

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II-
Molekulare Zellbiologie

des Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
Direktorin: Frau Prof. Dr. Dr. Beisiegel

Effekte von *delta-like-factor 1*

auf den Lipoproteinstoffwechsel

adulter humaner mesenchymaler Knochenmarksstammzellen

während adipogener und osteogener Differenzierung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Humanmedizin der Universität Hamburg

vorgelegt von Lisa Buddrus

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 10.06.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. T. Schinke

Datum der mündlichen Prüfung: 10.06.2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	2
1.1 Delta- like factor 1 (dlk1).....	2
1.2 Lipoproteinstoffwechsel.....	4
1.2.1 postprandialer Lipoproteinstoffwechsel	
1.2.3 Apo- Lipoprotein E (Apo E)	
1.3 Funktion von Adipozyten im Knochenmark.....	11
1.3.1 Verbindungen von Lipoproteinstoffwechsel und Knochenmetabolismus	
1.4 Ziel der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 kontinuierliche Zellkultur.....	14
2.2 Osteoblasten Differenzierung.....	15
2.3 Adipozyten Differenzierung.....	16
2.4 Immunfluoreszenz.....	17
2.5 Fettrotfärbung.....	19
2.6 cDNA- Synthese aus Zellpellets.....	19
2.7 Konzentrationsbestimmung von cDNA.....	20
2.8 RT- PCR.....	20
2.9 Agarose Gel.....	23
2.10 Membranproteinisolierung.....	24
2.11 (Membran-) Proteinbestimmung.....	26
2.12 SDS- Page.....	27

2.13 Western Blot.....	28
2.14 Apo E- Elisa.....	31
2.15 Isolierung von Chylomikronen Remnants.....	34
2.16 Jodierung von Chylomikronen- Remnants.....	35
2.17 Radioaktive Aufnahmeassays.....	36
3 Ergebnisse	38
3.1 dlk1- Überexpression im hMSC- Tert 20- Zellmodell.....	38
3.2 Inhibition der Differenzierung zu Osteoblasten und Adipozyten durch dlk1.	41
3.2.1 Inhibition der adipogenen Differenzierung durch dlk1	
3.2.2 Inhibition der osteogenen Differenzierung durch dlk1	
3.3 Effekt der dlk1- Überexpression auf den Lipoproteinstoffwechsel von hMSC- Tert 20.....	47
3.5 Radioaktive Aufnahmeassays.....	56
4 Diskussion	60
5 Zusammenfassung	65
6 Literaturverzeichnis	67
7 Abkürzungsverzeichnis	78
8 Danksagung	80
9 Erklärung	81
10 Lebenslauf	82

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurden die Effekte des delta- like Factor 1 auf den Lipoproteinstoffwechsel humaner mesenchymaler Stammzellen während adipogener und osteogener Differenzierung untersucht.

1.1 Delta- like factor 1 (dlk1)

Delta- like factor 1 (dlk1) ist ein 50- 60 kDa großes Transmembranprotein, dessen Gen erstmalig in 3T3- Präadipozyten auf dem Chromosom 14q32 in einem Screening für adipogene Differenzierung- regulierende Gene gefunden wurde ¹. Die Bezeichnung dlk1 ist dem humanen Modell vorbehalten, die Bezeichnung Präadipozyten- Faktor (pref-1) dem Mausmodell.

In Präadipozyten fand man mehrere Formen von dlk1, unter anderem auch drei lösliche Formen der Größe 25 kDa, 50 kDa und 31 kDa, welche die Bezeichnung fetal Antigen (fa1) erhielten.

Das Protein enthält sechs dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)- ähnliche Motive in der extrazellulären Domäne. Diese Motive stellen eine 35- 40 aminosäurehaltige Domäne mit sechs Cysteinresten dar.

EGF- ähnliche Domänen befinden sich in vielen Molekülen, die Protein- Protein- Interaktionen regulieren und Zellwachstum und Differenzierung kontrollieren ².

Pref-1 ist in vielen embryonalen Geweben exprimiert, z.B. in der Leber, der Lunge, der Zunge und im Knochen. Nach der Geburt ist pref- 1 in den meisten Geweben nicht mehr nachzuweisen, außer in Präadipozyten, pankreatischen β - Zellen, Thymozyten und Zellen der Nebenniere ^{3, 4, 5, 6}.

Die Pref-1- Expression in Präadipozyten nimmt im Laufe der adipogenen Differenzierung ab und ist in reifen Adipozyten nicht mehr nachweisbar ⁷.

Es besteht eine inverse Korrelation der Pref-1- Expression zu der Expression adipogener Differenzierungsmarker wie C/EBP und PPAR γ ⁸.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass dlk1 eine entscheidende Rolle in der Regulierung adipogener Differenzierung spielt.

Erste Erkenntnisse über die Funktion von Pref-1 gab es während der Untersuchung von 3T3- Präadipozyten mit stabiler Pref-1- Überexpression.

Die Präadipozyten waren nicht in der Lage, die Pref-1- Expression unter Behandlung mit adipogenen Differenzierungsstimuli wie z.B. Dexamethason zu regulieren.

Durch stabile Expression von Pref-1 oder Zugabe von löslichem fa1 verloren die Präadipozyten die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung ⁹. Um weitere Erkenntnisse über die Funktion von Pref-1 zu erlangen, wurde von Moon et al. 2002 ein Mausmodell mit homozygoter Pref- 1- Inaktivierung etabliert ¹⁰.

Diese Mäuse zeigten prä- und postnatale Wachstumsretardierung, Augenlidveränderungen in Form einer Blepharophimosis und Skelettmalformationen in Form von asymmetrischen Verbindungen der Rippen mit dem Sternum oder Fusion von Rippen.

Die Tatsache, dass die Embryos des Pref- 1- inaktivierten Mausmodells kleiner waren als die Wildtyp- Embryos und 50% der Pref- 1- inaktivierten Mäuse zwei Tage nach der Geburt verstarben, wies darauf hin, dass Pref-1 vor allem eine wichtige Funktion in der embryonalen Entwicklung hat.

Die Untersuchung der Fettpolster (inguinal und retroperitoneal) zeigte, dass diese bei Pref- 1- inaktivierten Mäusen im Alter von 8 Wochen ähnlich stark ausgeprägt waren wie bei Wildtypmäusen, bei 16 Wochen alten weiblichen Mäusen mit 13-wöchiger hochkalorischer Diät allerdings eine signifikant höhere Fettpolstermasse bei den Pref- 1- inaktivierten Mäusen aufwies.

Im Gegensatz zu den Modellen mit Pref-1- Inaktivierung bewirkte eine Überexpression oder eine Zugabe von löslichem fa-1 eine Inhibierung der adipogenen Differenzierung von 3T3-Präadipozyten ⁹.

Die regulierende Funktion des Pref-1 in der Differenzierung zu Adipozyten wurde hier deutlich.

Ein weiterer interessanter Zusammenhang besteht zwischen dem Pref-1- inaktivierten Mausmodell und einer genetischen Erkrankung, der maternalen uniparentalen Disomie (mUPD).

Die humane maternale uniparentale Disomie 14 ist eine genetische Erkrankung, bei der beide Allele von nur einem Elternpaar vererbt werden, im Falle der humanen maternalen UPD 14 nur von der Mutter.

Das entsprechende Krankheitsbild im Mausmodell ist die mUPD 12.

Das Krankheitsbild ist geprägt von verschiedenen Deformitäten und Störungen, wie z.B. Skoliose, Hypotonie, Fettleibigkeit, Blepharophimosis und verfrühte Pubertät ^{11, 12, 13} und zeigt mit dem Phänotyp der Pref-1- inaktivierten Mäuse einige Übereinstimmung (s.o.).

Interessant ist der Aspekt, dass dlk1 bzw. Pref-1 an diesen betroffenen Regionen (bei der Maus Chromosom 12, beim Menschen Chromosom 14) ihren Genlocus haben ^{14, 13} und die Proteine nur vom paternalen Allel exprimiert werden ^{15, 16}.

Man könnte also vermuten, dass der durch die Disomie verursachte Genverlust von Pref-1 bzw. dlk1 für einige der Symptome der mUPD wie Fettleibigkeit und verfrühte Pubertät verantwortlich ist.

Abdallah et al. zeigten 2004 an fetalem und adultem Knochen, dass dlk1 in fetalem Knochen exprimiert wird und die Expression bis zur Woche 11 der Entwicklung ansteigt, während im adulten Knochen die Expression wieder abnimmt ¹⁷.

Immunzytochemische Färbungen zeigten im Vergleich zu dem reifen Knochen eine höhere dlk1- Expression in Osteoblasten und im Periost des sich entwickelnden Knochen.

Abdallah et al. etablierten 2004 eine humane mesenchymale Knochenmarksstammzelllinie mit dlk1- Überexpression (hMSC- Tert 20- dlk1) ¹⁷.

Im Vergleich von hMSC- Tert 20- dlk1 mit hMSC- Tert 20 wurde gezeigt, dass die dlk1- Überexpression zwar die Zellproliferation nicht beeinflusst, die Differenzierung zu reifen Adipozyten und Osteoblasten und die Knochenmatrixbildung aber deutlich gehemmt werden.

Mit welchen Mechanismen dlk1 bzw. Pref1 die Differenzierung von hMSC zu Adipozyten und Osteoblasten beeinflusst, ist noch nicht bekannt.

1.2 Lipoproteinstoffwechsel

Da nur eine geringe Menge an exogen mit der Nahrung aufgenommenen unveresterten freien Fettsäuren im Blut an Serumalbumin gebunden transportiert wird, gelangt der größere Teil der hydrophoben Lipide durch das wässrige Milieu des Lymphsystems und Blutkreislaufes in Form von hydrophilen Lipoproteinen zu den Zielorganen.

Lipoproteine sind sphärische Gebilde mit einer hydrophilen Hülle aus Phospholipiden und freiem Cholesterin, bei der sich hydrophobe Fettsäuren der Phospholipide und Sterolringe des Cholesterins zum Kern hin orientieren und geladene Phosphatgruppen der Phospholipide und Hydroxylgruppen der Cholesterinmoleküle nach außen orientieren und so zusammen mit polaren Apolipoproteinen die Wasserlöslichkeit vermitteln. Apolipoproteine haben zum einen eine strukturelle Funktion, zum anderen aber auch Funktion als Co- Faktor von Enzymen oder als Bindungspartner für Zelloberflächenrezeptoren.

Der Kern der Lipoproteine besteht aus den zu transportierenden Cholesterinestern, Triglyceriden und lipophilen Vitaminen ¹⁸.

Lipoproteine lassen sich aufgrund ihrer verschiedenen Größe, Dichte, Zusammensetzung und elektrischer Ladung in fünf verschiedene Klassen einteilen.

Chylomikronen (CM) stellen die größten Partikel mit der geringsten Dichte dar, gefolgt von den VLDL (Very- low- density- lipoproteins), LDL (Low- density- lipoproteins), IDL (Intermediate- density- lipoproteins) und HDL (High- density- lipoproteins), die gemäß der Reihenfolge an Dichte zunehmen und an Größe abnehmen.

Lipoprotein	Dichte (g/ ml)	Durchmesser (nm)	Apo- Lp	Apo- Lp (%)	TG (%)	CE (%)	PL (%)	Chol (%)
Chylomikronen	0,93	75- 1200	B48	2	86	3	7	2
VLDL	0,93- 1,006	30- 80	B100, C	8	55	12	18	7
IDL	1,006- 1,019	25- 35	B100, C, E	19	23	29	19	9
LDL	1,019- 1,063	18- 25	B100	22	6	43	22	8
HDL	1,063- 1,3	5- 12	A, C, E	40- 90	0- 5	0- 17	5- 33	5

Tabelle 1:Eigenschaften der wichtigsten Lipoproteine (nach Havel and Kane, 2001)

1.2.1 postprandialer Lipoproteinstoffwechsel

Die mit der Nahrung aufgenommenen langkettigen Fettsäuren der Triglyceride werden bereits im Mund durch die pharyngeale Lipase hydrolytisch abgespalten. Im Magen werden mittel- und kurzkettige Fettsäuren der Triglyceride von der Magenlipase abgespalten. Durch die von den Gallensäuren aktivierte Pankreaslipase werden die Lipide in Mono- bzw. Diglyceride und freie Fettsäuren zerlegt.

Cholesterin, Phospholipide, Monoglyceride und freie Fettsäuren werden zu kleinen Mizellen zusammengelagert, von Enterozyten im Jejunum resorbiert und intrazellulär wieder zu Triglyceriden zusammengesetzt.

Chylomikronen werden im Enterozyten aus Triglyceriden, Phospholipiden, Cholesterinestern, fettlöslichen Vitaminen und Apolipoproteinen synthetisiert, um über den Ductus Thoracicus des Lymphsystems in den Blutkreislauf zu gelangen.

Im Blutkreislauf werden die Chylomikronen durch katalytische Aktivität von Lipoproteinlipase (LPL) zu Chylomikronen- Remnants (CR) hydrolysiert.

Während der Hydrolyse wird Apo E von im Blutkreislauf zirkulierendem HDL auf die entstandenen Chylomikronen Remnants (CR) transferiert ¹⁹.

Das zentrale Organ der CR- Aufnahme ist die Leber. Apo E vermittelt die CR- Aufnahme durch Bindung an hepatische Lipoproteinrezeptoren, LDL- Rezeptor- related- Protein 1 (LRP1) und LDL- Rezeptor (LDLR) ^{20; 21, 22}. Neben Apo E kann auch LPL als Ligand die Bindung von CR an LRP1 vermitteln ^{23; 24}.

2002 konnte von Heeren et al. gezeigt werden, dass LPL in der postprandialen Phase an CR bindet und dadurch als Ligand für Lipoproteinrezeptoren fungieren kann ²⁵.

Nach der Leber ist Knochen ein wichtiges Organ für die Aufnahme von postprandialen CR und assoziierter essentieller Nahrungslipide ²⁶. Die Aufnahme von CR durch LRP1- und LDLR- vermittelte Endozytose über Bindung an Apo E wurde 2005 von Niemeier et al. beschrieben ²⁷.

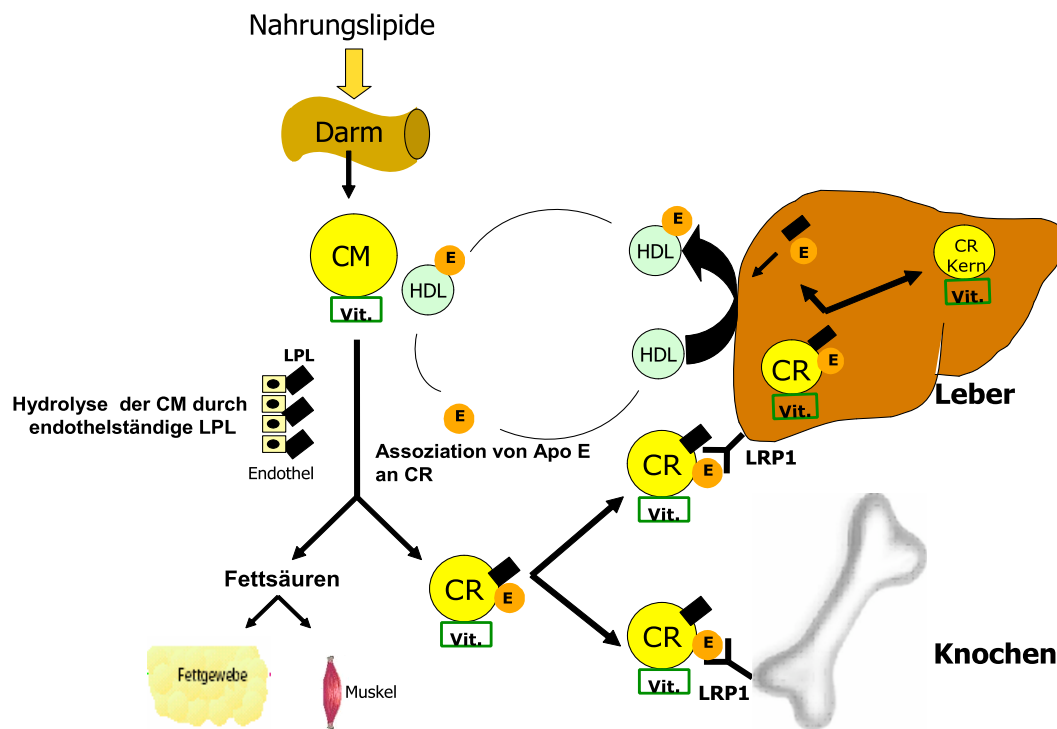


Tabelle 2: Postprandialer Lipoprotein-Stoffwechsel mit Schwerpunkt auf die Aufnahme in den Knochen

1.2.2 Lipoproteinrezeptoren

Um den zellulären Lipidbedarf und die intravaskuläre Lipidkonzentration zu regulieren, gibt es ein System regulierter Rezeptoren, die LDL- Rezeptor Familie.

LDL- Rezeptor

Der aus 839 Aminosäuren bestehende Rezeptor besitzt ein N- terminales, extrazelluläres, Ende, was eine aus 292 Aminosäuren bestehende Bindungsdomäne mit sieben Ligandenbindungsstellen aufweist. Die negativen Ladungen der Bindungsstellen können positiv geladene Aminosäure- Cluster von Apo B₁₀₀ und Apo E binden.

Der LDLR hat zwei entscheidende Aufgaben. Zum einen bindet er über Apo B₁₀₀ cholesterinreiche LDL für die Aufnahme von LDL in Zellen. Das senkt den plasmatischen Cholesterinspiegel. Diese wichtige Funktion führt zu der Tatsache, dass unterschiedliche Mutationen des LDLR- Gens zu dominant vererbten familiären Hypercholesterinämien (FH) führen ²⁸. FH führt zu einer Akkumulation von Apo B₁₀₀- haltigen Lipoproteinen im Blut, die durch Makrophagen phagozytiert werden und abschließend zur Schaumzell-

bildung und atherosklerotischen Läsionen führen ²⁹. Zum anderen bindet der LDLR das mit CR assoziierte Apo E und sorgt für die CR- Clearance aus dem Plasma.

Versuche mit LDL- Rezeptor- defizienten Mäusen zeigten, dass die Aufnahme von CR zwar deutlich verlangsamt, aber nicht vollständig aufgehoben war ³⁰, was für einen weiteren Aufnahmemechanismus in die Leber spricht.

LDL- Rezeptor- Related Protein 1 (LRP 1)

1988 wurde LRP1 von Herz et al. als 600 kDa schweres Zelloberflächenprotein mit hoher Sequenzhomologie zum LDLR und dem Vorläufer des Epidermal Growth Factor erstmalig beschrieben. Durch die strukturelle Ähnlichkeit zum LDLR und hohe Expression in der Leber entstand der Name LRP1 und erfolgte die Eingliederung in die LDLR- Familie.

1991 charakterisierten Strickland et al. ein rezeptorassoziiertes Protein (RAP) ³¹, das innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER) an LRP1 bindet ³² und als Chaperon bei der Faltung der extrazellulären Domänen hilft.

So verhindert RAP die vorzeitige Bindung an ebenfalls im ER synthetisierten LRP1- Liganden ^{33,34,35}.

Im Hinblick auf den Lipoprotein- Metabolismus besteht die Hauptaufgabe in der rezeptorvermittelten Endozytose von CR in die Leber ³⁶. Die Bindung der CR erfolgt über Apo E und LPL an LRP 1 ^{37,38,23,39}.

Eine Inaktivierung des LRP1 in der Leber oder ein LRP1- Knockout kombiniert mit einem LDLR- Knockout in Mäusen ergab einen Anstieg cholesterinhaltiger CR im Plasma ^{40,21}, während der alleinige Knockout von LRP1 zu einer Kompensation der Aufnahme durch den LDLR führte.

Eine homozygote Inaktivierung von LRP1 in Mäusen führte zur frühen Letalität der Embryonen im Stadium der Implantation ⁴¹.

Der multifunktionale Rezeptor LRP1 spielt neben seiner Funktion als Endozytose- Rezeptor eine Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen.

Ein Signaltransduktionsweg, der durch LRP1 reguliert wird, ist der platelet- derived growth factor (PDGF)- Signaltransduktionsweg.

Boucher et al. fanden 2003 heraus, dass durch eine Unterbrechung der LRP1- Expression in glatten Muskelzellen der Gefäßwände eine Steigerung der PDGF- Rezeptor β - Expression, eine Beschleunigung der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen und eine Zerstörung der elastischen Schicht der Arterien resultierte.

