

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ehemalige Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum

Funktionen lysosomaler Cysteinproteasen in humanen mesenchymalen Stammzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
SIMON SCHUSTER
aus Straubing
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. biol. hum. Dorit Nögler

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Ries
Prof. Dr. med. Claus Belka

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2015

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Funktionen lysosomaler Cysteinproteasen in humanen mesenchymalen Stammzellen“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, den 04.02.2015

Simon Schuster

INHALTSVERZEICHNIS

A	ZUSAMMENFASSUNG	1
B	EINLEITUNG.....	3
B 1	Stammzellen.....	3
B 1.1	Allgemeine Grundlagen	3
B 1.2	Adulte Stammzellen.....	3
B 1.3	Stammzellnische	4
B 1.4	Zelluläre Seneszenz	6
B 2	Lysosomale Cysteinproteasen	8
B 2.1	Allgemeine Grundlagen	8
B 2.2	Beteiligung bei der Tumorprogression und -metastasierung	9
B 2.3	Cathepsin X und dessen potentielle Rolle in Tumor- und Stammzellen	10
B 3	Proinvasive und proproliferative Signaltransduktion	12
C	FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT	14
D	MATERIAL UND METHODEN.....	15
D.1	Materialien.....	15
D 1.1	Geräte	15
D 1.2	Bioinformatische Hilfsmittel.....	16
D 1.3	Materialien für zellbiologische Methoden	16
D 1.4	Materialien für molekularbiologische Methoden	19
D 1.5	Materialien für proteinchemische Methoden	20
D 2	Methoden	23
D 2.1	Zellbiologische Methoden	23
D 2.1.1	Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen.....	23
D 2.1.2	Lipofektion humaner mesenchymaler Stammzellen mit siRNA	25
D 2.1.3	Proliferationsmessungen	26
D 2.1.4	β -Galactosidase-Färbung	28
D 2.1.5	Adipogene und osteogene Differenzierung	29
D 2.1.6	Kultivierung von hMSC mit EZM-Proteinen und (Pro)Cathepsin X.....	30
D 2.1.7	Invasionsassay	31
D 2.2	Molekularbiologische Methoden	32
D 2.2.1	Isolierung von RNA aus humanen mesenchymalen Stammzellen	32

D 2.2.2	cDNA-Synthese	33
D 2.2.3	Quantitative PCR.....	33
D 2.3	Proteinchemische Methoden	35
D 2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
D 2.3.2	SDS-PAGE und Immundetektion mittels Western-Blot	35
D 2.3.3	Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen	36
D 2.4	Datenanalyse	37
E	ERGEBNISSE.....	38
E 1	Charakterisierung der humanen mesenchymalen Stammzellen.....	38
E 1.1	Proliferationsverhalten der hMSC	38
E 1.2	Differenzierungsvermögen der hMSC	39
E 1.3	Morphologie und β -Galactosidase-Färbung der hMSC	40
E 1.4	Expression von Seneszenzmarkern in hMSC im Verlauf der Kultivierung.....	41
E 2	Untersuchung der potentiellen Rolle von Cathepsinen in hMSC.....	42
E 2.1	Expression von Cathepsinen in hMSC.....	42
E 2.2	Auswirkungen des Knockdowns der Cathepsine B, L und X in hMSC	43
E 2.2.1	Knockdown-Effizienz der Cathepsine B, L und X in hMSC auf RNA- und Proteinebene	43
E 2.2.2	Morphologie der hMSC und β -Galactosidase Detektion nach Knockdown der Cathepsine B, L und X.....	45
E 2.2.3	Proliferationsverhalten nach Knockdown der Cathepsine B, L und X in hMSC ..	46
E 2.2.4	Differenzierungsvermögen der hMSC nach Knockdown von Cathepsin X	47
E 2.2.5	Invasionsverhalten der hMSC nach Knockdown der Cathepsine B, L und X.....	48
E 2.2.6	Einfluss des Cathepsin X-Knockdowns auf die mRNA-Expression von p16, p21, p53 und Caveolin-1 in hMSC.....	49
E 2.3	Beeinflussung von Signaltransduktionskaskaden in hMSC durch Procathepsin X und Cathepsin X	50
F	DISKUSSION	53
F 1	Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen <i>in vitro</i>	53
F 2	Expression und potentielle Funktionen von Cathepsinen in hMSC.....	56
F 3	Induktion zellulärer Seneszenz nach Cathepsin X-Knockdown in hMSC.....	57
F 4	Aktivierung proproliferativer Signalwege durch exogene Zugabe von (Pro)Cathepsin X in hMSC	63

G	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	66
H	LITERATURVERZEICHNIS	69
I	DANKSAGUNG	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemein gültige und anerkannte Abkürzungen für Proteine der Signaltransduktion:

Crk	<i>cancer-related signaling adaptor protein</i>
CXCL-12	CXC-Motiv-Chemokin 12, <i>stromal cell-derived factor 1</i>
CXCR-4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, <i>stromal cell-derived factor 1 receptor</i>
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
PAK	<i>p21-activated protein kinase</i>
p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A, p16Ink4A)</i>
p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A, p21)</i>
p53	Tumorsuppressor-Protein
pRb	Retinoblastom-Protein
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Rac 1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> , gehört zur Familie der Rho-GTPasen
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor

Weitere in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen:

BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Cat	Cathepsin
Cav	Caveolin-1
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol

dNTP	doppelsträngiges Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
hMSC	<i>human mesenchymal stem cells</i>
H ₂ O	destilliertes Wasser
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
KPV	kumulative Populationsverdopplung
MSC	<i>mesenchymal stem cells/ marrow stromal cells</i>
MCGS	<i>mesenchymal stem cell growth supplement</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSCBM	<i>mesenchymal stem cell basal medium</i>
MSCGM	<i>mesenchymal stem cell growth medium</i>
nc-siRNA	<i>negative control-small interfering RNA</i>
P	Passage
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
qPCR	quantitative <i>real time</i> PCR
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small-interfering ribonucleic acid</i>

Abkürzungen für Einheiten:

bp	Basenpaare
OD	optische Dichte
SD	<i>standard deviation</i>
U	Units
V	Volt

A ZUSAMMENFASSUNG

Multipotente Stammzellen sind im adulten Organismus an Prozessen der Gewebereparatur und -regeneration beteiligt. Ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung wird einerseits durch ihre zellspezifischen Eigenschaften, andererseits durch ihre Umgebung, der sog. Stammzellnische, beeinflusst. In den letzten Jahren konnte vielfach belegt werden, dass ein Ungleichgewicht innerhalb der Stammzellnische Prozesse der Tumorgenese auslösen oder zelluläre Seneszenz herbeiführen kann. Unter zellulärer Seneszenz versteht man den irreversiblen Wachstumsarrest von Zellen, um eine unkontrollierte Proliferation im Sinne eines Tumorsuppressormechanismus zu unterbinden. Weitgehend unbekannt ist in diesem Zusammenhang die Rolle intra- und extrazellulärer Proteasen. Dabei konnte in Tumorzellen der Einfluss von Proteasen auf Proliferation, Differenzierung, Zellalterung und Migration/ Invasion bereits vielfach nachgewiesen werden. Für Cathepsine als Untergruppe lysosomaler Cysteinproteasen wurde bis vor einigen Jahren lediglich eine intrazelluläre Funktion im Rahmen des lysosomalen Proteinabbaus angenommen. Es häufen sich jedoch Hinweise auf weitere Funktionen von Cathepsinen außerhalb von Lysosomen. In diversen Tumoren konnte eine erhöhte Expression von Cathepsinen nachgewiesen werden. Ein Knockdown der Cathepsine B, L und X führte zu einer Reduktion der Tumorprogression und -invasion. In Cathepsin X-defizienten primären Fibroblasten konnte kürzlich eine verminderte Proliferation und Invasion durch die Induktion zellulärer Seneszenz belegt werden.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Rolle lysosomaler Cysteinproteasen in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) im Hinblick auf Zellproliferation und -invasion zu untersuchen. Wir stellten die Hypothese auf, dass die verminderte Proliferation und Invasion Cathepsin-defizienter Zellen durch eine beschleunigte zelluläre Seneszenz hervorgerufen wird. Im Umkehrschluss postulierten wir, dass eine erhöhte Konzentration von Cathepsinen Prozesse der Tumorgenese auslösen bzw. unterstützen kann.

In Untersuchungen zum Expressionsprofil von Cathepsinen in hMSC von zwei verschiedenen Spendern ergab sich insbesondere eine Expression der Cathepsine B, L und X. Vor dem Hintergrund der schon bekannten Einflüsse dieser drei Cathepsine auf die Proliferation und Invasion in Tumorzellen, wurde in dieser Arbeit die Rolle der Cathepsine B, L und X in hMSC näher charakterisiert.

Unsere Hypothese der Induktion von zellulärer Seneszenz konnte für Cathepsin X-defiziente hMSC bestätigt werden. Nach Knockdown von Cathepsin X reagierten hMSC mit der Ausbildung eines seneszenten Phänotyps, einer vermehrten Expression Seneszenz-

assoziierter β -Galaktosidase und einer verminderten Proliferation. Zudem wurden Gene wie p16 und Caveolin-1, die an der Signaltransduktion der zellulären Seneszenz beteiligt sind, in Cathepsin X-defizienten hMSC heraufreguliert. In Cathepsin B- und L-defizienten hMSC fanden sich keine Hinweise für eine beschleunigte Seneszenz.

In einem weiteren Schritt untersuchten wir die Auswirkungen einer exogenen Zugabe von (Pro)Cathepsin X zu hMSC-Zellkulturen. Es sollte geklärt werden, ob (Pro)Cathepsin X in der Lage ist, proproliferative bzw. -invasive Signaltransduktionswege zu beeinflussen. Einer der bekanntesten proproliferativen Signalwege ist der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg, der unter anderem Integrin-vermittelt bzw. durch Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert wird und im Rahmen der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt. Die Hypothese einer (Pro)Cathepsin X-vermittelten Aktivierung des MAPK-Signalweges beruhte dabei auf zwei Überlegungen: Zum einen konnte in Cathepsin X-defizienten Fibroblasten eine reduzierte Phosphorylierung von Erk (Schlüsselsignalprotein des MAPK-Signalweges) nachgewiesen werden; zum anderen besitzt Procathepsin X ein Integrinerkennungsmotiv, worüber eine Interaktion mit Integrinen der Zelloberfläche ermöglicht wird und damit *Outside-in*-Signalwege beeinflusst werden könnten. In unseren Experimenten zeigte sich eine Aktivierung des Erk-Signalweges durch Zugabe von (Pro)Cathepsin X in hMSC. Über welche molekularen Mechanismen die Aktivierung stattfindet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Zusammenfassend wurde erstmals eine Beteiligung eines proteolytischen Enzyms - Cathepsin X - an der Seneszenz-assoziierten und proproliferativen Signaltransduktion in humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen. Wir konnten mit unseren Daten zeigen, dass eine Cathepsin X-Defizienz zu einer beschleunigten zellulären Seneszenz und Reduktion der Proliferation führt. Umgekehrt ergab sich durch Zugabe von (Pro)Cathepsin X eine Aktivierung des proproliferativen Erk-Signalweges. Die Invasionsfähigkeit in Cathepsin X-defizienten hMSC wurde hingegen im Vergleich zu bisher existierenden Daten mit Cathepsin X-defizienten Tumorzellen/ Fibroblasten nicht beeinflusst. Eine verminderte Proliferations- und Invasionsfähigkeit der hMSC nach Knockdown der Cathepsine B und L konnte im Gegensatz zu Arbeiten mit Tumorzellen nicht bestätigt werden. Somit konnten Unterschiede hinsichtlich der Rolle diverser Cathepsine in verschiedenen Zelltypen herausgearbeitet werden. Dieses Wissen ist interessant für eine mögliche, zukünftige systemische Anwendung von Proteaseinhibitoren in der Tumorthherapie und deren Einfluss auf die stammzellabhängige Geweberegeneration und -homöostase.

B EINLEITUNG

B 1 Stammzellen

B 1.1 Allgemeine Grundlagen

Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung definiert. Die Voraussetzung dafür ist sowohl eine symmetrische als auch asymmetrische Zellteilung. Entstehen zwei identische Tochterzellen, die entweder dieselben Eigenschaften wie die Mutterzelle ohne Verlust des Differenzierungspotentials aufweisen (Selbsterneuerung) oder die sich bereits hin zu Vorläuferzellen entwickelt haben (Differenzierung), spricht man von symmetrischer Zellteilung. Bei der asymmetrischen Zellteilung hingegen bilden sich jeweils ein Stammzellklon und eine Vorläuferzelle, die in Richtung eines bestimmten Zelltyps differenziert (Morrison et al, 1997; Weissman, 2000; Cai et al, 2004). Mit ihren Eigenschaften sind Stammzellen somit in der Lage am Gewebeaufbau, an der Gewebemöostase und der Regeneration von defektem Gewebe mitzuwirken. Bei genauerer Betrachtung der bisher aus einer Vielzahl von Geweben des menschlichen Körpers gewonnenen Stammzellen handelt es sich jedoch um eine heterogene Zellpopulation, die nach ihrer entwicklungsgeschichtlichen oder gewebespezifischen Herkunft, ihren funktionellen und molekulargenetischen Eigenschaften oder durch den Nachweis bzw. dem Fehlen bestimmter Marker weiter klassifiziert werden kann. Nur für wenige der bisher bekannten Stammzellen trifft nach heutigem Wissenstand eine unbegrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung mit relevanter Beteiligung an der Geweberegeneration zu. Somit ist eine eindeutige Unterscheidung zu anderen teilungsfähigen Zellen nur bedingt gewährleistet (Cai et al, 2004). Die molekularen Mechanismen, die Stammzelleigenschaften auf zellulärer Ebene determinieren und diese von anderen somatischen Zellen unterscheiden, sind Gegenstand aktueller Forschung. Deren Aufklärung könnte zu einem besseren Verständnis des Stammzellkonzepts beitragen.

B 1.2 Adulte Stammzellen

Eine Subgruppe von humanen Stammzellen bilden die adulten Stammzellen, die in zahlreichen Gewebetypen des postnatalen Organismus vorhanden sind (Korbling & Estrov, 2003). Sie weisen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ein eingeschränktes Differenzierungspotential auf. Unipotente Stammzellen, die lediglich einen Zelltyp rekrutieren, werden von multipotenten Stammzellen, die verschiedene Zelltypen innerhalb eines Keimblattes bilden, unterschieden. Multipotenz weisen unter anderem die im Knochenmark vorhandenen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen auf.

Mesenchymale Stammzellen sind eine von der Blutbildung unabhängige Zellpopulation mit der Fähigkeit zur klonalen Expansion und einer multilinearen Differenzierung in Zellen des Binde- und Stützgewebes. Sie wurden erstmals im murinen Knochenmark von Friedenstein entdeckt (Friedenstein, 1961); ihre Existenz konnte im humanen Knochenmark bestätigt werden (Pittenger et al, 1999). Auf eine einheitliche Definition für mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cell*, MSC) einigte sich die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie (Dominici et al, 2006). Neben der Adhärenz an Plastik in Zellkultur als Unterscheidungsmerkmal zu hämatopoetischen Stammzellen und der Expression eines bestimmten Musters an Zellmembranepitopen (positiv für CD105, CD73, CD90 und negativ für die hämatopoetischen Marker CD45 und CD34 sowie Marker für Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten), wird eine Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten *in vitro* gefordert.

Die Begriffsbestimmung der mesenchymalen Stammzelle lässt jedoch einige methodische Gegebenheiten und Charakteristika von MSC unberücksichtigt. Die mit heutigen Methoden aus dem Knochenmark gewonnenen MSC weisen in Zellkultur eine morphologische und funktionelle Heterogenität auf. Die adhärennten Zellen setzen sich mitunter aus ausdifferenzierten Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten zusammen, die in ihrer Gesamtheit als Knochenmarkstromazellen bezeichnet werden. Im Englischen tragen Knochenmarkstromazellen (*marrow stroma cell*, MSC) und mesenchymale Stammzellen das gleiche Akronym, um die biologische Überlappung als Zellpopulation in der Kultur deutlich zu machen. Da keiner der oben aufgeführten Marker allein oder in Kombination spezifisch für mesenchymale Stammzellen ist, ist bisher nur eine Anreicherung, aber keine Isolation der Zellen aus dem Zellgemisch des Knochenmarks möglich. Zudem wird der Plastizität von MSC bei der Begriffsbestimmung nicht Rechnung getragen. Es gibt Hinweise dafür, dass MSC unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, in Zellen anderer Keimblätter zu differenzieren (Jiang et al, 2002; Korbaling & Estrov, 2003). Dies macht die Unterscheidung der verschiedenen Stammzelltypen schwierig.

B 1.3 Stammzellnische

Die Vorstellung, dass Stammzellen nicht nur durch intrinsische (zell-autonome) Eigenschaften in ihrer Funktion beeinflusst werden, entwickelte sich mit der bahnbrechenden Arbeit von Schofield (Schofield, 1978). Schofield postulierte, dass die spezifischen Eigenschaften von Stammzellen auch durch ihre Umgebung mit bestimmt werden. Diese Umgebung wird als Stammzellnische bezeichnet (Papayannopoulou & Scadden, 2008).

Bestandteile dieser Nische sind u.a. Stromazellen, die untereinander sowie mit benachbarten Stammzellen über Zelloberflächenrezeptoren, Zell-Zell-Kanäle (*gap junctions*) und lösliche Faktoren interagieren (Cai et al, 2004; Mimeault & Batra, 2009). Extrazelluläre Matrix (EZM)-Proteine geben dabei eine strukturelle Organisation mit speziellen mechanischen Eigenschaften (Engler et al, 2006) vor und beeinflussen die Zellen zudem durch diverse EZM-abhängige Signaltransduktionswege (Adams & Watt, 1993). Schließlich binden Blutgefäße und neuronale Netzwerke die Nische in systemische Prozesse ein (Jones & Wagers, 2008). Somit werden Stammzellen auch durch ihre Umgebung mit beeinflusst. Die dabei ablaufenden Signaltransduktionswege und deren Einfluss auf Selbsterneuerung/ Zellalterung, Differenzierung/ Transformation und Migration/ Invasion von Stammzellen sind noch weitgehend unverstanden. Es häufen sich Hinweise, dass eine Veränderung der Stammzellnische zu Prozessen der Zellalterung und Transformation beiträgt. Dadurch können degenerative und maligne Erkrankungen hervorgerufen werden (Conboy et al, 2005; Rossi et al, 2005; Rando, 2006; Scadden, 2006; Carlson & Conboy, 2007; Pan et al, 2007; Jones & Wagers, 2008; Rossi et al, 2008). Ein Beleg für eine Beteiligung von Stammzellen an der Tumorgenese ist der Nachweis von sogenannten Tumorstammzellen in verschiedenen Tumoren (Nguyen et al, 2012). Die Entstehung von Tumorstammzellen wird dadurch erklärt, dass es innerhalb der Stammzellnische zu einem Ungleichgewicht an wachstumsfördernden und -hemmenden Signalmolekülen zugunsten wachstumsfördernder Stimuli kommt. Statt einer kontrollierten Differenzierung der Stammzellen wird eine maligne Transformation und eine verstärkte Proliferation im Gewebe ausgelöst (Li & Neaves, 2006). Abbildung B-1 fasst das Stammzellkonzept und dessen physiologische und pathophysiologische Bedeutung zusammen.

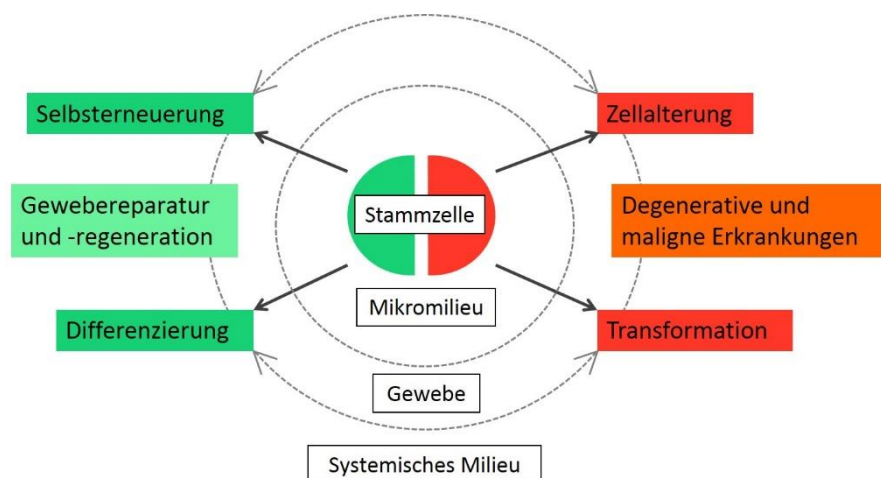


Abb. B-1: Eigenschaften von Stammzellen, ihre Einbindung in die Nische und ihre physiologische und pathophysiologische Bedeutung im Organismus, Abb. aus Joppien et al. 2010, modifiziert.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die an der Aufrechterhaltung der Stammzellfunktionen beteiligt sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Das Wissen könnte genutzt werden, um degenerativen Erkrankungen oder Tumoren vorzubeugen bzw. diese zu behandeln (Spaeth et al, 2008). Ein wichtiger und aktuell diskutierter Mechanismus, der bei Zellalterungs- und Transformationsprozessen eine Rolle spielt, ist die zelluläre Seneszenz.

B 1.4 Zelluläre Seneszenz

Die Kapazität zur Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen ist nicht unbegrenzt möglich. Nach einer bestimmten Zahl von Zellteilungen gehen diese in den Zustand der Seneszenz über, der durch irreversiblen Wachstumsarrest mit Resistenz gegenüber apoptotischem Zelltod gekennzeichnet ist (Wagner et al, 2008; Wagner et al, 2010). Dieses Phänomen wurde vor mehr als fünf Jahrzehnten von Hayflick bei Fibroblasten in Zellkultur entdeckt (Hayflick & Moorhead, 1961; Hayflick, 1965) und später auch für Stammzellen *in vitro* bestätigt (Banfi et al, 2000; Baxter et al, 2004; Bonab et al, 2006).

Zelluläre Seneszenz ist ein Mechanismus, der an diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist (Green, 2008). Sie wird beispielsweise als wichtiger Tumorsuppressormechanismus angesehen, indem durch Wachstumsarrest eine unkontrollierte Proliferation bzw. Migration maligne transformierter Zellen aufgehalten wird (Hanahan & Weinberg, 2000; Shay & Roninson, 2004; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Leonart et al, 2009). Im Rahmen von onkologischen Therapien konnten bereits Tumorwachstum und -invasion durch Initiierung von Seneszenz verhindert werden (Cichowski and Hahn 2008). Umgekehrt kann die Inhibition der zellulären Seneszenz die Tumordinvasion verstärken (Pavey et al. 2002). Stammzellen stellen aufgrund ihrer Langlebigkeit und Plastizität ideale Ziele für präkanzeröse Schäden dar (Serakinci et al, 2004). Sie konnten bisher aus verschiedenen Tumoren isoliert und ihre Rolle bei der Tumordinitiierung und -progression sowie Metastasierung konnte vielfach belegt werden (Reya et al, 2001; Houghton et al, 2004; Hurst & Welch, 2007). Zelluläre Seneszenz stellt in diesem Zusammenhang einen wichtigen Abwehrmechanismus dar, um eine Entartung von Stammzellen durch rechtzeitigen Wachstumsarrest zu verhindern. Der programmierte Mechanismus, in funktionsveränderten Zellen weitere unkontrollierte Schäden für den Organismus abzuwenden, geht jedoch auch mit einem Funktionsverlust der Zellen einher, der unter Umständen eine beschleunigte Zellalterung herbeiführt (Campisi, 2005; Mimeault & Batra, 2009; Kong et al, 2011). Kontrovers diskutiert wird aktuell die Rolle der zellulären Seneszenz bei der physiologischen Zellalterung. Es häufen sich Hinweise, dass die zelluläre Seneszenz an der altersabhängigen Veränderung der Gewebestruktur und -funktion beteiligt ist (Smith & Kipling, 2004; Sharpless & DePinho,

2007; Vijg & Campisi, 2008). Setzt man nun die zelluläre Seneszenz zur Tumorbekämpfung ein, muss eine frühzeitige Zellalterung berücksichtigt werden (Ruzankina & Brown, 2007). Im Unterschied zum Zustand der „relativen Ruhe“ (*relative quiescence*) - gekennzeichnet durch reversiblen Wachstumsarrest in der G₀-Phase - verharren seneszente Zellen irreversibel in der Zellzyklusphase G₁. Das Ausbleiben der Replikation beruht dabei auf der Expression bestimmter Zellzyklusinhibitoren. Die beiden Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p16 sind in seneszenten Zellen stark exprimiert (Alcorta et al, 1996) und Bestandteil zweier Tumorsuppressor-Signaltransduktionswege, die einerseits durch p53, andererseits durch p16 gesteuert werden, und sich gegenseitig beeinflussen. p21 wird direkt durch p53 induziert, während die Aktivierung von p16 bisher weitgehend unverstanden ist (Abb. B-2).

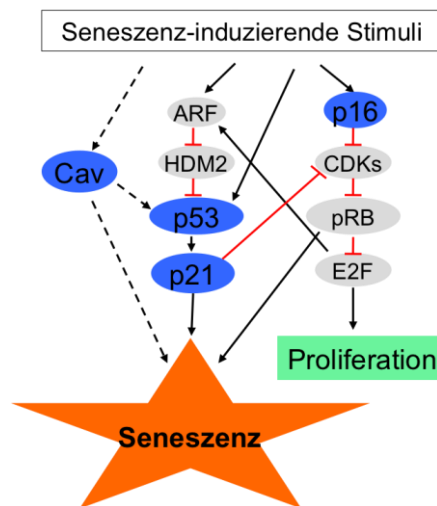


Abb. B-2: Im Rahmen der zellulären Seneszenz ablaufende Signaltransduktionskaskaden, Abb. aus Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007, modifiziert (Bartholomew et al, 2009).

Die Aktivierung der zellulären Seneszenz erfolgt primär über die p53-gesteuerte Signaltransduktion (Atadja et al, 1995), während p16-gesteuerte Signaltransduktionswege erst sekundär aktiviert werden. Die ablaufenden molekularen Mechanismen sind sowohl von der Spezies als auch vom jeweiligen Zelltyp abhängig (Itahana et al, 2004; Grinstein & Wernet, 2007). Bei der stammzellabhängigen Zellalterung spielt der p16-Signalweg eine besondere Rolle (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). In hMSC konnte gezeigt werden, dass eine Downregulation von p16 zu spontaner Transformation führt (Rubio et al, 2008). Neben den erwähnten Signaltransduktionsproteinen p16, p21 und p53 gibt es noch eine Reihe weiterer Proteine, die zur Entwicklung der zellulären Seneszenz beitragen. In den letzten Jahren konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das Membranprotein Caveolin-1 eine Stabilisierung des p53-Signalweges hervorruft (Abb. 2, Bartholomew et al., 2009). Zudem ist bekannt, dass eine Überexpression von Caveolin-1 in primären murinen Fibroblasten eine

vorzeitige Seneszenz induziert (Volonte et al, 2002). In humanen mesenchymalen Stammzellen wird bei Überexpression des Proteins die Differenzierungskapazität in Richtung Adipogenese eingeschränkt (Park et al, 2005).

