen DLK1/Pref-1 fehlt, zeigen eine beschleunigte Adipogenese (Moon et al., 2002).

1.3.2 INSULINSIGNALWEG

Ein weiterer sehr wichtiger Signalweg für die Adipogenese ist der Insulinsignalweg. Insulin ist ein wichtiger Stimulus der Adipogenese *in vivo* und *in vitro*. Beim Insulinrezeptor (IR) handelt es sich um eine Rezeptor-Tyrosinkinase (Kasuga, 1983), die auf unterschiedlichen Zellen unterschiedlich stark exprimiert wird. So exprimieren zirkulierende Erythrozyten nur ca. 40.000 Insulinrezeptoren. Dagegen werden ca. 200.000 von Adipozyten exprimiert (Kahn and White, 1988). Erfolgt eine Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor, führt das zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, was wiederum zur Autophosphorylierung der intrazellulären β -Untereinheiten führt (Kahn et al., 1978). Die nachgeschalteten Insulinrezeptor Substratproteine (IRS), von denen es vier gibt (IRS-1,-2,-3,-4), werden von den β -Untereinheiten des Insulinrezeptors phosphoryliert (Sun et al., 1991; Sun et al., 1995). Die IRS-Proteine erkennen Faktoren, die eine SH2 (src homology-2) Domäne enthalten. Dazu zählen Proteine wie Grb-2 und die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K) (Myers and White, 1993). Wird das Adaptorprotein Grb-2 aktiviert, führt das zu einer Assoziation mit dem GDP/GTP-Austauschfaktor SOS (son of sevenless), um das p21ras zu aktivieren. Dies führt

nachfolgend zur Aktivierung von Raf, was letztendlich den Mitogen-Activated Protein Kinase Signalweg (MAPK-Signalweg) einschaltet (Myers et al., 1994). Wird die Phosphatidylinositol-3 Kinase durch IRS-Proteine aktiviert, führt das zur Aktivierung nachgeschalteter Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1) und schließlich zur Proteinkinase B (AKT/PKB) Aktivierung (Martelli et al., 2006). Der Verlust einzelner Insulinrezeptor Substratproteine (IRS) führt zu Inhibierung der Adipogenese (Tseng et al., 2004). Aber auch die Inhibierung weiterer Faktoren dieses Signalweges, wie z.B. der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) oder AKT2, können die Adipogenese negativ beeinflussen (Garofalo et al., 2003; Kim et al., 2009). Die Bedeutung dieses Signalweges im Menschen wurde durch die Identifizierung einer Familie mit einer *loss-of-function* Mutation im AKT2-Gen, welche zu einer lipodystropher Diabetes führt, untermauert (George et al., 2004).

1.3.3 WNT-SIGNALWEG

Der Wnt-Signalweg ist ein hochkonservierter Signalweg, der sich von Nematoden bis hin zu den Säugetieren findet. Der Name Wnt ist durch eine Fusion aus dem Drosophila Segmentpolaritätsgen *wingless* und dem dazu aus den Vertebraten stammenden Homolog *int-1* entstanden. Dieser Signalweg hat auf der zellulären Ebene eine zentrale Funktion bei der primären Axenbildung und Organogenese, aber auch bei der Erneuerung von Stammzellen (Komiya and Habas, 2008).

Bei den Wnt-Molekülen handelt es sich um cysteinreiche, sezernierte Polypeptide, die sowohl auto- wie auch parakrin fungieren können und bei der Zell-Zell Kommunikation eine wichtige Rolle haben. Dabei werden die Wnt-Moleküle in zwei Klassen eingeteilt: zu der ersten Klasse, die auch als wnt-1 Klasse bezeichnet wird, gehören z.B. wnt-3a und wnt-8. Diese aktivieren den so genannten kanonischen Signalweg. Dagegen wird durch die zweite Klasse, die als wnt-5 Klasse bezeichnet wird (z.B. wnt-5a, wnt-11), vor allem der nicht kanonischen Signalweg aktiviert (Kuhl et al., 2000).

Beim kanonischen Signalweg binden die Wnt-Moleküle an die so genannten frizzled Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche von Zellen befinden. Nachfolgend fusionieren diese

mit den Co-Rezeptoren LRP5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein5/6) und können somit den Wnt-Signalweg aktivieren (Yang-Snyder et al., 1996).

Die *frizzled* Gene wurden nach Polaritätsgenen in *Drosophila frizzled (fz)* genannt, wo sie auch entdeckt wurden. Strukturell besitzen die *frizzled* Rezeptoren eine extrazelluläre Wnt-bindende Domäne, sieben transmembranständige sowie eine intrazelluläre C-terminale Domäne (Dale, 1998). Wird der Signalweg aktiviert, so erfolgt die Weiterleitung zunächst über das Phosphoprotein Dishevelled (Dsh), welches direkt mit *frizzled* Rezeptoren interagieren kann. Ab Dishevelled zweigt sich der Wnt-Signalweg in drei Kaskaden auf. Bis heute ist jedoch unbekannt, auf welche Weise Dishevelled das Signal reguliert und an die verschiedenen Kaskaden weiterleitet (Komiya and Habas, 2008).

Der wohl am besten untersuchte Signalweg ist der β -catenin abhängige kanonische Signalweg. Das Kennzeichen dieses Signalweges ist die Akkumulierung und die Translokation von β -catenin aus dem Cytosol in den Nukleus. Ohne den Wnt-Signal wird das cytosolische β -catenin durch einen Komplex, bestehend aus Axin, Adenomatosis Polyposis Coli (APC), Proteinphosphatase 2A (APP2A), Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und Caseinkinase 1 α (CK 1 α), phosphoryliert. Das phosphorylierte β -catenin wird von einer E3 Ubiquitinligase (β -Trcp) erkannt und ubiquityliert, was zu einem Abbau durch das Proteasom führt (Huang and He, 2008). Aktiviertes Dsh inhibiert die Wirkung von GSK3 und fördert dadurch die Akkumulierung des β -catenin im Cytosol. Bis heute ist es nicht ganz geklärt, auf welche Weise das β -catenin in den Nukleus gelangt, da es keine „nuclear localisation sequence“ (NLS) besitzt. Vermutet wird, dass es durch Bindung an andere Faktoren, wie z.B. Axin, in den Nukleus gelangt (Cong and Varmus, 2004). Im Nukleus fungiert das β -catenin als transkriptioneller Co-Activator, indem es mit vielen Faktoren interagieren kann, wie z.B. dem Lymphocyte enhancer factor (LEF) oder T-cell factor (TCF) (Clevers, 2006).

Die nicht kanonischen Signalwege, die auch als β -catenin unabhängige Signalwege bezeichnet werden, können in zwei Kaskaden eingeteilt werden: in den JNK Signalweg und den Wnt/ Ca^{2+} Signalweg. Die c-jun NH₂-terminale Kinase (JNK), die auch Stress Activated

Protein Kinase (SAPK) bezeichnet wird, gehört zur Gruppe der Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinasen (Roy et al., 2008). Es gibt drei Isoformen der JNK (JNK1, 2 und 3), die durch alternatives splicing erzeugt werden. Dishevelled, welches in allen Wnt-Signalwegen involviert ist, reguliert auch die JNK Aktivität (Boutros et al., 1998; Li et al., 1999) mit Hilfe der DEP Domäne (Moriguchi et al., 1999). Oishi I. et al. haben 2003 gezeigt, dass der JNK Signalweg nicht nur durch die frizzled Rezeptoren aktiviert werden kann, sondern auch durch den Ror2 Rezeptor (orphan receptor). Aktivierte JNK phosphoryliert das nachgeschaltete c-jun an den NH₂-terminalen Ser63 und 73. Zusätzlich zu c-jun kann JNK auch weitere Faktoren wie JunB, JunD und c-fos aktivieren (Barr and Bogoyevitch, 2001; Cui et al., 2007). Zusammen mit c-jun bilden diese Faktoren den Transkriptionsfaktor Aktivator Protein-1 (AP-1), welcher dann im Zellkern verschiedene Zielgene aktivieren kann (Vesely et al., 2009).

Auch der Ca²⁺-Signalweg kann durch Wnt-Moleküle aktiviert werden. Dabei werden sogenannte G-Proteine, die aus drei Untereinheiten (α , β , γ) bestehen, aktiviert (Slusarski et al., 1997). Die α -Untereinheit aktiviert nachfolgend eine Phosphodiesterase (PDE), was zur Abnahme von intrazellulärem cyklischen Guanosin Monophosphat (cGMP) führt (Ahumada et al., 2002). Die Untereinheiten β und γ dagegen aktivieren die Phospholipase C (PLC), die das Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zu inositol 1,4,5-triphosphat hydrolysiert (Kume et al., 2000). Diese Hydrolyse führt zur Aktivierung der Ca²⁺-calmodulin-abhängigen-Kinase II (CamKII) und Calcineurin, die schließlich den Transkriptionsfaktor NFAT aktivieren, was zu Aktivierung von Zielgenen führt (Saneyoshi et al., 2002).

1.4 ADIPOKINE

Entgegen allen Vorstellungen, dass Fettgewebe nur ein Speicherorgan für überschüssige Energie sei, wurde mittlerweile erkannt, dass es sich um ein endokrines und sekretorisches Organ handelt, welches einen starken Einfluss auf viele Funktionen im Körper hat, indem es verschiedene Zytokine und Adipokine freisetzt (Trayhurn and Wood, 2005). Die vom Fettgewebe sezernierten Moleküle spielen eine Rolle in der Immunantwort,

Blutdruckregulation, Nahrungsaufnahme, Angiogenese usw. Zudem weiß man, dass der Glukosemetabolismus durch das Fett reguliert wird. Denn beides, Übergewicht und Lipodystrophie, sind mit Insulinresistenz bzw. Hyperglykämie verbunden (Rosen and Spiegelman, 2006). Eine mögliche Erklärung dafür könnte das Hormon Leptin sein, welches eine wichtige Funktion im Glukosemetabolismus hat und von Fettzellen sezerniert wird. Bereits 1994 wurde gezeigt, dass übergewichtige Mäuse eine Mutation im *ob* Gen besitzen, was zum Fehlen des entstehenden Proteins (Leptin) führte (Zhang et al., 1994). Zudem wurde gezeigt, dass die Gabe von rekombinanten Leptin die metabolischen Abweichungen, das Essverhalten sowie das Gewicht dieser Mäuse verbessert (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995). Leptin wird fast ausschließlich von Adipozyten sezerniert und reduziert zentral den Appetit. Gleichzeitig fördert Leptin die Energieabgabe. Leptinrezeptoren wurden zwar in geringen Mengen in verschiedenen Geweben gefunden, jedoch wurden die meisten im Hypothalamus entdeckt (Bjorbaek and Kahn, 2004; Schwartz et al., 1996). Diese hohe Konzentration an Leptinrezeptoren im Gehirn verdeutlicht, dass es dort die stärkste Wirkung entfaltet und so den Glukosemetabolismus reguliert. Neben weiteren antiglykämischen Adipokinen wie z.B. Adiponectin und Omentin gibt es eine Reihe proglykämischer Faktoren. Diese beinhalten Resistin, RBP4, TNF- α (Al-Daghri et al., 2009) und weitere Zytokine, die vom Fettgewebe sezerniert werden.

1.5 WEISSES UND BRAUNES FETTGEWEBE

Weißes Fettgewebe dient als Speicherorgan für überschüssig zugeführte Energie. Daneben wird beim Menschen auch so genanntes braunes Fettgewebe gefunden (Langin, 2009). Die primäre Funktion des braunen Fettgewebes ist es, gespeicherte Energie mit Hilfe der adaptiven Thermogenese in Wärme umzuwandeln. Das weiße und das braune Fettgewebe sind normalerweise anatomisch unterschiedlich verteilt, jedoch gibt es unter bestimmten Umständen die Möglichkeit, dass sich braunes in weißes Fettgewebe einlagert (Cinti, 2005). Es gibt aber auch weitere Eigenschaften, die das weiße vom braunen Fettgewebe

unterscheiden. So besitzen die weißen Adipozyten einen großen Fetttropfen, der das ganze Cytoplasma ausfüllt. Braune Adipozyten dagegen haben mehrere kleine Fetttröpfchen. Die farblichen Unterschiede zwischen den Fettgeweben lassen sich durch einen erhöhten Anteil an Mitochondrien erklären, die in großer Zahl im braunen Fettgewebe vorzufinden sind. Interessanterweise wurde festgestellt, dass in großen Säugetieren das braune Fettgewebe nach der Geburt fast komplett verschwindet, indem es zu weißem Fettgewebe transdifferenziert. Bei kleineren Säugetieren dagegen findet dieser Prozess nicht statt (Lean et al., 1986). Viele bekannte transkriptionelle Faktoren, die die Entstehung des weißen Fettgewebes steuern, z.B. PPAR γ oder C/EBP α , sind auch bei der Entstehung des braunen Fettgewebes essentiell (Rosen et al., 2000). Jedoch werden viele Gene unterschiedlich reguliert und exprimiert. So findet man vor allem im braunen Fettgewebe eine hohe Expression an Genen, die für die mitochondriale Biogenese verantwortlich sind. Ein wichtiger Faktor dabei wird nahezu ausschließlich im braunen Fettgewebe exprimiert und zwar das uncoupling protein-1 (UCP-1). UCP-1 ist ein Protonenkanal, der sich an der inneren mitochondrialen Membran befindet und dort die Oxidierung von Substraten, die unter Entstehung von ATP abläuft, entkoppeln kann, was letztendlich zu Entstehung von Wärme führt (Hansen and Kristiansen, 2006a, b).

1.6 ZIEL DER ARBEIT

Ziel der Arbeit ist es zu untersuchen, ob das Signalmolekül wnt-5a eine Rolle in der molekularen Regulation der Determinierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten hat. Dazu soll auf zellulärer Ebene mittels *loss of function* und *gain of function* Experimenten analysiert werden, welchen Effekt wnt-5a auf das Entwicklungspotential humaner multipotenter mesenchymaler Stammzellen hat. Daneben sollen auf molekularer Ebene die für die wnt-5a Signaltransduktion wichtigen intrazellulären Signalwege in humanen mesenchymalen Stammzellen charakterisiert werden. Letztlich soll ein Zielgen der wnt-5a Signaltransduktion in humanen mesenchymalen Stammzellen identifiziert werden, welches für die Determinierung von Bedeutung ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN

Acrylamid / Bis-acrylamid 30%	Rotiphorese® Gel 30 (37.5/1) Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA
APS	AppliChem GmbH, Darmstadt
β-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH
BSA > 96 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
complete, EDTA-free	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	SigmaAldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
DTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
EGTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

FuGENE Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Glycerol	Glycerin, AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
IBMX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Indomethacin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na-Deoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaF	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NP-40	FLUKA Chemika/Biochemika Chemie AG, Schweiz
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
TritonX-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TWEEN 20®	Caesar and Lorentz GmbH, Bonn
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.1 PUFFER UND LÖSUNGEN

Zelllysis Puffer	150	mM NaCl
	50	mM Tris-HCl (pH 7,4)
	5	mM EDTA
	1	% Nonidet® P40 Substitute
Hypotoner Lysispuffer	50	mM Tris-HCl (pH 7.4)
	3	mM EDTA
	3	mM EGTA
	0,5	mM NaF
	10	mM β -glycerophosphat
	5	mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
	1	mM Na_3VO_4
RIPA-Lysispuffer	50	mM HEPES (pH 7.4)
	50	mM NaCl
	1	% Triton X-100
	1	mM EDTA
	1	% Na-Deoxycholat
	5	$\mu\text{g/ml}$ Aprotinin
	5	$\mu\text{g/ml}$ Leupeptin
	0,1	% SDS
	1	mM PMSF
SDS-Elektrophorese Puffer	194	mM Glycin
	25	mM Tris
	0,1	% SDS

4 x SDS Probenpuffer	250 200 40 8 0,01	mM Tris-HCl (pH 6.8) mM DTT % Glycerol % SDS % Bromphenolblau
Stripping Lösung	62,5 100 2	mM Tris-HCl (pH 6.8) mM β -mercaptoethanol % SDS
TBS Puffer (pH 7.6)	137 20	mM NaCl mM Tris
TBS-T Puffer (pH 7.6)	137 20 0,1	mM NaCl mM Tris % Tween 20®
Western Blot Antikörperlösung	137 20 0,5 x	mM NaCl mM Tris 10% Western Blocking Reagent (Roche)
Western Blot blocking Lösung	137 20 1 x	mM NaCl mM Tris 10% Western Blocking Reagent (Roche)
Western Blot Puffer (APII)	194 25 20 0,05	mM Glycin mM Tris % Methanol (99%) % SDS
Fett Lysispuffer	1 2 7	ml Kollagenase ml BSA ml Hanks BSS
Red Cell Lysispuffer	100 4,11 0,5 500	μ l EDTA (0,5M) g NH_4Cl g KHCO_3 ml H_2O
Lysis Puffer	50 25 125 0,5 1 x	mM KCl mM HEPES (pH8) μ M DTT % NP-40 complete Tabs (Protease Inhibitor)

Wasch Puffer	50	mM KCl
	25	mM HEPES (pH8)
	125	μ M DTT
	1 x	complete Tabs (Protease Inhibitor)

Extraktions Puffer	500	mM KCl
	25	mM HEPES (pH8)
	125	μ M DTT
	0,5	% NP-40
	10	% Glycerol
	1 x	complete Tabs (Protease Inhibitor)

- ECL; Pierce ECL Western Blotting Substrate #32106
- ECL; Pierce ECL Western Blotting Substrate Plus #34075
- Fetal bovine serum (FBS); Invitrogen GmbH #16000-044
- Newborn calf serum (NCS), PAA #B15-001
- Pen/Strep; Penicillin Streptomycin (P/S); Streptomycin; Invitrogen GmbH # 15070-063
- PBS 10 x (pH 7.2); Invitrogen GmbH #AM9624
- Protein Standard Ladder; Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards; Bio-Rad Laboratories GmbH
- Vectashield mounting Medium for fluorescence with Dapi Vektor Laboratories Inc. , Burlingame, (CA), USA
- RosetteSep, StemCell Technologies
- Lymphoprep, Fresenius

 2.1.2 GELE

	<u>Sammelgel 5%</u>	<u>Trenngel 7%</u>
dd H ₂ O	2,74 ml	7,01 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	0,5 ml	
Tris-HCl 3 M pH 8,8		1,5 ml
Acrylamid 30%	680 µl	3,2 ml
SDS 10%	40 µl	120 µl
APS 10%	80 µl	160 µl
TEMED 99%	4 µl	12 µl

Shift-Gel 4%

Acrylamid 30%	1,6 ml
TBE 10x	600 µl
APS	120 µl
TEMED 99%	12 µl
dd H ₂ O	9,68 ml

Agarose-Gel 1%

Agarose	1 g
TAE Puffer	100 ml

 2.2 MATERIAL

Blottingmembran

Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting, Bio-Rad Laboratories

Blottpapier

Blotterpapier Cat.No. 732-0591, VWR

Extra Thick Filter Paper, Bio-Rad Laboratories

Deckgläser & Objektträger

Deckgläser 24x50mm, 24 x 50 mm VWR International GmbH

Objekträger 76x26mm, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig

Filme

Photopapier Amersham Hyperfilm™ ECL GE Healthcare UK Ltd, England

Film-Entwicklermaschine

Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgien

Gelelektrophorese and Blotting Systeme

Minigel-Twin G42 Gel Electrophoresis Apparatus, Biometra GmbH

Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad

Fastblot B 34, Biometra

PowerPac300 Bio-Rad Laboratories

PowerPac3000 Bio-Rad Laboratories

Standard Power Pack P25, Biometra

UV Stratalinker 8000, Stratagene

Luminometer

Mithras LB 940, Berthold

Heizblöcke

Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Test Tube Heater SHT 1D, Stuart scientific