Durch Zugabe eines PDGF- Inhibitors konnte eine schwere Atherosklerose verhindert werden ⁴².

PDGF induziert die Migration von glatten Muskelzellen, was durch Apo E, LRP1- abhängig inhibiert werden kann ^{43,44,45}.

In der Pathogenese der Atherosklerose ist LRP1 auch an anderen Prozessen beteiligt.

Die glatten Muskelzellen der Gefäßwand nehmen durch LRP1 einen Teil der aggregierten LDL, die zu atherosklerotischen Läsionen durch entzündliche Prozesse führen, auf ⁴⁶.

Eine Verbindung des LRP1 mit einem für Entwicklung und Homöostase der Zellen wichtigen Signalprotein der Wnt- Familie ⁴⁷ wurde 2004 von Zilberberg et al. gefunden ⁴⁸.

Wnts sind Glykoproteine, welche an den Rezeptor „Frizzled 1 (Fz)“ binden und so β - Catenin stabilisieren ⁴⁹. Das stabilisierte β - Catenin akkumuliert im Zellkern, interagiert mit dem T- Zell- Factor (TCF), was die Zielgene des Wnt- Signaltransduktionsweges aktiviert. Zu diesen Zielgenen gehört z.B. c- myc oder cyclin D1, welche die Zellproliferation aktivieren, Onkogentransformation regulieren, Apoptose und die Differenzierung zu Osteoblasten inhibieren ⁵⁰⁻⁵².

Zilberberg et al. fanden heraus, dass ein Minirezeptor von LRP1 mLRP4T100 den Wnt- Signaltransduktionsweg hemmt ⁴⁸.

Ein möglicher Zusammenhang des LRP1 und der Alzheimer Demenz wird in verschiedenen Studien diskutiert ⁵³. Das bei der Alzheimer Demenz übermäßig abgelagerte, schwer lösliche Amyloid- β - Peptid ($A\beta$) entsteht durch proteolytische Spaltung des in der Plasmamembran vorkommenden Amyloid- Precursor- Proteins (APP) ⁵⁴ und wird durch die Aktivität der γ - Sekretase, einem Multiproteinkomplex mit Presenilinen als aktive Komponente ⁵⁵ freigesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von aktivem Presenilin- 1 zu einem Absinken des LRP1- Levels führt ⁵⁶.

Ergebnisse zeigen, dass die zytoplasmatische Domäne des LRP1 von der γ - Sekretase abgespalten werden kann ^{57, 58}, um den Transkriptionsaktivator- Komplex, bestehend aus APP und weiteren Molekülen in seiner Aktivität zu hemmen ⁵⁹.

VLDLR

Der VLDLR ähnelt in der Struktur dem LDLR, besitzt aber eine zusätzliche Ligandenbindungsstelle und bindet mit seinen acht Ligandenbindungsstellen hauptsächlich VLDL und IDL ⁶⁰, aber auch Apo E vermittelt CR ^{61,62} und LPL ³⁷.

Lokalisiert ist der VLDLR vor allem auf Muskel- und Fettzellen ⁶³.

Die Gewebsverteilung und Ligandenspezifität lässt auf eine energiespeichernde Funktion, vermittelt durch Bindung von triglyceridreichen Lipoproteinen schließen ⁶⁴

Versuche mit VLDLR- defizienten Mäusen zeigten eine 15- 20 prozentige Reduktion der Körpermasse und eine 50 prozentige Reduktion des Fettgewebes ⁶⁵.

1.2.3 Apo- Lipoprotein E (Apo E)

Apo E ist ein 32 kDA schweres Protein und ist Bestandteil von CM, VLDL, VLDL-Remnants, IDL und HDL ⁶⁶.

Apo E hat als Oberflächenprotein der Lipoproteine die Aufgabe, die Löslichkeit von CM im Blut zu vermitteln und dient als Ligand von Lipoproteinrezeptoren zur Aufnahme der CM z.B. in die Leber.

Apo E wird intrazellulär nicht lysosomal abgebaut, sondern mit LPL, Cholesterin und Phospholipiden in peripheren Endosomen als „Surface Remnants“ gespeichert ⁶⁷.

Durch HDL induziert werden die „Surface- Remnants“ an die Zelloberfläche transportiert und mit dieser reseziert ^{68, 69}.

Niedrige Apo E Spiegel gelten als Risikofaktor für Atherosklerose und koronare Herzkrankheit ⁷⁰.

Es lassen sich drei Isoformen Apo E2, Apo E3 und Apo E4 unterscheiden, die durch genetisch determinierten Polymorphismus ⁷¹ aus drei unabhängigen Allelen $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ gebildet werden. Die Allelfrequenz in der kaukasischen Bevölkerung ist unterschiedlich verteilt.

$\epsilon 3$ tritt mit einer Häufigkeit von 78,3%, $\epsilon 4$ mit einer von 14,6% und $\epsilon 2$ mit einer von 7,1% auf ⁷².

Durch diese Strukturunterschiede bindet Apo E₂ mit einer deutlich geringeren Affinität an den LDLR und ist deshalb assoziiert mit Hyperlipoproteinämie Typ 3 (Remnant-Hyperlipoproteinämie) ⁷³.

Personen mit der Apo E₄- Isoform haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Artherosklerose und der Alzheimer Erkrankung ^{74,75}.

Im Lipoproteinstoffwechsel finden sich erhöhte Triglycerid- und LDL- und erniedrigte HDL-Konzentrationen ⁷⁴.

Ein weiterer Zusammenhang wird zwischen der Apo E₄- Isoform und der Disposition für Frakturen, erniedrigte Knochendichte und Osteoporose diskutiert. Einige der

Untersuchungen ergaben eine Assoziation der Apo E₄- Isoform mit erhöhter Disposition für Frakturen, erniedrigte Knochendichte und Osteoporose ⁷⁶⁻⁸³, so ergab die Pittsburgh Studie von Cauley et al. in der Untersuchung von osteoporotischen Frakturen bei älteren Frauen eine Assoziation der Apo E₄ – Isoform mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine Schenkelhalsfraktur ⁷⁸.

Eine mögliche Erklärung wäre die niedrigere Versorgung des Knochens mit Vitamin K, da Apo E₄- Isoform- Träger eine niedrigere Vitamin K- Konzentration im Plasma aufweisen als Träger der anderen Isoformen ⁸⁴.

Andere Studien sahen keinen Zusammenhang zwischen Frakturdisposition, erniedrigter Knochendichte, Osteoporose und der Apo E₄- Isoform ⁸⁵⁻⁹³.

Es liegt nahe, dass die unterschiedlichen Ergebnisse durch ein unterschiedliches Studiendesign entstanden, sowohl die Studiengröße, als auch die Berücksichtigung der ethnischen Zugehörigkeit und des Geschlechts der Studienteilnehmer könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

1.3 Funktion von Adipozyten im Knochenmark

Knochenmark ist reich an Adipozyten.

Welche Funktion Adipozyten im Knochenmark haben, ist noch unklar.

Gimble et al. vermuteten 1990 eine passive Halte- und Stützfunktion durch Ausfüllen der Knochenbälkchen- Zwischenräume ⁹⁴.

Adipozyten des Knochenmarks haben zum einen eine Lipidspeicherfunktion als Energiereservoir für die lokale Knochenneubildung z.B. nach Frakturen, sie können sich zum anderen in Zellen der Hämatopoese oder Osteogenese umdifferenzieren und so an der Blutbildung und dem Knochenaufbau beteiligt sein, wie Nuttall und Gimble in vivo bei größeren Blutverlusten oder bei akuten Knochenumbauprozessen beobachten konnten ^{95,96}.

Eine weitere Theorie beschreibt die Teilnahme der Adipozyten am systemischen Lipidstoffwechsel, indem sie zirkulierende Triglyceride aus dem Blut aufnehmen und einlagern ⁹⁶.

1.3.1 Verbindungen von Lipoproteinstoffwechsel und Knochenmetabolismus

Mit CR werden fettlösliche Vitamine, wie z.B. Vitamin K ⁹⁷ und bestimmte Fettsäuren, welche für den anabolen Knochenstoffwechsel wichtig sind transportiert.

Osteoblasten synthetisieren Lipoproteinrezeptoren, welche an der Aufnahme von postprandialen CR beteiligt sind ²⁷.

Vitamin K hat zum einen Bedeutung für die osteoblastäre Differenzierung ⁹⁸ und ist Co-Faktor für die γ - Carboxylierung von Osteocalcin ⁹⁹, welches wichtig für die Knochenmatrixbildung ist.

In Mäusen mit einem Osteocalcin- Knockout ¹⁰⁰, ebenso wie bei Apo E- defizienten Mäusen beobachtete man eine verstärkte Knochenformation ¹⁰¹.

Die von den CR internalisierten essentiellen Fettsäuren können spezielle Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die „peroxisome proliferator activated receptors“ (PPARs) aktivieren ¹⁰² und dadurch die intraossäre Verteilung zwischen Adipozyten und Osteoblasten beeinflussen ¹⁰³.

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind fähig, sich in viele verschiedene Zelltypen zu differenzieren ^{104,105}, z. B. in Osteoblasten, Adipozyten, Myozyten und Chondrozyten.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung von Osteoporose in der alternden Gesellschaft kommt der Differenzierung in ossäre Adipozyten und Osteoblasten besonderes Interesse zu.

Auslöser für Osteoporose ist eine im Alter abnehmende Knochenneubildungsrate ⁹⁶. Die enge Beziehung zwischen osteogener Differenzierung und adipogener Differenzierung von hMSC wird aus verschiedenen Studien deutlich.

Beresford et al. stellten 1992 die Hypothese auf, dass eine steigende Adipozytenzahl im Knochenmark mit einer verminderten Osteoblastenzahl einhergehe und dadurch die Entstehung von Knochenerkrankungen wie Osteoporose begründet sei ¹⁰⁶.

Gimble et al. fanden 1995 heraus, dass Induktoren der osteogenen Differenzierung die Adipogenese inhibieren, was mit dem pathologischen Bild der Osteoporose- im Alter steigende intraossäre Adipozytenzahl und verminderte Knochenmatrixbildung- korreliert ¹⁰⁷.

Auch Regulatoren der Adipogenese scheinen dieses Gleichgewicht zu beeinflussen.

PPAR γ induziert die Adipogenese und inhibiert auch die Osteogenese muriner MSC ¹⁰⁸.

Akune et al. zeigten 2004, dass homozygote PPAR γ - defiziente embryonale Stammzellen *in vitro* nicht zu Adipozyten, aber spontan zu Osteoblasten differenzierten ¹⁰⁹.

PPAR γ haploinsuffiziente Zellen führten in Mäusen *in vivo* zu gesteigerter Osteogenese mit vermehrter Knochenmasse, verbunden mit gesteigerter Expression von osteogenen Markern wie Runx2 und Osterix.

PPAR γ scheint eine entscheidende Rolle in der Regulation von Adipogenese und Osteogenese zu haben.

Rosiglitazon und Pioglitazon aus der Gruppe der Thiazolidinedione stellen Agonisten des PPAR γ dar und werden derzeit in der Therapie des Diabetes Typ 2 eingesetzt.

Ein osteoblast- spezifischer PPAR γ - Antagonist, der die für den Diabetes Typ 2 wichtige Wirkung auf die adipogene Differenzierung nicht blockieren würde, könnte die osteogene Differenzierung steigern und so einen therapeutischen Ansatz für die Osteoporose darstellen.

Trotz einiger Ansätze für die Regulation der Differenzierung von hMSC sind viele physiologische Prozesse in diesem Gebiet noch nicht hinreichend erforscht.

Mit dlk1 wurde ein wichtiger Regulator der Adipogenese und Osteogenese gefunden.

Weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der Inhibierung könnten neue therapeutische Ansätze für die Osteoporose darstellen.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression von delta-like protein 1 (dlk1) und der Expression von Lipoproteinrezeptoren und Apolipoprotein E in einer immortalisierten humanen mesenchymalen Knochenmarks-Stammzell-Linie (hMSC-Tert) zu finden.

Während osteogener und adipogener Differenzierung der Zellen *in vitro* sollte analysiert werden, ob die Überexpression von dlk1 die Expression und Funktion von Lipoproteinrezeptoren und Apo E beeinflusst. Die Arbeitshypothese war, dass der durch dlk1 bewirkte inhibitorische Einfluss auf die adipogene und osteogene Differenzierung von hMSC-Tert partiell über die Rezeptoren und Apo E ausgeübt werden könnte.

Mit der Entdeckung des dlk1 wurde ein Protein beschrieben, welches in die Regulierung von hMSC und deren Differenzierung in Osteoblasten und Adipozyten eingreift.

2 Material und Methoden

Dieses Kapitel beinhaltet die Beschreibung der Methoden und der dabei verwendeten Materialien.

2.1 kontinuierliche Zellkultur

Materialien:

Casy 1 Zellzähler, Schärfe System

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
#31966-021

Fetales Bovines Serum, Sigma #F7524

Penicillin- Streptomycin ($10000\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
#15140-122

Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
#14190-094

Rotanta Zentrifuge, Hettich

Trypsin- EDTA, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA # 25300-054

Zellkulturflaschen 75cm^2 , Nunc, Dänemark

15ml und 50ml Röhrchen, Greiner bio-one, Cellstar

Als Zellen wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) junger Knochenmarkspender verwendet, die durch genetische Transfizierung humane Telomerase stabil exprimieren (hMSC- Tert 20).

Die Spender trugen die Apo $\epsilon 3/\epsilon 3$ - Isoform.

Als Vergleichszelllinie dienten hMSC- Tert 20, die Delta- like- Factor 1 überexprimieren (hMSC- Tert 20- dlk1).

Beide Zelllinien stammen aus dem Department of Endocrinology and Metabolism, University Hospital of Odense, Denmark.

Methode:

Die verwendeten Zelllinien hMSC-Tert 20 und hMSC-Tert 20-dlk1 wurden in einheitlicher Methode kultiviert.

Die kontinuierliche Kultur erfolgte in Zellkulturflaschen der Größe 75 cm² mit Vollmedium (1% Penicillin- Streptomycin und 10% Fetales Kälber Serum).

Um die Zellen zu Passagieren wurden die konfluenten Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen und mit 4ml Trypsin innerhalb von ca. fünf Minuten vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst.

Anschließend wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins mit 8ml Vollmedium gestoppt und die Zellzahl mit dem Zellcounter gezählt.

Die Zellsuspension wurde bei 800 rpm für 3 Minuten zentrifugiert, um die Zellen von der Trypsin- Medium- Lösung zu trennen.

Das entstandene Zellpellet wurde mit Vollmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung ausgesetzt, die 75 cm² Zellkulturflasche wurde auf 15 ml aufgefüllt.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre und 5% Kohlendioxid.

2.2 Osteoblasten Differenzierung**Materialien:**

L(+)- Ascorbinsäure, Merck # 1.00127.0100

β- Glycerophosphat, Sigma #G9891

Cellscraper, Falcon # 353085

Cover Slips

1,25 Dihydroxycholecalciferol, Sigma #D- 1530

Dulbeccos Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA,
USA #31966-021

Fetales Bovines Serum, Sigma #F7524

Penicillin- Streptomycin (10000 U·ml⁻¹), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA,
USA #15140-122

Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA,
USA #14190-094

Sechs Loch Platten, 24 Loch Platten, Sarstedt

Methode:

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² – soweit nicht anders angegeben – auf 6-Loch-Platten mit Vollmedium (DMEM + 10% FCS + 1% P/S) ausgesetzt

Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit Induktionsmedium versetzt.

Induktionsmedium: DMEM mit 10% FCS und 1% P/S versetzt mit

10 ⁻⁸ M	1, 25 Dihydroxycholecalciferol,
50 µg/ mL	Ascorbinsäure
10 mM	β- Glycerophosphat

Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit neuem Induktionsmedium versetzt. Nach weiteren 72 Stunden wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen und mit einem Zellscraper geerntet.

Zum Vergleich wurden parallel zu der Osteoblasten Differenzierung die beiden Zelllinien unter gleichen Kulturbedingungen ohne Differenzierungsstimuli ausgesetzt.

2.3 Adipozyten Differenzierung**Materialien:**

Cover Slips

Dexamethason, Sigma # D-4902

Dulbeccos Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA #31966-021

Fetales Bovines Serum, Sigma #F7524

Insulin, Sigma I-9278

Isobutylmethylxanthin (IBMX), Sigma # I-5879

24 Loch Platten, Sarstedt

Penicillin- Streptomycin (10000 U·ml⁻¹), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA #15140-122

Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA #14190-094

Rosiglitazon (BRL49653), Cayman # 71740

U0126 (MEK Inhibitor), Calbiochem # 662005

Methode:

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 23600 Zellen/cm² in 24-Loch-Platten auf Cover Slips ausgesetzt.

Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen und mit dem Induktionsmedium versetzt (Tag 0).

Induktionsmedium: DMEM mit 5% FCS und 1% P/S mit

0,1 µM	Dexamethason
450µM	IBMX
2µM	Insulin
1µM	Rosiglitazon
1µM	U0126 (Mek Inhibitor)

Das Induktionsmedium wurde am Tag 2, Tag 5, Tag 7, Tag 9 und am Tag 12 gewechselt, am Tag 14 wurde auf das Medium ohne Differenzierungsstimuli umgestellt und am Tag 16 wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen und geerntet.

2.4 Immunfluoreszenz

Material:

1. Antikörper:

- monoklonaler anti- humaner dlk1/ Pref1 Antikörper, R&D Systems #MAB1144 (Verdünnung 1: 200)
- monoklonaler anti- Osteocalcin Antikörper, Acris #BM2002 (Verdünnung 1:200)

2. Antikörper (Verdünnung 1:500):

- anti-mouse Cy2 (Esel), Jackson Immuno Research #715-226-150
- Bovines Serum Albumin, Serva #11930
- Fluoromount- G, SouthernBiotech #0100-01
- 4,6- Diamidino- 2- Phenyl- Indole, Sigma #D8417
- Glycin, Roth #3908.2

Mikroskop Zeiss Axiovert 100 mit Fluoreszenzeinrichtung

Paraformaldehyd, 4%ig

Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA,
USA, #14190-094

Saponin, Sigma #S-7900

Methode:

Die Zellen hMSC- TERT 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 wurden mit einer Dichte von 1000 Zellen/cm² auf Cover Slips in 24-Loch-Platten ausgesetzt und nach der Standard-Differenzierung zu Osteoblasten differenziert.

Wichtig hierbei war, dass die Zellen zur idealen mikroskopischen Auswertung eine nicht zu hohe Dichte aufwiesen.

Zum Vergleich wurden Zellen unter identischen Bedingungen- allerdings ohne Differenzierungsstimuli- ausgesetzt, um die Proteinexpression vor und nach Differenzierung zu vergleichen.

Am Tag 6 wurden die Cover Slips zweimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in PFA- Lösung fixiert.

Die Cover Slips wurden fünfmal mit PBS gewaschen und für 5 Minuten in Glycin-Saponin- PBS- Lösung (0,5% Glycin, 0,1 % Saponin in PBS) permeabilisiert.

Nach 20 Minuten in der Blocklösung (2% BSA in Glycin- Saponin- PBS- Lösung) wurden die Cover Slips im ersten Antikörper- verdünnt in Blocklösung- für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Bevor die Cover Slips im fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper -verdünnt in Blocklösung- für 45 Minuten bei 37°C inkubiert wurden, wurden sie zweimal in Glycin-Saponin- PBS- Lösung gewaschen.

Anschließend wurden sie zweimal 5 Minuten mit PBS gewaschen, um für 3 Minuten in DAPI- Lösung (10µl DAPI- Stammlösung in 60ml PBS) die Kerne zu färben.

Nach drei Waschschritten á 5 Minuten in PBS wurden die Cover Slips aus dem PBS herausgenommen und mit der Zelloberfläche nach unten und einer kleinen Menge Fluoromount und Nagellack eingedeckelt.

2.5 Fettrotfärbung

Material:

Cover Slips

Ethanol

Fettrot

Fluoromount- G, SouthernBiotech #0100-01

Paraformaldehyd, 4%ig

Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, #14190-094

Methode:

Herstellung der Fettrotlösung:

3g Fettrot werden in 100ml heißem 70%igem Ethanol gelöst, über Nacht bei 56°C im Bakterienschüttler leicht geschüttelt und filtriert.

Die Adipozyten wurden nach 14tägiger Differenzierung auf Cover Slips zweimal mit PBS gewaschen und danach für 30 Minuten in Paraformaldehyd fixiert.

Parallel zu den Adipozyten wurden einige Tage vor der Färbung hMSC- Tert20 und hMSC- Tert20- dk1 auf Cover Slips ausgesetzt, um die Zellen vor und nach Differenzierung zu vergleichen.