In hMSC wurden mittels Mikroarrayanalysen mehr als 300 Gene identifiziert, die bei seneszenten Zellen eine unterschiedliche Expression zeigten (Ryu et al, 2008). Ob auch intra- und extrazelluläre Proteasen an der zellulären Seneszenz in hMSC beteiligt sind, ist bisher unerforscht. In anderen Gewebearten häufen sich bereits Belege für die Bedeutung diverser Proteasen bei der zellulären Seneszenz. Eine Downregulation von MMP-9 führte beispielsweise in einer Medulloblastom-Zelllinie zu einer p16- und *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-abhängigen Induktion zellulärer Seneszenz (Rao et al, 2007). Auch der Gruppe der lysosomalen Cysteinproteasen wird eine wichtige Rolle bei Proliferations- sowie Invasions-/ Migrationsprozessen zugeschrieben. Es fehlen jedoch grundlegende Kenntnisse, über welche Mechanismen lysosomale Cysteinproteasen Einfluss darauf nehmen.

B 2 Lysosomale Cysteinproteasen

B 2.1 Allgemeine Grundlagen

Im humanen Genom sind über 550 Proteasen und mehr als 200 Proteaseinhibitoren codiert. Ein gesunder Organismus bedarf einer kontrollierten Biosynthese und Reifung bzw. Abbau von Proteasen, die an vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind (Reiser et al, 2010). Darunter bilden lysosomale Cysteinproteasen eine Gruppe ubiquitär vorkommender Proteasen, die die Proteolyse von Peptidbindungen katalysieren und dabei als Nukleophil die Thiolgruppe eines Cysteinrestes verwenden. Sie sind in ihrer Struktur der pflanzlichen Protease Papain sehr ähnlich und werden dementsprechend der Papainfamilie (C1) zugeordnet (Rawlings et al, 2006). Willstätter und Bamann beschrieben 1929 erstmals eine Protease aus dieser Gruppe mit einem schwach sauren pH-Optimum und belegten diese wegen ihrer digestiven Funktionen im Magensaft mit der Bezeichnung „Kathepsin“ (*καθελψειν*, griechisch: verdauen) (Willstätter & Bamann, 1929). Im humanen Genom sind 11 Vertreter lysosomaler Cysteinproteasen codiert, und zwar Cathepsin B, C, F, H, L, K, O, S, V, W und X (Buhling et al, 2000; Jedeszko & Sloane, 2004). Das humane Cathepsin X wurde 1998 als letztes der im humanen Genom vorkommenden lysosomalen Cysteinproteasen entdeckt und beschrieben (Nägler & Menard, 1998; Santamaria et al, 1998). Cathepsine werden in einer Vielzahl von Zellen exprimiert und sind neben dem unspezifischen Verdau von Proteinen im Rahmen des endosomal-lysosomalen Systems auch an der proteolytischen Spaltung extrazellulärer Proteinsubstrate beteiligt. Cathepsin L kann

beispielsweise direkt Matrixproteine wie Kollagen IV, Fibronectin und Laminin degradieren (Ishidoh & Kominami, 1995; Koblinski et al, 2000). Zudem kann eine indirekte EZM-Degradation mittels Prozessierung des Pro-Urokinase-Plasminogen-Aktivators (Pro-uPA) zu uPA durch Cathepsin L erfolgen (Goretzki et al, 1992). Darüber hinaus wird durch limitierte Proteolyse die Aktivierung von Zytokinen oder Wachstumshormonen ermöglicht (Turk et al, 2000). Cathepsine steuern vielfältige physiologische Funktionen; unter anderem wird ihnen eine Beteiligung bei der Antigenpräsentation oder an Knochenresorptionsprozessen zugeschrieben (Chapman et al, 1997; Burster et al, 2010; Costa et al, 2011). Die zugrundeliegenden Signalwege und Aktivierungsmechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt.

B 2.2 Beteiligung bei der Tumorprogression und -metastasierung

Neben Matrix-Metalloproteasen werden auch Cysteinproteasen mit Prozessen der Tumorprogression und -invasion in Verbindung gebracht. Ausgangspunkt dieser Überlegung ist die vermehrte Expression diverser lysosomaler Cysteinproteasen in verschiedenen Tumorgeweben (Mohamed & Sloane, 2006). Als Ursache für die Überexpression werden Genamplifikationen ebenso beschrieben wie alternatives *Splicing* oder posttranskriptionelle Modifikationen. Cysteinproteasen werden in das extrazelluläre Milieu sezerniert und nehmen hauptsächlich durch ihre proteolytische Aktivität eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren wahr (Koblinski et al, 2000; Nomura & Katunuma, 2005; Mohamed & Sloane, 2006; Gocheva & Joyce, 2007; Vasiljeva & Turk, 2008). Durch die Spaltung von Adhäsionsproteinen wie E-Cadherin werden Zell-Zell-Adhäsionen aufgelockert und einzelne Zellen aus dem Zellverband gelöst. Die Proteolyse von extrazellulären Matrixproteinen ermöglicht das Wandern einzelner Zellen durch das Gewebe. Dieser Vorgang wird dadurch begünstigt, dass Proteasen von Tumor- und Immunzellen hauptsächlich im Bereich der Invasionsfronten freigesetzt werden. Neben der direkten proteolytischen Spaltung besteht die Möglichkeit der Aktivierung anderer Proteasen wie z.B. von Matrix-Metalloproteasen oder des Pro-Urokinase-Plasminogen-Aktivators durch limitierte Proteolyse. Dies verstärkt den Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix. Zuletzt wird durch eine Degradierung der Basalmembran ein Zugang zum Blutkreislauf und Lymphsystem geschaffen. Dies ermöglicht den Tumorzellen eine Wanderung in entfernter liegende Gewebe (Metastasierung). Für viele der bekannten Cathepsine wurde eine Bedeutung bei der Tumorprogression belegt; insbesondere die Cathepsine B und L wurden in diesem Zusammenhang ausführlich untersucht (Joyce et al, 2004; Joyce & Hanahan, 2004; Rousselet et al, 2004; Gocheva et al, 2006; Vasiljeva et al, 2006). Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Downregulation von Cysteinproteasen und einer beschleunigten Tumorprogression

konnte sowohl durch pharmakologische Inhibition als auch durch Experimente mit Knockout-Mäusen gezeigt werden. Demgegenüber stehen einige Studien, in denen nachgewiesen werden konnte, dass Proteasen auch Tumor-suppressive Effekte entfalten können (Lopez-Otin & Matrisian, 2007). So konnte in Mäusen, die HPV16-induzierte Melanome aufwiesen, ein aggressiveres Tumorwachstum nach genetischer Ablation von Cathepsin L festgestellt werden (Reinheckel et al, 2005). Trotz der bisherigen Forschung zur Rolle von lysosomalen Cysteinproteasen bei der Tumorprogression und -metastasierung sind die genauen molekularen Vorgänge noch nicht bekannt. Neben der proteolytischen Aktivität von Cathepsinen werden noch andere, bisher nicht näher aufgeklärte Mechanismen diskutiert, die die Tumorentwicklung beeinflussen könnten.

B 2.3 Cathepsin X und dessen potentielle Rolle in Tumor- und Stammzellen

Eine wesentliche Voraussetzung für die Degradierung extrazellulärer Matrixbestandteile im Rahmen der Tumordinvasion ist die endoproteolytische Aktivität lysosomaler Cysteinproteasen. In diesem Zusammenhang nimmt die Cysteinprotease Cathepsin X eine besondere Rolle ein. Sie wurde 1998 zum ersten Mal beschrieben, rekombinant hergestellt und strukturell sowie zum Teil funktionell charakterisiert (Nägler & Menard, 1998; Nägler et al, 1999; Sivaraman et al, 2000). Es handelt sich um eine Mono-peptidyl-Carboxypeptidase, die lediglich die Abspaltung einzelner Aminosäuren vom C-Terminus eines Substrats erlaubt. Aufgrund ihrer dadurch eingeschränkten proteolytischen Aktivität erscheint eine proteolytische Degradierung extrazellulärer Matrixproteine unwahrscheinlich (Kos et al, 2005). Dagegen wird eine nicht-proteolytische Funktion dieser Protease aufgrund der Interaktion mit diversen Zelloberflächenproteinen angenommen. Auf Endothelzellen konnte die Kollokalisierung des Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ sowie die Interaktion dieser beiden Proteine gezeigt werden (Lechner et al, 2006). Dabei bindet Procathepsin X über eine RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) an das Integrin $\alpha_v\beta_3$. Auch das gereifte Enzym besitzt ein Integrin-Erkennungsmotiv mit der Sequenz Glu-Cys-Asp (ECD). Dies ermöglicht eine Bindung an β_2 -Integrine (Obermajer et al, 2008). Darüber hinaus wurde eine Interaktion des Enzyms mit Proteoglykanen der Zelloberfläche beschrieben (Nascimento et al, 2005). Neueste Erkenntnisse belegen zudem eine Rolle von Cathepsin X bei der IGF-Signaltransduktion in Prostatakarzinomzelllinien (Kraus et al, 2012). Die Wirkung von Cathepsin X auf Zelloberflächenmoleküle deutet auf eine Beeinflussung von Signaltransduktionskaskaden hin, worüber Invasions- und Proliferationsprozesse moduliert werden könnten.

Eine Beteiligung von Cathepsin X an Proliferations- und Invasionsprozessen wird aufgrund ihrer Überexpression in einigen Tumorarten vermutet - so beispielsweise in Prostata Tumoren,

in Magenkarzinomen, im hepatozellulären oder kolorektalen Karzinom (Nägler et al, 2004; Krueger et al, 2005; Wang et al, 2011; Vizin et al, 2012). In der Studie mit Magenkarzinomzellen konnte Cathepsin X besonders im Bereich der Invasionsfront detektiert werden, eine Downregulation von Cathepsin X führte zu einer verminderten Invasion der Tumorzellen (Krueger et al, 2005). In Cathepsin B-/ Cathepsin X-defizienten Mäusen konnte eine signifikante Verzögerung der Tumorentwicklung, ein verbessertes histopathologisches *Staging*, eine 70%ige Reduktion von pulmonalen Metastasen und eine 80%ige Reduktion der Metastasengröße im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Sevenich et al, 2010). Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass in Cathepsin X-defizienten Fibroblasten Signaltransduktionswege aktiviert werden, die eine beschleunigte zelluläre Seneszenz hervorrufen (Kraus et al, 2011). Diese Untersuchungen weisen auf eine spezifische Funktion von Cathepsin X bei Proliferations- und Migrations-/ Invasionsprozessen hin. Weitere Knockdown-Experimente sind notwendig, um die potentielle Rolle von Cathepsin X bei der Tumorgenese und –progression zu verstehen.

Während das Zusammenspiel von Tumorzellen mit EZM-Proteinen und die Rolle diverser Proteasen in Tumoren relativ gut untersucht sind, ist über den Einfluss von EZM-Proteinen bzw. Proteasen auf Stammzellfunktionen bisher nur wenig in der Literatur bekannt. In einer Studie von Salaszyk konnte beispielweise belegt werden, dass die osteogene Differenzierung von hMSC durch Adhäsion an Kollagen I oder Vitronektin induziert werden kann (Salaszyk et al, 2004b). Für Cathepsin X konnte in hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle bei der stammzellabhängigen Regeneration festgestellt werden: Cathepsin X ist in der Lage das Chemokin CXCL-12 zu degradieren; CXCL-12 und CXCR-4 sind für die Mobilisierung und Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellen zuständig (Staudt et al, 2010). Die Auswirkungen von Cathepsinen auf Stammzellen und ihre regenerativen Fähigkeiten sind bis dato wenig verstanden und bedürfen daher weiterer Untersuchungen.

B 3 Proinvasive und proproliferative Signaltransduktion

Neben den bereits beschriebenen Seneszenz-assoziierten Signalwegen stehen solche, die die Selbsterneuerung/ Proliferation sowie Invasion/ Migration von Zellen aufrechterhalten. Dabei bedienen sich sowohl Tumor- als auch Stammzellen trotz aller funktionellen Unterschiede (Destruktion von gesundem Gewebe bzw. Regeneration von zerstörtem Gewebe) gemeinsamer molekularer Mechanismen, die z.B. den zellulären Prozessen Differenzierung/ Transformation, Selbsterneuerung/ Proliferation und Invasion/ Migration zugrunde liegen. Die detaillierten Vorgänge, die etwa die Beteiligung von Signaltransduktionsproteinen, intra- und extrazellulären Proteasen, Chemokinen und Rezeptoren sowie Adhäsionsmolekülen betreffen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Den lysosomalen Cysteinproteasen wird neben Matrix-Metalloproteasen und Serinproteasen eine wesentliche Mitwirkung bei Wachstum, Invasion und Metastasierung in Tumorzellen zugesprochen (siehe B 2.2). Dazu zählt unter anderem im Rahmen des Tumorgeschehens der proteolytische Abbau extrazellulärer Matrix. Für (Pro)Cathepsin X als Exocarboxypeptidase werden auch nicht-proteolytische Aufgaben angenommen (siehe B 2.3): Die Kollokalisierung von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ legt eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine nahe; die Bindung von Cathepsin X an β_2 -Integrine sowie die kürzlich gezeigte Beteiligung von Cathepsin X an der IGF-Signalkaskade lassen auf mögliche Auswirkungen auf Signaltransduktionskaskaden schließen. Bisher gibt es jedoch kaum Daten über die Rolle von Cathepsinen bei der EZM-vermittelten Signaltransduktion in Stammzellen.

Einer der bekanntesten EZM-vermittelten Signaltransduktionswege und ein Schlüsselsignalweg in Bezug auf Zellproliferation und -differenzierung sowohl in Tumor- als auch in Stammzellen ist der Raf-MEK-Erk-Signalweg oder MAPK-Signalweg (Jaiswal et al, 2000; Salaszyk et al, 2004a; Klees et al, 2005; Roberts & Der, 2007). Dieser wird durch Phosphorylierung submembranöser Signaltransduktionsproteine aktiviert (Pullikuth & Catling, 2007), woraufhin die Signale in den Zellkern weitergegeben werden und einen Komplex an Zellzyklus-abhängigen Kinasen phosphorylieren, die Transkriptionsfaktoren und damit den Zellzyklus aktivieren. Eine Inhibition dieses Signalweges gilt als vielversprechende Therapie zur Behandlung von Tumoren (Roberts & Der, 2007). Unter anderem wird die Signalkaskade durch *Outside-in-Signaling* über Integrine und Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert, wobei sich die transmembranen Rezeptoren in ihrer Aktivität beeinflussen können (Eliceiri, 2001). Der Raf-MEK-Erk-Signalweg wird oft als lineare, unidirektionale Kaskade von Proteinkinasen illustriert, jedoch scheint es sich vielmehr um ein konserviertes Schlüsselement im Rahmen eines komplexen Signalnetzwerkes zu handeln (siehe Abb. B-3).

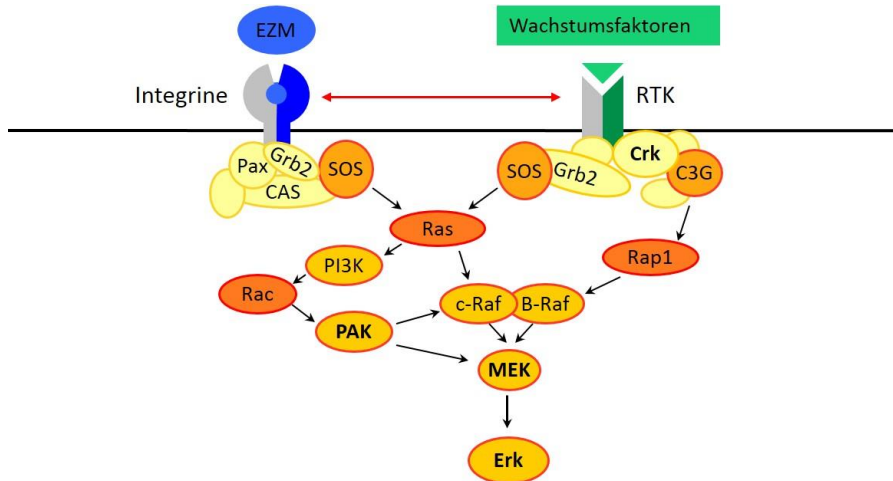


Abb. B-3: Vereinfachte Darstellung der Integrin- und Wachstumsfaktorrezeptoren-vermittelten Signaltransduktion, die an Prozessen der Differenzierung/ Transformation, Selbsterneuerung/ Proliferation und Invasion/ Migration beteiligt ist (modifizierte Darstellung, www.cellsignal.com).

Beispielsweise wird über die p21-aktivierte Kinase (PAK) weiter *downstream* eine Verbindung Integrin-vermittelter und Wachstumsfaktorrezeptoren-induzierter Signalwege hergestellt (Schwartz & Ginsberg, 2002), Crk fungiert als Schlüsselprotein zwischen Tyrosinkinassen und kleinen G-Proteinen und ist bei Migrations-/ Invasionsprozessen in Tumorzelllinien involviert (Cowburn, 2007), um nur einige Signalwege zu nennen, die in den Raf-MEK-Erk-Signalweg konvergieren. Einen wichtigen Einfluss nehmen zudem die sogenannten Rho-GTPasen - unter anderem Rac - aus der Superfamilie der kleinen GTPasen, die maßgeblich an der Modulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind (Hall, 1998; Hall, 2005; Burridge & Doughman, 2006; Huveneers & Danen, 2009). Das Binden extrazellulärer Matrixproteine an Zelloberflächenmoleküle bewirkt die Ausbildung sogenannter fokaler Adhäsionen, verankernde Zellverbindungen, die das Aktin-Zytoskelett der Zelle an EZM-Proteine koppeln. Damit werden sowohl die Zellmorphologie als auch Prozesse der Migration und Invasion beeinflusst. Inwieweit intra- und extrazelluläre Proteasen Einfluss auf den MAPK-Signalweg nehmen, ist bisher nicht bekannt.

C FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT

Über die Funktionen von Cathepsinen in humanen mesenchymalen Stammzellen war zu Beginn dieser Arbeit sehr wenig bekannt. Demgegenüber stehen Daten in der Fachliteratur, die eine Beteiligung von Cathepsinen an Proliferations- und Invasionsprozessen in Tumorzellen belegen. Eine Rolle von Cathepsin X bei der zellulären Seneszenz konnte kürzlich in Fibroblasten gezeigt werden. Wir stellten uns die Frage, ob lysosomale Cysteinproteasen auch in humanen mesenchymalen Stammzellen die Proliferation, Differenzierung, Invasion und Zellalterung beeinflussen. Im Folgenden werden die einzelnen Zielsetzungen angeführt.

1. Analyse der Cathepsin-Expression in hMSC

Zunächst sollte die mRNA-Expression von Cathepsinen in hMSC ermittelt werden, um zu klären, welche Cathepsine in hMSC exprimiert werden. Für die Cathepsine B, L und X wurden in Tumorzellen eine erhöhte Expression und eine Beteiligung an der Tumorprogression nachgewiesen, sodass der Fokus der Arbeit auf diese drei Cathepsine gelegt wurde.

2. Knockdown der Cathepsine B, L und X in hMSC

Um den Einfluss der Cathepsine B, L und X auf die Proliferation und Invasion von hMSC untersuchen zu können, sollte ein Knockdown der Cathepsine mittels RNA-Interferenz in hMSC etabliert werden. Die Knockdown-Effizienz sollte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft werden.

3. Charakterisierung der zellulären Seneszenz von hMSC nach Knockdown der Cathepsine B, L und X

Zunächst sollte der Phänotyp nach transientem Knockdown der Cathepsine B, L und X in hMSC untersucht werden, um erste Hinweise auf eine Induktion von zellulärer Seneszenz in Cathepsin-defizienten hMSC zu erhalten. Zur weiteren Charakterisierung der zellulären Seneszenz sollte die β -Galactosidase-Aktivität, die Proliferations- und Invasionfähigkeit und die Überexpression von Seneszenz-assoziierten Genen nach Knockdown der Cathepsine in hMSC bestimmt werden.

4. Einfluss von exogen zugegebenen (Pro)Cathepsin X auf die proproliferative und proinvasive Signaltransduktion

Der Einfluss von Cathepsin X auf die proproliferative und proinvasive Signaltransduktion in hMSC sollte näher charakterisiert werden. Nach Zugabe von rekombinant hergestelltem Procathepsin X bzw. Cathepsin X zum Zellkulturmedium von hMSC sollte die Phosphorylierung von Signaltransduktionsproteinen evaluiert werden. Der Fokus wurde auf den EZM-abhängigen, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg gelegt, der bei Proliferations- und Invasionsprozessen eine wichtige Rolle spielt.

D MATERIAL UND METHODEN

D 1 Materialien

D 1.1 Geräte

Im Folgenden werden die Geräte für zellbiologische, molekularbiologische und proteinchemische Methoden aufgeführt.

CO₂-Inkubator Jouan IG150	Jouan GmbH, Unterhaching
Fluorospektrometer NanoDrop 3300	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Image Scanner	BioRad Lab. GmbH, München
Mikroskope	
<ul style="list-style-type: none"> IX50 / 70 mit CO₂-Controller Lampe BH2-RFL-T3 SensiCam QE Tempcontrol 37-2 digital Uniblitz VCM-D1 Shutter Zeiss LSM 510 Axiovert Typ S100 	Olympus, Feldkirchen-Westerham PeCon GmbH, Deutschland Olympus, Feldkirchen-Westerham PCO CCD Imaging, Kehlheim PeCon GmbH, Deutschland Vincent Associates, Rochester, USA Carl Zeiss, Jena Carl Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Microtec, Laborsysteme, Overath
PCR Thermal Cycler	
<ul style="list-style-type: none"> LightCycler™ II T personal 	Roche, Mannheim Whatman Biometra, Göttingen
Proteintransfereinheit Fastblot B33	Biometra, Göttingen
Sicherheitswerkbank HERA Safe	Heracus Instruments, Mannheim
Spannungsquelle Mighty Slim II, SX250 Power Supply	Hoefer, Heidelberg
Stickstofftank Locator 4	Sigma, Taufkirchen
Spektrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Ultraschalllanze Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Vertikale Proteinelektrophoreseeinheit Mighty Small II	Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA
Wasserdeionisierungseinheit Membrapure	Membrapure, Bodenheim
Zentrifugen	
<ul style="list-style-type: none"> Eppendorf Centrifuge 5415 R Eppendorf Centrifuge 5415 D 	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg

- Varifuge 3.0 R Heracus Sepatech, München

D 1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

Quantity One®	BioRad Lab. GmbH, München
Image-Pro® PLUS	Media Cybernetics, Silver Spring, USA
Light Cycler Software 3.5	Roche, Mannheim
Microwin 2000 V 4.0	Microtek Laborsysteme, Overath
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim

D 1.3 Materialien für zellbiologische Methoden

Humane mesenchymale Stammzellen:

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der Firma Lonza, USA, bezogen. Diese werden mittels Knochenmarksbiopsie des posterioren Beckenkamms gewonnen, durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und durch ihre selektive Adhärenz an Plastik der Zellkulturflaschen von hämatopoetischen Stammzellen getrennt. Mittels Durchflusszytometrie wurden folgende Oberflächenmoleküle charakterisiert: positiv für CD29, CD44, CD105 und CD166; negativ für CD14, CD34 und CD45 (Marker hämatopoetischer Stammzellen). Zudem wird eine Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen in drei mesodermale Richtungen garantiert. Dabei wird die adipogene Differenzierung durch Lipidvakuolenbildung, die chondrogene Differenzierung durch Bildung von Kollagen II sowie die osteogene Differenzierung durch Mineralisierung (Kalziumdeposition) nachgewiesen. Die Firma garantiert einen negativen Befund auf HIV, Hepatitis-B und -C, Mycoplasmen, Bakterien und Pilze. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene humane mesenchymale Stammzelllinien verwendet, hMSC einer 22-jährigen Spenderin (Spender A) und eines 43-jährigen Spenders (Spender B). Laut Firmenangaben waren die Spender normalgewichtig, hämatologisch unauffällig und zeigten keine Anzeichen für Herzerkrankungen, Diabetes, Neoplasien, Epilepsie, anderen Organerkrankungen bzw. für virale oder bakterielle Infektionen. Zudem wurde die Medikation der Spender überprüft.

Sterile Medien, Zusätze und Lösungsmittel in Zellkultur:

DMEM Serum-freies Medium mit 2mM L-Glutamin 4 g/l Glucose	PAA, Österreich
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS 1x) Mg ²⁺ -und Ca ²⁺ -frei	Invitrogen, Karlsruhe
Humanes Serum	PAA, Österreich
Lipofectamine 2000 (Transfektionsreagenz)	Invitrogen, USA

Proteine und Inhibitoren:

- Cathepsin X Nägler et al. 1999
- Humane Extrazelluläre Matrix BD Biosciences, USA
- Humanes Fibronectin Harbor Bio-Products, USA
- Humanes Vitronectin Promega, Madison, USA
- Procathepsin X Sivaraman et al., 2000
- MEK 1/2 Inhibitor U0126 Promega, Madison, WI, USA

Nutridoma**Sodiumvanadat** (Na_3VO_4) Roche, Mannheim

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Stammzellwachstumsmedium (MSCGM)

- MSC-Basalmedium (MSCBM) Lonza, USA
- MSC-Growth Supplement (MCGS) Lonza, USA
- L-Glutamin Lonza, USA
- Penicillin/ Streptomycin Lonza, USA

Trypsin-/ EDTA-Lösung Lonza, USA**Zusätze für die Adipogenese:**

- Dexamethason Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Indomethacin Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Insulin Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Zusätze für die Osteogenese:

- Dexamethason Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- β -Glycerolphosphat Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- L-Ascorbinsäure-2-phosphat Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Weitere Chemikalien:

- Alizarin-Red-S Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) Invitrogen, Karlsruhe
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Merck, Darmstadt
- Ethanol Merck, Darmstadt
- Formaldehyd Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Glutardialdehyd Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Glyzerol Merck, Darmstadt
- Isopropanol Merck, Darmstadt
- Natronlauge 1 M Merck, Darmstadt
- Oil-Red-O Merck, Darmstadt

Salzsäure 2 M	Apotheke Klinikum Innenstadt
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Weitere Materialien für die Zellkultur:

Eppendorf Gefäße 0,5 ml und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Kryokonservierungsröhrchen	Nalgene, USA
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
Neubauer-Zählkammer Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Polystyrol-Röhrchen 5 ml für die Transfektion	BD Falcon, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Sterile Spritze (20ml)	BD Discardit II
Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore/ Nalgene, USA
Transwell-Platte	Costar, USA
(Invasion Chambers: 6,5 mm Durchmesser, 8 µm Porengröße, 24 Kavitäten)	
Zellkulturflaschen (75 cm ² Oberfläche)	NUNC, USA
Zellkulturplatten mit 6/12/96 Kavitäten	NUNC, USA
Zellschaber 25cm	Sarstedt, Inc. Newton, USA

Fertigsysteme:

CyQuant Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes, USA
BrdU Cell Proliferation ELISA	Roche, Mannheim
Senescence β-Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling, Danvers, USA

siRNA-Oligonukleotide:

Die siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen, Hilden, bezogen und sind nachfolgend in 5'-3'-Richtung angegeben.

