

Medizinische Klinik m. S. Nephrologie und
internistische Intensivmedizin
Campus Virchow Klinikum
Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse der Signaltransduktionskaskade
glattmuskulärer Differenzierung
von humanen mesenchymalen Stammzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Lange

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. Dragun
 2. Prof. Dr. med. F. Thaiss
 3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Schmeck

Tag der Promotion: 08.04.2011

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aR	gegen Kaninchen (anti rabbit)
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
Bicine	N,N-Bis-(2-hydroxymethyl)-glycin
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxymethyl)-imino-tris-(hydroxylmethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CSF-1	Kolonie-stimulierender Faktor 1 (colony-stimulating factor-1)
DaM	Esel gegen Maus (donkey anti mouse)
DAPI	Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	endotheliale Zelle (endothelial cell)
ECL	Chemolumineszenz-Reagenz (Enhanced Chemoluminescence)
EDTA	Diamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
EPC	endotheliale Progenitorzelle
ERK	extrazelluläre Signal-bezogene Kinasen (extracellular-signal regulated kinases)

et al.	und andere
FBS	fetales Rinderserum (fetal bovine serum)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FKBP-12	FK506-bindendes Protein-12
FRAP	FKBP-Rapamycin-assoziiertes Protein
FRB	FKBP-Rapamycin-Bindungsstelle (FKBP-rapamycin binding)
GFP	grünfluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GFR	Wachstumsfaktorrezeptor (growth factor receptor)
β-GP	Glycerol-2-phosphat
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSC	hämatopoetische Stammzelle (hematopoietic stem cell)
HuNu	humanes Zellkern-Antigen (human nuclear antigen)
IFN-γ	Interferon-γ
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor)
IL-2	Interleukin-2
JAK	Janus-Tyrosin-Kinasen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LacZ	β-Galaktosidase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPL	Lipoproteinlipase

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (mitogen-activated protein kinases)
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEK	MAPK/ERK-Kinase
β-ME	β-Merkaptoethanol
MHC	schwere Myosinkette (myosin heavy chain)
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase (myosin light chain kinase)
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MSC	mesenchymale Stammzelle (mesenchymal stem cell)
mTOR	Rapamycin-sensitiver Faktor (mamallian target of rapamycin)
NDS	normales Eselserum (normal donkey serum)
NFAT	Kernfaktor aktivierter T-Zellen (nuclear factor of activated T-cells)
NRTK	Nicht-Rezeptortyrosinkinasen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCI	perkutane Koronar-Intervention (percutaneous coronary intervention)
PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (platelet-derived growth factor)
PDK	Phosphoinositol-abhängige Kinase (phosphoinositide-dependent kinase, phosphatidyl-dependent kinase)
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PPAR-γ	Peroxisome Proliferation-Activated Receptor γ
p70S6K	p70 ribosomale S6 Kinase

PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RaM	Kaninchen gegen Maus (rabbit anti mouse)
Rbp	Retinoblastoma-Protein
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SaR	Schwein gegen Kaninchen (swine anti rabbit)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SH2	Src-homologe Domäne Typ 2
sm	glattmuskulär (smooth muscle)
SMA	glattmuskuläres Aktin (smooth muscle actin)
SMC	glatte Muskelzelle (smooth muscle cell)
STAT	Signaltransduzierer und Aktivator der Transkription (signal transducer and activator of transcription)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TBST	TBS + Tween 20
TF	Gewebefaktor (tissue factor)
TGF-β	transformierender Gewebswachstumsfaktor β (transforming growth factor β)
TKR	Tyrosinkinaserzeptoren
Tris-Base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle (vascular smooth muscle cell)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1.	Gefäßumbauprozesse.....	1
1.2.	Mesenchymale Stammzellen.....	5
1.3.	Regulation glattmuskulärer Differenzierung in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	6
1.4.	Zelluläre Regulationsmechanismen über die PI3K/PDK/Akt/ mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade.....	7
1.4.1.	Tyrosinkinaserzeptoren (TKR).....	7
1.4.2.	Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K).....	8
1.4.3.	PDK-1 und Akt/Proteinkinase B (PKB).....	9
1.4.4.	mTOR (“mammalian target of rapamycin”).....	9
1.4.5.	p70 ribosomale S6 Kinase (p70S6K).....	10
1.5.	Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von Dimethylsulfoxid (DMSO), LY294002 und Rapamycin.....	11
1.5.1.	Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von Dimethylsulfoxid (DMSO).....	11
1.5.2.	Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von LY294002.....	12
1.5.3.	Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von Rapamycin (Sirolimus).....	13
1.6.	Herleitung der Aufgabenstellung.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1.	Material.....	16
2.1.1.	Geräte.....	16
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.3.	Chemikalien und Reagenzien.....	17
2.1.4.	Antikörper.....	19
2.1.5.	Medien.....	19
2.1.6.	Lösungen und Puffer.....	20

2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Zellkultur.....	23
2.2.2. Immunfluoreszenz.....	24
2.2.3. Proteinextraktion.....	25
2.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	25
2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.2.6. Western blot.....	27
2.2.7. „Strippen“ der Western blots.....	28
2.2.8. Statistik.....	28
3 Ergebnisse.....	29
3.1. Morphologie.....	29
3.1.1 Phänotypische Untersuchungen zur Expression glattmuskulärer Markerproteine durch mesenchymale Stammzellen.....	29
3.1.2 Veränderungen der Zellmorphologie mesenchymaler Stammzellen durch DMSO.....	31
3.1.3 Immunfluoreszenz-Untersuchungen mesenchymaler Stammzellen nach Inkubation mit DMSO.....	33
3.1.4 Veränderungen der Zellmorphologie mesenchymaler Stammzellen durch DMSO und LY294002.....	35
3.2 Markerproteine für die glattmuskuläre Differenzierung.....	36
3.2.1 Wirkung von DMSO und LY294002.....	36
3.2.2 Wirkung von DMSO und Rapamycin.....	39
3.2.3 Rapamycin-Konzentrationsreihe.....	41
3.3 Analyse der Signaltransduktion bei glattmuskulärer Differenzierung und Dedifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen.....	43
3.3.1 Wirkung von DMSO.....	43
3.3.1.1 pAkt und Akt.....	43
3.3.1.2 pp70S6K Threonin 389 und p70S6K.....	46
3.3.1.3 pp70S6K Threonin 421/Serin 424 und p70S6K.....	47
3.3.2 Auswirkung einer PI3K-Inhibition durch LY294002 auf die DMSO- induzierte Signaltransduktion in mesenchymalen Stammzellen.....	50

3.3.2.1	pAkt und Akt.....	50
3.3.2.2	pp70S6K Threonin 389 und p70S6K.....	52
3.3.2.3	pp70S6K Threonin 421/Serin 424 und p70S6K.....	53
3.3.3	Auswirkungen einer mTOR-Inhibition durch Rapamycin auf die DMSO-induzierte Signaltransduktion in mesenchymalen Stammzellen.....	56
3.3.3.1	pp70S6K Threonin 389 und p70S6K.....	56
4	Diskussion.....	58
4.1	Glattmuskuläres Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen und dessen Bedeutung.....	58
4.2	Beeinflussung des glattmuskulären Differenzierungsgrades mesenchymaler Stammzellen.....	60
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis.....	68
7	Anhang.....	78

1 Einleitung

1.1 Gefäßumbauprozesse

Die Gefäße eines Organismus befinden sich ständig in einem Regenerationsprozess, der durch die physiologische Belastung, durch Blutfluss und Blutdruck erforderlich wird. Kommt es zu einer Imbalance aus Schädigung und Regeneration, resultiert daraus eine dauerhafte Schädigung des Gefäßes. Diese Schädigungen können mechanischer, metabolischer oder entzündlicher Natur sein. Mechanische Schädigungen können beispielsweise in Form eines erhöhten Blutdrucks bei arterieller Hypertonie, in Venen, die als Bypass in das arterielle System verpflanzt worden sind, oder im Rahmen einer Gefäßdehnung mit einem Ballonkatheter bei Interventionen an Koronar- oder anderen Arterien auftreten. Eine metabolische Schädigung findet sich bei Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie. Entzündliche Läsionen zeigen sich bei Autoimmunerkrankungen oder nach Transplantation solider Organe.

Unabhängig von der Art der Schädigung besteht die Reaktion des Gefäßes in der Ausbildung einer sogenannten Neointima. Pathogenetisch kommt es an der Stelle der Gefäßläsion zu einer Anhäufung glatter Muskelzellen (SMC), die proliferieren und Komponenten der extrazellulären Matrix synthetisieren. Während der frühen Phase der Gefäßläsion kommt es zur Apoptose-Induktion von Gefäßzellen durch oxidiertes LDL, Homocystein, Angiotensin II und Lipopolysaccharide. Daraufhin finden am betroffenen Gefäß komplexe Umbauvorgänge statt. Es kommt zu einer progressiven, konzentrischen Verdickung der Intima (Intimahyperplasie) mit anschließender Bildung einer Neointima. Diese Vorgänge gehen mit einer perivaskulären Entzündungsreaktion einher. Das führt zu einer zunehmenden Stenosierung des betroffenen Gefäßabschnittes bis zum vollständigen Gefäßverschluss [71, 76]. Die Folge ist eine Mangeldurchblutung des betroffenen Gewebes mit Einschränkungen der Funktion bis hin zum Funktionsverlust.

Ein Hauptmerkmal der Neointimabildung ist die Proliferation glatter Muskelzellen. Lange wurde angenommen, dass durch eine endotheliale Schädigung welcher Ursache auch immer inflammatorische Zellen einwandern und verschiedene Zytokine sezernieren, die eine Dedifferenzierung, Migration in den subendothelialen Raum und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus der Media bewirken [77]. Allerdings konnten

nicht alle Beobachtungen mit diesem Modell erklärt werden. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass Blutzellen an der luminalen Seite der Gefäßverletzung binden und dadurch zur Entwicklung einer Intimahyperplasie beitragen. Durch Inhibition spezifischer Chemokine oder Adhäsionsmoleküle, die bei der Rekrutierung von Blutzellen eine entscheidende Rolle spielen, konnte einer SMC-Hyperplasie vorgebeugt werden. Neointimale SMC ähneln außerdem in Phänotyp und Genexpression eher hämatopoetischen als vaskulären Zellen. Darüber hinaus wurde auch trotz Fehlen einer Media nach schweren Gefäßverletzungen eine Neointima-Bildung beobachtet. Trotz großer Bemühungen konnte der molekulare Regulationsmechanismus von Proliferation und Migration glatter Muskelzellen bisher noch nicht geklärt werden [72]. Viele Aspekte sprechen aber dafür, dass nicht nur Zellen aus der Media an Gefäßumbauprozessen beteiligt sind.

Seit den 70er Jahren wird der Ursprung dieser Zellen genauer diskutiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es nicht nur zur Proliferation ortsständiger Zellen kommt [86], sondern dass auch zirkulierende Knochenmarkvorläuferzellen entscheidend zur Pathogenese vaskulärer Erkrankungen beitragen [46, 72, 80, 92]. Sie können zu endothelialen und glattmuskulären Zellen differenzieren und sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen außer zu Gefäßreparaturmechanismen auch zur Neubildung von Gefäßen und zu Umbauprozessen an Gefäßläsionen beitragen [5, 72, 73].

Zur Detektion zirkulierender Stammzellen in peripheren Organen gibt es je nach Untersuchungsansatz verschiedene Strategien, die teilweise nur experimentell anwendbar sind, teilweise aber auch an humanem Material aus der Klinik eingesetzt werden können. Im tierexperimentellen Bereich können Spezies-spezifische Antigene wie zum Beispiel HuNu nach Xenotransplantation oder genetisch markierte Zellen wie beispielsweise bei LacZ- oder GFP-transgenen Tieren verwendet werden. Zur zweiten Gruppe gehört der Nachweis des Y-Chromosoms bei geschlechtsdiskordanten (Sex-mismatch) Transplantationen. Weiterhin kommt die Analyse genetischer Polymorphismen nach Mikrodissektion zum Einsatz. Mit Hilfe dieser Techniken konnte nicht nur in einer Vielzahl von Experimenten in unterschiedlichen Spezies und nach verschiedenen Schädigungstypen sondern auch in Untersuchungen am Menschen eine Beteiligung nicht ortsständiger Zellen an der Neointimabildung nachgewiesen werden. Der Anteil eingewanderter Zellen schwankt dabei sehr stark und ist unter anderem von

der Art der Schädigung, dem gewählten Organismus und der Nachweismethode abhängig [22, 34, 35, 38, 92].

In einem beispielhaften Mausmodell wurde Knochenmark von ROSA26-Mäusen, die ubiquitär das Enzym β -Galaktosidase (LacZ) exprimieren, in myeloablatierte Wildtyp-Mäuse implantiert. Anschließend wurde ein Draht in die Femoralarterie eingeführt und mit diesem eine schwere mechanische Verletzung an Endothel und Media verursacht. Eine Woche nach Gefäßverletzung wurden LacZ-positive Zellen an der luminalen Gefäßseite als Neointima nachgewiesen. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch zum Nachweis zirkulierender Knochenmarkszellen bei der Transplantatvaskulopathie, in arteriosklerotischen Plaques und bei anderen Gefäßumbauprozessen erfolgreich eingesetzt [23, 28, 70, 71, 79, 84].

In Nieren von weiblichen Spendern, die männlichen Empfängern transplantiert worden waren, wurden Zellen identifiziert, die positiv für das Y-Chromosom waren und somit vom Empfänger abstammen mussten und ins Transplantat eingewandert waren. Diese Zellen exprimierten außerdem den mesenchymalen und glattmuskulären Marker alpha smooth muscle actin (α -SMA) und wurden sowohl in der Neointima als auch der Adventitia von Gefäßen und im Interstitium gefunden. Zwischen 30 und 38% der Zellen des jeweiligen Kompartiments trugen das Y-Chromosom.

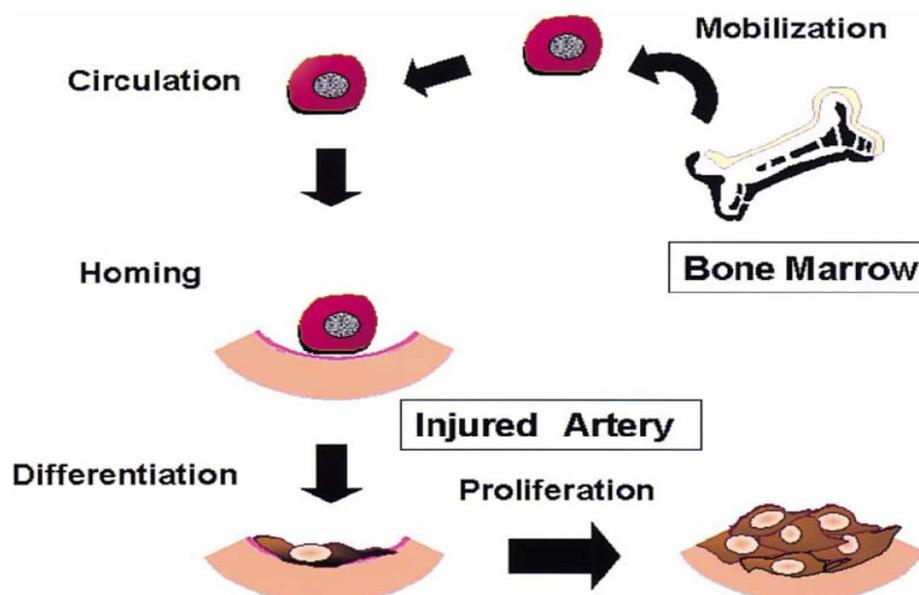


Abb. 1: Schematische Darstellung von Mobilisierung, Homing und Differenzierung von Stammzellen bei Gefäßschädigungen

Ein neues pathophysiologisches Konzept, das diese Befunde berücksichtigt, geht davon aus, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder auch aus anderen Stammzellnischen des Körpers im Blut zirkulieren oder gezielt mobilisiert werden können. Diese Zellen können nach Ankunft am Ort der Gefäßschädigung differenzieren und proliferieren und dadurch sowohl an physiologischer Gefäßregeneration und adäquater Gefäßreparatur als auch an fehlgeleiteter Reaktion auf Gefäßschäden in Gestalt der Neointima beteiligt sein (Abb. 1). Die genauen Mechanismen von Mobilisierung, Migration, Homing und Differenzierung sind noch weitestgehend unklar. Nach schweren mechanischen Gefäßverletzungen wie durch das Einführen eines Drahtes wird beispielsweise die Expression von MCP-1 und VEGF induziert. Diese Faktoren scheinen beim Homing von Knochenmarkzellen von Bedeutung zu sein [50, 76, 84]. Bei der Zelldifferenzierung in glatte Gefäßmuskelzellen kommt der intrazellulären Signaltransduktion eine besondere Bedeutung zu. Sie kann eine Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei Gefäßerkrankungen bieten.

Anhand der oben genannten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Zellen, die zumindest teilweise aus dem Knochenmark stammen, an Gefäßreparaturmechanismen, Umbauprozessen und an der Bildung einer Neointima bei Gefäßläsionen beteiligt sind [33]. Im Knochenmark gibt es mehrere verschiedene Stamm- und Vorläuferzellen. Neben hämatopoetischen Stammzellen (HSC) existieren außerdem mesenchymale Stammzellen (MSC) und endotheliale Progenitorzellen. Da jedoch in den beschriebenen Tierexperimenten jeweils das komplette Knochenmark von Spendern in Empfängertiere transplantiert wurde, ist eine Aussage über den tatsächlich beteiligten Zelltyp nicht möglich. Darüber hinaus wird vermutet, dass SMC in Gefäßläsionen heterogenen Ursprungs sind, und dass es lediglich nach schweren Gefäßverletzungen wie Angioplastie, Transplantation und Plaque-Ruptur im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse zur Beteiligung zirkulierender Vorläuferzellen kommt [28, 84]. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an mesenchymalen Stammzellen durchgeführt, die klären sollten, welche Mechanismen eine glattmuskuläre Differenzierung von MSC, die für eine Beteiligung an den oben geschilderten Prozessen unabdingbar ist, steuern.

1.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden erstmals 1976 von Friedenstein und Kollegen aus dem Knochenmark isoliert. Sie werden auch mesenchymale Stromazellen genannt, da sie das Knochenmarkstroma regenerieren, welches Wachstum und Differenzierung der hämatopoetischen Reihen im Knochenmark unterstützt. Ontogenetisch entstammen MSC dem Mesoderm. Sie haben ein sehr hohes Proliferationspotenzial, machen lediglich 0,01 bis 0,001% aller kernhaltigen Zellen im Knochenmark aus und können leicht durch eine Knochenmarkpunktion gewonnen werden [63, 69]. Sie besitzen in Kultur die Fähigkeit zur Proliferation und weisen eine flach ausgebreitete, charakteristische Zellmorphologie auf. Spezifische Markerproteine konnten bisher nicht identifiziert werden. Dennoch weisen MSC ein charakteristisches Muster an Oberflächenantigenen auf, anhand dessen eine eindeutige Abgrenzung zu hämatopoetischen Stammzellen möglich ist. So wird laut Konsensus gefordert, dass MSC positiv für CD73, CD90 und CD105 und negativ für CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD 79alpha und HLA-DR sind [17]. Als Stammzellen sind sie in der Lage, die eigene Population zu regenerieren und außerdem in andere Zelllinien zu differenzieren. Zu diesen Differenzierungslinien gehören klassischerweise Zellen mesenchymaler Gewebe wie Knorpel-, Knochen- und Fettzellen.

Um eine chondrogene Differenzierung zu induzieren, wurden MSC zu Pellets zentrifugiert und anschließend serumfrei mit TGF- β inkubiert. Die kultivierten Zell-Pellets entwickelten eine mehrschichtige Anordnung mit Bildung einer Proteoglykanreichen extrazellulären Matrix. Im Gegensatz dazu kommt es nach Behandlung konfluenter MSC mit Insulin zur intrazellulären Bildung lipidreicher Vakuolen sowie zur Expression von PPAR- γ 2 und LPL, was eine adipozytäre Differenzierung anzeigt [63, 69]. Viele verschiedene Faktoren haben einen Einfluss auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen, so zum Beispiel Nährstoffangebot, Zelldichte, mechanische Kräfte, umgebende Matrixproteine, Wachstumsfaktoren und Zytokine [39, 59].

Es wurde vermutet, dass MSC unter den richtigen Bedingungen auch in Zellen differenzieren können, die eigentlich von den anderen Keimblättern abstammen [55, 61, 64]. Dies wurde sowohl für epitheliale (Endoderm) als auch für neuronale Zellen (Ektoderm) gezeigt [3, 14, 36, 40, 67]. Dieses Phänomen wird als Transdifferenzierung oder Plastizität adulter Stammzellen bezeichnet. Beispielsweise wurde beobachtet,

dass MSC sowohl nach peripherer als auch nach direkter Injektion ins Gehirn entlang der Wege migrieren, die bereits während der Embryonalentwicklung von neuronalen Zellen genutzt wurden. Im weiteren Verlauf kam es zu einer großflächigen Verteilung von MSC mit anschließendem Verlust von MSC-typischen Markerproteinen. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass MSC zu Neuronen und Astrozyten differenzierten. Die genaue weitere Entwicklung konnte jedoch nicht exakt aufgedeckt werden [67].

Der genaue Mechanismus der Transdifferenzierung ist also noch nicht geklärt, und der definitive Beweis für die Existenz und Relevanz einer Transdifferenzierung von MSC steht derzeit noch aus. Eine Vielzahl der Beobachtungen ließe sich auch durch andere Phänomene wie beispielsweise eine Fusion von undifferenzierten Stammzellen mit lokalen, bereits differenzierten Gewebszellen erklären [67, 86]. Dabei müsste nach Fusion zweier Zellen eine tetraploide Zelle entstehen. Das stimmt mit einigen Studien überein, bei denen eine Polyploidisierung glatter Gefäßmuskelzellen beobachtet wurde [72, 73]. Da Zellfusionen *in vitro* jedoch relativ selten beobachtet wurden, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sämtliche Vorgänge der Transdifferenzierung durch Zellfusionen entstehen, eher gering.

1.3 Regulation glattemuskulärer Differenzierung in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Über die glattemuskuläre Differenzierung von MSC und die daran beteiligten Signaltransduktionswege ist nichts bekannt. Von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) weiß man jedoch, dass das ausgewogene Zusammenspiel insbesondere der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) ERK (extrazelluläre Signal-bezogene Kinasen) und p38MAPK sowie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt/mTOR/p70S6-Kinase-Signalweg (siehe 1.4) von entscheidender Bedeutung ist [11, 74, 90]. Während eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Weges durch Insulin-like growth factor (IGF) zu einer Stabilisierung des differenzierten Phänotyps führt [25, 57], der durch eine starke Expression kontraktile Proteine und eine reduzierte Proliferation gekennzeichnet ist (kontraktile Phänotyp), resultiert die Stimulation von ERK und p38MAPK z. B. durch basic fibroblast growth factor (b-FGF) oder epidermal growth factor (EGF) in einer Ausbildung des sogenannten synthetisierenden Phänotyps [30, 45, 66] mit verminderter Expression kontraktile Proteine und hoher Proliferationsrate. Bemerkenswerterweise

hat die Hemmung von mTOR, einem der PI3K und Akt nachgeschalteten Signalelement, durch den spezifischen Inhibitor Rapamycin (siehe 1.4.3) den gleichen Effekt wie die Aktivierung der PI3K, nämlich eine Stabilisierung der glattmuskulären Differenzierung [51]. Die Hemmung der PI3K hatte jedoch keinen stabilisierenden Effekt. Weiterhin wurde beobachtet, dass Rapamycin über einen Rückkopplungsmechanismus von mTOR auf die PI3K wirkt, der zu einer Hemmung der stromabwärts von mTOR gelegenen S6K und einer Aktivierung von Akt führt, und so eine optimale Differenzierung von VSMC ermöglicht [51].