Nach der Fixierung wurden die Zellen einmal mit PBS und zweimal zwei Minuten mit 50% Ethanol gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten mit Fettrotlösung gefärbt und dreimal drei Minuten mit 50% Ethanol gewaschen, um Farbrückstände zu beseitigen.

Nach dem Waschen in PBS wurden die Cover Slips mit der Zelloberfläche nach unten und einem Tropfen Fluoromount und Nagellack eingedeckelt.

2.6 cDNA- Synthese aus Zellpellets

Material:

dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen # 55082, 55085, 55083, 55084

0,1M DTT, Invitrogen #Y00147

5x First Strand Buffer, Invitrogen #Y00146
M- MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen #28025
NucleoSpin RNA II Kit, Macherey- Nagel #740955.50
Oligo(dT) Primer, Invitrogen #Y01212
RNase Inhibitor, Invitrogen #15518-012
Tischzentrifuge 1-15K, Sigma

Methoden:

Aus Zellen eines Loches der 6-Loch-Platte oder aus drei Löchern der 24-Loch-Platte wurde mit dem NucleoSpin RNA Kit nach dem Protokoll des Kits RNA isoliert und aus der entstandenen RNA 1µl mit je 1µl oligo dT und RNase Inhibitor und 2µl Aqua dest. für 10 Minuten bei 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und diese 5µl mit 4µl (5x) First Strand Buffer, 2µl 0,1 M DTT, 1µl dNTPmix (10 mM jedes dNTPs), 7 µl Aqua dest. und 1µl M-MLV Reverse Transkriptase versetzt und für eine Stunde auf 37°C erhitzt und so die cDNA hergestellt.

2.7 Konzentrationsbestimmung von cDNA

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch mit Hilfe des „SmartSpec 2000“ von der Firma BioRad in Quarzküvetten.

2.8 RT- PCR

Material:

dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen # 55082, 55085, 55083, 55084
50 mM MgCl₂, Invitrogen #Y02016
10x PCR Reaction Buffer (-MgCl₂), Invitrogen #Y02028
PCR Softstrips, Biozym #710988
Taq DNA Polymerase, Invitrogen #18038-042
T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland

Primer Sequenzen:

Alkalische	5'ACGTGGCTAAGAATGTCATC 3'	F	475bp
Phosphatase:	5'CTGGCAGGCGATGTCCTTA 3'	R	
	Programm 2		
aP2:	5'GCCAGGAATTTGACGAAGTC 3'	F	107bp
	5'TGGTTGATTTTCCATCCCAT 3'	R	
	Programm 6		
Apo E:			
AlaI01	5'GGTGGAGCAAGCGGTGGAGAC 3'	F	149bp
AlaI02	5'GCTCCTCCTGTACCTGCTCAGAC 3'	R	
	Programm 5		
Collagen Typ 1 (Col 1):	5'TGACGAGACCAAGAACTG 3'	F	599bp
	5'CCATCCAAACCACTGAAACC 3'	R	
	Programm 2		
dlk1:	5'CTGGACGGTGGCCTCTATGAATG 3'	F	130bp
	5'ATCATCCACGCAGGTGCCTC 3'	R	
	Programm 1		
GAPDH:	5'ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	F	452bp
	5'TTCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	R	
	Programm 1		
hLDL:	5'TGGCTGCGTTAATGTGACACTC 3'	F	202bp
	5'AGCCGATCTTAAGGTCATTGC 3'	R	
	Programm 4		
LPL:	5'GAGATTTCTCTGTATGGCACC 3'	F	275bp
	5'CTGTAAATGAGACGCTTTCTC 3'	R	
	Programm 6		

LRP1:

Alai02	5'CATGCTGCCTTCAGGGAGAC 3'	F	135bp
Alac08	5'GGAGAGCCTTGGCAAAGTGT 3'	R	
	Programm 1		

Osteocalcin:	5'CATGAGAGCCCTCACA 3'	F	310bp
	5'AGAGCGACACCCTAGAC 3'	R	
	Programm 1		

PPAR-γ:	5'TTCTCCTATTGACCCAGAAAGC 3'	F	307bp
	5'CTCCACTTTGATTGCACTTTGG 3'	R	
	Programm 6		

VLDL-R:	5'TGGTCGCTGTATTACGCTGTTG 3'	F	217bp
	5'GGCACTGTTCTGGGCTTTCA 3'	R	
	Programm 3		

Methode:

Der Reaktionsansatz enthielt 1 µg der cDNA, 2,5 µl 10x PCR Reaction Buffer, 1µl 50mM MgCl₂, 1µl 10mM dNTP's, 1µl Taq Polymerase, 20pmol des jeweiligen Primers und 17µl Aqua dest.. Der Ansatz wurde für die RT- PCR eingesetzt und mit den folgenden Programmen für die entsprechenden Primer im Thermocycler verarbeitet.

Programme:

1)

5min 95°C –

40 Zyklen: 30sec 95°C, 30sec 65°C, 30sec 72°C –

7min 72°C –

Ende 4°C

2)

10min 95°C –

40 Zyklen: 30sec 95°C, 30sec 60°C, 60sec 72°C –

7min 72°C –
Ende 4°C

3)
8min 95°C –
40 Zyklen: 10sec 55°C, 10sec 95°C, 15sec 72°C –
Ende 4°C

4)
15min 95°C –
40 Zyklen: 30sec 94°C, 60sec 60°C, 30sec 72°C –
5min 72°C –
Ende 4°C

5)
5min 95°C -
40 Zyklen: 30sec 95°C, 30sec 69°C, 30sec 72°C -
8min 72°C –
Ende 4°C

6)
10min 95°C –
40 Zyklen: 30sec 95°C, 30sec 60°C, 30sec 72°C –
7min 72°C –
Ende 4°C

2.9 Agarose Gel

Material:

Agarose, Electrophoresis Grade, BRL Bethesda Research
Laboratories #11027D
Ethidiumbromid, Sigma #E1510

Gelkammern, BioRad

Gene Rule DNA Ladder Mix, Fermentas #SM0331

6x Loading Dye Solution, Fermentas #R0611

Tris- Borat- EDTA- Puffer (TBE), 5x:

54g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris), Sigma #T1503

27,5g Borsäure, Merck #1.00165.1000

20 ml 0,5M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma #ED255

pH 8,0 mit Essigsäure

Aqua dest. ad 1L

Methode:

Um die DNA- Fragmente aufzutrennen, wurden 2% (w/v) Agarose in 100ml TBE- Puffer durch Erhitzen gelöst und nach Abkühlen auf $< 50^{\circ}\text{C}$ mit 3 μl Ethidiumbromid versetzt und die Lösung in die vorbereiteten Gelträger gegeben.

Nach dem Erstarren der Lösung wurde der Gelträger in die mit 1xTBE gefüllte Gelkammer eingesetzt und der Taschenkamm aus dem Gel gezogen. Die 10 μl PCR- Produkt (GAPDH- PCR- Produkt 5 μl) wurden mit 2 μl Gelladepuffer versehen und in die Taschen gefüllt. Nach etwa 60 Minuten bei 100 mA wurde der Gellauf gestoppt.

2.10 Membranproteinisolierung

Material:

Antipain, Cabiochem #178220

Calciumchlorid

Centrifuge Tube, Beckmann #347356

Chymostatin, Cabiochem #230790

Dimethylsulfoxid(DMSO), Merck #41662250

Leupeptin, Cabiochem #108975

Magnesiumchlorid, Merck

Natriumchlorid (NaCl), J.T. Baker #0278

Pepstatin A, Cabiochem #516482

Rotanta Zentrifuge, Hettich

Sucrose(Saccharose), Merck #7651

Tischzentrifuge 1-15K, Sigma

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(Tris), Sigma #T1503

TritonX 100, Merck #1.009137.1000

TL-100 Ultrazentrifuge, Beckmann

Ultra Turrax T25, Janke&Kunkel

Homogenisierungs(HB)- Puffer:

20mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(Tris), pH 7,4 mit HCl

2mM MgCl₂

0,25 M sucrose

in Aqua dest.

PIC, frisch hinzugefügt in der Konzentration 1:1000

Protease- Inhibitor- Cocktail (PIC):

1mM Pepstatin A, 10mM Chymostatin, 10mM Leu-peptin, 10mM Antipain

Resuspensions(RB)- Puffer:

50mM Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris), pH 8,0 mit HCl

2 mM CaCl₂

80 mM NaCl

1% TritonX 100

in Aqua dest

PIC, frisch hinzugefügt in der Konzentration 1:1000

Methode:

Zu den mit PBS gewaschenen Zellen wurde PBS (4°C) gegeben, um sie aus dem Loch zu kratzen.

Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 2500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und das Zellpellet mit 1,2 ml HB- Puffer resuspendiert.

Die Zellschlammung wurde zweimal 10 Sekunden mit dem Ultra Turrax T25 zerschmettert und in der Tischzentrifuge bei 800g 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei den oben genannten Bedingungen zentrifugiert.

Der Überstand wurde 60 Minuten bei 100.000g und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 100- 200µl RB- Puffer und einer 28G Insulin Spritze resuspendiert und 30 Minuten bei 100.000g und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Im Überstand waren die Membranproteine enthalten.

2.11 (Membran-) Proteinbestimmung

Material:

Albumin Standardlösung, Pierce/Perbio #23209

Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences

Folin- Ciocalteau- Lösung, Merck #1.09001.0500 (1:1 mit Aqua dest. verdünnt)

Kupfersulfat

Natronlauge, Merck #1.09137.1000

Natrium-Kaliumtartrat, Merck #538A26187

Natriumbicarbonat, J.T. Baker #0274

Natriumdodecylsulfat(SDS), Serva #20760

Lösung A: 2% Natriumbicarbonat, 0,02% Natrium- Kaliumtartrat in 0,1 N NaOH

Lösung B: 0,5% CuSO₄ ,5% SDS in Aqua dest.

Lösung C: Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50 :1

Methode:

Die Proteinbestimmung wurde nach dem Lowry- Verfahren (Lowry et al. 1951) bestimmt, bei dem Cu²⁺- Ionen im alkalischen Milieu, gemäß der Biuret- Reaktion, mit Proteinen einen Komplex bilden.

Die bläuliche Farbe, die als Maß für die photometrische Proteinbestimmung steht, entsteht durch einen Komplex zwischen Folin- Ciocalteau- Reagenz und dem Kupferionen- Protein- Komplex.

Zur Herstellung dieses Komplexes wurde 20µl Proteinprobe mit 80µl 0,1 N NaOH versetzt, dann 1ml Lösung C hinzugefügt und vorgetextet und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde 100µl Folin- Lösung hinzugefügt, vorgetextet und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach der Inkubation konnte die Extinktion des blauen Komplexes photometrisch bei 760nm gemessen werden und über eine mitgeführte Verdünnungsreihe des Albumin-Standard die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

2.12 SDS- Page

Material:

Acrylamid/Bis- Lösung, BioRad #161-0148

Ammoniumpersulfat(APS), Serva #13375 – 0,1 g in 1ml Aqua dest.

β- Mercaptoethanol, Serva #28625

Borsäure, Merck #1.00165.1000

Bromphenolblau, Sigma #B7021 -eine Spatelspitze Bromphenolblau in Aqua dest.

Elektrophoresekammer und Gelplatten, BioRad

Glycerin, Sigma #G-7757

Isobutanol, Merck #1990.1000

Natriumdodecylsulfat, Merck #1.06504

Proteinmarker RPN 756

Temed, BioRad #161-0801

Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris), Sigma #T1503

Obergelpuffer: 0,2M Tris, pH 6,14, eingestellt mit H₂SO₄ ad 100ml Aqua dest.

Untergelpuffer: 1,7M Tris, pH 9,18, eingestellt mit HCl ad 100ml Aqua dest.

SDS- Lösung:10% Natriumdodecylsulfat in 50mM Tris

SDS- Page Oberpuffer:24,8g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris),

12,4g Borsäure,ad Aqua dest. 5L

SDS- Page Unterpuffer:258,5g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris),

ad Aqua dest. 5L pH 9,5 mit HCl

Methode:

Die gewünschte Menge Protein wurde für reduzierte Gele mit der gleichen Menge Gelladepuffer versehen, der aus einer Mischung aus SDS-Lösung, Glycerol und Bromphenolblau im Verhältnis 2:1:1 besteht.

Diese Mischung wurde bei 95°C für fünf Minuten reduziert.

Für nicht reduzierte Gele bestand der Gelladepuffer aus SDS-Lösung und Bromphenollösung im Verhältnis 1:1.

Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden Gele nach der modifizierten Methode von Neville und das Mini Protean 3- System von BioRad(mit Ober- und Unterpuffer) verwendet.

Dazu wurde ein 10%iges Trenngel aus 2ml Acrylamid/Bis- Lösung, 4ml Aqua dest., 2ml Untergelpuffer, 40µl frisch zubereitetes APS und 10µl Temed angesetzt, in die Apparatur gegeben und zum Oberflächenausgleich mit Isobutanol überschichtet.

Nach der Polymerisation des Trenngels und Entfernung des Isobutanols mit Aqua dest. wurde das Sammelgel (5ml) aus 385µl Acrylamid/Bis- Lösung, 1,25ml Untergelpuffer, 25µl frisch zubereitetes APS, 5µl Temed und 3,4ml Aqua dest. angesetzt und zügig in die Apparatur gegossen.

Zuletzt wurde der Taschenkamm eingesetzt und das Gel zur Polymerisation einige Zeit stehengelassen.

Der Gellauf wurde bei ca. 30mA mit bis zum Erreichen der gewünschten Trennung durchgeführt.

Zur Kontrolle der Proteingröße wurde in einer Tasche des Gels ein Proteinmarker mitlaufen lassen.

2.13 Western Blot**Material:**

Antikörper, primäre:

- monoklonaler anti- humaner Dlk1/ Pref1 Antikörper, R&D Systems #MAB1144 (Verdünnung 1: 200)
- anti- RAP (rabbit) (Verdünnung 1:50.000)
- anti- LRP1-Dolly (sheep), Dr.Jörg Heeren (Verdünnung 1:250)
- monoklonaler anti- β-Actin (mouse), Sigma #A-5441 (Verdünnung 1:50.000)

- monoklonaler anti- VLDLR 6A6 (mouse), Dr.Jörg Heeren (Verdünnung 1:50)
- polyklonaler anti- LDLR (chicken), Progen #61049 (Verdünnung 1:200)
- monoklonaler anti- Dlk1/Pref1(mouse), R&D Systems #MAB1144 (Verdünnung 1:100)

Antikörper, sekundäre (Verdünnung 1: 5000):

- Peroxidase- gekoppeltes Ziege anti Kaninchen IgG (GaR- PO), Jackson Immuno Research #111-035-045
- Peroxidase- gekoppeltes Ziege anti Maus IgG (GaM- PO), Jackson Immuno Research #111-035-003
- Peroxidase- gekoppeltes Esel anti Schaf IgG (DaSH- PO), Jackson Immuno Research #111-035-147
- Peroxidase- gekoppeltes Esel anti Huhn IgG (DaC- PO), Jackson Immuno Research #111-035-155

Bovines Serum Albumin(BSA), Serva #11930

ECL+Plus Western Blotting detection system, Amersham Pharmacia Biotech #RPN2132

Glycin, Roth #3908.2

Methanol

Natriumchlorid, J.T. Baker #0278

Natriumdesoxycholat, Merck #1.06504

Natriumdodecylsulfat(SDS), Serva #20760

PonceauS Solution, Serva #33427

Protan Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher&Schuell

TransBlot™- Cell- Apparatur, BioRad

Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris), Sigma #T1503

Tween 20, BioRad #1706531

Blocklösung: Waschpuffer A mit 10% entfettetem Milchpulver

Blotting- Puffer: 12,1g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris),
56,2g Glycin, 1L Methanol, ad 5L Aqua dest.

Ponceau-Lösung:

0,2% Ponceau in 3% Trichloressigsäure

Waschpuffer A:

12,1g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris), 45g Natriumchlorid, 5g Tween 20, ad 5L Aqua dest., pH 7,4 mit HCl

Waschpuffer B:

12,1g Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris), 45g Natriumchlorid, 12,5g Natriumdesoxycholat, 5g Tween 20, 5g Natriumdodecylsulfat(SDS), ad 5L Aqua dest., pH7,4 mit HCl

Methode:

Der Proteintransfer aus dem SDS- Page- Gel auf die Nitrozellulosemembran der Porengröße 0,45µm erfolgte in 4°C gekühlten Blotting Puffer in einer TransBlot™- Zell-Apparatur von BioRad bei einer Stromstärke von 250mA für zwei Stunden.

Nachdem die Effizienz des Blottens mit der Ponceau- Färbung überprüft wurde, wurden die Markerbanden beschriftet und die Membran mit PBS entfärbt.

Alle folgenden Inkubationen erfolgten unter leichtem Schütteln.

Anschließend folgte die Blockierung der freien Bindungsstellen der Membran in einer Inkubation in Blocklösung für 45 Minuten. Die Membran wurde entsprechend der unterschiedlichen zu untersuchenden Proteine in horizontaler und vertikaler Ebene geschnitten und im ersten Antikörper für zwei Stunden inkubiert.

Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte in Waschpuffer A mit 5% BSA bei Raumtemperatur in den oben genannten Verdünnungen.

Es folgten Waschschrte in Waschpuffer A für dreimal 10 Minuten.

Die Inkubation erfolgte im peroxidase- gekoppelten zweiten Antikörper- in Blocklösung verdünnt- für 45 Minuten bei Raumtemperatur.

Die zweite Waschserie bestand aus fünf Minuten Waschpuffer A, zweimal 10 Minuten Waschpuffer B und fünf Minuten Waschpuffer A.

Nach einigen Minuten in PBS wurde die Membran mit ECL- Reagenz für fünf Minuten bedeckt, die Lösung danach abgetupft und auf die Membran ein Röntgenfilm aufgelegt.

Die Expositionszeit wurde durch die Signalstärke der dunklen Banden bestimmt.

2.14 Apo E- Elisa

Mit dem Apo E- Elisa wurden Apo E- Konzentrationen im konditionierten Medium bestimmt. Dazu wurden hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 im basalen Zustand in einer beliebigen Zellzahl ausgesetzt. Nach mindestens zweitägigem Wachstum wurde das Medium vom Standard- Medium auf ein „Hungermedium“ (DMEM, 1% P/S) umgestellt.

Um die Apo E- Konzentration im konditionierten Medium differenzierter Zellen zu bestimmen, wurden die Adipozyten am Tag 14 und die Osteoblasten am Tag 6 auf das „Hungermedium“ umgestellt.

Material:

Antikörper:

- anti- Apo E, DAKO #A0077
- EE7 Antikörper, monoklonal, Dr. Jörg Heeren
- Peroxidase- gekoppeltes Ziege- anti- Kaninchen IgG (GaR- PO), Jackson Immuno Research #111-035-045

Bovines Serum Albumin(BSA), Serva #11930

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma #ED255

H₂O LiCHROSolv, Merck #323604

Kontrollserum Apo E, Behring

Malonsäure, FLUKA #63290

Microtiter Strips Immuno- modules, Maxisorp, Nunc #469940

Natriumacetat, Merck #1.06268

Natriumchlorid (NaCl), J.T. Baker #0278

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), Merck #6329

Natriumhydrogenphosphat (NaH₂PO₄), Merck #1.06586

Natronlauge (NaOH), Merck #1.06495

Plasma- Pool Standardreihe

Plattendeckel, Nunc #263339

Plattenrahmen, Nunc #460348

Tetramethylbencidin (TMB), Sigma #T-2885

Thimerosal, FLUKA #71230

Tween 20, BioRad #1706531

Schwefelsäure (H_2SO_4), Merck #100732

Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Merck #1.07209

Blocking Puffer:

0,1 M NaH_2PO_4

0,15 M NaCl

1% BSA

1 mM EDTA

0,055% Tween20

0,01% Thimerosal

pH 7,0

Herstellung:

13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$

8,77 g NaCl

0,37 g $\text{EDTA} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

5,0 ml 10% Tween20

in 800 ml H_2O lösen, auf pH 6,5 mit 2M NaOH einstellen

10g BSA

0,1g Thimerosal

zugeben, pH 7,0 mit 2M NaOH einstellen und auf 1000ml auffüllen

Coating Puffer:

50 mM NaHCO_3

pH 9,6

HRP- Substrat Puffer:

1,3 M Malonsäure

0,6 M Natriumacetat

1,11 M NaOH

in H_2O verdünnen

Waschlösung:

0,5% NaCl

0,02% Tween20

in H₂O verdünnt

TMB:

0,3% TMB in 0,2M Malonsäure lösen

Methode:

Um die Microtiterstrips zu coaten, wurden 0,5µg EE7 Antikörper- verdünnt in Coating Puffer- pro Well aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Es folgten drei Waschschritte mit 300µl Waschpuffer pro Well und das Blockieren der Strips mit 300µl Blockingpuffer pro Well bei 37°C für 90 Minuten.