„Nonsilencing“ (Negativkontrolle)

Zielsequenz	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT
Sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT
Antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT

Cat X304

Zielsequenz	AAC GGA TCG GAT CAA CAT CAA
Sense	CGG AUC GGA UCA ACA UCA AdTdT
Antisense	UUG AUG UUG AUC CGA UCC GdTdT

Cat Z4

Zielsequenz	TCG GAT CAA CAT CAA GAG GAA
Sense	GGA UCA ACA UCA AGA GGA AdTdT
Antisense	UUC CUC UUG AUG UUG AUC CdGdA

Cat B6

Zielsequenz	CAG CAT GAT TCT TTA ATA GAA
Sense	GCA UGA UUC UUU AAU AGA AdTdT
Antisense	UUC UAU UAA AGA AUC AUG CdTdG

Cat L440

Zielsequenz	AAG GCG ATG CAC AAC AGA TTA
Sense	GGC GAU GCA CAA CAG AUU AdTdT
Antisense	UAA UCU GUU GUG CAU CGC CdTdT

D 1.4 Materialien für molekularbiologische Methoden

Für Arbeiten mit RNA wurde RNase-freies Wasser (Qiagen, Hilden) verwendet.

Materialien:

Light Cycler® Kapillaren	Roche, Mannheim
QiaShredder	Qiagen, Hilden
RNase freie Pipettenspitzen, Safeseal Tips Premium	Biozym Biotech, Wien

Fertigsysteme:

iScript cDNA Synthese Kit	BioRad, USA
Light Cycler® FastStart DNA Master SYBR green I Kit	Roche, Mannheim
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
VenorGeM, PCR Mycoplasmen-Diagnostik Kit	Minerva Biolabs, Berlin

Light Cycler® Primer:

Die Cathepsin- und GAPDH-Primer wurden von Search-LC, Heidelberg, die Primer für die Seneszenzmarker p16, p21, p53 und Caveolin-1 wurden von Qiagen, Hilden, bezogen.

D 1.5 Materialien für proteinchemische Methoden

Für proteinchemische Methoden wurde entionisiertes Wasser („HPLC-grade“) verwendet.

Stock- und Pufferlösungen:

Bei sämtlichen Puffer- und Stocklösungen wurde der pH mit 10 M Salzsäure eingestellt.

Stocklösungen zum Gießen von Acrylamidgelen:

Trenngelpuffer	Tris-Base 1,5 M, pH 8,8 (Trishydroxymethylaminomethan) Lagerung bei 4 °C	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sammelgelpuffer	Tris-Base 0,5 M, pH 6,8 Lagerung bei 4 °C	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Stocklösung	10 % SDS in H ₂ O Lagerung bei Raumtemperatur	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)-Stocklösung	10 % APS in H ₂ O (500 µl Aliquots) Lagerung bei -20 °C	Appllichem, Darmstadt

Lysispuffer:

Denaturierender Lysispuffer (Laemmli-Puffer) für Western Blot	<ul style="list-style-type: none"> • Blue Loading Buffer 1x • 10 % 1,4-Dithiothreitol (DTT) • 1 % Natriumvanadat (Na₃VO₄) als Phosphatase-Inhibitor • 1 % Protease Inh. Cocktail Set III Puffer wird frisch hergestellt	Cell Signaling, USA Sigma-Aldrich, Deisenhofen Sigma-Aldrich, Deisenhofen Calbiochem, Darmstadt
Nicht denaturierender Lysispuffer für ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • 50mM Na₂PO₄/NaH₂PO₄ • 0,2 M NaCl • 5 mM EDTA • 1 % Triton pH 6,0, Lagerung bei 4 °C bei Verwendung: + 1% Protease Inh. Cocktail Set III	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Deisenhofen Calbiochem, Darmstadt

Weitere Pufferlösungen für Western Blot:

Elektrophorese-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,25 M Tris-Base • 1,92 M Glycin • 1 % SDS Lagerung bei Raumtemperatur	Sigma-Aldrich, Deisenhofen Carl Roth GmbH, Karlsruhe Serva, Heidelberg
Blotting-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 45 mM Tris-Base • 39 mM Glycin • 0,00375 % SDS • 20 % Methanol pH 8,3, Lagerung bei Raumtemperatur	Sigma-Aldrich, Deisenhofen Carl Roth GmbH, Karlsruhe Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt
TBST Stocklösung 10x für TBST 1x für Blockierungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,65 M Tris-Base • 2 M NaCl pH 7,4-7,6, Lagerung bei Raumtemperatur + 0,05 % Tween-20 + 0,05 % Tween-20 + 3,5 g Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen Merck, Darmstadt Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Pufferlösungen für CatX-ELISA:

Beschichtungs-Puffer A, Carbonatpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 15,9 mM Na₂CO₃ • 35 mM NaHCO₃ pH 9,6	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
Waschpuffer B 10x	<ul style="list-style-type: none"> • 1,5 M NaCl • 0,1 M NaH₂PO₄ • 0,1 M NaHPO₄ • 0,5 % Tween-20 pH 7,4, Lagerung bei Raumtemperatur	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Serva, Heidelberg

Weitere Substanzen:

Acrylamid

Serva, Heidelberg

Albumin-Standardlösung

Pierce, Rockford

BC Assay Reagenz A und B

Uptima, Interchim, Frankreich

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassie blau G-250	Pierce, Rockford
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Glyzerol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Salzsäure 10 M	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, USA
Single Component TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Applichem, Darmstadt
Entwickler	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fixierer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Weitere Materialien:

BioMax Filme	Kodak, USA
BioMax Filmkassette	Kodak, USA
Eppendorf GefäÙe 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schüll, Kassel
Whatman Filterpapier Nr. 1	Whatman/ Vetter, Ammerbruch

Antikörper und Konjugate:

Alexa Fluor® 488 anti-rabbit IgG (H+L) (goat)	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Aktin (monoclonal mouse)	Sigma #A4700
anti-Procathepsin X (goat)	R&D Systems, USA #AF934
anti-Procathepsin X (rabbit)	Naegler et al., 2006
anti-Crk II (polyclonal rabbit)	Cell Signaling # 3492
anti-Phospho-Crk II (polyclonal rabbit)	Cell Signaling #3491
anti-P44/42 MAP Kinase (monoclonal rabbit)	Cell Signaling #4695
anti-Phospho-P44/42 MAP Kinase (monoclonal rabbit)	Cell Signaling #9101
anti-MEK 1/2 (polyclonal rabbit)	Cell Signaling #9122
anti-Phospho-MEK 1/2 (monoclonal rabbit)	Cell Signaling #9145
anti-PAK 1/2/3 (polyclonal rabbit)	Cell Signaling #2604
anti-Phospho-PAK1/2 (polyclonal rabbit)	Cell Signaling #2606
anti-Rac 1 (monoclonal mouse)	BD Biosciences #610650
anti-mouse HRP-linked (goat)	New England Biolabs, USA
anti-rabbit HRP-linked (goat)	New England Biolabs, USA

anti-goat/-sheep HRP-linked (mouse) Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Fertigsysteme:

Human Pro-Cathepsin B-ELISA

R&D Systems, USA

Human Cathepsin L-ELISA

ImmunoBiol. Lab., Hamburg

Anmerkung: Alle verwendeten Chemikalien hatten „p.a.“ Qualität. Die Reaktions- und Kultivierungsgefäße wurden entweder steril bezogen oder vor der Verwendung bei 121 °C und 1×10^5 Pa Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

D 2 Methoden**D 2.1 Zellbiologische Methoden****D 2.1.1 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen****Herstellen des Zellkulturmediums**

Für die Herstellung des Stammzellwachstumsmediums (MSCGM) der Firma Lonza wurden 440 ml Kulturmedium (MSCBM) mit 50 ml fetalem Kälberserum (MCGS), 10 ml L-Glutamin (200 mM) sowie 0,5 ml Penicillin/ Streptomycin vermischt. Das vervollständigte Medium wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert, da dieses lediglich für zwei Wochen im Kühlschrank stabil bleibt.

Auftauen und Aussäen humaner mesenchymaler Stammzellen

Von der Firma Lonza wurden je 2155000 hMSC (Spender A) bzw. 1920000 hMSC (Spender B) in jeweils 1 ml Kryokonservierungsmedium in der 1. Passage geliefert. Zur Aussaat der Zellen wurde der Inhalt der Kryogefäße eine Minute in 37 °C warmem Wasser an- und schließlich bei Raumtemperatur gänzlich aufgetaut, nachdem unter sterilen Bedingungen ein Druckausgleich im Röhrchen durch leichtes Öffnen des Deckels ermöglicht wurde. Unmittelbar nach dem Erwärmen wurden die Zellen in 5 ml vorgewärmten Stammzellwachstumsmedium resuspendiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation der Zellen bei 500 x g und Raumtemperatur waren die Zellen sedimentiert und konnten nach Abnahme des Überstandes in 5 ml Stammzellwachstumsmedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren erneut resuspendiert werden. Die Zellen wurden gleichmäßig auf im Brutschrank vorgewärmten, mit jeweils 9 ml Wachstumsmedium gefüllten, fünf T75-Kulturflaschen verteilt. Eine gleichmäßige Verteilung der Stammzellen in den Kulturflaschen wurde durch vorsichtiges Schwenken und horizontale Lagerung im Brutschrank erreicht. Dabei wurde auf die empfohlene Aussaatdichte der Stammzellen von 5000 - 6000 Zellen pro cm^2 geachtet.

Expansion und Subkultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Die Kulturflaschen wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, einer 90%igen Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Sättigung von 5 % aufbewahrt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Zellen wurden bis zu einem Konfluenzgrad von maximal 80 % weitergezüchtet, was nach etwa 6-7 Tagen erreicht wurde. Eine zu hohe Zelldichte wurde vermieden, um eine Induktion von Differenzierungsvorgängen sowie eine Kontaktinhibition durch Zell-Zell-Kontakte zu verhindern. Bei einem Konfluenzgrad von 80 % wurde das Medium entfernt und die adhärenen Zellen mit 4 ml einer Mg²⁺- und Ca²⁺-freien Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) unter gleichmäßigem Schwenken der Kulturflasche gewaschen. Nach Abnahme des PBS wurde 4 ml Trypsin/ EDTA-Lösung zugegeben. Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug 5 Minuten und wurde maximal bis 10 Minuten verlängert, falls die Zellen sich unter mikroskopischer Kontrolle nicht vollständig von der Plastikoberfläche der Kulturflasche ablösen. Ein Schwenken der Kulturflasche beschleunigte die Ablösung der Zellen. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml MSCGM gestoppt. Die Zellsuspension wurde zum vollständigen Entfernen des Trypsin/ EDTA-Gemischs in ein 50 ml-Falkonröhrchen überführt und 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit einem geringen Volumen an MSCGM (< 5 ml) resuspendiert. Die Zellzahl wurde vor erneuter Kultivierung in der Neubauerzählkammer bestimmt.

Eine Subkultivierung mesenchymaler Stammzellen ist aufgrund möglicher Veränderungen im Proliferations- und Differenzierungsverhalten nur begrenzt möglich. In dieser Arbeit wurde sehr genau auf die Anzahl der Passagen bzw. die Populationsverdopplung der Stammzellen geachtet. Die Stammzellen wurden bis Passage 3 expandiert, anschließend für Versuche verwendet oder erneut eingefroren. Stammzellen wurden maximal bis zur 7. Passage für Untersuchungen verwendet.

Zellzahlbestimmung und Neuaussäen der Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauerzählkammer verwendet. Auf eine gleichmäßige Verteilung der in einer geringen Menge an Medium resuspendierten Stammzellen ist besonders zu achten, um bei der Entnahme von 10 µl eine repräsentative Probe zu erhalten. Diesem Aliquot wurden 10 µl Trypanblau zugegeben. Die vitalen Zellen, die sich nicht mit dem Farbstoff anfärbten, wurden anschließend gezählt. Die vier Eckquadrate der Zählkammer wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Um die tatsächliche Zellzahl zu bestimmen, wurde der Mittelwert der Zellzahl der vier Eckquadrate errechnet. Daraufhin wurde das Ergebnis mit 2×10^4 multipliziert (Multiplikation mit 2 wegen der 1:2 Verdünnung mit Trypanblau; Multiplikation mit 10^4 , um eine Zellzahl pro ml zu erhalten, ein Eckquadrat wird von 0,1 µl Zellsuspension ausgefüllt). Für die Reinkultivierung von Zellen wurden 5000 Zellen/

cm² ausgesät. Dazu wurde das entsprechende Volumen, das durch die Zellzahlbestimmung errechnet werden konnte, in 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben, welches sich in einer neuen Kulturflasche befand.

Einfrieren von humanen mesenchymalen Stammzellen

Die Zellzahl wurde nach Ablösen der Zellen mittels Trypsin-EDTA bestimmt und jeweils 500000 Zellen auf ein Kryogefäß in je 1 ml Einfriermedium verteilt. Das Einfriermedium bestand zu 85 % aus dem Kulturmedium, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 5 % bovinem Serumalbumin (BSA). Die Einfriereröhrchen wurden für zwei Stunden bei -20 °C, anschließend über Nacht bei -80 °C gelagert. Am folgenden Tag konnten sie in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren werden.

D 2.1.2 Lipofektion humaner mesenchymaler Stammzellen mit siRNA

Für die Entdeckung der RNA-Interferenz wurde 2006 der Nobelpreis für Medizin & Physiologie an die US-Amerikaner Andrew Z. Fire (Universität Stanford) und Craig C. Mello (Universität Massachusetts, Worcester) verliehen (Fire et al, 1998). Darunter versteht man eine durch RNA vermittelte, posttranskriptionelle Stilllegung von Genen (*gene-silencing*), woraus ein Knockdown der Proteinexpression resultiert. Durch die Bindung kurzer RNA-Abschnitte an eine komplementäre mRNA der Wirtszelle kommt es zur enzymatischen Spaltung und damit Inaktivierung der mRNA. Die Translation in ein funktionsfähiges Protein wird damit verhindert. Die Voraussetzungen für diesen Mechanismus sind natürlicherweise im Organismus vorhanden und dienen der Abwehr von Virusinfektionen durch Inaktivierung von Virus-RNA sowie der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität durch Inaktivierung von Transposons. Dieser Mechanismus kann in den Biowissenschaften genutzt werden, um bestimmte Gene gezielt auszuschalten oder diese über einen gewissen Zeitraum herabzuregulieren (Karagiannis & El-Osta, 2005; Tuschl, 2001). Dies geschieht durch Einbringen von Fremd-RNA (Transfektion) mittels *small interfering ribonucleic acids* (siRNA) in die Wirtszelle, die komplementäre Eigenschaften zur Ziel-mRNA der Zelle aufweist. In dieser Arbeit wurde eine transiente Transfektion von hMSC mit diversen siRNAs durch Lipofektion durchgeführt. Die Methode der Lipofektion beruht auf der Wechselwirkung der anionischen Nukleinsäuren und des kationischen amphiphilen Transfektionsreagenz. Durch eine Komplexbildung werden Mizellen generiert, die endozytotisch oder durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden können. Somit können künstlich synthetisierte siRNA-Sequenzen von 21 bp in die Zelle zur gezielten Degradation von spezifischen mRNA-Transkripten eingebracht werden.

Einen Tag vor der Transfektion mit siRNA wurden hMSC in 6-Kavitäten-Kulturschalen mit einer Konfluenz von 30-40 % ausgesät (ca. 30000 Zellen/ Kavität). Für den Transfektionsansatz wurden spezielle Transfektionsröhrchen aus Polystyrol verwendet und die Reagenzien unter sterilen Bedingungen auf Eis vorbereitet. Pro Kavität wurden 2,5 µl der jeweiligen siRNA zu 250 µl DMEM in ein Polystyrolröhrchen gegeben und für 2-3 Minuten inkubiert. Die eingesetzte siRNA war entweder spezifisch für Cathepsin B, Cathepsin L oder Cathepsin X oder unspezifisch (Kontroll-siRNA). In der Zwischenzeit wurden in einem separaten Polystyrolröhrchen pro Kavität jeweils 5 µl Lipofectamine 2000 mit 250 µl DMEM verdünnt. Anschließend wurden die Transfektionsansätze zusammengeführt, sodass pro Kavität 250 µl DMEM mit 5 µl Lipofectamine 2000 sowie 250 µl DMEM mit 2,5 µl der jeweiligen siRNA pipettiert werden konnte. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und 1,5 ml frisches Stammzellwachstumsmedium (MSCGM ohne Antibiotika) in die 6-Kavitäten-Kulturschalen zugegeben. Anschließend wurden jeweils 500 µl des Transfektionsansatzes vorsichtig tropfenweise in die Kavitäten verteilt. Die Endkonzentration der siRNA lag somit bei 25 nM. Die Zellen wurden 6 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, anschließend das Transfektionsmedium abgenommen, die Kavitäten mit PBS gewaschen und je 2 ml des Stammzellnährmediums zugegeben.

D 2.1.3 Proliferationsmessungen

Bestimmung der Populationsverdopplung bei Subkultivierung

Um die Proliferation der Zellen in Kultur zu untersuchen, wurde bei jeder Subkultivierung eine Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer durchgeführt und daraus die Zahl der Populationsverdopplungen bestimmt. Die Analyse der Populationsverdopplung ermöglicht die Bestimmung der Zellteilungen der hMSC und gibt Aufschluss über die Proliferationsrate. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen korreliert die Passagezahl anfänglich mit der Populationsverdopplung, da eine Subkultivierung bei einer Verdopplung der Zellzahl in der Kulturflasche vorgenommen wurde (Konfluenzgrad 30-40 % bis 70-80 %).

Folgende Formel wurde zur Berechnung der Populationsverdopplung herangezogen:

$$PV = (\log N / N_0) / \log 2$$

PV Populationsverdopplung
N Zellzahl vor Subkultivierung
N₀ neu ausgesäte Zellzahl

DAPI-Färbung und Auszählen der angefärbten Zellkerne

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens der hMSC in verschiedenen Passagen wurden insgesamt 48000 Zellen in sechs Kavitäten von 12-Kavitäten-Kulturschalen ausgesät (8000 Zellen pro Kavität) und in je 1 ml MSCGM kultiviert. Die Zellkerne von jeweils zwei Kavitäten wurden mit DAPI zu folgenden Zeitpunkten angefärbt: nach Adhärenz der Zellen am Folgetag nach Aussäen der Zellen (Zeitpunkt 0) und nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden; dies wurde für hMSC in der 6., 12., 19. und 22. Passage durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen fünf Minuten mit 5%igem Glutardialdehyd fixiert, drei Minuten zur Membranpermeabilisierung mit 0,2%igem Triton X 100 behandelt und anschließend drei Minuten mit DAPI (1:7000 Verdünnung) gefärbt und erneut zweimal mit PBS gewaschen, bevor das Auszählen der Zellkerne erfolgte. Sämtliche Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Drei zufällig ausgewählte Stellen der Kavitäten wurden bei 4-facher Vergrößerung und einer festgelegten Belichtungszeit (50 ms) fotografiert. Das Auszählen erfolgte mit Hilfe des Programms Image-Pro® PLUS.

CyQuant-Proliferationsassay

Mit dem CyQuant-Assay-Proliferation Kit der Firma Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe) ist die Messung der Proliferation durch den Einsatz des fluoreszierenden Farbstoffs CyQuant möglich, der unspezifisch in Nukleinsäuren interkaliert (Karow, 2008). Nach Lyse der Zellen mit nachfolgender Inkubation mit dem Farbstoff konnten durch Fluoreszenz-Messung die Wachstumsraten siRNA-transfizierter hMSC im Vergleich zu Kontrollzellen ermittelt werden. Hierzu wurden hMSC mit einer Konfluenz von ca. 25 - 35 % in den Vertiefungen einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät (30000 Zellen pro Kavität) und wie oben beschrieben mit siRNA transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Zellen in 96-Kavitäten-Platten (pro Kavität 1000 Zellen). Die übrigen hMSC wurden erneut in 6-Kavitäten-Platten angezüchtet und zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz verwendet. Es folgte eine Kultivierung der siRNA-transfizierten hMSC in den 96-Kavitäten-Platten über sieben Tage. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten - nach Adhärenz der Zellen sowie nach 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen - mit PBS gewaschen und schließlich bei -80 °C gelagert. Beim Waschen mit PBS wurden die Kavitäten ausgeklopft und nicht abgesaugt, um die Zellzahl durch die Waschschrte möglichst wenig zu beeinflussen. Schließlich wurden die siRNA-transfizierten hMSC lysiert und mit dem CyQuant-Farbstoff bei Raumtemperatur inkubiert (pro Kavität 100 µl Lysepuffer, CyQuant-Farbstoff in einer Verdünnung von 1:500). Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 480 nm Anregung und 520 nm Emission gemessen.

BrdU-Proliferationsassay

Bei dieser Methode zur Messung der Zellproliferation wird die Replikation der zellulären DNA durch Einbau des Pyrimidin-Analogons BrdU (Bromdesoxyuridin) in die DNA während der S-Phase der Zellteilung direkt gemessen. Dazu wurden hMSC einen Tag nach siRNA-Transfektion in 96-Kavitäten-Kulturplatten in einer Zelldichte von 8000 bzw. 16000 Zellen/Kavität ausgesät. Weitere zwei Tage später wurde BrdU-Labeling-Lösung (10 µl in 100 µl MSCGM pro Kavität, Endkonzentration 10 µM BrdU) zugegeben und die Zellen für 8 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ausklopfen der Kavitäten wurden die Zellen durch eine im Kit enthaltene Fixierungslösung (200 µl/ Kavität) für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Dem erneuten Ausklopfen der Platte folgte die Zugabe des anti-BrdU-Antikörpers (100 µl/ Kavität) für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Kavitäten gründlich ausgewaschen, um nicht gebundenes BrdU-Konjugat zu entfernen (3 x 200 µl Waschlösung). Die photometrische Detektion mit einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge bei 690 nm) wurde nach 30 Minuten Inkubation mit Substrat (100 µl/ Kavität) und Stoppen der Reaktion mit 25 µl 1 M Schwefelsäure durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung von BrdU und dessen Konjugat an die Mikrotiterplatte auszuschließen, wurden diese Substanzen in drei Kavitäten ohne Zellen pipettiert und die gemessene Absorption als Leerwert von den anderen Messwerten abgezogen.

D 2.1.4 β-Galactosidase-Färbung

Die pH-abhängige Aktivität der β-Galactosidase gilt als Indikator für die Seneszenz von Zellen (Dimri et al, 1995). Der *Senescence-β-Galactosidase-Staining Kit* (Cell Signaling) ermöglicht eine histochemische Anfärbung der β-Galactosidase bei einem pH-Wert von 6. Humane mesenchymale Stammzellen in verschiedenen Kultivierungspassagen, sowie siRNA-transfizierte Zellen wurden auf 6-Kavitäten-Platten kultiviert. Nach Absaugen des Wachstumsmediums wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer im Kit bereitgestellten Fixierungslösung (1,0 ml/ Kavität) 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, währenddessen die Färbelösung nach Herstellerangaben frisch zubereitet wurde. Der pH der Färbelösung sollte für ein optimales Ergebnis bei pH 6 liegen; dieser wurde mit Hilfe eines Indikatorpapiers überprüft. Nach der Fixierung erfolgte das zweimalige Waschen mit jeweils 2 ml PBS, daraufhin wurde jeweils 1 ml der hergestellten Färbelösung pro Kavität pipettiert und die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fotografiert, die Langzeitlagerung erfolgte in 70 % Glycerol bei 4 °C. Für die Auswertung wurden im Durchschnitt 500 Zellen pro Kavität auf die Intensität der β-Galactosidase Färbung untersucht. Dabei wurden je nach Grad der Blaufärbung der Zellen

Punkte vergeben: 0 für keine Färbung, 1 für leichte Färbung, 2 für starke und 3 für sehr starke Anfärbung.

D 2.1.5 Adipogene und osteogene Differenzierung

Chemische Differenzierung

Für die chemische Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen wurden 600000 Zellen auf sechs Kavitäten einer 6-Kavitäten-Kulturschale ausgesät. Die Zusammensetzung der für die Adipogenese und Osteogenese notwendigen Kulturmedien ist in Tabelle D-1 zusammengefasst (Ilmer, 2009). Als Basismedium wurde MSCGM verwendet. Pro Kavität wurden jeweils 2 ml Medium zugegeben. Für die Osteogenese wurde das entsprechende Medium zweimal wöchentlich gewechselt. Die adipogene Differenzierung bestand zum einen aus einer fünftägigen Stimulierung mit Induktionsmedium und zum anderen aus einer zweitägigen Konservierung des Differenzierungsstatus in Erhaltungsmedium. Der Zyklus wurde bis zu dreimal durchlaufen.

Osteogene Zusätze	
Zusatz	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	100 nM
β -Glycerolphosphat	10 mM
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	50 μ M

Adipogene Zusätze für Induktionsmedium	
Zusatz	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	1 μ M
Indomethacin	0,2 mM
Insulin	0,01 mg/ml
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	0,5 mM

Adipogene Zusätze für Erhaltungsmedium	
Zusatz	Endkonzentration im Medium
Insulin	100 μ g/ml

Tabelle D-1: Zusammensetzung der Kulturmedien für die Adipogenese und Osteogenese

Histochemische Färbung von hMSC

Nach Kultivierung der hMSC in adipogenem oder osteogenem Kulturmedium bzw. in normalem Wachstumsmedium ohne Zusätze für die Differenzierung erfolgte die histochemische Färbung der hMSC (Illmer, 2009).

Zum Nachweis der Osteogenese wurde die Alizarin-Rot-Färbung verwendet. Zellen, die sich zu Osteoblasten entwickeln, bilden extrazelluläre Matrixproteine, in die sich Calciumphosphat einlagert. Diese Einlagerungen können mit Alizarin-Rot angefärbt werden. Zunächst wurde eine Stocklösung (40mM mit pH 4,1) hergestellt. Dafür wurden 0,411 g Alizarin-Rot-S (M = 342,3 g/ mol) der Firma Sigma in einem Gesamtvolumen von 30 ml H₂O unter Erhitzen auf 50 °C und ständigem Rühren gelöst. Der pH-Wert wurde unter Zugabe von NaOH bzw. HCl auf 4,1 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert. Die Färbung wurde nach dem Protokoll von Digirolama durchgeführt (Digirolamo et al, 1999). Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen bei -20 °C eine Stunde mit 2 ml 70%igem Ethanol fixiert und erneut mit 1 ml H₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 2 ml Alizarin-Rot-Stocklösung für 10 min auf dem Schüttler. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen bei 4 °C mit PBS bedeckt aufbewahrt. Lichtmikroskopisch wurde der Anteil der Calciumeinlagerungen in den hMSC bestimmt.

Die Oil-Red-O-Färbung wurde zur Darstellung der während der Adipogenese entstehenden Lipidvakuolen durchgeführt. Zunächst wurde eine 0,3%ige Stocklösung hergestellt. Dafür wurden 150 mg Oil-Red-O mit 50 ml Isopropanol unter Rühren vermischt. Die Stocklösung ist bei Raumtemperatur etwa einen Monat verwendbar. Aus dieser Stocklösung wurde eine 0,2%ige Arbeitslösung frisch zubereitet, indem 12 ml Stocklösung mit 8 ml H₂O vermischt, 10 Minuten inkubiert und schließlich filtriert wurden. Die Arbeitslösung kann lediglich drei Stunden verwendet werden. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen zwei Minuten mit 10 % Formalin bei -20 °C fixiert, mit 50%igem Ethanol gewaschen und daraufhin für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2%iger Oil-Red-O-Arbeitslösung gefärbt. Abschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte, zuerst erneut mit 50%igem Ethanol, dann mit H₂O. Die Zellen wurden bei 4 °C mit H₂O bedeckt aufbewahrt. Der Anteil der Lipidvakuolen konnte nun lichtmikroskopisch quantifiziert werden.