1.4 Zelluläre Regulationsmechanismen über die PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade

Die PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade beeinflusst Apoptose, Wachstum, Proliferation und Migration von Zellen [4, 13, 62]. Sie reguliert vielfältige Stoffwechselprozesse, ist beteiligt an Transkriptions- und Translationsprozessen bei der Proteinbiosynthese und beeinflusst die Resistenz von Zellen gegenüber Sauerstoffmangel oder auch zytotoxischer Behandlung [58, 68, 75]. Außerdem ist sie, wie oben gezeigt, für die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen von großer Bedeutung.

1.4.1 Tyrosinkinaserzeptoren (TKR)

Ausgangspunkt dieser Signaltransduktionskaskade sind Tyrosinkinaserzeptoren (TKR). Sie bestehen aus drei Domänen. An der Zelloberfläche befindet sich eine Ligandenbindungsdomäne für Wachstumsfaktoren und Hormone. Weiterhin besitzen sie eine kurze, hydrophobe transmembranäre Domäne. Sie stellt die Verbindung mit der intrazellulären Proteintyrosinkinasedomäne dar. Die Bindung eines Liganden wie beispielsweise PDGF, Insulin, CSF-1 oder Oncogen-Produkte [85] an den entsprechenden Rezeptor einer Tyrosinkinase bewirkt eine Dimerisierung des Rezeptors, wodurch ein Anstieg der Rezeptortyrosinkinaseaktivität induziert wird. TKR phosphorylieren sich selber an Tyrosinresten ihrer zytoplasmatischen Domänen, die ATP-Bindungsstellen besitzen. Diese autophosphorylierten Tyrosinreste dienen später als hochaffine Bindungsstellen für verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle. Diese intrazellulären Signalproteine weisen vielfältige Unterschiede in ihrer Struktur und

Funktion auf. Ihre Gemeinsamkeit sind zwei nicht-katalytische Domänen, die SH2- und SH3-Domäne. Die SH2-Domäne erkennt spezifische phosphorylierte Tyrosinreste und ermöglicht den Signalproteinen sowohl eine Bindung an aktivierte Rezeptortyrosinkinasen als auch an andere intrazelluläre Signalproteine, die an Tyrosinresten phosphoryliert wurden. Mit der SH3-Domäne können Signalmoleküle an andere Proteine binden, die nachfolgend in der Signaltransduktionskaskade wirken [49, 56].

1.4.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Das nachgeschaltete Enzym ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Sie kann neben den RTK und den NRTK auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden [85].

PI3-Kinasen bilden eine große, weit verzweigte Familie intrazellulärer Regulatorproteine. Die Gruppe der PI3K Typ 1 umfasst die Spezies α , β , γ und δ , welche in Säugetieren durch vier verschiedene Gene kodiert werden [89]. Die PI3K ist ein zytosolisches Heterodimer und besteht aus einer katalytischen Untereinheit p110 (110kDa) mit den Isoformen p110 α , - β und - δ und einer regulatorischen Untereinheit p85 (85kDa) [62, 78, 81]. Die p85-Untereinheit besitzt eine SH2-Domäne und kann so an spezifische Phosphotyrosinreste aktivierter Rezeptortyrosinkinasen binden [62, 78]. Dadurch gelangt die katalytische Untereinheit der PI3K in unmittelbare Nähe der Plasmamembran. In der Membran befinden sich Phosphoinosite, welche von der PI3K an Position 3 des Inositolringes phosphoryliert werden. Somit entstehen Phosphatidylinositol-Verbindungen, die als intrazelluläre Botenstoffe fungieren. Zu diesen second messengers gehören Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P₂) und Phosphatidylinositol-3, 4, 5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) [13, 62, 78, 81]. Nachgeschaltete Signalproteine mit einer Pleckstrin-homologen (PH) Domäne gelangen durch direkte Bindung an Phosphatidylinositol-Verbindungen in Membrannähe. Zu diesen Effektorproteinen der PI3K zählen Phospholipasen, Nukleotid-Austausch-Faktoren sowie die Proteinkinasen PDK-1 und Akt/PKB.

1.4.3 PDK-1 und Akt/Proteinkinase B (PKB)

Die humane Akt-Familie besteht aus drei Genen: Akt 1, Akt 2 und Akt 3. Die zugehörigen Proteine sind aus einer Pleckstrin-homologen (PH) Domäne, einer Kinasedomäne und einer regulatorischen Domäne aufgebaut [18, 58]. Es handelt sich um Serin-Threonin-Kinasen, die auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet werden. Phosphatidylinositol-Verbindungen dienen als Kopplungsstelle für „phosphatidyl-dependent kinase-1“ (PDK-1) und Akt an der Plasmamembran. Dabei wurde gezeigt, dass PtdIns(3,4)P₂ die einzige Phosphatidylinositol-Verbindung ist, die PKB aktivieren kann [18]. Durch Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung der Membran-assoziierten PDK-1. Daraufhin wird Akt durch die PDK-1 und -2 zweifach an Serinrest 473 und Threoninrest 308 phosphoryliert und erhält so seine katalytische Aktivität [13, 62, 78]. Daneben gibt es aber auch PDK- und PI3K-unabhängige Wege zur Aktivierung von Akt [58, 78]. Außer durch Wachstumsfaktoren wird Akt auch durch Stressstimuli, wie Hitzeschock, Hypoxie oder Wasserstoffperoxid aktiviert [10, 13]. Nach Aktivierung verlässt Akt die Plasmamembran, um intrazelluläre Substrate zu phosphorylieren. Diese Substrate sind sehr vielfältig und stellen vor allem Apoptose-regulierende Moleküle dar, die zu einer Unterdrückung des programmierten Zelltods führen [62, 78, 82]. Besondere Einflüsse hat die Aktivierung von Akt auch auf den Metabolismus und das Größenwachstum von Zellen [58].

1.4.4 mTOR („mammalian target of rapamycin“)

Ein wichtiges Substrat in diesem Zusammenhang ist der Rapamycin-sensitive Faktor mTOR („mammalian target of rapamycin“). Hierbei handelt es sich um eine Serin-Threonin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 289kDa. Sie besteht aus einer Kinase-Domäne sowie einer FRB (FKBP-rapamycin binding)-Domäne, die als Bindungsstelle für Rapamycin dient [52, 66, 75]. Weiterhin besitzt sie zwei Blöcke sich ständig wiederholender HEAT-Motive, die wahrscheinlich für Interaktionen mit verschiedenen Proteinen verantwortlich sind. Von besonderer Bedeutung ist die Verbindung von mTOR mit Raptor zum mTOR-Komplex 1 (mTORC1) und mit Rictor zum mTOR-Komplex 2 (mTORC2). Während mTORC1 durch Rapamycin umfassend inhibierbar ist, scheint lediglich die Neubildung von mTORC2 Rapamycin-sensibel zu sein. Bereits formiertes mTORC2 wird nicht von Rapamycin beeinflusst [51].

Die Proteinkinase mTOR ist in ein Netzwerk aus verschiedenen Signalkaskaden eingebunden und dient als zentrale Kontrollstation zellulären Wachstums. Sie integriert Informationen über die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Signale von Wachstumsfaktoren und übt ihren Einfluss über die Steuerung von Initiation und Elongation der Proteinbiosynthese aus [47, 68, 75]. Außerdem balanciert sie die anaerobe Energiegewinnung mit der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien aus. Diese Aufgaben werden ebenso wie ein Feedback auf Akt über mTORC1 wahrgenommen [82]. Über mTORC2 ist sie an der Organisation des Zellzyklus-abhängigen Aktinzytoskeletts beteiligt [51].

1.4.5 p70 ribosomale S6 Kinase (p70S6K)

Die p70S6K ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die über eine Phosphorylierung des S6-Proteins der 40S-ribosomalen Untereinheit und eine Aktivierung des Translations-Initiationsfaktors eIF4B eine gesteigerte Translation spezifischer mRNA [42, 68] bewirkt und so Zellwachstum und Zellzyklusprogression beeinflusst [62]. Sie wird in erster Linie direkt von mTOR durch Phosphorylierung an Threonin 389 aktiviert, kann aber auch unabhängig von mTOR direkt von PDK-1 an Threonin 229 phosphoryliert und damit aktiviert werden [62].

Auch die extrazellulären Signal-bezogenen Kinasen (ERK) können die p70S6K aktivieren. Das geschieht durch Phosphorylierung an Threonin 421 und Serin 424. Sie gehören zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) [62, 78]. Die MAPK werden in drei große Gruppen eingeteilt: p38MAPK, JNK und ERK [7]. Sie werden außer durch mitogene Signale wie Wachstumsfaktoren auch durch umweltbedingten Stress, Wasserstoffperoxid oder UV-Licht aktiviert.

Zur Analyse von Signaltransduktionsprozessen über die PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Kaskade stehen spezifische Inhibitoren einzelner Signaltransduktionselemente zur Verfügung. In der hier beschriebenen Studie wurden zwei der Hauptkomponenten, die PI3K und mTOR, mit ihren spezifischen Inhibitoren LY294002 und Rapamycin einzeln oder kombiniert bei unterschiedlichen Konzentrationen blockiert. Außerdem wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt, welches als Aktivator dieses Signalwegs angesehen werden kann. Einen Überblick gibt Abbildung 2.

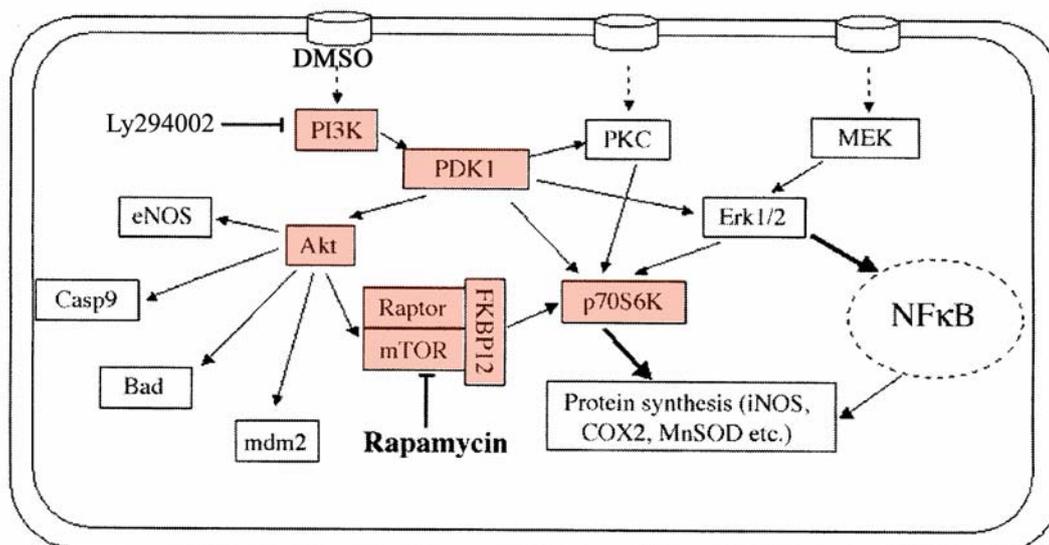


Abb. 2: Schematische Darstellung der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade zur glattmuskulären Differenzierung; Darstellung der Angriffspunkte von DMSO, LY294002 und Rapamycin

1.5 Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von Dimethylsulfoxid (DMSO), LY294002 und Rapamycin

1.5.1 Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von Dimethylsulfoxid (DMSO)

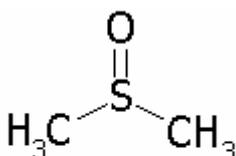


Abb. 3: Strukturformel von Dimethylsulfoxid (DMSO)

DMSO ist ein in der Biochemie, Pharmakologie und Industrie weit verbreitetes organisches Lösungsmittel [2, 54]. Es gehört zur Gruppe der Sulfoxide und wird technisch aus Dimethylsulfid ($\text{H}_3\text{C-S-CH}_3$) durch katalytische Oxidation mit Distickstofftetroxid (N_2O_4) oder Sauerstoff-Distickstofftetroxid-Gemischen hergestellt.

DMSO ist eine farblose Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch, die als sogenannter „Penetrationsverstärker“ fungiert. In DMSO gelöste Substanzen können leicht in die Haut eindringen und somit vom Organismus resorbiert werden. In der Pharmazie wird es daher als Bestandteil von Salben verwendet. DMSO hat außerdem antiphlogistische Eigenschaften. Gleichzeitig wirkt es bei äußerlicher, lokaler Applikation analgetisch. Daher ist es zur äußerlichen Anwendung bei rheumatischen Beschwerden und Sportverletzungen in einigen Handelspräparaten wie Rheumabene® oder Dolobene Gel® enthalten. Weiterhin werden lokalanästhetische, vasodilatatorische sowie geringe bakteriostatische und fungistatische Wirkungen diskutiert. Eine mutagene oder kanzerogene Wirkung wurde bisher nicht festgestellt.

Darüber hinaus wird es in der Zellkultur als „Gefrierschutzmittel“ bei der Kryokonservierung von Zellen eingesetzt, da es in wässrigen Systemen die Bildung von Eiskristallen verhindert und so den zellulären Kryokonservierungsschaden reduziert.

Die genaue Wirkungsweise von DMSO auf molekularer Ebene in Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund der chemischen Eigenschaften wird eine Beeinflussung der Membranintegrität diskutiert, aber auch die Induktion verschiedener Mediatoren sowie eine Aktivierung der PI3K [24, 44].

1.5.2 Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von LY294002

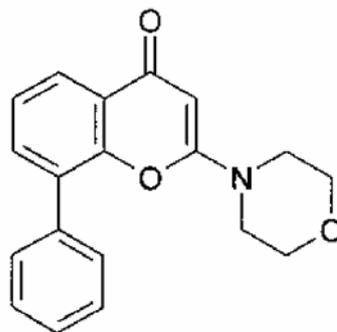


Abb. 4: Strukturformel von LY294002

LY294002 ist ein spezifischer, kompetitiver Inhibitor der PI3K. Es handelt sich um eine synthetische Substanz, die speziell für diesen Zweck entwickelt wurde. Die chemische Struktur basiert auf dem Flavonoid Quercetin. Es weist ein breites Einsatzgebiet auf und wird am häufigsten in der Zellbiologie zu Studien der Signaltransduktion in Zellsystemen eingesetzt. Der Wirkmechanismus beruht auf einer reversiblen Bindung an der ATP-

Bindungsstelle der PI3K [15, 85]. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung im katalytisch aktiven Zentrum der PI3K. LY294002 geht dabei genau wie ATP Wasserstoffbrückenbindungen mit der ATP-Bindungstasche ein. Allerdings weist es eine höhere Affinität zur Bindungsstelle als ATP selbst auf [65, 87].

LY294002 wirkt spezifisch an der PI3K und hat keine bedeutsamen inhibitorischen Effekte auf andere ATP-abhängige Enzyme, wie Phosphatidylinositol-4-Kinasen, MAPK, S6K, PKA oder PKC. Andere Proteinkinase-Inhibitoren wie Quercetin, Myricetin oder Staurosporine weisen ein deutlich breiteres Spektrum auf [87]. Sie inhibieren verschiedene Tyrosin- sowie Serin-Threonin-Kinasen und sind somit wenig für eine genaue Untersuchung der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade geeignet. LY294002 wurde bisher nur in experimentellen Systemen verwendet, eine klinische Prüfung fand noch nicht statt [58].

1.5.3 Chemische und zellphysiologische Eigenschaften von Rapamycin (Sirolimus)

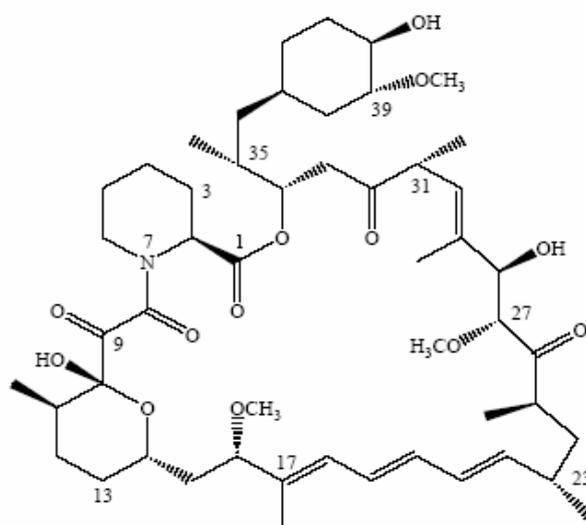


Abb. 5: Strukturformel von Rapamycin

Rapamycin wurde erstmals Mitte der 70er Jahre aus Erdproben der Osterinsel (Rapanui) isoliert. Es handelt sich um ein Fermentationsprodukt der Actinomyces-Art *Streptomyces hygroscopicus*. Nach seiner chemischen Struktur ist Rapamycin ein hydrophobes, 31-gliedriges Makrolid-Antibiotikum mit der Summenformel $C_{51}H_{79}NO_{13}$ [83]. Zunächst war die Substanz unter dem Namen Rapamycin® als Fungizid von der

Pharmaindustrie entwickelt worden. Neben der antifungalen Wirkung wurden jedoch auch schwere immunsupprimierende Effekte beobachtet, so dass die Entwicklung vorerst eingestellt wurde [52]. Erst bei Markteinführung des strukturverwandten Tacrolimus (Prograf®) wurde Rapamycin zur Abstoßungsprophylaxe transplantierte solider Organe wieder aufgenommen. Da es selbst nicht nephrotoxisch ist, wird es häufig bei Patienten mit Nierenschädigung durch nephrotoxische Immunsuppressiva wie Calcineurininhibitoren eingesetzt.

Nach Aufnahme in die Zelle bindet Rapamycin an das Immunophilin FKBP-12 (FK506-bindendes Protein-12). Dieser Komplex inhibiert die Proteinkinase mTOR, die ein zentrales Element im PI3-Kinase/Akt-Signalweg darstellt [9, 52, 66, 83]. Hierdurch kommt es zu einem Arrest der Zelle beim Übergang von der G1- in die S-Phase des Replikationszyklus und damit zu einer Hemmung der Proliferation. Seine immunsuppressive Wirkung entfaltet Rapamycin durch eine Hemmung der Interleukin-2 (IL-2) vermittelten klonalen Expansion aktivierter T-Lymphozyten [9]. Weiterhin reguliert mTOR über die PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade viele zelluläre Funktionen wie Proteinsynthese und Wachstum [52, 83].

1.6 Herleitung der Aufgabenstellung

Wegen der steigenden kardiovaskulären Morbidität und Mortalität in einer immer älter werdenden Gesellschaft sind neue therapeutische Ansätze für Herz-Kreislaufkrankungen dringend erforderlich. Als gemeinsame Endstrecke von Gefäßschäden unterschiedlicher Art, seien sie durch mechanische Belastung, metabolische Störungen oder primär inflammatorische Prozesse hervorgerufen, findet sich im Organismus eine progrediente Einengung des Gefäßlumens durch neointimale Zellen, die glatten Gefäßmuskelzellen ähneln. Daher sind therapeutische Strategien, die auf diese universelle „Fehlheilung“ vaskulärer Läsionen abzielen, besonders vielversprechend.

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass an der Neointimabildung nicht nur lokale glatte Gefäßmuskelzellen beteiligt sind, sondern auch zirkulierende Vorläuferzellen unter anderem aus dem Knochenmark hierzu in unterschiedlichem Ausmaß beitragen können. Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark sind hierfür gute Kandidatenzellen, da eine glattmuskuläre Differenzierung aufgrund ihrer Abstammung aus dem Mesoderm nahe liegt und die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen in andere Bindegewebszelllinien wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten gut bekannt ist. Außerdem bieten diese Zellen die Perspektive einer Zell- oder Gentherapie, da sie im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen aus dem adulten Organismus leicht durch eine Knochenmarkpunktion zu gewinnen sind, sich in der Zellkultur gut expandieren lassen und keine Neigung zu maligner Entartung zeigen. Nicht zuletzt sind die ethischen Bedenken zum Einsatz dieser Zellen wesentlich weniger schwerwiegend als bei embryonalen Stammzellen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das glattmuskuläre Differenzierungspotenzial humaner, adulter MSC aus dem Knochenmark zu charakterisieren und die hierbei beteiligten Signaltransduktionswege aufzudecken. Die hieraus resultierenden Erkenntnisse können Ausgangspunkt für pharmakologische Interventionen sein, die darauf abzielen, eine fehlgeleitete Reparatur vaskulärer Schäden durch zirkulierende MSC zu verhindern und stattdessen diese Zellen als endogene Regeneratoren in geschädigten Gefäßen einzusetzen. Darüber hinaus können sie wichtige Hinweise für den Einsatz humaner MSC zur Regeneration von Geweben, wie zum Beispiel bei Herzklappen [37] oder als Vehikel in der Gentherapie [48, 69, 88] liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Produkt

- Accu-Jet
- Brutschrank Hera cell
- Elektrophorese-Kammer
- ELISA-Reader
- Entwicklerkassette Hypercassette™
- Gefrierschrank (-80°C)
- Kühlschranks-Kombination (4°C; -20°C)
- Mikropipetten
- Mikroskop
- Neubauer-Zählkammer
- Schüttler IKA VIBRAX VXR
- Sterilbank Hera safe
- Taumelrollenmischgerät
- Thermomixer compact
- Tischzentrifuge 5417 R
- Tischzentrifuge Megafuge 2.0 R
- Waagen (5g–6100g; 10mg–220g)
- Western-blot-Kammer Novex Mini-Cell

Hersteller

- Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Heraeus, Hanau, Deutschland
- Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA
- Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Liebherr, Deizisau, Schweiz
- Liebherr, Deizisau, Schweiz
- Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Leica, Wetzlar, Deutschland
- Merck, Darmstadt, Deutschland
- Merck, Darmstadt, Deutschland
- Heraeus, Hanau, Deutschland
- Merck, Darmstadt, Deutschland
- Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Heraeus, Hanau, Deutschland
- Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt

- Blotting-Schwämme

Hersteller

- Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

- Chamber Slides	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
- Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Einwegkanülen und –spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Gel-Blotting-Papiere	Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Hybond-ECl-Nitrocellulose-Membranen	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Kodak Biomax Light Film	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Microtest™ Zellkulturplatte	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Mikropipettenspitzen (0,5–20µl; 2–200µl; 100–5000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pasteurplastpipetten	Merck, Darmstadt, Deutschland
- PVDF-Membran	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Serologische Pipetten (5ml; 10ml; 25ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Zellkulturschaber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
- Zellkulturschalen (100x20mm; 60x15mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz Deutschland
- Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg,

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
- Bicin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- Bis-Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
- Complete - Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
- DAPI	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- DC Protein Assay	BioRad, München, Deutschland
- DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland

- DMSO	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- ECL-Reagenzien Detection Reagent 1+2	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
- FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
- Ficoll-Paque™ Plus	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
- β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Glycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
- Größenmarker Prestained See Blue	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Kodak Readymatic Entwicklerlösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Kodak Readymatic Fixierbad	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- LY294002	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- β-Merkaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
- MOPS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
- NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
- NDS	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- NuPAGE LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- NuPAGE Novex Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- NuPAGE Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
- Penicillin – Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
- Rapamycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- SDS	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5.2 Wachstumsmedium

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
100ml FCS	20%
5ml L-Glutamin	2mmol/l
5ml Penicillin/Streptomycin	100U/ml Penicillin/ 100µg/ml Streptomycin
500ml DMEM	

2.1.6 Lösungen und Puffer

2.1.6.1 Blockpuffer

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
5g Magermilchpulver auf 100ml mit TBST auffüllen	5%

2.1.6.2 Laemmli-Puffer

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
100mg Bromphenolblau	14,4mM
3,5ml Glycerin	3,5%
1,5g SDS	1,5%
3,2ml Tris-HCl (1M; pH=6,8)	264mM
2,5ml β-ME auf 100ml mit dest. H ₂ O auffüllen	2,5%

2.1.6.3 Lysis-Puffer (pH = 7,4)

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
5ml Tris-HCl (1M)	50mM
1ml SDS (10%)	0,1%
0.5ml Triton X-100 auf 100ml mit dest. H ₂ O auffüllen	0,5%

2.1.6.4 Lysis-Puffer-Complete

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
40µl Protease-Inhibitoren Complete mini (25x)	1x
20µl Phosphatase-Inhibitor NaF	10mM
10µl Phosphatase-Inhibitor Na ₃ VO ₄	1mM
10µl Phosphatase-Inhibitor β-GP	10mM
1ml Lysis-Puffer	

2.1.6.5 20x MOPS-Puffer

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration (1x)</i>
104,6g MOPS	50mM
60,6g Tris Base	50mM
10g SDS	0,1%
3g EDTA	1mM
auf 500ml mit dest. H ₂ O auffüllen	

2.1.6.6 Strip-Puffer

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
6,25ml Tris-HCl (1M)	62,5mM; pH=6,8
20ml SDS (10%)	2%
700µl β-ME	0,1M
auf 100ml mit dest. H ₂ O auffüllen	

2.1.6.7 20x Transferpuffer-Stammlösung

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration (1x)</i>
10,2g Bicine	25mM
13,1g Bis-Tris	25mM
0,75g EDTA	1mM
auf 125ml mit dest. H ₂ O auffüllen	

2.1.6.8 1x Transferpuffer

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
25ml Transfer-Puffer (20x)	1x
100ml Methanol	20%
0,5ml Antioxidant	0,1%
auf 500ml mit dest. H ₂ O auffüllen	

2.1.6.9 10x Waschpuffer-Stammlösung/ TBS (pH=7,5)

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration (1x)</i>
160g NaCl	137mM
43,4g Tris Base	50mM
auf 2000ml mit dest. H ₂ O auffüllen	

2.1.6.10 1x Waschpuffer/TBST

<i>Substanz</i>	<i>Endkonzentration</i>
100ml Waschpuffer-Stammlösung/TBS (10x)	1x
1ml Tween 20	0,1%
auf 1000ml mit dest. H ₂ O auffüllen	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zur Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen wurde eine Knochenmarkpunktion am Beckenkamm durchgeführt. Das Patientenkollektiv bestand aus erwachsenen Spendern zwischen 24 und 79 Jahren, bei denen eine diagnostische Punktion wegen des Verdachts auf eine nicht-maligne Erkrankung des Knochenmarks erfolgte.