Anschließend wurden zum einen 100µl Probe in unterschiedlichen Verdünnungen (in Waschpuffer) und zum anderen die Standardreihe und das Kontrollserum in Doppelwerten aufgetragen.

Plasma- Pool Standardreihe (Konzentration 41µg/ml):

1:100 vorverdünnen 10µl Plasma Pool + 990µl Blockingpuffer

- | | |
|------------|--|
| 1) 64ng/ml | 844µl Blockingpuffer + 156µl Vorverdünnung |
| 2) 32ng/ml | 400µl Blockingpuffer + 400µl von 1) |
| 3) 16ng/ml | 400µl Blockingpuffer + 400µl von 2) |
| 4) 8ng/ml | 400µl Blockingpuffer + 400µl von 3) |
| 5) 4ng/ml | 400µl Blockingpuffer + 400µl von 4) |
| 6) 2ng/ml | 400µl Blockingpuffer + 400µl von 5) |
| 7) 1ng/ml | 400µl Blockingpuffer + 400µl von 6) |
| 8) 0ng/ml | Blockingpuffer |

Kontrollserum (Konzentration 37ng/ml):

1:100 vorverdünnen	10µl Plasma	+ 990µl Blockingpuffer
1: 60 verdünnen	10µl vorverdünnte Probe	+ 590µl Blockingpuffer

Die Proben wurden bei 37°C für 90 Minuten inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit 300µl Waschpuffer wurden die Strips bei 4°C über Nacht mit 100µl anti- Apo E (DAKO) inkubiert.

Anti- Apo E- Antikörper:

1:100 vorverdünnen	5µl Antikörper	+ 495µl Blockingpuffer
1:7.407	162µl Vorverdünnung	+ 12ml Blockingpuffer

Anschließend wurden die Strips mit 100µl GaR- PO bei 37°C für 60 Minuten inkubiert und danach viermal mit 300µl Waschpuffer gewaschen.

250µl Substratlösung pro Well wurden aufgetragen, woraufhin sich ein blauer Farbstoff entwickelte, dessen Entwicklung nach ca. 10 Minuten mit 50µl 2M Schwefelsäure gestoppt wurde.

Substratlösung:

1ml HRP- Substratpuffer

1ml H₂O₂

1ml TMB

auf 25ml H₂O

Die Extinktionen wurden bei 450nm gemessen und die Konzentrationen der Proben mit denen der Standardreihe verglichen.

2.15 Isolierung von Chylomikronen Remnants

Material und Methode:

Chylomikronen Remnants wurden aus EDTA- Blut eines ApoCII- defizienten (ApoE2/3) Spenders isoliert.

Die zellulären Bestandteile des Bluts wurden zur Gerinnung gebracht und der Plasmaüberstand abgenommen.

40 ml Plasma wurden mit 7 ml 60% (w/v) Saccharose versetzt und 7ml dieser Suspension in ein Zentrifugenröhrchen- unter 4 ml PBS geschichtet- gegeben.

Nach einstündiger Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA, SW41- Rotor) bei 38000rpm und 4°C wurde die flotierte Schicht abgenommen und in 8ml PBS gelöst und mit 2ml Saccharose beschwert.

Die Suspension wurde auf vier Röhrchen verteilt, erneut unter PBS geschichtet und wie oben zentrifugiert.

Dieser Vorgang wurde zum Entfernen des Serum- Albumins noch zweimal wiederholt.

Anschließend wurden die Chylomikronen abgenommen und in ca. 4ml PBS gelöst.

Die Chylomikronen wurden in einem 50ml Gefäß in 10ml PBS auf $12\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

TG eingestellt, mit 10ml FCS und $1\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ LPL versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nachdem 4ml 60% (w/v) Saccharose zugegeben wurde, folgten drei Zentrifugations-schritte wie oben angegeben.

Die CR wurden in 3ml PBS aufgenommen und bei 4°C unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt.

Die CR- Isolation wurde von Dr. Jörg Heeren durchgeführt.

2.16 Jodierung von Chylomikronen- Remnants

Material:

TRL (CR- Präparation)

^{125}I Na (Amersham, Braunschweig)

Glycinpuffer (1M Glycin mit 1N NaOH auf pH 10 eingestellt)

Iodmonochlorid- Lösung (3,3mM ICl, 2M NaCl in 0,1 N HCl)

PD-10- Gelfiltrationssäule

Methode:

Die radioaktive Markierung der Chylomikronen- Remnants mit ^{125}J erfolgte mit der Jodmonochlorid- Methode nach McFarlane (McFarlane, 1958).

Die Methode beruht auf der Reaktion von ^{125}I Na und ICl.

Die Proteine der CR wurden markiert, indem 0,5mg CR mit PBS auf ein Volumen von 1ml gebracht und mit 800µl Glycinpuffer versetzt wurden.

Zu dieser Emulsion wurde zum einen eine Lösung von 6µl ^{125}I Na mit einer Aktivität von 22,2 MBq und 200µl Glycinpuffer und zum anderen 40µl ICl gegeben.

Die Iodierungsreaktion erfolgte für 2 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Lösung wurde abschließend über eine PD- 10- Gelfiltrationssäule von freiem ^{125}I und $^{125}\text{I}_2$ getrennt.

Die Iodierung wurde von Dr. Jörg Heeren durchgeführt.

2.17 Radioaktive Aufnahmeassays

Material:

Bovines Serum Albumin(BSA), Serva #11930

^{125}I - CR

Dulbeccos Modified Eagle Medium, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA,
USA #31966-021

Gamma- Counter und Röhrchen

Liquemin, Roche

NaOH, Merck #1.09137.1000

Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA,
USA, #14190-094

VLDL

Zellmaterial:

hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 verschiedener Differenzierungszustände

Ligandenlösung:

DMEM +

1% P/S +

2% BSA +

5µg/ml ^{125}I - CR

Methode:

Für die radioaktiven Aufnahmeexperimente wurden hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 zu Osteoblasten und Adipozyten wie oben beschrieben auf 24- Loch- Platten differenziert und einige Tage vor dem Experiment zusätzlich hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 auf 24- Loch- Platten ausgesetzt, um die Aufnahme von CR/mg Gesamtzellprotein zu vergleichen.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei 37°C mit DMEM ohne FCS inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen von zwei Löchern für eine Stunde bei 37°C mit 500µl Ligandenlösung inkubiert.

In weiteren zwei Löchern wurde zusätzlich zu der Ligandenlösung 150µg VLDL gegeben, um die unspezifische Bindung und Aufnahme zu ermitteln.

Die folgenden Waschschrte erfolgten auf Eis.

Nach Abnahme der Ligandenlösung wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen.

Es folgten folgende Waschschrte bei leichtem Schütteln, um oberflächlich gebundene CR abzuwaschen:

3 x 5 Minuten mit PBS

1 x 15 Minuten mit PBS- Heparin (1000 U/ml)

Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in jedes Loch 250µl 0,1 N NaOH gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Lösung in Gamma- Counter- Röhrchen überführt und die Löcher mit weiteren 250µl NaOH gespült, um restliches Material aufzusammeln.

Die Radioaktivität der Proben wurde im Gamma- Counter gemessen und anschließend der Proteingehalt der Proben nach Lowry bestimmt, um die Counts auf den Proteingehalt zu beziehen.

3 Ergebnisse

Um den Zusammenhang zwischen der Expression von dlk1 und dem Lipoprotein-stoffwechsel von humanen mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen, wurde zunächst die dlk1- Überexpression der hMSC- Tert 20- dlk1 auf Protein- und RNA- Ebene gezeigt.

Im ersten Teil der Ergebnisse wird der Einfluss von dlk1 auf den TRL- Metabolismus von hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 auf Protein- und RNA- Ebene ohne Differenzierungsstimuli dargestellt.

Im zweiten Teil der Ergebnisse wird der inhibitorische Effekt von dlk1 auf die adipogene und osteogene Differenzierung der beiden Zelllinien gezeigt und der Effekt von dlk1 auf den Lipoprotein-stoffwechsel differenzierter Zellen untersucht.

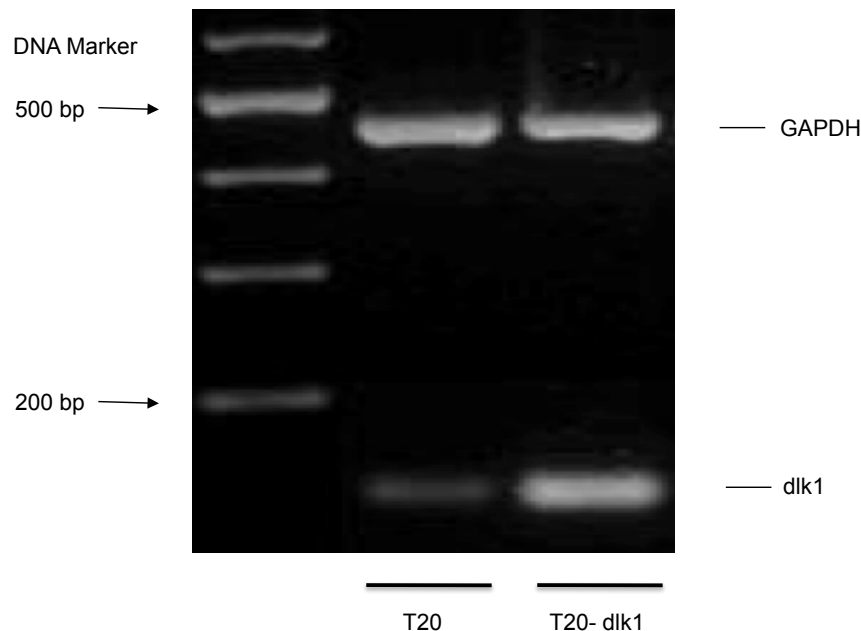
Im dritten Teil der Ergebnisse werden anhand von Apo E- Konzentrationsmessungen im Zellkulturüberstand und Aufnahmeassays radioaktiv- markierter Chylomikronen- Remnants mögliche funktionelle Unterschiede von hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen untersucht.

3.1 dlk1- Überexpression im hMSC- Tert 20- Zellmodell

Um zunächst die dlk1- Überexpression der hMSC- Tert 20- dlk1 sicherzustellen, wurde eine RT- PCR, ein Western Blot und eine Immunzytochemie wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

Die Abbildung 1a zeigt eine RT- PCR von dlk1 mit hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 unter basalen Bedingungen. Man erkennt durch GAPDH als Ladekontrolle, dass auf allen Spuren gleich viel PCR- Produkt aufgetragen wurde.

In der Spur eins wurde das PCR- Produkt der hMSC- Tert 20, in Spur zwei das der hMSC- Tert20- dlk1 aufgetragen. Man kann die intensivere Signalgebung in Spur zwei erkennen, was für eine stabile Überexpression von dlk1 in den hMSC- Tert 20- dlk1 spricht.

**Abb. 1a: RT-PCR von dlk1 mit hMSC- T20 und hMSC- T20-dlk1**

unter basalen Bedingungen über 6 Tage wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert und auf 2% Agarose Gel (10µl PCR Produkt dlk1/ Lane und 5µl PCR Produkt GAPDH/ Lane) aufgetragen.

Abbildung 1b zeigt eine Immunzytochemie mit α - dlk1 in hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 ohne Differenzierungsstimuli. Das linke Bild zeigt die dlk1- Expression in hMSC- Tert 20, die Grünfärbung des dlk1 ist nicht zu erkennen. Die rechte Immunzytochemie zeigt eine deutliche Grünfärbung der hMSC- Tert 20- dlk1. Dieses Färbungsmuster zeigt, dass in hMSC- Tert 20 unter basalen Bedingungen kein dlk1 angefärbt wird, in hMSC- Tert 20- dlk1 unter basalen Bedingungen dlk1 im Sinne einer stabilen Überexpression angefärbt wird.

Die Antikörperkontrollen zeigten keine Grünfärbung, so dass man unspezifische Bindung des Antikörpers ausschliessen kann.

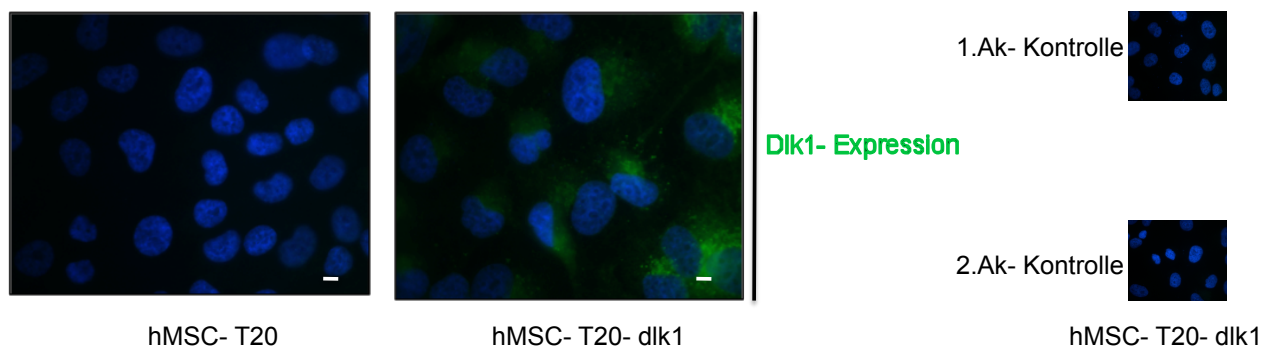


Abb. 1b: Immunzytochemie mit a- dlk1 in hMSC- T20 versus hMSC- T20- dlk1 Zellen
 6 d auf cover slips unter Standardkulturbedingungen
 Immunzytochemie mit 1°AK anti-dlk1(R&D systems), 1:200, mouse monoclonal, 2°AK
 cy2 a-mouse 1:500, 100x Öl
 Skalierungsbalken 1 µm (Ak- Kontrolle kleiner)

Bei dem folgenden Western Blot (Abb. 1c) wurde entgegen den übrigen Western Blots RAP als Ladekontrolle verwendet, ein 39kDa großes, im endoplasmatischen Retikulum befindliches Protein, welches als Chaperon bei der Faltung extrazellulärer Regionen des LRP1 hilft und die vorzeitige Bindung von LRP1- Liganden an LRP1 verhindert. Da die dlk1- Proteingröße mit 50 kDa und die β - Actin- Proteingröße mit 42 kDa es nicht zuließen, von beiden Proteinen eine Immunfärbung in einem Gel zu machen.

Für den Rest der Arbeit wurde β - Actin als Ladekontrolle verwendet, ein Protein des Zytoskeletts.

Das hier gezeigte Experiment ist ein Beispiel für die Veränderungen der Proteinexpression von dlk1 unter basalen Bedingungen bei stabiler Überexpression von dlk1.

Man kann durch RAP erkennen, dass auf die verschiedenen Spuren gleichmäßig Membranprotein aufgetragen wurde.

In der ersten Spur (hMSC- Tert 20 unter basalen Bedingungen) erkennt man eine leichte dlk1- Anfärbung durch den Antikörper, in der zweiten Spur (hMSC- Tert 20- dlk1 unter basalen Bedingungen) hingegen erkennt man eine starke Anfärbung durch den Antikörper. Eine stabile dlk1- Überexpression der hMSC- Tert 20- dlk1 unter basalen Bedingungen wurde hiermit gezeigt.

Die stabile Überexpression wurde auch nach Differenzierung hMSC- dlk1 in mehreren Experimenten auf RNA- und Proteinebene belegt.

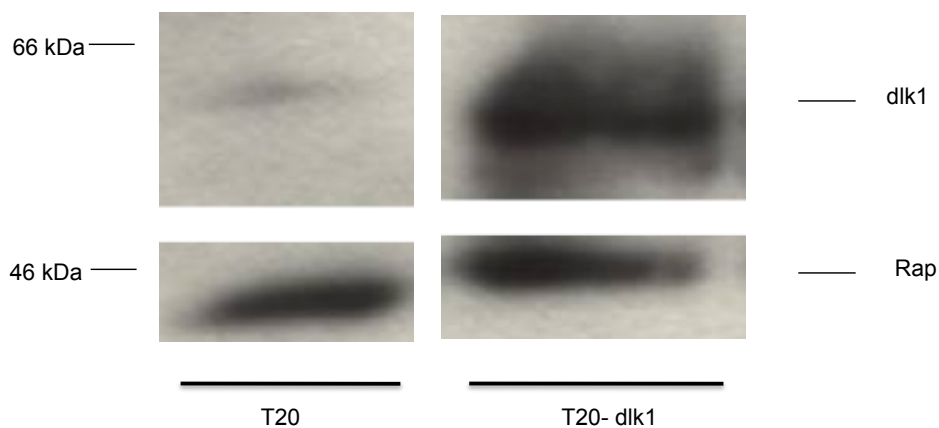


Abb.1c: dlk1- Protein Expression von hMSC T20 und hMSC T20- dlk1.

Western Blot von Membranproteinpräparation unter basalen Bedingungen

40µg Membranprotein/Lane auf 10% SDS Page aufgetragen, Immunfärbung wie in Material und Methoden beschrieben mit monoklonalem spezifischem anti-dlk1/pref1- Ak (1:100) und monoklonalem RAP- Ak (1:50.000)

3.2 Inhibition der Differenzierung zu Osteoblasten und Adipozyten durch dlk1

Zur Analyse des Effekts der dlk1- Überexpression auf die Differenzierung hMSC- Tert 20 wurden die beiden zu vergleichenden Zelllinien, wie in Material und Methoden beschrieben, zu Adipozyten und Osteoblasten differenziert und die Expression von adipogenen und osteogenen Differenzierungsmarkern auf Protein- und RNA- Ebene untersucht.

3.2.1 Inhibition der adipogenen Differenzierung durch dlk1

Abbildung 2a zeigt die mRNA- Expression folgender adipogener Differenzierungsmarker. Als frühe Marker der adipogenen Differenzierung wurden aP2 und LPL und als späte Marker der adipogenen Differenzierung PPARgamma verwandt.

In der Abbildung sieht man neben der gleichmäßig exprimierten Ladekontrolle GAPDH, dass die RNA des frühen Differenzierungsmarker aP2 in den ersten beiden Spuren (hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20-dlk1 unter basalen Bedingungen) kaum exprimiert ist, in der dritten Spur (hMSC- Tert 20- AD) jedoch exprimiert wird.

In der vierten Spur (hMSC- Tert 20- AD- dlk1) wird die RNA von aP2 etwas schwächer exprimiert als in der dritten Spur.

Dieses Bild der RNA- Expression zeigt, dass der Differenzierungsmarker vor Differenzierung kaum exprimiert wurde, in hMSC- Tert 20- AD exprimiert wird und in hMSC- Tert 20- AD- dlk1 im Sinne einer Inhibition der Differenzierung durch die dlk1- Überexpression schwächer exprimiert wird.

In der ersten Spur sieht man, dass die RNA des ebenfalls frühen adipogenen Differenzierungsmarkers LPL schon im basalen Zustand in hMSC- Tert 20 exprimiert ist, jedoch nicht in Spur 2 (hMSC- Tert 20- dlk1 vor adipogener Differenzierung) sichtbar exprimiert wird.

Nach adipogener Differenzierung zeigt sich in der dritten Spur (hMSC- Tert 20- AD) eine stärkere Expression als basal, in der vierten Spur (hMSC- Tert 20- AD- dlk1) wird LPL auch nach adipogener Differenzierung im Sinne einer Inhibition der Differenzierung nicht sichtbar exprimiert.

Die RNA des späten Differenzierungsmarkers PPARgamma wird unter basalen Bedingungen sowohl in hMSC- Tert 20, als auch in hMSC- Tert 20- dlk1 nicht exprimiert. Nach adipogener Differenzierung wird die RNA nur in der dritten Spur (hMSC- T20- AD) exprimiert, jedoch nicht in der vierten Spur (hMSC- Tert 20- AD- dlk1).

Das bedeutet, dass auch die RNA des späten Differenzierungsmarkers PPARgamma nach adipogener Differenzierung in hMSC- T20- AD stärker exprimiert ist als in den, in der Differenzierung inhibierten hMSC- Tert 20-AD- dlk1.