D 2.1.6 Kultivierung von hMSC mit EZM-Proteinen und (Pro)Cathepsin X

Die Kultivierung von hMSC mit EZM-Proteinen bzw. von (Pro)Cathepsin X verfolgte das Ziel, deren Einfluss auf die Phosphorylierung bestimmter Signaltransduktionsproteine im

Immunoblot zu detektieren. hMSC wurden in 6-Kavitäten-Platten mit einer Zelldichte von 40000 - 80000 Zellen in 2 ml MSCGM ausgesät. Am Vortag der Stimulation wurden die Kavitäten mit den adhären hMSC gründlich mit PBS gewaschen, sodass keine Wachstumsfaktoren des Mediums zurückblieben, und über Nacht in DMEM mit 1 % Nutridoma kultiviert, um die Signaltransduktion der Zellen zu reduzieren. hMSC wurden anschließend mit Procathepsin X (125 nM) oder Cathepsin X (100 µM) inkubiert. Als Lösungsmittel wurde dabei PBS verwendet. Als Negativkontrolle diente eine lediglich mit PBS gefüllte Kavität. Als Positivkontrolle wurden Vitronektin und Fibronektin verwendet. Bei der Untersuchung des Erk-Signalweges wurde zusätzlich eine Stunde vor Stimulation der MEK-Inhibitor U0126 zugegeben. Nach 30-minütiger bzw. 60-minütiger Inkubation der hMSC mit den jeweiligen Agenzien wurden die Kavitäten auf Eis gestellt, die Zellen mit eiskaltem PBS mit 0,2 mM Natriumvanadat gewaschen und nach Entfernen von PBS mit 100 µl *Blue Loading Buffer* (Cell Signaling) lysiert, dem 1mM Na₃VO₄ (Phosphatase-Inhibitor) und 1 % Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem) zugegeben wurde. Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers abgelöst und das Zelllysate in Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend folgte eine Sonifizierung der Proben, ein Erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten sowie eine Zentrifugation für weitere fünf Minuten bei 16000 g und 4 °C.

D 2.1.7 Invasionsassay

Mit Hilfe des sog. Transwell-Systems wurde die Invasion von hMSC in einem *in vitro*-Modell untersucht (Karow, 2008). In den Vertiefungen einer 24-Kavitäten-Platte befinden sich Einsätze, die eine Membran mit 8 µm Porengröße enthalten und mit extrazellulärer Matrix beschichtet sind. Diese Inserts werden mit hMSC in serumfreiem Medium befüllt, während der Boden der Platten mit 10 % Humanserum bedeckt wird. Durch das Einbringen von serumfreiem Medium in das obere Abteil und der Verwendung von nährstoffreichem Medium im unteren Bereich der Kavität werden hMSC von oben nach unten angezogen, wobei eine Membran aus extrazellulärer Matrix als Hindernis dient. Zunächst erfolgte eine Beschichtung der Einsätze mit 10 µg humaner extrazellulärer Matrix (hECM) aus der Plazenta (PAA, Österreich), gelöst in 200 µl DMEM, 24 Stunden vor dem Einsetzen der hMSC. Unter sterilen Bedingungen wurden die geöffneten Platten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Verdampfen der Flüssigkeit wurde eine gleichmäßige Beschichtung der Membranen ermöglicht. Zwei Stunden vor dem Aussäen der hMSC erfolgte ein Rehydrieren der Membranen mit jeweils 200 µl DMEM. In das untere Abteil wurden 600 µl MSCBM mit 1 % Nutridoma und 10 % humanem Serum eingebracht. In das Insert wurden jeweils 10000 Zellen gegeben, die in DMEM, 1 % Nutridoma enthaltend, suspendiert wurden. Die Kammern wurden daraufhin für 48 Stunden inkubiert. Zur Darstellung der transmigrierten Zellen wurden die im

oberen Anteil verbliebenen Zellen mit Hilfe eines Wattestäbchens entfernt und die im unteren Kompartiment verbliebenen Zellkerne mit DAPI angefärbt. Dafür wurden die Inserts einmal mit jeweils 800 μ l PBS gewaschen, für 10 Minuten bei 4 °C mit -20 °C kaltem 100%igem Methanol (800 μ l/ Insert) fixiert, mit 1 x PBS mit 0,2%igem Triton X-100 für 10 Minuten rehydriert und die verbliebenen Zellkerne daraufhin mit DAPI (1:7500 in 1 x PBS verdünnt) für 3 Minuten gefärbt (600 μ l/ Insert). Anschließend wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml PBS bedeckt. Die Anzahl der gewanderten hMSC wurde schließlich lichtmikroskopisch ermittelt.

D 2.2 Molekularbiologische Methoden

D 2.2.1 Isolierung von RNA aus humanen mesenchymalen Stammzellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Die Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran einer RNeasy Mini-Säule, kombiniert mit verschiedenen Zentrifugationsschritten, ermöglicht eine effiziente Isolierung von bis zu 100 μ g RNA ab einer Länge von 200 Nukleotiden. Für eine optimale Ausbeute von RNA aus dem Zelllysat wurde die Probe mittels einer QIAshredder-Säule homogenisiert und anschließend durch Zugabe von Guanidiniumisothiocyanat ein Verdau intakter RNA durch Inaktivierung von RNasen verhindert. Durch Zugabe von Ethanol (Endkonzentration 35 %) werden optimale Bindungsverhältnisse für die Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran einer RNeasy Mini-Säule geschaffen. Nach mehreren Zentrifugationsschritten, sowie einem DNase-Verdau, wird die isolierte RNA in RNase-freiem Wasser verdünnt.

Die hMSC-Pellets wurden in 350 μ l RLT-Puffer mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (1 % Endkonzentration) resuspendiert. Dadurch konnte eine vollständige Lyse der Zellmembran und Denaturierung der Proteine erreicht werden. Alternativ wurden die Zellen auch direkt aus der 6-Kavitäten-Platte nach Zugabe des RLT-Puffers in Kombination mit β -Mercaptoethanol mittels eines Zellschabers abgelöst. In einer QIAshredder-Säule wurde das Lysat durch Zentrifugation (zwei Minuten bei 16100 x g) homogenisiert. Dem Lysat wurde anschließend eine äquivalente Menge (350 μ l) an 70%igem Ethanol zugegeben, das Gemisch daraufhin zentral auf die RNeasy-Mini Säule pipettiert, für 15 Sekunden bei 16100 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die nicht-RNA-haltige Fraktion wurde durch Zugabe von 350 μ l RW1-Puffer auf die RNeasy-Mini Säule und einen Zentrifugationsschritt (15 Sekunden bei 16100 x g) entfernt, der Durchfluss wurde erneut verworfen. Im Anschluss wurden 80 μ l DNase-Lösung zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase-Lösung setzte sich aus 10 μ l DNase-Stammlösung und 70 μ l RDD-Puffer zusammen.

Erneut wurden 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy-Säule pipettiert und nochmals zentrifugiert (15-Sekunden bei 16100 x g). Nach Austausch des Sammelröhrchens, wurde ein zweimaliger Waschschrift durch Zentrifugation mit 500 µl RPE-Puffer (15 Sekunden, 16100 x g) angeschlossen. Nachdem die RNeasy-Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt worden war, erfolgte die RNA-Elution in 30 µl RNase-freiem Wasser in die Mitte der Silica-Gel Membran und es schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 1 Minute bei 16100 x g an. Um die Gesamtausbeute zu erhöhen, wurde der letzte Schritt mit 30 µl RNase-freiem Wasser wiederholt. Aufgrund der erneuten Elution war die Konzentration der RNA geringer, die Ausbeute jedoch um ungefähr 15 - 30 % höher. Die Konzentration der erhaltenen Gesamt-RNA wurde photometrisch bei einer Absorption von 260 nm bestimmt. Als Leerwert wurde RNase-freies Wasser herangezogen. Bei einem Quotienten von $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ zwischen 1,8 und 2,2 kann von einer proteinfreien RNA-Lösung ausgegangen werden. Bei der Durchführung wurde auf eine Verwendung von RNase freien Pipettenspitzen geachtet. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

D 2.2.2 cDNA-Synthese

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des iScript™ cDNA Synthese Kits der Firma Bio-Rad. Als Ausgangsmaterial diente die mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen gewonnene Gesamt-RNA. Für die cDNA-Synthese wurden - abhängig von der Ausbeute bei der RNA-Isolierung - 100 bis 1000 ng DNase-behandelte Gesamt-RNA eingesetzt. Die Konzentration der isolierten RNA-Proben wurde zuvor photometrisch bestimmt und diese durch Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser angeglichen, sodass in der Synthesereaktion gleiche Konzentrationen in einem Volumen von 15 µl eingesetzt werden konnten. Zu der jeweiligen Probe wurden 4 µl 5x iScript Reaction Mix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase gegeben, sodass insgesamt 20 µl pro Ansatz enthalten waren. Die reverse Transkription erfolgte 30 Minuten bei 42 °C, nachdem zuvor eine 5-minütige Inkubation bei 25°C für das Anlagern der Primer vorangegangen war. Zum Schluss wurde die reverse Transkriptase denaturiert (5 Minuten, 85 °C). Die so entstandene cDNA konnte bei -20 °C für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

D 2.2.3 Quantitative PCR

In dieser Arbeit wurde das LightCycler-System der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen I wird in die DNA-Doppelstränge, die bei jedem PCR-Zyklus entstehen, eingebaut. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen, die mit der Anzahl der PCR-Produkte korreliert. Um die ursprüngliche Kopienzahl der Probe bestimmen zu können, muss eine Verdünnungsreihe mit genau definierter Kopienzahl mitgeführt werden,

aus der sich eine Standardkurve berechnen lässt. SybrGreen I interkaliert nicht nur in spezifische Produkte, sondern auch in Primerdimere und doppelsträngige Nebenprodukte. Über die Schmelzkurvenanalyse und Agarosegelelektrophorese erfolgte der Nachweis der Spezifität der generierten Produkte.

Die cDNAs wurden abhängig von den zu untersuchenden Genen bzw. verwendeten Primern 1:5 oder 1:10 mit DNase freiem Wasser verdünnt. In jedem LightCycler-Lauf wurden eine Standardreihe zur Quantifizierung und ein Ansatz mit H₂O als Negativkontrolle mitgeführt. Jeweils 5 µl der entsprechenden Proben und Kontrollen wurden für die PCR eingesetzt, in die dafür vorgesehenen eisgekühlten LightCycler-Kapillaren pipettiert und mit 5 µl eines PCR-Ansatzes ergänzt, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Kapillare resultierte. Die PCR-Stocklösung bestand aus 3 µl H₂O, 1 µl des jeweiligen Primer-Sets und 1 µl LightCycler FastStart DNA Master SybrGreen I der Firma Roche. Letzteres setzte sich aus SybrGreen I, DNA-Polymerase, PCR-Puffer und dNTPs zusammen. Abschließend wurde jede Kapillare mit einem Plastikstopfen verschlossen. Die Kapillaren wurden vier Minuten bei 660 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in die LightCycler-Apparatur gestellt. Die PCR-Bedingungen waren abhängig von den verwendeten Primern und richteten sich nach den vom Hersteller Search-LC bzw. Qiagen empfohlenen Angaben. Diese werden in Tabelle D-2 aufgeführt.

Primer von	Search-LC	Qiagen
	95 °C für 10 Min.	95 °C für 15 Minuten
Denaturierung	95 °C für 10 Sek.	94 °C für 15 Sek.
Primerhybridisierung	68 °C für 10 Sek.	55 °C für 20 Sek.
Elongation	72 °C für 16 Sek.	72 °C für 20 Sek.
Anzahl der Zyklen	45 Zyklen	

Tabelle D-2: PCR-Bedingungen für Search-LC- und Qiagen-Primer

Nach Durchlaufen der PCR-Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Da die Konzentrationen der jeweiligen cDNA-Proben unbekannt waren, wurde bei jeder Probe das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitbestimmt, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewährleisten.

D 2.3 Proteinchemische Methoden

D 2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der im Zelllysate enthaltenen Proteinkonzentration wurde die BCA-Methode verwendet. Das Prinzip beruht auf der photometrischen Messung eines blauen Cu^{2+} -Komplexes, der sich zwischen Peptidbindungen und Bicinchoninsäure (BCA) bei Kupferzugabe ausbildet. Dafür wurden die Proben 1:10 verdünnt und jeweils 100 μl Lysat mit 100 μl BCA/ Cu^{2+} -Lösung (24:1) in die Kavität einer 96-Kavitäten-Platte pipettiert. Zur Quantifizierung der Proben wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Albumin-Standardlösung bekannter Proteinkonzentration (2 mg/ml) angefertigt. Die Bestimmung der Standards und der Proben erfolgte in Duplikaten. Nach einer Inkubationsphase von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

D 2.3.2 SDS-PAGE und Immundetektion mittels Western-Blot

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Gel-Elektrophorese verwendet. Die Denaturierung und negative Ladung der Proteine wurde durch Sodiumdodecylsulfat gewährleistet, so dass eine Auftrennung ausschließlich nach der Molekularmasse erfolgte. Für sämtliche Versuche wurden 12 %ige Trenngelle verwendet, die sich wie folgt zusammensetzten: 4,5 ml dH_2O , 2,5 ml Trenngel-Puffer, 3 ml 40% (w/v) (Bis-)Acrylamid, 100 μl 10 % (w/v) SDS, 10 μl TEMED und 100 μl 10 % (w/v) APS. Das Volumen bezieht sich auf 2 Gele mit 1,5 mm Dicke. Für das Sammelgel wurden 5,675 ml dH_2O , 2,5 ml Sammelgel-Puffer, 1,65 ml 40% (w/v) (Bis-)Acrylamid, 100 μl 10 % (w/v) SDS, 10 μl TEMED und 100 μl 10 % (w/v) APS verwendet. TEMED und APS wurden kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben, nachdem alle anderen Komponenten vermischt wurden. Damit wurde die Polymerisierung der Gele eingeleitet. Zur Herstellung der Zelllysate wurde der unter D 1.5.1 beschriebene denaturierende Puffer verwendet. Die Proben wurden sonifiziert, 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und anschließend bei 4 °C und 16000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden auf die Gele aufgetragen (max. 20 μl / Tasche) und die Elektrophorese bis zur gewünschten Trennung bei 125 V durchgeführt. Mit Hilfe vorgefärbter Markerbanden konnte die Trennung während des Laufs abgeschätzt werden. Zur direkten Visualisierung von Proteinbanden wurden Gele mit Coomassie-Brilliantblau-Lösung (0,5 % Coomassie blau G-250, 10 % Essigsäure, 45 % Methanol) für 10 Minuten auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Entfärberlösung (10 % Essigsäure, 45 % Methanol) über 2-3 Stunden konnten die Banden sichtbar gemacht werden. Zum Trocknen und Erhalten der Gele wurden die Gele für 15 Minuten in H_2O auf dem Schüttler gewaschen und für 20 Minuten in

Trocknungslösung (20 % Methanol und 2 % Glycerol) geschwenkt. Im Anschluss erfolgte das Trocknen der Gele zwischen Zellophanpapier.

Zur Identifizierung der aufgetrennten Proteine wurde ein Western Blot durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt die Detektion über Antikörper, die an ein Epitop oder mehrere Epitope des Proteins binden, nachdem das Protein mit Hilfe eines *semi dry*-Elektrotransferverfahrens vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wurde. Dafür wurde das Gel, eine Nitrozellulosemembran, sowie 18 Whatman-Filterpapiere mit Blotting-Puffer (siehe D 1.5.1) getränkt und wie folgt in die vorgesehene horizontale Immunoblot-Apparatur eingelegt: ANODE - 9 Filterpapiere - Nitrozellulosemembran - Gel - 9 Filterpapiere - KATHODE. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 100 mA für 90 Minuten. Nach dem *semi dry*-Transfer wurde die Membran für 3 x 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler in TBST mit 3% BSA inkubiert, dadurch werden unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch Abspritzen mit H₂O und Waschen mit TBST (3 x 10 Minuten, Schüttler) entfernt. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper, ein HRP (horse radish peroxidase)-Konjugat (1 : 20000 in TBST verdünnt), für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch das Waschen der Membran mit H₂O und TBST, erfolgte die Detektion nach 5-minütiger Inkubation der Membran in einer Luminol/ H₂O₂-Lösung durch Auflegen und Entwickeln von Röntgenfilmen.

D 2.3.3 Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen

Zur extra- und intrazellulären Detektion und Quantifizierung von humanem (Pro)Cathepsin X wurde in unserer Arbeitsgruppe ein sensitiver, spezifischer Enzym-gekoppelter Immunoassay etabliert, der im Folgenden kurz beschrieben wird (Nägler et al, 2006, Lechner, 2008). Zunächst erfolgte die Beschichtung einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte mit dem in unserem Labor hergestellten Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X aus Kaninchen (*Capture*-Ak). 10 µl Antikörperlösung wurden mit 10 ml Beschichtungspuffer (Zusammensetzung siehe D 1.5.1) verdünnt, pro Kavität wurden anschließend 100 µl pipettiert. Nach 12- bis 15-stündiger Inkubation der Platte bei 4 °C erfolgte das Ausklopfen der Platte und 5-maliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer pro Kavität. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden im Anschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur mit je 100 µl Blockierungspuffer (Waschpuffer B + 4 % BSA) abgesättigt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurden Standard und Proben als Duplikate mit je 100 µl in die Kavitäten pipettiert. Die Standardreihe mit rekombinantem Procathepsin X bestand aus den Konzentrationen 8000, 4000, 2000, 1000,

500, 250, 125 und 62,5 pg/ml, die Verdünnung erfolgte mit Probenpuffer (Waschpuffer + 2% BSA). Zellysate wurden in der Regel 1:10, Zellkulturüberstände 1:5 verdünnt. Die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, erneut ausgeklopft und 5 x mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Als zweiter polyklonaler Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X wurde anti-Cathepsin X-IgG aus Ziege 1:200 (Detektions-Ak 1) in Probenpuffer verwendet und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde im Anschluss wiederum 5 x gewaschen und daraufhin mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper gegen Ziege (anti-Ziege IgG, POD konj., Detektions-Ak 2), 1:20000 verdünnt, für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Substrat pro Kavität (Tetramethylbenzidin, TMB) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Hinzufügen von 100 µl einer Stopplösung (1 M H₂SO₄) wurde die Reaktion beendet. Mit Hilfe eines Mikrotitermessgeräts wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt und die entsprechenden Werte auf den Standard bezogen.

Bei dem ELISA zur Bestimmung der (Pro)Cathepsin-B-Konzentration handelte es sich um einen kommerziell erhältlichen Kit (Quantikine®, R&D Systems), der nach Angaben der Firma durchgeführt wurde.

D 2.4 Datenanalyse

Für die statistische Datenanalyse wurde beim Vergleich zweier Stichproben der Student T-Test mit zweiseitiger Verteilung verwendet. Beim Vergleich mehrerer Variablen wurde die Varianzanalyse (analysis of variance = ANOVA) durchgeführt. In den Abbildungen des Ergebnisteils wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben, die mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel berechnet wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism®. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,001$ (***) angenommen.

E ERGEBNISSE

E 1 Charakterisierung der humanen mesenchymalen Stammzellen

In Vorversuchen wurden hMSC in Zellkultur hinsichtlich ihres Proliferations- und Differenzierungsvermögens charakterisiert, um den optimalen Zeitrahmen für die nachfolgenden Funktionsuntersuchungen mit Cathepsinen zu bestimmen.

E 1.1 Proliferationsverhalten der hMSC

Zunächst wurde das Proliferationsverhalten der hMSC in Zellkultur untersucht. Dazu wurde die Zellzahl der hMSC von zwei verschiedenen Spendern während jeder Subkultivierung bestimmt und daraus die kumulative Populationsverdopplung (KPV) errechnet. Stammzellen von Spender A wurden bis zur 29. Passage subkultiviert, hMSC von Spender B bis zur 7. Passage. Das Proliferationsverhalten in Abbildung E-1 (A) wird ab der 5. Passage dargestellt, da die Zellteilungen bis zur 2. Passage von der Firma Lonza vorgenommen wurden und bis einschließlich der 4. Passage keine Zellzahlbestimmung in unserem Labor durchgeführt wurde. Es zeigte sich für beide Stammzelllinien eine kontinuierliche Proliferation bis zur 7. Passage, wobei sich für hMSC von Spender B eine niedrigere Wachstumsrate im Vergleich zu hMSC von Spender A abzeichnete. Im Verlauf der weiteren Kultivierung von hMSC des Spenders A konnte ein Proliferationsarrest ab 12 bis 14 KPV (19. bis 22. Passage) nach etwa 50 Tagen *in vitro* beobachtet werden.

Eine Abnahme der Proliferation mit zunehmender Passagierung der hMSC bestätigte sich auch in der DAPI-Färbung der hMSC-Zellkerne. Für diesen Versuch wurden hMSC des Spenders A in der 6., 12., 19. und 22. Passage verwendet und die Zellkerne zu den Zeitpunkten $t_1 = 0$ h, $t_2 = 24$ h und $t_3 = 48$ h nach Aussäen in 6-Kavitäten-Platten mit DAPI gefärbt (Abb. E-1 (B)). Es zeigte sich im untersuchten Zeitraum von 48 Stunden für die Stammzellen in der 6., 12. und 19. Passage ein Anstieg der Zellzahl, wobei sich ein Trend zu verminderter Proliferation mit steigender Passagezahl abzeichnete. Für die Stammzellen in der 22. Passage konnte keine Zellproliferation mehr verzeichnet werden.

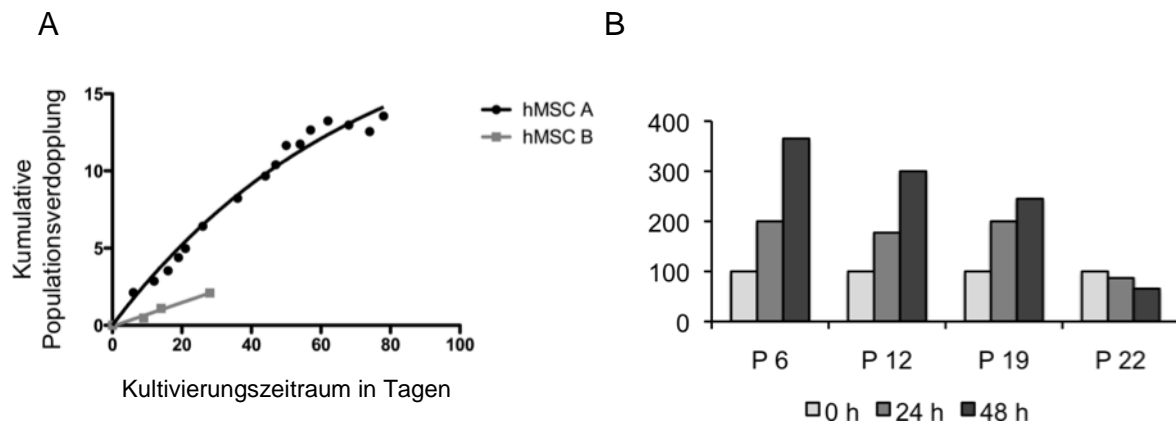


Abb. E-1: Proliferationsverhalten von hMSC über den Zeitraum der *in vitro*-Kultivierung.

A) Mittels Zellzahlbestimmung bei der Subkultivierung der hMSC wurde die kumulative Populationsverdopplung der Stammzelllinien A und B *in vitro* berechnet.

B) Mittels DAPI-Färbung der hMSC-Zellkerne zu den Zeitpunkten $t_1 = 0$ h, $t_2 = 24$ h und $t_3 = 48$ h wurde die Zellzahl von hMSC (Spender A) in den Passagen 6, 12, 19 und 22 bestimmt. Die Proliferation wird in % der Ausgangszellzahl nach 24- und 48-stündiger Kultivierung angegeben.

E 1.2 Differenzierungsvermögen der hMSC

Die Fähigkeit zur Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Adipozyten und Osteozyten ist beweisend für den Erhalt des Stammzellcharakters. Wie unter D 2.1.5 beschrieben wurden hMSC in Passage 6 chemisch in die osteogene und adipogene Richtung durch spezielle Kulturmedien differenziert und nach 18 Tagen bzw. 14 Tagen histochemisch gefärbt. Als Kontrolle dienten hMSC, die in MSCGM kultiviert wurden, und den gleichen histochemischen Färbungen unterzogen wurden. Bei Differenzierung in Adipozyten können die Fettvakuolen mittels Oil-Red-O-Färbung sichtbar gemacht werden, bei Differenzierung in Osteozyten werden die Calciumphosphateinlagerungen durch Alizarin-Rot-Färbung nachgewiesen. Abb. E-2 zeigt die erfolgreiche Differenzierung der hMSC in die adipogene sowie osteogene Richtung.

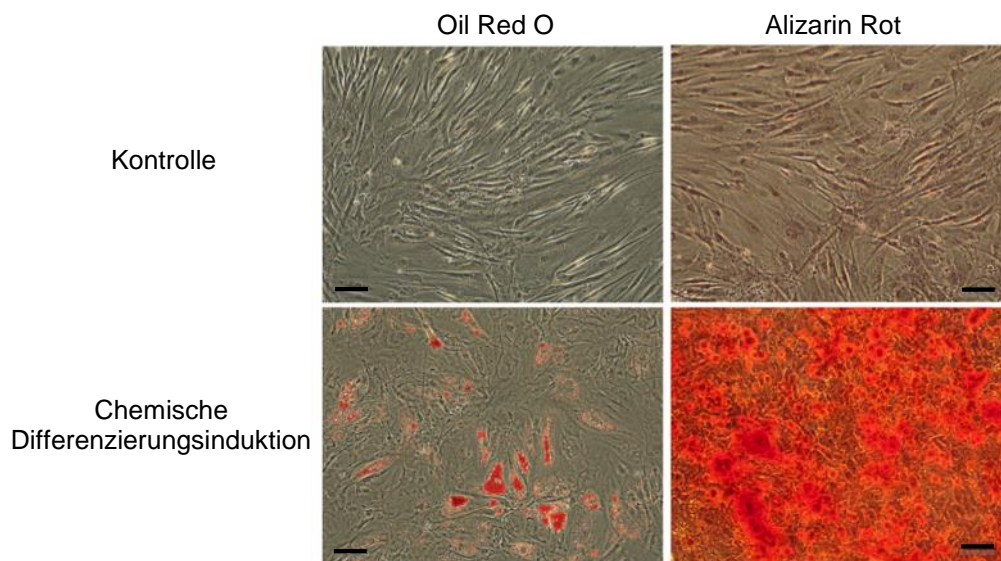


Abb E-2: Differenzierungsvermögen von hMSC in Passage 6.

Die Differenzierung in die osteogene und adipogene Richtung wurde chemisch induziert und entsprechend mit Alizarin Rot- bzw. Oil-Red O-Färbung nachgewiesen. Der Größenstandard entspricht 100 μm .

Linke Spalte: Nachweis des adipogenen Differenzierungsvermögens in hMSC mittels Oil Red O-Färbung ohne chemische Differenzierungsinduktion (oben) und nach 18 Tagen chemischer Differenzierungsinduktion (unten).

Rechte Spalte: Nachweis des osteogenen Differenzierungsvermögens in hMSC mittels Alizarin Rot-Färbung ohne chemische Differenzierungsinduktion (oben) und nach 14 Tagen chemischer Differenzierungsinduktion (unten).