Hierbei wurden ca. 10ml Blut aus dem Beckenkamm aspiriert und in ein Falcon überführt. Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und gut gemischt. Anschließend wurde es vorsichtig über 10ml Ficoll geschichtet und 30 Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch wurden die Bestandteile nach ihrem spezifischen Gewicht aufgetrennt. Man konnte vier verschiedene Schichten unterscheiden: Auf dem Boden setzten sich Erythrozyten und Granulozyten ab. Die nächste Schicht wurde von Ficoll gebildet. Anschließend folgte ein Zellring aus mononukleären Zellen. Dazu gehören Monozyten, Lymphozyten und mesenchymale Stammzellen. Die oberste Schicht bestand aus PBS, Serum und Thrombozyten.

Nun wurde vorsichtig die Schicht aus mononukleären Zellen abgenommen, in ein zweites Falcon überführt und einmal mit 10ml PBS gewaschen. Dafür wurde das Gemisch 15 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute mit Bremse zentrifugiert.

Vorher wurden zur Bestimmung der Zellzahl 10 μ l der Zellsuspension für die Neubauer-Zählkammer abgenommen. Abschließend erfolgte die Resuspension der pelletierten Zellen in Wachstumsmedium und die Aufteilung auf 100mm-Zellkulturschalen mit einer Zelldichte von 7-12x10⁶ Zellen pro Schale.

Nach 24 Stunden waren einige der isolierten Zellen auf dem Boden der Schalen angewachsen, und es erfolgten zwei Waschschrte mit PBS, um nicht-adhärente Zellen zu entfernen. Ein Mediumwechsel wurde alle drei bis vier Tage durchgeführt. Nach ca. 3 Wochen waren bereits erste Zellkolonien sichtbar. Die Zellen imponierten durch eine flach ausgebreitete, unregelmäßige Zellform mit prominenten stress fibers. Nach ca. 6 Wochen zeigte sich eine Konfluenz der Zellen von 70 bis 80% der Zellkulturschalen. Nun erfolgte die Passagierung der Zellen auf neue Schalen. Dafür wurde das Medium abgenommen und jede Schale zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die

Zellen sechs Minuten bei 37°C mit 5ml Trypsin (0,25%) in EDTA (1mmol/l) inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde FCS-haltiges Medium dazugegeben, um die Reaktion mit Trypsin zu inhibieren. Aus dem Trypsin-Medium-Zell-Gemisch wurden erneut 10µl entnommen, um die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer zu bestimmen. Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro 100mm-Zellkulturschale. Die Zellen wurden weiterhin bei 37°C und 5% CO₂ mit Wachstumsmedium inkubiert und konnten ab der zweiten Passage für Experimente genutzt werden, da sie nun eine annähernd homogene Zellpopulation mesenchymaler Stammzellen darstellten.

2.2.2 Immunfluoreszenz

Die mesenchymalen Stammzellen wurden in Chamber Slides mit 5000 Zellen pro Kammer im Brutschrank inkubiert. Es wurden Experimente für einen Tag mit Wachstumsmedium und für acht Tage mit Experimentiermedium angesetzt. Beim Achttagsexperiment erfolgte nach vier Tagen ein Mediumwechsel. Während der Inkubationsphase wurde dem Medium DMSO in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 0; 0,5; 1,25 und 2,5%.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die mesenchymalen Stammzellen für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend für 60 Minuten mit 0,2% Triton X-100 und 3% NDS in TBS behandelt. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung der Zellen mit gleichzeitiger Blockierung nicht-spezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch NDS. Danach wurden die Slides bei Raumtemperatur für 60 Minuten mit dem Primär-Antikörper inkubiert, der 1:50 verdünnt in 0,2% Triton X-100, 3% NDS und TBS aufgetragen wurde. Als Negativ-Kontrolle wurde 0,2% Triton X-100, 3% NDS und TBS dazugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Zellen bei Dunkelheit für 60 Minuten mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Verdünnung des Sekundär-Antikörpers Alexa Fluor 488 DaM erfolgte 1:100 in 0,2% Triton X-100, 3% NDS und TBS. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TBS. Abschließend wurden die Slides für 30 Minuten mit DAPI (Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) gefärbt und mit einem Deckgläschen versehen.

Zur Auswertung wurden mindestens acht Photos pro Antigen angefertigt. Die quantitative Auswertung von Antigen-exprimierenden Zellen erfolgte durch Auszählen

von fluoreszenz-positiven und –negativen Zellen, welches durch die DAPI-Kernfärbung möglich war.

2.2.3 Proteinextraktion

Nach Inkubation der Zellen für die in den Experimenten beschriebenen Zeiträume erfolgte die Proteinextraktion aus den Zellen zur weiterführenden Analyse mittels Western blot. Von den Zellkulturschalen wurde zuerst das Medium abgenommen. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit je 5ml PBS pro Schale. Dann wurden 100µl Lysis-Puffer-Complete pro Schale dazugegeben und gut verteilt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das gewonnene Lysat wurde durch wiederholtes Aufnehmen mit einer Insulinspritze homogenisiert und 10 Minuten bei 4°C und 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um im Western blot äquivalente Proteinmengen pro Spur auftragen zu können, wurde bei jeder Probe die Proteinbestimmung nach BRADFORD durchgeführt. Dabei bindet der Farbstoff Commassie-Blau an basische und aromatische Aminosäurereste. Die entstehenden Farbintensitäten sind von der Höhe der Proteinkonzentration abhängig und lassen sich photometrisch bestimmen.

Die Proteinmessung wurde auf einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 5µl des Leerwerts, der Standards und der Proben aufgetragen. Der Leerwert diente dem Hintergrund-Abgleich und wurde als Doppelbestimmung aus Lysis-Puffer aufgetragen. Auch die Standards wurden als Doppelbestimmungen in fünf verschiedenen Konzentrationen pipettiert. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe aus BSA und Lysis-Puffer-Complete in folgenden Konzentrationen angesetzt: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; und 2,0mg/ml. Bei den Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Proteinbestimmung wurde das DC-Protein-Assay-System verwendet. Zu Leerwert, Standards und Proben wurden zuerst jeweils 25µl von Reagens A und anschließend 200µl von Reagens B dazugegeben. Danach wurde die Platte für 15 Minuten auf dem

Schüttler inkubiert. Abschließend erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 750nm die Absorptionsmessung mit Bestimmung der Proteinkonzentrationen anhand einer Eichkurve der Proteinstandards.

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen. Hierfür kamen 4-12%-NuPAGE® Bis-Tris-Gele in zwei verschiedenen Systemen zur Anwendung. Nach der Proteinbestimmung wurden jeweils gleiche Mengen an Protein pro Spur aufgetragen. Dabei wurde der Proteinprobe entweder LDS oder Laemmli-Puffer zugesetzt. Sie enthalten das stark anionisch wirkende Detergens SDS, das an kationische Reste der Proteine bindet und ihnen eine negative Überschussladung verleiht. Die Eigenladung der Proteine kann jetzt bei der Elektrophorese vernachlässigt werden. Das Laufverhalten wird also ausschließlich von der Proteingröße bestimmt. Während der weiteren Probenvorbereitung wurde dem LDS-System Reducing Agent zugesetzt. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Dem Laemmli-System wurde β -Merkaptoethanol zugefügt. Daraufhin folgte ein 5-minütiges Erhitzen bei 99°C. Durch den Zusatz von Reduktionsmitteln sowie anschließendes Erhitzen wurden die Proteine vollständig denaturiert und dissoziiert.

Die innere Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer (1x) aufgefüllt und mit 500 μ l Antioxidant versetzt. Pro Gel wurden auf eine Spur 3 μ l des Proteinmarkers SeeBlue-Standard aufgetragen. Er diente zur Erkennung der molekularen Größen der detektierten Proteine. In die anderen Geltaschen wurden je 20 μ l Probengemisch aufgetragen. Nach Auffüllen der äußeren Kammer mit Laufpuffer (1x) wurde für 50 Minuten eine Gleichspannung von 200V angelegt. Nun wanderten die Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode.

2.2.6 Western blot

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine können elektrophoretisch weiter auf eine Membran übertragen werden (Blot). Dabei wurden im

LDS-System PVDF-Membranen und im Laemmli-System Nitrozellulose-Membranen verwendet. Anschließend konnten die geblotteten Proteine durch eine spezifische Antikörperreaktion nachgewiesen werden.

Dafür wurden Membran und Filterpapiere auf Gelgröße zugeschnitten und zusammen mit Blotting-Schwämmen in Transferpuffer (1x) äquilibriert. Die PVDF-Membranen wurden zuvor mit Methanol benetzt. Daraufhin erfolgte der Aufbau eines „Sandwichs“ im Nassblotverfahren. Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt und vorsichtig mit der Membran und einem zweiten Filterpapier bedeckt. Diese Schichtung wurde beidseits mit je zwei Lagen Schwämmen bedeckt, mit entsprechendem Druck in die Blotkassette eingesetzt und anschließend mit Transferpuffer (1x) bedeckt. Die äußere Kammer wurde zur Kühlung mit Wasser aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgte bei 30V und 90 Minuten für ein Gel. Bei zwei Gelen wurde 120 Minuten geblottet.

Nach dem Transfer wurden die Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer gelegt, um unspezifische Bindungsstellen für die nachfolgende Antikörperreaktion abzudecken. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper in 5ml Blockpuffer. Dafür wurden die Membranen zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Antikörpern gegen glattmuskuläre Markerproteine behandelt. Die Inkubation mit den phosphospezifischen Antikörpern erfolgte über Nacht.

Dann wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBST gewaschen. Nun folgte für eine Stunde in 5ml TBST die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war. Nach vier Waschschritten mit TBST und zwei Weiteren mit doppelt destilliertem Wasser erfolgte die Sichtbarmachung der Proteinbanden durch eine Chemolumineszenz-Reaktion (ECL-System). Bei Enzym-Antikörper-Konjugaten wird durch das Enzym eine Farb- oder Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert. Die Peroxidase katalysiert im hier verwendeten System die Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid, wodurch ein Lichtsignal generiert wird.

Dazu wurden die Membranen für zwei Minuten mit den ECL-Reagenzien inkubiert, die zuvor zu gleichen Teilen gemischt worden waren. Die Membranen wurden zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Entwicklerkassette gelegt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde im Dunkeln für 1 bis 15 Minuten ein Röntgenfilm eingelegt, der anschließend manuell entwickelt wurde.

Zur Auswertung der Western blots wurden die auf dem Röntgenfilm entwickelten Banden mit dem Programm Scan Wise gescannt. Anschließend erfolgte die densitometrische Auswertung der dargestellten Proteinbanden mit der Software Image

J. Dabei wurden alle Banden eines Blots auf die Bande des Null-Wertes des jeweiligen Experimentes bezogen, die auf den Wert 1,0 gesetzt wurde, um unterschiedliche Blots miteinander vergleichen zu können.

2.2.7 „Strippen“ der Western blots

Zum Entfernen der Antikörper von proteinbeladenen PVDF-Membranen wurde ein Gemisch aus SDS und β -Merkaptoethanol verwendet. Vorher wurde die Blotmembran nochmals in Methanol äquilibriert. Danach erfolgte für eine Stunde bei 70°C die Inkubation mit 10ml Strip-Puffer. Nach zwei 5-minütigen Waschschritten mit TBST wurde die Membran bei 4°C eine Stunde in Blockpuffer gelegt. Anschließend wurde die bereits beschriebene Inkubation mit einem Primär-Antikörper anderer Spezifität und dem entsprechenden Sekundär-Antikörper sowie die Detektion der Proteinbanden mittels Chemolumineszenz-Reaktion wiederholt.

2.2.8 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Dabei wurden die Mittelwerte der durchgeführten Experimente mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit dem Programm SPSS 13.0 (Leadtools Lead Technologys, Inc.) erstellt. Die statistisch signifikante Grenze wurde bei $p=0,05$ festgesetzt. Sollten Fehlerbalken nicht in der Graphik erscheinen, so liegen die Fehler innerhalb der Größe der Symbole.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie

3.1.1 Phänotypische Untersuchungen zur Expression glattmuskulärer Markerproteine durch mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark sind multipotente Zellen. Sie haben die Fähigkeit sich in verschiedene Zelltypen wie zum Beispiel Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu entwickeln. Grundlage dieser Arbeit ist die Hypothese, dass multipotente, mesenchymale Stammzellen auch in Richtung glatter Muskelzellen differenzieren können.

Um die Zellen unter basalen Bedingungen auf das Vorhandensein von Differenzierungsmarkern glatter Muskelzellen zu untersuchen, wurden sie unter Kulturbedingungen mit Wachstumsmedium inkubiert. Diesem Medium wurde 20% vorgetestetes FCS zugesetzt, um eine hohe Differenzierungskapazität in verschiedene Zelltypen zu gewährleisten. Unter diesen Bedingungen zeigten die Zellen einen Phänotyp, der dem glatter Muskelzellen ähnelte. Die mesenchymalen Stammzellen imponierten durch eine flache, unregelmäßige Zellform mit prominenten „stress fibers“ (Abb. 6). Stress fibers bestehen aus Aktin, Myosin, Tropomyosin und α -Aktinin und stellen das kontraktile Element des Zytoskeletts dar. Sie sind notwendig zur Herstellung der inneren Spannung einer Zelle und damit auch zur Aufrechterhaltung ihrer flächenhaft ausgebreiteten Struktur.

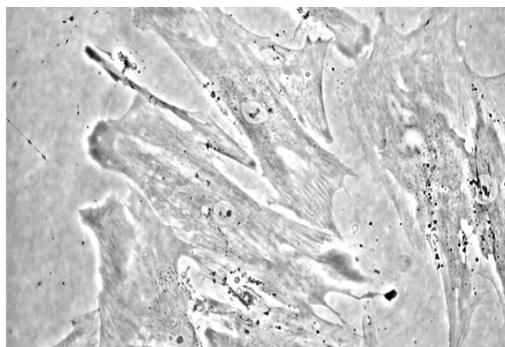


Abb. 6: Phasenkontrastbild mesenchymaler Stammzellen

Im Folgenden wurde der kontraktile Phänotyp dieser Zellen weiter untersucht. Dafür wurden Chamber slides mit 5000 Zellen pro Kammer für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach anschließender Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die Behandlung mit Antikörpern gegen verschiedene glattmuskuläre Markerproteine. Als Negativ-Kontrolle diente Maus-Serum. Abschließend wurden die Zellen mit DAPI gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

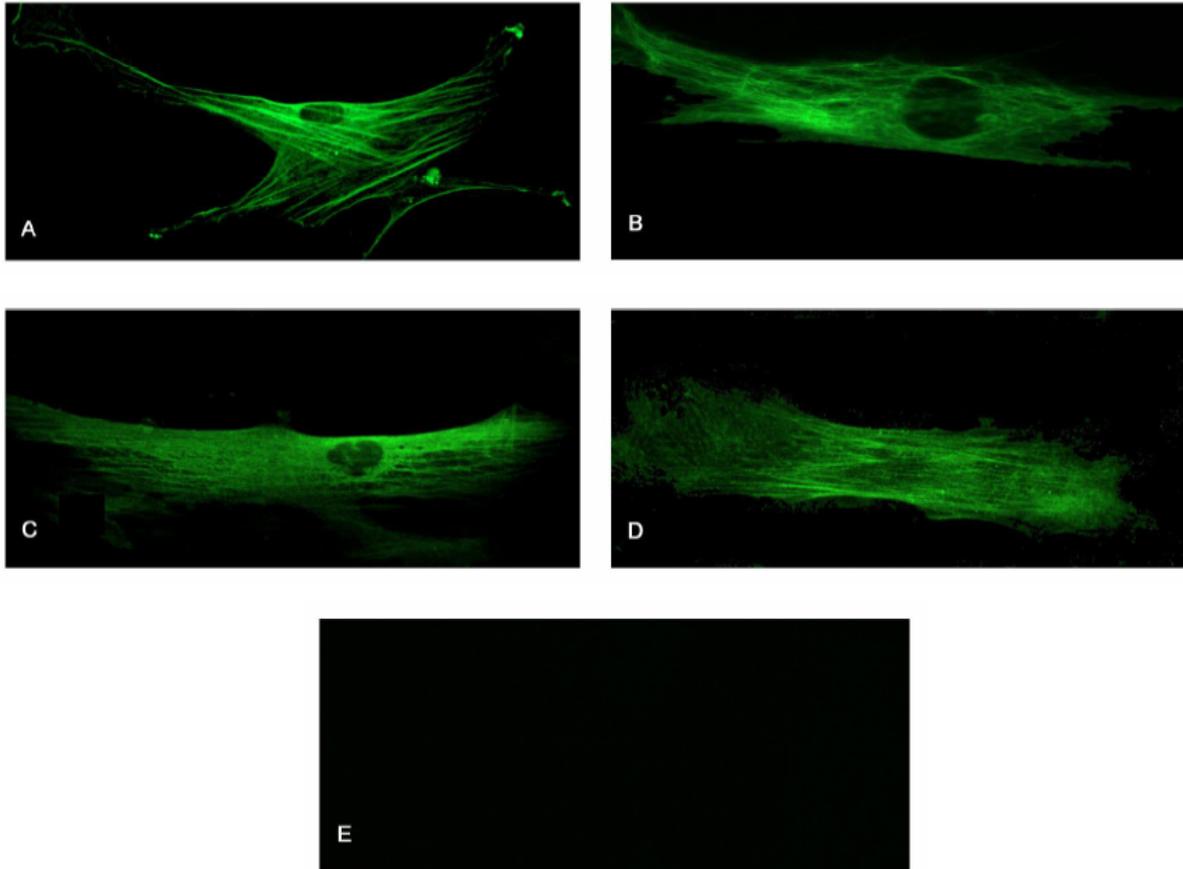


Abb. 7: Expression glattmuskulärer Markerproteine in mesenchymalen Stammzellen ; (A) α -SMA, (B) Desmin, (C) sm-Calponin, (D) MLCK, (E) Negativkontrolle

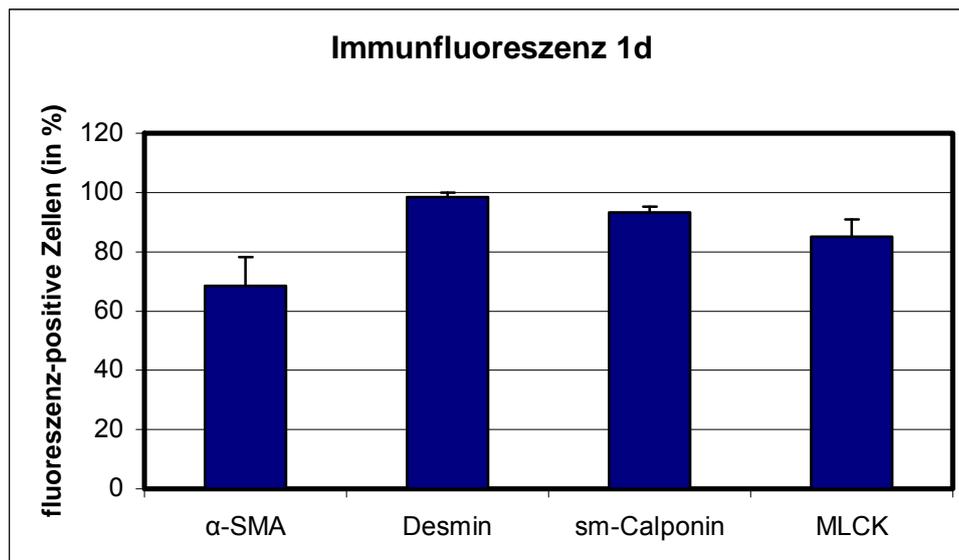


Abb. 8: Statistische Auswertung der Immunfluoreszenz-Analysen glattmuskulärer Markerproteine in mesenchymalen Stammzellen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten

Die Untersuchungen am Mikroskop haben bei α -SMA 68,5% und bei Desmin 98,5% fluoreszenz-positive Zellen gezeigt (Abb. 8). Während bei α -SMA die Anordnung in den Zellen entlang der stress fibers deutlich zu erkennen war, zeigte Desmin eine feine, eher netzartige Struktur (Abb. 7). Die Myosin-Leichtkettenkinase zeigte in den 85,1% fluoreszenz-positiven Zellen eine Anordnung, die der von α -SMA ähnlich war (Abb. 7 und 8). Glattmuskuläres Calponin wurde zu 93,3% in mesenchymalen Stammzellen exprimiert (Abb. 8). Damit konnte gezeigt werden, dass humane mesenchymale Stammzellen unter *in vitro*-Bedingungen, die multilineäres Differenzierungspotenzial gewährleisten, zu einem hohen Prozentsatz Markerproteine glatter Muskelzellen in charakteristischer Anordnung aufweisen.

3.1.2 Veränderungen der Zellmorphologie mesenchymaler Stammzellen durch DMSO

Durch Austesten verschiedener Substanzen, die bekanntermaßen Differenzierungsvorgänge in unterschiedlichen Zellen beeinflussen, wurde herausgefunden, dass DMSO die Morphologie von mesenchymalen Stammzellen verändern kann. Während die Zellen ohne DMSO flach ausgebreitet mit einer

unregelmäßigen Struktur und prominenten stress fibers waren, veränderten sie bei Zugabe von DMSO deutlich ihr Aussehen. Die Zellen wurden schlank, spindelförmig und es kam zu einer deutlichen Reduktion der stress fibers (Abb. 9). Diese Veränderungen der Zellmorphologie zeigten eine Dosisabhängigkeit und wurden von 0,5 bis 2,5% DMSO untersucht. Dazu wurden die Zellen in drei unabhängigen Experimenten für acht Tage mit den angegebenen DMSO-Konzentrationen im Brutschrank inkubiert. Nach 4 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Zur Darstellung dieser morphologischen Veränderungen wurden Aufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop gemacht.