Der inhibitorische Effekt der dlk1- Überexpression wurde dadurch gezeigt.

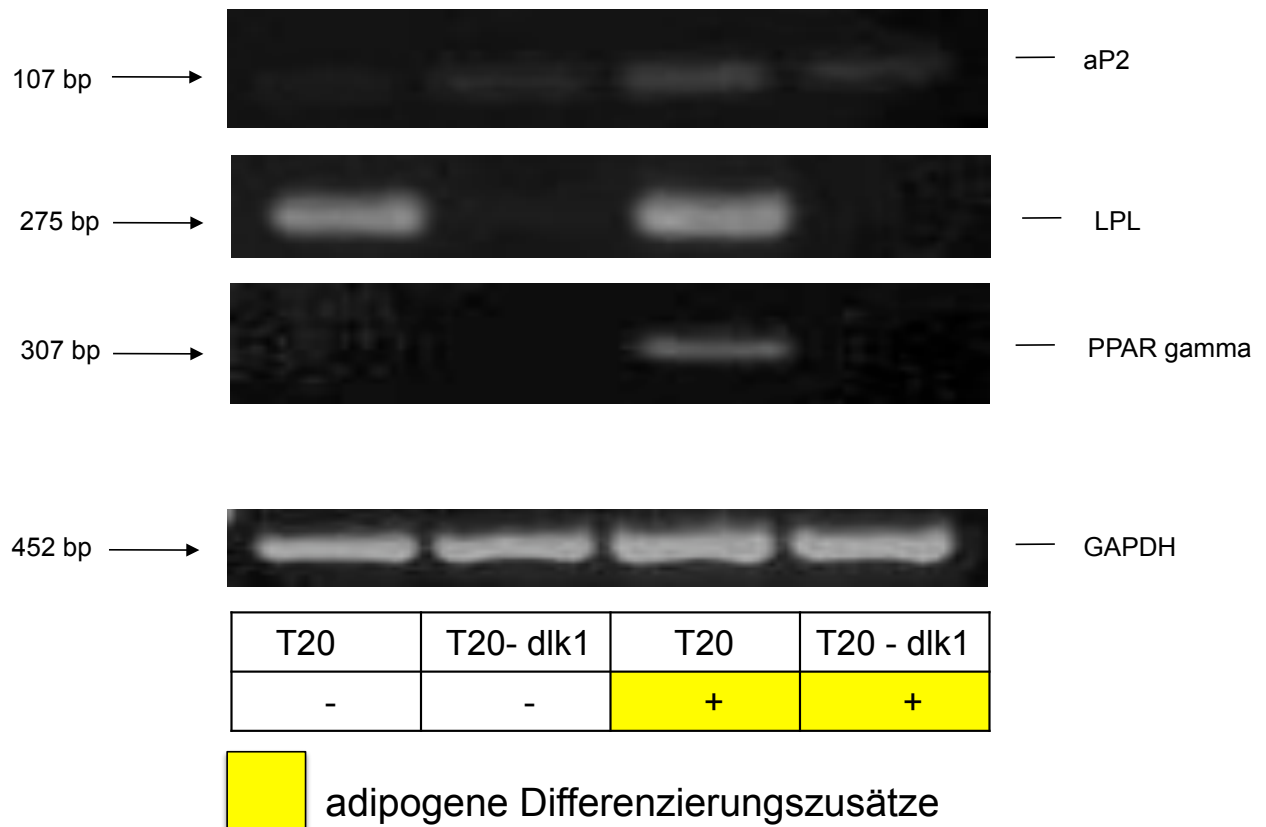


Abb. 2a: RT- PCR von aP2, LPL, PPAR gamma und GAPDH von hMSC- T20 und hMSC- T20- dlk1 mit und ohne adipogene Differenzierung
über 14 Tage wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert und auf 2% Agarose Gel (10µl PCR Produkt/ Lane, 5µl PCR Produkt GAPDH/ Lane) aufgetragen.

Abbildung 2b zeigt eine Oil- Red- O- Färbung von hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 vor und nach 14 Tagen adipogener Differenzierung, bei der Neutralfette rot angefärbt werden.

Es ist eine Zunahme sowohl der Größe, als auch der Anzahl und Intensität rot angefärbter Fettvakuolen während der adipogenen Differenzierung zu erkennen.

Die hMSC- Tert 20 nach adipogener Differenzierung (hMSC- Tert 20- AD) haben deutlich mehr und deutlich größere Fettvakuolen, als die hMSC- Tert 20- dlk1 nach adipogener Differenzierung (hMSC- Tert 20- AD- dlk1).

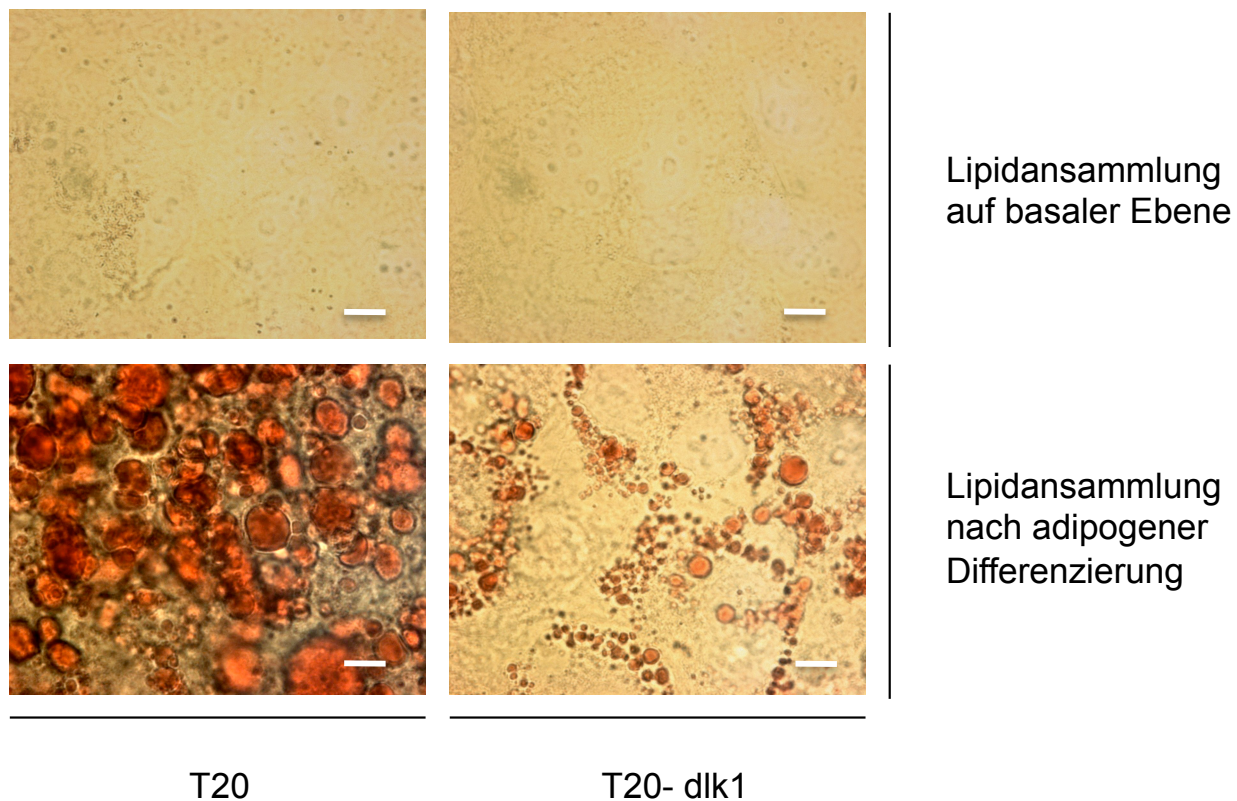


Abb. 2b: Oil- Red O Färbung von hMSC- T20 und hMSC- T20- dlk1 Zellen
mit und ohne adipogene Differenzierung über 14 Tage wie in Material und Methoden
beschrieben. 200x Öl
Skalierungsbalken 1µm

3.2.2 Inhibition der osteogenen Differenzierung durch dlk1

Zur Analyse des Effekts von dlk1 auf das osteogene Differenzierungspotential der Zellen wurden die beiden Zelllinien über sechs Tage wie in Material und Methoden beschrieben zu Osteoblasten differenziert.

Zum einen wurden osteogene Differenzierungsmarker auf RNA- Ebene untersucht und zum anderen eine Immunzytochemie mit anti- Osteocalcin durchgeführt.

Abbildung 3a zeigt die mRNA- Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Collagen 1, Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und GAPDH als Ladekontrolle mittels RT- PCR.

Durch die gleichmäßige Expression der Ladekontrolle GAPDH kann man davon ausgehen, dass auf allen Spuren gleich viel RNA aufgetragen wurde.

Der frühe osteogene Differenzierungsmarker Collagen 1 zeigt in der ersten Spur (hMSC- Tert 20) eine stärkere Expression als in hMSC- Tert 20- dlk1 in der zweiten Spur.

In der dritten Spur (hMSC- Tert 20- OB) sieht man, dass die Expression im Vergleich zu Spur eins (hMSC- Tert 20) etwas zunimmt.

In der vierten Spur (hMSC- Tert 20- OB- dlk1) erkennt man keine Veränderung im Vergleich zu Spur zwei (hMSC- Tert 20- dlk1).

Das bedeutet, dass in hMSC- Tert 20 ohne dlk1- Überexpression die Collagen 1- Expression unter osteogener Differenzierung ansteigt und sowohl vor, als auch nach Differenzierung stärker ist als in den Zellen mit dlk1- Überexpression im entsprechenden Differenzierungsstadium.

Dadurch ist gezeigt worden, dass die Zellen osteogen differenzieren und dlk1- Überexpression die Differenzierung inhibiert.

Der zweite Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase weist eine Expression in Spur eins auf (hMSC- Tert 20), die sich im Verlauf der Differenzierung der Zellen verstärkt (Spur 3).

Die Zellen mit dlk1- Überexpression zeigen im basalen Zustand keine RNA- Expression, nach osteogener Differenzierung (Spur 4) lässt sich nur eine minimale Expression erkennen.

Das bedeutet, dass die RNA- Expression der alkalischen Phosphatase in hMSC- Tert 20 während osteogener Differenzierung steigt, in hMSC- Tert 20- dlk1 sowohl vor, als auch nach osteogener Differenzierung kaum sichtbar darzustellen ist.

Das zeigt ebenfalls den inhibierenden Effekt des dlk1 auf die osteogene Differenzierung.

Die RNA- Expression des späten Differenzierungsmarkers Osteocalcin konnte in Spur eins (hMSC- Tert 20) schwach dargestellt werden, in Spur zwei (hMSC- Tert 20- dlk1) wurde Osteocalcin nicht sichtbar exprimiert.

In hMSC- Tert 20- OB (Spur drei) ist die Osteocalcin- Expression im Vergleich zur Expression vor osteogener Differenzierung (Spur eins) deutlich gesteigert, in hMSC- Tert 20- OB- dlk1 (Spur vier) ist die Expression im Vergleich zur Expression vor osteogener Differenzierung (Spur zwei) auch gesteigert, erscheint aber im Vergleich zu der Expression in hMSC- Tert 20- OB (Spur drei) etwas schwächer.

Das bedeutet, dass der Differenzierungsnachweis durch die vermehrte Expression der osteogenen Differenzierungsmarker bei hMSC- Tert 20- OB im Vergleich zu den hMSC- Tert 20 gegeben ist.

hMSC- Tert 20- dlk1 zeigen nach osteogener Differenzierung eine verminderte Expression von osteogenen Differenzierungsmarkern im Vergleich zu hMSC- Tert 20- OB, was auf den inhibitorischen Effekt des dlk1 hinweist.

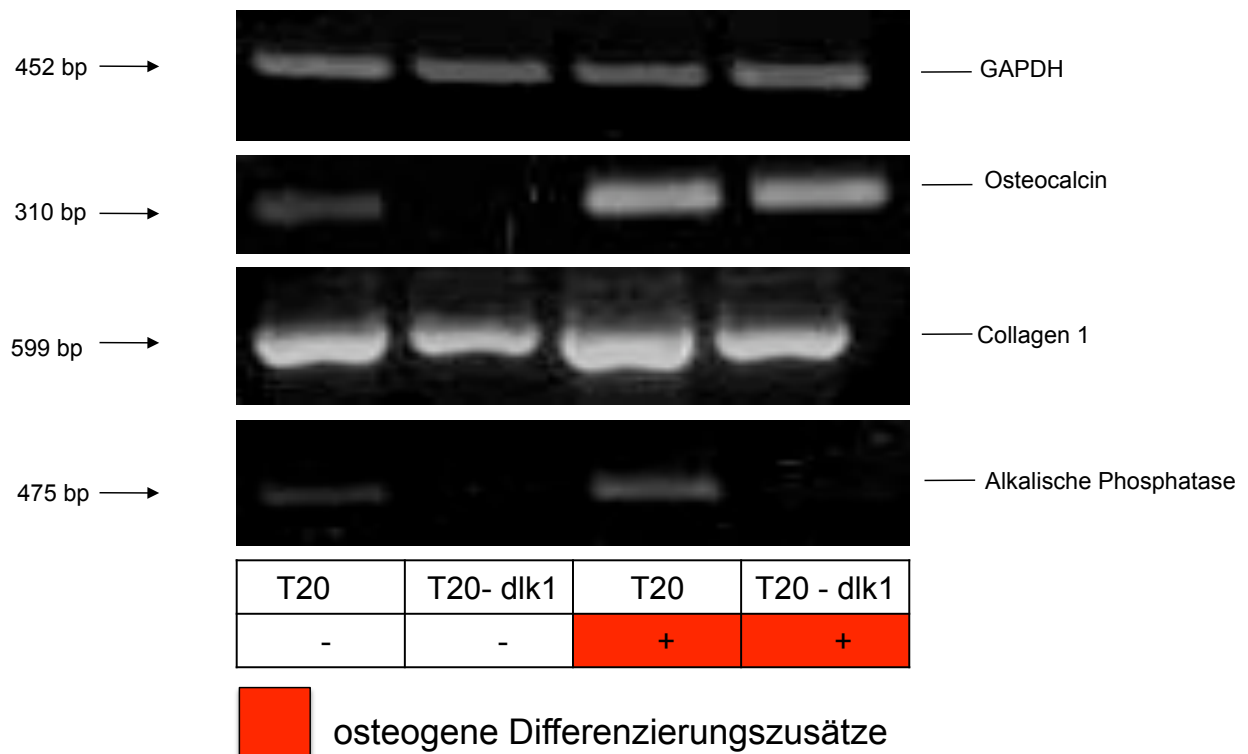


Abb. 3a: RT- PCR von Collagen 1, Alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und GAPDH mit hMSC- T20 und hMSC T20- dlk1

mit und ohne osteogene Differenzierungsstimuli über 6 Tage wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert und auf 2% Agarose Gel (10µl PCR Produkt / Lane , 5µl PCR Produkt GAPDH/ Lane) aufgetragen.

Abbildung 3b zeigt die Immunzytochemie mit anti- Osteocalcin der zu vergleichenden Zelllinien vor und nach osteogener Differenzierung. Die Antikörperkontrolle wurde auf hMSC- Tert 20 nach osteogener Differenzierung (hMSC- Tert 20- OB)- die Zelllinie, bei der die höchste Konzentration an Osteocalcin zu erwarten ist- durchgeführt, um sicherzugehen, dass der Antikörper keine unspezifischen Bindungen aufweist.

Die beiden linken Bilder in Abbildung 3b zeigen hMSC- Tert 20 vor und nach osteogener Differenzierung. Man sieht die vermehrte Fluoreszenz der hMSC- Tert 20- OB, während die hMSC- Tert 20 vor osteogener Differenzierung kaum Fluoreszenz aufweisen.

Die rechten beiden Bilder zeigen hMSC- Tert 20- dlk1 vor und nach osteogener Differenzierung. Während die Fluoreszenz der hMSC- Tert 20- dlk1 vor osteogener

Differenzierung annähernd die Stärke der Zellen ohne *dlk1*- Überexpression aufweist, ist die Fluoreszenz in hMSC Tert 20- *dlk1* nach osteogener Differenzierung (hMSC- Tert 20- OB- *dlk1*) im Vergleich zu der der Zellen ohne *dlk1*- Überexpression deutlich schwächer. Das bedeutet, dass hMSC- Tert 20 mit *dlk1*- Überexpression unter osteogenen Differenzierungsstimuli weniger differenzieren als hMSC- Tert 20. Der Differenzierungsnachweis von hMSC- Tert 20 zu Osteoblasten ist durch die deutliche Fluoreszenz bei hMSC- Tert 20 nach osteogener Differenzierung gegeben.

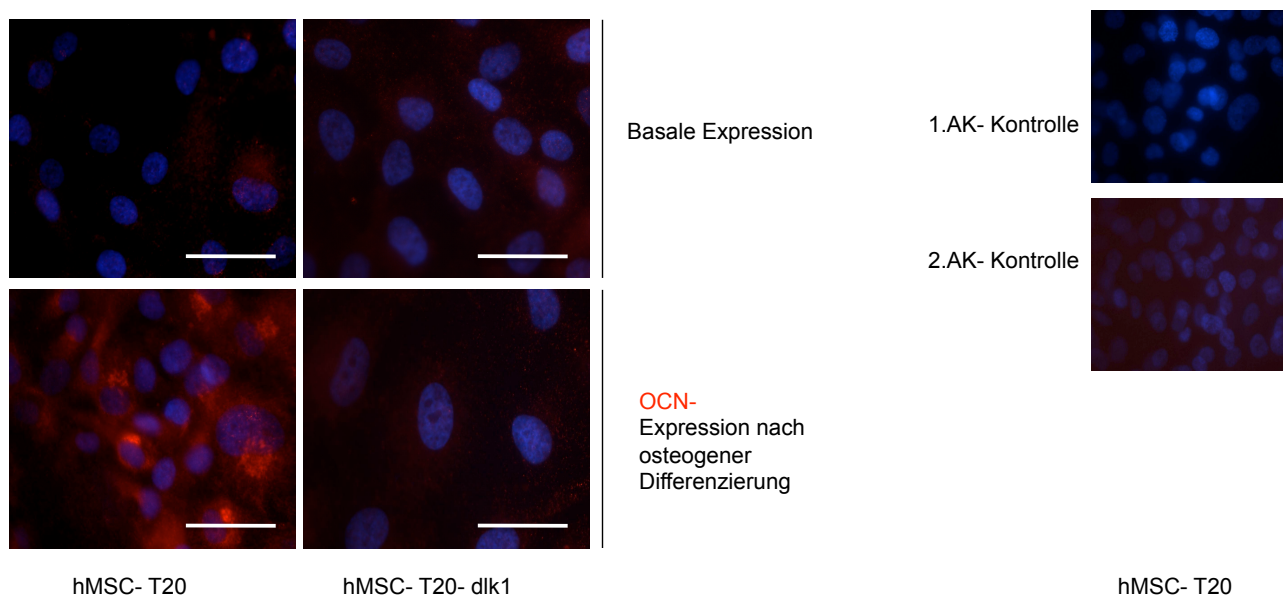


Abb. 3b: Immunzytochemie mit anti- Osteocalcin in hMSC-T20 und hMSC-T20- *dlk1*. 6 Tage auf cover slips unter Standardkulturbedingungen und Differenzierungsbedingungen laut Material und Methoden kultiviert. Immunfluoreszenz mit 1°AK anti-Osteocalcin (acris) mouse monoklonal (1:200), 2°AK cy2 a-mouse (1:500). 100x Öl

3.3 Effekt der *dlk1*- Überexpression auf den Lipoproteinstoffwechsel von hMSC- Tert 20

Um zu untersuchen, ob die Rezeptorexpression prä- oder posttranskriptionell reguliert wird, wurden mRNA- Analysen der LDLR-, VLDLR- und LRP1- Gene mittels konventioneller RT- PCR durchgeführt (Abb. 4a). Es ist bekannt, dass die Protein- expression von Mitgliedern der LDLR- Genfamilie posttranskriptionell reguliert wird ¹¹⁰.

Der linke Teil der Abbildung zeigt die RNA- Expression vor und nach adipogener Differenzierung, der rechte Teil der Abbildung die RNA- Expression vor und nach osteogener Differenzierung.

Als Ladekontrolle ist GAPDH verwendet worden, dessen Signalgebung auf den Spuren von gleicher Intensität ist. Dieses spricht für eine gleich große Menge an RNA auf den Spuren. Die PCR- Produkte von VLDLR, LDLR und LRP1 zeigen bei den hMSC- Tert 20 und den hMSC- Tert 20- dlk1 unter basalen Bedingungen sowohl im linken Teil der Abbildung, als auch im rechten Teil der Abbildung gleich starke Signalgebung.