Inkubatoren

HeraCell 150, Thermo Scientific

Magnetrührer

Heizbarer Magnetrührer Combimag RCT, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany

Heizbarer Magnetrührer MONOTHERM, Variomag, Daytona Beach, USA

Microskope

Fluorescence Microscope Eclipse E800, Nikon Instech Co., Ltd. Kanagawa, Japan

Mikroskop CKX41, Olympus

PCR-Maschine

iCycler PCR Machine, Bio-Rad Laboratories

pH meter

Docu-pHmeter, Sartorius

Pipetten

Eppendorf research 0,5-10 µL

Eppendorf research 10-100 µL

Eppendorf research 100-1000 µL

Pipettierhilfe

Pipetus, Hirschmann Laborgeräte

Rührgeräte

Mixer UZUSIO VTX-3000L, LMS

Sterilbänke

HERA safe, Thermo Scientific

Wasserbad

Wasserbad SFB-68-TB14, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany

Zellkulturschalen

Ø 10cm Schalen, TPP AG, Trasadingen, Schweiz

Ø 6cm Schalen, TPP AG, Trasadingen, Schweiz

6-well-, 24-well- & 96-well-Schalen, TPP AG, Trasadingen, Schweiz

Zentrifugen

Megafuge 11R , Thermo Scientific

Biofuge Fresco, Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Germany

2.2.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

- Aktin: monoclonaler Maus Antikörper MP Biomedicals, Item # 69100;
- CamKII: polyclonaler Kaninchen Antikörper, Cell Signaling, Item # 3362,
- CamKIIphospo: polyclonaler Kaninchen Antikörper, Cell Signaling, Item # 3362,

- CD 14 MicroBeads (human), Miltenyi Biotec Item # 130-050-201
- CD29, CD44, CD73, CD34, CD45
- β -catenin: monoklonaler Maus Antikörper, Santa Cruz Biotechnology #sc-133239
- JNK: polyclonaler Kaninchen Antikörper, Cell Signaling, Item # 9251,
- JNKphospo: polyclonaler Kaninchen Antikörper, Cell Signaling, Item # 9252,
- Wnt5a: polyclonaler Kaninchen Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Item # sc-23698
- Osteopontin: monoclonaler Maus Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Item # sc-21742
- ALP: monoclonaler Maus Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Item # sc-21707
- PPAR γ : polyclonaler Kaninchen Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Item # sc-7196
- Galectin-3: polyklonaler Maus Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Item # sc-56108

2.2.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

- Anti-Ziege IgG, Peroxidase gekoppelt; Antigen spezifischer Antikörper erhalten aus Kaninchen anti-Ziege IgG Antiserum durch immunospezifische Aufreinigung; Sigma-Aldrich, USA; # A5420
- Anti-Maus IgG, Peroxidase gekoppelt; der Antikörper wurde aus Ziege anti-Maus IgG Antiserum durch immunospezifische Aufreinigung isoliert; Sigma-Aldrich, USA; # A9917
- Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt; der Antikörper wurde aus Ziege anti-Kaninchen IgG Antiserum durch immunospezifische Aufreinigung isoliert. Sigma-Aldrich, USA; Item # A6154
-

2.2.3 KONSTRUKTE

- pcDNA3.1 empty vector (Invitrogen) / pcDNA3.1-wnt-5a
- TOPFLASH Plasmid
- pXP2-OPN (ATCC)
- pGL2 empty vector (Promega)
- pGL2-AP1

2.2.4 KOMMERZIELLE KITS

- Dual-Luciferase Reporter Assay, Promega GmbH. Mannheim
- HPRT TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Item #
- Wnt-5aTaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Item # 675854
- Plasmid Maxi Kit , Qiagen, Hilden #12163
- QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden #28106
- RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden #75142
- SuperScript® II Reverse Transcriptase, Invitrogen # 18064022
- QIAGEN PCR Cloning Kit, Qiagen, Hilden #231122
- LightShift Chemiluminescent EMSA Kit, Thermo Scientific #20148

2.2.5 PRIMER UND OLIGONUKLEOTIDE

Forward

Reverse

EMSA Oligonucleotide mit und ohne Biotin 5'-GGGCTTGATGAGTCAGCCGGACC-3' 5'-CCCGAACTACTCAGTCGGCCTGG-3'

Wnt5a Klonierungs Primer 5'-GCCATGAAGAAGTCCATTGGA-3' 5'-CTACTTGCACACAAACTGGTC-3'

2.3 METHODEN

2.3.1 ZELLKULTUR

2.3.2 ZELLINIEN

C3H10T1/2 (Maus mesenchymale Stammzellen) sowie 3T3-L1 (Maus-Preadipozyten) Zellen wurden im DMEM+Glutamax (Dulbecco's modified Eagle medium) Medium mit 4,5g/l Glukose, 10% NCS und 1% Penicilin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Humane mesenchymale Stammzellen wurden in DMEM+Glutamax 1g/l Glukose, 30% FBS und 1% Penicilin/Streptomycin gehalten. Humane Preadipozyten wurden in DMEM:F-12 Medium mit 2 mM L-Glutamin, 10% FBS und 1% Penicilin/Streptomycin kultiviert. Die Makrophagen Zelllinie J744A.1 wurde in DMEM Medium mit 4,5g/l Glukose, 10% FCS und 1% Penicilin/Streptomycin gehalten. Alle Zellen, die für diese Doktorarbeit verwendet wurden, hatten eine Umgebung von 37°C und 5% CO₂. Für die Isolierungsarbeiten der verschiedenen Zellen war ein Einverständnis der Ethik-Kommission sowie Patienten Einverständnisse vorhanden.

2.3.3 ISOLIERUNG HUMANER PRIMÄRER ZELLEN

a) humane mesenchymale Stammzellen

Die Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen wurde mittels RosetteSep® und Lymphoprep® aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen durchgeführt. Bei Lymphoprep handelt es sich um Sucrose Polymere, die eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten aufweisen. Überschichtet man Lymphoprep® mit Blut und zentrifugiert anschließend, so sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten durch das Lymphoprep. Stammzellen und Lymphozyten dagegen bleiben in der Interphase zwischen dem Serum und dem Lymphoprep. Weil bei dieser Methode auch hämatopoetische Zellen zusammen mit den Stammzellen isoliert werden, wurde das Blut vorher 20 min. lang mit RosetteSep inkubiert. Das RosettSep besteht aus einer Mischung von Antikörpern, die eine hohe Affinität

gegenüber den Oberflächenmarkern von hämatopoetischen Zellen und Glycophorin A haben. Inkubiert man RosetteSep 20 min. mit dem Blut, welches vorher 1:1 mit 1xPBS (phosphate buffered saline) gemischt wird, so entstehen große Komplexe aus den Antikörpern und den daran gebundenen hämatopoetischen Zellen und Erythrozyten. Um eine Auftrennung dieser Komplexe und der humanen mesenchymalen Stammzellen zu erreichen, wird das mit RosetteSep inkubierte Blut auf Lymphoprep aufgeschichtet und 20 min. bei 2000 rpm eine Dichtegradienten Zentrifugation durchgeführt. Anschließend kann die helle Interphase, die die humanen mesenchymalen Stammzellen enthält abgenommen werden. Diese wird mehrmals mit PBS gewaschen und im Medium für humane mesenchymale Stammzellen aufgenommen.

b) Preadipozyten

Humane subkutane Preadipocyten (PA) wurden aus Fettgewebebiopsien von gesunden Patienten im Alter zwischen 18-40 Jahren isoliert. Das Fettgewebe wurde mit Skalpell im Zellkulturlabor zerschnitten und die Blutgefäße entfernt. Die zerkleinerten Fettproben wurden anschließend 1 h bei 37°C in Kollagenase (30mg/ml in DMEM:F12) geschüttelt. Die nach 1 h verdauten Proben wurden durch ein grobmaschiges und danach durch ein feinmaschiges Sieb filtriert, um alle unverdauten Bestandteile herauszufiltern. Das Filtrat wurde anschließend bei 1000rpm 5 min. zentrifugiert. Das auf diese Weise entstandene Pellet wurde in 5 ml Red Cell Lysis Buffer aufgenommen und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 1000rpm 5 min. lang zentrifugiert und das Pellet wurde in Kulturmedium aufgenommen.

c) Monozyten

Monozyten wurden aus humanem Vollblut isoliert. Um eine Auftrennung der verschiedenen Blutzellen zu erreichen, wurde das Blut 1:2 mit 1xPBS verdünnt, auf Lymphoprep aufgeschichtet und zentrifugiert. Da Monozyten den Oberflächenmarker CD14 exprimieren, wurden CD14 MicroBeads genutzt, um Monozyten spezifisch aus der Population mononukleärer Zellen aufzureinigen. Die Phase mit Monozyten wurde gewaschen und 10^7 Zellen wurden in 80 µl Puffer (PBS 2mM EDTA) aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurden

20 µl CD14 MicroBeads hinzugegeben und 15 min. lang bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze jeweils mit 2 ml Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 500 ml Puffer aufgenommen. Die weitere Auftrennung der Monozyten erfolgte magnetisch mit Hilfe von AutoMACS (Milteniy).

2.3.4 PASSAGIEREN VON ZELLEN

Um die Zellen zu passagieren wurden diese in Trypsin/EDTA ca. 1 min. lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000rpm 5 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium in benötigter Menge auf neue Platten pipettiert.

2.3.5 DIFFERENZIERUNG DER ZELLEN

Für die Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzellen wurde DMEM 1g/l Glucose Medium mit 1% penicilin/streptomycin sowie 10% FBS verwendet. Hinzugegeben wurde:

a) Adipogenese

- 1 µmol/l Dexamethason (1 M)
- 5 µg/ml Insulin (Actrapid) (100 U/mL)
- 0,5 mmol/l IBMX (0,25 M)
- 60 µmol/l Indometacin (60 mM)

b) Osteogenese

- 0,1 µmol/l Dexamethason (1M)
- 0,05 mmol/l Ascorbinsäure (0,05 M)
- 10 mmol/l β-Glycerophosphat (1 M)

Das Differenzierungsmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

Für die Differenzierung der 3T3-L1 Zellen wurde DMEM 4,5g/l Glucose Medium mit 1% penicilin/streptomycin sowie 10% NCS verwendet. Hinzugegeben wurde:

Tag 0-2: 14,4 µl Insulin (Actrapid 100 U/ml)
 20 µl IBMX (0,25 M)
 10 µl Dexamethason (1M)

Tag 3-5: 14,4 µl Insulin (100 U/ml)

Tag 6-8: nur Differenzierungsmedium

2.3.6 ANFÄRZEN VON ZELLEN

a) Oil red O Färbung

Die Oil red O Färbung wird genutzt, um Triglyceride anzufärben. Die differenzierten Zellen wurden in PBS gewaschen und mit 5%iger PBS/Glutaraldehyd Lösung 5 min. lang fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit 60%igem Isopropanol gewaschen. Für die Färbung der Fetttröpfchen wurde eine 60% Oil-red O Lösung (Ausgangslösung 2,5 mg/ ml) benutzt, die 30 min. auf den Zellen inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen mehrfach mit 60% Isopropanol und anschließend mit 1x PBS gewaschen.

b) Alizarin red Färbung

Alizarin wird genutzt, um in Zellen die Osteogenese nachzuweisen. Dabei färbt das Alizarin das entstehende Hydroxylapatit, ein früher Hinweis für Knochenentstehung.

Differenzierte Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und mit 1%iger PBS/Formaldehyd Lösung 10 min. lang fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 1%iger Alizarin red S Lösung (Ausgangslösung 10mg/ml) 2 min. lang angefärbt. Um das überschüssige Alizarin zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit H₂O gewaschen.

2.3.7 FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)

Als Vorbereitung für die FACS Analyse müssen Zellen vorher, mit Farbstoff gekoppelten Antikörpern, markiert werden. Dazu eignen sich besonders Antikörper, die die

Oberflächenmarker (CD cluster of differentiation) der Zellen erkennen. Beim FACS werden Zellen, die sich in einer Lösung befinden und mit Antikörpern markiert wurden, durch eine Kapillare gesaugt. Dabei passieren die Zellen einen Laserstrahl und reflektieren Lichtsignale, die dann gemessen werden können. Die Menge des reflektierten Licht korreliert dabei mit der Größe und Beschaffenheit der Zellen.

4×10^5 Zellen wurden pro FACS Röhrchen eingesetzt. Die Röhrchen wurden bei 1000 rpm 5 min. lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem PBS-FBS Säure Mix (2% FBS, 0,05% Na-Acid) resuspendiert und 15 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation mit den gewünschten Farbstoffmarkierten Antikörpern (10 µl) bei 4°C mit einer anschließenden FACS Analyse im FACScan (BD, Becton Dickinson).

2.4 PROTEINAUFARBEITUNG

Alle Proteinextraktionsschritte erfolgten auf Eis bei 4°C, um eine Degradierung der Proteine zu vermeiden. Die Zellen wurden vorher mit kaltem 1x PBS gewaschen und je nach Bedarf mit unterschiedlichen Lysispuffern lysiert. Für den Nachweis von β -catenin wurde ein hypotoner Lysispuffer verwendet, um cytosolisches β -catenin von membranständigem zu trennen. Die Zellen wurden in diesem Puffer abgekratzt und bei 4°C und 13.000rpm 10 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Herstellung nicht fraktionierter Zelllysate wurde der Ripa-Puffer verwendet.

2.4.1 GEWINNUNG VON KERNEXTRAKTEN

Die Zellen wurden mit kaltem 1x PBS gewaschen und in kaltem 1x PBS abgekratzt. Anschließend wurden diese bei 2000 rpm 1 min. lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl Lysis Puffer aufgenommen und 5 min. auf Eis inkubiert. Zwischendurch wurde das Pellet gemischt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 1 min. bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Pellet wurde in 300 µl Wasch Puffer resuspendiert. Nchfolgend wurde bei 10.000 rpm 1 min. lang zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Extraktions Puffer aufgenommen. Nach

15 min. bei 4°C wurde bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand, der die Kernextrakte enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.4.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER PROTEINE NACH BRADFORD

Der Bradford-Assay beruht auf der Anfärbung der Proteine durch den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250 bei Bindung an aromatische oder basische Aminosäuren. Dabei verursacht der Kontakt von Proteinen mit dem Farbstoff eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von rot (595 nm) nach blau (465 nm) in Abhängigkeit der Menge der vorhandenen Proteine in der Probe. Die Erhöhung der Absorption wird bei 595 nm gemessen. Die vorhandene Proteinmenge in der Probe kann anhand von Standardlösungen mit bekannten BSA Mengen ermittelt werden. Dazu wird die Bradford Lösung 1:5 mit dH₂O verdünnt und mit jeweils 1 µl des zu messenden Proteins in 96 well Platten vermischt.

Standartlösungen:

Eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration [100µg/ml] wurde verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen von 1-2,5-5-10 µg/µl zu erhalten. Nach Zugabe des Bradfordreagenzes wurde die Absorption bei 595nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nachfolgend durch den Abgleich des Absorptionwertes des Proteins und der Absorptionwerte der Eichgeraden bestimmt.

2.4.3 AUFTRENNUNG VON PROTEINEN MITTLES SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Das SDS-PAGE wird allgemein zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht verwendet. Das anionische Detergenz SDS überlagert dabei die Eigenladungen der Proteine, sodass eine konstante Ladungsverteilung vorliegt und die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Bevor die Proteine auf ein SDS-Gel geladen werden, müssen diese bei 95°C denaturiert werden, um Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen aufzubrechen. Das Gel selbst, welches aus Polyacrylamid besteht, stellt eine Art Sieb dar.

Wird eine elektrische Ladung angelegt, bewirkt diese eine Wanderung der negativ geladenen Proben. Dabei können kleinere Proteine schneller durch die Maschen wandern als die größeren Proteine, die zurückgehalten werden und sich deshalb deutlich langsamer durch das Gel bewegen, wodurch eine Auftrennung nach Molekulargewicht erreicht wird.

Die Gele zur Auftrennung von Proteinen bestehen meist aus dem so genannten Sammelgel und dem Trenngel. Das Sammelgel besteht aus 5 % Acrylamid. Dieses gewährleistet einen gleichzeitigen Auftrennungsstart der Proteine, da diese im Sammelgel fokussiert werden. Zur anschließenden Auftrennung dient das Trenngel. Dieses kann je nach Proteingröße 6%-20% Acrylamid enthalten. Dabei werden die Maschen innerhalb des Gels mit einer höheren Acrylamid-Konzentration kleiner und ermöglichen dadurch eine bessere Auftrennung der kleinen Proteine.

Die Polymerisierung der Gele wird durch die Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) erreicht. Um später die Größen der Proteine zu erkennen, wird neben den Proben auch ein Größenmarker mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100-130 V.

2.4.4 WESTERN BLOT

Der Western Blot wird verwendet, um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran (Nitrozellulose, Polyvinylidenfluorid) zu übertragen. Ein senkrecht zum Acrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld sorgt für die Übertragung der Proteine. Diese werden dann mit Hilfe hydrophober Wechselwirkungen an der Oberfläche der Trägermembran fixiert.

Zur Vorbereitung des Western Blots muss zuerst das Whatman-Papier, bei dem es sich um ein spezielles Blottingpapier handelt, sowie die Trägermembran auf die Größe des Gels zugeschnitten werden. Polyvinylidenfluorid-Membran wird ca. 1 min lang in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Whatman-Papier in den Transfer Puffer (APII) gelegt. Nun werden drei Whatman-Papiere auf die Blottingapparatur gelegt. Auf das Whatman-

Papier wird als nächstes die Trägermembran gegeben. Nachdem das Acrylamid-Gel auf die Membran gelegt wurde, werden die restlichen drei Whatman-Papiere darüber aufgeschichtet. Dabei sollte beachtet werden, dass keine Luftblasen sich einlagern, was den Transfer der Proteine auf die Membran stört. Der Transfer erfolgt bei 200mA. Die Dauer des Transfers ist von der Größe der Proteine abhängig. Kleinere Proteine (ca. 50 kDa) werden 1h lang geblotet, die größeren (ab 100 kDa) ungefähr 1.30h-2h.

Nach dem Transfer wird die Membran 1h bei Raumtemperatur in ein Western Blocking Reagent (Roche) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wird die Membran mit dem gewünschten Antikörper entweder 1h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wird die Membran mit TBS-T fünfmal zehn min. lang gewaschen, um alle ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Nach den Waschsritten wird die Membran mit dem zweiten Antikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt und gegen eine konstante Region des ersten Antikörpers gerichtet ist, 1h lang inkubiert. Nach der Inkubation erfolgen erneut fünfmal zehnmütige Waschsritte mit TBS-T. Die Detektion erfolgt letztlich mit einem kommerziellen Zwei-Komponenten-Chemilumineszens-Kit („ECL“=„Enhanced Chemiluminescence“ bzw. „supersensitives ECL plus“ (Pierce).

2.5 REVERSE TRANSKRIPTASE (RT-PCR)

Mit Hilfe der reversen Transkriptase kann man RNA in cDNA umschreiben. In dieser Arbeit wurde folgender Ansatz gewählt:

- 2 µl Random Primer (Invitrogen)
 - 1 µl 10mM dNTP Mix
 - x µl DEPC- H₂O
 - 200 ng RNA
-
- 20 µl gesamt

Der Ansatz wurde 5 min. bei 65°C erhitzt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden folgende Bestandteile zugefügt:

- 4 µl 5 x First-Strand Buffer (Invitrogen)
- 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)
- 1 µl RNase Out Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)

Nach 2 minütiger Inkubation bei 42°C wurde 1 µl Superscript II RT hinzugegeben und 10 min. bei 25°C inkubiert. Bevor der Ansatz bei 70°C inaktiviert wurde, wurde dieser 50 min. bei 42°C inkubiert.