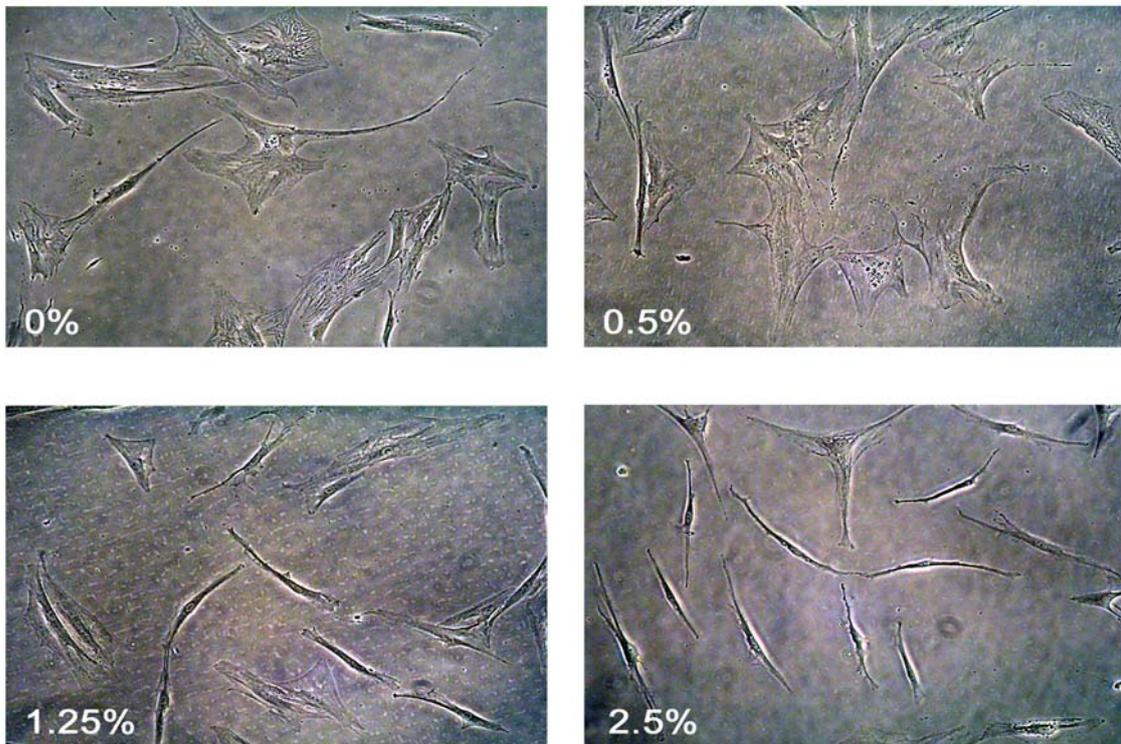


Abb. 9: Phasenkontrastbilder mesenchymaler Stammzellen bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen nach 8 Tagen Inkubationszeit

3.1.3 Immunfluoreszenz-Untersuchungen mesenchymaler Stammzellen nach Inkubation mit DMSO

Um zu untersuchen, ob die unter DMSO beobachteten morphologischen Veränderungen auch in der Expression und Lokalisation glattmuskulärer Markerproteine widergespiegelt werden, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für acht Tage mit den angegebenen DMSO-Konzentrationen inkubiert, fixiert, mit dem entsprechenden Antikörper und DAPI gefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Abb. 10).

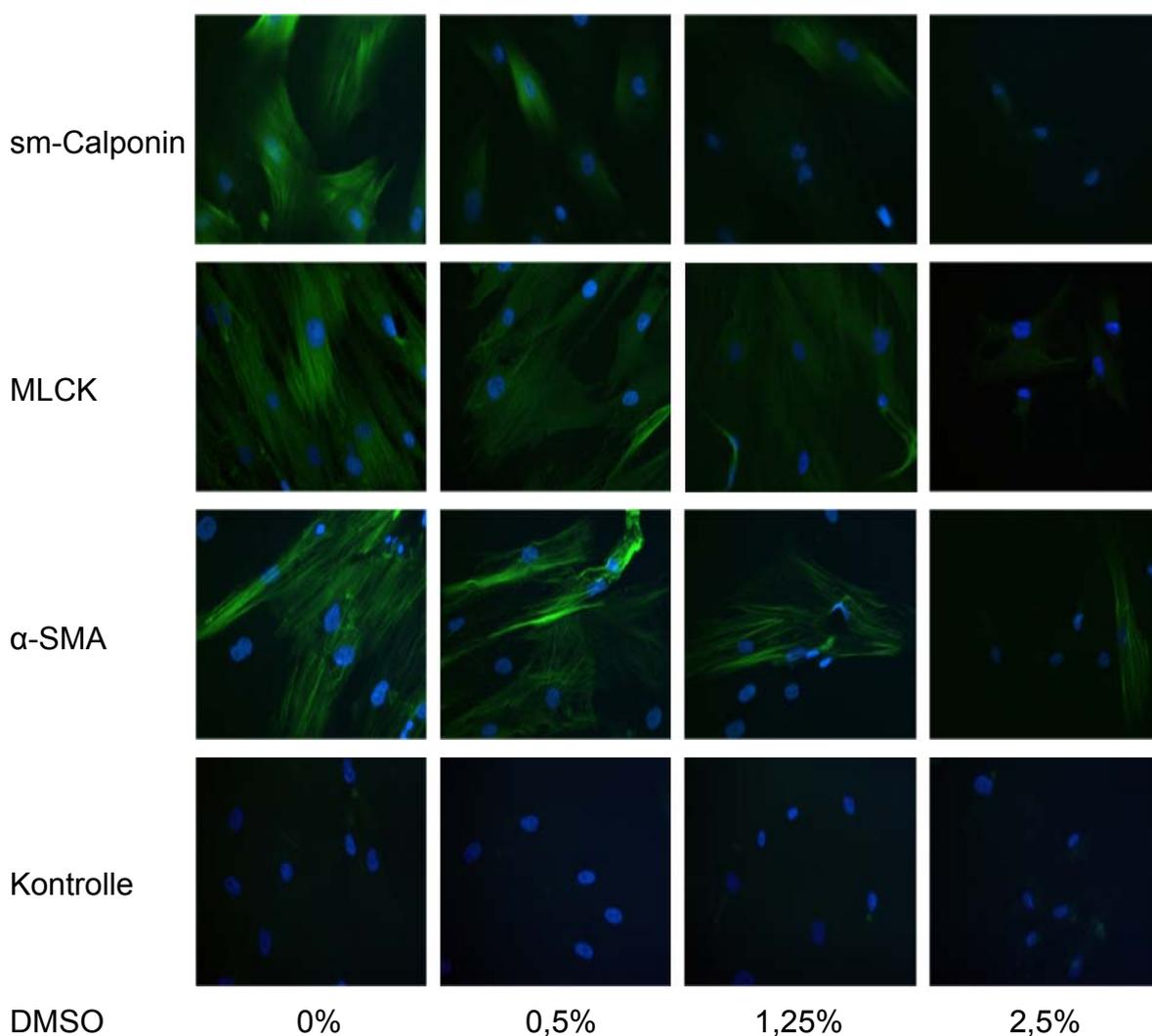


Abb. 10: Immunfluoreszenz-Analysen glattmuskulärer Markerproteine aus mesenchymalen Stammzellen nach Inkubation mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen über 8 Tage

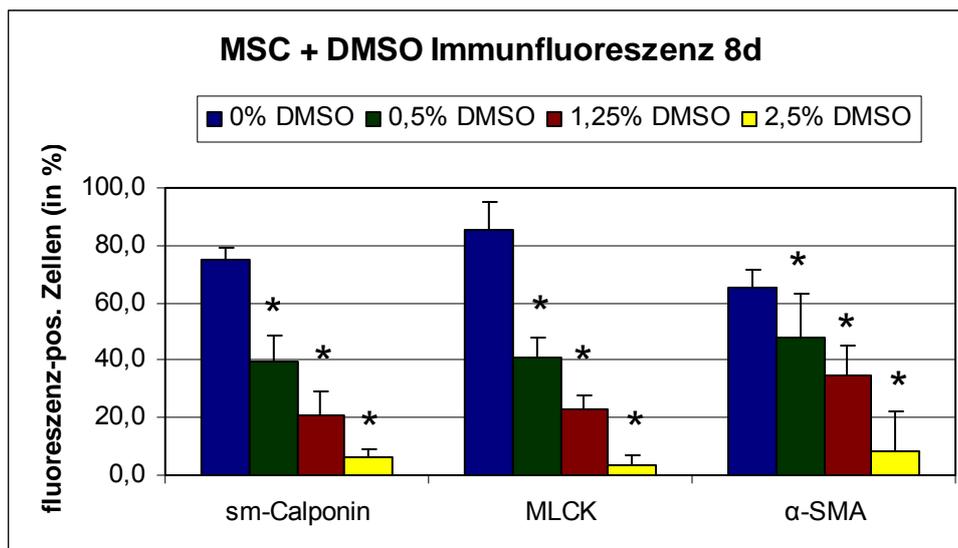


Abb. 11: Statistische Auswertung der Immunfluoreszenz-Analysen glattmuskulärer Markerproteine aus mesenchymalen Stammzellen nach Inkubation mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten; * $p < 0,05$ zu 0% DMSO

Von den Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop durch den mit DAPI gefärbten Zellkern identifiziert und die für die unterschiedlichen glattmuskulären Markerproteine fluoreszenz-positiven und –negativen Zellen durch Auszählen ermittelt und statistisch in Prozent dargestellt (Abb. 11). Hierbei zeigte sich eine deutliche Abnahme der für die Markerproteine positiven Zellen nach Behandlung mit DMSO. Ohne DMSO waren 75,3% aller Zellen positiv für sm-Calponin. In den verschiedenen DMSO-Konzentrationen wurden die sm-Calponin-positiven Zellen auf 39,6, 21,0 und 6,2% reduziert. Auch bei MLCK kam es zu einem deutlichen Abfall der fluoreszenz-positiven Zellen von 85,7 auf 41,3, 22,9 und 3,7%. Die Anzahl der α -SMA-exprimierenden Zellen hingegen sank von 65,0 auf 47,8, 34,9 und 16,7%.

Anhand dieser Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die nach Inkubation mesenchymaler Stammzellen mit DMSO beobachteten morphologischen Veränderungen in Abhängigkeit von der Konzentration mit einer deutlichen Abnahme der glattmuskulären Markerproteine an ihrer typischen intrazellulären Lokalisation einhergeht.

3.1.4 Veränderungen der Zellmorphologie mesenchymaler Stammzellen durch DMSO und LY294002

In den vorangegangenen Experimenten konnte demonstriert werden, dass DMSO in Abhängigkeit von der Dosis sowohl die Zellmorphologie als auch die Expression glattmuskulärer Markerproteine in mesenchymalen Stammzellen verändern kann. Es ist bekannt, dass DMSO je nach Zellsystem unterschiedliche Wirkungen entfaltet [54]. Bei noch nicht genau bekannter Wirkungsweise wird hierbei eine Schädigung der Membranintegrität sowie eine Aktivierung der PI3K diskutiert. Außerdem wurde gezeigt, dass der Differenzierungsgrad von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) maßgeblich über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg reguliert wird [8]. Daher stellten wir die Hypothese auf, dass die beobachteten Veränderungen der glattmuskulären Differenzierung von MSC ebenfalls über diesen Signalweg hervorgerufen werden. Um dies zu testen, wurden MSC mit DMSO und dem spezifischen Inhibitor der PI3K LY294002 koinkubiert.

Dazu wurden MSC für acht Tage mit 1,25% DMSO sowie 5 bzw. 15µM LY294002 inkubiert. Nach vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Zur Untersuchung der phänotypischen Veränderungen wurden anschließend Phasenkontrastaufnahmen angefertigt. Die Kontrolle wurde mit Experimentiermedium ohne Zusatz von DMSO oder LY294002 inkubiert. Diese Zellen zeigten die typische unregelmäßige Struktur mit prominenten stress fibers (Abb. 12). Bei Zugabe von 1,25% DMSO veränderten die mesenchymalen Stammzellen ihr charakteristisches Aussehen in der bereits beschriebenen Weise. Sie wurden schlank und spindelförmig. Außerdem kam es zu einer deutlichen Reduktion der stress fibers. Bei Koinkubation mit 1,25% DMSO und 5µM LY294002 zeigte sich eine partiell antagonistische Wirkung von LY294002. Die Zellen erschienen nicht mehr ganz so spindelförmig und zeigten einen Phänotyp ähnlich der Kontrolle. Diese Wirkung wurde durch Inkubation mit 1,25% DMSO und 15µM LY294002 noch verstärkt. Damit konnte gezeigt werden, dass LY294002 die durch DMSO hervorgerufenen morphologischen Veränderungen mesenchymaler Stammzellen zumindest partiell antagonisieren kann.

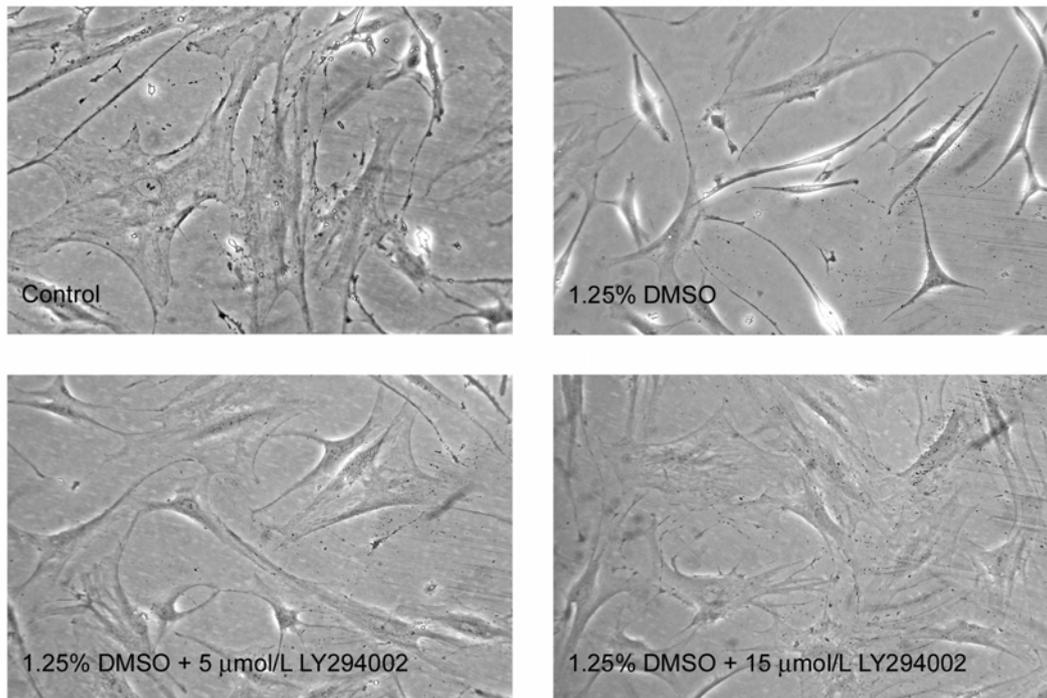


Abb. 12: Phasenkontrastbilder mesenchymaler Stammzellen bei Koinkubation mit DMSO und LY294002 über 8 Tage

3.2 Markerproteine für die glattmuskuläre Differenzierung

3.2.1 Wirkung von DMSO und LY294002

Es konnte gezeigt werden, dass LY294002 die durch DMSO induzierten morphologischen Veränderungen mesenchymaler Stammzellen zumindest partiell antagonisieren kann. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese Veränderungen des mikroskopischen Aspekts sich auch in Änderungen der Höhe der Expression glattmuskulärer Markerproteine widerspiegeln. Dazu wurden Zellen nur mit 1,25% DMSO sowie in Kombination mit 5 und 15µM LY294002 inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Experimentiermedium ohne Zusatz von DMSO oder LY294002 behandelt. Nach acht Tagen erfolgte die Proteinextraktion. Zur quantitativen Analyse der Veränderungen bei der Proteinexpression wurden Western blots mit Antikörpern gegen die glattmuskulären Markerproteine sm-Calponin, MLCK und α -SMA durchgeführt und die entstehenden Banden densitometrisch ausgewertet. Diese Werte wurden auf die Bande des Proteins α -Tubulin bezogen, das ubiquitär und unabhängig von äußeren

Einflüssen in annähernd gleicher Menge exprimiert wird und daher als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Elektrophoresegels verwendet werden kann. Der Kontrollwert diente dabei als Referenzwert und wurde auf 1,00 festgelegt.

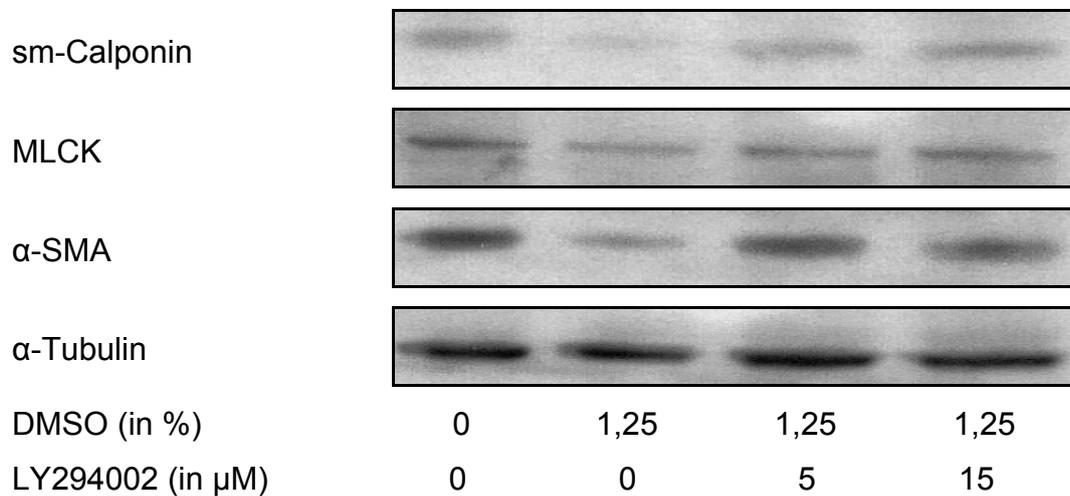


Abb. 13: Repräsentative Western blots von sm-Calponin (34kDa), MLCK (leichte Isoform; 130kDa), α -SMA (42kDa) und α -Tubulin (50kDa) zur Wirkung von LY294002 auf mesenchymale Stammzellen bei 1,25% DMSO nach 8 Tagen

In den abgebildeten Western-blot-Ausschnitten (Abb. 13) sieht man bei Zugabe von 1,25% DMSO eine starke Abnahme der Expression glattemuskulärer Markerproteine. Dieser Befund korrespondiert mit den unter 3.1.2 beschriebenen morphologischen Veränderungen und dem verminderten Nachweis dieser Proteine in der Immunfluoreszenz (siehe 3.1.3). Bei Koinkubation mit 5 μ M LY294002 ist diese Herabregulation deutlich weniger stark ausgeprägt und kann durch höhere Dosen von LY294002 (15 μ M) noch weiter reduziert werden.

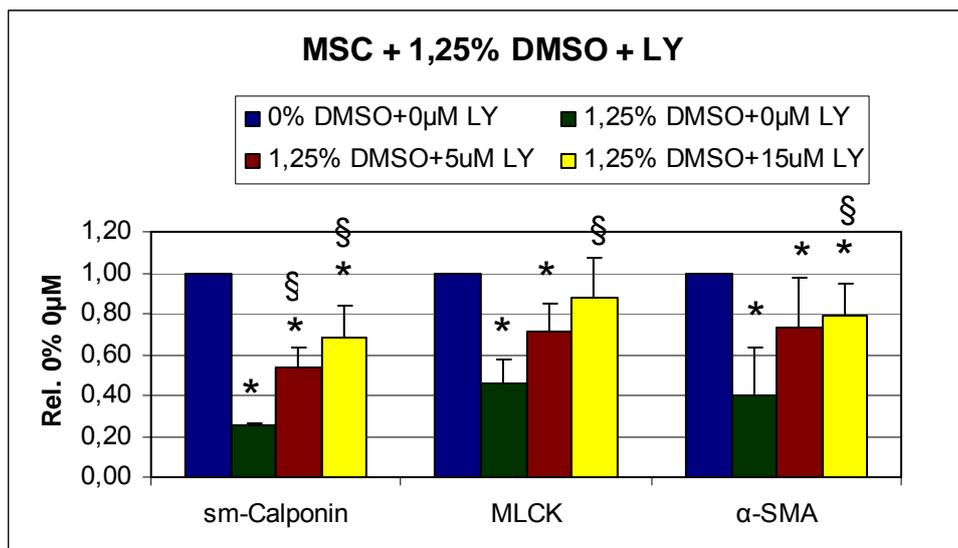


Abb. 14: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von LY294002 auf die Expression glattmuskulärer Markerproteine in mesenchymalen Stammzellen bei 1,25% DMSO nach 8 Tagen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten, * $p < 0,05$ zu 0% DMSO+0 μ M LY, § $p < 0,05$ zu 1,25% DMSO+0 μ M LY

Abschließend erfolgte die densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente (Abb. 14). Die Expression von glattmuskulärem Calponin sank bei Zugabe von 1,25% DMSO von 1,00 auf 0,25. Bei Koinkubation mit 5 und 15 μ M LY294002 war diese Herabregulation mit 0,54 und 0,68 deutlich weniger stark ausgeprägt. Bei der für glatte Muskelzellen charakteristischen leichten Isoform der MLCK veränderte sich die Höhe der Expression durch Zugabe von 1,25% DMSO von 1,00 auf 0,46. Auch hier zeigte sich bei Koinkubation mit LY294002 eine deutlich geringere Herabregulation der Proteinexpression von 0,71 und 0,88. Die α -SMA-Expression sank bei Inkubation mit 1,25% DMSO auf 0,40. Bei Koinkubation mit LY294002 wurde die Expression des glattmuskulären Markerproteins α -SMA lediglich auf 0,73 und 0,79 herabreguliert. Demnach wirkt die Hemmung der PI3K durch LY294002 sowohl in Bezug auf die Morphologie mesenchymaler Stammzellen als auch auf die Höhe der Expression der glattmuskulären Markerproteine sm-Calponin, MLCK und α -SMA dem DMSO-Effekt entgegen.

3.2.2 Wirkung von DMSO und Rapamycin

Die bisherigen Experimente legen nahe, dass DMSO durch Aktivierung der PI3K eine Herabregulation der Expression glattmuskulärer Markerproteine als Zeichen einer Dedifferenzierung mesenchymaler Stammzellen verursacht. Ein wichtiges Protein in der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade ist „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) [68, 75]. Das Makrolid Rapamycin inhibiert die Serin-Threonin-Kinase mTOR und fördert die glattmuskuläre Differenzierung von VSMC [7], welche unter Standard-Bedingungen dedifferenzieren. Im Folgenden soll untersucht werden, ob mTOR auch an Differenzierungsprozessen mesenchymaler Stammzellen in glatte Muskelzellen beteiligt ist.

Deshalb wurde in den nachfolgenden Experimenten die Wirkung von Rapamycin auf mesenchymale Stammzellen untersucht. Um herauszufinden, ob der mTOR-Inhibitor die dedifferenzierende Wirkung von DMSO auf MSC antagonisieren kann, wurden mesenchymale Stammzellen für acht Tage mit 1,25% DMSO alleine sowie DMSO und verschiedenen Rapamycin-Konzentrationen inkubiert. Zur weiteren Untersuchung wurden Western-blot-Analysen angefertigt.