In der ersten Reihe sieht man die mRNA- Expression von hLDLR, alle Spuren zeigen eine gleich starke Signalgebung.

Das bedeutet, dass die Expression des hLDLR nicht transkriptionell reguliert wird.

In der zweiten Reihe sieht man die mRNA- Expression von VLDLR.

Auch hier kann man erkennen, dass alle Spuren eine gleich starke Signalgebung zeigen.

Das bedeutet, dass man auch bei der VLDLR- Expression davon ausgehen kann, dass diese nicht transkriptionell reguliert wird.

In der dritten Reihe ist die mRNA- Expression von LRP1 abgebildet.

Hier sieht man, dass im linken Teil der Abbildung (RNA- Expression vor und nach adipogener Differenzierung) die erste, zweite und dritte Spur (hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 und hMSC- Tert20- AD) annähernd gleich starke Signalgebungen aufweisen. Die vierte Spur (hMSC- Tert 20- AD- dlk1) zeigt eine sehr schwache Signalgebung.

Das bedeutet, dass die Veränderungen in der LRP1- Proteinexpression (s.u. Abb. 4b) während adipogener Differenzierung in hMSC- Tert 20- dlk1 transkriptionell reguliert sind.

Im rechten Teil der Abbildung (RNA- Expression vor und nach osteogener Differenzierung) ist keine unterschiedliche Signalgebung in der LDLR-, VLVDLR- und LRP1- RNA- Expression zu sehen, so dass man davon ausgehen kann, dass die LRP1- Expression unter osteogener Differenzierung nicht transkriptionell reguliert wird.

Diese Abbildung ist ein Beispiel für mehrere voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

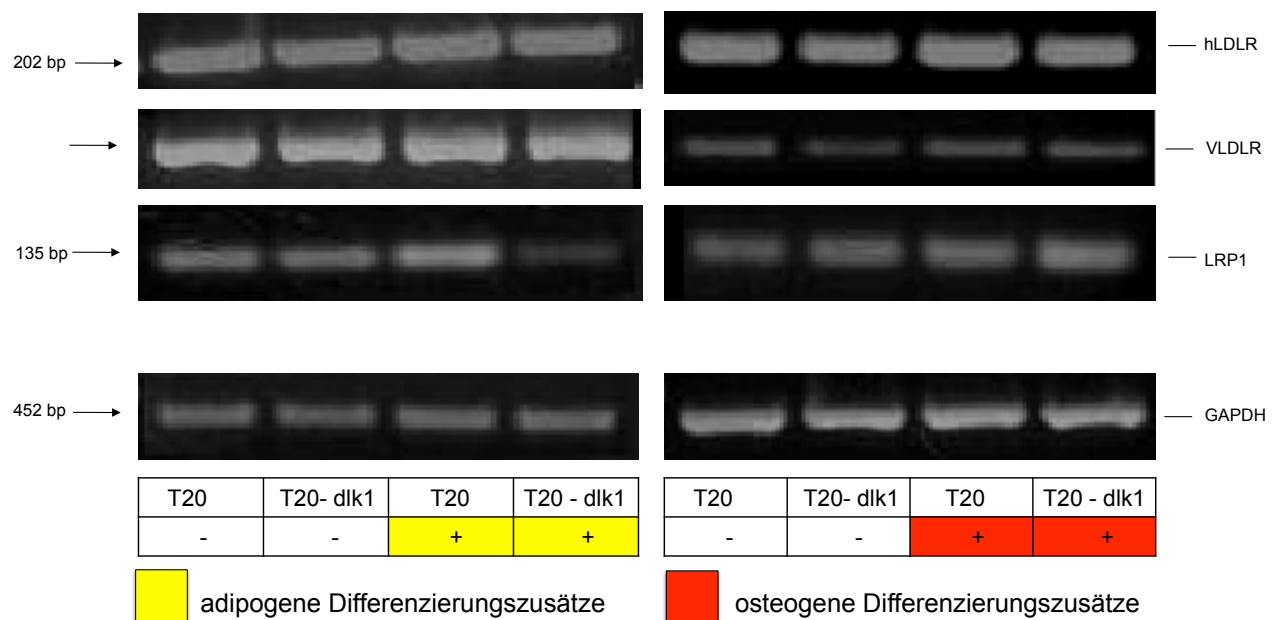


Abb. 4a: RT-PCR von hLDLR, VLDLR und LRP1 mit hMSC- T20 und hMSC- T20-dlk1 auf 2% Agarose Gel (10µl PCR Produkt/ Lane, 5µl PCR Produkt GAPDH/ Lane) aufgetragen.

Um den Effekt der dlk1- Überexpression auf den Lipoproteinstoffwechsel von hMSC- Tert 20 vor und nach adipogener und osteogener Differenzierung zu untersuchen, wurde die Proteinexpression der Lipoproteinrezeptoren LDLR, VLDLR und LRP1 durch Western Blot- Analysen untersucht.

Der Effekt von dlk1 auf die Rezeptorexpression wurde zwischen den Zelllinien unter basalen Bedingungen und nach adipogener und osteogener Differenzierung verglichen. Die Abbildungen sind ein Beispiel für Western Blots von mehreren voneinander unabhängigen Experimenten, die die gezeigten Veränderungen in der Proteinexpression aufwiesen.

Abbildung 4b zeigt die LDLR-, VLDLR- und LRP1- Expression von hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 unter basalen Bedingungen und nach adipogener und osteogener Differenzierung.

In der ersten Reihe der Abbildung ist die LDLR- Expression dargestellt. Die Immunfärbung des LDLR der hMSC- Tert 20- dlk1 ist unter basalen Bedingungen (erste Reihe/ links) wesentlich stärker als die der hMSC- Tert 20- dlk1. Dieser Unterschied konnte in sechs voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

Nach adipogener Differenzierung (erste Reihe/ mitte) stellen sich die Immunfärbungen des LDLR bei hMSC- Tert 20- AD und hMSC- Tert 20- AD- dlk1 gleich stark dar. Dieser Unterschied konnte in fünf voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

Nach osteogener Differenzierung (erste Reihe/ rechts) zeigt die Immunfärbung des LDLR hMSC- Tert 20- AD- dlk1 eine leicht verminderte Intensität im Vergleich mit der des LDLR hMSC- Tert 20- AD. Dieser Unterschied konnte in fünf voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

In der zweiten Reihe der Abbildung ist die VLDLR- Expression dargestellt.

Die Darstellung der VLDLR- Expression im basalen Zustand benötigte eine hohe Konzentration des α - VLDLR- Antikörpers und eine lange Expositionszeit, konnte aber in vier voneinander unabhängigen Experimenten gelingen.

Die Immunfärbung des VLDLR hMSC- Tert unter basalen Bedingungen (zweite Reihe/ links) zeigt bei den hMSC- Tert 20- dlk1 eine wesentlich stärkere Intensität als bei den hMSC- Tert 20.

Nach adipogener Differenzierung (zweite Reihe/ mitte) zeigt die Immunfärbung des VLDLR hMSC- Tert 20- AD- dlk1 eine schwächere Intensität im Vergleich zu den hMSC- Tert 20- AD. Dieser Unterschied konnte in vier voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

Nach osteogener Differenzierung (zweite Reihe/ rechts) zeigt die Immunfärbung des VLDLR hMSC- Tert 20- OB- dlk1 eine stärkere Intensität im Vergleich zu der hMSC- Tert 20- OB. Dieser Unterschied konnte in vier voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

In der dritten Reihe ist die LRP1- Expression dargestellt.

Unter basalen Bedingungen (dritte Reihe/ links) zeigt die Bande des LRP1 hMSC- Tert 20- dlk1 eine wesentlich stärkere Intensität im Vergleich zu der hMSC- Tert 20. Dieser Unterschied konnte in vier voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

Nach adipogener Differenzierung (dritte Reihe/ mitte) zeigt die Bande des LRP1 hMSC- Tert 20- AD- dlk1 eine wesentlich schwächere Intensität im Vergleich zu der hMSC- Tert 20- AD. Dieser Unterschied konnte in fünf voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

Nach osteogener Differenzierung (dritte Reihe/ rechts) zeigt die Immunfärbung des LRP1 hMSC- Tert 20- OB- dlk1 eine schwächere Intensität im Vergleich zu der hMSC- Tert 20.

Dieser Unterschied konnte in vier voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

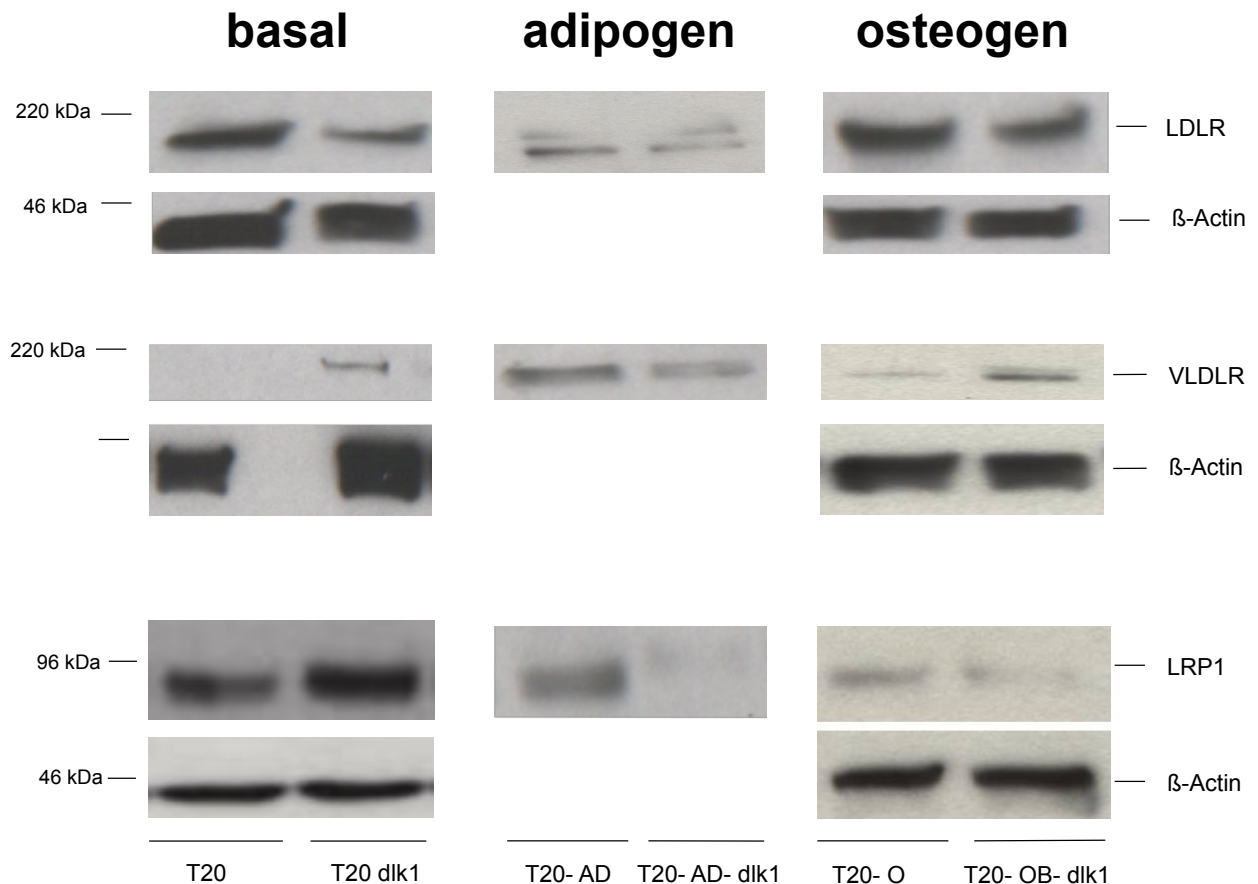


Abb. 4b: LDLR-, VLDLR- und LRP1- Proteinexpression von hMSC T20 und hMSC T20- dlk1 vor und nach adipogener und osteogener Differenzierung.

Western Blot von Membranproteinpräparation mit Differenzierungsstimuli wie in Material und Methoden beschrieben auf 10% SDS Page mit 40 μ g Membranprotein/Lane, Immunfärbung wie in Material und Methoden beschrieben mit monoklonalem spezifischem anti-VLDLR- Ak [6A6, 1:50], polyklonalem anti- LDLR- Ak [1:100] und

In den Western Blots nach adipogener Differenzierung wurden keine Ladekontrolle verwendet, da sowohl β - Actin, als auch RAP, welche in dieser Arbeit als Ladekontrolle verwandt werden, während adipogener Differenzierung reguliert sind.

Abbildung 4c zeigt den Western Blot von β - Actin und RAP nach adipogener Differenzierung.

Die Abbildung zeigt, dass beim Auftragen von gleicher Menge Membranprotein- in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt- sowohl die β - Actin- Expression, als auch die RAP- Expression reguliert ist.

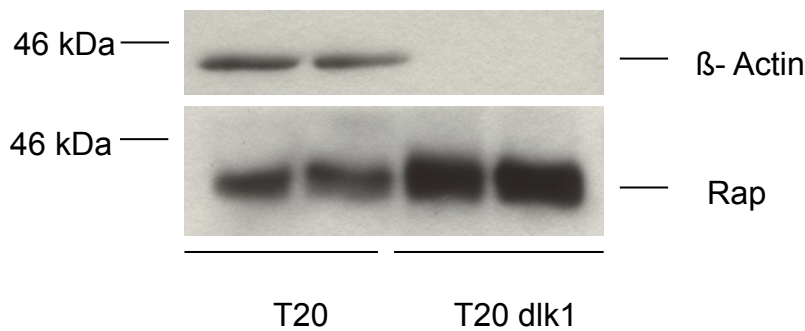


Abb. 4c: β - Actin und RAP- Proteinexpression von hMSC T20 und hMSC T20- dlk1 nach adipogener Differenzierung.

Western Blot von Membranproteinpräparation mit Differenzierungsstimuli wie in Material und Methoden beschrieben auf 10% SDS Page mit 40 μ g Membranprotein/Lane, Immunfärbung wie in Material und Methoden beschrieben mit monoklonalem spezifischem anti-RAP- Ak [1:50.000], und polyklonalem anti- β -Actin Ak [1:50.000]

Abbildung 4d zeigt die Ponceaufärbung des Western Blots nach adipogener Differenzierung, bei der man erkennen kann, dass hMSC- Tert 20-AD- dlk1 im Gegensatz zu hMSC- Tert 20- AD ein anderes Proteinbandenmuster aufweisen. Dieses Proteinbandenmuster wurde reproduzierbar dargestellt und die Western Blots ohne Ladekontrolle nach vorhergehender Membranproteinbestimmung mit gleicher Menge Membranprotein pro Bande durchgeführt.

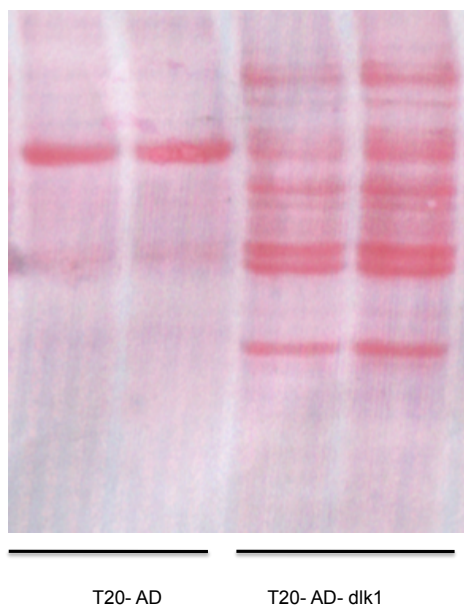


Abb. 4d: Proteinexpression von hMSC T20 und hMSC T20- dlk1 nach adipogener Differenzierung.

Western Blot von Membranproteinpräparation mit Differenzierungsstimuli wie in Material und Methoden beschrieben auf 10% SDS Page mit 40 μ g Membranprotein/Lane, Ponceaufärbung wie in Material und Methoden beschrieben

3.4 Apo E- Sekretion

Zur Analyse der Apo E- Expression in der Zelle wurden zum einen mRNA- Analysen mittels konventioneller RT- PCR und zum anderen Analysen über die Apo E- Sekretion in das Zellkulturmedium in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien durchgeführt.

Dazu wurde ein Elisa von Medienüberständen laut Material und Methoden durchgeführt und die Apo E- Sekretion in das Medium gemessen, um von der Apo E- Sekretion der Zellen auf die intrazelluläre Apo E- Konzentration zu schließen.

Eine Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot wurde aufgrund von Problemen mit dem Apo- E- Antikörper abgebrochen.

In Abbildung 5a und b zeigen die mRNA- Expression mittels RT- PCR von Apo E vor und nach adipogener und osteogener Differenzierung.

Man erkennt, dass in den ersten beiden Spuren (hMSC- Tert20 und hMSC- Tert 20- dlk1) die Signalgebung gleich stark ausgeprägt ist.

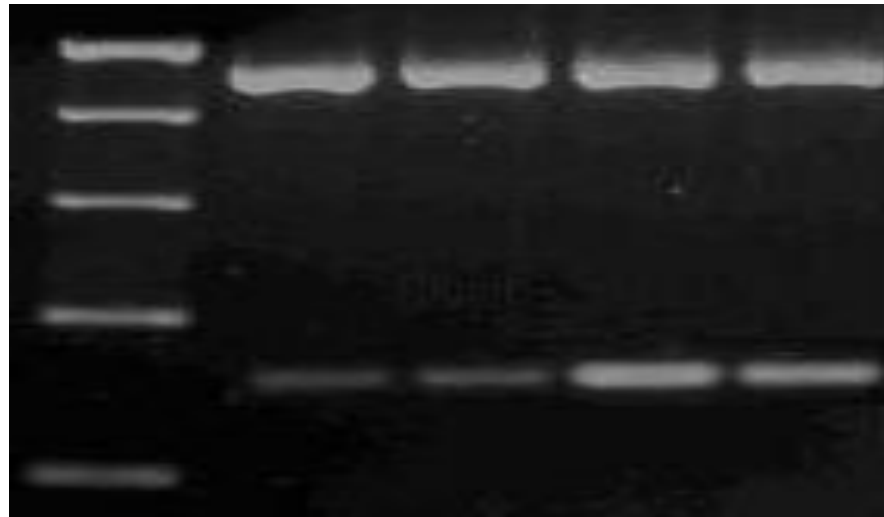
In der dritten Spur (hMSC- Tert 20- AD) ist die Signalgebung deutlich stärker als in den ersten beiden Spuren.

In der vierten Spur (hMSC- Tert 20- AD- dlk1) ist die Signalgebung im Vergleich zur Expression vor adipogener Differenzierung (Spur zwei) stärker, aber etwas schwächer im Vergleich mit der Expression der Zellen ohne dlk1- Überexpression (Spur drei)

Das bedeutet zum einen, dass mögliche Veränderungen in der Apo E- Sekretion während der Differenzierung transkriptionell reguliert sein können und zum andern, dass Veränderungen durch die dlk1- Überexpression ebenfalls transkriptionell reguliert sein können.

DNA Marker

500 bp →



T20	T20-dlk1	T20	T20-dlk1
-	-	+	+



adipogene Differenzierungszusätze

Abb. 5a: RT-PCR von Apo E mit hMSC- T20 und hMSC- T20-dlk1 mit und ohne adipogene Differenzierungsstimuli

über 14 Tage wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert und auf 2% Agarose Gel (10µl PCR Produkt Apo E/Lane , 5µl PCR Produkt GAPDH/ Lane) aufgetragen.

Die mRNA- Expression von Apo E vor und nach osteogener Differenzierung ist in Abbildung 5b dargestellt.

Man sieht, dass in allen vier Spuren die Signalgebung der mRNA- Expression gleich stark ausgeprägt ist.

Das bedeutet, dass eventuelle Veränderungen in der Apo E- Expression posttranskriptionell reguliert sein müssen.