E 1.3 Morphologie und β -Galactosidase-Färbung der hMSC

Neben der Abnahme der Proliferationsfähigkeit kam es zu zellmorphologischen Veränderungen im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung der hMSC. Während Stammzellen in frühen Passagen einen Längsdurchmesser von ca. 100 μm mit langen, dünnen Zellfortsätzen aufwiesen, zeigten hMSC in höheren Passagen eine abgerundete, verbreiterte Zellmorphologie. Der Zellumfang und die Größe des Zellkerns nahmen zu. Ausgehend von diesen zellmorphologischen Veränderungen, die in der Literatur in Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz stehen (Katsube et al, 2008), wurden hMSC diesbezüglich näher untersucht. Eine zur Identifizierung von Seneszenz etablierte Methode ist die Anfärbung der lysosomalen β -Galactosidase (Dimri et al, 1995), die sich im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung im lysosomalen Kompartiment ansammelt. Die Detektion von β -Galactosidase erfolgte wie unter D 2.1.4 beschrieben für hMSC in verschiedenen Passagen. Dabei konnte man mit zunehmender Passagezahl eine Zunahme der Farbintensität erkennen, wobei dies besonders in hMSC der Passage 29 deutlich wurde. Abbildung E-3 zeigt die zellmorphologischen Veränderungen sowie die β -Galactosidase-Färbung exemplarisch für hMSC in Passage 12 und 29.

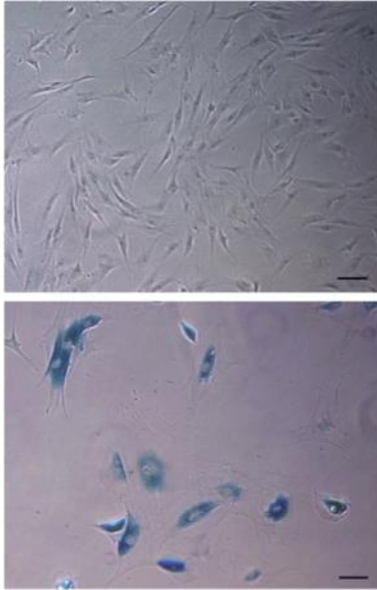


Abb E-3: Veränderung der Zellmorphologie und Detektion von β -Galactosidase in hMSC im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung.

Mit zunehmender Passagezahl wandelten sich die schlanken hMSC mit langgestreckten, dünnen Zellausläufern zugunsten einer verbreiterten Zellmorphologie. Mit steigender Passagenzahl konnte auch eine Zunahme der Farbintensität nach β -Galactosidase-Färbung nachgewiesen werden. Der Größenstandard entspricht 100 μ m.

Oben: hMSC in Passage 12. Unten: hMSC in Passage 29.

E 1.4 Expression von Seneszenzmarkern in hMSC im Verlauf der Kultivierung

Zur weiteren Charakterisierung der hMSC im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung bestimmten wir weitere Marker für zelluläre Seneszenz mittels quantitativer PCR. Seneszente Zellen weisen unter anderem eine erhöhte Expression der Gene p16, p21, p53 und Caveolin-1 auf. Wir untersuchten die mRNA-Expressionsprofile dieser Marker in hMSC der 6., 12. und 22. Passage. Es zeigte sich mit zunehmender Passagezahl insbesondere eine erhöhte Expression von p16, p21 und Caveolin-1. Es konnte ein Anstieg von p16 um das 25-fache bzw. von p21 um das 35-fache in hMSC der Passage 22 verzeichnet werden. Die Expression von Caveolin-1 stieg auf das 50-fache an (siehe Abb. E-4).

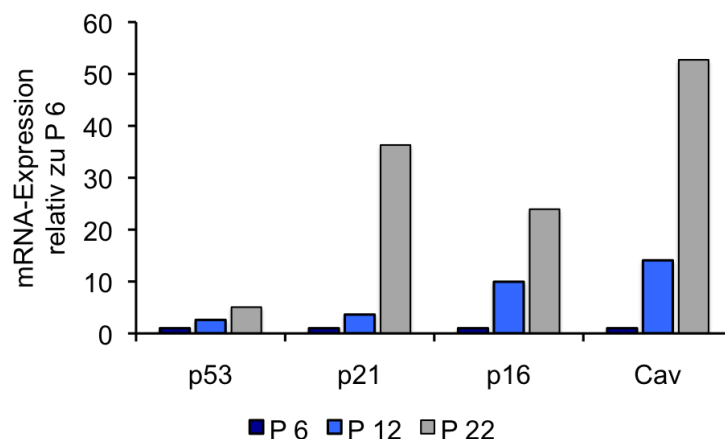


Abb. E-4: mRNA-Expressionsprofil von p53, p21, p16 und Caveolin-1 in hMSC der 6., 12. und 22. Passage.

Die Transkriptmengen von p53, p21, p16 und Caveolin-1 wurden mittels qPCR bestimmt. Dabei wurde die mRNA-Expression jeweils im Verhältnis zur GAPDH-Expression gesetzt und das Expressionsprofil der 6. Passage als Vergleichswert verwendet.

E 2 Untersuchung der potentiellen Rolle von Cathepsinen in hMSC

Nach Charakterisierung der hMSC *in vitro* wurde die potentielle Rolle von Cathepsinen in hMSC untersucht. Die meisten Experimente beziehen sich auf die Rolle von Cathepsin X in hMSC, da diese Protease in Vorarbeiten mit anderen Zellen eine besondere Funktion erkennen ließ. Bei einigen Inhibitionsversuchen wurden auch die Cathepsine B und L herunterreguliert und die Auswirkungen auf die Funktion von hMSC untersucht. Für die Untersuchungen zur potentiellen Rolle von lysosomalen Cysteinproteasen in hMSC wurde ein dualer Ansatz angewandt. Dabei erfolgte einerseits eine durch RNA-Interferenz vermittelte Downregulation der Cathepsine B, L und X. Andererseits wurde (Pro)Cathepsin X rekombinant in das Kulturmedium humaner mesenchymaler Stammzellen zugegeben, um die Beteiligung dieser Protease an der Signaltransduktion zu eruieren.

E 2.1 Expression von Cathepsinen in hMSC

Zunächst wurde das Expressionsprofil lysosomaler Cysteinproteasen auf RNA-Ebene durch qPCR von hMSC-cDNA (Spender A) untersucht. Dabei zeigte sich eine hohe Expression der Cathepsine B, K, L und X. Aufgrund der großen Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Cathepsinen wurde für die y-Achse in Abbildung E-5 zur besseren Übersicht die logarithmische Darstellung gewählt.

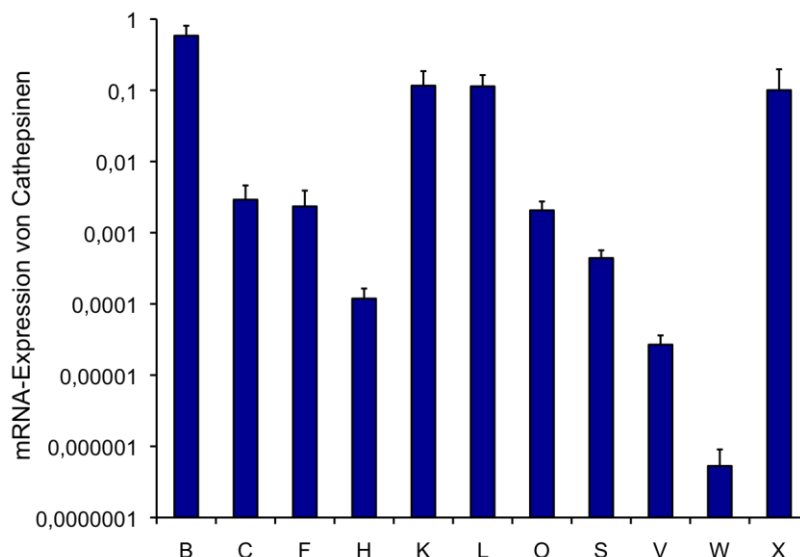


Abb. E-5: mRNA-Expressionsprofil von Cathepsinen in hMSC.

Die mRNA-Transkriptmengen lysosomaler Cysteinproteasen wurden in hMSC (Spender A, Passage 6) bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +Standardabweichung eines Triplikat-Ansatzes.

E 2.2 Auswirkungen des Knockdowns der Cathepsine B, L und X in hMSC

E 2.2.1 Knockdown-Effizienz der Cathepsine B, L und X in hMSC auf RNA- und Proteinebene

Der Knockdown der Cathepsine B, L und X erfolgte unter Verwendung der RNAi-Technologie. Die Effizienz des Knockdowns wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen auf mRNA- und zum Teil auf Proteinebene bestimmt. Für die drei Cathepsine konnte mittels RNA-Interferenz ein Knockdown auf RNA-Ebene erreicht werden und mittels quantitativer PCR nachgewiesen werden. Ein Rückgang der Anzahl der RNA-Transkripte gelang auf unter 10 % im Vergleich zur nc-siRNA-Kontrolle ab Tag 1 (siehe Abb. E-6). Der transiente Knockdown mit Reduktion der endogenen Transkriptlevel war über einen Zeitraum von sieben Tagen zu beobachten. Zudem zeigte sich, dass eine Downregulation eines Cathepsins zur kompensatorischen Heraufregulation anderer Cathepsine führte. Dies war besonders am 3. Tag deutlich zu erkennen.

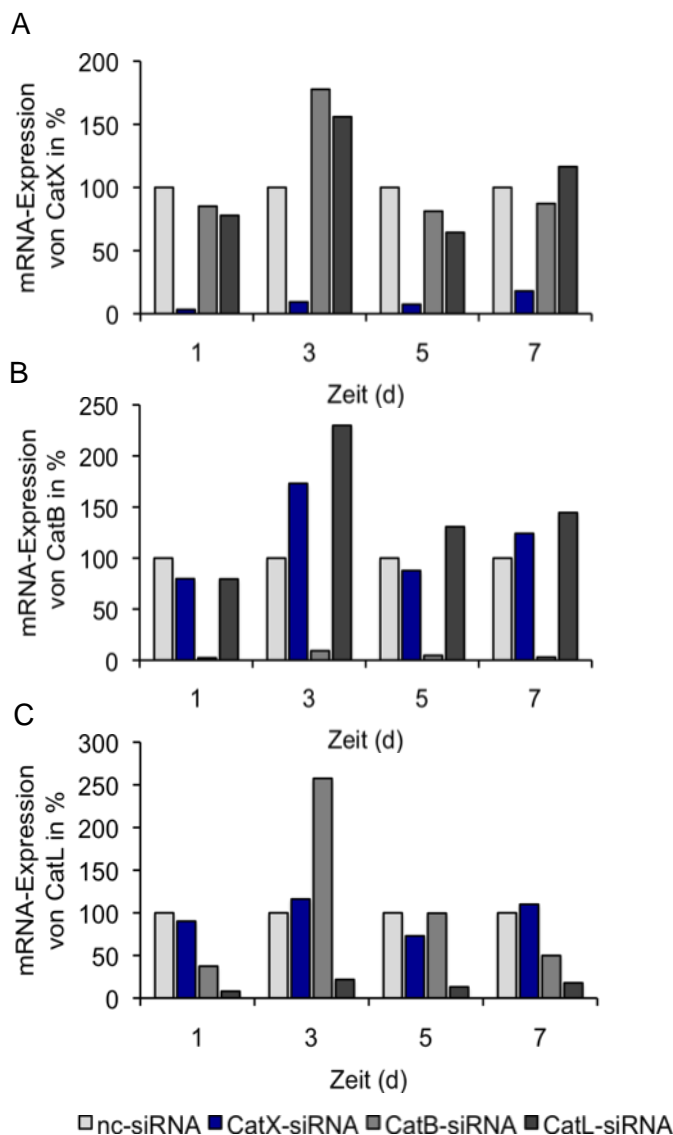


Abb. E-6: mRNA-Expression nach Knockdown der Cathepsine B, L und X in hMSC mittels RNAi.

Die Überprüfung der Knockdown-Effizienz von Cathepsin B, L und X erfolgte mittels qPCR. Es wird jeweils die mRNA-Expression in den Knockdown-Zellen im Vergleich zu den mit nc-siRNA transfizierten hMSC an Tag (d) 1, 3, 5 und 7 nach siRNA-Transfektion dargestellt.

A: mRNA-Expression von CatX in %. B: mRNA-Expression von CatB in %. C: mRNA-Expression von CatL in %.

Der Nachweis des Cathepsin-Knockdowns auf Proteinebene erfolgte mittels ELISA. Auch auf Proteinebene konnte ein Rückgang der Expression der jeweils downregulierten Cathepsine gezeigt werden, wobei im Vergleich zu den Beobachtungen des mRNA-Knockdowns eine deutliche Verzögerung der Reduktion auf Proteinebene (bis zu sieben Tagen) zu verzeichnen war. In Abbildung E-7 wird der Knockdown von Cathepsin B und X auf Proteinebene im Zelllysats und Überstand in einem Zeitraum von 7 Tagen dargestellt. Wie bereits auf RNA-Ebene beschrieben, wurde auf Proteinebene ebenfalls eine kompensatorische Heraufregulation von Cathepsinen nach Knockdown eines Cathepsins nachgewiesen. In Abb. E-7 (C) und (D) wird die Heraufregulation von Cathepsin X nach Knockdown der Cathepsine B und L dargestellt. Der ELISA zur Quantifizierung von Cathepsin L gelang nicht, vermutlich befinden sich die Proteinmengen unter der Nachweisgrenze.

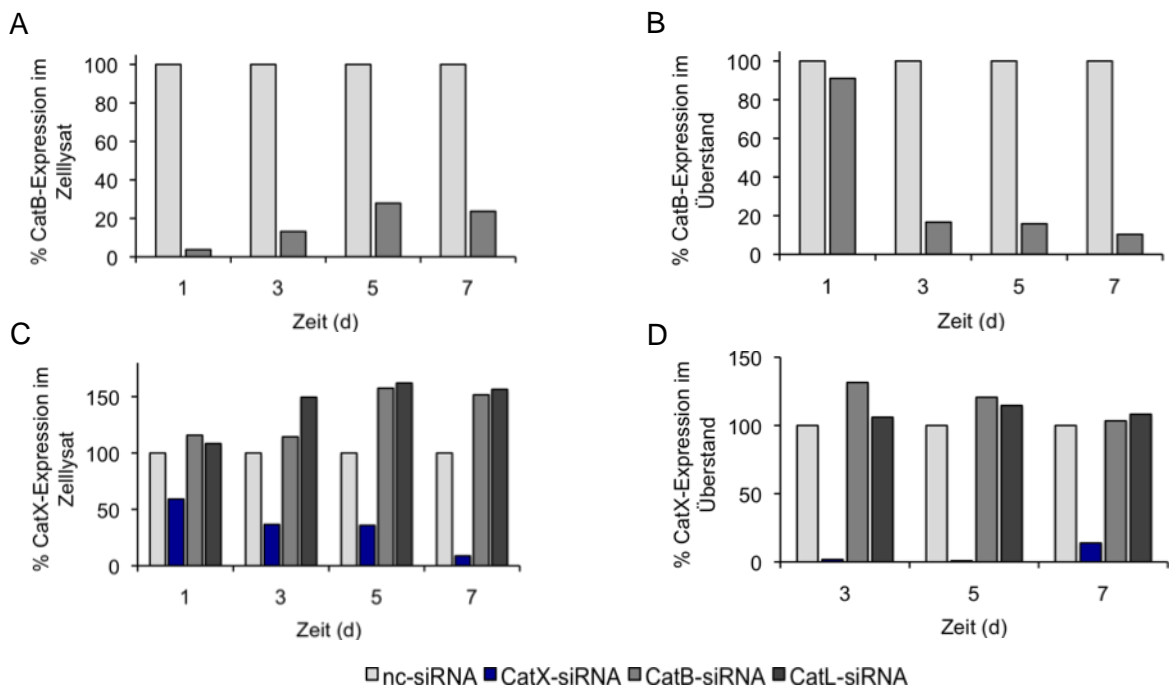


Abb. E-7: Nachweis der Reduktion der Proteinmengen von Cathepsin B und X nach siRNA-Transfektion von hMSC.

Mittels ELISA wurde die Reduktion der Proteinmengen nach Knockdown der Cathepsine im Zelllysats und im Überstand untersucht. Der Kultivierungszeitraum ist in Tagen (d) angegeben.

A: Cathepsin B-Expression im Zelllysats.

B: Cathepsin B-Expression im Überstand.

C: Cathepsin X-Expression im Zelllysats.

D: Cathepsin X-Expression im Überstand.

In den Diagrammen C und D wird zusätzlich die Heraufregulation der Cathepsin X-Proteinmengen nach siRNA-Transfektion mit Cathepsin B und Cathepsin L dargestellt.

E 2.2.2 Morphologie der hMSC und β -Galactosidase Detektion nach Knockdown der Cathepsine B, L und X

Nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Cathepsin X in hMSC imponierte zellmorphologisch eine Zunahme des Zellumfangs mit einer Verbreiterung der Zellausläufer. Dieser Phänotyp wurde auch bei hMSC in höheren Passagen beobachtet. Die Veränderungen konnten lediglich in Cat X-defizienten hMSC nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe (nc-siRNA transfiziert) sowie in Cathepsin B- und Cathepsin L-defizienten Zellen waren diese Unterschiede nicht zu erkennen. Um die siRNA-transfizierten Zellen hinsichtlich der Induktion zellulärer Seneszenz näher zu untersuchen, wurde eine β -Galactosidase-Färbung nach Knockdown der Cathepsine B, L bzw. X durchgeführt. Die jeweilige Farbintensität wurde wie unter D 2.1.4 beschrieben mit Hilfe eines Scoring-Systems objektiviert. Mindestens 500 Zellen wurden jeweils pro Versuchsansatz ausgezählt und nach der Farbintensität bewertet, wobei mindestens drei unabhängige Versuche mit hMSC in Passage 6 von zwei verschiedenen Spendern durchgeführt wurden. Cathepsin X-defiziente Zellen wiesen dabei eine höhere Farbintensität als Cathepsin B bzw. L-defiziente hMSC sowie im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die Quantität der β -Galactosidase-Färbung in Cathepsin B, L bzw. X-defizienten hMSC wird in Abbildung E-8 (A) im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC dargestellt. Abbildung E-8 (B) illustriert die zellmorphologischen Veränderungen sowie die stärkere β -Galactosidase-Färbung in Cathepsin X-defizienten hMSC.

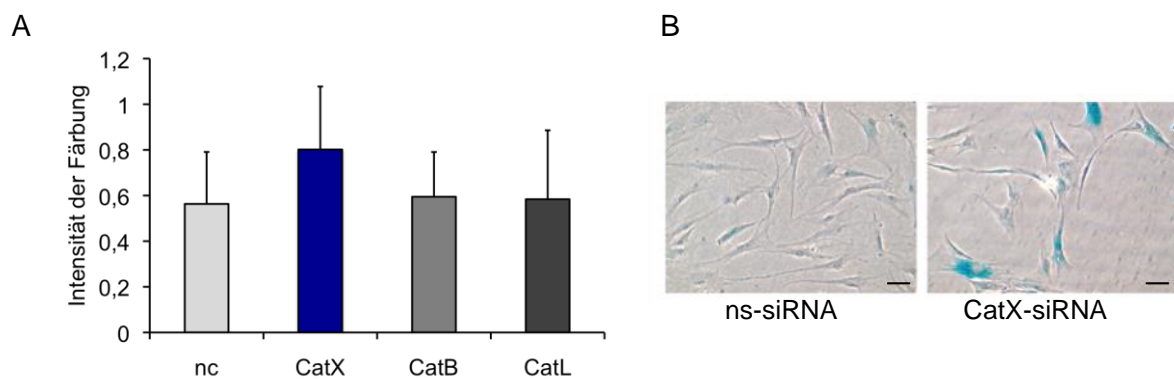


Abb. E-8: Morphologie und β -Galactosidase-Nachweis siRNA-transfizierter hMSC.

A) Es wird die quantitative Auswertung der Farbintensität nach Detektion von β -Galactosidase in siRNA-transfizierten hMSC der 6. Passage dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

B) Lichtmikroskopisch ergaben sich neben der erhöhten β -Galactosidase-Färbung bei CatX-siRNA-transfizierten Zellen deutliche morphologische Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Größenstandard entspricht 100 μ m.

Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine beschleunigte zelluläre Seneszenz nach Knockdown von Cathepsin X in hMSC. In einem weiteren Schritt wurden mit Cathepsin-defizienten hMSC Proliferations- und Invasionsuntersuchungen durchgeführt.

E 2.2.3 Proliferationsverhalten nach Knockdown der Cathepsine B, L und X in hMSC

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der hMSC wurden der CyQuant-Assay und der BrdU-Assay verwendet. In Abbildung E-9 ist die Proliferationsrate von Cathepsin X-, Cathepsin B- und Cathepsin L-defizienten Zellen im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC im BrdU-Assay dargestellt. In Cathepsin X-siRNA transfizierten hMSC konnte eine signifikant reduzierte Proliferation (-30%) nachgewiesen werden. Cathepsin B- und Cathepsin L-defiziente Zellen zeigten hingegen keine signifikante Abnahme der Proliferation. Der BrdU-Assay wurde zur Optimierung der Methode mehrmals durchgeführt - sowohl mit einer Zellzahl von 1500 Zellen/ Kavität als auch mit 3000 Zellen/ Kavität nach 8-stündiger Inkubation mit BrdU am dritten bzw. fünften Tag nach siRNA-Transfektion. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abb. E-9 dargestellt.

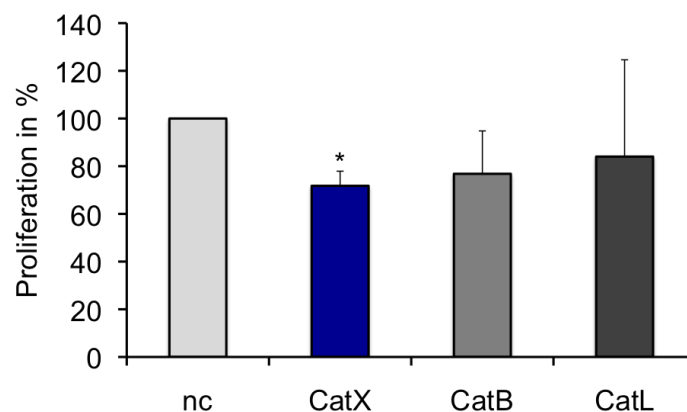


Abb. E-9: Proliferationsverhalten von siRNA-transfizierten hMSC im BrdU-Assay.

Nach Transfektion mit Cat B-, Cat L- und Cat X-siRNAs wurde die Proliferation von hMSC mittels BrdU-Assay im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC untersucht. Dabei zeigte sich bei Cat X-defizienten hMSC im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. zu Cat B- bzw. Cat L-defizienten hMSC eine verminderte Proliferation. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten bei einer Zellzahl von 1500 Zellen/ Kavität am dritten Tag nach siRNA-Transfektion. *P < 0,05.

Eine Abnahme der Proliferation Cathepsin X-defizienter hMSC konnte auch im CyQuant-Proliferationsassay erzielt werden. In Abbildung E-10 ist die Proliferationsrate nc-siRNA- und Cathepsin X-siRNA-transfizierter hMSC in einem Zeitraum von sieben Tagen nach siRNA-Transfektion dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Zellteilung nach Cathepsin X-Knockdown. Nach vier Tagen ließ sich ein signifikanter Unterschied des Proliferationsverhaltens im Vergleich zu den Kontrollzellen feststellen. Am vierten Tag wurde

das Stammzellwachstumsmedium gewechselt, was mit einem Verlust von nc-siRNA transfizierten Zellen einherging. Dies ist sichtbar an der Abnahme der Fluoreszenz-Einheiten bei erneuter Messung am fünften Tag. Im weiteren Verlauf bis Tag 7 bestätigte sich eine signifikant verminderte Proliferation Cathepsin X-defizienter hMSC.

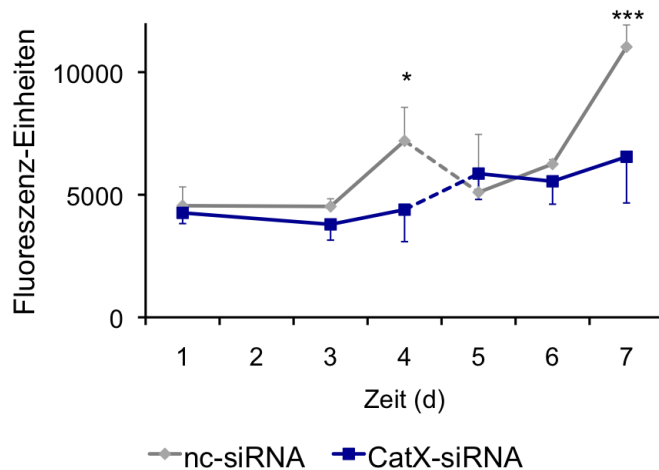


Abb. E-10: Proliferationsverhalten von siRNA-transfizierten hMSC im CyQuant-Assay.

Nach Transfektion mit Cat X-siRNA wurde die Proliferation von hMSC mittels CyQuant-Assay im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC untersucht. Dabei zeigte sich bei CatX-siRNA-transfizierten hMSC im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC eine verminderte Proliferation. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +Standardabweichung eines Triplikat-Ansatzes. *P < 0,05, ***P < 0,001.

E 2.2.4 Differenzierungsvermögen der hMSC nach Knockdown von Cathepsin X

Die Differenzierungskapazität der hMSC in Adipozyten und Osteozyten wurde nach transientem Knockdown von Cathepsin X untersucht. Dafür wurden die hMSC zweimal im Abstand von 6 Tagen mit Cathepsin X-siRNA transfiziert, sodass ein kontinuierlicher Knockdown von Cathepsin X über 12 Tage erreicht wurde. Währenddessen wurden die Zellen durch Zugabe der entsprechenden chemischen Komponenten in die osteogene und adipogene Richtung differenziert. Als Kontrolle dienten nc-siRNA-transfizierte Zellen, die ebenfalls entsprechend mit adipogenem bzw. osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden. Am 13. Tag erfolgte die Alizarin-Rot- bzw. Oil-Red-O-Färbung. Im Hinblick auf die Differenzierungskapazität zeigten sich zwischen nc-siRNA- und CatX-siRNA-transfizierten Zellen keine wesentlichen Unterschiede (siehe Abb. E-11). Bei der osteogenen Differenzierung konnte eine etwas verminderte Oil Red O-Färbung nachgewiesen werden, dies konnte jedoch aufgrund der unregelmäßigen Verteilung der angefärbten Calciumphosphateinlagerungen in hMSC nicht quantifiziert werden.