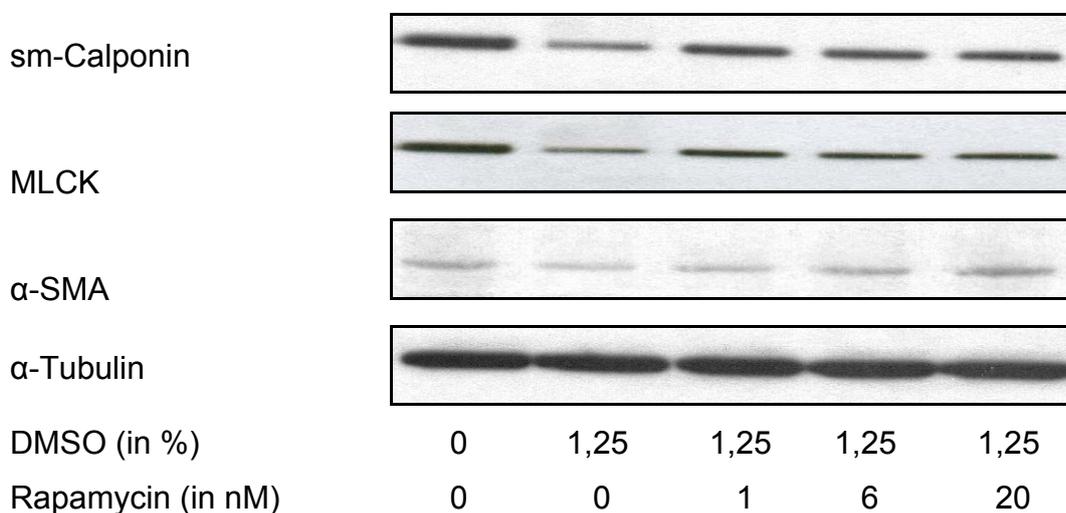


Abb. 15: Repräsentative Western blots von sm-Calponin (34kDa), MLCK (leichte Isoform; 130kDa), α-SMA (42kDa), und α-Tubulin (50kDa) zur Wirkung von Rapamycin auf mesenchymale Stammzellen bei 1,25% DMSO nach 8 Tagen

In den dargestellten Western blots (Abb. 15) wurde die Expression der Proteine sm-Calponin, MLCK und α -SMA untersucht. Bei Inkubation mesenchymaler Stammzellen mit 1,25% DMSO sieht man wie bereits unter 3.2.1 beschrieben eine deutliche Herabregulation in der Expression der dargestellten glattmuskulären Markerproteine. Die Expression des ubiquitär vorkommenden Proteins Tubulin, das als Kontrolle der Proteinbeladung des Elektrophoresegels diente, blieb unverändert. Bei Koinkubation mit 1,25% DMSO und verschiedenen Rapamycin-Konzentrationen zeigte sich eine partielle Antagonisierbarkeit der inhibierenden DMSO-Wirkung auf die Höhe der Expression glattmuskulärer Markerproteine in MSC.

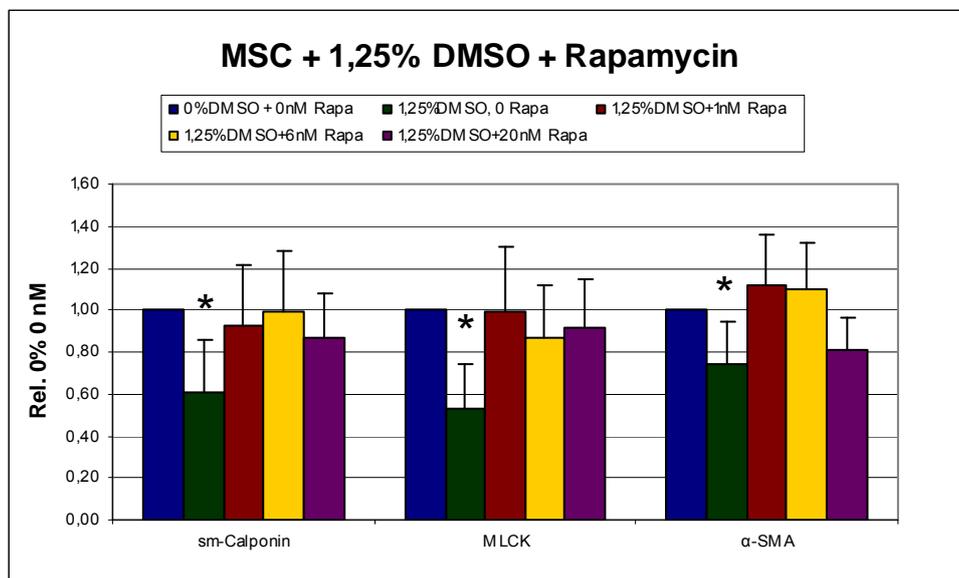


Abb. 16: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von Rapamycin auf die Expression glattmuskulärer Markerproteine in mesenchymalen Stammzellen bei 1,25% DMSO nach 8 Tagen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten; * $p < 0,05$ zu 0% DMSO+0nM Rapa

Zur quantitativen Darstellung dieser Western-blot-Analysen wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und anschließend mittels Densitometrie ausgewertet (Abb. 16). Als Referenzwert diente die Kontrolle, bei der MSC ohne Zusatz von DMSO oder Rapamycin mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle in Experimentiermedium behandelt wurden. Hierfür wurde der Referenzwert mit 1,00 festgelegt. Bei der Auswertung wurden sm-Calponin, MLCK und α -SMA auf das Protein

α -Tubulin bezogen, das als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Elektrophoresegels mit Proteinen diene.

Bei glattmuskulärem Calponin sank die Proteinexpression bei Inkubation mit 1,25% DMSO von 1,00 auf 0,61. Bei Koinkubation mit 1,25% DMSO und den angezeigten Rapamycin-Konzentrationen kam es zu einer deutlich geringeren Herabregulation der Proteinexpression von 0,93, 0,99 und 0,87. Die Expression von MLCK sank bei Zugabe von 1,25% DMSO von 1,00 auf 0,53 ab. Bei Koinkubation mit den angegebenen Rapamycin-Konzentrationen konnte eine Proteinexpression von 1,00, 0,87 und 0,91 gemessen werden. Bei α -SMA kam es durch Inkubation mit 1,25% DMSO zu einem Abfall der Proteinexpression von 1,00 auf 0,74. Bei Koinkubation mit 1,25% DMSO und Rapamycin konnte eine Proteinexpression von 1,12, 1,10 und 0,81 verzeichnet werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die durch DMSO induzierten Veränderungen der Expression verschiedener glattmuskulärer Markerproteine durch Rapamycin zumindest partiell antagonisierbar sind. Somit kommt mTOR als Bestandteil der PI3K/Akt/mTOR/p70S6K-Kaskade eine wichtige Rolle bei der Regulation der glattmuskulären Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu.

3.2.3 Rapamycin-Konzentrationsreihe

In den vorangegangenen Experimenten wurde demonstriert, dass der dedifferenzierende Effekt von DMSO auf die glattmuskuläre Differenzierung von MSC partiell durch Blockade des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges auf unterschiedlichen Stufen (PI3K; mTOR) antagonisierbar ist. Im Weiteren soll die Wirkung einer mTOR-Blockade durch Rapamycin auf ruhende MSC untersucht werden, ohne dass eine Dedifferenzierung durch DMSO induziert wird. Dazu wurden die Zellen für acht Tage mit den angezeigten Rapamycin-Konzentrationen inkubiert. Nach der Proteinextraktion wurden Western-blot-Untersuchungen mit Antikörpern gegen die glattmuskulären Markerproteine sm-Calponin, MLCK und α -SMA durchgeführt (Abb. 17). Diese Werte wurden wieder auf das ubiquitär exprimierte Protein α -Tubulin bezogen.

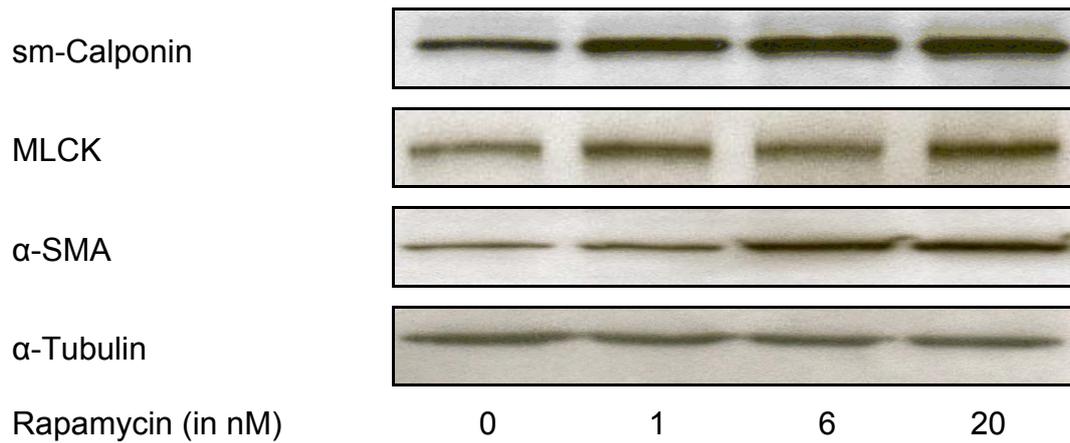


Abb. 17: Repräsentative Western blots von sm-Calponin (34kDa), MLCK (leichte Isoform; 130kDa), α-SMA (42kDa), und α-Tubulin (50kDa) zur Darstellung der Rapamycin-Wirkung auf mesenchymale Stammzellen nach 8 Tagen

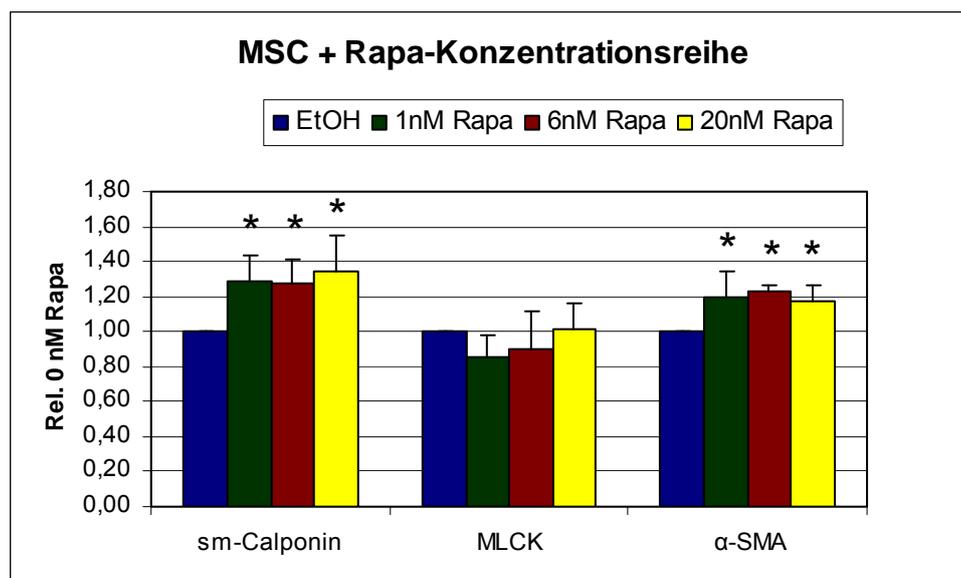


Abb. 18: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von Rapamycin auf die Expression glattmuskulärer Markerproteine in mesenchymalen Stammzellen nach 8 Tagen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten; * $p < 0,05$ zu EtOH

Zur quantitativen Auswertung wurden Western blots von drei unabhängigen Experimenten mittels Densitometrie quantifiziert und anschließend statistisch

ausgewertet (Abb. 18). Als Bezugswert diente eine Lösungsmittel-Kontrolle mit Ethanol ohne Rapamycin. Dieser Wert wurde auf 1,00 festgelegt. Auf ihn wurden alle weiteren Angaben bezogen. Bei Zugabe der angezeigten Rapamycin-Konzentrationen wurden Veränderungen in der Höhe der Expression glattmuskulärer Markerproteine gemessen. Bei sm-Calponin kam es vom Ausgangswert 1,00 zu einem Anstieg der Expression auf 1,29, 1,28 und 1,35. Bei MLCK waren keine signifikanten Veränderungen eruierbar. α -SMA zeigte einen Anstieg der Proteinexpression von 1,00 auf 1,20, 1,23 und 1,17. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierung von mTOR durch Rapamycin die Expression verschiedener glattmuskulärer Markerproteine auch in ruhenden MSC mit multilineärem Differenzierungspotenzial fördert. Dies veranschaulicht die Bedeutung der Proteinkinase mTOR für die Regulation der glattmuskulären Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.

3.3 Analyse der Signaltransduktion bei glattmuskulärer Differenzierung und Dedifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen

3.3.1 Wirkung von DMSO

3.3.1.1 pAkt und Akt

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass DMSO eine dosisabhängige Wirkung auf die Morphologie und die Höhe der Expression glattmuskulärer Markerproteine von mesenchymalen Stammzellen hat. Blockierungsexperimente mit LY294002 und Rapamycin weisen auf die Bedeutung einer Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionskaskade für diesen Vorgang hin. Diese Hypothese soll nun anhand des zeitabhängigen Phosphorylierungszustandes verschiedener Proteinkinasen innerhalb der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade als Ausdruck ihrer Aktivierung nach DMSO-Exposition genauer untersucht werden. Dafür wurden MSC trypsiniert, in einer Dichte von 300.000 Zellen pro 100mm-Zellkulturschale neu ausgesät und über Nacht im Brutschrank zur Adhärenz gebracht. Anschließend erfolgte die Inkubation der MSC mit 1,25% DMSO. Zur Analyse des Phosphorylierungszustandes der unterschiedlichen Elemente der Signaltransduktionskaskade wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 0 und 1440 Minuten lysiert. Im Anschluss wurden Western blots mit

verschiedenen Antikörpern, die phosphorylierte und unphosphorylierte Proteine differenzieren können, angefertigt. Hierfür wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und anschließend densitometrisch ausgewertet.

Einer dieser spezifischen Antikörper ist gegen pAkt gerichtet. Die Proteinkinase Akt wird direkt über den PI3K/PDK/Akt-Signalweg aktiviert. Diese Aktivierung wird in der Phosphorylierung von Akt zu pAkt sichtbar. Zur Auswertung wurden dabei die Intensitäten der Banden der phosphorylierten Form von Akt auf die Intensitäten der Banden bezogen, die die gesamte Menge an Akt, also die phosphorylierte und unphosphorylierte Form, repräsentieren.

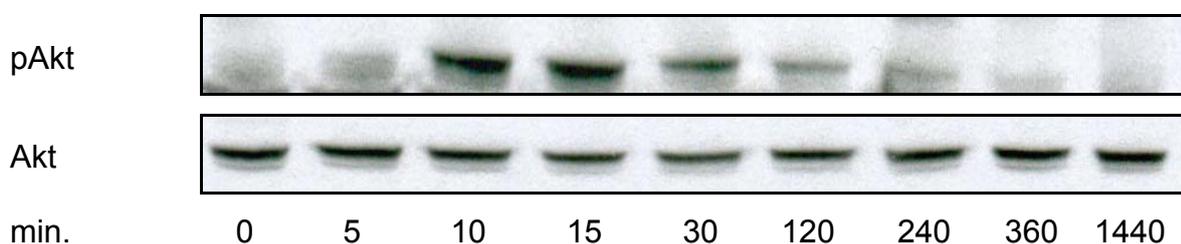


Abb. 19: Repräsentative Western blots von pAkt (60kDa) und Akt (60kDa) zur Darstellung der DMSO-Wirkung auf mesenchymale Stammzellen zwischen 0 und 1440 min.

In den abgebildeten Western-blot-Ausschnitten (Abb. 19) sieht man deutlich eine Zunahme des Phosphorylierungszustandes von Akt 10 Minuten nach Beginn der DMSO-Exposition. Im weiteren Zeitverlauf nimmt der Phosphorylierungsgrad wieder ab. Der gegen Akt gerichtete Antikörper, der sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form der Proteinkinase Akt repräsentiert, zeigt unveränderte Bandenintensitäten. Daran wird deutlich, dass es bei gleichbleibender Expression des Proteins Akt zu einer Änderung des Phosphorylierungszustandes von Akt kommt.

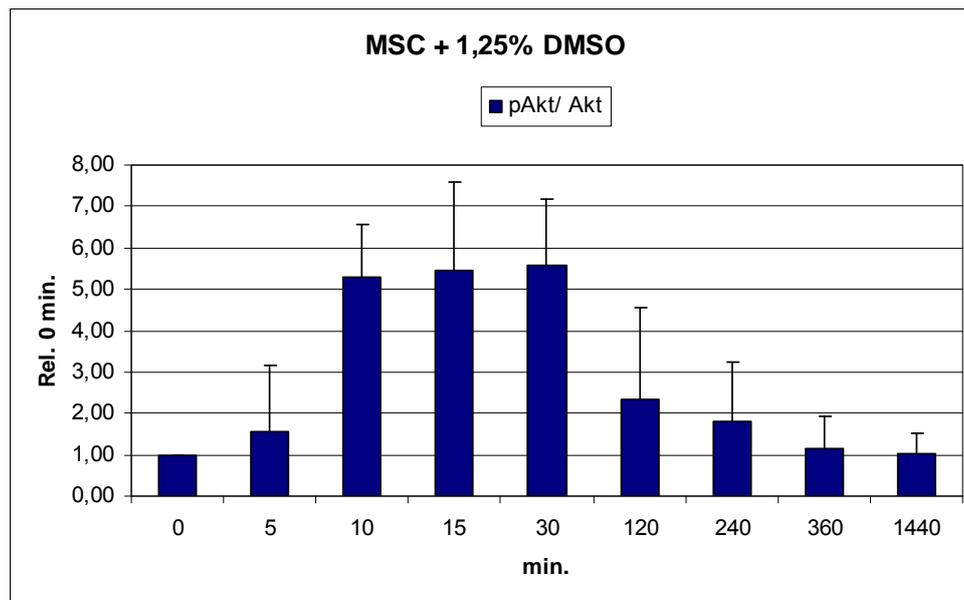


Abb. 20: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von DMSO auf den Phosphorylierungszustand von Akt in mesenchymalen Stammzellen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten

Zur Darstellung der quantitativen Veränderungen erfolgte anschließend eine densitometrische Auswertung der Western-blot-Analysen (Abb. 20). Als Referenzwert diente der Zeitpunkt null Minuten. Die Zellen zu diesem Zeitpunkt wurden mit Experimentiermedium ohne Zusatz von DMSO inkubiert. Alle folgenden Werte wurden auf den Null-Minuten-Wert bezogen, der auf 1,00 gesetzt wurde. Im Verhältnis hierzu erhöhte sich der Anteil des phosphorylierten Akt bei den folgenden Zeitpunkten um die Faktoren 1,55, 5,31 und 5,46. Die maximale Phosphorylierung von Akt zu pAkt zeigte sich nach 30 Minuten und erreichte das 5,60-fache des Ausgangswertes. Anschließend kam es zu einem Abfall in der Akt-Phosphorylierung auf 2,35, 1,82, 1,13 und 1,02.

Es wurde bereits gezeigt, dass DMSO die Ausprägung des glattmuskulären Phänotyps und die Expression verschiedener glattmuskulärer Markerproteine in mesenchymalen Stammzellen beeinflusst. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen eine Aktivierung der Proteinkinase Akt durch DMSO in MSC, so dass die Regulation des glattmuskulären Phänotyps über diesen Signaltransduktionsweg vermutet werden kann.

3.3.1.2 pp70S6K Threonin 389 und p70S6K

Ein weiteres wichtiges Element innerhalb der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade ist die Serin-Threonin-Proteinkinase p70S6. Sie ist der Proteinkinase Akt nachgeschaltet, kann aber auch unabhängig von Akt phosphoryliert und damit aktiviert werden. Nachfolgend wurde die Aktivierung der p70S6K an zwei verschiedenen, spezifischen Phosphorylierungsstellen untersucht.

Eine dieser Phosphorylierungsstellen ist Threonin 389. Sie wird Akt-abhängig über das Signaltransduktionselement mTOR phosphoryliert und ist daher in den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eingebunden. Zur Untersuchung dieser Phosphorylierungsstelle wurden Western-blot-Analysen mit einem phosphospezifischen Antikörper, der gegen p70S6K Threonin 389 gerichtet ist, durchgeführt. Diese Angaben wurden auf die Banden bezogen, die den Gesamtgehalt an p70S6K repräsentieren (p70 total).

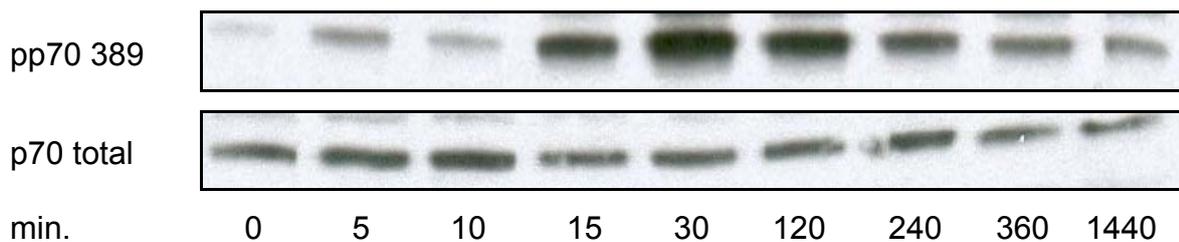


Abb. 21: Repräsentative Western blots von pp70S6K Threonin 389 (70kDa) und p70S6K total (70kDa) zur Darstellung der DMSO-Wirkung auf mesenchymale Stammzellen zwischen 0 und 1440 min.

Bereits in den abgebildeten Ausschnitten der durchgeführten Western-blot-Analysen (Abb. 21) sieht man eine deutliche zeitabhängige Aktivitätszunahme an der Phosphorylierungsstelle Threonin 389. Die Bande des gegen p70S6K gerichteten Antikörpers, der den phosphorylierten und unphosphorylierten Anteil detektiert, bleibt unverändert. Dabei kommt es in Abhängigkeit von der Zeit zuerst zu einem Anstieg der Aktivität an der Phosphorylierungsstelle Threonin 389. Nach 30 bis 120 Minuten ist der maximale Wert erreicht. Danach kommt es zu einem langsamen Absinken der Aktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass DMSO die Proteinkinase p70S6 an der Stelle Threonin 389 über den PI3K/PDK/Akt/mTOR-Signalweg phosphoryliert und damit aktiviert.

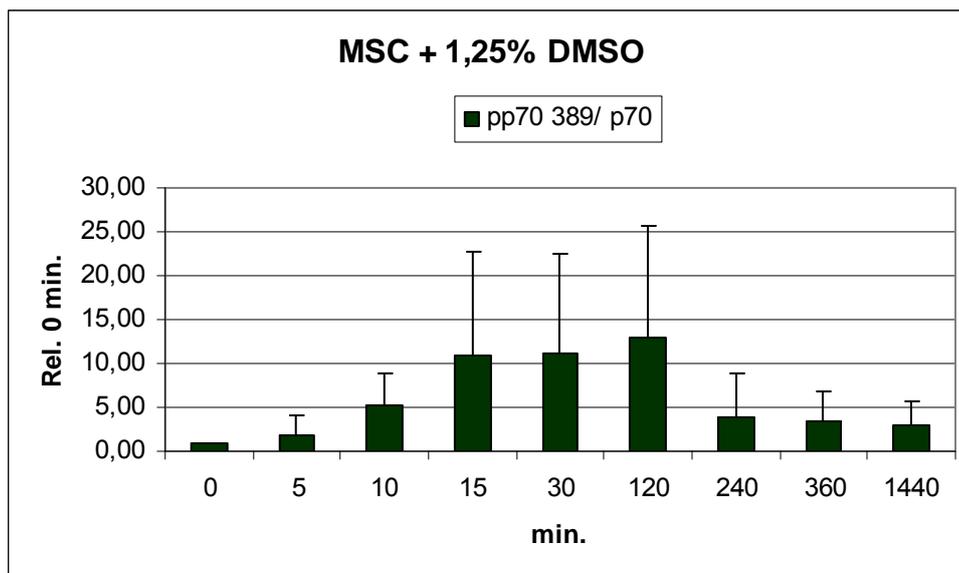


Abb. 22: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von DMSO auf den Phosphorylierungszustand von p70S6K Threonin 389 in mesenchymalen Stammzellen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten

Zur quantitativen Darstellung dieser durch DMSO induzierten Veränderungen wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und anschließend densitometrisch ausgewertet (Abb. 22). Der Null-Minuten-Wert diente als Referenzwert und wurde auf 1,00 gesetzt. Auf ihn wurden alle weiteren Angaben bezogen. Zum Zeitpunkt null Minuten wurden die Zellen mit Experimentiermedium ohne Zusatz von DMSO inkubiert. Bei den folgenden Zeitpunkten erhöhte sich der Anteil der phosphorylierten p70S6K um die Faktoren 1,83, 5,31, 10,94 und 11,19. Die maximale Phosphorylierung der p70S6K an der Stelle Threonin 389 wurde nach 120 Minuten erreicht und betrug 12,90. Danach kam es zu einem Abfallen der Phosphorylierung auf 3,96, 3,52 und 2,87.