2.6 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

In der Molekularbiologie wird die Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA *in vitro* verwendet. Die PCR beruht dabei auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt, um eine Denaturierung zu erreichen. Anschließend erfolgt die Hybridisierung von Primern an die einzelsträngige DNA bei ca. 55°C. Bei den Primern handelt es sich um kurze Oligonukleotide, die komplementäre Sequenz zur amplifizierenden DNA haben müssen, um eine spezifische Bindung an die Ziel-DNA zu gewährleisten. Die Polymerase, nach der die Methode benannt wurde, ist eine weitere Schlüsselkomponente. Diese ist in der Lage die an die DNA gebundenen Primer, unter Verwendung von Nukleotiden, zu verlängern. Dieser weitere Schritt wird als Elongation bezeichnet. Dabei wird die Temperatur auf 72°C erhöht, um eine ideale Arbeitstemperatur für die Polymerase zu erreichen. Durch die ständige Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelt sich jedes Mal die Anzahl der kopierten DNA-Fragmente, so dass man am Ende der PCR ca. eine Million kopierter DNA-Fragmente erhält. In dieser Arbeit wurden folgende Protokolle verwendet:

DNA	1	µl
GoTaq Buffer 5x (Promega)	10	µl
GoTaq (Promega)	0,25	µl
wnt-5a Primer forward (10 pmol)	1	µl
wnt-5a Primer reverse (10 pmol)	1	µl
MgCl ₂ (25 mM)	3	µl
dNTPs (10 mM)	1	µl
DMSO	3	µl
dd H ₂ O	29,75	µl
gesamt	50	µl

PCR-Protokoll:

1:	1x	94°C	4 Min.
2:	30x	94°C	30 Sekunden
		50°C	45 Sekunden
		72°C	1 Minute
3:	1x	72°C	10 Min.
4:		4°C	unendlich

Anschließend wird die PCR auf ein Agarose-Gel geladen, um die amplifizierten DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen. Dabei macht man sich ein elektrische Feld zu nutze, da es sich bei DNA um ein Polyanion handelt, welches dann zu Anode wandert. Das Agarose-Gel funktioniert dabei nach einem Siebprinzip. Je höher konzentriert das Gel ist, umso besser kann man die kleineren Fragmente auftrenne, weil die größeren Fragmente durch das feinmaschige Gel zurückgehalten werden und langsamer wandern. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen wird dem Gel Ethidiumbromid zugefügt. Dieses interkaliert in Nukleinsäuren und emittiert nach Anregung durch UV-Licht Fluoreszenzlicht im Rotbereich.

2.7 REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

Die Real-Time quantitative PCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR (siehe Polymerase-Kettenreaktion). Jedoch ermöglicht die Real-Time PCR eine direkte Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR Zyklus durchgeführt werden. Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität proportional mit der Menge der entstehenden DNA-Fragmente zu. Für die Fluoreszenzmessungen können unterschiedliche Sonden verwendet werden. In dieser Arbeit wurden die so genannten TagMan®-Assays, bestehend aus einer Sonde und zwei Primern, benutzt. Als Kontrolle wurde eine Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) TagMan-Sonde benutzt. Weil HPRT ein „housekeeping“ Gen ist, kann es als Expressionskontrolle benutzt werden. Die TagMan-Sonden enthalten an ihren Enden einen Quencher und einen Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall das 6-FAM-phosphoramidit. Die mit einer 5'-Exonukleaseaktivität ausgestattete Taq-Polymerase löst während der Elongation den Reporterfarbstoff von der DNA ab. Durch die räumliche Trennung gibt der Reporterfarbstoff, nach Anregung, ein Fluoreszenzsignal bei 518 nm ab, welches gemessen wird. Findet die räumliche Trennung des Quenchers und des Reporters nicht statt, so unterdrückt der Quencherfarbstoff die Fluoreszenz des Reportefarbstoffs. Für die Durchführung der Real-Time PCR wurde folgendes Protokoll benutzt:

HPRT Taqman-Assay (20x)	1 µl
wnt-5a Taqman-Assay (20x)	1 µl
MasterMix (2x)	10 µl
cDNA	1 µl
dd H ₂ O	7 µl
<hr/> gesamt	<hr/> 20 µl

2.8 KLONIEREN

Um humanes wnt-5a zu klonieren, wurde aus humanen Blutmonozyten mit Hilfe eines RNeasy Mini Kits RNA isoliert. Diese wurde mittels einer SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Mit der erhaltenen cDNA wurde eine PCR mit den oben genannten wnt-5a Primern angesetzt (siehe Polymerase-Kettenreaktion). Nach der Agarosegel Auftrennung wurden die wnt-5a Fragmente ausgeschnitten und mit Hilfe eines kommerziellen Kits aufgereinigt.

2.8.1 LIGATION

Die erhaltene wnt-5a cDNA wurde anschließend mit Hilfe von Qiagen PCR Cloning Kit in einen pDrive Klonierungsvektor, nach den Empfehlungen des Herstellers, einkloniert.

pDrive Cloning Vector (50ng/μL)	1 μl
PCR Produkt (wnt-5a)	4 μl
dd H ₂ O	10 μl
Ligation Master Mix	5 μl
<hr/>	<hr/>
gesamt	20 μl

2.8.2 TRANSFORMATION

7 μl der auf diese Weise erhaltenen pDrive-wnt-5a Vektoren wurden zusammen mit 100 μl kompetenter Zellen (Omnimax) 20 min. lang bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 90 sek. langer Hitzeschock bei 42°C. Nachfolgend wurden die Zellen 5 min. lang bei 4°C ruhengelassen. Der Ansatz wurde anschließend in 400 μl LB Medium 1 h lang bei 37°C geschüttelt und jeweils 100 μl des Ansatzes wurden auf LB-Ampicilin Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht stehen gelassen. Über Nacht gewachsene Kolonien wurden am nächsten Tag gepickt und in 100 ml LB-Ampicilin-Medium 24 h geschüttelt. Nach 24 h wurde das LB-Medium zentrifugiert und eine Maxi Preparation des Pellets mit Hilfe kommerzieller Kits (Quiagen) durchgeführt. Damit das wnt-5a aus den pDrive Vektoren in pcDNA3.1 Expressionsvektoren umkloniert werden konnte, wurden die pDrive-wnt-5a Vektoren sowie die pcDNA3.1 Expressionvektoren anschließend mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut.

Vektor (pDrive-wnt-5a/pcDNA3.1)	1 µg
EcoRI	1 µl
EcoRI Buffer	1 µl
dd H ₂ O	x µl
<hr/>	
gesamt	10 µl

Die verdauten pDrive-wnt-5a Vektoren sowie verdaute pcDNA3.1 Vektoren wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente mit der richtigen Größe wurden ausgeschnitten und mit kommerziellen Kits aufgereinigt. Anschließend wurden die wnt-5a Fragmente mit den Verdauten pcDNA3.1 Expressionsvektoren ligiert.

EcoRI-wnt5a	10 µL
EcoRI-pcDNA3.1	7 µL
T4 Ligase	1 µL
T4 Ligase Buffer	2 µL
<hr/>	
gesamt	20 µL

Um eine Fehlligation auszuschließen, wurden die neuen Konstrukte (pcDNA3.1-wnt-5a) anschließend sequenziert.

2.9 IMMUNFLUORESCENZ

Die Immunfluoreszenz wird für den spezifischen Nachweis von Proteinen innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes benutzt. Der erste Antikörper ist spezifisch und hat eine hohe Affinität gegenüber dem gesuchten Protein. Ein zweiter Antikörper, der mit Farbstoffen gekoppelt ist, bindet an den Protein-Erstantikörper Komplex. Die gekoppelten Farbstoffe des zweiten Antikörpers emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, wenn sie selbst mit Photonen angeregt werden, und können auf diese Weise im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Bei der Immunfluoreszenz wurden die zu untersuchenden Zellen, die sich auf einem Deckgläschen befanden, einmal mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend für 5 min. mit eiskalten 100 % Methanol fixiert. Nach einem dreimaligen, je 5 minütigen Waschschrift

mit PBS wurden die Zellen mit 1% BSA in PBS (1% BSA/PBS) für 1 h geblockt. Hierauf folgte eine einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper bei Raumtemperatur. Hinterher wurden die Zellen dreimal für 10 min. mit 1% BSA/PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Auf die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgten drei zehnmütige Waschschrirte mit 1% BSA/PBS, um die nicht gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einem Tropfen Vectashield™ eingebettet und mit Nagellack auf einem Objektträger fixiert. Die Zellen wurden nachfolgend mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

2.9.1 IMMUNHISTOLOGIE

Humane Fettbiopsien wurden zunächst für 24 h in eine 4%ige PFA/PBS Lösung eingelegt. Nachfolgend wurden die Proben im Entwässerungsautomat über aufsteigende Alkoholreihe 40%, 55%, 70%, 90% und 100% Ethanol dehydriert und in Parafin eingebettet. Mit den eingebetteten Fettproben wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert, indem sie je 3 min. in Xylol und in 100% Ethanol getaucht wurden. Die Rehydrierung erfolgte durch eine fallende Alkoholreihe. Dazu wurden die Schnitte in 90%, 70% und 55% Ethanol getaucht. Die rehydrierten Proben wurden nachfolgend 3 h in einem Retrievelofen eingelegt, um eine Demaskierung der Antikörperbindestellen zu erreichen. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden jeweils zweimal 10 min. mit PBS gewaschen und anschließend 1 h in Rotiblock, welches 1:10 mit ddH₂O verdünnt wurde, geblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (wnt-5a 1:50 / Galectin-3 1:200) erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Schnitte wurden nachfolgend jeweils drei Mal für 5 min. mit PBS gewaschen und mit einem, mit HRP (horseredish peroxidase) gekoppelten zweiten Antikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend dreimal je 5 min. mit PBS gewaschen und in DAB (3,3'-diaminobenzidin) inkubiert. Das DAB wird als ein HRP Substrat benutzt und bildet ein braunes unlösliches Reaktionsprodukt. Sobald dieses sichtbar wurde, wurden die Schnitte mit ddH₂O gewaschen. Nach DAB erfolgte eine Gegenfärbung mit Hematoxylin, welches zum Färben der Zellkerne benutzt wird.

Anschließend wurden die Schnitte erneut dehydriert und eingedeckt. Die Analyse erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

2.10 ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

Der EMSA, auch band shift assay genannt, wurde zum Nachweis der Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotorsequenzen genutzt. Synthetische Oligonukleotide, die die Promotorbindestellen enthalten, wurden nach der Inkubation mit den nukleären Proteinextrakten auf einem Acrylamid-Gel mittels eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Dabei gilt dasselbe Prinzip wie beim Western Blot. Je feinmaschiger das Gel, desto langsamer laufen die größeren Protein-DNA Komplexe. Der so genannte „super-shift“ wird durch die Gabe eines Antikörpers erreicht. Dabei wird der Komplex aus Protein-DNA durch den Antikörper vergrößert, was dazu führt, dass dieser Komplex noch langsamer durch das Gel wandert. Die dabei eingesetzten Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit mit Biotin markiert. Um die Spezifität der Bindung zwischen dem Protein und den Oligonukleotiden zu zeigen, wurde eine Verdrängung mit unmarkierten Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei werden die unmarkierten Oligonukleotide in 200facher Menge zum Ansatz zugegeben. Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese mit Hilfe eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feld auf eine Biotinylated Nylon Membran übertragen. In dieser Doktorarbeit wurden 4% Acrylamid-Gele benutzt.

Als Vorbereitung für den EMSA Ansatz wurden die Zellen (C3H10T1/2) mit und ohne den wnt-5a Antikörper 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und Kernextrakte isoliert, die dann für den EMSA nach folgendem Schema eingesetzt wurden:

	<u>Kontrolle</u>	<u>Ansatz</u>	<u>200x Verdrängung</u>
dd H ₂ O	15 µl	x µl	x µl
Binding Buffer 10x	2 µl	2 µl	2 µl
dId C 1 µg/µL	1 µl	1 µl	1 µl
kalte Oligos 1 pmol/µL			4 µl
Kernextrakte		x µl (10 µg)	x µl (10 µg)
Biotin Oligos 10 fmol/µL	2 µl	2 µl	2 µl

Nachdem die Ansätze zusammenpipettiert wurden, wurden sie 40 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung der Kernproteine an die Oligonukleotide zu ermöglichen. Anschließend wurden die Ansätze auf 4% Acrylamid-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei maximal 70V und 4°C, weil die Wärmeentstehung die Bindungen zwischen den Oligonukleotiden und den Proteinen wieder auflösen können. Um den Transfer der aufgetrennten DNA-Protein Komplexe durchzuführen wurde die Membran sowie Whatman-Papier zurecht geschnitten und in 0,5fach TBE Puffer eingelegt. Anschließend wurde die Membran auf drei Whatman-Papiere gelegt, auf welche das Gel platziert wurde und von weiteren Whatman-Papieren bedeckt wurde. Der Transfer erfolgte 45 min. lang bei 350 mA. Nach dem Transfer wurden die DNA-Protein Komplexe mit Hilfe von UV-Stratalinker bei 254-nm an die Membran fixiert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Membran über Nacht geblockt. Die Inkubation mit dem Antikörper sowie die weiteren Entwicklungsschritte wurden nach den Anweisungen des Herstellers des EMSA-Kits (Pierce) durchgeführt.

2.11 PROMOTOR-REPORTERGEN-ANALYSE

Promotor-Reporter-Gen-Analysen werden zur Messung von Promotoraktivitäten eingesetzt. Dabei wird der zu untersuchende Promotor vor ein Luciferasegen in ein kommerzielles Plasmid kloniert, welches bei der Aktivierung des Promotors aktiviert wird. Das Enzym Luciferase katalysiert die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige oxidative Decarboxylierung

von Luciferin, unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562-nm, was bedeutet, viel Lichtemission entspricht in dieser Analyse einer hohen Promotoraktivität.



Für diese Arbeit wurden C3H10T1/2 Zellen auf 24-well Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von 80% mit den gewünschten Konstrukten (TOPFLASH, pGL2-AP1, pXP2-OPN) transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen stets mit 10ng pRL-CMV, einem ubiquitär aktivierten Promotor, zusätzlich transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Passiv Lysis-buffer (Promega), welcher vorher 1:5 mit dH₂O verdünnt wurde, lysiert. Alle weiteren Schritte wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Messungen wurden immer in dreifacher Ausfertigung mit einem Luminometer durchgeführt. Es wurde folgender Transfektionsprotokoll benutzt:

Luciferase-Plasmide (TOPFLASH, pGL-AP1, pXP2-OPN je 100ng/ µl)	2 µl
pcDNA3.1-EV / pcDNA3.1-wnt-5a (100ng/ µl)	2 / 5 µl
pRL-CMV (10ng/ µl)	1 µl
Fugene Transfection Reagent (Roche)	3 µl/1 µg DNA
Optimem	x µl
<hr/>	
gesamt	25 µl

3. ERGEBNISSE

3.1 HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN ZEIGEN IM GEGENSATZ ZU HUMANEN PREADIPOZYTEN EIN MULTIPOTENTES DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob wnt-5a eine Rolle in der Determinierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten hat. Da es keine etablierten humanen Zelllinien gibt, die zur Untersuchung des Determinierungsprozesses verwendet werden können, wurden folgende Ansätze gewählt. Es wurden zum Einen humane mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut von Neugeborenen isoliert, welche nachgewiesenermaßen multipotente Eigenschaften besitzen (Lee et al., 2004; Wang et al., 2004). Zum Anderen wurden Preadipozyten aus Fettbiopsien erwachsener, stoffwechselgesunder Menschen isoliert. Diese beiden Zellpopulationen wurden nachfolgend auf zellulärer und molekularer Ebene verglichen.

Da humane mesenchymale Stammzellen sowie die humanen Preadipozyten morphologisch von einander nicht zu unterscheiden sind (Abb.2), wurden als erstes FACS Analysen durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich diese Zellpopulationen im Hinblick auf ihre Oberflächenmarker-Expression unterscheiden.

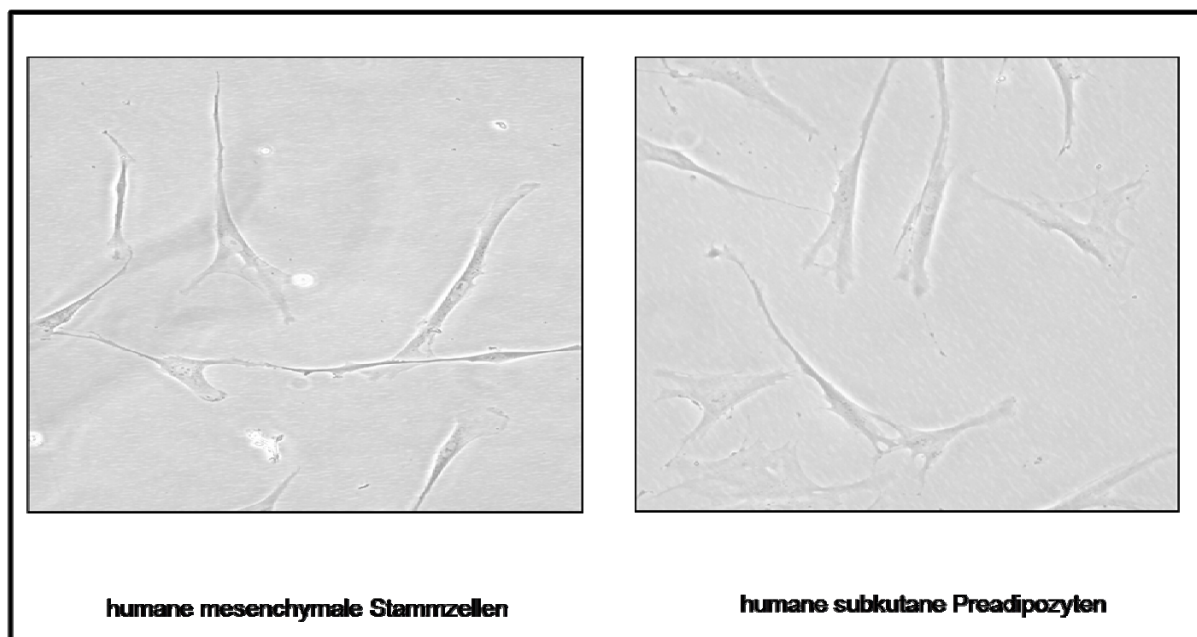


Abbildung 2. Morphologie der humanen primären Zellen.

Links: humane mesenchymale Stammzellen. **Rechts:** humane subkutane Preadipozyten.

Beide Zellpopulationen waren positiv für die mesenchymalen Oberflächenmarker CD29, CD44 und CD73 und negativ für die hämatopoetischen Oberflächenmarker CD34 und CD45 (Abb.3). Dies zeigt zum Einen, dass sich die Zellpopulationen in der Oberflächenmarkerexpression nicht unterscheiden, zum Anderen, dass die Zellpräparationen keine Kontaminationen mit Blutzellen aufweisen.