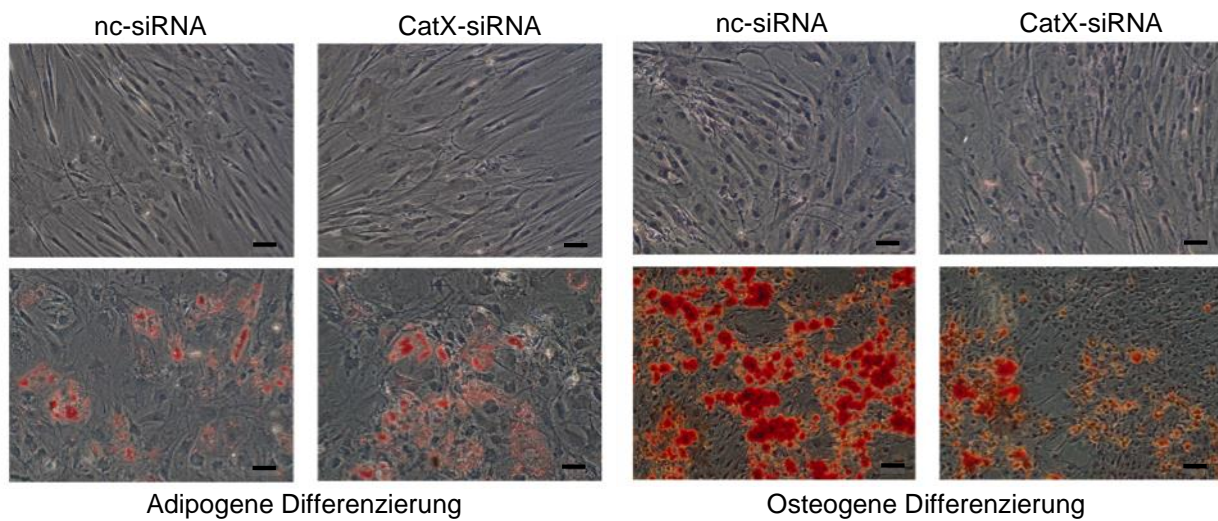


Abb. E-11: Differenzierungsvermögen von nc-siRNA- und CatX-siRNA-transfizierten hMSC.

Die Differenzierung in die adipogene und osteogene Richtung wurde über 13 Tage chemisch induziert und mittels der Alizarin Rot- und Oil Red O-Färbung nachgewiesen. Kontrollzellen (obere Reihe) blieben unstimuliert. Eine Differenzierung in die adipogene und osteogene Richtung war sowohl bei nc-siRNA-transfizierten als auch bei CatX-siRNA-transfizierten hMSC nach 12 Tagen Knockdown möglich. Der Größenstandard entspricht 100 μm .

E 2.2.5 Invasionsverhalten der hMSC nach Knockdown der Cathepsine B, L und X

Das Invasionsverhalten der hMSC wurde in einem Transwell-System untersucht. Dabei wurde die Fähigkeit der Zellen evaluiert, eine rekonstituierte Basalmembran in Richtung eines Konzentrationsgradienten aus Humanserum zu durchwandern (siehe D 2.1.7). Die transmigrierten Zellen wurden quantifiziert. Als Kontrolle wurden nc-siRNA-transfizierte hMSC verwendet. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung des Invasionsverhaltens durch den Knockdown der Cathepsine B, L und X (siehe Abb. E-12).

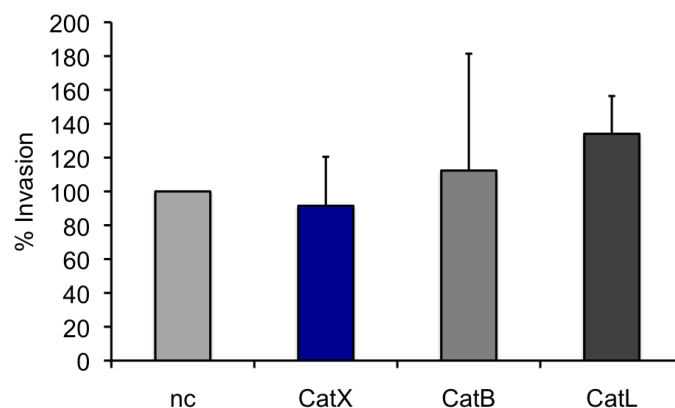


Abb. E-12: Invasionsverhalten der hMSC nach Knockdown von CatB, CatL und CatX durch RNAi in hMSC.

Nach Transfektion mit CatB, CatL und CatX-siRNAs wurde die Invasionsfähigkeit mittels des Transwell-Systems im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC untersucht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten.

E 2.2.6 Einfluss des Cathepsin X-Knockdowns auf die mRNA-Expression von p16, p21, p53 und Caveolin-1 in hMSC

In einem weiteren Schritt untersuchten wir die Expression von Seneszenzmarkern in Cathepsin X-defizienten hMSC mittels quantitativer PCR. Es wurde die Expression der Gene p16, p21, p53 und Caveolin-1 bestimmt. In Abbildung E-13 wird deren Expression nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Cathepsin X-siRNA dargestellt. Der zuvor ermittelte optimale Zeitpunkt der Downregulation lag bei fünf Tagen nach siRNA-Transfektion. Zudem wird die mRNA-Expression der retransfizierten hMSC mit den gleichen Oligo-siRNAs nach insgesamt 12 Tagen Knockdown gezeigt. Die Retransfektion der hMSC erfolgte am sechsten Tag nach der ersten siRNA-Transfektion. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Exemplarisch werden in Abbildung E-13 die Ergebnisse eines Experimentes gezeigt. Es konnte eine erhöhte Expression von p16, p21 und Caveolin-1 nach einmaliger siRNA-Transfektion nachgewiesen werden. Die Expression von p21 und Caveolin-1 ging nach 12 Tagen Knockdown wieder zurück, die p16-Expression stieg noch weiter bis ca. auf das 7-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Die p53-Level änderten sich durch den Knockdown von Cathepsin X nicht.

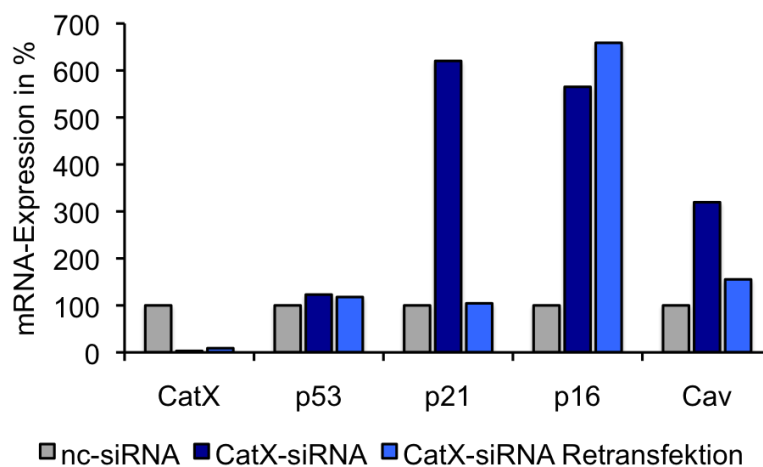


Abb. E-13: mRNA-Expressionsprofil von Cat X, p53, p21, p16 und Caveolin-1 nach Cat X-Knockdown.

Die Transkriptmengen von Cat X, p53, p21, p16 und Caveolin-1 (Cav) wurden in den Cat X-Knockdown-Zellen am Tag 5 und am Tag 12 (nach erneuter siRNA-Transfektion an Tag 6) mittels qPCR bestimmt und mit derjenigen der nc-siRNA-transfizierten Kontrollgruppe verglichen. 1. reproduzierbarer Versuch von drei unabhängigen Experimenten.

E 2.3 Beeinflussung von Signaltransduktionskaskaden in hMSC durch Procathepsin X und Cathepsin X

Um den Einfluss der Cysteinprotease Cathepsin X bzw. dessen Vorstufe Procathepsin X auf die Signaltransduktion genauer zu untersuchen, wurde rekombinant hergestelltes (Pro)Cathepsin X (Nägler et al. 1999, Sivaraman et al. 2000) in das Zellkulturmedium zugegeben und daraufhin die Phosphorylierung diverser Signalproteine in hMSC evaluiert. Insbesondere interessierten wir uns für den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signaltransduktionsweg. Proliferation, Invasion/ Migration sowie Differenzierung werden über diesen Signalweg gesteuert. Als Kontrollen wurden gleiche Mengen an PBS (Negativkontrolle) bzw. Vitronektin und Fibronektin (Positivkontrollen) in das Zellkulturmedium gegeben. Vitronektin und Fibronektin können durch *outside-in-Signaling* den MAPK-Signalweg aktivieren. Um den Erk-Signalweg zu inhibieren wurde der MEK-Inhibitor U0126 eingesetzt, der die Übertragung der Phosphatgruppe von MEK auf Erk unterbindet. Die Aktivierung des MAPK-Signalweges wurde durch Phosphorylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Kinasen nachgewiesen. In mehreren unabhängigen Versuchen konnte eine Phosphorylierung von Erk 30 Minuten bzw. 60 Minuten nach Stimulation mit Vitronektin/ Fibronektin (Positivkontrollen) bzw. Procathepsin X gezeigt werden. In Abb. E-14 (A) ist die Phosphorylierung von Erk nach 60-minütiger Inkubation mit Procathepsin X bzw. den jeweiligen Kontrollen dargestellt. In der densitometrischen Auswertung ist eine erhöhte Intensität der pErk-Bande bei Inkubation mit Procathepsin X bzw. mit Positivkontrollen im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen. Eine Phosphorylierung von Erk konnte auch nach Stimulation mit der reifen Form der Protease Cathepsin X nachgewiesen werden (Abb. E-14 (B)). In einem weiteren Schritt wurde MEK im Immunoblot untersucht. MEK ist ein *upstream* von Erk gelegenes Signaltransduktionsprotein des MAPK-Signalweges, das durch Übertragung der Phosphatgruppe auf Erk eine Aktivierung von Erk herbeiführt. Bei Stimulation der Zellkultur mit Vitronektin und Procathepsin X war nach 60 Minuten eine deutliche Phosphorylierung von MEK vorhanden – jedoch nur nach vorheriger Zugabe von U0126 in Zellkultur (Abb. E-14 (C)). Ohne den Inhibitor U0126 konnte kein phosphoryliertes MEK-Protein im Immunoblot detektiert werden. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die Phosphorylierung von MEK sehr rasch nach Zugabe von Vitronektin bzw. Procathepsin X stattfindet; nach 60 Minuten Stimulation ist die Phosphatgruppe wahrscheinlich bereits auf die nachfolgende Kinase (Erk) weitergegeben worden. Nur durch Blockierung der Übertragung der Phosphatgruppe von MEK auf Erk mittels des MEK-Inhibitors U0126 konnte somit nach 60 Minuten eine MEK-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Versuche wurden mit hMSC von zwei verschiedenen Spendern durchgeführt.

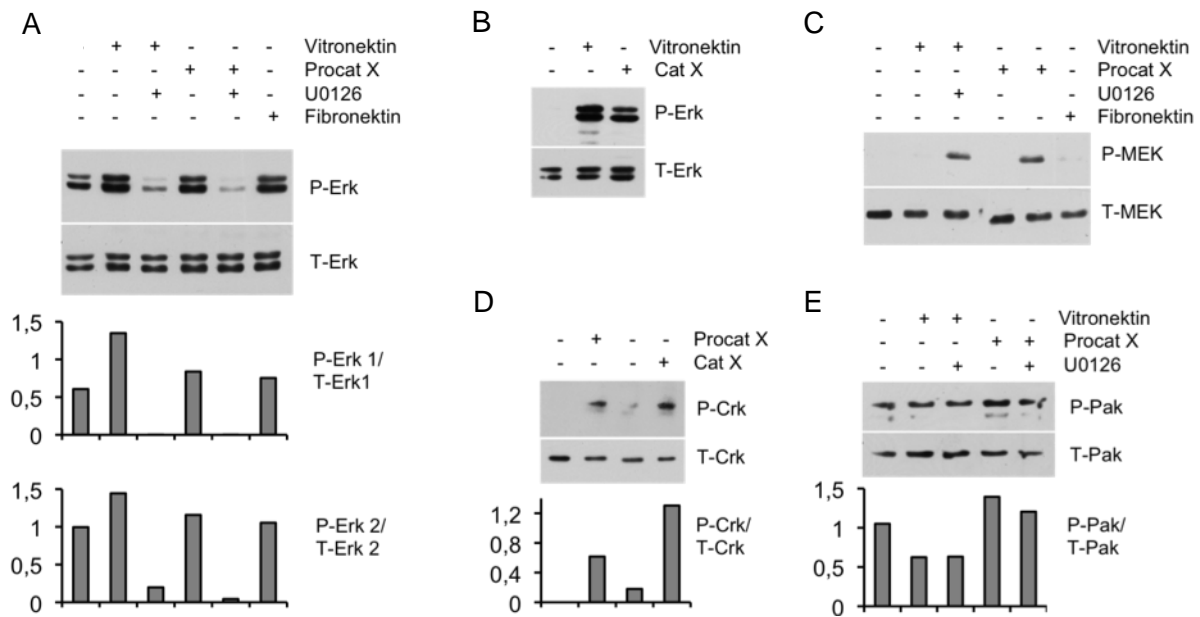


Abb. E-14: Aktivierung der Signaltransduktion in hMSC nach Stimulation mit EZM-Proteinen bzw. Procathepsin X/ Cathepsin X.

hMSC wurden für 60 min mit Procathepsin X bzw. Cathepsin X (125 nM), PBS (Negativkontrolle), Vitronektin bzw. Fibronektin (Positivkontrollen) inkubiert. A) Im Immunoblot konnte eine Zunahme an phospho-Erk (42/44 kDa) nach Stimulation mit Procathepsin X bzw. Vitronektin/ Fibronektin nachgewiesen werden. Mit dem MEK-Inhibitor U0126 wurde die phospho-Erk-Akkumulation inhibiert. Es erfolgte eine densitometrische Analyse, wobei der Quotient P-Erk/ T-Erk (42/44 kDa) dargestellt wird. B) Auch nach Stimulation der hMSC mit Cathepsin X konnte im Immunoblot eine Phosphorylierung von Erk erzielt werden. C) Nach Inkubation mit Procathepsin X war nur in Kombination mit dem MEK-Inhibitor U0126 eine Phosphorylierung von MEK (45 kDa) nachweisbar. U0126 hemmt die Weitergabe der Phosphatgruppe von MEK auf Erk, somit bleibt MEK über einen längeren Zeitraum phosphoryliert und akkumuliert. D und E) Neben den Signaltransduktionsproteinen MEK und Erk konnte auch bei Crk (42 kDa) und Pak (61/68 kDa) eine Phosphorylierung nach Stimulation mit (Pro)Cathepsin X festgestellt werden. Die Immunoblots wurden densitometrisch ausgewertet.

Neben Erk und MEK wurden weitere Komponenten des MAPK-Signalweges und damit assoziierten Kinasen untersucht, die an der *outside-in* Signaltransduktion beteiligt sind. Es zeigte sich eine Phosphorylierung der *p21-activated protein kinase* (Pak) nach Stimulation mit Procathepsin X. Auch das Signaltransduktionsprotein *cancer-related signaling adaptor protein* (Crk) wurde sowohl nach Stimulation mit Procathepsin X als auch Cathepsin X deutlich phosphoryliert.

Aufgrund der mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Zellmorphologie nach Knockdown von Cathepsin X interessierten wir uns auch für Proteine, die die Architektur des Zytoskeletts mit beeinflussen. Dazu zählen u.a. die sog. Rho-GTPasen, zu denen auch das Protein Rac1

(*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) gehört. Nach siRNA-Knockdown von Cathepsin X wurde im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten bzw. untransfizierten hMSC die Rho-GTPase Rac1 quantifiziert. Dabei ergab sich im Immunoblot eine deutliche Reduktion der Rac1-Proteinlevel in Cathepsin X-Knockdown-hMSC im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten bzw. untransfizierten hMSC (Abb. E-15).

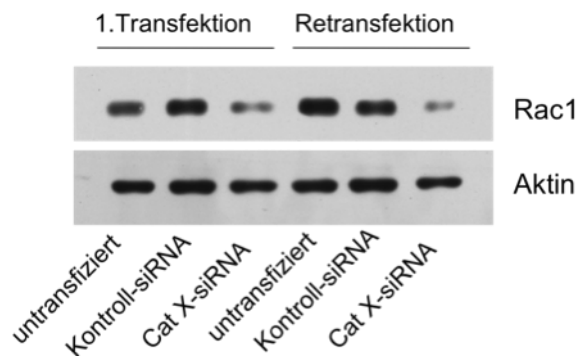


Abb. E-15: Nachweis der Reduktion von Rac1 auf Proteinebene nach CatX-siRNA-Transfektion.

Mittels Western Blot-Analyse wurden die Proteinlevel von Rac1 nach Transfektion mit CatX-siRNA im Vergleich zu Kontroll-siRNA bzw. untransfizierten hMSC quantifiziert. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der Rac-Proteinlevel in CatX-Knockdown-hMSC sowohl nach einmaliger siRNA-Transfektion als auch nach erneuter Transfektion.

In unseren Experimenten konnte eine Beeinflussung diverser Signaltransduktionskaskaden in hMSC durch Procathepsin X bzw. Cathepsin X belegt werden. Nach Zugabe von (Pro)Cathepsin X zeigte sich eine Aktivierung des Erk-Signalweges (Phosphorylierung von Erk, MEK, Crk, Pak), in Cathepsin X-defizienten hMSC konnte eine Reduktion der Rho-GTPase Rac im Vergleich zu nc-siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

F DISKUSSION

Neben dem Proteinabbau in Lysosomen häufen sich Hinweise für physiologische und pathophysiologische Funktionen von lysosomalen Cysteinproteasen außerhalb des lysosomalen Kompartiments im Extrazellulärraum. In zahlreichen Tumorgeweben konnte eine vermehrte Expression von Cathepsinen, insbesondere im Bereich der Invasionsfront, und eine Beteiligung bei der Invasion von Tumorzellen nachgewiesen werden. Über die Rolle von Cathepsinen in humanen mesenchymalen Stammzellen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur sehr wenig bekannt. Dabei konnte in der Literatur mehrfach belegt werden, dass Stammzellen innerhalb der Stammzellnische von zahlreichen Faktoren unter anderem von Proteasen maßgeblich mit beeinflusst werden. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Rolle lysosomaler Cysteinproteasen in humanen mesenchymalen Stammzellen im Hinblick auf die Proliferation, Differenzierung, Invasion und Zellalterung zu untersuchen.

F 1 Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro*

Mesenchymale Stammzellen sind zur klonalen Expansion und einer multilinearen Differenzierung in Zellen des Binde- und Stützgewebes befähigt. Ihre stammzellspezifischen Eigenschaften werden dabei durch eine Vielzahl von Faktoren in Zellkultur beeinflusst. Bevor die Effekte von Cathepsinen auf humane mesenchymale Stammzellen untersucht wurden, erfolgte eine detaillierte Charakterisierung der verwendeten primären Stammzellen *in vitro*, um möglichst aussagekräftige Daten durch Etablierung einer standardisierten Zellkultur zu erhalten.

Die Zellkultur humaner mesenchymaler Stammzellen stellt in vielerlei Hinsicht eine Herausforderung dar. Zum einen ist mit den heutigen Methoden lediglich eine Anreicherung jedoch keine Isolierung von hMSC aus dem Knochenmark möglich. Aufgrund fehlender spezifischer Marker lassen sich hMSC nicht eindeutig von anderen Knochenmarkstromazellen trennen, was zu einer gewissen Heterogenität der Zellkultur führt. Je nach Anreicherungsverfahren kann die Ausbeute der Stammzellen variieren. Aus diesem Grund verwendeten wir Stammzellen der Firma Lonza, um eine möglichst homogene Zellpopulation durch die von Lonza garantierte, standardisierten Anreicherungsverfahren sicherzustellen. Zum anderen wird der Umgang mit hMSC in Zellkultur dadurch erschwert, dass sich hMSC von verschiedenen Spendern hinsichtlich ihrer Proliferationskapazität unterscheiden können (Wagner et al, 2008). Wir verwendeten hMSC von zwei verschiedenen Spendern und konnten auch in unseren Experimenten unter identischen Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Proliferationsraten für die hMSC von zwei verschiedenen Spendern nachweisen. Die größte

Herausforderung bei der Arbeit mit hMSC ist, dass Stammzellen nach einer bestimmten Zahl von Zellteilungen in Zellkultur ihre Proliferation einstellen und ihre Differenzierungsfähigkeit verlieren. Dieses Phänomen wird als zelluläre Seneszenz bezeichnet. Die Zellen gehen in einen Zustand über, der durch irreversiblen Wachstumsarrest mit Resistenz gegenüber dem apoptotischen Zelltod gekennzeichnet ist (Bonab et al, 2006; Wagner et al, 2008; Wagner et al, 2010). Um einen Einsatz von seneszenten hMSC für Proliferations- und Invasionsstudien mit Cathepsin-defizienten Stammzellen zu verhindern, ist es entscheidend, den Zeitpunkt des Beginns der zellulären Seneszenz in hMSC rechtzeitig zu erkennen. In dieser Arbeit wurden dafür verschiedene Methoden angewandt. Keine der angewandten Methoden ist spezifisch für die Detektion zellulärer Seneszenz, weshalb mehrere Methoden verwendet werden müssen, um eine klare Aussage zu erhalten.

Zunächst wurde untersucht, ob die verwendeten hMSC nach einer Subkultivierung in Zellkultur noch zur Proliferation und Differenzierung befähigt sind. Ein einfaches Maß zur Evaluierung der Proliferation in Zellkultur ist die Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung. Unter dem Begriff der kumulativen Populationsverdopplung versteht man die Anzahl der Populationsverdopplungen im Verlauf der Zeit. In der Literatur werden für mesenchymale Stammzellen 13 bis 25 Populationsverdopplungen bis zum Eintreten zellulärer Seneszenz angegeben (Bonab et al, 2006; Kern et al, 2006; Wagner et al, 2008). Die angegebenen Schwankungen sind u.a. stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig. So wurden in einer Studie von Colter et al. 50 Populationsverdopplungen über 10 Wochen bei einer Kultivierung mit geringer Zelldichte beschrieben, demgegenüber steht ein Wachstumsarrest nach bereits 15 Passagierungen bei hoher Zelldichte (Colter et al, 2000). In unseren Experimenten konnten für hMSC von Spender A 12 bis 14 Populationsverdopplungen nach ca. 50 Tagen Kultivierungszeitraum erreicht werden, bis ein Wachstumsarrest eintrat, was gut zu den bisherigen Daten in der Literatur passt. Für hMSC beider Spender konnten wir ein lineares Wachstum bis zur siebten Passage zeigen. Ein Rückgang des Wachstums wurde erst im Verlauf der weiteren Subkultivierung beobachtet. Für die Funktionsuntersuchungen zur Rolle von Cathepsinen in hMSC wurden deshalb ausschließlich hMSC verwendet, die nicht länger als bis zur 7. Passage kultiviert wurden. Zusätzlich führten wir eine Differenzierung der hMSC in der sechsten Passage in Zellen des Binde- und Stützgewebes durch. Die hMSC von beiden Spendern konnten sich mittels chemischer Differenzierung hin zu Adipozyten bzw. Osteozyten entwickeln. Mit dem Erhalt einer linearen Proliferation und der Differenzierungsfähigkeit konnte der Stammzellcharakter für die verwendeten hMSC bis zur siebten Passage bewiesen werden.

Eines der sichtbaren Kennzeichen seneszenter Zellen ist ihre vergrößerte und abgeflachte Zellmorphologie (Hayflick & Moorhead, 1961). Die Änderung der Zellmorphologie wurde auch

für seneszente Stammzellen beschrieben (Katsube et al, 2008; Wagner et al, 2008). Mit zunehmender Subkultivierung der hMSC zeigte sich auch in unseren Experimenten eine Zunahme des Zellumfangs und der Zellorganellen. Eine besonders deutliche Vergrößerung und Abflachung der hMSC war bei Zellen zu beobachten, die nach langer Kultivierung in Zellkultur keine Proliferation mehr aufwiesen.

Neben dem Wachstumsarrest und den zellmorphologischen Veränderungen weisen seneszente Zellen ein verändertes Expressionsprofil verschiedener Gene auf. Ein etablierter und einfach zu bestimmender Marker der zellulären Seneszenz ist beispielsweise die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase in Lysosomen, deren Menge in seneszenten Zellen stark erhöht ist und durch eine SA- β -Galactosidase-Färbung quantitativ nachgewiesen werden kann (Dimri et al, 1995; Lee et al, 2006). Mit zunehmender Passagezahl ließ sich auch in den in dieser Arbeit verwendeten hMSC ein steigender Gehalt an β -Galactosidase mittels β -Galactosidase-Färbung nachweisen. Die vermehrte Detektion von β -Galactosidase kann dabei durch die Zunahme lysosomaler Kompartimente in seneszenten Zellen begründet werden (Robbins et al, 1970; Kurz et al, 2000; Lee et al, 2006).

Das Ausbleiben der Replikation in seneszenten Zellen beruht auf der Expression bestimmter Zellzyklusinhibitoren, die auf die Signaltransduktion Einfluss nehmen (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Grundsätzlich lassen sich zwei Signaltransduktionswege in seneszenten Zellen unterscheiden: ein über p53-p21-gesteuerter sowie ein über p16-gesteuerter Signalweg, wobei letzterer bei der stammzellabhängigen Zellalterung/ Regeneration eine besondere Rolle spielt (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Neben den Zellzyklusinhibitoren p16, p21 und p53 gibt es noch eine Reihe weiterer Signaltransduktionsproteine, die bei zellulärer Seneszenz heraufreguliert werden. Dazu zählt auch das Membranprotein Caveolin-1, das eine Stabilisierung des p53-Signalweges ermöglicht (Bartholomew et al, 2009). In unseren Experimenten konnte mit steigender Passagezahl der hMSC eine vermehrte Expression der RNA-Transkripte p16, p21, p53 und Caveolin-1 detektiert werden, wobei sich insbesondere eine Erhöhung der Expression von p16 und Caveolin-1 zeigte. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten aus der Fachliteratur, in der eine erhöhte Expression von p16 in seneszenten hMSC belegt wird (Gu et al, 2012) und Caveolin-1 eine regulierende Funktion bei der Stammzellproliferation und der Osteogenese zugeschrieben wird (Baker et al, 2012).

Die funktionserhaltende Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen *in vitro* stellt eine Herausforderung dar und wird von vielen Faktoren beeinflusst. Das Proliferationsvermögen der hMSC kann sich von Spender zu Spender unterscheiden und abhängig von den

Kultivierungsbedingungen, z.B. dem Konfluenzgrad in Zellkultur, stark variieren. Bei längerer Kultivierung in Zellkultur wird zudem zelluläre Seneszenz in den hMSC ausgelöst, die nur durch die Kombination verschiedener Seneszenz-Marker zuverlässig ermittelt werden kann. Für den Einsatz von Stammzellen im Rahmen der Geweberegeneration müssen somit standardisierte Anreicherungsverfahren und Kultivierungsbedingungen eingehalten werden, um den Stammzellcharakter für therapeutische Strategien zu gewährleisten (Banfi et al, 2000; Stolzing et al, 2008).

F 2 Expression und potentielle Funktionen von Cathepsinen in hMSC

Die Überexpression von Cathepsinen im Tumorgewebe und deren Rolle bei der Tumorprogression und -invasion wurde bereits vielfach belegt (Mohamed & Sloane, 2006). Im Gegensatz zu Tumor- und Entzündungszellen wurde die Expression und Bedeutung von Cathepsinen in Stammzellen bisher nicht untersucht. Die Untersuchung der RNA-Expression der 11 humanen Cathepsine in hMSC ergab in unseren Experimenten eine besonders hohe Expression der Cathepsine B, K, L und X. Vergleichsuntersuchungen hierzu liegen in der Literatur bisher nicht vor. Wir entschieden uns für die Charakterisierung der Funktion der Cathepsine B, L und X in hMSC, da für diese Cathepsine bereits pathophysiologische Funktionen in Tumorzellen beschrieben wurden und jedes der Cathepsine spezielle strukturelle Voraussetzungen besitzt. Im Folgenden wird kurz erläutert über welche strukturellen Eigenheiten die Cathepsine B, L und X verfügen, die ihre Funktionsweise beeinflussen können.