Diese Ergebnisse zeigen, dass DMSO den Aktivitätszustand der Proteinkinase p70S6 in MSC durch eine Phosphorylierung an der Stelle Threonin 389, die stromabwärts von Akt und mTOR liegt, verstärken kann.

3.3.1.3 pp70S6K Threonin 421/Serin 424 und p70S6K

Eine weitere spezifische Phosphorylierungsstelle der p70S6K ist Threonin 421/Serin 424. Dieser Aktivierungsmechanismus der p70S6K erfolgt Akt-unabhängig über den MAPK/ERK-Signalweg. Zur genaueren Untersuchung einer Beteiligung dieser

Phosphorylierungsstelle an der Regulation der glattmuskulären Differenzierung von MSC wurden Western blots mit dem phosphospezifischen Antikörper, der gegen p70S6K Threonin 421/Serin 424 (pp70 421) gerichtet ist, durchgeführt. Diese Werte wurden auf die Banden bezogen, die die Gesamtheit an phosphorylierter und unphosphorylierter p70S6K repräsentieren (p70 total).

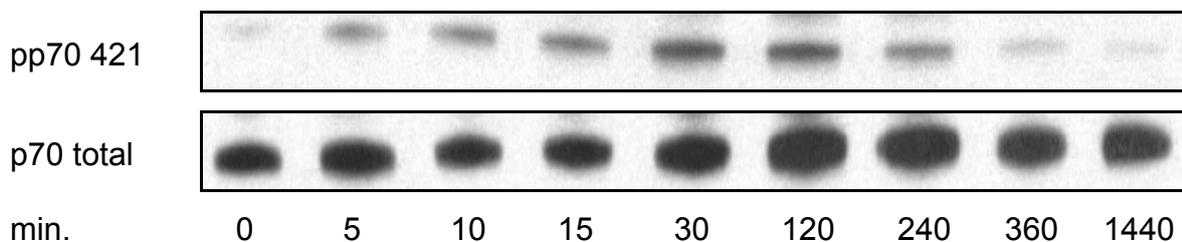


Abb. 23: Repräsentative Western blots von pp70S6K Threonin 421/Serin 424 (70kDa) und p70S6K total (70kDa) zur Darstellung der DMSO-Wirkung auf mesenchymale Stammzellen zwischen 0 und 1440 min.

In den dargestellten Western-blot-Ausschnitten (Abb. 23) sind deutliche Veränderungen des Phosphorylierungszustandes der Proteinkinase p70S6 an der Stelle Threonin 421/Serin 424 erkennbar. In Abhängigkeit von der Zeit kommt es zuerst zu einer Intensitätszunahme der Bande von pp70 421. Im weiteren Zeitverlauf kommt es dann wieder zu einer Abnahme des Phosphorylierungsausmaßes als Zeichen einer Aktivitätsänderung. Die Bande des gegen p70S6K gerichteten Antikörpers, der die phosphorylierte und unphosphorylierte Form repräsentiert, bleibt dabei unverändert. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass es bei gleichbleibender Intensität der Bande der Proteinkinase p70S6 zu Änderungen des Ausmaßes der Phosphorylierung an der Stelle Threonin 421/Serin 424 kommt. Diese Aktivierung durch Phosphorylierung an der Position Threonin 421/Serin 424 legt nahe, dass der MAPK/ERK-Signalweg an der Regulation der glattmuskulären Differenzierung mesenchymaler Stammzellen beteiligt sein kann.

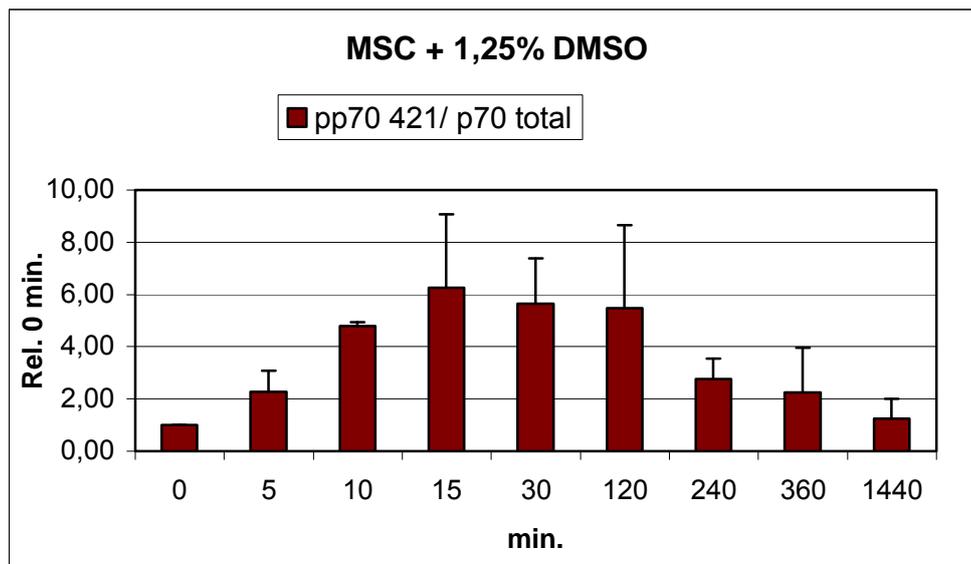


Abb. 24: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von DMSO auf den Phosphorylierungszustand von p70S6K Threonin 421/Serin 424 in mesenchymalen Stammzellen; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten

Anschließend erfolgte die densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente (Abb. 24). Als Referenzwert diente dabei der Null-Minuten-Wert. Die Zellen zu diesem Zeitpunkt wurden mit Experimentiermedium ohne Zusatz von DMSO inkubiert. Alle folgenden Werte wurden auf den Null-Minuten-Wert bezogen, der auf 1,00 festgelegt wurde. Bei der Inkubation mesenchymaler Stammzellen mit 1,25% DMSO erhöhte sich die Aktivität von pp70S6K Threonin 421/Serin 424 über 2,27 und 4,80 auf das 6,25-fache des Ausgangswertes. Dieser Maximalwert wurde zum Zeitpunkt 15 Minuten erreicht. Anschließend kam es zu einem langsamen Absinken der Aktivität auf 5,66, 5,47, 2,76, 2,26 und 1,25.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass DMSO auch über den Akt-unabhängigen Signalweg die p70S6K durch Phosphorylierung an der Stelle Threonin 421/Serin 424 aktivieren kann.

3.3.2 Auswirkung einer PI3K-Inhibition durch LY294002 auf die DMSO-induzierte Signaltransduktion in mesenchymalen Stammzellen

3.3.2.1 pAkt und Akt

In den vorangegangenen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass die Inkubation mesenchymaler Stammzellen mit DMSO zu Änderungen in der Zellmorphologie führt. MSC waren nach Kultivierung flach ausgebreitet und zeigten eine unregelmäßige Struktur mit prominenten stress fibers. Nach Zugabe von DMSO wurden die Zellen schlank und spindelförmig. Neben den phänotypischen Veränderungen konnten auch Änderungen in der Höhe der Proteinexpression nachgewiesen werden. Dafür wurden Western blots mit Antikörpern gegen die glattmuskulären Markerproteine sm-Calponin, MLCK und α -SMA durchgeführt und anschließend densitometrisch ausgewertet. Dabei bewirkte DMSO eine deutliche Herabregulation der Expression der verschiedenen glattmuskulären Markerproteine. Sowohl die morphologischen Veränderungen als auch die Änderungen in der Höhe der Proteinexpression zeigten eine Reversibilität und waren durch Koinkubation mit DMSO und LY294002 zumindest partiell antagonisierbar. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DMSO in Abhängigkeit von der Zeit den Phosphorylierungszustand von Akt verändern kann, so dass dies möglicherweise an der Regulation der glattmuskulären Differenzierung mesenchymaler Stammzellen beteiligt ist.

Es ist bereits bekannt, dass DMSO ein Aktivator der PI3K ist. Um zu zeigen, dass die durch DMSO induzierten Veränderungen in MSC über eine Aktivierung der PI3K erfolgen, wurde diese in weiteren Experimenten durch den PI3K-Inhibitor LY294002 gehemmt. Dafür wurden mesenchymale Stammzellen trypsinisiert, mit circa 300.000 Zellen pro 100mm-Zellkulturschale neu ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zu Beginn des Experimentes wurden MSC für 30 Minuten mit 15 μ M LY294002 präinkubiert, um die PI3K effektiv zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen mit 1,25% DMSO und 15 μ M LY294002 koinkubiert. Die Proteinextraktion erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Als Referenzwert wurde der Zeitpunkt null Minuten mit 1,00 festgelegt. Diese Zellen wurden ausschließlich mit 15 μ M LY294002 präinkubiert. Alle folgenden Werte wurden als ein Vielfaches dieses Wertes angegeben.

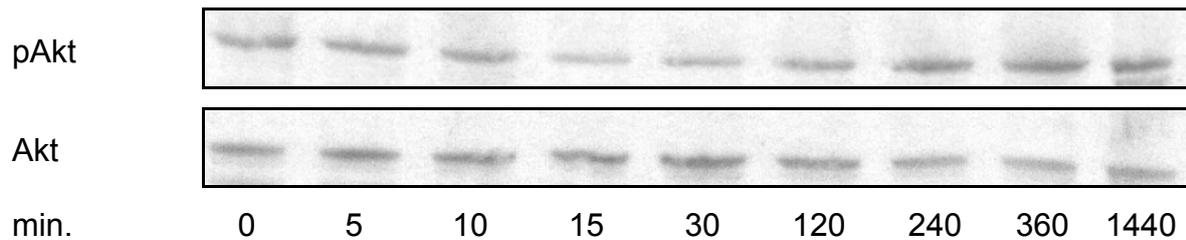


Abb. 25: Repräsentative Western blots von pAkt (60kDa) und Akt (60kDa) zur Darstellung der Wirkung von 1,25% DMSO auf mesenchymale Stammzellen bei 15 μ M LY294002

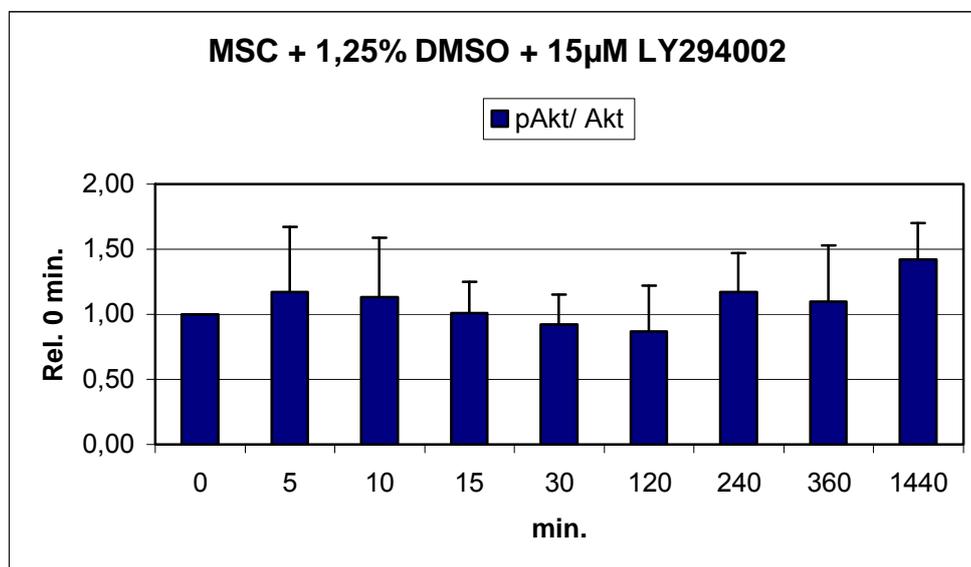


Abb. 26: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von 1,25% DMSO auf den Phosphorylierungszustand von Akt in mesenchymalen Stammzellen bei 15 μ M LY294002; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten

Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Anschließend erfolgte eine statistische Auswertung der Western-blot-Analysen (Abb. 25 und 26). Dabei kam es über den gesamten untersuchten Zeitraum zu keiner signifikanten Änderung des Phosphorylierungszustandes von Akt.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass DMSO in Abhängigkeit von der Zeit zu einer Aktivitätszunahme der Proteinkinase Akt führt. Bei

erneuter Durchführung dieses Experimentes mit vorheriger Inhibierung der PI3K durch LY294002 war diese Aktivitätsveränderung von Akt nicht mehr messbar. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die zuvor beobachtete Akt-Aktivierung durch DMSO über die PI3K vermittelt wurde.

3.3.2.2 pp70S6K Threonin 389 und p70S6K

Die p70S6K ist eine wichtige Proteinkinase, die unter anderem in die Regulation der glattmuskulären Differenzierung mesenchymaler Stammzellen eingebunden ist. Sie kann sowohl Akt-abhängig als auch unabhängig von Akt über den MAPK/ERK-Signalweg aktiviert werden. In den folgenden Experimenten wurde die PI3K durch den PI3K-Inhibitor LY294002 geblockt. Nach unserer Hypothese dürfte es durch anschließende Inkubation mit DMSO zu keiner Aktivitätsänderung der p70S6K an der Stelle Threonin 389 kommen, da diese über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg vermittelt wird. Im Gegensatz dazu wird der MAPK/ERK-Signalweg nicht durch LY294002 inhibiert, so dass eine Änderung der Phosphorylierung und damit auch der Aktivität an der Stelle Threonin 421/Serin 424 durchaus möglich wäre.

Zunächst wurde die Akt-abhängige Aktivierung der p70S6K an der Phosphorylierungsstelle Threonin 389 genauer untersucht. Dafür wurden mesenchymale Stammzellen für 30 Minuten mit 15µM LY294002 präinkubiert. Anschließend erfolgte die Koinkubation mit 1,25% DMSO und 15µM LY294002. Die Proteinextraktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Der Zeitpunkt null Minuten wurde mit 1,00 festgelegt und diente als Referenzwert. Diese Zellen wurden nur mit 15µM LY294002 präinkubiert. Alle weiteren Werte wurden auf den Null-Minuten-Wert bezogen.

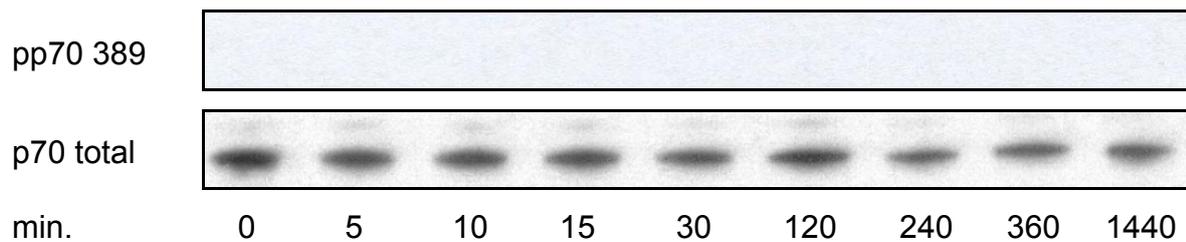


Abb. 27: Repräsentative Western blots von pp70S6K Threonin 389 (70kDa) und p70S6K total (70kDa) zur Darstellung der Wirkung von 1,25% DMSO auf mesenchymale Stammzellen bei 15 μ M LY294002

Zur Untersuchung der Wirkung von DMSO und LY294002 auf die spezifische Phosphorylierungsstelle Threonin 389 der p70S6K wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit Western-blot-Analysen durchgeführt. Wie in den beispielhaft abgebildeten Western blots (Abb. 27) gezeigt, konnte in allen drei Experimenten keine Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Nach Präinkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 sowie anschließender Koinkubation mit DMSO und LY294002 war somit weder bei der Proteinkinase Akt noch bei der nachgeschalteten Proteinkinase p70S6 an der Stelle Threonin 389 eine Änderung in der Phosphorylierung messbar. Diese Beobachtungen veranschaulichen die Bedeutung der PI3K für die weitere Signaltransduktion innerhalb der PI3K/Akt/mTOR/p70S6K-Kaskade.

3.3.2.3 pp70S6K Threonin 421/Serin 424 und p70S6K

Es wurde bereits die inhibierende Wirkung von LY294002 auf die durch DMSO induzierte Phosphorylierung der Proteinkinasen Akt und p70S6 an der Stelle Threonin 389 gezeigt. Im Folgenden soll die Wirkung von LY294002 auf die durch DMSO verursachte Phosphorylierung an der Stelle Threonin 421/Serin 424 der p70S6K untersucht werden. Die Phosphorylierung an dieser Stelle erfolgt über den MAPK/ERK-Signalweg unabhängig von Akt und mTOR.

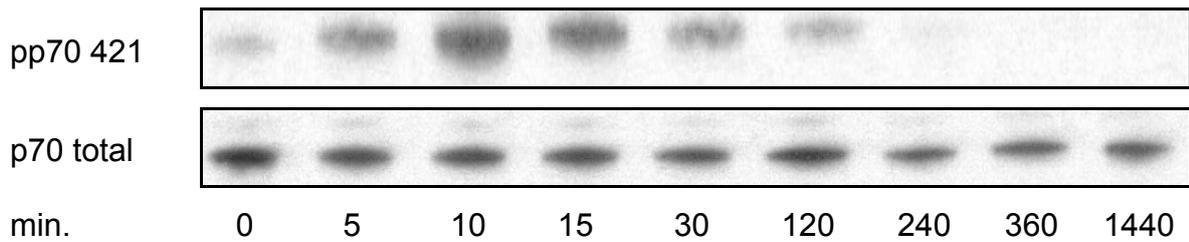


Abb. 28: Repräsentative Western blots von pp70S6K Threonin 421/Serin 424 (70kDa) und p70S6K total (70kDa) zur Darstellung der Wirkung von 1,25% DMSO auf mesenchymale Stammzellen bei 15 μ M LY294002

In den abgebildeten Western-blot-Ausschnitten (Abb. 28) sieht man eine deutliche zeitabhängige Aktivitätsänderung an der Phosphorylierungsstelle Threonin 421/Serin 424. Im Verlauf kommt es zuerst zu einer Zunahme der Phosphorylierung, die dann langsam wieder abflacht. Die Bande des gegen p70S6K gerichteten Antikörpers, der die Gesamtheit der phosphorylierten und unphosphorylierten Form repräsentiert, bleibt dabei unverändert. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass es bei gleichbleibender Expression des Proteins p70S6K zu Aktivitätsänderungen an der Phosphorylierungsstelle Threonin 421/Serin 424 kommt, die nicht von einer Aktivierung der PI3K abhängig ist.

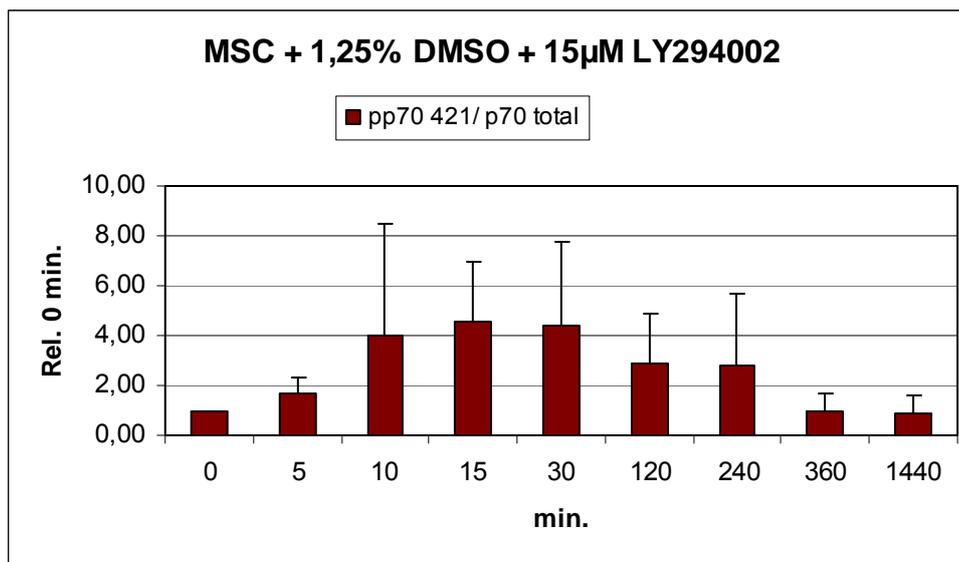


Abb. 29: Statistische Auswertung der Western blots zur Wirkung von 1,25% DMSO auf den Phosphorylierungszustand von p70S6K Threonin 421/Serin 424 in mesenchymalen Stammzellen bei 15 μ M LY294002; Mittelwert + Standardabweichung von 3 Experimenten

Es wurden erneut mesenchymale Stammzellen für 30 Minuten mit 15 μ M LY294002 präinkubiert. Anschließend erfolgte die Koinkubation mit 1,25% DMSO und 15 μ M LY294002 für die angegebenen Zeiträume. Nach der Proteinextraktion wurden Western blots angefertigt und mittels Densitometrie ausgewertet (Abb. 29). Als Referenzwert wurde der Zeitpunkt null Minuten mit 1,00 festgelegt. Zuerst kam es zu einem Anstieg der Phosphorylierung als Zeichen einer Aktivitätsänderung an der Stelle Threonin 421/Serin 424 auf 1,66 und 3,98. Die maximale Phosphorylierung wurde zum Zeitpunkt 15 Minuten erreicht und betrug das 4,55-fache des Ausgangswertes. Danach kam es zu einem langsamen Abfallen der Aktivität über 4,43, 2,90, 2,79 und 0,96 auf 0,85.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei Koinkubation mesenchymaler Stammzellen mit DMSO und LY294002 unabhängig von Akt und mTOR zu einer Aktivitätszunahme der p70S6K an der Stelle Threonin 421/Serin 424 kommt. Das spricht dafür, dass DMSO neben dem PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signalweg auch noch über den MAPK/ERK-Signalweg seine Wirkungen entfalten kann.

3.3.3 Auswirkungen einer mTOR-Inhibition durch Rapamycin auf die DMSO-induzierte Signaltransduktion in mesenchymalen Stammzellen

3.3.3.1 pp70 S6K Threonin 389 und p70S6K

In verschiedenen Experimenten wurde bereits die Wirkung von DMSO auf MSC untersucht. Dabei wurden Veränderungen hinsichtlich des Phänotyps mesenchymaler Stammzellen und der Höhe der Expression verschiedener glattmuskulärer Markerproteine nachgewiesen. Darüber hinaus wurde anhand verschiedener Antikörper die Wirkung von DMSO innerhalb der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade genauer untersucht. So konnte gezeigt werden, dass DMSO sowohl die PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade als auch den MAPK/ERK-Signalweg aktiviert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der mTOR-Inhibitor Rapamycin die glattmuskuläre Differenzierung mesenchymaler Stammzellen fördert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DMSO eine Änderung des Phosphorylierungszustandes als Zeichen einer Aktivitätsänderung der p70S6K an der Stelle Threonin 389 bewirkt.

Nun soll durch Koinkubation mesenchymaler Stammzellen mit DMSO und Rapamycin genauer untersucht werden, ob die Phosphorylierung dieser Position durch mTOR vermittelt wird. Dazu wurden MSC für 30 Minuten mit 6nM Rapamycin präinkubiert, um mTOR effektiv zu blockieren. Anschließend erfolgte die Koinkubation mit 1,25% DMSO und 6nM Rapamycin. Die Proteinextraktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Als Referenzwert diente mit 1,00 der Null-Minuten-Wert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen ausschließlich mit 6nM Rapamycin inkubiert ohne Zusatz von DMSO.