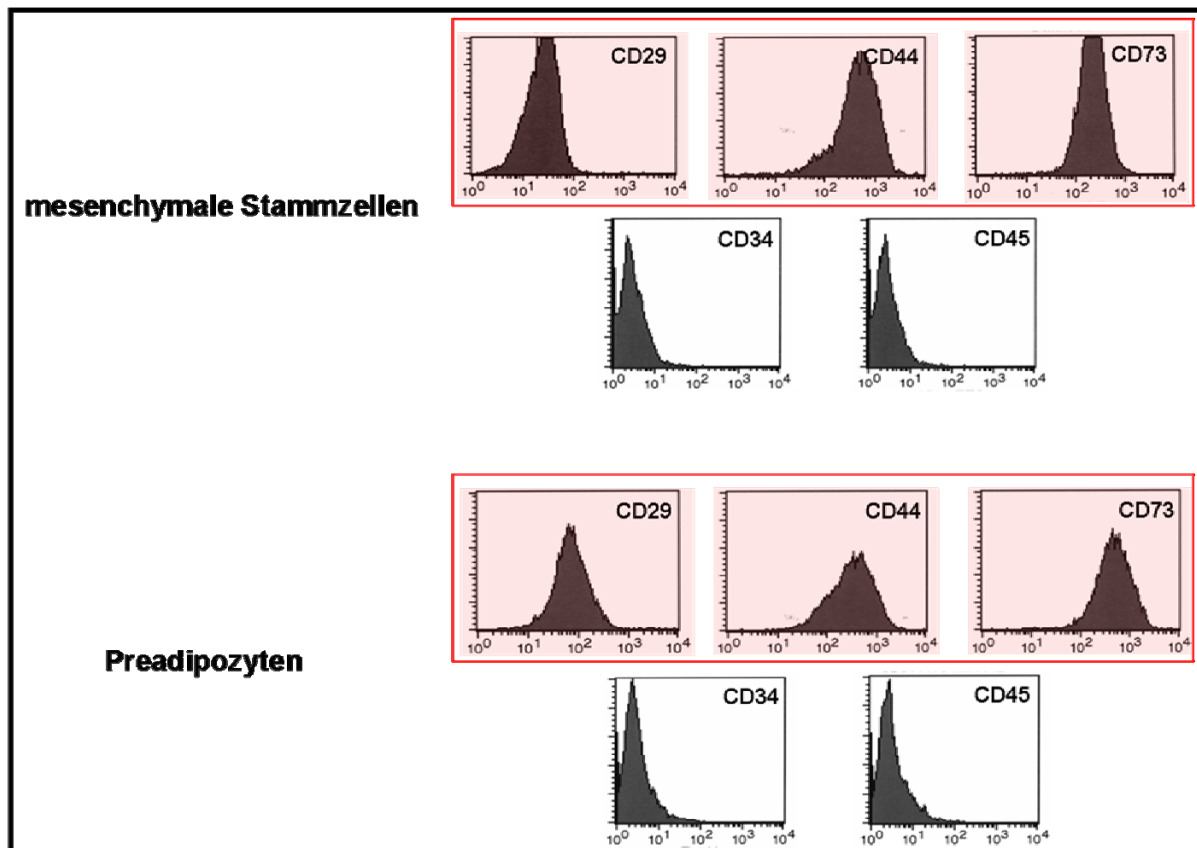


Abbildung 3. Expression mesenchymaler Oberflächenmarker

Humane mesenchymale Stammzellen und humane Preadipozyten exprimieren die typischen mesenchymalen Oberflächenmarker CD 29, CD 44, CD 73. Eine Expression hämatopoetischer Oberflächenmarker CD34 und CD45 konnte in diesen Zellen nicht detektiert werden.

Nachdem gezeigt wurde, dass sich humane mesenchymale Stammzellen und humane Preadipozyten weder morphologisch noch im Hinblick auf die Expression der Oberflächenmarker wesentlich unterscheiden, wurde nachfolgend das Differenzierungspotential dieser Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur humane mesenchymale Stammzellen in der Lage waren, sowohl Osteogenese als auch die Adipogenese zu durchlaufen, was zeigt, dass es sich bei diesen Zellen tatsächlich um multipotente Zellen handelt. Die humanen Preadipozyten dagegen zeigten nur eine

Differenzierung zu Adipozyten, nicht aber zu Osteozyten, was zeigt, dass die Preadipozyten ihre Multipotenz verloren haben und daher als determinierte Zellen nur noch zu reifen Adipozyten differenzieren können (Abb. 4).

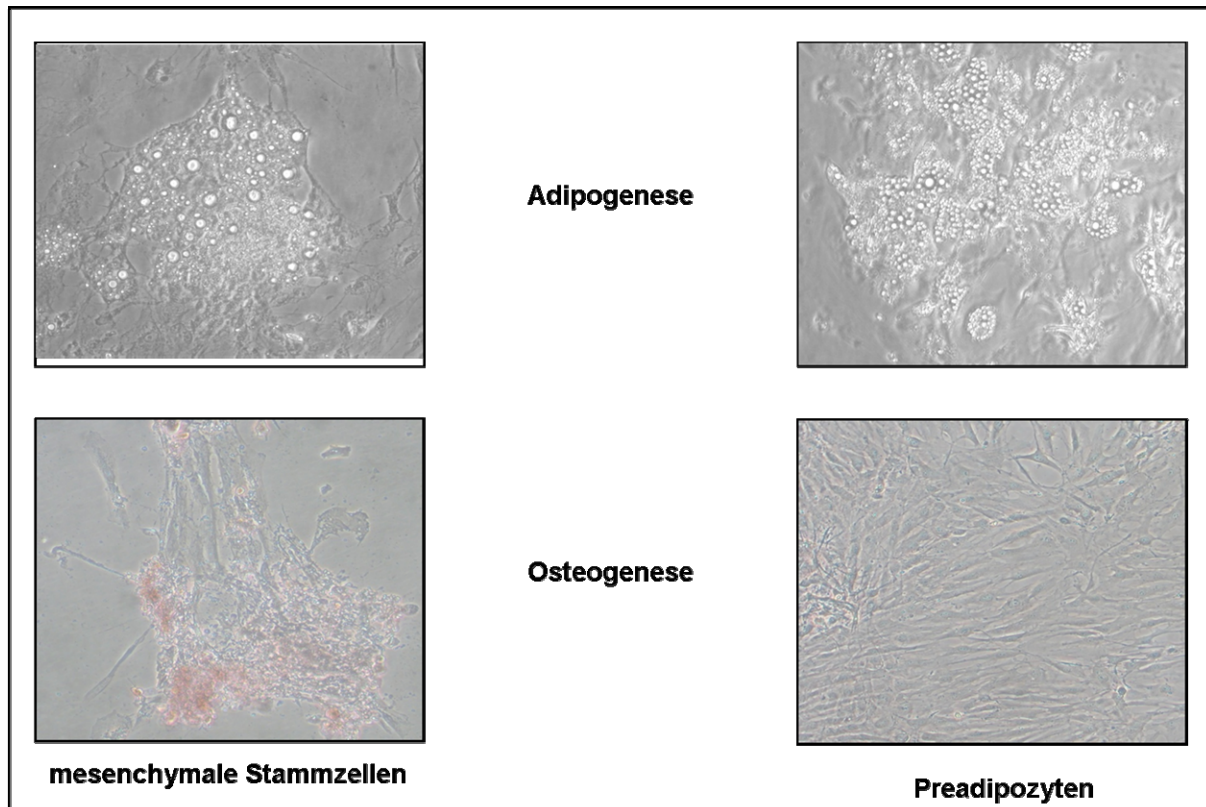


Abbildung 4. Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen und Preadipozyten

Links: mesenchymale Stammzellen differenzierten sowohl im Adipo- wie auch dem Osteogenese-Medium. **Rechts:** Preadipozyten zeigen nur im Adipogenese-Medium eine Differenzierung zu Adipozyten.

3.2 MESENCHYMALER STAMMZELLEN UND PREADIPOZYTEN ZEIGEN UNTERSCHIEDLICHE WNT-5A EXPRESSION

Aus den bis dahin durchgeführten Experimenten wird ersichtlich, dass die Preadipozyten bereits die Determinierung abgeschlossen haben und nur noch zu Adipozyten ausdifferenzieren können, wohingegen mesenchymale Stammzellen eine multipotente Differenzierungsfähigkeit besitzen. Deshalb eignen sich diese beiden Zellpopulationen besonders, um molekulare Mechanismen in der Determinierung genauer zu untersuchen. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass der Wnt-Signalweg bei der Osteogenese sowohl in Menschen wie auch in Mäusen eine wichtige Funktion hat. Dabei konnte gezeigt

werden, dass wnt-5a proosteogen wirkt (Baksh et al., 2007). Aus diesem Grund wurde die wnt-5a Expression zwischen den humanen mesenchymalen Stammzellen und den humanen Preadipozyten verglichen (Abb. 5).

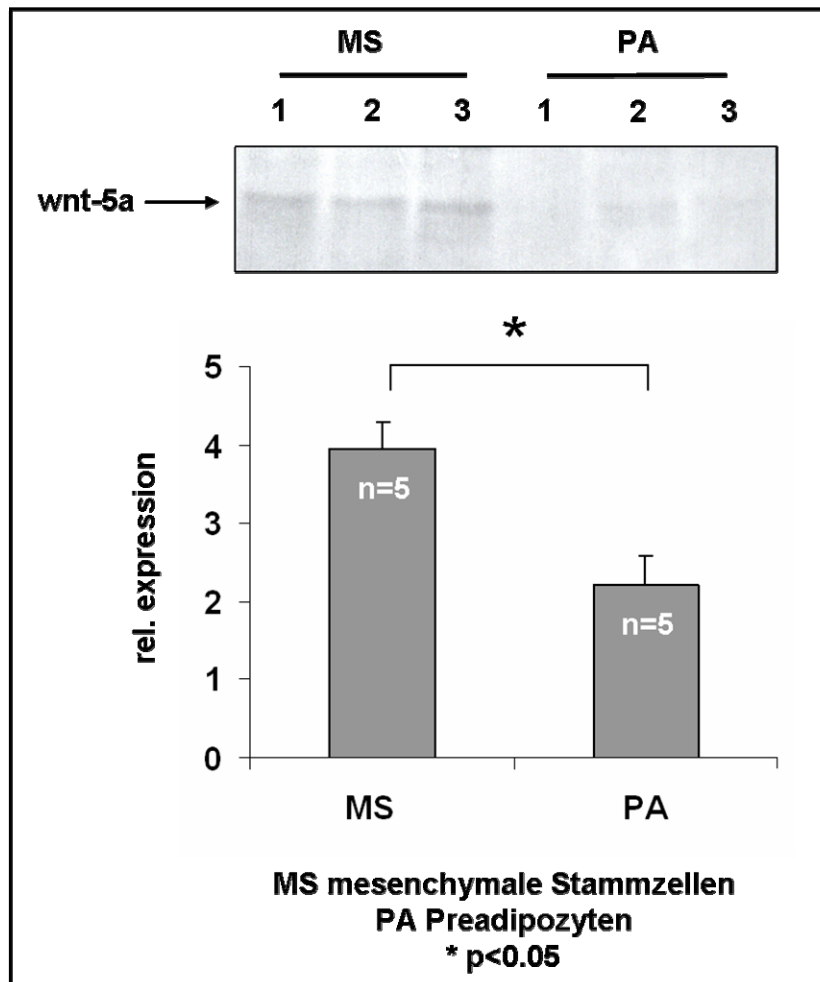


Abbildung 5. Wnt-5a Expression in mesenchymalen Stammzellen und Preadipozyten

Humane mesenchymalen Stammzelle (MS) zeigen eine signifikant höhere wnt-5a Expression verglichen mit humanen Preadipozyten (PA). Die wnt-5a Expression wurde densitometrisch auf eine unspezifische Bande normalisiert. * Student t-test p-Wert $\leq 0,05$

Es zeigte sich, dass die wnt-5a Expression in den multipotenten Stammzellen signifikant höher ist als in den determinierten Preadipozyten. Dieser Expressionsunterschied deutet darauf hin, dass die Verminderung der wnt-5a Expression eine Voraussetzung für den Verlust des Osteogenesepotentials und damit für die Determinierung der Zellen zu Preadipozyten sein könnte.

3.3 WNT-5A AKTIVIERT DIE OSTEOGENESE UND INHIBIERT DIE ADIPOGENESE.

Da festgestellt wurde, dass die wnt-5a Expression signifikant in den Preadipozyten herunterreguliert ist, sollte als nächstes der Einfluss dieses Moleküls auf den Verlauf der Osteo- und Adipogenese genauer untersucht werden. Bei den Wnt-Molekülen handelt es sich um sezernierte Glykoproteine, die ihre Wirkung sowohl para- wie auch autokrin entfalten. Durch die Zugabe eines neutralisierenden anti-wnt-5a Antikörpers in das Differenzierungsmedium kann eine „loss-of-function“ Situation in der Zellkultur erreicht werden, weil der Antikörper die Bindung von wnt-5a an die jeweiligen Rezeptoren unterbindet. Zusätzlich lässt sich durch Zugabe von rekombinanten wnt-5a eine „gain-of-function“ Situation in der Zellkultur erzeugen. In Anwesenheit solcher neutralisierenden Antikörper und des rekombinanten wnt-5a wurde dann die Adipogenese und die Osteogenese induziert. Dabei zeigte sich, dass der Wnt-Signalweg für den Verlauf der Osteogenese essentiell ist, da bei der Zugabe des neutralisierenden wnt-5a Antikörpers dieser inhibiert wurde. Deutlich sichtbar wird das anhand der Alizarinfärbung, bei der die Intensität der Färbung durch die Zugabe des neutralisierenden wnt-5a Antikörpers deutlich verringert wird (Abb. 6A). Auch auf der Proteinebene sind Unterschiede sichtbar. Durch die Zugabe des rekombinanten wnt-5a zeigt sich eine verstärkte Expression der Osteogenesemarker Osteopontin (OPN) und alkalische Phosphatase (ALP), welche sich durch die Zugabe des neutralisierenden wnt-5a Antikörpers verringern (Abb.6B+C).

Auf die Adipogenese dagegen hat wnt-5a eine umgekehrte Wirkung. Wird der wnt-5a Signalweg während der Adipogenese durch Zugabe neutralisierender Antikörper gehemmt, läuft diese verstärkt ab. Dies zeigt sich sowohl in der Akkumulation von Triacylglyceriden (Oil Red-O Färbung) als auch in der Expression des molekularen Markers PPAR γ (Abb.7A+B). Ein weiteres Indiz dafür, dass wnt-5a die Adipogenese hemmt ist die höhere Expression des Adipokins Adiponectin in Zellen, in denen die Adipogenese in Gegenwart von neutralisierenden wnt-5a Antikörpern induziert wurde (Abb.7B). Neben den „loss-of-function“ Experimenten wurden auch „gain-of-function“ Experimente durch Zugabe des rekombinanten

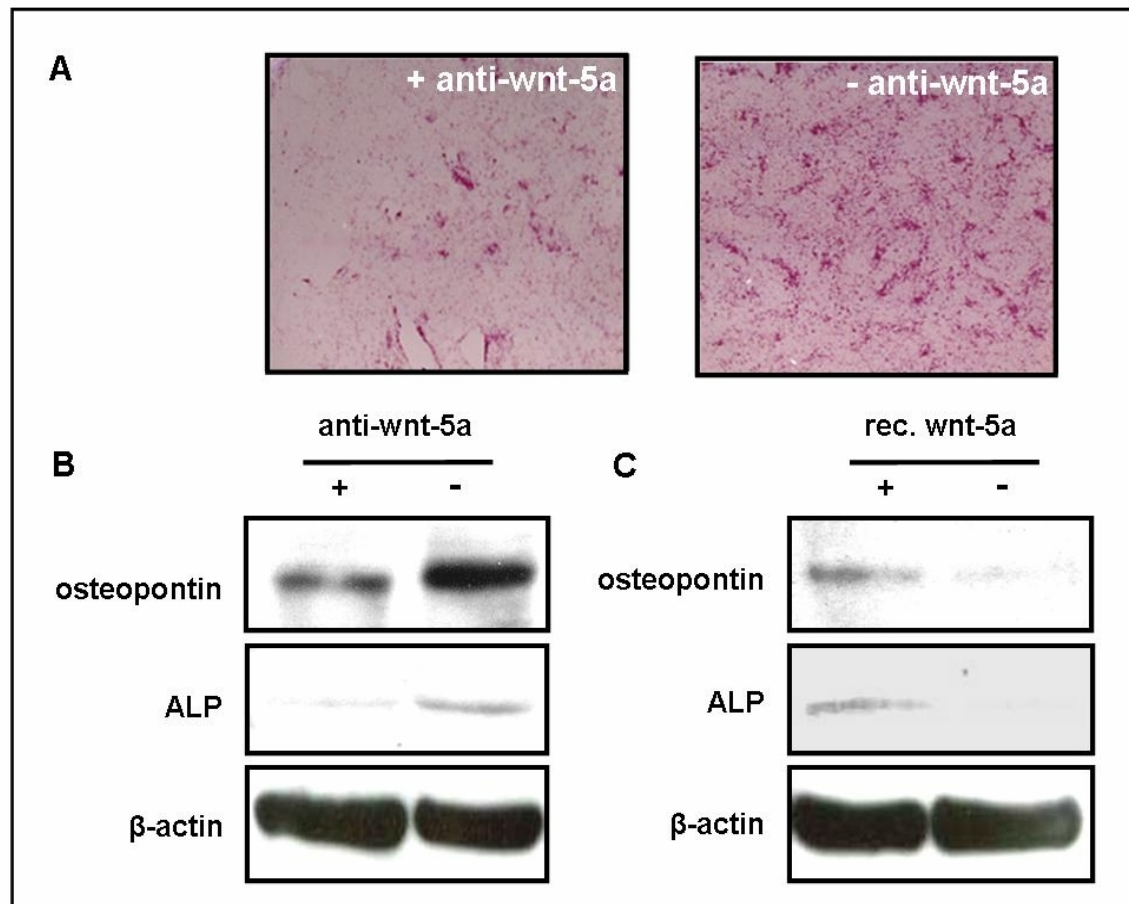


Abbildung 6. Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen im Osteogenese-Medium

A. Alizarin-Färbung differenzierter mesenchymaler Stammzellen mit Zugabe des neutralisierenden wnt-5a Antikörpers (+AK) und ohne den Antikörper (-AK). Expression von Osteogenesemarkern OPN (Osteopontin) und ALP (alkalische Phosphatase) nach 8 Tagen Differenzierung mit dem neutralisierenden Antikörper (B) und dem rekombinanten wnt-5a (C) (representatives Ergebnis aus n=3 unabhängigen Experimenten).

wnt-5a durchgeführt. Dabei wirkte die hohe wnt-5a Konzentration inhibierend auf die PPAR γ Expression (Abb.7C).

3.4 HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN EXPRIEREN ZENTRALE MOLEKÜLE DES KANONISCHEN UND DER NICHT KANONISCHEN SIGNALWEGE.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass wnt-5a als proosteogener und antiadipogener Faktor eine wesentliche Rolle in der Determinierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten spielt, sollten nachfolgend intrazelluläre Wnt Signalwege in humanen mesenchymalen Stammzellen charakterisiert werden. Es gibt Arbeiten, die gezeigt haben,

dass das wnt-5a in anderen Zellsystemen vor allem die nicht kanonischen Signalwege aktiviert (Dejmek et al., 2006; Pukrop and Binder, 2008). Aber auch ein Einfluss von wnt-5a auf den kanonischen β -catenin abhängigen Signalweg konnte in den letzten Jahren gezeigt werden (Hu et al., 2008; Nemeth et al., 2007). Daher wurde zunächst untersucht, welche Signalwege überhaupt in den humanen mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden. Dazu wurden humane mesenchymale Stammzellen lysiert und mit Hilfe von Western Blots das Vorhandensein der zentralen Moleküle verschiedener Signalwege (β -catenin, CamKII, JNK) überprüft.