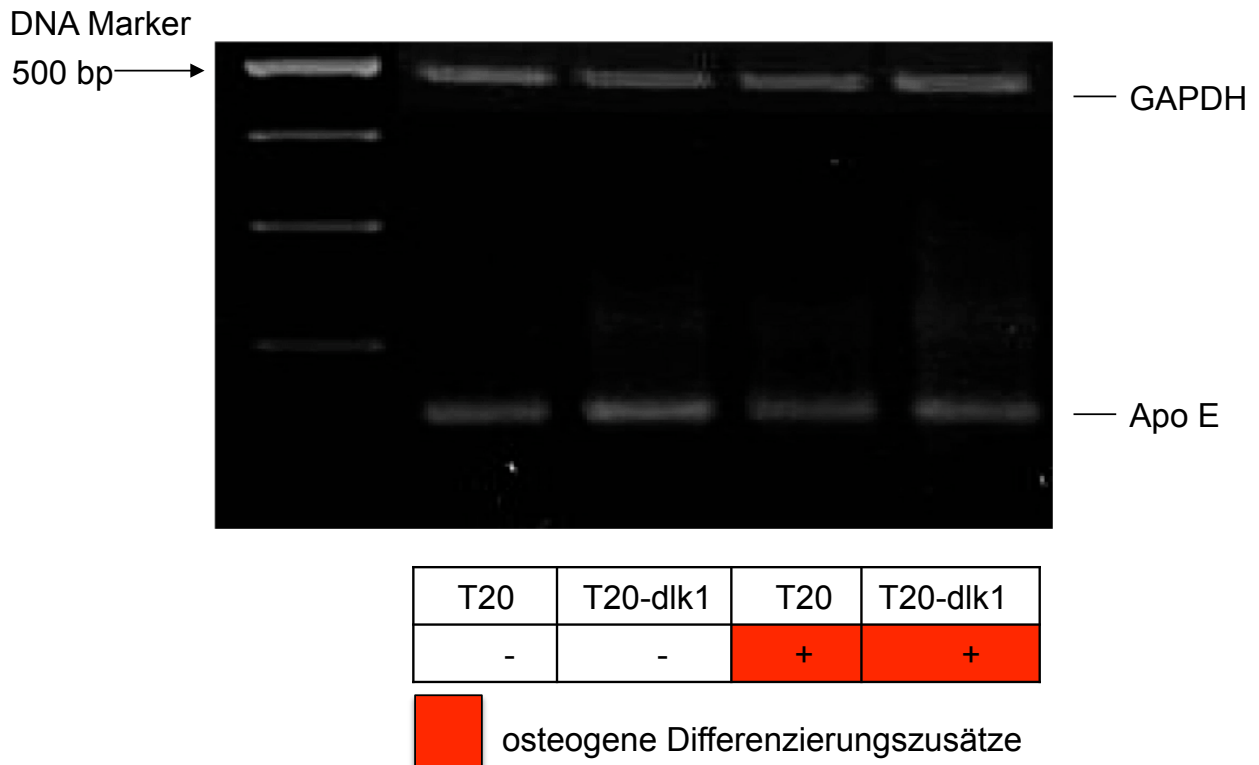


Abb. 5b: RT-PCR von Apo E mit hMSC- T20 und hMSC- T20-dlk1 mit und ohne osteogene Differenzierungsstimuli

über 6 Tage wie in Material und Methoden beschrieben kultiviert und auf 2% Agarose Gel (10µl PCR Produkt Apo E/Lane , 5µl PCR Produkt GAPDH/ Lane) aufgetragen.

Abbildung 6 zeigt die Mittelwerte von drei Werten eines Apo E- Elisass. Gemessen wurde die Apo E- Sekretion in das Medium während 60 Minuten von hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien.

Ein zweites Experiment konnte die Veränderungen bestätigen, jedoch konnte der Leerwert nicht gemessen werden und das Experiment dadurch nicht mit in die Auswertung einbezogen werden.

Man kann erkennen, dass die Apo E- Sekretion von hMSC- Tert 20 im basalen Zustand und nach adipogener Differenzierung sich nicht deutlich von der der hMSC- Tert 20- dlk1 unterscheidet, während nach osteogener Differenzierung hMSC- Tert 20- OB- dlk1 eine gesteigerte Apo E- Sekretion auf das doppelte der Sekretion von hMSC- Tert 20- OB aufweisen.

Aufgrund der niedrigen Zahl von durchgeführten Experimenten lässt sich keine sichere Aussage über den Einfluss von dlk1 auf die Sekretion von Apo E in das Medium treffen, diese könnte erst nach der Durchführung von weiteren Experimenten getroffen werden.

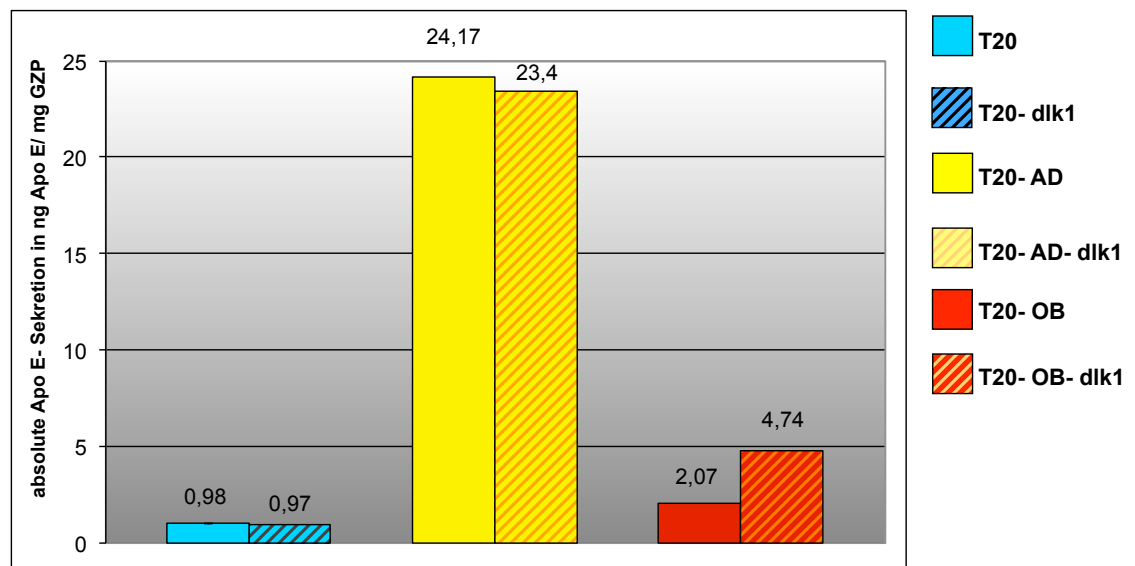


Abb. 6: Absolute Apo E- Sekretion in ng Apo E / mg GZP

Apo E- Elisa mit Medienüberständen von hMSC- T20 und hMSC- T20- dlk1 wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

Die Balken entsprechen Mittelwerten von drei Werten eines Experimentes.

3.5 Radioaktive Aufnahmeassays

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Expression der Lipoproteinrezeptoren Auswirkungen auf die Aufnahme von Lipoproteinpartikeln haben, wurde ein Aufnahmeassay mit ^{125}J - markierten Chylomikronen- Remnants durchgeführt.

Die Aufnahme von Lipoproteinpartikeln ist deshalb von Interesse, da sie zum einen wichtig für Wachstum, Proliferation und Differenzierung der Zellen ist und zum anderen mit Aufnahme der Partikel wichtige Signale für Stoffwechselprozesse übermittelt werden können.

Abbildung 7 zeigt die relative CR- Aufnahme nach einstündiger Inkubation mit radioaktiv markierten Chylomikronen- Remnants aus drei voneinander unabhängigen Experimenten in Prozent.

Die Balken entsprechen relativen Werten aus Mittelwerten der drei Experimente. Die veränderte CR- Aufnahme der Zellen mit dlk1- Überexpression wurde mit der Aufnahme der hMSC- Tert 20 in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien verglichen.

Im basalen Zustand und nach osteogener Differenzierung weisen hMSC- Tert 20- dlk1 im Vergleich zu den hMSC- Tert 20 eine höhere CR- Aufnahme auf, während die CR- Aufnahme nach adipogener Differenzierung bei den hMSC- Tert 20- dlk1 im Vergleich zu den hMSC- Tert 20 in den Experimenten so unterschiedliche Messwerte zeigte, dass eine Aussage erst nach weiteren Experimenten getroffen werden kann.

Die Standardabweichung der Werte unter basalen Bedingungen und nach osteogener Differenzierung zeigen, dass weitere Experimente nötig sind, um quantitative Aussagen zu erhalten, sich aber dennoch bereits ein Hinweis auf eine höhere CR- Aufnahme von Zellen mit dlk1- Überexpression zeigt.

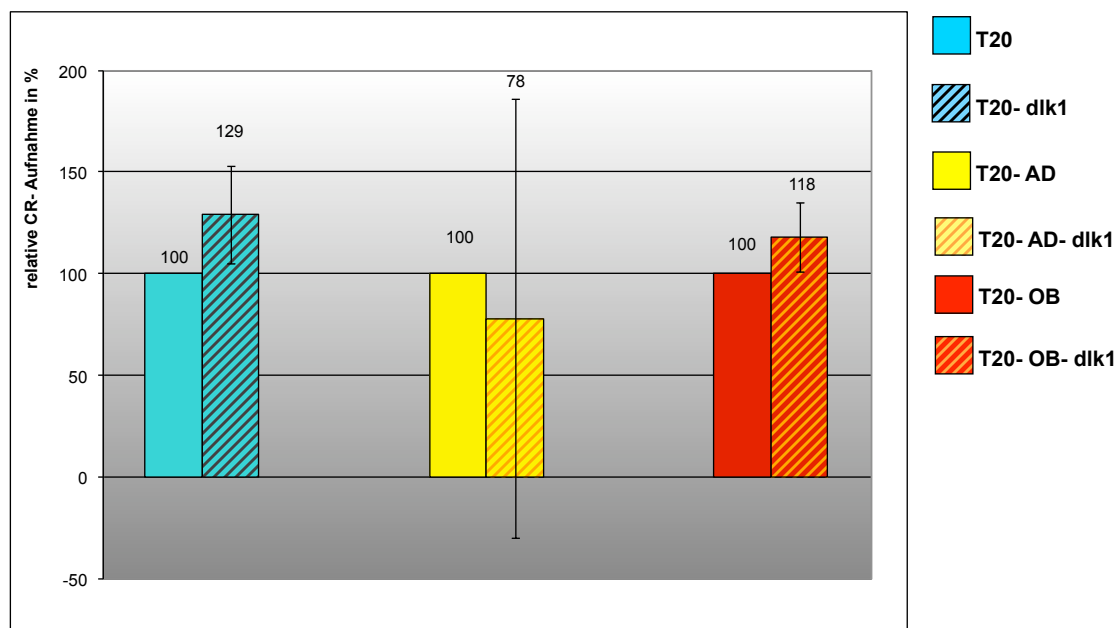


Abb. 7: relative CR- Aufnahme nach einstündiger Inkubation mit ^{125}J - markierten Chylomikronen- Remnants in %

CR- Aufnahmeassay durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben mit hMSC- T20 und hMSC- T20- dlk1 vor und nach adipogener und osteogener Differenzierung. Die Balken entsprechen relativen Werten aus Mittelwerten von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Abbildung 8 zeigt die absolute CR- Aufnahme der drei Experimente hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 vor und nach adipogener und osteogener Differenzierung.

Man sieht, dass im basalen Zustand die CR- Aufnahme von hMSC- Tert 20- dlk1 in Experiment 1 und 3 höher, in Experiment 2 jedoch niedriger als die Aufnahme von hMSC- Tert 20 ist.

Die CR- Aufnahme von hMSC- Tert 20- AD- dlk1 nach adipogener Differenzierung ist in Experiment 1 und in Experiment 3 höher als von hMSC- Tert 20- AD, in Experiment 2 niedriger als die Aufnahme von hMSC- Tert 20- AD.

Die CR- Aufnahme von hMSC- Tert 20- OB- dlk1 nach osteogener Differenzierung ist in Experiment 1, Experiment 2 und in Experiment 3 höher als von hMSC- Tert 20- OB. Das zeigt, dass erst durch eine wesentlich höhere Anzahl von Wiederholungen eine Aussage über die Unterschiede in der CR- Aufnahme von hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1 getroffen werden kann.

Durch Vergleichen der Zellen in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien kann man sehen, dass Adipozyten im Vergleich zu den Zellen unter basalen Bedingungen weniger CR aufnehmen. Eine Aussage über die Bedeutung der dlk1- Überexpression lässt sich aufgrund der Varianz der Messwerte nicht treffen.

Die CR- Aufnahme nach osteogener Differenzierung ist etwa gleich hoch oder höher im Vergleich zu der hMSC.

Die dlk1- Überexpression scheint nach osteogener Differenzierung eine höhere CR- Aufnahme zu bewirken.

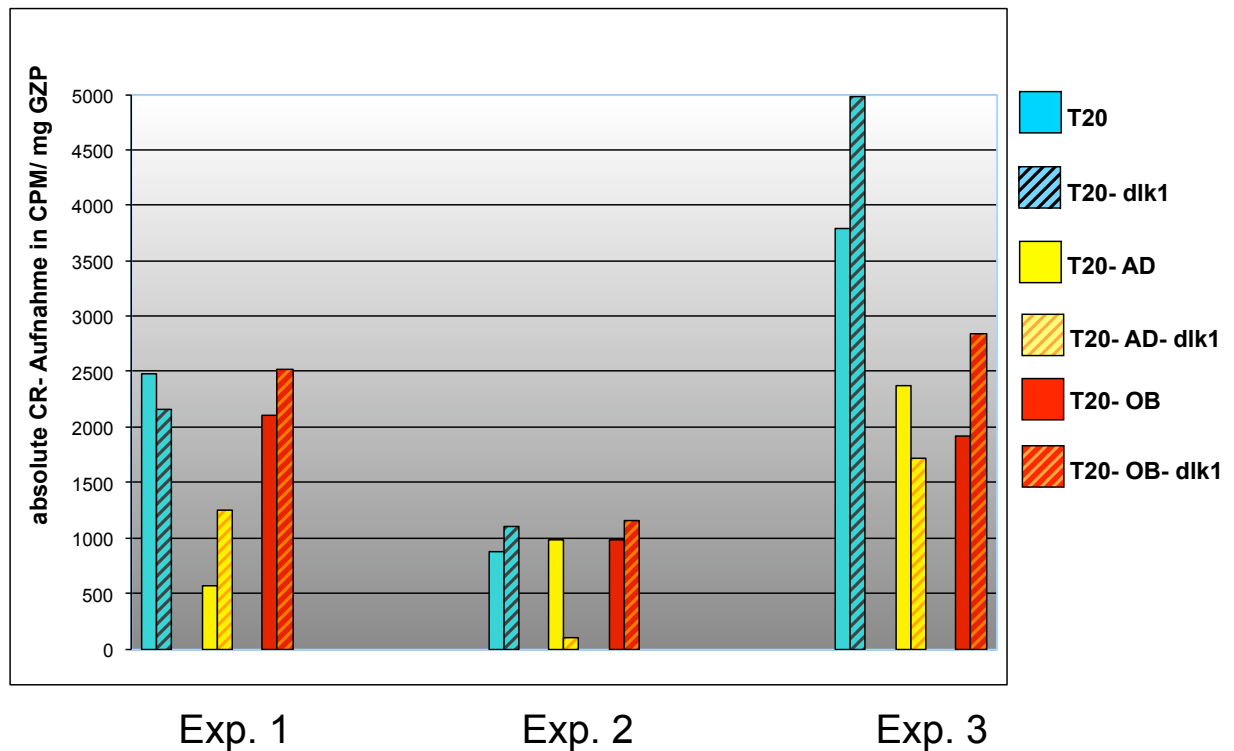


Abb. 8: absolute CR- Aufnahme nach einstündiger Inkubation mit ^{125}J - markierten Chylomikronen- Remnants gemessen in CPM/mg GZP

wie in Material und Methoden beschrieben in hMSC- T20 und hMSC- T20- dlk1 vor und nach adipogener und osteogener Differenzierung.

Die Balken entsprechen Mittelwerten aus zwei Werten.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Zusammenhänge zwischen dem delta-like-factor 1 und der Expression und Funktion von Lipoproteinrezeptoren und Apo E vor und nach adipogener und osteogener Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen untersucht.

Die Untersuchung der Expression von Lipoproteinrezeptoren vor der Differenzierung ergab eine verstärkte VLDLR- und LRP1- Expression durch die dlk1- Überexpression durch posttranskriptionelle Regulation.

Da die hMSC- Tert 20- dlk1 durch die dlk1- Überexpression in der Differenzierung gehemmt sind, benötigen sie prinzipiell weniger Lipoproteine als die zur Differenzierung fähigen hMSC- Tert 20.

Die verstärkte Expression von VLDLR und LRP1 bei dlk1- Überexpression könnte einen Kompensationsversuch der Zelle darstellen, mehr triglycerid- reiche Lipoproteine und die von ihnen gebundenen, für die Differenzierung wichtigen Substanzen aufzunehmen, um der Inhibition durch dlk1 entgegenzuwirken.

Die verstärkte Expression könnte auch Ausdruck der Aktivierung von Signalwegen sein, in die der VLDLR und LRP1 involviert sind.

Interessant wäre es, ob die Lipoproteinrezeptoren funktionsfähig an der Zelloberfläche lokalisiert sind oder funktionsunfähig im Cytoplasma akkumulieren. Wenn sie funktionsfähig an der Zelloberfläche lokalisiert wären, würden sie vermehrt Lipoproteine aufnehmen können oder Signaltransduktionwege aktivieren können.

Wenn sie im Cytoplasma funktionsunfähig akkumulieren würden, stünden sie weder für die Lipoproteinaufnahme, noch für die Signaltransduktionswege zur Verfügung.

Bei Versuchen, die Lokalisation der Lipoproteinrezeptoren in der Zelle mit Hilfe von Immunzytochemien darzustellen, zeigte sich, dass die Zellen mit dlk1- Überexpression sich durch ihre größere Zellgröße schlecht einschichtig darstellen ließen und eine verstärkte Tendenz zur frühzeitigen und leichteren Ablösung von den Cover Slips zeigten. Hier war damit eine Grenze der Methoden zur weiteren Untersuchung der dlk1- überexprimierenden Zellen erreicht, biochemische Trennung der verschiedenen Membrankompartimente könnte Aufschlüsse über die Funktionalität der Rezeptoren geben.

Die Lipoproteinrezeptorexpression nach adipogener und osteogener Differenzierung zeigt eine unterschiedliche Expression von VLDLR bei hMSC- OB- dlk1 und hMSC- AD- dlk1.

Während die VLDLR- Expression bei hMSC- AD- dlk1 niedriger als bei den stärker differenzierten hMSC- AD ist, scheinen die weniger differenzierten hMSC- OB- dlk1 eine stärkere VLDLR- Expression als die hMSC- OB aufzuweisen.

Dies könnte darin begründet sein, dass die Zelle unter adipogener Differenzierung die Aufgabe der Lipidspeicherung einnimmt und so eine sehr große Menge an Triglyceriden aufgenommen wird und die Rezeptorexpression deshalb physiologischerweise unter der Differenzierung steigt, um diese Triglyceride aufnehmen zu können.

In hMSC- Tert 20 in undifferenziertem Stadium und somit auch als hMSC- Tert 20- AD- dlk1, da diese weniger stark differenziert sind, besteht vorerst eine geringere Speicherfunktion für Triglyceriden als in ausdifferenzierten Adipozyten.

Die verstärkte VLDLR- Expression nach osteogener Differenzierung in hMSC- Tert 20- OB- dlk1 könnte ein Versuch der Kompensation sein, die Rezeptoren verstärkt zu exprimieren, durch die für die Differenzierung wichtigen Substanzen aufgenommen werden, um der Inhibition entgegenzuwirken.

Die unterschiedliche Regulation zeigt, dass eine unterschiedliche Inhibierung durch dlk1 das intraossäre Gleichgewicht zwischen Adipozyten und Osteoblasten beeinflussen kann.

Die LDLR- Expression ist bei hMSC- OB- dlk1 im Vergleich zu den hMSC- OB leicht erniedrigt, die LDLR- Expression nach adipogener Expression zeigt keine wesentlichen Unterschiede. Da der LDLR vor allem zur Aufnahme von Cholesterin dient, Osteoblasten einen erniedrigten Bedarf an Cholesterinen haben, müsste die LDLR- Expression in den weniger differenzierten hMSC- Tert 20- OB- dlk1 eigentlich eher höher sein als in den zu Osteoblasten differenzierten hMSC- Tert 20- OB.

Auch hier zeigt sich, dass dlk1 in die osteogene Differenzierung stärker regulierend eingreift als in die adipogene Differenzierung und so das intraossäre Gleichgewicht zwischen Adipozyten und Osteoblasten beeinflusst wird.