Die Bedeutung der Cathepsine B und L bei der Tumorprogression konnte durch Knockdown mittels RNA-Interferenz in Prostatakarzinom- bzw. Lungenepithelzellen gezeigt werden (Wille et al, 2002; Nalla et al, 2010). Ihre Rolle bei der Tumordinvasion wird dabei u.a. durch die endoproteolytische Aktivität der Cathepsine B und L begründet, die einen Abbau extrazellulärer Matrixproteine ermöglicht (Joyce et al, 2004; Joyce & Hanahan, 2004; Vasiljeva et al, 2006). Bei genauerer Betrachtung der proteolytischen Aktivität der Cathepsine B und L wird deutlich, dass Cathepsin L eine starke endoproteolytische Aktivität besitzt, während Cathepsin B hingegen aufgrund eines *occluding loop*, der eine Bindung von Substraten an das aktive Zentrum einschränkt, seine Aktivität als Endoprotease nur eingeschränkt entfalten kann (Illy et al, 1997; Nägler et al, 1997; Krupa et al, 2002). In Proteolyse-Experimenten unserer Arbeitsgruppe (Ergebnisse nicht gezeigt) konnten Kollagene und bovines Serumalbumin durch Cathepsin L sehr gut degradiert werden. Für Cathepsin L erscheint somit eine Beteiligung an der Tumorprogression durch Proteolyse sehr wahrscheinlich. Cathepsin B hingegen konnte EZM-Proteine nur unzureichend spalten. Die relativ schwache endoproteolytische Aktivität von

Cathepsin B lässt vermuten, dass der Einfluss auf die Tumorgenese zusätzlich über andere, bisher nicht bekannte Mechanismen ermöglicht wird, die bisher nicht vollständig verstanden sind.

Für Cathepsin X wurde ebenfalls eine signifikante Überexpression in bestimmten Tumoren belegt und ein Einfluss auf die Tumorentwicklung z.B. von Prostata- und Magenkarzinomen nachgewiesen (Nägler et al, 2004; Krüger et al, 2005). Im Gegensatz zu den Cathepsinen B und L handelt es sich jedoch um eine Carboxypeptidase d.h. dass lediglich eine Abspaltung einzelner Aminosäuren am C-Terminus des Substrates möglich ist. Eine nennenswerte Spaltung von EZM-Proteinen gelang im Proteolyse-Experiment nicht. Somit kann postuliert werden, dass Cathepsin X über alternative Mechanismen an der Tumorgenese mitwirkt, die über eine rein proteolytische Funktion hinausgehen. Von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichte Daten belegen z.B. eine Beteiligung von Cathepsin X an Mechanismen der zellulären Seneszenz in primären Fibroblasten (Kraus et al, 2011).

Um die Bedeutung der Cathepsine B, L und X in humanen mesenchymalen Stammzellen und deren Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Invasion/ Migration in hMSC zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein transients Knockdown dieser Cathepsine mittels RNA-Interferenz durchgeführt. Die Untersuchung der Funktionen von Cathepsinen in primären Stammzellen bietet dabei einen entscheidenden Vorteil gegenüber transformierten Zellen: In Tumorzellen liegt eine Überaktivierung bestimmter proproliferativer Signalwege vor, in primären Stammzellkulturen kann hingegen angenommen werden, dass die ursprüngliche Signaltransduktion weitgehend erhalten ist. Für Studien zur Proliferation bzw. zur zellulären Seneszenz sind primäre, untransformierte Zellen somit besser geeignet als Tumorzellen, da sie allgemeingültige Aussagen über physiologische Funktionen von Cathepsinen erlauben.

F 3 Induktion zellulärer Seneszenz nach Cathepsin X-Knockdown in hMSC

Mittels RNA-Interferenz erfolgte ein Knockdown der Cathepsine B, L und X in humanen mesenchymalen Stammzellen, wobei sich unterschiedliche Kinetiken für die Verringerung der mRNA- und Protein-Mengen ergaben. Eine effiziente Downregulation auf RNA-Ebene war bereits einen Tag nach siRNA-Transfektion vorhanden, während die Proteinmengen erst verzögert absanken (bis zu sieben Tagen nach siRNA-Transfektion). Ursächlich dafür ist vermutlich die längere Halbwertszeit von Proteinen im Vergleich zur RNA. Die Proteinquantifizierung gelang in unseren Experimenten nur für die Cathepsine B und X, die Proteinmengen von Cathepsin L lagen unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Assays. Interessanterweise führte der Knockdown einer Protease in der Regel zu einer

kompensatorischen Heraufregulation der mRNA-Transkripte anderer Proteasen. Dies ist konsistent mit Daten aus der Literatur, in der eine große Redundanz innerhalb der Cathepsine beschrieben wird und das Fehlen eines Cathepsins durch die erhöhte Expression anderer Cathepsine zumindest teilweise ausgeglichen werden kann (Nägler & Menard, 2003).

Nach Cathepsin X-Downregulation fielen uns zellmorphologische Veränderungen mit Zunahme des Zellumfangs und vergrößerten Zellorganellen auf, die starke Ähnlichkeiten mit den seneszenten hMSC aus Voruntersuchungen (siehe F1) aufwiesen. Dagegen konnte bei Cathepsin B- und L-siRNA transfizierten hMSC keine Änderung der Zellgestalt beobachtet werden. Die vergrößerte und abgeflachte Morphologie in Cathepsin X-defizienten hMSC veranlasste uns, diese Zellen auf zelluläre Seneszenz zu untersuchen.

Zunächst wurde untersucht, ob die siRNA-transfizierten hMSC eine unterschiedliche Menge an Seneszenz-assoziiierter β -Galactosidase (SA- β -Gal) exprimieren. Es konnte eine erhöhte SA- β -Gal-Färbung in den Cathepsin X-defizienten hMSC im Vergleich zu nc-siRNA-transfizierten hMSC nachgewiesen werden. In Cathepsin B bzw. L-defizienten hMSC konnte hingegen keine verstärkte β -Galactosidase-Aktivität detektiert werden. In murinen embryonalen Fibroblasten Cathepsin X-defizienter Mäuse bzw. Cathepsin X siRNA-transfizierten neonatalen humanen dermalen Fibroblasten wurde ebenso eine vergrößerte, abgeflachte Zellmorphologie mit verstärkter β -Galactosidase-Färbung festgestellt (Kraus et al, 2011). Da in verschiedenen Zelltypen nach Cathepsin X-Knockdown ein seneszenten Phänotyp mit verstärkter β -Galactosidase-Färbung beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass durch Cathepsin X-Defizienz Mechanismen der zellulären Seneszenz beeinflusst werden können. Zur näheren Charakterisierung führten wir Proliferationsmessungen nach Knockdown der Cathepsine in hMSC durch.

Der Cathepsin X-Knockdown in Fibroblasten hatte in einer Studie von Kraus et al. neben einer Änderung der Zellgestalt und einer erhöhten SA- β -Gal-Färbung eine verminderte Proliferation zur Folge (Kraus et al, 2011). In Cathepsin X-defizienten hMSC ließ sich diese Beobachtung bestätigen: Eine reduzierte Proliferation konnte in hMSC am dritten Tag nach Cathepsin X-siRNA-Transfektion mittels BrDU-Inkorporation beobachtet werden. Im CyQuant-Assay konnte dieser Effekt reproduziert werden. Somit wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden zur Messung der Proliferation ein signifikant vermindertes Zellwachstum in Cathepsin X-defizienten hMSC erreicht. Die verminderte Proliferation in Cathepsin X-defizienten hMSC liefert einen weiteren Beleg für die potentielle Rolle der Cysteinprotease Cathepsin X bei der Beeinflussung der zellulären Seneszenz. Für Cathepsin B und L-defiziente hMSC konnte

hingegen in unseren Experimenten keine verminderte Proliferation erzielt werden. Früher veröffentlichte Daten zeigen hingegen eine Apoptoseinduktion nach Cathepsin B-Defizienz in Prostatakarzinomzellen (Nalla et al, 2010) und im Falle eines Cathepsin L-Knockdowns eine verminderte Proliferation in Epithelzellen der Lunge (Wille et al, 2002). Weshalb ein Knockdown von Cathepsin B oder L in hMSC keine Auswirkungen auf die Zellproliferation hatte, konnte nicht geklärt werden. Die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen, die sich möglicherweise in verschiedenen Zelltypen unterscheiden können, sind im Detail noch unbekannt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

In seneszenten Zellen werden einige Gene verstärkt exprimiert. Dazu zählen beispielsweise Komponenten des p53-p21- und des p16-pRB-Signalweges (Campisi, 2005; Campisi, 2007; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007) sowie diverse Seneszenz-assoziierte Proteine wie Caveolin-1. Wir konnten bereits in unseren Vorversuchen mit seneszenten hMSC eine Zunahme der Expression von insbesondere p16 und Caveolin-1 nachweisen (siehe F1). Nun sollte überprüft werden, ob in Cathepsin X-defizienten hMSC diese Gene ebenfalls hochreguliert werden. In unseren Experimenten konnte eine vermehrte Expression von p16 sowohl nach 5 als auch nach 12 Tagen Cathepsin X-Knockdown gezeigt werden. Zudem konnten wir eine Überexpression von Caveolin-1 in Cathepsin X-defizienten hMSC nachweisen. Neben dem Zellzyklusinhibitor p16, der bei Downregulation eine spontane Transformation in hMSC auslösen kann (Rubio et al, 2008) und in seneszenten hMSC eine Überexpression zeigt (Gu et al, 2012), wird das Membran-assoziierte Protein Caveolin-1 mit antiproliferativen Prozessen in Verbindung gebracht. Eine Überexpression von Caveolin-1 induziert beispielsweise zelluläre Seneszenz in Primärzellkulturen muriner Fibroblasten durch Zellzyklusarrest (Volonte et al, 2002). Caveolin-1 ermöglicht zudem eine Stabilisierung des p21-p53-Signaltransduktionswegs (Galbiati et al, 2001; Bartholomew et al, 2009). Bezogen auf hMSC nimmt Caveolin-1 eine regulierende Funktion bei der Stammzellproliferation und Osteogenese wahr (Baker et al, 2012). Eine Caveolin-1-Überexpression führte in hMSC zu einer eingeschränkten Differenzierungsfähigkeit in Richtung Adipogenese (Park et al, 2005). Es lässt sich festhalten, dass sowohl p16 als auch Caveolin-1 eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von hMSC spielen und an der Steuerung der zellulären Seneszenz beteiligt sind. In mehreren unabhängigen Experimenten konnte in dieser Arbeit eine Überexpression von p16 und Caveolin-1 in Cathepsin X-defizienten hMSC belegt werden. Daraus lässt sich folgern, dass Cathepsin X auf Seneszenz-assoziierte Signalwege in hMSC Einfluss nehmen kann. Die genauen molekularen Mechanismen einer Cathepsin X-vermittelten Änderung der Genexpression von p16 und Caveolin-1 konnten nicht geklärt werden. Für Cathepsin B- bzw. Cathepsin L-defiziente hMSC wurde die Expression der Seneszenzmarker in unseren Experimenten nicht bestimmt, da sich sowohl

zellmorphologisch, in der β -Galaktosidase-Färbung als auch in den Proliferationsuntersuchungen anders als in Cathepsin X-Knockdown-Zellen keine Hinweise auf zelluläre Seneszenz fanden.

Unsere Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von p16 und Caveolin-1 in Cathepsin X-defizienten hMSC. Demgegenüber stehen Daten mit Cathepsin X-defizienten Fibroblasten aus unserer Arbeitsgruppe, die statt einer p16-gesteuerten Signaltransduktion eine deutliche Aktivierung des p21-p53-Signaltransduktionsweges ergaben (Kraus et al, 2011). Diese Beobachtung bestätigt die bereits bekannte primäre Aktivierung des p16-pRB-Signalweges zur Induktion zellulärer Seneszenz in Stammzellen (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007) und verdeutlicht, dass sich die molekularen Mechanismen zellulärer Seneszenz in verschiedenen Zelltypen unterscheiden können. Ein weiterer Unterschied zu den Versuchen mit Cathepsin X-defizienten Fibroblasten im Vergleich zu unseren Experimenten mit hMSC besteht darin, dass der Nachweis der Überexpression der Seneszenzmarker in Fibroblasten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gelang (Kraus et al, 2011). In hMSC gelang hingegen der Nachweis nur auf mRNA-Ebene. Diese Ergebnisse sprechen für eine deutlichere Aktivierung der Seneszenz-assoziierten Signaltransduktion in Cathepsin X-defizienten Fibroblasten mit messbarem Einfluss auf die Proteinexpression von Seneszenzmarkern im Vergleich zu Untersuchungen in hMSC. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Cathepsin X-Expression in Fibroblasten höher ist als in hMSC. Ein Cathepsin X-Knockdown in Fibroblasten würde folglich eine deutlichere Antwort auf die Signaltransduktion hervorrufen. Für die Annahme der unterschiedlichen Cathepsin X-Expression in hMSC bzw. Fibroblasten gibt es jedoch keine Daten in der Literatur. Eine weitere, mögliche Erklärung für die moderateren Auswirkungen in Cathepsin X-defizienten hMSC im Vergleich zu Cathepsin X-Knockdown-Fibroblasten könnte sein, dass durch den transienten Knockdown von Cathepsin X eine sehr frühe Phase der Seneszenz untersucht wurde und deshalb noch keine eindeutige Aktivierung der Signalwege in hMSC festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Proliferationsstudien, in denen lediglich eine verminderte Proliferation, jedoch kein Wachstumsarrest Cathepsin X-defizienter hMSC zu verzeichnen war. Eine Retransfektion mit Cathepsin X-siRNA zur Verlängerung der Cathepsin X-Downregulation führte jedoch in unseren Versuchen auch nicht zu einem messbaren Anstieg der untersuchten Tumorsuppressorproteine. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Methode der RNA-Interferenz weniger effizient ist als beispielsweise ein langfristiger, gentechnischer Knockout eines Gens. Da nicht alle Zellen in gleichem Maße mit siRNA transfiziert werden, ist bei einem transienten Knockdown eine gewisse Unschärfe der Ergebnisse nicht auszuschließen. Die dadurch entstehende Variabilität der Ergebnisse könnte die weniger starken Veränderungen in hMSC erklären. Darüber hinaus kann allgemein beim

Arbeiten mit Stammzellen festgestellt werden, dass eine Analyse der zellulären Signaltransduktion schwierig ist: Zum einen führt die Heterogenität von hMSC in Zellkultur zu einer gewissen Streuung der Ergebnisse. Zum anderen besitzen Stammzellen eine Vielzahl von Regulationsmechanismen, um ihre Stammzellfunktionen aufrechtzuerhalten. Der Knockdown einer Protease reicht vermutlich nicht aus, um die molekularen Mechanismen der Proliferation nennenswert zu destabilisieren, während in anderen Zelltypen z.B. Fibroblasten bereits eine Änderung der Signaltransduktion herbeigeführt wird. Die unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen sind vermutlich für die unterschiedlichen Ergebnisse in hMSC und Fibroblasten verantwortlich und deren Aufklärung bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Bedeutung von Cathepsinen im Rahmen der Tumorinvasion und -metastasierung (Koblinski et al, 2000; Reiser et al, 2010) führte uns zu der Frage, ob Cysteinproteasen auch die Invasion bzw. Migration von hMSC beeinflussen. Insbesondere den Cathepsinen B, L und X wird eine wesentliche Rolle bei Invasionsprozessen im Rahmen der Tumorgenese zugeschrieben. Eine Überexpression von Cathepsin B beispielsweise erhöhte die Invasionsfähigkeit einer Melanomzelllinie um das 3- bis 5-fache (Szpaderska & Frankfater, 2001), während eine Downregulation von Cathepsin B mittels Antisense-RNA zu verminderter Invasion in Matrigel-Assays führte (Krueger et al, 1999). Nach Knockdown von Cathepsin L konnte in Osteosarkomzellen eine verminderte Invasion beobachtet werden (Krueger et al, 2001). Darüber hinaus konnte die Expression von Cathepsin L in Blasentumoren mit der Kapazität zur Invasion/ Metastasierung und höheren Tumorstadien korreliert werden. Die Cathepsin L-Expression wird somit als wichtiger prognostischer Faktor im Rahmen des Tumor-Stagings diskutiert (Yan et al, 2010). Der Einfluss der Cathepsine B und L auf die Invasion bzw. Migration von Zellen kann durch ihre proteolytische Aktivität erklärt werden, die eine Degradation extrazellulärer Matrixproteine ermöglicht (Reddy et al, 1995; Serveau-Avesque et al, 2006). Im Gegensatz zu Cathepsin L besitzt Cathepsin B nur eine relativ schwache endoproteolytische Aktivität (Illy et al, 1997; Nögler et al, 1997; Krupa et al, 2002). Dies lässt vermuten, dass der Einfluss von Cathepsin B auf die Invasion über nicht-proteolytische Funktionen ermöglicht wird. Neben den Cathepsinen B und L ist auch Cathepsin X an der Mobilisierung von Zellen beteiligt. Ein Mangel an Cathepsin X hatte beispielsweise in Zellen der Magenschleimhaut bzw. in Endothelzellen (HUVEC) eine reduzierte Migrations-/ Invasionsfähigkeit zur Folge (Nögler et al, 2004; Krüger et al, 2005; Lechner et al, 2006). Zudem konnte in Cathepsin X-reprimierten Fibroblasten eine verminderte Invasion der Zellen und dabei eine Hochregulation Seneszenz-assoziiierter Signaltransduktionswege beobachtet werden (Kraus et al, 2011). In der Studie von Kraus et al. konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die verminderte Invasion/ Migration in Cathepsin X-defizienten Zellen Folge

einer veränderten Signaltransduktion ist. Eine nicht-proteolytische Funktion von Cathepsin X mit Einfluss auf die Signaltransduktion erscheint insofern plausibel, da es sich bei Cathepsin X um eine Carboxypeptidase mit sehr geringer endoproteolytischer Aktivität handelt. Eine nennenswerte Spaltung von EZM-Proteinen durch Proteolyse als Grundlage für ihren Beitrag zur Zellmobilisierung ist daher unwahrscheinlich. Vor dem Hintergrund der bisher in der Literatur verfügbaren Daten zur Rolle von Cathepsin B, L und X im Rahmen von Migrations-/ Invasionsprozessen erwarteten wir nach Knockdown des jeweiligen Cathepsins in hMSC eine verminderte Invasionsfähigkeit im Transmigrationsassay. Überraschenderweise konnte keine signifikante Reduktion der Invasionsfähigkeit nach Knockdown der Cathepsine B, L oder X in hMSC festgestellt werden. Der leichte Rückgang der Invasion bei Cathepsin X-defizienten hMSC lässt sich vermutlich auf die verminderte Proliferation zurückführen. Es ist auch denkbar, dass aufgrund der vergrößerten Zellmorphologie von Cathepsin X-Knockdown-Zellen eine Migration durch die Poren im Transwell-Assay erschwert wird und dadurch die leicht reduzierte Invasion im Matrigel-Assay erklärt werden kann. Die Ergebnisse stehen veröffentlichten Daten gegenüber, die eine verminderte Invasionsfähigkeit nach Cathepsin-Knockdown in diversen Tumor- und Endothelzellen belegen. Eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Befunde könnte eine wesentlich höhere Cathepsin-Expression in Tumor- oder Endothelzellen im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen sein. Ein Knockdown in hMSC würde dadurch geringere Auswirkungen auf die Invasionsfähigkeit mit sich bringen. Alternativ wäre es vorstellbar, dass in hMSC der Knockdown eines Cathepsins noch keine erkennbaren Auswirkungen auf die für Invasionsprozesse zuständige Signaltransduktion zur Folge hat. Im Gegensatz zu Tumorzellen, die bereits eine Überexpression proproliferativer und proinvasiver Signalwege aufweisen, besitzen Stammzellen ein komplexes Netzwerk regulativer Mechanismen, um ihre Funktionen aufrechtzuerhalten. In unseren Experimenten zur Knockdown-Effizienz der Cathepsine B, L und X führte beispielsweise eine Downregulation eines Cathepsins zu einer kompensatorischen Heraufregulation anderer Cathepsine. Diese Reaktion stellt womöglich einen Versuch dar, sich an die veränderten Bedingungen anzupassen und eine Entartung der Stammzellfunktionen zu verhindern. Eventuell zeigen sich erst nach gleichzeitigem Knockdown verschiedener Cathepsine relevante Auswirkungen auf die Invasion von hMSC. In einem Mausmodell für Mammakarzinome konnte durch Sevenich et al. nachgewiesen werden, dass ein kombinierter Cathepsin B-/ Cathepsin X-Knockout in Mäusen synergistische Effekte im Sinne einer signifikant verzögerten Tumorprogression im Vergleich zu lediglich Cathepsin X-defizienten Mäusen ermöglicht (Sevenich et al, 2010; Sevenich et al, 2011). Denkbar wäre auch, dass erst eine längerfristige Downregulation von Cathepsin X in hMSC die Invasionsfähigkeit herabsetzt.

Zusammenfassend konnte nach Cathepsin X-Knockdown in humanen mesenchymalen Stammzellen eine Induktion zellulärer Seneszenz verzeichnet werden. Die vergrößerte Zellmorphologie, die verstärkte Expression lysosomaler β -Galactosidase und die Abnahme der Proliferationsrate weisen darauf hin. Zudem konnte eine Heraufregulation von mit zellulärer Seneszenz-assoziierten Genen - p16 und Caveolin-1 - nachgewiesen werden. In Cathepsin B- und L-defizienten hMSC fanden wir keine Hinweise für eine beschleunigte Seneszenz. Die Proliferation und die Invasion von Cathepsin B- und Cathepsin L-defizienten hMSC änderten sich nicht nennenswert. Es bleibt festzuhalten, dass lediglich in Cathepsin X-defizienten hMSC eine Induktion zellulärer Seneszenz beobachtet werden konnte. Wenn man die Ergebnisse mit Daten von Cathepsin X-defizienten Fibroblasten oder Tumorzellen vergleicht, wird deutlich, dass sich in primären Stammzellen weniger starke Effekte nach Cathepsin X-Knockdown zeigen. Im Vergleich zu Fibroblasten und Tumorzellen ließ sich in Cathepsin X-defizienten hMSC keine verminderte Invasion feststellen. Zudem kann in verschiedenen Zelltypen eine unterschiedliche Aktivierung von Seneszenz-assoziierten Genen nachgewiesen werden. Die genauen Regelmechanismen, die für diese Unterschiede in den verschiedenen Zelltypen verantwortlich sind, konnten noch nicht aufgeklärt werden.

F 4 Aktivierung proproliferativer Signalwege durch exogene Zugabe von (Pro)Cathepsin X in hMSC

In unseren Knockdown-Experimenten mit humanen mesenchymalen Stammzellen konnte eine beschleunigte zelluläre Seneszenz in Cathepsin X-defizienten hMSC gezeigt werden. Für die Downregulation von Cathepsin B und L wurde keine Induktion zellulärer Seneszenz in hMSC nachgewiesen. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die eine Veränderung der Zellmorphologie und eine verminderte Proliferation nach Cathepsin X-Downregulation herbeiführten, konnten dabei nicht geklärt werden. Wir stellten uns die Frage, ob eine Zugabe von Procathepsin X bzw. Cathepsin X zum Zellkulturmedium bei hMSC eventuell zu einer Zunahme der Proliferation durch Aktivierung proproliferativer Signalwege führt.

Eine Beteiligung diverser Proteasen an der proproliferativen Signaltransduktion durch Interaktion mit Zellrezeptoren ist bereits in der Literatur beschrieben (Sloane et al, 2006). Ein prominentes Beispiel ist in diesem Zusammenhang der uPAR-uPA-Signalweg bzw. das Plasminogen-Aktivator-System. Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) besitzt einerseits proteolytische Aktivität (Aktivierung des Urokinase-Plasminogen-Aktivators), was eine Degradierung extrazellulärer Matrixproteine zur Folge hat und somit die Invasion und Metastasierung von Tumoren begünstigt (Ellis & Murphy, 2001). Andererseits konnte für uPAR auch eine Rolle bei der Signaltransduktion durch die Interaktion mit membrangebundenen

Integrinen nachgewiesen werden, die zu einer Aktivierung proliferativer Signalwege führt (Blasi & Carmeliet, 2002; Smith & Marshall, 2010). uPAR beeinflusst unter anderem den für Wachstum und Differenzierung wichtigen MAPK-Signaltransduktionsweg und trägt bei Überexpression zu maligner Transformation im Tumorgewebe bei.

Die Cysteinprotease Cathepsin X zeigt in einigen Tumoren eine Überexpression im extrazellulären Milieu. Besonders im Bereich der Invasionsfront konnte eine Expression von Cathepsin X nachgewiesen werden. Aufgrund der Exocarboxypeptidaseaktivität von Cathepsin X ist eine Degradierung extrazellulärer Matrixproteine durch diese Protease sehr unwahrscheinlich. Es häufen sich Hinweise für eine Interaktion von Cathepsin X bzw. dessen Proform mit diversen Zelloberflächenproteinen, die eine Beteiligung an der Signaltransduktion (*Outside-In-Signaling*) vermuten lassen (Obermajer et al, 2008a). Auf Endothelzellen konnte die Kollokalisierung von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ sowie die Interaktion dieser beiden Proteine gezeigt werden (Lechner et al, 2006). Dabei bindet Procathepsin X über eine RGD-Sequenz an das Integrin $\alpha_v\beta_3$. Auch das gereifte Enzym besitzt ein Integrinerkennungsmotiv mit der Sequenz Glu-Cys-Asp (ECD), was eine Bindung an β_2 -Integrine ermöglicht (Obermajer et al, 2008b). Ob diese Interaktion die Signaltransduktion nennenswert beeinflusst, wurde jedoch noch nicht erforscht. Durch Zugabe von Procathepsin X bzw. Cathepsin X zum Zellkulturmedium konnte in unseren Experimenten mit hMSC erstmals eine Aktivierung des MAPK-Signalweges durch Phosphorylierung von Erk gezeigt werden. Eine Integrin-vermittelte *Outside-In*-Signaltransduktion erscheint vor dem Hintergrund der bereits beschriebenen Interaktion mit Integrinen denkbar, die Mechanismen der Aktivierung bleiben jedoch unklar. Neben der Interaktion mit Integrinen konnte auch kürzlich eine Verbindung von Cathepsin X zum IGF-*Signaling* hergestellt werden (Kraus et al, 2012). Das IGF-System ist in Tumorzellen maßgeblich an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt. Ein Knockdown von Cathepsin X unterdrückte in Experimenten von Kraus et al. den proliferativen IGF-Signalweg. Cathepsin X-defiziente Prostatakarzinomzellen zeigten eine reduzierte Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors sowie des weiter *downstream* gelegenen Signalproteines *focal adhesion kinase* (FAK).