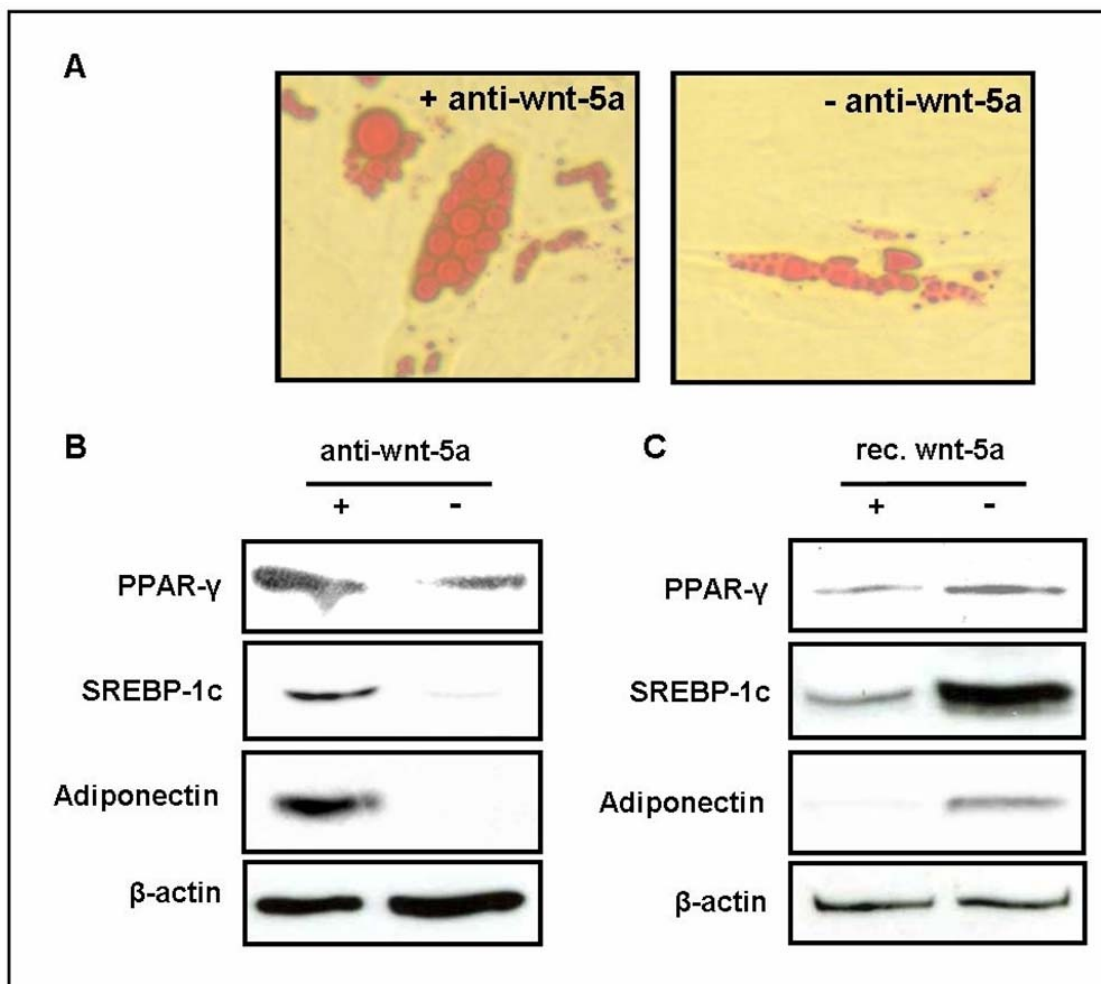


Abbildung 7. Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen im Adipogenese-Medium

A. Oil-red-O Färbung differenzierter mesenchymaler Stammzellen mit (+AK) und ohne (-AK) den neutralisierenden wnt-5a Antikörper. B. Expression der Adipogenese-Marker PPAR γ , SREBP-1c und des Adipokins Adiponectin nach 8 Tagen Differenzierung mit dem neutralisierenden Antikörper (B) und nach Zugabe von rekombinantem wnt-5a (C)

Wie der Abbildung 8 entnommen werden kann, sind alle Wnt-Signalwege in den humanen mesenchymalen Stammzellen vorhanden.

3.5 WNT-5A AKTIVIERT DEN JNK SIGNALWEG IN HUMANEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welcher der oben genannten Signalwege von wnt-5a in humanen mesenchymalen Stammzellen aktiviert wird. Weil dafür unter anderem Transfektionsexperimente notwendig waren und die primären Stammzellen eine sehr geringe Transfektionseffizienz mit klassischen liposomalen Methoden aufweisen, wurde hier zunächst auf die Maus-Stammzelllinie (C3H10T1/2) zurückgegriffen, die von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich für Determinierungsexperimente eingesetzt wurde (Iemata et al., 2007). Zuerst wurde der so genannte Ca^{2+} abhängige Signalweg untersucht. Dazu wurden C3H10T1/2 Zellen mit und ohne den neutralisierenden wnt-5a Antikörper 24 h inkubiert. Nach der Inkubation

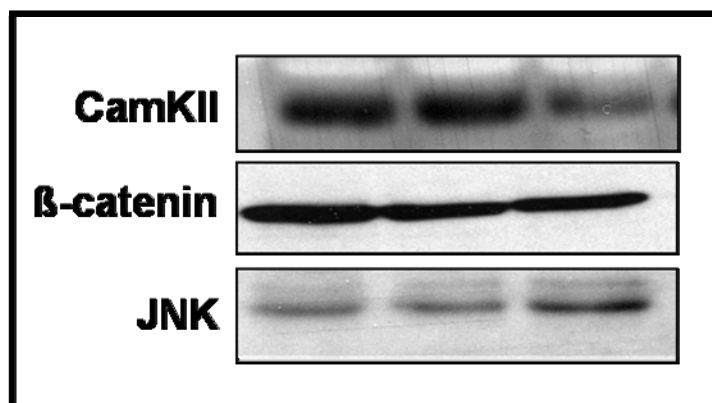


Abbildung 8. Expression der zentralen Signalmoleküle verschiedener Wnt-Signalwege in humanen mesenchymalen Stammzellen.

WB von n=3 unabhängiger Zellpopulationen.

wurden die Zellen lysiert und ein Western Blot hinsichtlich der aktiven (phosphorylierten) Form der Calmodulin abhängigen Kinase II (CamKII), die ein zentraler Bestandteil dieses Signalweges ist, durchgeführt. Wird der Signalweg aktiviert, so findet normalerweise eine erhöhte Autophosphorylierung von CamKII statt. In mit anti-wnt-5a behandelten Zellen zeigte sich in dem durchgeführten Experiment jedoch kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen, was dafür spricht, dass der Ca^{2+} abhängige Signalweg für wnt-5a in Maus mesenchymalen Stammzellen keine Bedeutung zu haben scheint (Abb.9).

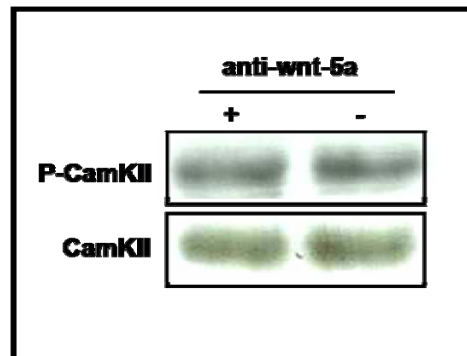


Abbildung 9. Einfluss von wnt-5a auf die CamKII-Aktivität in C3H10T1/2 Zellen.

Die Aktivität der CamKII wird nicht durch wnt-5a reguliert.

Um zu überprüfen, ob der kanonische Signalweg durch wnt-5a aktiviert wird, wurde die zytosolische β -catenin Konzentration untersucht. Dazu wurden die Zellen erneut 24 h mit und ohne den neutralisierenden wnt-5a Antikörpern inkubiert und anschließend mit einem hypotonen Lysispuffer lysiert, um das zytosolische β -catenin von dem membrangebundenen zu trennen. In diesem Experiment konnten keine Unterschiede in der β -catenin Konzentration zwischen den Kontrollzellen und den antikörperbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb.10), was nahelegt, dass auch der kanonische Signalweg keine Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion von wnt-5a in mesenchymalen Stammzellen spielt.

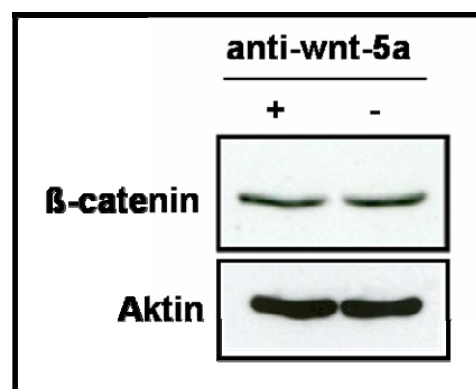


Abbildung 10. Einfluss von wnt-5a auf den kanonischen Signalweg in C3H10T1/2 Zellen.

Der kanonische β -catenin abhängige Signalweg wird nicht durch wnt-5a reguliert.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden zwei weitere Experimente durchgeführt. Zum einen wurde die Translokation von β -catenin mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen mit Lithiumchlorid behandelt, welches die Aktivität von GSK-3 β inhibiert und somit die Anreicherung von β -catenin im Nukleus fördert.

Im Gegensatz zu den Lithiumchlorid behandelten Zellen zeigten Zellen, die mit und ohne den wnt-5a Antikörper inkubiert wurden, keine β -catenin Translokalisierung in den Nucleus (Abb. 11).

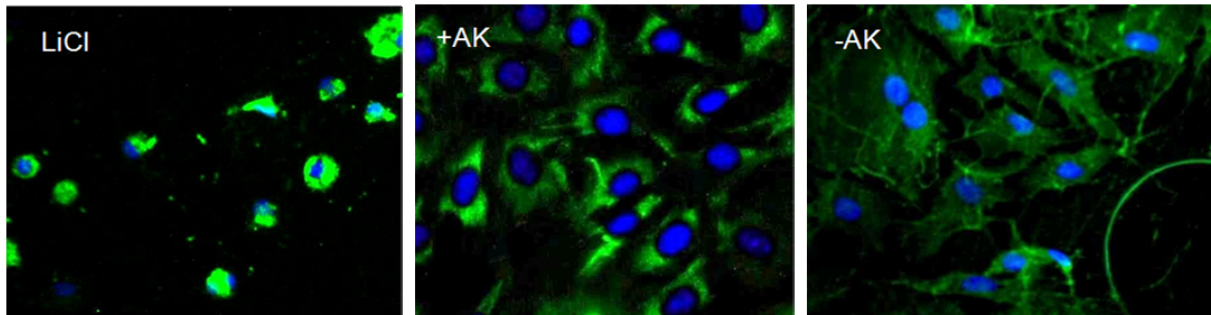


Abbildung 11. Immunfärbung von β -catenin in C3H10T1/2 Zellen.

Translokalisierung von β -catenin in den Nucleus. Kontrollzellen wurden mit LiCl behandelt, um den Abbau des β -catenins zu inhibieren. Zugabe des neutralisierenden wnt-5a Antikörpers (+AK) zeigt keine Auswirkung auf die β -catenin Lokalisation in mesenchymalen C3H10T1/2 Zellen verglichen zu unbehandelten Zellen (-AK)..

Als letztes wurden C3H10T1/2 Zellen mit einem Luciferase Reporterplasmid (TOPFLASH), welches multiple β -catenin-TCF Bindestellen aufweist, transfiziert. Transfizierte Zellen wurden wieder mit und ohne den neutralisierenden wnt-5a Antikörper für 24 h inkubiert.

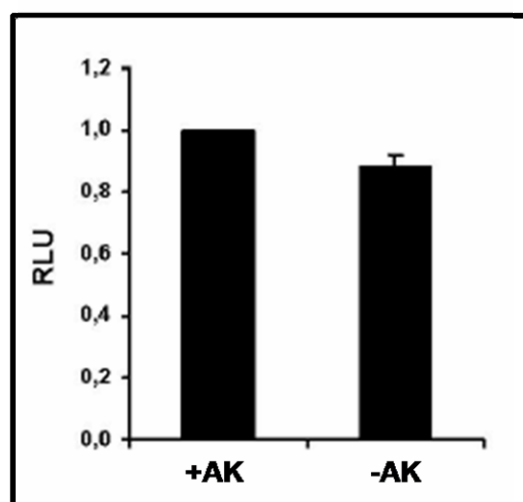


Abbildung 12. β -catenin Luciferase-Reporterplasmid-Analyse in C3H10T1/2 Zellen.

C3H10T1/2 Zellen wurden mit dem TOPFLASH plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit und ohne den neutralisierenden wnt-5a Antikörper inkubiert. Die Messung zeigt keine Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen.

Auch in diesem Fall konnte keine unterschiedliche Aktivität des Luciferase Reporters zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen beobachtet werden (Abb.12). Alle diese

Ergebnisse bestätigen, dass das wnt-5a den kanonischen β -catenin abhängigen Signalweg nicht aktiviert.

Um den JNK-Signalweg zu untersuchen, wurden die Zellen erneut mit und ohne den neutralisierenden wnt-5a Antikörper 24 h inkubiert. Da im Falle einer Aktivierung dieses Signalweges die JNK phosphoryliert wird, haben wir zuerst mit Hilfe eines Western Blots den Phosphorylierungsstatus von JNK in den Kontrollzellen und den mit Antikörper behandelten Zellen verglichen. In den Zellen, die vorher mit dem neutralisierenden wnt-5a Antikörper behandelt wurden, verlief die JNK Phosphorylierung deutlich schwächer als in Kontrollzellen ab, was dafür spricht, dass wnt-5a tatsächlich den JNK Signalweg aktiviert (Abb.13). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde ein EMSA Ansatz durchgeführt. Dazu wurden aus den mit neutralisierendem Antikörper behandelten und den Kontrollzellen Kernextrakte isoliert und mit Oligonukleotiden inkubiert, die eine c-jun Bindungsstelle besitzen. In diesem Experiment zeigten nur die Kontrollzellen, die nicht mit dem neutralisierenden wnt-5a Antikörper behandelt wurden, eine Bindung von c-jun an die entsprechende Promotorbindungsstelle (Abb.14).

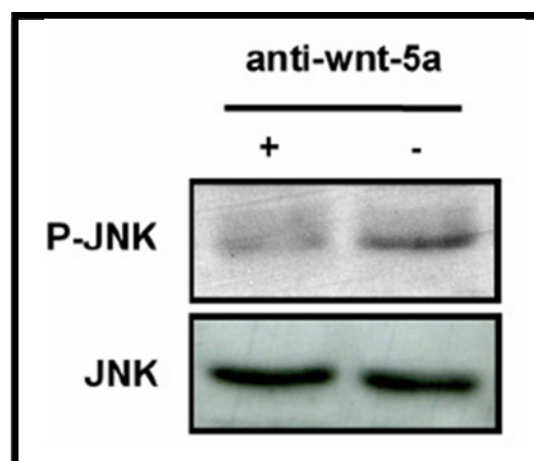


Abbildung 13. Einfluss des wnt-5a auf den JNK Signalweg in C3H10T1/2 Zellen.

C3H10T1/2 Zellen zeigen eine verminderte Phosphorylierung der JNK-Kinase, wenn sie mit neutralisierenden wnt-5a Antikörper inkubiert wurden.

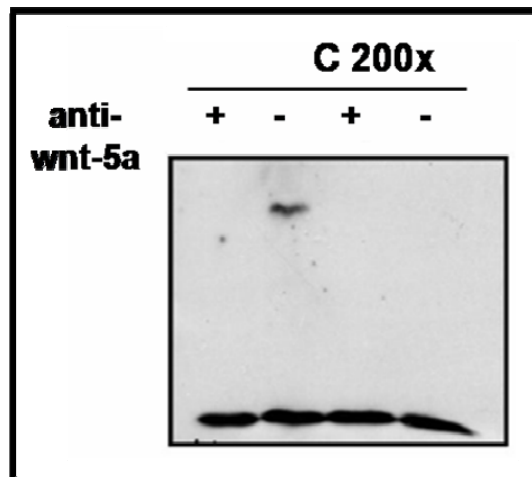


Abbildung 14. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in C3H10T1/2 Zellen.

C3H10T1/2 Zellen wurden 24 h mit und ohne den neutralisierenden wnt-5a Antikörper inkubiert. Aus diesen Zellen isolierte Kernextrakte wurden mit Oligonukleotiden, die eine AP-1 Bindestelle besitzen, inkubiert. (C200=200xVerdrängung)

Zusätzlich wurden Zellen mit einem Luciferase Plasmid transfiziert, das einen AP1 Promotor enthält. Der AP1 Promotor wird durch die Bindung des c-juns aktiviert, was gleichzeitig auch die Aktivität des Luciferasegens fördert. Eine Behandlung dieser Zellen mit dem neutralisierenden wnt-5a Antikörper zeigte eine signifikante Reduzierung der Luciferase Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.15).

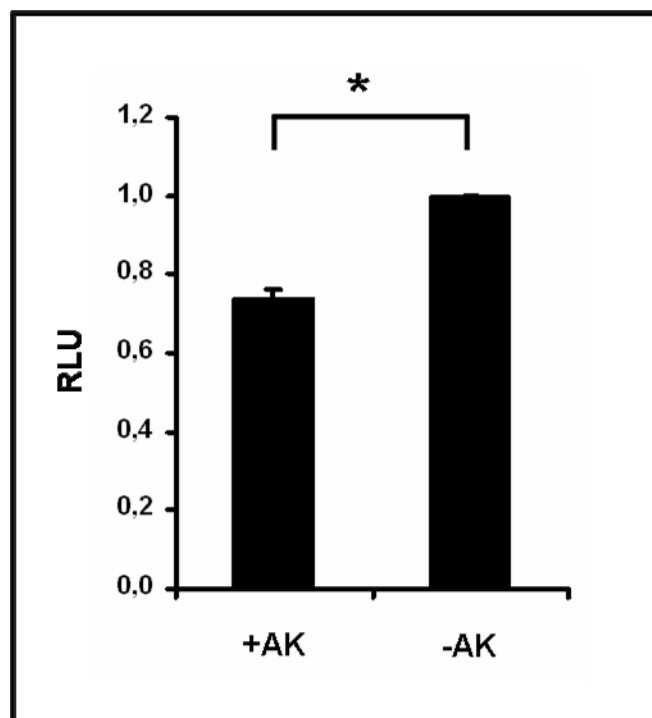


Abbildung 15. AP-1 Luciferase-Reporterplasmid-Analyse in C3H10T1/2 Zellen.

C3H10T1/2 Zellen wurden nach einer transienten pGL2-AP1 Transfektion 24 h mit und ohne den neutralisierenden wnt-5a Antikörper inkubiert. Bei loss-of-function des wnt-5a findet eine signifikant geringere Aktivierung des JNK Signalweges statt.

* Student t-test p-Wert $\leq 0,05$

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass nur der JNK Signalweg durch das wnt-5a in mesenchymalen Stammzellen aktiviert wird.

Ziel der Arbeit war es, die Rolle von wnt-5a in **humanen** mesenchymalen Stammzellen zu charakterisieren. Deshalb wurden die oben genannten Signalwege auf Proteinebene abschließend auch in humanen Stammzellen untersucht, was verdeutlicht, dass auch hier der JNK Signalweg von essentieller Bedeutung ist. Hier zeigte sich ebenfalls nur im Falle des JNK Signalweges eine Aktivierung durch das wnt-5a Molekül. Der kanonische β -catenin sowie der Ca^{2+} Signalweg blieben unbeeinflusst (Abb. 16).