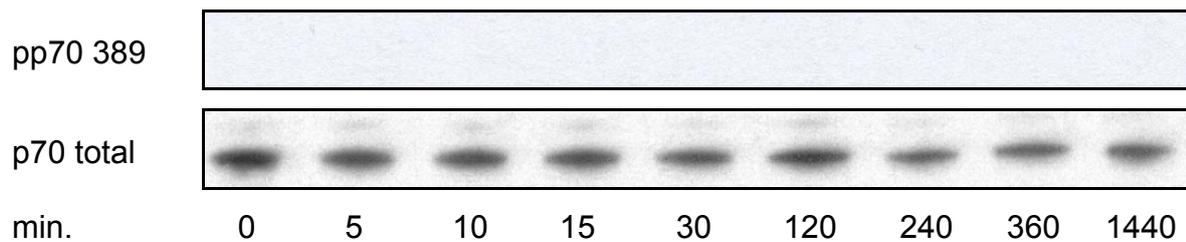


Abb. 30: Repräsentative Western blots von pp70S6K Threonin 389 (70kDa) und p70S6K total (70kDa) zur Darstellung der Wirkung von 1,25% DMSO auf mesenchymale Stammzellen bei 6nM Rapamycin

Es wurden erneut drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. In den anschließenden Western-blot-Analysen (Abb. 30) konnte in allen drei Versuchen an der Stelle Threonin 389 keine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Bande des gegen p70S6K gerichteten Antikörpers, der die Gesamtheit der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form repräsentiert, blieb dabei unverändert.

Durch Aktivierung der PI3K mittels DMSO kommt es über Akt und mTOR zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der p70S6K an der Stelle Threonin 389. Bei vorheriger Inkubation mesenchymaler Stammzellen mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin wurde dieser Aktivierungsweg der p70S6K inhibiert. Auch nach anschließender Koinkubation mit 1,25% DMSO und 6nM Rapamycin war eine Aktivierung der p70S6K an der Phosphorylierungsstelle Threonin 389 nicht mehr nachweisbar. Damit konnte veranschaulicht werden, dass die Proteinkinase mTOR eine wichtige Schaltstation innerhalb der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Signaltransduktionskaskade darstellt. Die aktivierende Wirkung von DMSO auf dieses System kann mittels mTOR-Blockade durch Rapamycin effektiv unterdrückt werden.

4 Diskussion

4.1 Glattmuskuläres Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen und dessen Bedeutung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen *in vitro* einen Phänotyp aufweisen, der Überschneidungen mit kontraktilen Zellen wie beispielsweise glatten Muskelzellen zeigt. Auffällig ist zunächst die morphologische Ähnlichkeit der Zellen in der Phasenkontrastmikroskopie. MSC imponieren durch eine flache unregelmäßige Zellform mit prominenten stress fibers bestehend aus Aktin, Myosin, Tropomyosin und α -Aktinin. Diese bilden das kontraktile Element des Zytoskeletts und sind unter anderem notwendig zur Herstellung der inneren Spannung einer Zelle. Damit dienen sie der Aufrechterhaltung der flach ausgebreiteten Struktur mesenchymaler Stammzellen [31, 63].

Es gibt kein spezifisches Markerprotein für glatte Muskelzellen. Wichtige Proteine sind Myosin und Aktin. Sie sind notwendig für die charakteristische Funktion glatter Muskelzellen – die Kontraktion. Aktin kommt in drei verschiedenen Isoformen vor: α , β und γ . In adulten Arterien exprimieren glatte Gefäßmuskelzellen in der Media vor allem α -Aktin. Neben den kontraktilen Proteinen gibt es noch strukturelle Proteine, die sich während der Differenzierung ändern können. Reife glattmuskuläre Zellen enthalten zwei Klassen intermediärer Filamentproteine: Vimentin, ein nahezu ubiquitär vorkommendes Protein, und Desmin, ein nur in Muskelzellen vorkommendes Protein. Allerdings sind nicht alle glatten Muskelzellen positiv für Desmin. Daneben gibt es noch eine Reihe Intermediärfilament-assoziiierter Proteine [29, 77]. Wegen der sehr uneinheitlichen Expression dieser Proteine durch kontraktile Zellen ist zu deren Charakterisierung immer die Analyse eines Panels aus mehreren Markern erforderlich.

Zur genaueren Einschätzung des kontraktilen Phänotyps von MSC wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. In den angefertigten Färbungen mit Antikörpern, die gegen die glattmuskulären Markerproteine α -SMA, Desmin, sm-Calponin und MLCK gerichtet waren, zeigte sich eine für das jeweilige Antigen charakteristische intrazelluläre Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes. Es erfolgte keine diffuse intrazelluläre Verteilung. Die Expression dieser Marker wurde auf Proteinebene durch Western blots bestätigt. Hier zeigten sich bereits bei geringen Proteinmengen deutliche

Signale, so dass von einer nicht unerheblichen Expression ausgegangen werden kann. Von der MLCK fand sich vor allem die leichte Isoform mit einem Molekulargewicht von 130kDa, die typischerweise in glatten Gefäßmuskelzellen vorkommt, und für die Kontraktion der Zellen von entscheidender Bedeutung ist [6]. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, dass mesenchymale Stammzellen *in vitro* das Potenzial besitzen, in glatte Muskelzellen zu differenzieren. Diese Schlussfolgerung wird durch aktuelle Daten aus unserem Labor gestützt, die zeigen, dass MSC auch funktionelle L-Typ-Calciumkanäle exprimieren, wie sie typischerweise bei glatten Gefäßmuskelzellen gefunden werden [32].

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass zwar ein hoher Prozentsatz, aber nicht alle Zellen positiv für die getesteten Markerproteine waren. Die höchsten Werte wurden mit 98,5% positiven Zellen für das Intermediärfilamentprotein Desmin erreicht, der niedrigste Wert für α -SMA mit 68,5%. Daran wird deutlich, dass mesenchymale Stammzellen unter den hier gewählten Kulturbedingungen keine vollständige Differenzierung erreichen. In FACS-Analysen zeigten die Zellen den für MSC geforderten Phänotyp: Nahezu alle Zellen waren positiv für CD73, CD90 und CD105, während Marker hämatopoetischer Linien nicht zu detektieren waren [32]. Außerdem behielten die hier beschriebenen Zellen unter den angewandten Kulturbedingungen die Fähigkeit, zu Osteoblasten oder Adipozyten zu differenzieren. Sie waren also trotz der vorhandenen Charakteristika glatter Gefäßmuskelzellen multipotent und zeigten typische Stammzellcharakteristika.

In den durchgeführten Experimenten wurden MSC mit vorgetestetem FCS inkubiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass FCS bisher noch nicht identifizierte Wachstumsfaktoren enthält, die Einfluss auf Differenzierung und Wachstum von Zellen haben [63]. Es ist daher denkbar, dass das in unserem Labor zur Kultivierung der MSC verwendete FCS Faktoren enthält, die diesen kontraktilen Phänotyp begünstigen und möglicherweise in anderen FCS-Chargen fehlen oder nur gering vorhanden sind.

Die in dieser Arbeit beschriebene glattmuskuläre Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark ist von großer Bedeutung für die in letzter Zeit mehr und mehr ins Bewusstsein gerückte Tatsache, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu physiologischen und pathologischen Gefäßumbauprozessen beitragen können [5]. Hierzu gibt es eine Vielzahl experimenteller Belege sowohl in Tiermodellen als auch am Menschen. Bisher konnte allerdings noch nicht abschließend geklärt werden, welche Zellpopulation hauptsächlich an diesen Umbauprozessen

beteiligt ist. Neuere Befunde weisen auf eine große Bedeutung mesenchymaler Stammzellen hin [23, 32]. Eine Grundvoraussetzung für die Beteiligung an der Neointimabildung nach Gefäßschädigungen ist die Fähigkeit, einen entsprechenden, glatten Gefäßmuskelzellen ähnelnden Phänotyp annehmen zu können. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für MSC gezeigt.

4.2 Beeinflussung des glattmuskulären Differenzierungsgrades mesenchymaler Stammzellen

Um einer unerwünschten Neointimabildung mit Beteiligung zirkulierender MSC zum Beispiel im Rahmen der Restenose nach Koronarangioplastie oder der Transplantatvaskulopathie therapeutisch entgegen treten zu können, ist es erforderlich, die molekularen Mechanismen der zugrundeliegenden Vorgänge zu kennen. Ein wesentlicher Punkt ist hierbei die Differenzierung und Dedifferenzierung bezüglich des kontraktiven Phänotyps.

Bei Gefäßverletzungen, die mit Ablösung des Endothels, veränderten Zellkontakten mit Komponenten der extrazellulären Matrix über Integrine sowie mit der Einwirkung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren einhergehen, kommt es zu phänotypischen Modulationen der ortsständigen glatten Gefäßmuskelzellen. Sie bewirken eine Dedifferenzierung, Proliferation, Migration sowie eine verstärkte Synthese von Kollagen, Proteasen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen extrazellulären Matrixproteinen [50, 66]. Diese Vorgänge tragen zur Intimahyperplasie bei [50]. Während der Dedifferenzierung kommt es zu einem Abfall der Expression und Konversion verschiedener Markerproteine, wie sm-Calponin, α -SMA, Caldesmon, MLCK, SM22 α , α 1-Integrin sowie α - und β -Tropomyosin. Darüber hinaus zeigen die Zellen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie und sind nach Stimulation mit Carbachol unfähig zur Kontraktion. Diese Dedifferenzierung wird auch *in vitro* beobachtet und kann durch Inkubation mit PDGF-BB, EGF oder bFGF induziert werden [29, 30, 50].

Durch Austesten verschiedener Substanzen, die bekanntermaßen den Differenzierungsstatus unterschiedlicher Zellen beeinflussen, wurde herausgefunden, dass vergleichbare Vorgänge bei mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark durch Inkubation mit DMSO induziert werden können. Nach einer Behandlungszeit von acht Tagen zeigte sich eine eindrucksvolle, dosisabhängige morphologische Umwandlung von flach ausgebreiteten Zellen mit prominenten stress fibers zu sehr

schmalen, spindelförmigen Zellen. In den Immunfluoreszenz-Untersuchungen fand sich in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration eine deutliche Abnahme der intrazellulären Filamentdichte dieser Markerproteine. Der Anteil der positiven Zellen sank dosisabhängig auf unter 10% für alle untersuchten Antigene bei der höchsten DMSO-Konzentration von 2,5%. Bei den verschiedenen Konzentrationen kam es nicht zu einer diffusen intrazellulären Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes, was ein Hinweis auf eine gestörte strukturelle Organisation wäre, sondern immer zu einer für die jeweiligen Markerproteine charakteristischen Anordnung. Mittels Western-blot-Analysen ließ sich die Herabregulation der gewählten glattmuskulären Markerproteine bestätigen. Diese Untersuchungen zeigen, dass die beobachteten morphologischen Veränderungen auf molekularer Ebene durch eine deutliche Abnahme mehrerer unterschiedlicher Markerproteine glatter Muskelzellen wie sm-Calponin, MLCK und α -SMA gekennzeichnet sind. Auch der Besatz an L-Typ-Calcium-Kanälen nimmt unter DMSO-Einwirkung deutlich ab [32], so dass von einer Dedifferenzierung hinsichtlich des glattmuskulären Phänotyps gesprochen werden kann.

In weiteren Studien außerhalb dieser Arbeit konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass diese durch DMSO induzierte Dedifferenzierung durch anschließende Inkubation mit FCS ohne Zusatz von DMSO rückgängig gemacht werden kann [31]. Daran wird deutlich, dass die Reduktion glattmuskulärer Markerproteine durch DMSO nicht auf die Selektion einer spezifischen Zellpopulation zurückzuführen ist. Es handelt sich vielmehr um eine homogene Zellpopulation, mit der Fähigkeit zu kompletter Reversibilität der durch DMSO induzierten phänotypischen Veränderungen [45].

Der genaue Wirkmechanismus von DMSO im Rahmen von Differenzierungsprozessen in unterschiedlichen Zellsystemen ist nach wie vor unklar. Je nach Zelltyp kann DMSO eine Differenzierung, zum Beispiel bei der Promyelozyten-Leukämiezelllinie HL60 in Richtung Neutrophile, oder eine Dedifferenzierung induzieren [41]. Unter anderem werden als Mechanismen eine Schädigung der Membranintegrität, die Induktion verschiedener Mediatoren sowie eine Aktivierung der PI3K diskutiert [54].

Der PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg als putativer Hauptmechanismus ist für die hier beobachteten DMSO-Effekte von besonderem Interesse, da er bekanntermaßen eine zentrale Rolle bei der Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen spielt [8, 27, 53]. Um die Bedeutung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges für die glattmuskuläre Differenzierung von MSC zu untersuchen, wurde der spezifische pharmakologische Inhibitor der PI3K LY294002 in Koinkubationsversuchen verwendet.

Dabei zeigte sich, dass die durch DMSO verursachte Umwandlung in eine spindelförmige Zellform durch Koinkubation mit LY294002 zumindest partiell und in Abhängigkeit der Dosis von LY294002 verhindert werden kann. Außerdem wird auch die Herabregulation der Expression der glattmuskulären Markerproteine durch Koinkubation der Zellen mit DMSO und 5µM LY294002 abgeschwächt. Dieser Effekt ist bei höheren Dosen von LY294002 (15µM) noch gesteigert. Dies bestätigt die Vermutung, dass die PI3K eine wichtige Rolle bei der Regulation der glattmuskulären Differenzierung von MSC spielt. Da es jedoch nicht zu einer kompletten Inhibierung der Dedifferenzierung nach Koinkubation mit DMSO und LY294002 kommt, scheinen auch andere Signalwege an der Regulation beteiligt zu sein. Diese Annahme wird durch die Experimente zur Signaltransduktion gestützt: Während die Präinkubation mit LY294002 eine DMSO-induzierte Phosphorylierung der p70S6K an der mTOR- und damit Akt-abhängigen Position Threonin 389 vollständig verhindern kann, kommt es auch unter Einwirken von LY294002 zu einer DMSO-vermittelten Phosphorylierung der p70S6K an der mTOR-unabhängigen Position Threonin 421/Serin 424. Diese Position wird von ERK1/2, einem Bestandteil der MAP-Kinase-Kaskade, kontrolliert und ist ebenfalls für die Aktivierung der p70S6K von großer Bedeutung.

DMSO und LY294002 bewirken also sowohl morphologische Veränderungen als auch Änderungen in der Höhe der Proteinexpression. Während DMSO zu einer Dedifferenzierung mesenchymaler Stammzellen führt, fördert LY294002 über eine Inhibierung der PI3K ihre Differenzierung in glatte Gefäßmuskelzellen.

Ein weiteres wichtiges Element innerhalb dieser Kaskade ist die stromabwärts von Akt gelegene Proteinkinase „mammalian target of rapamycin“ (mTOR). Sie ist an der Regulation vieler Vorgänge beteiligt, die für das Überleben von Zellen notwendig sind, zum Beispiel Proteinsynthese, Zellzyklusprogression und Zellproliferation. Mittels Western-blot-Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der dedifferenzierende DMSO-Effekt auf MSC durch Koinkubation mit Rapamycin partiell antagonisierbar ist. Die Wirkung von Rapamycin auf die Morphologie und die Expression glattmuskulärer Markerproteine in MSC zeigt dabei im getesteten Konzentrationsbereich von 1 bis 20nM keine Dosisabhängigkeit. Das bestätigt erneut, dass die DMSO-Wirkung nicht auf der Selektion eines bestimmten Zelltyps beruht. Allerdings kommt es nach Koinkubation mit DMSO und Rapamycin zu keiner vollständigen Inhibition der Dedifferenzierung. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass DMSO nicht nur innerhalb der PI3K/PDK/Akt/mTOR/p70S6K-Kaskade wirkt, sondern

darüber hinaus auch noch über andere Signalwege, die von Rapamycin nicht beeinflusst werden.

Neben der Koinkubation von DMSO und Rapamycin wurde in weiteren Experimenten die alleinige Wirkung von Rapamycin auf mesenchymale Stammzellen untersucht. Durch verschiedene Rapamycin-Konzentrationen konnte innerhalb einer Konzentrationsreihe demonstriert werden, dass Rapamycin eine verstärkte Expression glattmuskulärer Markerproteine auch ohne vorherige oder gleichzeitige Behandlung mit dedifferenzierenden Substanzen induziert. Die Expression der leichten Isoform der MLCK war in diesen Experimenten nicht weiter stimulierbar. Vermutlich ist bereits unter basalen Bedingungen das maximale Expressionsniveau dieses Proteins erreicht, so dass es auch bei weiter voranschreitender glattmuskulärer Differenzierung nicht weiter ansteigt. Hier zeigt sich erneut die Wichtigkeit der Analyse mehrerer Markerproteine für die glattmuskuläre Differenzierung. Die dargestellten Experimente zeigen, dass Rapamycin nicht nur zu einer reduzierten Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen führt, sondern darüber hinaus auch zu einer Stabilisierung ihres differenzierten, kontraktilen Phänotyps [19].

Außer Rapamycin ist Everolimus als weitere Substanz, die mTOR inhibiert, bereits in klinischer Anwendung. Beide Wirkstoffe sind ihrer Struktur nach Makrolid-Antibiotika, werden aber wegen ihrer antiproliferativen Wirkung auf aktivierte T-Zellen als Immunsuppressiva nach Transplantation solider Organe wie Herzen oder Nieren eingesetzt. Außerdem werden mit Rapamycin beschichtete Stents bei der Koronarangioplastie zur Verminderung der Restenoserate eingesetzt. Auffallend ist, dass Rapamycin besser in der Lage ist, die Neointimabildung in dilatierten Koronararterien zu verhindern, als das ebenfalls zur Stentbeschichtung verwendete Zytostatikum Paclitaxel [21, 26, 60]. Beide Substanzen wirken antiproliferativ. Rapamycin kann aber, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, außerdem in Differenzierungsvorgänge von MSC, die bei der Neointimabildung von Bedeutung sein können, eingreifen [20]. Diese Eigenschaft kann eine mögliche Erklärung für die beobachtete Überlegenheit von Rapamycin gegenüber Paclitaxel sein. Rapamycin kann zur Prophylaxe der In-Stent-Restenose neben der Stentbeschichtung auch über zehn Tage systemisch oral appliziert werden. Beide Applikationsformen weisen Vorteile und Nachteile auf. Nach systemischer Applikation beugt Rapamycin effektiv einer Restenose vor. Gleichzeitig treten aber zum Teil schwere Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen, Hyperlipidämie, Polyarthralgie und Myelosuppression auf [52]. Auf der

anderen Seite kommt es nach lokaler Applikation in Form von Rapamycin-beschichteten Stents nicht nur zu einer Reduzierung der Neointima-Bildung, sondern darüber hinaus auch zur Abnahme der Reendothelialisierung in Gefäßen mit der Gefahr der Spätthrombose, wodurch eine duale Plättchenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel über einen längeren Zeitraum von mindestens 12 Monaten erforderlich wird. Dies ist wiederum mit einer erhöhten Rate an Blutungskomplikationen verbunden. Ein wichtiges Protein in diesem Zusammenhang ist der Gewebefaktor (tissue factor, TF). Er stellt den Hauptinitiator bei der Thrombose und der extrinsischen Antikoagulation dar und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Stent-Thrombose und der In-Stent-Restenose. Nach einer Plaque-Ruptur kommt es zu einer erhöhten TF-Expression. Das induziert die arterielle Thrombose, welche eine der Hauptursachen des akuten Koronarsyndroms, in Form der instabilen Angina pectoris und des akuten Myokardinfarktes darstellt. Rapamycin erhöht die TF-Proteinexpression. Weitere Marker für die Spätthrombose sind RhoA und p38MAPK. Dabei handelt es sich um positive Regulatoren der TF-Expression, auf die Rapamycin keinen Einfluss hat. Eine Therapieoption der Spätthrombose besteht in der Applikation von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine). Diese hemmen die TF-Expression [91]. Weiterhin wird postuliert, dass DMSO über eine Aktivierung der PI3K negativ die TF-Expression reguliert. Demnach käme DMSO als neue Strategie bei der Stent-Beschichtung und der Behandlung des akuten Koronarsyndroms in Betracht. In diesem Zusammenhang wurde DMSO nach Gefäßverletzung *in vivo* am Mausmodell getestet. Dabei zeigte sich keine Thrombusbildung [12].

In den durchgeführten Experimenten wurde Rapamycin in einer mittleren Konzentration von 6nM eingesetzt. Durch diese Konzentration wurde zwar keine komplette Reversibilität der DMSO-Wirkung erreicht, aber höhere Konzentrationen von Rapamycin führten auch nicht zu einer Erhöhung der Expression kontraktile Proteine. Die Untersuchungen zur Signaltransduktion zeigten, dass 6nM Rapamycin eine suffiziente Blockade von mTOR ermöglichen. In Patienten nach Organtransplantation wird ein Zielspiegel von 4 bis 12ng/ml (4,4 bis 13,1nM) angestrebt. Zur Pharmakokinetik Rapamycin-beschichteter Stents beim Menschen gibt es nur wenig verfügbare Daten. In einem Schweinemodell wurde eine Stunde nach Implantation eines Rapamycin-beschichteten Stents über einen Maximalwert im Gewebe von 2,88nM (2,63ng/ml) Rapamycin berichtet [83]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass in MSC bereits eine Konzentration von 1nM zur vollen Ausprägung der pleiotropen Effekte in

Hinblick auf die glattmuskuläre Differenzierung ausreicht. Daher könnte es möglich sein, bereits mit sehr geringen Rapamycin-Dosen therapeutische Wirkungen zu erzielen, die mit weniger Nebenwirkungen belastet sind. Auch die Kontrolle der Menge von lokal freigesetztem Rapamycin aus beschichteten Stents mit der Möglichkeit unterschiedlicher Zielkonzentrationen rückt in den Fokus des Interesses [21], so dass die hier dargestellten Ergebnisse auch in diesem Zusammenhang von großem Interesse sind. Allerdings sind Rückschlüsse von Rapamycin-Konzentrationen aus *in vitro*-Experimenten auf tatsächliche Konzentrationen *in vivo* nur mit großer Vorsicht zu ziehen, so dass klinische Studien erforderlich sind, um Klarheit zu schaffen.

Eine weitere Möglichkeit für innovative Therapieansätze stellt die therapeutische Applikation von MSC dar, die je nach Einsatzgebiet auch genetisch modifiziert sein können. Solche MSC könnten beispielsweise nach systemischer Verabreichung zu Gefäßläsionen gelangen und dort der Neointimabildung entgegenwirken. Für derartige Anwendungen sind MSC in besonderer Weise geeignet, da sie als potenzielle therapeutische Targets viele Vorteile aufweisen: Sie sind leicht durch eine Knochenmarkpunktion freiwilliger adulter Spender zu erhalten, sind einfach expandierbar und zeigen in Kultur ein langes Überleben. Außerdem weisen sie ein breites Spektrum an Differenzierungspotenzial auf und stellen durch genetische oder biochemische Modifikationen eine Option zur Zelltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen dar [43]. Darüber hinaus exprimieren MSC keine MHC-Klasse-II-Antigene und tragen an ihrer Zelloberfläche nur geringe Mengen MHC-Klasse-I-Antigene, so dass sie als immunprivilegierte Zellen unabhängig von den Gewebemerkmale des Spenders keine Abstoßungsreaktion hervorrufen und daher gut in einer Zellbank gelagert und bei beliebigen Empfängern eingesetzt werden können [16, 63, 69].

5 Zusammenfassung

Die gemeinsame Endstrecke von Gefäßschädigungen, seien sie mechanischer, metabolischer oder entzündlicher Natur, ist die progrediente Einengung des Gefäßlumens durch Zellen, die glatten Gefäßmuskelzellen ähneln und die sogenannte Neointima bilden. In einer immer älter werdenden Gesellschaft mit einer hohen Morbidität und Mortalität aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen, die mit einer Neointimabildung einhergehen, gewinnen neue Strategien zur Verhinderung dieser Neointimabildung in der medizinischen Forschung mehr und mehr an Bedeutung. Das Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen insbesondere der Differenzierungs- und Dedifferenzierungsvorgänge der beteiligten Zellen ist hierfür von größter Wichtigkeit.