Auf der einen Seite können proliferative bzw. proinvasive Signalwege durch die Interaktion von (Pro)Cathepsin X mit Zelloberflächenrezeptoren beeinflusst werden. Auf der anderen Seite wird in Cathepsin X-defizienten Zellen zelluläre Seneszenz begünstigt. Es lässt sich festhalten, dass Cathepsin X in der Lage ist, sowohl Seneszenz-assoziierte als auch Integrin- bzw. Wachstumsfaktorrezeptor-abhängige Signalwege zu beeinflussen. Zusammenhänge zwischen den genannten Signalwegen sind in den letzten Jahren in der Fachliteratur beschrieben worden. Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor uPAR beispielsweise

beeinflusst Integrin-abhängige und Seneszenz-assoziierte Signalwege: In Schilddrüsenkarzinomzellen spielt eine Integrin-vermittelte Aktivierung des Erk-Signalweges für die Tumorgenese eine wichtige Rolle. uPAR löste in einer Studie von Nowicki et al. durch Interaktion mit Integrinen eine Phosphorylierung von Erk aus und begünstigte damit die Proliferation und Invasion. Ein Mangel an uPAR (durch Knockdown mittels RNA-Interferenz) führte hingegen zu einer Induktion zellulärer Seneszenz (Nowicki et al, 2011). In einer weiteren Studie konnte der Einfluss von β_1 -Integrinen auf die zelluläre Seneszenz nachgewiesen werden: Das Fehlen von β_1 -Integrinen in Pankreastumoren transgener Mäuse reduzierte das Tumorstadium und die Tumormetastasierung durch Heraufregulation des Seneszenzmarkers p21 (Kren et al, 2007). In humanen mesenchymalen Stammzellen von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses konnte kürzlich eine p16-gesteuerte Induktion der zellulären Seneszenz durch die Unterdrückung des Erk-Signalweges nachgewiesen werden (Gu et al, 2012). In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Cysteinprotease Cathepsin X in hMSC sowohl einen Einfluss auf proliferative als auch auf antiproliferative Signalwege nehmen kann. Die veröffentlichten Daten von Kraus et al. belegen ebenfalls eine Beteiligung von Cathepsin X an der Seneszenz-assoziierten Signaltransduktion (Kraus et al, 2011; Kraus et al, 2012). Die Aufklärung der genauen molekularen Mechanismen bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

G SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Für diverse Cathepsine wurde in den letzten Jahren eine Beteiligung an Proliferations- und Invasionsprozessen insbesondere in Tumorzellen belegt (Mohamed & Sloane, 2006). Ihre Funktion - beispielsweise bei der Tumorprogression - wurde für die Cathepsine B und L durch den proteolytischen Abbau extrazellulärer Matrixproteine erklärt, was eine Migration von Tumorzellen ermöglicht (Joyce et al, 2004; Joyce & Hanahan, 2004; Vasiljeva et al, 2006). Die Rolle von Cathepsin X im Tumorgewebe war jedoch lange unklar, ein Abbau von EZM-Proteinen ist aufgrund seiner Carboxypeptidaseaktivität nicht möglich (Kos et al, 2005). Vielmehr scheint Cathepsin X Mechanismen der zellulären Seneszenz und dadurch Wachstum und Invasion der Zellen zu beeinflussen: In primären Fibroblasten wurde gezeigt, dass ein Knockdown von Cathepsin X zelluläre Seneszenz auslösen kann, was zu einer Reduktion der Proliferation und Invasion führte (Kraus et al, 2011). In Prostatakarzinomzellen war dieser Befund ebenfalls zu erheben. Über die Funktion von Cathepsinen in humanen mesenchymalen Stammzellen war zu Beginn dieser Arbeit sehr wenig bekannt. Wir konnten in unseren Experimenten mit Cathepsin X-defizienten hMSC erstmals die Induktion zellulärer Seneszenz in Stammzellen bestätigen. Cathepsin X-defiziente hMSC reagierten mit der Ausbildung eines seneszenten Phänotyps mit vergrößertem Zelldurchmesser, einer verstärkten Expression lysosomaler β -Galactosidase, einer verminderten Proliferation und einer Überexpression der Seneszenz-assoziierten Gene p16 und Caveolin-1. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Tumorzellen, primären Fibroblasten und humanen mesenchymalen Stammzellen legt nahe, dass es sich dabei um ein allgemeingültiges Phänomen handelt. Ein Knockdown der Cathepsine B und L führte in hMSC im Gegensatz zu Experimenten mit Tumorzellen nicht zu einer verminderten Proliferation und Invasion. Diese Beobachtung unterstreicht, dass Cathepsin X innerhalb der Gruppe lysosomaler Cysteinproteasen eine besondere Rolle einnimmt und als Carboxypeptidase ohne endoproteolytische Aktivität vermutlich über Proteolyse-unabhängige Mechanismen in der Lage ist, Proliferations- und Invasionsprozesse in verschiedenen Zelltypen zu beeinflussen.

Neben den Auswirkungen auf die zelluläre Seneszenz ist Cathepsin X in der Lage, die proproliferative und proinvasive Signaltransduktion zu beeinflussen. Einer der bekanntesten Signalwege, der Proliferations- und Invasionsprozesse in Zellen steuert, ist der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg. Erk (*extracellular signal-related kinase*) fungiert im Rahmen des MAPK-Signalweges als Schlüsselprotein und ist maßgeblich an der Steuerung der Tumorgenese und -progression beteiligt. Wir konnten durch Zugabe von (Pro)Cathepsin X in das Zellkulturmedium von hMSC eine Aktivierung des Erk-Signalweges auslösen. Eine reduzierte Phosphorylierung von Erk wurde kürzlich in Cathepsin X-defizienten

Fibroblasten nachgewiesen (Kraus et al, 2012). Diese Ergebnisse belegen eine Cathepsin X-vermittelte Aktivierung des MAPK-Signalweges. Dies könnte sowohl die Funktion von Tumorzellen als auch von Stammzellen beeinflussen: An Orten der vermehrten Cathepsin X-Expression - z.B. bei Magen- oder Prostatakarzinomen - könnte Cathepsin X die Tumorprogression fördern; möglicherweise stellt die erhöhte Expression von Cathepsin X im Tumorgewebe einen Versuch dar, zelluläre Seneszenz zu umgehen und dadurch die hohen Proliferationsraten aufrechtzuerhalten. Innerhalb der Stammzellnische könnte ein Überangebot von Cathepsin X zu einem Ungleichgewicht an wachstumsfördernden und -hemmenden Signalmolekülen führen und unter Umständen die stammzellspezifischen Funktionen verändern. Statt einer kontrollierten Proliferation und Differenzierung könnte eine maligne Entartung der Stammzelle ausgelöst werden. Diese Überlegungen sind jedoch rein hypothetisch und erfordern weitere Untersuchungen. Es lässt sich festhalten, dass Cathepsin X-vermittelt sowohl Seneszenz-assoziierte Signalwege als auch proproliferative und proinvasive Signalwege in verschiedenen Zelltypen beeinflusst werden können. Die detaillierten molekularen Grundlagen - insbesondere die Zusammenhänge zwischen pro- und antiproliferativen Signalwegen - bleiben jedoch unklar und ihre Aufklärung erfordert weitere Experimente.

Wenn man die erhobenen Daten nach Knockdown von Cathepsin X in hMSC mit den bisherigen Ergebnissen in Tumorzellen und Fibroblasten vergleicht, zeigen sich - trotz der Gemeinsamkeit einer Induktion zellulärer Seneszenz bei Cathepsin X-Defizienz - einige Unterschiede. Zum einen konnte in Cathepsin X-defizienten hMSC keine Reduktion der Invasionsfähigkeit im Transwell-Assay beobachtet werden. In Experimenten mit Prostatakarzinomzellen und primären Fibroblasten war hingegen eine deutlich reduzierte Invasion zu verzeichnen (Kraus et al, 2011). Zum anderen unterscheiden sich die Auswirkungen auf die Expression von Zellzyklusinhibitoren in Cathepsin X-defizienten hMSC im Vergleich zu primären Fibroblasten nach Cathepsin X-Knockdown. Während in Cathepsin X-defizienten primären Fibroblasten eine deutliche Heraufregulation des p53-p21-Signalweges zu beobachten war (Kraus et al, 2011), ergab sich in unseren Untersuchungen mit hMSC eine Aktivierung des p16-gesteuerten Signalweges. Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass sich in verschiedenen Zelltypen die molekularen Mechanismen, die den zellulären Prozessen Proliferation und Migration/ Invasion zugrunde liegen, unterscheiden können. Stammzellen besitzen ein komplexes Netzwerk an regulativen Mechanismen, um ihre stammzellspezifischen Funktionen aufrechtzuerhalten. Der Knockdown einer Protease löst in hMSC womöglich weniger deutliche Änderungen aus als in Tumorzellen, deren proproliferative und proinvasive Signaltransduktion bereits entartet ist. Eine andere Erklärung für die Unterschiede zwischen hMSC und Tumorzellen bzw. Fibroblasten nach Cathepsin-Knockdown könnte die geringere Expression der Cathepsine in

hMSC sein. Dies würde die ausbleibenden Effekte auf die Invasion von hMSC nach Knockdown der Cathepsine B und L erklären. Wahrscheinlich führt erst ein gemeinsamer Knockdown von Proteasen zu signifikanten Effekten auf die Invasion, wie dies für den kombinierten Cathepsin B-/ Cathepsin X-Knockout in einem Mausmodell für Mammakarzinome gezeigt wurde (Sevenich et al, 2010).

Die bisherigen Ergebnisse liefern bereits wichtige Hinweise, die im Rahmen einer Tumorthherapie Bedeutung finden könnten. Ein Knockdown von Cathepsin X führte sowohl in Tumorzellen als auch in Stammzellen zur Induktion zellulärer Seneszenz. Die Auswirkungen auf Proliferation und Invasion in Cathepsin X-defizienten Tumorzellen waren dabei stärker ausgeprägt als in unseren Versuchen mit Stammzellen. Zelluläre Seneszenz als therapeutisches Konzept in der Onkologie hat in den letzten Jahren immer mehr Beachtung gefunden (Ewald et al, 2010). Ein Cathepsin X-Inhibitor könnte zukünftig im Rahmen der Tumorthherapie eingesetzt werden. Die Überexpression von Cathepsin X im Tumorgewebe und die moderateren Effekte auf die Stammzellen im Vergleich zu Tumorzellen stellen dafür gute Voraussetzungen dar. Abgesehen von einem möglichen Einsatz eines Cathepsin X-Inhibitors wären auch Inhibitoren der Cathepsine B und L als Therapeutika in der Tumorthherapie denkbar. Ihr Beitrag zur Tumorsuppression und die fehlenden Auswirkungen auf die Funktionen von hMSC *in vitro* stellen ein vielversprechendes Therapiekonzept dar. Für die Entwicklung effektiver Medikamente sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Auswirkungen einer möglichen Funktionsminderung von Stammzellen durch Cathepsin-reprimierende Tumortherapien besser abschätzen zu können. Ein besseres Verständnis der zellulären Seneszenzmechanismen sowie der Beteiligung von Proteasen an Prozessen der Proliferation und Invasion sind entscheidend für die Entwicklung sicherer Tumortherapien.

H LITERATURVERZEICHNIS

Adams JC, Watt FM (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**: 1183-1198

Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13742-13747

Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K (1995) Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8348-8352

Baker N, Zhang G, You Y, Tuan RS (2012) Caveolin-1 regulates proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **113**: 3773-3787

Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R (2000) Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* **28**: 707-715

Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F (2009) Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Res* **69**: 2878-2886

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* **22**: 675-682

Blasi F, Carmeliet P (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 932-943

Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* **7**: 14

Buhling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge S, Nagler DK (2000) Review: novel cysteine proteases of the papain family. *Adv Exp Med Biol* **477**: 241-254

Burridge K, Doughman R (2006) Front and back by Rho and Rac. *Nat Cell Biol* **8**: 781-782

Burster T, Macmillan H, Hou T, Boehm BO, Mellins ED (2010) Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Mol Immunol* **47**: 658-665

Cai J, Weiss ML, Rao MS (2004) In search of "stemness". *Exp Hematol* **32**: 585-598

Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**: 513-522

Campisi J (2007) Aging and cancer cell biology, 2007. *Aging Cell* **6**: 261-263

Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 729-740

Carlson ME, Conboy IM (2007) Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging Cell* **6**: 371-382

-
- Chapman HA, Riese RJ, Shi GP (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* **59**: 63-88
- Cichowski K, Hahn WC (2008) Unexpected pieces to the senescence puzzle. *Cell* **133**: 958-961
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3213-3218
- Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**: 760-764
- Costa AG, Cusano NE, Silva BC, Cremers S, Bilezikian JP (2011) Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* **7**: 447-456
- Cowburn D (2007) Moving parts: how the adaptor protein CRK is regulated, and regulates. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 465-466
- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* **107**: 275-281
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9363-9367
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**: 315-317
- Eliceiri BP (2001) Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res* **89**: 1104-1110
- Ellis V, Murphy G (2001) Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. *FEBS Lett* **506**: 1-5
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**: 677-689
- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF (2010) Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* **102**: 1536-1546
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811
- Friedenstein AJ (1961) Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. *Acta Anat (Basel)* **45**: 31-59
- Galbiati F, Volonte D, Liu J, Capozza F, Frank PG, Zhu L, Pestell RG, Lisanti MP (2001) Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **12**: 2229-2244

-
- Gocheva V, Joyce JA (2007) Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* **6**: 60-64
- Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, Hanahan D, Joyce JA (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* **20**: 543-556
- Goretzki L, Schmitt M, Mann K, Calvete J, Chucholowski N, Kramer M, Gunzler WA, Janicke F, Graeff H (1992) Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett* **297**: 112-118
- Green MR (2008) Senescence: not just for tumor suppression. *Cell* **134**: 562-564
- Grinstein E, Wernet P (2007) Cellular signaling in normal and cancerous stem cells. *Cell Signal* **19**: 2428-2433
- Gu Z, Cao X, Jiang J, Li L, Da Z, Liu H, Cheng C (2012) Upregulation of p16INK4A promotes cellular senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients. *Cell Signal* **24**: 2307-2314
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514
- Hall A (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**: 891-895
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70
- Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-636
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585-621
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC (2004) Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* **306**: 1568-1571
- Hurst DR, Welch DR (2007) A MSC-ing link in metastasis? *Nat Med* **13**: 1289-1291
- Huveneers S, Danen EH (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**: 1059-1069
- Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS (1997) Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem* **272**: 1197-1202
- Ilmer, Matthias (2009) Osteoblasten-induzierte frühe Osteogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen durch Aktivierung des Wnt-Signalweges. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
- Ishidoh K, Kominami E (1995) Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **217**: 624-631
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP (2004) Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* **5**: 1-10

-
- Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF (2000) Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **275**: 9645-9652
- Jedeszko C, Sloane BF (2004) Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* **385**: 1017-1027
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**: 41-49
- Jones DL, Wagers AJ (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 11-21
- Joppien S, Maier SL, Wendling D (2010) *Experimentelle Doktorarbeit*, Vol. 1, München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-Morse N, Giraudo E, Tsai FY, Greenbaum DC, Hager JH, Bogoy M, Hanahan D (2004) Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**: 443-453
- Joyce JA, Hanahan D (2004) Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* **3**: 1516-1619
- Karagiannis TC, El-Osta A (2005) RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* **12**: 787-795
- Karow, Marisa (2008) Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Analyse einzelner Signalkomponenten und deren funktioneller Bedeutung bei Proliferation und Invasion. Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie
- Katsube Y, Hirose M, Nakamura C, Ohgushi H (2008) Correlation between proliferative activity and cellular thickness of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **368**: 256-260
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**: 1294-1301
- Klees RF, Salasznyk RM, Kingsley K, Williams WA, Boskey A, Plopper GE (2005) Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. *Mol Biol Cell* **16**: 881-890
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* **291**: 113-135
- Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H (2011) Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res* **2011**: 963172
- Korbling M, Estrov Z (2003) Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* **349**: 570-582

-
- Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavasnik Bergant V, Langerholc T, Turk B, Werle B, Golouh R, Repnik U, Jeras M, Turk V (2005) Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res* **306**: 103-113
- Kraus S, Bunsen T, Schuster S, Cichon MA, Tacke M, Reinheckel T, Sommerhoff CP, Jochum M, Nagler DK (2011) Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *Eur J Cell Biol* **90**: 678-686
- Kraus S, Fruth M, Bunsen T, Nagler DK (2012) IGF-I receptor phosphorylation is impaired in cathepsin X-deficient prostate cancer cells. *Biol Chem* **393**: 1457-1462
- Kren A, Baeriswyl V, Lehembre F, Wunderlin C, Strittmatter K, Antoniadis H, Fassler R, Cavallaro U, Christofori G (2007) Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function. *EMBO J* **26**: 2832-2842
- Krueger S, Haeckel C, Buehling F, Roessner A (1999) Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res* **59**: 6010-6014
- Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Kuster D, Peitz U, Ebert M, Nagler DK, Kellner U, Malferttheiner P, Naumann M, Rocken C, Roessner A (2005) Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol* **207**: 32-42
- Krueger S, Kellner U, Buehling F, Roessner A (2001) Cathepsin L antisense oligonucleotides in a human osteosarcoma cell line: effects on the invasive phenotype. *Cancer Gene Ther* **8**: 522-528
- Krupa JC, Hasnain S, Nagler DK, Menard R, Mort JS (2002) S2' substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem J* **361**: 613-619
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**: 3613-3622
- Lechner, Annette (2008) Regulation der Sekretion und Zelloberflächenassoziation von Cathepsin X durch Interaktionen mit dem Integrin α v β 3 und seinem Liganden Vitronektin. Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie
- Lechner AM, Assfalg-Machleidt I, Zahler S, Stoeckelhuber M, Machleidt W, Jochum M, Nagler DK (2006) RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin α v β 3 mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem* **281**: 39588-39597
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**: 187-195
- Li L, Nieves WB (2006) Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* **66**: 4553-4557
- Lleonart ME, Artero-Castro A, Kondoh H (2009) Senescence induction; a possible cancer therapy. *Mol Cancer* **8**: 3
- Lopez-Otin C, Matrisian LM (2007) Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **7**: 800-808

-
- Marx J (2008) Cancer biology. All in the stroma: cancer's Cosa Nostra. *Science* **320**: 38-41
- Mimeault M, Batra SK (2009) Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res Rev* **8**: 94-112
- Mohamed MM, Sloane BF (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 764-775
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* **88**: 287-298
- Nägler DK, Kruger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P, Krams M, Roessner A, Kellner U (2004) Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* **60**: 109-119
- Nägler DK, Lechner AM, Oettl A, Kozaczynska K, Scheuber HP, Gippner-Steppert C, Bogner V, Biberthaler P, Jochum M (2006) An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods* **308**: 241-250
- Nägler DK, Menard R (1998) Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett* **434**: 135-139
- Nägler DK, Menard R (2003) Family C1 cysteine proteases: biological diversity or redundancy? *Biol Chem* **384**: 837-843
- Nägler DK, Storer AC, Portaro FC, Carmona E, Juliano L, Menard R (1997) Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* **36**: 12608-12615
- Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Menard R (1999) Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* **38**: 12648-12654
- Nalla AK, Gorantla B, Gondi CS, Lakka SS, Rao JS (2010) Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther* **17**: 599-613
- Nascimento FD, Rizzi CC, Nantes IL, Stefe I, Turk B, Carmona AK, Nader HB, Juliano L, Tersariol IL (2005) Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch Biochem Biophys* **436**: 323-332
- Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ (2012) Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* **12**: 133-143
- Nomura T, Katunuma N (2005) Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *J Med Invest* **52**: 1-9
- Nowicki TS, Zhao H, Darzynkiewicz Z, Moscatello A, Shin E, Schantz S, Tiwari RK, Geliebter J (2011) Downregulation of uPAR inhibits migration, invasion, proliferation, FAK/PI3K/Akt signaling and induces senescence in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Cycle* **10**: 100-107
- Obermajer N, Jevnikar Z, Doljak B, Kos J (2008a) Role of cysteine cathepsins in matrix degradation and cell signalling. *Connect Tissue Res* **49**: 193-196

-
- Obermajer N, Repnik U, Jevnikar Z, Turk B, Kreft M, Kos J (2008b) Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of beta2 integrins. *Immunology* **124**: 76-88
- Palermo C, Joyce JA (2008) Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 22-28
- Pan L, Chen S, Weng C, Call G, Zhu D, Tang H, Zhang N, Xie T (2007) Stem cell aging is controlled both intrinsically and extrinsically in the Drosophila ovary. *Cell Stem Cell* **1**: 458-469
- Papayannopoulou T, Scadden DT (2008) Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood* **111**: 3923-3930
- Park JS, Kim HY, Kim HW, Chae GN, Oh HT, Park JY, Shim H, Seo M, Shin EY, Kim EG, Park SC, Kwak SJ (2005) Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. *Mech Ageing Dev* **126**: 551-559
- Pavey SJ, Cummings MC, Whiteman DC, Castellano M, Walsh MD, Gabrielli BG, Green A, Hayward NK (2002) Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. *Melanoma Res* **12**: 539-547
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**: 143-147
- Pullikuth AK, Catling AD (2007) Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal* **19**: 1621-1632
- Rando TA (2006) Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* **441**: 1080-1086
- Rao JS, Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Lakka SS (2007) MMP-9 short interfering RNA induced senescence resulting in inhibition of medulloblastoma growth via p16(INK4a) and mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* **67**: 4956-4964
- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **34**: D270-272
- Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ (1995) Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3849-3853
- Reinheckel T, Hagemann S, Dollwet-Mack S, Martinez E, Lohmuller T, Zlatkovic G, Tobin DJ, Maas-Szabowski N, Peters C (2005) The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci* **118**: 3387-3395
- Reiser J, Adair B, Reinheckel T (2010) Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* **120**: 3421-3431
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111
- Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* **109**: 4055-4063

-
- Robbins E, Levine EM, Eagle H (1970) Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J Exp Med* **131**: 1211-1222
- Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**: 3291-3310
- Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9194-9199
- Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL (2008) Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* **132**: 681-696
- Rousselet N, Mills L, Jean D, Tellez C, Bar-Eli M, Frade R (2004) Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. *Cancer Res* **64**: 146-151
- Rubio D, Garcia S, Paz MF, De la Cueva T, Lopez-Fernandez LA, Lloyd AC, Garcia-Castro J, Bernad A (2008) Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS One* **3**: e1398
- Ruzankina Y, Brown EJ (2007) Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing. *Br J Cancer* **97**: 1189-1193
- Ryu E, Hong S, Kang J, Woo J, Park J, Lee J, Seo JS (2008) Identification of senescence-associated genes in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **371**: 431-436
- Salasznyk RM, Klees RF, Hughlock MK, Plopper GE (2004a) ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Commun Adhes* **11**: 137-153
- Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE (2004b) Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* **2004**: 24-34
- Santamaria I, Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Lopez-Otin C (1998) Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* **273**: 16816-16823
- Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**: 1075-1079
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**: 7-25
- Schwartz MA, Ginsberg MH (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* **4**: E65-68
- Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, Abdallah B, Schrodder H, Jensen T, Kassem M (2004) Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* **23**: 5095-5098
- Serveau-Avesque C, Martino MF, Herve-Grepinet V, Hazouard E, Gauthier F, Diot E, Lalmanach G (2006) Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell* **98**: 15-22

-
- Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, Gajda M, Werner F, Muller S, Vasiljeva O, Schwinde A, Klemm N, Deussing J, Peters C, Reinheckel T (2010) Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2497-2502
- Sevenich L, Werner F, Gajda M, Schurigt U, Sieber C, Muller S, Follo M, Peters C, Reinheckel T (2011) Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-middle-T-induced breast cancer in mice. *Oncogene* **30**: 54-64
- Sharpless NE, DePinho RA (2007) How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 703-713
- Shay JW, Roninson IB (2004) Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **23**: 2919-2933
- Sivaraman J, Nägler DK, Zhang R, Menard R, Cygler M (2000) Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* **295**: 939-951
- Sloane BF, Sameni M, Podgorski I, Cavallo-Medved D, Moin K (2006) Functional imaging of tumor proteolysis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 301-315
- Smith HW, Marshall CJ (2010) Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 23-36
- Smith SK, Kipling D (2004) The role of replicative senescence in cancer and human ageing: utility (or otherwise) of murine models. *Cytogenet Genome Res* **105**: 455-463
- Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F (2008) Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* **15**: 730-738
- Staudt ND, Aicher WK, Kalbacher H, Stevanovic S, Carmona AK, Bogyo M, Klein G (2010) Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica* **95**: 1452-1460
- Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* **129**: 163-173
- Szpaderska AM, Frankfater A (2001) An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res* **61**: 3493-3500
- Turk B, Turk D, Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 98-111
- Tuschl T (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem* **2**: 239-245
- Vasiljeva O, Papazoglou A, Kruger A, Brodoefel H, Korovin M, Deussing J, Augustin N, Nielsen BS, Almholt K, Bogyo M, Peters C, Reinheckel T (2006) Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* **66**: 5242-5250
- Vasiljeva O, Turk B (2008) Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie* **90**: 380-386

Vijg J, Campisi J (2008) Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* **454**: 1065-1071

Vizin T, Christensen IJ, Nielsen HJ, Kos J (2012) Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Radiol Oncol* **46**: 207-212

Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F (2002) Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell* **13**: 2502-2517

Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Jousen S, Ma N, Strunk D, Koch C (2010) How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging (Albany NY)* **2**: 224-230

Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* **3**: e2213

Wang J, Chen L, Li Y, Guan XY (2011) Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **6**: e24967

Weissman IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**: 157-168

Wille A, Heimburg A, Gerber A, Reisenauer A, Welte T, Buhling F (2002) Functional consequences of cathepsin L deficiency in human lung epithelial cells. *Biol Chem* **383**: 1291-1296

Willstätter R, Bamann E (1929) Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* **180**: 127-143

Yan JA, Xiao H, Ji HX, Shen WH, Zhou ZS, Song B, Chen ZW, Li WB (2010) Cathepsin L is associated with proliferation and clinical outcome of urothelial carcinoma of the bladder. *J Int Med Res* **38**: 1913-1922

I DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Heesemann, Leiter des Lehrstuhles Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Institutes und Leiter des Promotionsstudienganges Molekulare Medizin und Systembiologie, für die Möglichkeit, im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU wissenschaftlich tätig sein zu dürfen.

Frau Professor Jochum, ehemalige Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dorit Nägler für die tatkräftige und immer verfügbare Unterstützung während der experimentellen Arbeit und schriftlichen Ausarbeitung.

Zudem bin ich Herrn PD Dr. Peter Neth für seine großzügige fachliche Unterstützung in allen Belangen der mesenchymalen Stammzellforschung außerordentlich dankbar.

Für die praktische Unterstützung meiner Arbeit möchte ich vor allem folgenden Personen sehr danken: Stephan Kraus und Thea Bunsen für das methodische Einarbeiten, ihre Geduld und freundschaftliche Begleitung; Ruza Hell und Lourdes Ruiz-Heinrich für ihre wertvolle technische Mithilfe sowie Annemarie Oettl für ihr immer offenes Ohr.

Erwähnen möchte ich auch Dr. Virginia Egea, Dr. Tanja Popp, Dr. Marisa Karow und Dr. Iris Peröbner, um ihnen allen für ihre wertvolle Unterstützung zu danken.

Besonderer Dank gilt auch meiner FöFoLe-Kollegin Ulrike Leitenstern für ihre freundschaftliche Unterstützung und ihre motivierenden Worte.

Vor allem aber möchte ich meiner Familie herzlich danken, allen voran meinen Eltern Günter und Gislinde Schuster, die meinen Werdegang stets gefördert und mir das Studium ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Zwillingsschwester Katrin Schuster und Dr. Justin du Toit, die mir mit ihren Ratschlägen stets sehr geholfen haben.