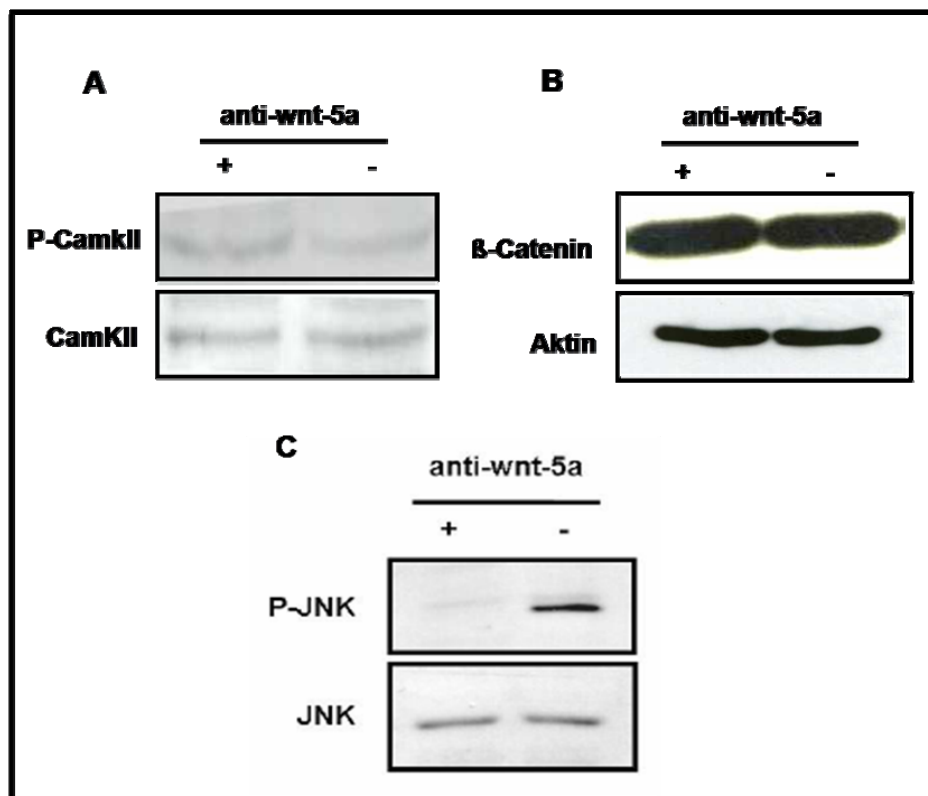


Abbildung 16. Einfluss des wnt-5a auf die zentralen Moleküle der Wnt-Signalwege in humanen mesenchymalen Stammzellen.

Die erhaltenen Daten aus C3H10T1/2 Zellen wurden in humanen mesenchymalen Stammzellen via Western-Blot verifiziert. A: keine Unterschiede in der CamKII Aktivität durch Zugabe des neutralisierenden wnt-5a Antikörpers. B: nicht kanonischer Signalweg wird durch wnt-5a nicht beeinflusst. C: wnt-5a aktiviert den JNK-Signalweg in humanen mesenchymalen Stammzellen.

3.6 WNT-5A REGULIERT DIE OSTEOPONTIN PROMOTORAKTIVITÄT IN DEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN.

Nachdem in der Arbeit gezeigt wurde, dass wnt-5a eine funktionelle Relevanz im Determinierungsprozess multipotenter humaner mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten hat und der JNK Signalweg als entscheidend für die intrazelluläre Signaltransduktion identifiziert wurde, sollte nachfolgend ein potentiell Zielgen des wnt-5a Signals in mesenchymalen Stammzellen identifiziert werden. Datenbankrecherchen zeigten, dass der Osteopontin-Promotor eine c-jun Bindestelle besitzt. Um den Effekt des wnt-5a auf das Osteopontin zu untersuchen, wurde humanes wnt-5a mittels einer PCR amplifiziert und in ein pcDNA3.1 Expressionsplasmid kloniert. Das pcDNA3.1-wnt-5a wurde dann zusammen mit einem Luciferase Plasmid (pXP2-OPN), welches die Osteopontin Promotorsequenz von -88 bis +79 enthält, transient in C3H10T1/2 Zellen kotransfiziert. Wie aus der Abbildung 17 ersichtlich wird, wurde durch das wnt-5a eine erhöhte Aktivität des Osteopontin Promotors beobachtet, was zeigt, dass Osteopontin tatsächlich ein wnt-5a Zielgen ist. Um zu überprüfen, ob die Wirkung von wnt-5a auf den Osteopontin-Promotor JNK abhängig ist, wurde ein Teil der transfizierten Zellen mit dem JNK Inhibitor (SP600125) 6 h lang behandelt. Durch die Zugabe des JNK Inhibitors wurde die durch das wnt-5a angeregte Promotoraktivität von Osteopontin bis auf den Basalwert herunterreguliert (Abb. 17), was die Bedeutung dieses Signalweges für die wnt-5a Signaltransduktion weiter unterstreicht.

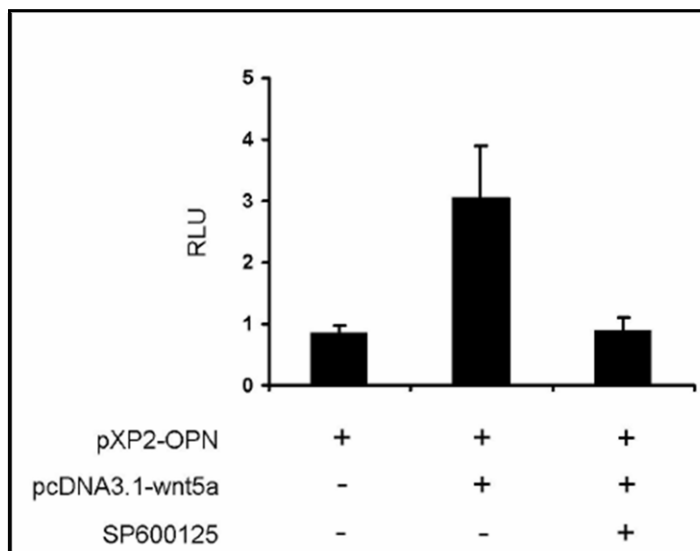


Abbildung 17. Osteopontin Luciferase-Reporterplasmid-Analyse in C3H10T1/2 Zellen.

C3H10T1/2 Zellen wurden transient mit pXP2-OPN (Osteopontinpromotor) Plasmid transfiziert und ein Teil der Zellen wurde vor der Messung mit dem neutralisierenden Antikörper behandelt. Die Messung zeigt, dass wnt-5a die Promotoraktivität des Osteopontin fördert. Durch Zugabe des JNK Inhibitors SP600125 wurde die OPN-Promotoraktivität bis auf die Basalaktivität reduziert. Repräsentatives Ergebnis aus n=5 Experimenten

3.7 WNT-5A WIRD VON DEN ZIRKULIERENDEN BLUTMONOZYTEN UND VON FETTGEWEBESTÄNDIGEN MAKROPHAGEN IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS EXPRIMIERT.

Viele Untersuchungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass Makrophagen im Fettgewebe adipöser Patienten die Funktion von Adipozyten über verschiedene Zytokine, z.B. TNF- α , beeinflussen. Es ist auf der anderen Seite aber auch bekannt, dass Blutmonozyten wnt-5a exprimieren und sezernieren. Da in den zuvor berichteten Experimenten gezeigt wurde, dass wnt-5a die Adipogenese hemmt, sollte nachfolgend untersucht werden, ob in der Interaktion von Makrophagen und Adipozyten im Fettgewebe des Menschen wnt-5a neben klassischen Zytokinen eine Rolle spielt. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob humane Blutmonozyten und fettgewebeständige Makrophagen wnt-5a exprimieren. Dazu wurden humane Monozyten aus Blutproben isoliert. Mit Hilfe einer semiquantitativen PCR konnte gezeigt werden, dass wnt-5a in diesen Zellen exprimiert wird (Abb.18A). Für den wnt-5a Expressionsnachweis in humanen Makrophagen wurden Fettbiopsien von metabolisch gesunden Patienten gesammelt. Diese Fettbiopsien wurden zur Herstellung von Parafinschnitten verwendet. Mit den hergestellten Schnitten des Fettgewebes wurden Immunfluoreszenz Färbungen durchgeführt. Zum Nachweis von

eingelagerten Makrophagen innerhalb des Fettgewebes wurde für die Immunfluoreszenz ein Galectin-3 Antikörper verwendet, der spezifisch Makrophagen erkennt. Zusätzlich wurde mit den Parafinschnitten eine wnt-5a Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, um die wnt-5a Expression innerhalb des Fettgewebes zu identifizieren. Wie in Abbildung 18B gezeigt, exprimieren Makrophagen in humanem Fettgewebe wnt-5a. Um die Expression des wnt-5a in Blutmonozyten weiter zu untersuchen, wurden Blutproben von normalgewichtigen Personen und adipösen Patienten mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 gesammelt. Aus diesen Blutproben wurden Monozyten, welche dann zur Herstellung von RNA verwendet wurden, isoliert. Die aus den Monozyten gewonnene RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe einer wnt-5a-Taqman-Sonde wurde eine quantitative Real Time PCR mit der hergestellten cDNA aus den Blutmonozyten durchgeführt. In diesem Experiment zeigten adipöse Patienten keinen wnt-5a Expressionsunterschied zu normalgewichtigen Personen. Die wnt-5a Expression bei adipösen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 dagegen war signifikant vermindert im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden (Abb.19).

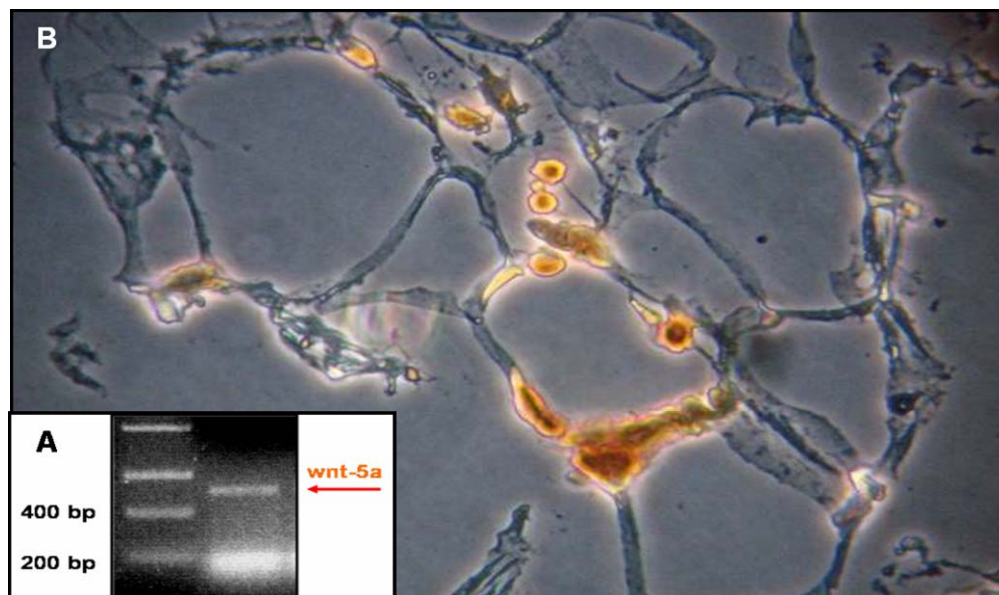


Abbildung 18. Wnt-5a Expression in humanen Monozyten und Makrophagen

A. semiquantitative PCR mit wnt-5a Primern und cDNA aus humanen Blutmonozyten. B. wnt-5a Immunhistologie von Makrophagen innerhalb des humanen Fettgewebes.

3.8 MAKROPHAGEN HABEN EINEN NEGATIVEN EFFEKT AUF DIE ADIPOGENESE

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob wnt-5a aus Makrophagen tatsächlich die Adipogenese hemmt. Dazu wurden 3T3-L1 Preadipozyten und J744A.1 Makrophagen verwendet. Die 3T3-L1 Zellen wurden 12 Tage in Kontrollmedium, Adipogenese Medium und zusätzlich in so genannten Makrophagen konditioniertem Medium inkubiert. Beim konditionierten Medium handelt es sich um Differenzierungsmedium, welches 6 h auf den J774A.1 Makrophagen inkubiert wurde. Das konditionierte Medium enthielt nun alle Faktoren, die von den Makrophagen sezerniert wurden, und wurde auf den 3T3-L1 Zellen inkubiert. Abbildung 20 zeigt, dass die von den Makrophagen ins Medium sezernierten Faktoren den Verlauf der Adipogenese negativ beeinflussen, wenn man diesen mit dem Standard Adipogenese Medium vergleicht.

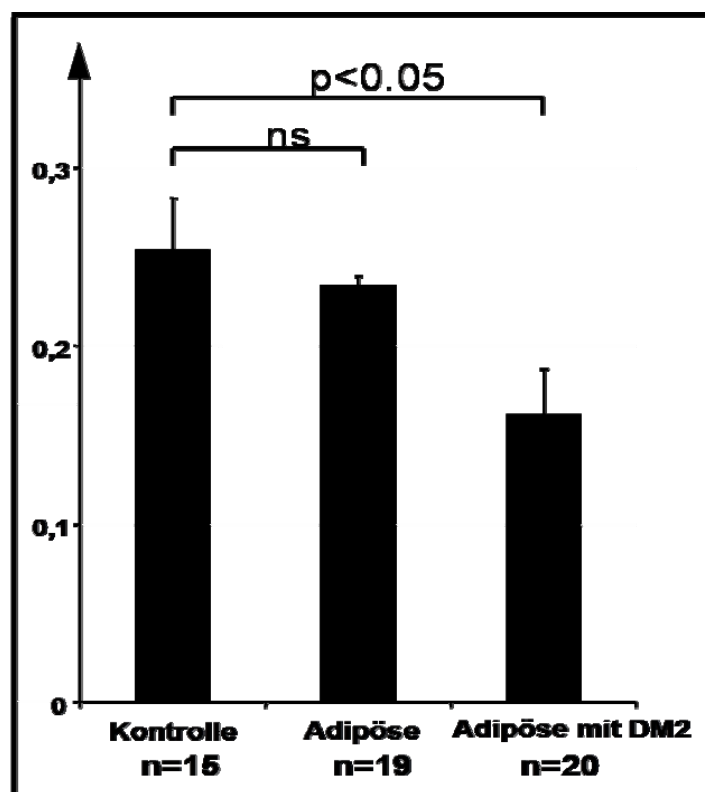


Abbildung 19. Real Time PCR.

Wnt-5a Expressionslevel in den Blutmonozyten von Normalgewichtigen (Kontrolle), Adipösen und Adipösen mit Diabetes mellitus Typ 2 (DM2). ns=nicht signifikant. Student t-test p-Wert $\leq 0,05$

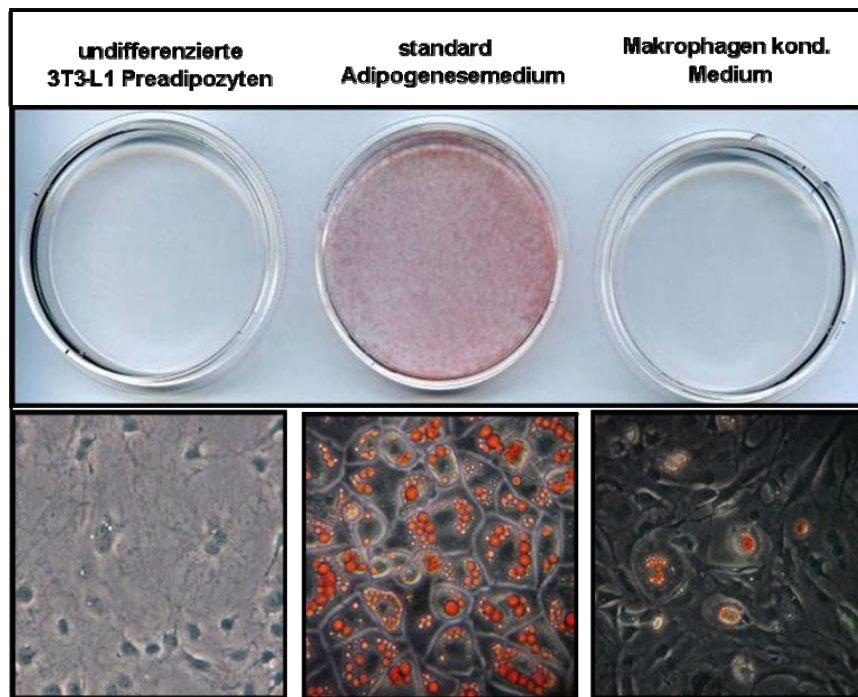


Abbildung 20. Einfluss des Makrophagen konditionierten Mediums auf den Verlauf der Adipogenese.

3T3-L1 Zellen wurden 12 Tage im Adipogenese-Medium inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde mit Makrophagen konditionierten Medium, welches sich vorher 6 h auf den Makrophagen (J744.A1) befand, inkubiert. Im konditionierten Medium wurde die Adipogenese inhibiert (rechts unten).

3.9 DAS VON DEN MAKROPHAGEN SEZERNIERTE WNT-5A INHIBIERT DIE ADIPOGENESE.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich das von den Makrophagen sezernierte wnt-5a den inhibitorischen Effekt bedingt, wurde zu einem Teil der 3T3-L1 Zellen mit Makrophagen konditioniertem Medium der neutralisierende wnt-5a Antikörper hinzugefügt. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Expression von PPAR γ sowie SREBP-1c, einem weiteren Adipogenese Marker, untersucht. Durch die Zugabe des Makrophagen konditionierten Mediums wurde die PPAR γ sowie SREBP-1c Expression unterdrückt. Die inhibierende Wirkung des konditionierten Mediums konnte durch die Zugabe des neutralisierenden Antikörpers aufgehoben werden. Sowohl die Inhibition von PPAR γ wie auch die von SREBP-1c wurden dadurch deutlich abgeschwächt, was zeigt, dass Makrophagen neben klassischen Zytokinen auch über wnt-5a die Adipogenese hemmen (Abb. 21).

3.10 DIE WNT-5A EXPRESSION IN MAKROPHAGEN WIRD DURCH EXTRAZELLULÄRE GLUKOSEKONZENTRATION REGULIERT.

Nachdem der inhibitorische Effekt des Makrophagen wnt-5a auf die Adipogenese gezeigt wurde, sollte als nächstes untersucht werden, wodurch die wnt-5a Expression in den Makrophagen reguliert wird. Zunächst wurde überprüft, ob die Insulinkonzentration die Intensität der wnt-5a Expression beeinflusst. Dazu wurden J774A.1 Makrophagen mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte ein Western-Blot, um die Expression des wnt-5a zu überprüfen. Wie man der Abbildung 22A entnehmen kann, hat die Insulinkonzentration keine Auswirkung auf die Expression von wnt-5a. Nachfolgend wurde überprüft, ob Glukose die wnt-5a Expression beeinflusst. Dazu wurden J774A.1 Makrophagen mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen inkubiert. Als osmotische Kontrolle wurde Sorbitol benutzt. Abbildung 22 B zeigt eine kaum noch vorhandene wnt-5a Expression bei einer Konzentration von 20 mM Glukose verglichen mit 5 mM Glukose. 20 mM Sorbitol dagegen haben keinen Einfluss auf die wnt-5a Expression, was zeigt, dass eine erhöhte Glukosekonzentration die wnt-5a Expression inhibiert.