In der aktuellen Forschung gibt es Belege dafür, dass an der Neointimabildung zum Beispiel im Rahmen der Arteriosklerose, der Restenose nach Koronarangioplastie oder der Transplantatvaskulopathie nicht nur, wie früher angenommen wurde, lokale glatte Gefäßmuskelzellen aus der Media beteiligt sind, sondern auch zirkulierende Vorläuferzellen wie mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark hierzu in unterschiedlichem Ausmaß beitragen können.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das glattmuskuläre Differenzierungspotenzial humaner, adulter MSC aus dem Knochenmark zu charakterisieren und die hierbei beteiligten Signaltransduktionswege aufzudecken. Es wurde anhand von Immunfluoreszenz- und Western-blot-Untersuchungen gezeigt, dass humane MSC unter *in vitro*-Bedingungen zu einem hohen Prozentsatz einen kontraktilen Phänotyp annehmen können, der glatten Gefäßmuskelzellen gleicht. Dies ist eine Grundvoraussetzung für eine Beteiligung von MSC an der Neointimabildung nach Gefäßschädigungen. Signaltransduktionsanalysen ergaben, dass für die Differenzierung von MSC in glatte Gefäßmuskelzellen dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eine zentrale Rolle zukommt. Weitere Experimente mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 und dem mTOR-Inhibitor Rapamycin bestätigten die Beeinflussbarkeit der glattmuskulären Differenzierung von MSC durch Modulation des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges.

Die hier dargestellten Erkenntnisse können als Ausgangspunkt für pharmakologische Interventionen genutzt werden, die darauf abzielen, pathologische

Gefäßumbauprozesse durch zirkulierende MSC zu verhindern und stattdessen diese Zellen als endogene Regeneratoren von geschädigten Gefäßen einzusetzen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abedin, M.; Tintut, Y.; Demer, L.L: Mesenchymal Stem Cells and the Artery Wall; *Circ Res*, 2004, 95: 671-676
- [2] Alfonso-De Matte, M. Y.; Cheng, J. Q.; Kruk, P. A.: Ultraviolet irradiation- and dimethyl sulfoxide-induced telomerase activity in ovarian epithelial cell lines; *Exp Cell Res*, 2001, 267 (1): 13-27
- [3] Alison, M. R.; Poulosom, R.; Forbes, S. and Wright, N. A.: An introduction to stem cells; *J Pathol*, 2002, 197: 419-423
- [4] Alvarez, B.; Garrido, E., Garcia-Sanz, J.A.; Carrera, A.C.: Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate; *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 26466-73
- [5] Asahara, T.; Masuda, H.; Takahashi, T.; Kalka, C.; Pastore, C.; Silver, M.; Kearne, M.; Magner, M. and Isner, J. M.: Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization; *Circ Res*, 1999, 85: 221-228
- [6] Bao, J.; Oishi, K.; Yamada, T.; Liu, L.; Nakamura, A.; Uchida, M. K. and Kohama, K.: Role of the short isoform of myosin light chain kinase in the contraction of cultured smooth muscle cells as examined by its down-regulation; *PNAS*, 2002, 99: 9556-9561
- [7] Bertrand, F. E.; Spengeman, J. D.; Shelton, J. G. and McCubrey, J. A.: Inhibition of PI3K, mTOR and MEK signaling pathways promotes rapid apoptosis in B-lineage ALL in the presence of stromal cell support; *Leukemia*, 2005, 19: 98-102
- [8] Braun-Dullaeus, R.C.; Mann, M.J.; Seay, U.; Zhang, L.; von der Leyen, H.E.; Morris, R.E.; Dzau, V. J.: Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(7): 1152-8
- [9] Brennan, P.; Babbage, J. W.; Thomas, G. and Cantrell, D.: p70^{S6k} Integrates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Rapamycin-Regulated Signals for E2F Regulation in T-Lymphocytes; *Mol Cell Biol*, 1999, 19(7): 4729-4738
- [10] Burgering, B. M. TH.; Coffey, P. J.: Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction; *Nature*, 2002, 376: 599-602

- [11] Calabro, P.; Samudio, I.; Willerson, J.T.; Yeh, E.T.H.: Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways; *Circulation*, 2004, 110(21): 3335-40
- [12] Camici, G.G.; Steffel, J.; Akhmedov, A.; Schafer, N.; Baldinger, J.; Schulz, U.; Shojaati, K.; Matter, C.M.; Yang, Z.; Lüscher, T.F.; Tanner, F.C.: Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: a potential treatment strategy for drug-eluting stents; *Circulation*, 2006, 114(14): 1512-21
- [13] Chang, F.; Lee, J. T.; Navolanic, P. M.; Steelman, L. S.; Shelton, J. G.; Blalock, W. L.; Franklin, R. A. and McCubrey, J. A.: Involvement of PI3K/ Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy; *Leukemia*, 2003, 17: 590-603
- [14] Chen, J.; Li, Y.; Wang, L.; Lu, M.; Zhang, X.; Chopp, M.: Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats; *J Neurol Sci*, 2001, 189: 49-57
- [15] Choi, E.-K.; Park, H.-J.; Ma, J.-S.; Lee, H.-C.; Kang, H.-C.; Kim, B.-G.; Kang, I.-C.: LY294002 inhibits monocyte chemoattractant protein-1 expression through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism; *FEBS Letters*, 2004, 559: 141-144
- [16] Colter, D. C.; Class, R.; DiGirolamo, C. M. and Prockop, D. J.: Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow; *PNAS*, 2000, 97(7): 3213-3218
- [17] Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317
- [18] Franke, T. F.; Kaplan, D. R.; Cantley, L. C.; Toker, A.: Direct Regulation of the Akt Proto-Oncogene Product by Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate; *Science*, 1997, 275: 665-668
- [19] Fukuda, D.; Sata, M.; Tanaka, K.; Nagai, R.: Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells; *Circulation*, 2005; 111(7): 926-31

- [20] Gallo, R.; Paduran, A.; Jayaraman, T.; Marx, S.; Roque, M.; Adelman, S.; Chesebro, J.; Fallon, J.; Fuster, V.; Marks, A.; Badimon, J.J.: Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle; *Circulation*, 1999; 99(16): 2164-2170
- [21] García-García, H.M.; Vaina, S.; Tsuchida, K.; Serruys, P.W.: Drug-eluting Stents; *Arch Cardiol Mex*, 2006, 76(3): 297-319
- [22] Glaser, R.; Lu, M. M.; Narula, N.; Epstein, J. A.: Smooth Muscle Cells, But Not Myocytes, of Host Origin in Transplanted Human Hearts; *Circulation*, 2002, 106: 17-19
- [23] Grimm, P. C.; Nickerson, P.; Jeffery, J.; Savani, R. C.; Gough, J.; McKenna, R. M.; Stern, E. and Rush, D. N.: Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection; *N Engl J Med*, 2001, 345(2): 93-97
- [24] Gurtovenko, A. A.; Anwar, J.: Modulation the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide; *J Phys Chem B*, 2007, 111 (35): 10453-60
- [25] Gustafsson, F.; Ross, H. J.: Proliferation signal inhibitors in cardiac transplantation, *Current Opinion in Cardiology*, 2007, 22(2): 111-116
- [26] Haery, C.; Sachar, R.; Ellis, S.G.: Drug-eluting Stents: the beginning of the end of restenosis?; *Cleve Clin J Med*, 2004, 71(10): 815-24
- [27] Halayko, A.J.; Kartha, S.; Stelmack, G.L.; McConville, J.; Tam, J.; Camoretti-Mercado, B.; Forsythe, S.M.; Hershenson, M.B.; Solway, J.: Phosphatidylinositol 3-kinase/ mammalian target of rapamycin/ p70S6K regulates contractile protein accumulation in airway myocyte differentiation; *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(3): 266-75
- [28] Han, C.; Campbell, G. R.; Campbell, J. H.: Circulating Bone Marrow Cells Can Contribute to Neointimal Formation; *J Vasc Res*, 2001, 38: 113-119
- [29] Hayashi, K.; Saga, H.; Chimori, Y.; Kimura, K.; Yamanaka, Y. and Sobue, K.: Differentiated Phenotype of Smooth Muscle Cells Depends on Signaling Pathways through Insulin-like Growth Factors and Phosphatidylinositol 3-Kinase; *J Biol Chem*, 1998, 273(44): 28860-28867

- [30] Hayashi, K.; Takahashi, M.; Kimura, K.; Nishida, W.; Saga, H. and Sobue, K.: Changes in the Balance of Phosphoinositide 3-Kinase/ Protein Kinase B (Akt) and the Mitogen-activated Protein Kinases (ERK/ p38MAPK) Determine a Phenotype of Visceral and Vascular Smooth Muscle Cells; *J Cell Biol*, 1999, 145(4): 727-740
- [31] Hegner, B.; Weber, M.; Dragun, D.; Schulze-Lohoff, E.: Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells; *Journal of Hypertension*, 2005, 23(6): 1191-1202
- [32] Hegner, B.; Lange, M.; Kusch, A.; Essin, K.; Sezer, O.; Schulze-Lohoff, E.; Luft, F. C.; Gollasch, M.; Dragun, D.: mTOR Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation From Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Progenitors, *Arterioscler Thromb. Vasc Biol*, 2009, 29(2): 232-238
- [33] Hillebrands, J.-L.; Klatter, F. A.; Hurk, B. M. H. van den; Popa, E. R.; Nieuwenhuis, P. and Rozing, J.: Origin of neointimal endothelium and α -actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis; *J Clin Invest*, 2001, 107: 1411-1422
- [34] Hillebrands, J.-L.; Klatter, F. A.; van Dijk, W. D.; Rozing, J.: Bone marrow does not contribute substantially to endothelial-cell replacement in transplant arteriosclerosis; *Nat Med*, 2002, 8(3): 194-195
- [35] Hillebrands, J.-L.; Klatter, F. A.; Rozing, J.: Origin of Vascular Smooth Muscle Cells and the Role of Circulating Stem Cells in Transplant Arteriosclerosis; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 380-387
- [36] Hirschi, K. K. and Majesky, M. W.: Smooth Muscle Stem Cells; *Anat Rec Part A*, 2004, 276A: 22-33
- [37] Hoerstrup, S. P.; Kadner, A.; Melnitchouk, S.; Trojan, A.; Eid, K.; Tracy, J.; Sodian, R.; Visjager, J. F.; Kolb, S. A.; Grunenfelder, J.; Zund, G.; Turina, M. I.: Tissue Engineering of Functional Trileaflet Heart Valves From Human Marrow Stromal Cells; *Circulation*, 2002, 106[suppl I]: I-143-I-150
- [38] Hu, Y.; Davison, F.; Ludewig, B.; Erdel, M.; Mayr, M.; Url, M.; Dietrich, H.; Xu, Q.: Smooth Muscle Cells in Transplant Atherosclerotic Lesions Are Originated From Recipients, but Not Bone Marrow Progenitor Cells; *Circulation*, 2002, 106: 1834-1839

- [39] Isomoto, S.; Hattori, K.; Ohgushi, H.; Nakajima, H.; Tanaka, Y.; Takakura, Y.: Rapamycin as an inhibitor of osteogenic differentiation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells; *J Orthop Sci*, 2007; 12(1): 83-8
- [40] Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L.; Schwartz, R. E.; Keene, C. D.; Ortiz-Gonzalez, X. R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W. C.; Largaespada, D. A. and Verfaillie, C. M.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow; *Nature*, 2002, 418: 41-49
- [41] Kanayasu-Toyoda, T.; Yamaguchi, T.; Uchida, E.; Hayakawa, T.: Commitment of Neutrophilic Differentiation and Proliferation of HL-60 Cells Coincides with Expression of Transferrin Receptor; *J Biol Chem*, 1999, 274(36): 25471-25480
- [42] Kis, A.; Yellon, D. M.; Baxter, G. F.: Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2003, 35: 1063-1071
- [43] Kong, D. K.; Melo, L. G.; Mangi, A. A.; Zhang, L.; Lopez-Illasaca, M.; Perrella, M. A.; Liew, C. C.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J.: Enhanced Inhibition of Neointimal Hyperplasia by Genetically Engineered Endothelial Progenitor Cells; *Circulation*, 2004, 109: 1769-1775
- [44] Lee, Y. R.; Shim, H. J.; Yu, H. N.; Song, E. K.; Park, J.; Kwon, K. B.; Park, J. W.; Rho, H. W.; Park, B. H.; Han, M. K.; Kim, J. S.: Dimethylsulfoxide induces upregulation of tumor suppressor protein PTEN through nuclear factor-kappaB activation in HL—60 cells; *Leuk Res*, 2005, 29 (4): 401-5
- [45] Li, S.; Sims, S.; Jiao, Y.; Chow, L. H.; Pickering, J. G.: Evidence From a Novel Human Cell Clone That Adult Vascular Smooth Muscle Cells Can Convert Reversibly Between Noncontractile and Contractile Phenotypes; *Circ Res*, 1999, 85: 338-348
- [46] Majka, S. M.; Jackson, K. A.; Kienstra, K. A.; Majesky, M. W.; Goodell, M. A. and Hirschi, K. K.: Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration; *J Clin Invest*, 2003, 111: 71-79
- [47] Mancini, D.; Pinney, S.; Burkhoff, D.; LaManca, J.; Itescu, S.; Burke, E.; Edwards, N.; Oz, M.; Marks, A. R.: Use of Rapamycin Slows Progression of Cardiac Transplantation Vasculopathy; *Circulation*, 2003, 108: 48-53

- [48] Mangi, A. A.; Noiseux, N.; Kong, D.; He, H.; Rezvani, M.; Ingwall, J. S. and Dzau, V. J.: Mesenchymal stem cells modified with Akt prevents remodeling and restore performance of infarcted hearts; *Nature Med*, 2003, 9(9): 1195-1201
- [49] Manning, B. D.: Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis; *J Cell Biol*, 2004, 167(3): 399-403
- [50] Martin, K.A.; Rzuicidlo, E.M.; Merenick, B.L.; Fingar, D.C.; Brown, D.J.; Wagner, R.J.; Powell, R.J.: The mTOR/ p70S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation; *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(3): C507-17
- [51] Martin, K. A.; Merenick, B. L.; Ding, M.; Fetalvero, K. M.; Rzuicidlo, E. M.; Kozul, C. D.; Brown, D. J.; Chiu, H. Y.; Shyu, M.; Drapeau, B. L.; Wagner, R. J. and Powell, R. J.: Rapamycin Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation through Insulin Receptor Substrate-1/Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt2 Feedback Signaling, *J Biol Chem*, 2007, 282 (49): 36112-36120
- [52] Marx, S. O.; Marks, A. R.: Bench to bedside: The Development of Rapamycin and Its Application to Stent Restenosis; *Circulation*, 2001, 104: 852-855
- [53] Mourani, P.M.; Garl, P.J.; Wenzlau, J.M.; Carpenter, T.C.; Stenmark, K.R.; Weiser-Evans, M.C.M.: Unique, highly proliferative growth phenotype expressed by embryonic and neointimal smooth muscle cells is driven by constitutive Akt, mTOR and p70S6K signaling and is actively repressed by PTEN; *Circulation*, 2004, 109(10): 1299-306
- [54] Murata, Y.; Watanabe, T.; Sato, M.; Momose, Y.; Nakahara, T.; Oka, S.; Iwahashi, H.: Dimethyl Sulfoxide Exposure Facilitates Phospholipid Biosynthesis and Cellular Membrane Proliferation in Yeast Cells; *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 33185-33193
- [55] Müller, P.; Pfeiffer, P.; Koglin, J.; Schäfers, H.-J.; Seeland, U.; Janzen, I.; Urbschat, S.; Böhm, M.: Cardiomyocytes of Noncardiac Origin in Myocardial Biopsies of Human Transplanted Hearts; *Circulation*, 2002, 105: r138-r142
- [56] Obermeier, A.; Lammers, R.; Wiesmüller, K.-H.; Jung, G.; Schlessinger, J. and Ullrich, A.: Identification of Trk Binding Sites for SHC and Phosphatidylinositol 3'-Kinase and Formation of a Multimeric Signaling Complex; *J Biol Chem*, 1993, 268(31): 22963-22966
- [57] Ohkawa, Y.; Hayashi, K. and Sobue, K.: Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells; *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301: 78-83

- [58] Opalka, B.; Schütt, P.: Ein neuer Akt in der Tumorthherapie? Inhibition des PI3K/Akt-Kinasewegs als neue Therapieoption bei Tumorerkrankungen; *TumorDiagn u Ther*, 2005; 26: 105-112
- [59] Özüyaman, B.; Kelm, M.: Mesenchymal stem cells: unknown mechanisms of differentiation; *Journal of Hypertension*, 2005, 23: 1133-1134
- [60] Patterson, C.; Mapera, S.; Li, H.-H.; Madamanchi, N.; Hilliard, E.; Lineberger, R.; Herrmann, R.; Charles, P.: Comparative effects of paclitaxel and rapamycin on smooth muscle migration and survival: role of Akt-dependent signaling; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006, 26(7): 1473-80
- [61] Păunescu, V.; Deak, E.; Herman, D.; Siska, I.R.; Tănasie, G.; Bunu, C.; Anghel, S.; Tatu, C.A.; Oprea, T.I.; Henschler, R.; Ruster, B.; Bistran, R.; Seifried, E.: In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage; *J Cell Mol Med*, 2007, 11(3): 502-508
- [62] Pene, F.; Claessens, Y.-E.; Muller, O.; Vigiúé, F.; Mayeux, P.; Dreyfus, F. and Bouscary, D.: Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt and mTOR/ P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma; *Oncogene*, 2002, 21: 6587-6597
- [63] Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R.: Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells; *Science*, 1999, 284: 143-147
- [64] Pittenger, M.F.; Martin, B.J.: Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics; *Circ Res*, 2004, 95: 9-20
- [65] Poh, T. W.; Pervaiz, S.: LY294002 and LY303511 Sensitize Tumor Cells to Drug-Induced Apoptosis via Intracellular Hydrogen Peroxide Production Independent of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt Pathway; *Cancer Res*, 2005; 65(14): 6264-6274
- [66] Poon, M.; Marx, S. O.; Gallo, R.; Badimon, J. J.; Taubman, M. B. and Marks, A. R.: Rapamycin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Migration; *J Clin Invest*, 1996, 98(10): 2277-2283
- [67] Poulson, R.; Alison, M. R.; Forbes, S. and Wright, N. A.: Adult stem cell plasticity; *J Pathol*, 2002, 197: 441-456
- [68] Raught, B.; Gingras, A.-C. and Sonenberg, N.: The target of rapamycin (TOR) proteins; *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(13): 7037-7044

- [69] Reyes, M.; Lund, T.; Lenvik, T.; Aguiar, D.; Verfaillie, C. M.: Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells; *Blood*, 2001, 98(9): 2615-2625
- [70] Saiura, A.; Sata, M.; Hirata, Y.; Nagai, R.; Makuuchi, M.: Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis; *Nat Med*, 2001, 7(4): 382-383
- [71] Sata, M.; Saiura, A.; Kunisato, A.; Tojo, A.; Okada, S.; Tokuhisa, T.; Hirai, H.; Makuuchi, M.; Hirata, Y. and Nagai, R.: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis; *Nat Med*, 2002, 8(4): 403-409
- [72] Sata, M.: Circulating Vascular Progenitor Cells Contribute to Vascular Repair, Remodeling, and Lesion Formation; *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(6): 249-253
- [73] Sata, M.; Fukuda, D.; Tanaka, K.; Kaneda, Y.; Yashiro, H.; Shirakawa, I.: The role of circulating precursors in vascular repair and lesion formation; *J Cell Mol Med*, 2005, 9(3): 557-568
- [74] Schauwienold, D.; Plum, C.; Helbing, T.; Voigt, P.; Bobbert, T.; Hoffmann, D.; Paul, M.; Reusch, H.P.: ERK 1/2-dependent contractile protein expression in vascular smooth muscle cells; *Hypertension*, 2003, 41(3): 546-552
- [75] Schmelzle, T.; Hall, M. N.: TOR, a Central Controller of Cell Growth; *Cell*, 2000, 103: 253-262
- [76] Schober, A.: Chemokines in Vascular Dysfunction and Remodeling, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: 1950-1959
- [77] Schwartz, S. M.; Campbell, G. R. and Campbell, J. H.: Replication of Smooth Muscle Cells in Vascular Disease; *Circ Res*, 1986, 58: 427-444
- [78] Shelton, J. G.; Steelman, L. S.; Lee, J. T.; Knapp, S. L.; Blalock, W. L.; Moye, P. W.; Franklin, R. A.; Pohnert S. C.; Mirza, A. M.; MyMahon, M. and McCubrey, J. A.: Effects of the RAF/ MEK/ ERK and PI3K/ Akt signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells; *Oncogene*, 2003, 22: 2478-2492
- [79] Shimizu, K.; Sugiyama, S.; Aikawa, M.; Fukumoto, Y.; Rabkin, E.; Libby, P. and Mitchell, R. N.: Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy; *Nat Med*, 2001, 7(6): 738-741

- [80] Simper, D.; Stalboerger, P. G.; Panetta, C. J.; Wang, S.; Caplice, N. M.: Smooth Muscle Progenitor Cells in Human Blood; *Circulation*, 2002, 106: r41-r46
- [81] Soltoff, S. P.; Rabin, S. L.; Cantley, L. C. and Kaplan, D. R.: Nerve Growth Factor Promotes the Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Its Association with the trk Tyrosine Kinase; *J Biol Chem*, 1992, 267(24): 17472-17477
- [82] Sun, S.-Y.; Rosenberg, L.M.; Wang, X.; Zhou, Z.; Yue, P.; Fu, H.; Khuri, F.R.: Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition; *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7052-8
- [83] Suzuki, T.; Kopia, G.; Hayashi, S.; Bailey, L. R.; Llanos, G.; Wilensky, R.; Klugherz, B. D.; Papandreou, G.; Narayan, P.; Leon, M. B.; Yeung, A. C.; Tio, F.; Tsao, P. S.; Falotico, R.; Carter, A. J.: Stent-Based Delivery of Sirolimus Reduces Neointimal Formation in a Porcine Coronary Model; *Circulation*, 2001, 104: 1188-1193
- [84] Tanaka, K.; Sata, M.; Hirata, Y.; Nagai, R.: Diverse Contribution of Bone Marrow Cells to Neointimal Hyperplasia After Mechanical Vascular Injuries; *Circ Res*, 2003, 93: 783-790
- [85] Vlahos, C. J.; Matter, W. F.; Hui, K. Y. and Brown, R. F.: A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002); *J Biol Chem*, 1994, 269(7): 5241-5248
- [86] Wagers, A. J.; Sherwood, R. I.; Christensen, J. L.; Weissman, I. L.: Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells; *Science*, 2002, 297: 2256-2259
- [87] Walker, E. H.; Pacold, M. E.; Perisic, O.; Stephens, L.; Hawkins, P. T.; Wymann, M. P.; Williams, R. L.: Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine; *Molecular Cell*, 2000, 6: 909-919
- [88] Werner, N.; Junk, S.; Laufs, U.; Link, A.; Walenta, K.; Böhm, M.; Nickenig, G.: Intravenous Transfusion of Endothelial Progenitor Cells Reduces Neointima Formation After Vascular Injury; *Circ Res*, 2003, 93: e17-e24
- [89] Wetzker, R.; Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie, Klinikum der Universität Jena: Irrungen und Perspektiven der Phosphoinositid 3-Kinase-Forschung; *BIOspektrum*, 05/ 2004

- [90] Zhai, W.; Eynott, P.R.; Oltmanns, U.; Leung, S.Y.; Chung, K.F.: Mitogen-activated protein kinase signalling pathways in IL-1- β -dependent rat airway smooth muscle proliferation; *Br J Pharmacol*, 2004, 143: 1042-1049
- [91] Zhu, S.; Viswambharan, H.; Gajanayake, T.; Ming, X.-F.; Yang, Z.: Sirolimus increases tissue factor expression but not activity in cultured human vascular smooth muscle cells; *BMC Cardiovasc Disord*, 2005, 5: 22
- [92] Ziegelhoeffer, T.; Fernandez, B.; Kostin, S.; Heil, M.; Voswinckel, R.; Helisch, A.; Schaper, W.: Bone Marrow-Derived Cells do Not Incorporate Into the Adult Growing Vasculature; *Circ Res*, 2004, 94: 230-238

7 Anhang

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Hegner, B.; Lange, M.; Kusch, A.; Essin, K.; Sezer, O.; Schulze-Lohoff, E.; Luft, F. C.; Gollasch, M.; Dragun, D.:

mTOR Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation From Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Progenitors

Arterioscler Thromb. Vasc Biol, 2009, 29(2): 232-238

Erklärung

„Ich, Maria Lange, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der Signaltransduktionskaskade glattmuskulärer Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 24.01.2011