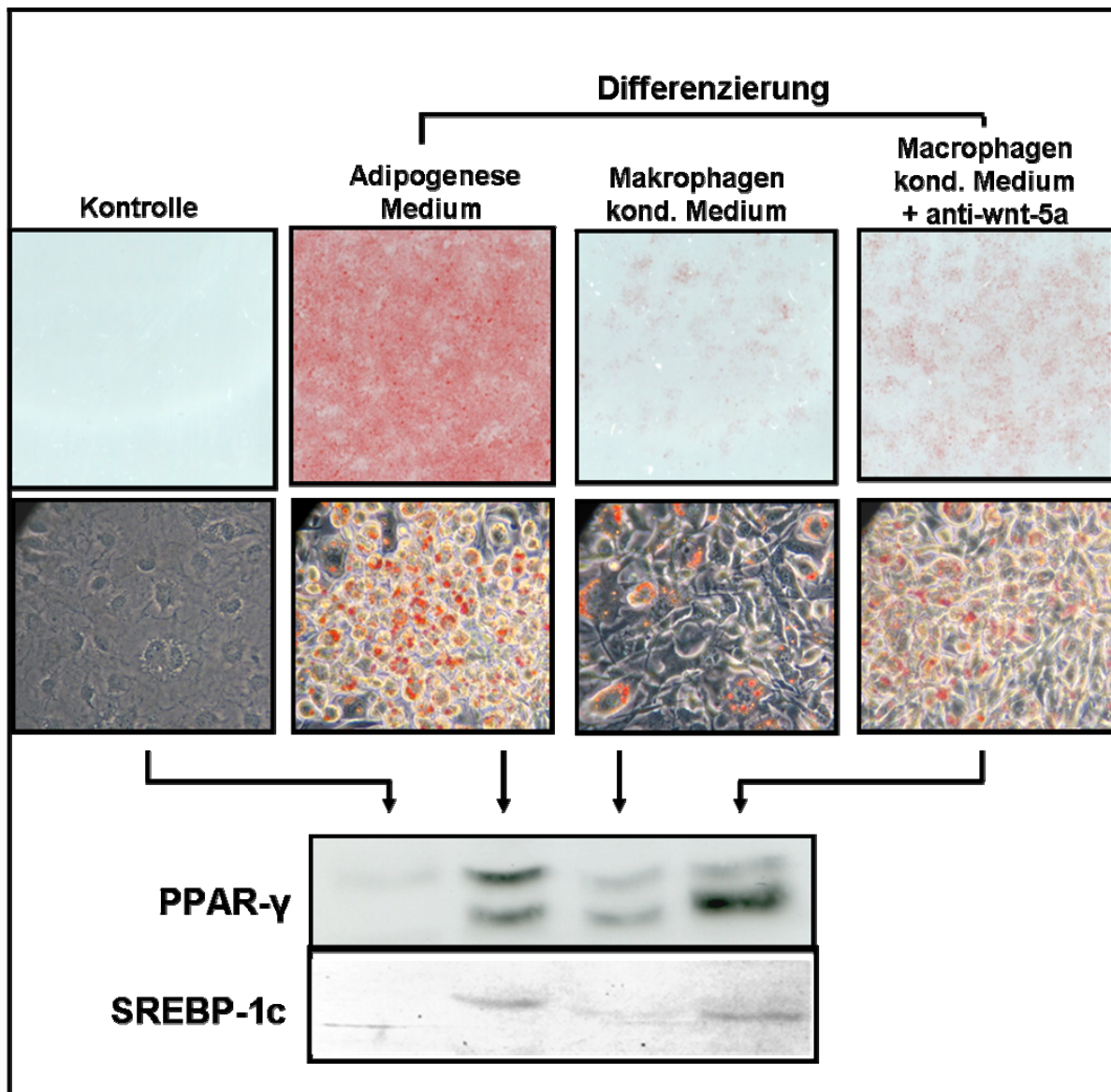


Abbildung 21. Makrophagen hemmen die Adipogenese über wnt-5a.

3T3-L1 Zellen wurden 12 Tage im Adipogenese-Medium differenziert. Neben dem Standard Adipogenese-Medium wurde ein Teil der Zellen mit konditioniertem Makrophagen-Medium und ein Teil mit konditioniertem Makrophagen Medium, dem zusätzlich ein neutralisierender wnt-5a Antikörper zugegeben wurde, inkubiert. Die inhibierende Wirkung des Makrophagen wnt-5a wurde mit Zugabe des neutralisierenden Antikörpers aufgehoben. Dieser Effekt zeigt sich auch auf der Proteinebene. Durch Zugabe des wnt-5a Antikörpers wurde sowohl die PPAR γ sowie die SREBP-1c Expression normalisiert.

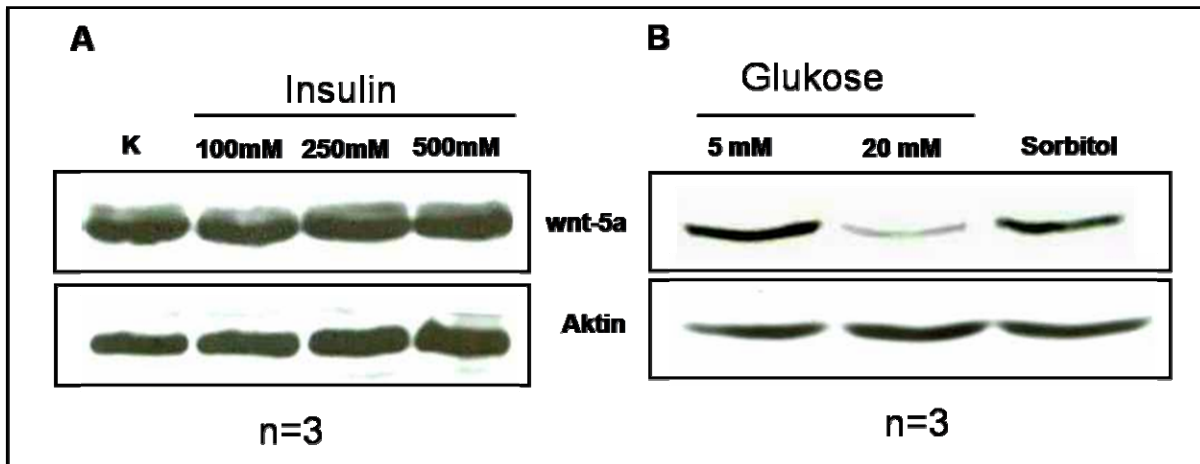


Abbildung 22. Glukoseabhängige wnt-5a Expression in den Makrophagen.

A. Insulin hat keinen Einfluss auf die Wnt-5a Expression in J744A.1 Makrophagen. B. Ein erhöhter Glukosespiegel inhibiert die wnt-5a Expression in den J744A.1 Makrophagen.

4. DISKUSSION

Im Fettgewebe reflektiert die Anzahl an Vorläuferzellen und reifen Adipozyten das Gleichgewicht zwischen Determinierung, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der mesenchymalen Stammzellen sowie der Preadipozyten. Dabei ist die Determinierung der mesenchymalen Stammzellen zu Preadipozyten bis heute wenig verstanden. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Verlauf der Determinierung untersucht. Die erhaltenen Daten deuten daraufhin, dass das Molekül *wnt-5a* in diesem Prozess eine zentrale Funktion übernimmt.

Da es keine geeignete Zelllinie gibt, um die Determinierung von mesenchymalen Stammzellen im menschlichen Organismus zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit humane primäre mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut und humane primäre Preadipozyten aus Fettgewebebiopsien auf zellulärer und molekularer Ebene verglichen. Zunächst stellt sich die Frage, ob die Zellen, die aus dem Fettgewebe erwachsener Menschen in dieser Arbeit isoliert wurden, wirklich Preadipozyten entsprechen. Dies wird zum Teil kontrovers diskutiert. Zum Einen konnte in einer aktuellen Publikation von Tang W. et al 2008 gezeigt werden, dass „Vorläuferzellen“ im Fettgewebe von Nagern bereits in der Perinatalperiode zur adipogenen Linie determinieren, d.h. in erwachsenen Tieren liegen tatsächlich meist Preadipozyten und nicht multipotente Stammzellen vor. Dazu passend konnte auch Tchoukalova et al. 2004/2006 im menschlichen Organismus zeigen, dass die meisten „Vorläuferzellen“ im Fettgewebe von Erwachsenen bereits den Adipozytenmarker FABP-4 exprimieren, was ebenfalls suggeriert, dass die Zellen echte Preadipozyten sind. Im Gegensatz zu diesen Arbeiten behaupten einige Autoren, dass es sich bei Zellen innerhalb des Fettgewebes von erwachsenen Menschen um multipotente Zellen handelt, die zu unterschiedlichen Zelllinien, wie z.B. Osteozyten und Adipozyten, ausdifferenzieren können (Vidal et al., 2008; Wagner et al., 2005). Jedoch konnte die Differenzierung dieser Zellen zu Osteozyten in der Regel nur mit Zugabe des bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), welches zusätzlich zum Standard Osteogenese-Medium hinzugefügt wurde, ausgelöst werden. Im Verlauf dieser Arbeit konnten die aus dem Fettgewebe isolierten Zellen unter Zugabe des Standard Osteogenese-Mediums nicht zu Osteozyten ausdifferenziert werden. Dies unterstützt die Aussage von Tchoukalova, dass

es sich bei diesen Zellen um bereits determinierte Preadipozyten handelt. Zusätzlich konnte Skillington et al. 2002 zeigen, dass mit Zugabe von bioaktiven Molekülen, wie dem BMP, wahrscheinlich eher eine Transdifferenzierung determinierter Preadipozyten zu Osteozyten stattfindet. Ergebnisse der vorgelegten Arbeit weisen in Übereinstimmung zu diesen Daten darauf hin, dass es sich bei Vorläuferzellen aus humanem Fettgewebe erwachsener um bereits determinierte Preadipozyten handelt, sodass diese als Modell für humane Preadipozyten genutzt werden können.

Zur Gewinnung humaner mesenchymaler Stammzellen wurde in der aktuellen Arbeit Nabelschnurblut von Neugeborenen verwendet. In einer Mehrzahl von Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei diesen Zellen aus dem Nabelschnurblut tatsächlich um multipotente Zellen handelt, was im Zuge dieser Arbeit bestätigt wurde (Chan et al., 2007; Lee et al., 2004). Sowohl die Adipogenese wie auch die Osteogenese konnte in diesen Zellen unter Verwendung der Standard-Medien, ohne Zugabe von BMPs oder PPAR γ Agonisten, induziert werden.

Um einen Einblick in den Verlauf der Determinierung zu erhalten, wurden die aus dem Nabelschnurblut isolierten mesenchymalen Stammzellen und aus dem Fettgewebe erwachsener Menschen isolierten Preadipozyten auf molekularer Ebene untersucht. Zunächst wurden Preadipozyten und humane mesenchymale Stammzellen auf zellulärer Ebene verglichen. Weil die Zellpopulationen morphologisch keine Unterschiede aufweisen (Abb.2), wurde die Oberflächenmarker Expression analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl humane mesenchymale Stammzellen als auch Preadipozyten die typischen mesenchymalen Oberflächenmarker CD29, CD44 und CD73 exprimieren. Eine Kontamination mit Blutzellen dieser Zellpopulationen lag nicht vor, da weder Preadipozyten noch mesenchymale Stammzellen eine Expression von hämatopoetischen Oberflächenmarker CD34 und CD45 aufwiesen (Abb.3). Deutliche Unterschiede dieser Zellpopulationen zeigten sich hingegen im Differenzierungsverhalten. Humane mesenchymale Stammzellen differenzierten sowohl in

Adipogenese- als auch in Osteogenese-Medium. Dagegen war die Differenzierung der Preadipozyten nur in Adipogenese-Medium möglich. Durch Zugabe des Osteogenese-Mediums wurden die Zellen nicht beeinflusst (Abb.4). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den humanen mesenchymalen Stammzellen tatsächlich um multipotente Zellen handelt. Die Preadipozyten sind dagegen bereits determiniert und können nur noch zu Adipozyten ausdifferenzieren.

2007 hatten sowohl Baksh D. et al als auch Guo J. et al einen Effekt von wnt-5a auf die Osteogenese feststellen können. Aus diesem Grund wurden in der aktuellen Arbeit Stammzellen und Preadipozyten auf die wnt-5a Expression untersucht. In Stammzellen wurde eine signifikant erhöhte wnt-5a Expression im Vergleich zu Preadipozyten nachgewiesen (Abb.5). Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied in der Expression auch von funktioneller Relevanz ist, wurden nachfolgend *loss-of-function* und *gain-of-function* Experimente durchgeführt. Da Wnt-Moleküle sowohl parakrin als auch autokrin wirken, kann durch Zugabe geeigneter neutralisierender Antikörper zum Zellkulturmedium dieser Signalweg inhibiert werden. Durch Zugabe von rekombinantem wnt-5a kann dieser stattdessen verstärkt werden (Abb.6). Die durchgeführten Experimente haben nachgewiesen, dass wnt-5a zum Erhalt des osteogenen Potenzials essentiell ist. Dies zeigt, dass die Abnahme der wnt-5a Expression ein wichtiger molekularer Regelmechanismus in der Determinierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten ist.

Die Auswirkung des wnt-5a auf den Verlauf der Adipogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen wurde ebenfalls mit Hilfe neutralisierender Antikörper untersucht. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein des wnt-5a einen negativen Einfluss auf den Verlauf der Adipogenese hat (Abb.7). In der Literatur wird die Auswirkung von wnt-5a auf die Adipogenese zum Teil kontrovers diskutiert. So behaupten Nishizuka et al. 2008, dass die Expression des wnt-5a die Adipogenese positiv beeinflussen soll. Gleichzeitig aber wurde in dieser Studie festgestellt, dass das wnt-5a in 3T3-L1 Zellen während der Differenzierung

herabreguliert ist. Takada I. et al. haben dagegen 2007 zeigen können, dass der wichtige molekulare Regulator der Adipogenese, PPAR γ , durch das wnt-5a auf molekularer Ebene inhibiert wird. Unsere Ergebnisse stimmen mit diesen Daten überein, denn im Rahmen dieser Arbeit konnte ein inhibierender Einfluss des wnt-5a auf die Adipogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden (Abb.7).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass der nicht kanonische JNK abhängige Signalweg sowohl in humanen mesenchymalen Stammzellen als auch in der murinen Stammzelllinie C3H10T1/2 durch wnt-5a induziert wird (Abb.13,16). Unsere Beobachtung wird durch die Arbeit von Matsuguchi T. et al. 2009 unterstützt, die ebenfalls eine besondere Bedeutung des JNK Signalweges während der Osteogenese beobachtet haben. JNK phosphoryliert den Transkriptionsfaktor c-jun, welcher dann unterschiedliche Gene aktivieren kann (Davis, 2000). Ein für die Osteogenese essentielles Gen ist das Osteopontin, welches eine c-jun Bindestelle innerhalb der Promotorsequenz besitzt (Denhardt and Guo, 1993). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass eine wnt-5a Überexpression zu einer erhöhten Aktivität des Osteopontinpromotors führt (Abb.17), was zeigt, dass Osteopontin ein direktes Zielgen des wnt-5a ist, dessen Signaltransduktion mit Hilfe des JNK-Signalweges vermittelt wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die meisten Vorläuferzellen innerhalb des Fettgewebes erwachsener Menschen bereits determinierte Preadipozyten sind und deshalb zur adipogenen Linie gezählt werden können. Dies wirft die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt die Determinierung in humanem Gewebe stattfindet. Wie bereits Tang W. et al. 2008 zeigen konnten, findet in Nagern eine Determinierung der Vorläuferzellen zu Preadipozyten entweder pränatal oder in einem sehr frühen postnatalen Stadium statt. Für die Situation in Menschen liegen dazu momentan wenige Daten vor. Diese Feststellung ist aber besonders interessant, weil einige Studien gezeigt haben, dass die humane perinatale Phase besonders sensitiv bei der Entwicklung von Fettleibigkeit und

Diabetes mellitus Typ 2 ist (Armitage et al., 2008; Laudes et al., 2009). Deshalb ist es in zukünftigen Studien wichtig zu untersuchen, ob die Determinierung von Stammzellen zu Preadipozyten in Menschen ebenfalls in der Perinatalperiode abläuft und ob Menschen, die im Laufe ihres Lebens eine Adipositas entwickeln, eventuell mehr Preadipozyten anlegen als Normalgewichtige, was die Neigung zu Adipositas erklären würde. Im Zuge dieser Arbeit wurde *wnt-5a* als ein wichtiger molekularer Faktor in der Determinierung nachgewiesen, sodass dieses Molekül zur Beantwortung dieser weiterführenden Fragestellung in der Zukunft gegebenenfalls als molekularer Marker genutzt werden kann.

Im Fettgewebe von adipösen Diabetikern wurden vermehrt Makrophagen gefunden, welche die Funktion der Adipozyten beeinflussen (Alexandraki et al., 2006; Bouloumie et al., 2005). In diesem Zusammenhang wird von so genannter *low-grade* Inflammation gesprochen. Weiterhin haben Untersuchungen des Fettgewebes von normalgewichtigen Personen und von adipösen Patienten gezeigt, dass in dem Fettgewebe von Adipösen deutlich mehr Zytokine zirkulieren (Weisberg et al., 2003). 2007 zeigte Tchoukalova Y. et al., dass der Anteil an eingewanderten Makrophagen bei Adipösen deutlich erhöht ist. Es wurde nachgewiesen, dass das Fettgewebe auch das Monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1) exprimiert. Dieser Faktor ist essentiell für die Einwanderung von Makrophagen (Kanda et al., 2006). Zusätzlich zum MCP-1 wurde 2005 ein weiterer Faktor von Skursk T. et al. beschrieben, der die Migration der Makrophagen in verschiedenen Geweben beim Menschen verhindert, Macrophage migration inhibitory factor (MIF). Dieser wird ebenfalls in humanen Adipozyten exprimiert. Interessanterweise haben Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine besonders hohe MIF Serumkonzentration. Zusätzlich haben die Autoren festgestellt, dass das Zytokin TNF- α die MIF Expression stimulieren kann (Yabunaka et al., 2000). Makrophagen beeinflussen die Adipogenese und die Funktion von Adipozyten über Zytokine, wie z.B. IL-6, IL-8 und TNF- α (Cavaillon, 1994). 1993 gelang es Hotamisligil G.S. & Spiegelmann B.M. zu zeigen, dass in Nagern TNF- α einen starken Einfluss auf die Insulinresistenz hat. Im Rahmen dieses Projektes konnten die Autoren auch zeigen, dass

man mit Hilfe neutralisierender anti-TNF- α Antikörper die Insulinsensitivität in Mäusen deutlich verbessern konnte. Eine direkte Korrelation zwischen dem Grad des Übergewichts, TNF- α Expression und Insulinresistenz konnten auch in Menschen gezeigt werden (Hotamisligil et al., 1995). Überraschenderweise hatte eine anti-TNF- α Therapie mit neutralisierenden Antikörpern bei humanen Probanden keinerlei Auswirkung auf die Insulinsensitivität (Ofei et al., 1996), was nahe legt, dass bei Menschen andere Faktoren aus Makrophagen von Bedeutung sind.

Studien mit so genannten „Tumor-infiltrierenden-Makrophagen“ haben in der Vergangenheit gezeigt, dass diese Zellen neben klassischen Zytokinen auch wnt-5a exprimieren (Pukrop et al., 2006; Smith et al., 1999). 2008 hat Pereira C. et al. zeigen können, dass die wnt-5a Expression durch inflammatorische Stimuli in den Makrophagen zusätzlich erhöht wird. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit weiterhin untersucht, ob Makrophagen die Adipogenese, neben klassischen Zytokinen, auch über wnt-5a beeinflussen. Um dies zu Überprüfen, wurde zunächst die Expression von wnt-5a in den fettgewebeständigen Makrophagen und deren Vorläuferzellen, zirkulierenden Monozyten, untersucht. Diese Experimente zeigen, dass wnt-5a nicht nur in „Tumor-infiltrierenden-Makrophagen“ sondern auch in gewebeständigen Makrophagen im Fettgewebe sowie deren Vorläuferzellen, zirkulierenden Blutmonozyten, exprimiert wird (Abb.18). Zusätzlich zeigte sich eine unterschiedliche wnt-5a Expression in den Blutmonozyten normalgewichtiger Probanden verglichen zu adipösen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (Abb.19), was nahe legt, dass Diabetes einen Einfluss auf die wnt-5a Expression hat.

Experimente mit Makrophagen konditioniertem Medium zeigten einen inhibitorischen Einfluss auf die Adipogenese, was dafür spricht, dass Faktoren, die durch Makrophagen exprimiert werden, wichtig in diesem Zusammenhang sind (Abb.20). Durch die Zugabe des neutralisierenden wnt-5a Antikörpers konnte die inhibierende Wirkung von Makrophagen konditioniertem Medium auf die Adipogenese aufgehoben werden, was verdeutlicht, dass die Makrophagen tatsächlich über wnt-5a einen starken Einfluss auf die Adipogenese nehmen (Abb.21).

2006 und 2008 haben Lin et al. gezeigt, dass hohe Glukosekonzentrationen in Nagern die wnt-5a Expression inhibieren. Weil die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 2 mit einer Hyperglykämie und einer Hyperinsulinämie einhergeht (Kuzuya et al., 2002), wurde als nächstes der Einfluss von Glukose und Insulin auf die wnt-5a Expression in den Makrophagen überprüft. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die wnt-5a Expression in Makrophagen durch eine erhöhte Glukosekonzentration herabreguliert wird. Die unterschiedlichen Insulinkonzentrationen zeigten dagegen keinen Einfluss auf die wnt-5a Expression in Makrophagen (Abb.22). Daraus könnte gefolgert werden, dass bei Diabetikern, wegen der hohen Glukosekonzentration und damit verbundener herabgesetzter wnt-5a Expression, die Adipogenese „enthemmt“ ist, weshalb diese Menschen deutlich stärker zu Adipositas neigen.

4.1 ZUSAMMENFASSUNG

In der Pathogenese der Adipositas und des Diabetes mellitus Typ 2 spielt neben der Vergrößerung bestehender Adipozyten auch die Generierung neuer Fettzellen aus undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen eine wichtige Rolle. Dieser Prozess, auch Adipogenese genannt, besteht aus zwei Teilschritten, der *Determinierung* mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten und der *Differenzierung* von Preadipozyten zu reifen Adipozyten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob das Signalmolekül wnt-5a eine Rolle in der molekularen Regulation der Determinierung spielt. Dazu wurden humane mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblutproben und humane Preadipozyten aus Fettgewebebiopsien isoliert. Diese beiden primären Zellpopulationen wiesen eine vergleichbare Morphologie sowie eine übereinstimmende Expression mesenchymaler Zelloberflächenmarker (CD29, CD44, CD73) auf. Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede im Entwicklungspotenzial. Während mesenchymale Stammzellen sowohl zu Adipozyten als auch zu Osteozyten differenziert werden konnten, waren Preadipozyten nur in der Lage sich zu Adipozyten zu entwickeln. Mittels Expressionsanalysen wurde nachgewiesen, dass multipotente Stammzellen signifikant mehr wnt-5a exprimieren als

Preadipozyten, was nahe legt, dass dieses Molekül eine wichtige Rolle in der Determinierung spielt. In der Tat führte die Behandlung humaner mesenchymaler Stammzellen mit neutralisierenden anti-wnt-5a Antikörpern zu einer verminderten Osteogenese und einer gesteigerten Adipogenese. Neben diesen *loss of function* Experimenten zeigten *gain of function* Untersuchungen mit rekombinatem wnt-5a gegenteilige Effekte hinsichtlich Osteo- und Adipogenese, was die funktionelle Bedeutung dieses Signalmoleküls unterstreicht. Auf molekularer Ebene wurde nachgewiesen, dass wnt-5a den nicht-kanonischen JNK Signalweg in humanen mesenchymalen Stammzellen aktiviert. Die JNK vermittelte wnt-5a Signaltransduktion führte zu einer Aktivierung des Osteopontinpromotors und zu einer gesteigerten Osteopontin Expression. Diese Experimente legen den Schluss nahe, dass wnt-5a zur Aufrechterhaltung des Osteogenesepotentials beiträgt und dass die Inhibierung dieses Signalweges ein wichtiger Mechanismus in der Determinierung multipotenter mesenchymaler Stammzellen zu Preadipozyten beim Menschen ist. Immunhistochemische Untersuchungen an Fettgewebebiopsien zeigten nachfolgend, dass wnt-5a nicht nur von mesenchymalen Vorläuferzellen sondern auch von Makrophagen exprimiert wird, die bei Patienten mit Adipositas vermehrt im Fettgewebe vorzufinden sind. Auf zellulärer Ebene wurde nachgewiesen, dass Makrophagen über die Sekretion von wnt-5a die Adipogenese von mesenchymalen Vorläuferzellen hemmen. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die proosteogenen Eigenschaften von wnt-5a für die Aufrechterhaltung der Multipotenz mesenchymaler Stammzellen von Bedeutung sind, während die antiadipogenen Effekte von wnt-5a in der Interaktion von Makrophagen und dem Fettgewebe beim Menschen eine funktionelle Relevanz haben.

4.2 SUMMARY

Increasing adipocyte size as well as numbers are important in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes in humans. Adipocytes are generated from mesenchymal precursor cells during the so called adipogenesis. This process consists of two related steps, the *determination* of multipotent mesenchymal stem cells into preadipocytes and the

differentiation of preadipocytes into mature fat cells. While the differentiation is highly investigated, the determination in humans is poorly understood. The aim of the present study was to investigate, if wnt-5a is important in the determination process in humans. Therefore, human multipotent mesenchymal stem cells were isolated from umbilical cord blood and preadipocytes from fat biopsies of human subjects. These two primary cell populations exhibited similar morphology and expression of the mesenchymal surface markers (CD29, CD44, CD73). However, while mesenchymal stem cells were able to differentiate into adipocytes and osteocytes, preadipocytes were only able to undergo adipogenesis. Expression of wnt-5a was significantly higher in mesenchymal stem cells compared to preadipocytes, suggesting that wnt-5a is important to maintain osteogenic potential. Indeed, treatment of mesenchymal stem cells with neutralizing anti-wnt-5a antibodies inhibited osteogenesis and promoted adipogenesis. In agreement to these *loss of function* experiments, *gain of function* experiments using recombinant wnt-5a showed inverse effects on osteogenesis and adipogenesis. On a molecular level, wnt-5a was found to promote JNK non-canonical signalling pathway. Activation of this pathway resulted in increased osteopontin promoter activity and expression. These data suggest, that wnt-5a is necessary to maintain osteogenic potential of human mesenchymal stem cells and that down-regulation of wnt-5a expression is an important molecular process in the determination of these cells into preadipocytes. Furthermore, using immunohistochemistry, wnt-5a was also found to be expressed in adipose tissue macrophages. On a cellular level, macrophages were found to inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a. In summary, these data suggest, that the proosteogenic capacity of wnt-5a is crucial in maintaining multipotency of human mesenchymal stem cells, while the antiadipogenic effects of wnt-5a are important in the interaction of macrophages and adipose tissue in humans.

5. ANHANG

5.1 LITERATURVERZEICHNISS

Ahumada, A., Slusarski, D.C., Liu, X., Moon, R.T., Malbon, C.C., and Wang, H.Y. (2002). Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science* 298, 2006-2010.

Al-Daghri, N.M., Al-Attas, O.S., Alokail, M., Draz, H.M., Bamakhramah, A., and Sabico, S. (2009). Retinol binding protein-4 is associated with TNF-alpha and not insulin resistance in subjects with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Dis Markers* 26, 135-140.

Alexandraki, K., Piperi, C., Kalofoutis, C., Singh, J., Alaveras, A., and Kalofoutis, A. (2006). Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1084, 89-117.

Armitage, J.A., Poston, L., and Taylor, P.D. (2008). Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res* 36, 73-84.

Baksh, D., Boland, G.M., and Tuan, R.S. (2007). Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 101, 1109-1124.

Barr, R.K., and Bogoyevitch, M.A. (2001). The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol* 33, 1047-1063.

Bjorbaek, C., and Kahn, B.B. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59, 305-331.

Bouloumie, A., Curat, C.A., Sengenès, C., Lolmede, K., Miranville, A., and Busse, R. (2005). Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8, 347-354.

Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I., and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109-118.

Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549.

Cavaillon, J.M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48, 445-453.

Chan, J., Kennea, N.L., and Fisk, N.M. (2007). Placental mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 196, e18; author reply e18-19.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 9-15.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

Cong, F., and Varmus, H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2882-2887.

Cram, E.J., Ramos, R.A., Wang, E.C., Cha, H.H., Nishio, Y., and Firestone, G.L. (1998). Role of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 273, 2008-2014.

Cui, J., Zhang, M., Zhang, Y.Q., and Xu, Z.H. (2007). JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin* 28, 601-608.

- Dale, T.C. (1998). Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329 (Pt 2), 209-223.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- Dejmek, J., Saffholm, A., Kamp Nielsen, C., Andersson, T., and Leandersson, K. (2006). Wnt-5a/Ca²⁺-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 26, 6024-6036.
- Denhardt, D.T., and Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7, 1475-1482.
- Elberg, G., Gimble, J.M., and Tsai, S.Y. (2000). Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* 275, 27815-27822.
- Feve, B. (2005). Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 483-499.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., *et al.* (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112, 197-208.
- George, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., *et al.* (2004). A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* 304, 1325-1328.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-546.
- Hansen, J.B., and Kristiansen, K. (2006a). Pocket proteins control white versus brown fat cell differentiation. *Cell Cycle* 5, 341-342.
- Hansen, J.B., and Kristiansen, K. (2006b). Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 398, 153-168.
- Harris, T., Cook, E.F., Garrison, R., Higgins, M., Kannel, W., and Goldman, L. (1988). Body mass index and mortality among nonsmoking older persons. The Framingham Heart Study. *JAMA* 259, 1520-1524.
- Hauner, H. (2006). [The costs of diabetes mellitus and its complications in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* 131 Suppl 8, S240-242.
- Hiebert, S.W., Chellappan, S.P., Horowitz, J.M., and Nevins, J.R. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev* 6, 177-185.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409-2415.
- Hu, D., Fang, W., Han, A., Gallagher, L., Davis, R.J., Xiong, B., and Yang, W. (2008). c-Jun N-terminal kinase 1 interacts with and negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling through GSK3beta pathway. *Carcinogenesis* 29, 2317-2324.

- Hua, K., Deng, J., and Harp, J.B. (2004). Interleukin-4 inhibits platelet-derived growth factor-induced preadipocyte proliferation. *Cytokine* 25, 61-67.
- Huang, H., and He, X. (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol* 20, 119-125.
- Iemata, M., Takarada, T., Hinoi, E., Taniura, H., and Yoneda, Y. (2007). Suppression by glutamate of proliferative activity through glutathione depletion mediated by the cystine/glutamate antiporter in mesenchymal C3H10T1/2 stem cells. *J Cell Physiol* 213, 721-729.
- Kahn, C.R., Baird, K.L., Jarrett, D.B., and Flier, J.S. (1978). Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4209-4213.
- Kahn, C.R., and White, M.F. (1988). The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 82, 1151-1156.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., *et al.* (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-1505.
- Kasuga, M. (1983). [Structure and function of insulin receptor]. *Horumon To Rinsho* 31, 1157-1161.
- Kim, J.E., Shepherd, P.R., and Chaussade, C. (2009). Investigating the role of class-IA PI 3-kinase isoforms in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 830-834.
- Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68-75.
- Koster, I., von Ferber, L., Ihle, P., Schubert, I., and Hauner, H. (2006). The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study. *Diabetologia* 49, 1498-1504.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., and Moon, R.T. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16, 279-283.
- Kume, S., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2000). G_α family G proteins activate IP₃-Ca²⁺ signaling via gbetagamma and transduce ventralizing signals in Xenopus. *Dev Biol* 226, 88-103.
- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., *et al.* (2002). Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 55, 65-85.
- Langin, D. (2009). Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: Strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta*.
- Laudes, M., Christodoulides, C., Sewter, C., Rochford, J.J., Considine, R.V., Sethi, J.K., Vidal-Puig, A., and O'Rahilly, S. (2004). Role of the POZ zinc finger transcription factor FBI-1 in human and murine adipogenesis. *J Biol Chem* 279, 11711-11718.
- Laudes, M., Oberhauser, F., Bilkovski, R., Schubert, M., Udelhoven, M., Wassmer, G., Roth, B., and Krone, W. (2009). Human fetal adiponectin and retinol-binding protein (RBP)-4 levels in relation to birth weight and maternal obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117, 146-149.
- Lean, M.E., James, W.P., Jennings, G., and Trayhurn, P. (1986). Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clin Sci (Lond)* 71, 291-297.

- Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L., and Chen, T.H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669-1675.
- Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A.M., McMahon, A., Sussman, D.J., and Wu, D. (1999). Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 274, 129-134.
- Martelli, A.M., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P.L., Evangelisti, C., and Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20, 911-928.
- Moon, Y.S., Smas, C.M., Lee, K., Villena, J.A., Kim, K.H., Yun, E.J., and Sul, H.S. (2002). Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 22, 5585-5592.
- Moriguchi, T., Kawachi, K., Kamakura, S., Masuyama, N., Yamanaka, H., Matsumoto, K., Kikuchi, A., and Nishida, E. (1999). Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates. *J Biol Chem* 274, 30957-30962.
- Myers, M.G., Jr., Wang, L.M., Sun, X.J., Zhang, Y., Yenush, L., Schlessinger, J., Pierce, J.H., and White, M.F. (1994). Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol* 14, 3577-3587.
- Myers, M.G., Jr., and White, M.F. (1993). The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes* 42, 643-650.
- Nemeth, M.J., Topol, L., Anderson, S.M., Yang, Y., and Bodine, D.M. (2007). Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15436-15441.
- Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., and Taylor, R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45, 881-885.
- Pukrop, T., and Binder, C. (2008). The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med* 86, 259-266.
- Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trumper, L., and Binder, C. (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5454-5459.
- Ren, D., Collingwood, T.N., Rebar, E.J., Wolffe, A.P., and Camp, H.S. (2002). PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* 16, 27-32.
- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885-896.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4, 611-617.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853.

- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14, 1293-1307.
- Ross, D.A., Rao, P.K., and Kadesch, T. (2004). Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Cell Biol* 24, 3505-3513.
- Roy, P.K., Rashid, F., Bragg, J., and Ibdah, J.A. (2008). Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14, 200-202.
- Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y., and Mikoshiba, K. (2002). The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* 417, 295-299.
- Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., and Porte, D., Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2, 589-593.
- Schwarz, E.J., Reginato, M.J., Shao, D., Krakow, S.L., and Lazar, M.A. (1997). Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 17, 1552-1561.
- Slusarski, D.C., Corces, V.G., and Moon, R.T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410-413.
- Smith, K., Bui, T.D., Poulosom, R., Kaklamanis, L., Williams, G., and Harris, A.L. (1999). Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 81, 496-502.
- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77.
- Sun, X.J., Wang, L.M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M.G., Jr., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H., and White, M.F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173-177.
- Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., *et al.* (2003). Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat Cell Biol* 5, 224-230.
- Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2005). Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 33, 1078-1081.
- Tseng, Y.H., Kriauciunas, K.M., Kokkotou, E., and Kahn, C.R. (2004). Differential roles of insulin receptor substrates in brown adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 24, 1918-1929.
- Vesely, P.W., Staber, P.B., Hoefler, G., and Kenner, L. (2009). Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res* 682, 7-12.
- Vidal, M.A., Robinson, S.O., Lopez, M.J., Paulsen, D.B., Borkhsenius, O., Johnson, J.R., Moore, R.M., and Gimble, J.M. (2008). Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg* 37, 713-724.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., *et al.* (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33, 1402-1416.

Wang, J.F., Wang, L.J., Wu, Y.F., Xiang, Y., Xie, C.G., Jia, B.B., Harrington, J., and McNiece, I.K. (2004). Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica* 89, 837-844.

Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.

Yabunaka, N., Nishihira, J., Mizue, Y., Tsuji, M., Kumagai, M., Ohtsuka, Y., Imamura, M., and Asaka, M. (2000). Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23, 256-258.

Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J., and Moon, R.T. (1996). A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6, 1302-1306.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1995). Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7921-7925.

5.2 ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jens C. Brüning betreut worden.

Köln, den 03.11.2009



Roman Bilkovski

Teilpublikation:

Bilkovski R, Oberhauser F, Schulte D.M, Gomolka M, Udelhoven M, Hettich M.M, Roth B, Heidenreich A, Gutschow C, Krone W und Laudes M
„Role of wnt-5a in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes“
(under review, Journal of Biological Chemistry)

5.3 LEBENS LAUF

■ Persönliche Daten

Name: Bilkovski, Roman
Geburtsdatum/-ort: 13.02.1981, Dneproderschinsk / Ukraine

■ beruflicher Werdegang

2001 Abitur
WS 2001/02 Beginn des Biologiestudiums an der Universität zu Köln
8.10.2003 Vordiplom
WS 2003/05 Hauptstudium mit der Fächerkombination
Genetik, Entwicklungsbiologie und organische Chemie
01.10.2005 Diplomarbeit am Institut der Genetik der Universität zu
Köln
04.10.2006 Diplom Abschluss Biologie
seit 01.11.2006 Promotion an der Universitätsklinik zu Köln in der
Klinik II und Poliklinik für Innere Medizin zum
Thema: „Role of wnt-5a in the determination of
human mesenchymal stem cells into preadipocytes“
mit voraussichtlicher Disputation im Januar 2010

■ Kongresse

30.04.08 – 03.05.08 Teilnahme an der Jahrestagung der Deutschen
Diabetesgesellschaft in München mit folgenden
Vorträgen:
„Role of wnt-5a in the determination of human
mesenchymal stem cells into preadipocytes“
„Transcription factor FBI-1 acts as a dual regulator in
adipogenesis by coordinated regulation of cyclin-A and
E2F-4“

30.04.08 – 03.05.09 Teilnahme an der Jahrestagung der Deutschen Diabetesgesellschaft in Leipzig mit einem Posterbeitrag:
„Macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans”

■ Auszeichnungen

30.04.08 – 03.05.08 Reisestipendium der deutschen Diabetesgesellschaft

30.04.08 – 03.05.09 Reisestipendium der deutschen Diabetesgesellschaft

■ Publikationen

Bilkovski R, Oberhauser F, Schulte D.M, Gomolka M, Udelhoven M, Hettich M.M, Roth B, Heidenreich A, Gutschow C, Krone W und Laudes M
„Role of wnt-5a in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes“ (under review, Journal of Biological Chemistry)

Laudes M, Oberhauser O, Schulte D.M, Freude S, Bilkovski R, Mauer J, Rappl G, Abken H, Schulz F and Krone W
„ Visfatin and resistin expression in circulating blood monocytes are differentially related to obesity and type 2 diabetes in humans “(under review, Hormone and Metabolic Research)

Laudes M, Bilkovski R, Oberhauser F, Droste A, Gomolka M, Leeser U, Udelhoven M, Krone W
„Transcription factor FBI-1 acts as a dual regulator in adipogenesis by coordinated regulation of cyclin-A and E2F-4“. (Journal of Molecular Medicine, Mai 2008;86(5):597-608)

Laudes M, Oberhauser F, Bilkovski R, Schubert M, Udelhoven M, Wassmer G, Roth B, Krone W
„Human fetal adiponectin and retinol-binding protein (RBP)-4 levels in relation to birth weight and maternal obesity“ (Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, März 2009;117(3):146-9)

Köln, den 03.11.2009

Bilkovski

5.4 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt besonders Dr. Matthias Laudes für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe forschen zu dürfen. Frank Oberhäuser möchte ich ganz herzlich für die Hilfe während meiner Arbeit danken.

Ich möchte mich beim Prof. Dr. Jens C. Brüning, Prof. Dr. Wilhelm Krone, Prof. Dr. Peter Kloppenburg und Dr. Thomas Wunderlich für die Übernahme des Prüfungskomitees bedanken.

Dr. Michael Udelhoven möchte ich für die Unterstützung während der Arbeit und das Korrekturlesen meiner Arbeit danken. Außerdem möchte ich mich bei den restlichen Labormitgliedern für die Hilfe und die schöne Atmosphäre im Labor bedanken.

Meiner Familie danke ich für die stetige Unterstützung während meines akademischen Werdegangs.