Die LRP1- Expression sowohl nach adipogener, als auch nach osteogener Differenzierung ist bei den hMSC mit dlk1- Überexpression wesentlich schwächer als bei hMSC- Tert 20.

Die sichtbaren Unterschiede in der LRP1- Rezeptorexpression lassen sich unterschiedlich interpretieren.

Da die hMSC mit dlk1- Überexpression durch dlk1 an der Differenzierung gehemmt werden, besteht ein niedrigerer Bedarf an für die Differenzierung wichtigen Lipoproteinen, was sich in einer verminderten Expression von Lipoproteinrezeptoren ausdrückt.

Die differenzierten Zellen benötigen durch z.B. ihre Größe und ihre Aufgaben eine erhöhte Menge an triglyceridreichen Lipoproteinen und mit ihnen transportierten Substanzen, wie z.B. Vitamin K für die Knochenmatrixbildung oder essentielle Fettsäuren zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPARgamma.

Dieses wird im Adipozytenmodell und im Osteoblastenmodell sichtbar, bei dem nach der Differenzierung zu Adipozyten und Osteoblasten die hMSC- Tert 20- dlk1 eine geringere LRP1- Expression aufweisen.

Eine andere Erklärung wäre, dass durch dlk1 LRP1 herunterreguliert wird und das den Weg der Inhibition der Differenzierung darstellt.

Das könnte auch ein Grund dafür sein, dass nach osteogener Differenzierung VLDLR und LDLR verstärkt exprimiert werden, um die durch dlk1 gesteuerte Supprimierung von LRP1 auszugleichen, um der Inhibition entgegenzuwirken.

Untersuchungen an Zellen mit dlk1- und LRP1- Überexpression würden nach dieser Theorie Hinweise dafür geben können, dass diese Zellen weniger stark in der Differenzierung gehemmt werden, da die LRP1- Überexpression die Verminderung der LRP1- Expression verhindern würde.

Die Apo E- Sekretion in das serumfreie Medium zeigt unter basalen Bedingungen eine annähernd gleich starke Sekretion in das serumfreie Medium in hMSC- Tert 20 und hMSC- Tert 20- dlk1.

Wenn man davon ausgeht, dass die Apo E- Sekretion in etwa die Apo E- Expression in den Zellen widerspiegelt, bedeutet das, dass trotz wesentlich höherer Expression von VLDLR und LRP1 in hMSC- Tert 20- dlk1 nicht mehr Apo E aufgenommen wird.

Das würde dafür sprechen, dass die Rezeptoren nicht alle funktionsfähig an der Zelloberfläche exprimiert sind, sondern auch funktionsunfähig im Cytoplasma akkumuliert sind.

Die gesteigerte Apo E- Sekretion könnte dlk1- induziert die Differenzierung inhibieren.

Schilling et al. zeigten eine verstärkte Knochenbildung bei Apo E- defizienten Mäusen ¹⁰¹, ein Phänotyp, der durch die verminderte γ - Carboxylierung des Osteocalcins entstehen könnte, welches Knochenbildung hemmt ¹⁰⁰.

Der Mechanismus des *dlk1* könnte sein, die Apo E- Expression zu steigern, dadurch die γ - Carboxylierung des Osteocalcins zu erhöhen, um so die Knochenbildung zu hemmen.

Die Apo E- Sekretion in das serumfreie Medium zeigt nach adipogener Differenzierung eine annähernd gleiche starke Apo E- Sekretion in das serumfreie Medium in hMSC- Tert 20- AD und hMSC- Tert 20- AD- *dlk1*, nach osteogener Differenzierung eine wesentlich stärkere Apo E- Sekretion bei hMSC- Tert 20- OB- *dlk1* als bei hMSC- Tert 20- OB.

Die hohe Apo- Sekretion der hMSC- OB-*dlk1* in das serumfreie Medium im Vergleich zu den hMSC- OB könnte darauf hinweisen, dass die Inhibierung der Differenzierung zu Osteoblasten Apo E- vermittelt geschieht.

Die Tatsache, dass die Apo E- Sekretion transkriptional reguliert ist, lässt eine wichtige Funktion des Apo E vermuten.

In der Apo E- Sekretion zeigt sich eine unterschiedlich starke Regulierung auf adipogener und osteogener Ebene, der Apo E- Elisa mit Zellen nach osteogener Differenzierung zeigt eine deutlich stärkere Apo E- Sekretion der hMSC- OB- *dlk1*.

Die verstärkte Apo E- Sekretion der hMSC- OB- *dlk1* könnte der Mechanismus des *dlk1* sein, die Osteogenese und damit das intraossäre Gleichgewicht zwischen Adipozyten und Osteoblasten zu regulieren.

Auch hier wäre der Ansatzpunkt des *dlk1* für die Regulation vor allem die osteogene Differenzierung.

Interessant wäre es, die Lipoproteinrezeptorexpression in z.B. *dlk1*- defizienten Mäusen zu untersuchen und damit weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen *dlk1* und dem Lipoproteinmetabolismus zu erhalten.

Die radioaktiven Aufnahmeassays unter basalen Bedingungen weisen auf eine verstärkte Aufnahme radioaktiver CR bei hMSC- Tert 20- *dlk1* im Vergleich mit hMSC- Tert 20 hin.

Die Zellen mit *dlk1*- Überexpression nach adipogener Differenzierung erbrachten so unterschiedliche Messwerte, dass keine Aussage über den Einfluss von *dlk1* auf die CR- Aufnahme hMSC- Tert 20 getroffen werden kann.

Die Assays nach osteogener Differenzierung weisen auf eine erhöhte CR- Aufnahme der hMSC- Tert 20- OB- *dlk1* im Vergleich zu der der hMSC- Tert 20- OB hin.

Dieser Hinweis korreliert mit der erhöhten VLDLR- Expression und der erhöhten Apo E- Sekretion, nicht aber mit der erniedrigten LRP1- Expression. Eine Erklärung könnte sein, dass die in der Differenzierung gehemmten hMSC- Tert 20- OB- *dlk1* als weniger

differenzierte Zellen mehr CR aufnehmen- eventuell über nicht- rezeptorgebundene Aufnahme, um einen höheren Differenzierungsgrad zu erlangen und der Zeitpunkt, in dem dlk1 in die Differenzierung eingreift, erst in der weiteren Entwicklung folgt.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass gerade die CR- und mit ihnen auch die Apo E- Aufnahme der Mechanismus ist, mit dem dlk1 die Differenzierung hemmt.

Auch hier wird deutlich, dass dlk1 regulierend auf das Gleichgewicht zwischen intraossären Adipozyten und Osteoblasten einwirkt, der Einfluss des dlk1 ist auf die osteogene Differenzierung auch hier stärker als auf die adipogene Differenzierung.

Durch die geringe Anzahl an Experimenten und die hohe Varianz der Messwerte wird nur eine Tendenz der Beeinflussbarkeit der CR- Aufnahme unter dlk1- Überexpression sichtbar.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Expression und Funktion von Lipoproteinrezeptoren und Apolipoprotein E in adulten humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen während adipogener und osteogener Differenzierung unter dem Einfluss von dlk1 untersucht. Ziel der Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression von dlk1 und der Expression von Mitgliedern der LDLR- Genfamilie und von Apo E in humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen zu finden. Der Mechanismus, über den dlk1 inhibierend auf die adipogene und osteogene Differenzierung von hMSC zu Adipozyten und Osteoblasten einwirkt ist noch nicht bekannt.

Die durchgeführten Analysen zur Expression von Lipoproteinrezeptoren ergaben deutliche Unterschiede unter Einfluss von dlk1. Unter basalen Bedingungen zeigte sich eine post-transkriptionelle Regulation der Expression von VLDLR, LDLR und LRP1 in Abhängigkeit von dlk1. Bei unveränderter mRNA Expression der Rezeptoren war durch dlk1 Überexpression eine verminderte Expression von LDLR Protein zu beobachten, während die VLDLR und LRP1 Proteinexpression durch dlk1 deutlich gesteigert wurden.

Unter adipogenen Differenzierungsbedingungen hingegen stellte sich ein völlig anderes Bild dar. Die mRNA und Proteinexpression von LDLR war unverändert, die von VLDLR und LRP1 hingegen klar durch die Überexpression von dlk1 reduziert.

Nach osteogener Differenzierung war die Rezeptorexpression von VLDLR, LDLR durch dlk1 zwar auf Proteinebene tendenziell erhöht und LRP1 tendenziell erniedrigt, die Unterschiede zu den Vergleichszellen ohne dlk1 Überexpression waren jedoch vergleichsweise gering, d.h. bei weitem nicht so klar ausgeprägt wie während der adipogenen Differenzierung.

Hinsichtlich Apo E war auf mRNA Ebene reproduzierbar zu beobachten, dass dlk1 Überexpression unter adipogenen Bedingungen die Apo E- Expression reduzierte, während unter osteogenen Bedingungen keine eindeutiger Einfluß von dlk1 auf die Apo E- Expression beobachtet wurde.

Zusammenfassend bestehen deutliche Unterschiede in der Expression von VLDLR, LRP1 und Apo E unter Einfluss von dlk1 während der adipogenen Differenzierung von hMSC-Tert. Ob die veränderte Expression von Apo E und der Rezeptoren eine Folge der inhibierten adipogenen Differenzierung ist, oder sie ursächlich für das veränderte

Differenzierungsverhalten mitverantwortlich ist, wird in weiteren Experimenten zu klären sein.

Die Tatsache, dass das Expressionsverhalten für diese Moleküle unter osteogenen Differenzierungsbedingungen deutlich von dem unter adipogenen Bedingungen abweicht, obwohl die Überexpression von dlk1 beide Differenzierungswege inhibiert, lässt die Vermutung zu, dass Apo E, der VLDLR und LRP1 eine Schlüsselfunktion für die Festlegung der adipogenen versus osteogenen Differenzierung von Stammzellen des Knochenmarks sein können.

6 Literaturverzeichnis

1. Smas,C.M. & Sul,H.S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**, 725-734 (1993).
2. Appella,E., Weber,I.T. & Blasi,F. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett.* **231**, 1-4 (1988).
3. Carlsson,C. *et al.* Growth hormone and prolactin stimulate the expression of rat preadipocyte factor-1/delta-like protein in pancreatic islets: molecular cloning and expression pattern during development and growth of the endocrine pancreas. *Endocrinology* **138**, 3940-3948 (1997).
4. Hansen,L.H., Madsen,B., Teisner,B., Nielsen,J.H. & Billestrup,N. Characterization of the inhibitory effect of growth hormone on primary preadipocyte differentiation. *Mol. Endocrinol.* **12**, 1140-1149 (1998).
5. Kaneta,M. *et al.* A role for pref- 1 and HES- 1 in thymocyte development. *J. Immunol.* **164**, 256-264 (2000).
6. Ohno,N., Izawa,A., Hattori,M., Kageyama,R. & Sudo,T. dlk inhibits stem cell factor-induced colony formation of murine hematopoietic progenitors: Hes-1-independent effect. *Stem Cells* **19**, 71-79 (2001).
7. Smas,C.M. & Sul,H.S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**, 725-734 (1993).
8. Smas,C.M. & Sul,H.S. Characterization of Pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **20 Suppl 3**, S65-S72 (1996).
9. Sul,H.S., Smas,C., Mei,B. & Zhou,L. Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **24 Suppl 4**, S15-S19 (2000).
10. Moon,Y.S. *et al.* Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol. Cell Biol.* **22**, 5585-5592 (2002).
11. Berends,M.J. *et al.* Two cases of maternal uniparental disomy 14 with a phenotype overlapping with the Prader-Willi phenotype. *Am. J. Med. Genet.* **84**, 76-79 (1999).

12. Fokstuen,S., Ginsburg,C., Zachmann,M. & Schinzel,A. Maternal uniparental disomy 14 as a cause of intrauterine growth retardation and early onset of puberty. *J. Pediatr.* **134**, 689-695 (1999).
13. Georgiades,P., Watkins,M., Surani,M.A. & Ferguson-Smith,A.C. Parental origin-specific developmental defects in mice with uniparental disomy for chromosome 12. *Development* **127**, 4719-4728 (2000).
14. Kobayashi,S. *et al.* Mouse Peg9/ Dlk1 and human PEG9/ DLK1 are paternally expressed imprinted genes closely located to the maternally expressed imprinted genes: mouse Meg3/ Gtl2 and human MEG3. *Genes Cells* **5**, 1029-1037 (2000).
15. Takada,S. *et al.* Delta-like and gtl2 are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Curr. Biol.* **10**, 1135-1138 (2000).
16. Wylie,A.A., Murphy,S.K., Orton,T.C. & Jirtle,R.L. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res.* **10**, 1711-1718 (2000).
17. Abdallah,B.M. *et al.* Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/ Pref-1. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 841-852 (2004).
18. Beisiegel,U. Apolipoproteins as ligands for lipoprotein receptors. In: Rosseneu M (Hrsg) Structureand function of apolipoproteins. 269-294. CRC Press, Boca Raton, USA.
19. Imaizumi,K., Fainaru,M. & Havel,R.J. Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins. *J. Lipid Res.* **19**, 712-722 (1978).
20. Beisiegel,U., Weber,W., Ihrke,G., Herz,J. & Stanley,K.K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164 (1989).
21. Rohlmann,A., Gotthardt,M., Hammer,R.E. & Herz,J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J. Clin. Invest* **101**, 689-695 (1998).

22. Zhang,L. & Liu,B. [Apolipoprotein C III binding sites (receptor) on non-parenchymal cells from rat liver]. *Hua Xi. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* **23**, 233-236 (1992).
23. Beisiegel,U., Weber,W. & Bengtsson-Olivecrona,G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 8342-8346 (1991).
24. Beisiegel,U. & Heeren,J. Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc. Nutr. Soc.* **56**, 731-737 (1997).
25. Heeren,J., Niemeier,A., Merkel,M. & Beisiegel,U. Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J. Mol. Med.* **80**, 576-584 (2002).
26. Hussain,M.M. *et al.* Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. Factors that modify tissue-specific uptake. *J. Biol. Chem.* **264**, 9571-9582 (1989).
27. Niemeier,A. *et al.* Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 283-293 (2005).
28. Hobbs,H.H., Brown,M.S. & Goldstein,J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* **1**, 445-466 (1992).
29. Brown,M.S. & Goldstein,J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986).
30. Kita,T., Beisiegel,U., Goldstein,J.L., Schneider,W.J. & Brown,M.S. Antibody against low density lipoprotein receptor blocks uptake of low density lipoprotein (but not high density lipoprotein) by the adrenal gland of the mouse in vivo. *J. Biol. Chem.* **256**, 4701-4703 (1981).
31. Strickland,D.K. *et al.* Primary Structure of α_2 -Macroglobulin Receptor- associated Protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 13364-13369 (1991).

32. Bu, G., Geuze, H.J., Strous, G.J. & Schwartz, A.L. 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO J.* **14**, 2269-2280 (1995).
33. Willnow, T.E., Armstrong, S.A., Hammer, R.E. & Herz, J. Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 4537-4541 (1995).
34. Willnow, T.E. *et al.* RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J.* **15**, 2632-2639 (1996).
35. Obermoeller-McCormick, L.M. *et al.* Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *J. Cell Sci.* **114**, 899-908 (2001).
36. Brown, M.S., Herz, J., Kowal, R.C. & Goldstein, J.L. The low-density lipoprotein receptor-related protein: double agent or decoy? *Curr Opin Lipidol* **2**, 65-72 (1991).
37. Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. & Stanley, K.K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164 (1989).
38. Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V. & Brown, M.S. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 5810-5814 (1989).
39. Verges, M., Bensadoun, A., Herz, J., Belcher, J.D. & Havel, R.J. Endocytosis of hepatic lipase and lipoprotein lipase into rat liver hepatocytes in vivo is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 9030-9036 (2004).
40. Willnow, T.E., Sheng, Z., Ishibashi, S. & Herz, J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* **264**, 1471-1474 (1994).

41. Herz,J., Clouthier,D.E. & Hammer,R.E. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411-421 (1992).
42. Boucher,P., Gotthardt,M., Li,W.P., Anderson,R.G. & Herz,J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* **300**, 329-332 (2003).
43. Takayama,Y., May,P., Anderson,R.G. & Herz,J. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta). *J. Biol. Chem.* **280**, 18504-18510 (2005).
44. Ishigami,M., Swertfeger,D.K., Granholm,N.A. & Hui,D.Y. Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J. Biol. Chem.* **273**, 20156-20161 (1998).
45. Zeleny,M., Swertfeger,D.K., Weisgraber,K.H. & Hui,D.Y. Distinct apolipoprotein E isoform preference for inhibition of smooth muscle cell migration and proliferation. *Biochemistry* **41**, 11820-11823 (2002).
46. Llorente-Cortes,V., Martinez-Gonzalez,J. & Badimon,L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1572-1579 (2000).
47. Moon,R.T., Brown,J.D. & Torres,M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet.* **13**, 157-162 (1997).
48. Zilberberg,A., Yaniv,A. & Gazit,A. The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 17535-17542 (2004).
49. Salic,A., Lee,E., Mayer,L. & Kirschner,M.W. Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* **5**, 523-532 (2000).
50. Behrens,J. Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **910**, 21-33 (2000).

51. Polakis,P. More than one way to skin a catenin. *Cell* **105**, 563-566 (2001).
52. Datta,N.S., Chen,C., Berry,J.E. & McCauley,L.K. PTHrP signaling targets cyclin D1 and induces osteoblastic cell growth arrest. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1051-1064 (2005).
53. Zerbinatti,C.V. & Bu,G. LRP and Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* **16**, 123-135 (2005).
54. Gandy,S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest* **115**, 1121-1129 (2005).
55. Brunkan,A.L. & Goate,A.M. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J. Neurochem.* **93**, 769-792 (2005).
56. Van Uden,E. *et al.* Aberrant presenilin-1 expression downregulates LDL receptor-related protein (LRP): is LRP central to Alzheimer's disease pathogenesis? *Mol. Cell Neurosci.* **14**, 129-140 (1999).
57. May,P., Reddy,Y.K. & Herz,J. Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 18736-18743 (2002).
58. von Arnim,C.A. *et al.* The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J. Biol. Chem.* **280**, 17777-17785 (2005).
59. Kinoshita,A., Shah,T., Tangredi,M.M., Strickland,D.K. & Hyman,B.T. The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe65. *J. Biol. Chem.* **278**, 41182-41188 (2003).
60. Takahashi,S., Kawarabayasi,Y., Nakai,T., Sakai,J. & Yamamoto,T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 9252-9256 (1992).
61. Niemeier,A. *et al.* VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J. Lipid Res.* **37**, 1733-1742 (1996).

62. Argraves, K.M. *et al.* The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26550-26557 (1995).
63. Gafvels, M.E. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9pter-p23. *Somat. Cell Mol. Genet.* **19**, 557-569 (1993).
64. Yamamoto, T. *et al.* The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **748**, 217-224 (1995).
65. Frykman, P.K., Brown, M.S., Yamamoto, T., Goldstein, J.L. & Herz, J. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 8453-8457 (1995).
66. Gotto, A.M., Jr., Pownall, H.J. & Havel, R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* **128**, 3-41 (1986).
67. Heeren, J., Weber, W. & Beisiegel, U. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 3)**, 349-359 (1999).
68. Farkas, M.H., Swift, L.L., Hasty, A.H., Linton, M.F. & Fazio, S. The recycling of apolipoprotein E in primary cultures of mouse hepatocytes. Evidence for a physiologic connection to high density lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 9412-9417 (2003).
69. Heeren, J. *et al.* Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J. Biol. Chem.* **278**, 14370-14378 (2003).
70. Wilson, H.M., Patel, J.C., Russell, D. & Skinner, E.R. Alterations in the concentration of an apolipoprotein E-containing subfraction of plasma high density lipoprotein in coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* **220**, 175-187 (1993).

71. Innerarity, T.L. & Mahley, R.W. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* **17**, 1440-1447 (1978).
72. Zannis, V.I. *et al.* Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J. Lipid Res.* **23**, 911-914 (1982).
73. Zaiou, M. *et al.* Apolipoprotein E₃-low density lipoprotein receptor interaction. Influences of basic residue and amphipathic alpha-helix organization in the ligand. *J. Lipid Res.* **41**, 1087-1095 (2000).
74. Davignon, J., Gregg, R.E. & Sing, C.F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **8**, 1-21 (1988).
75. Roses, A.D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* **47**, 387-400 (1996).
76. Kohlmeier, M., Saupe, J., Schaefer, K. & Asmus, G. Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif. Tissue Int.* **62**, 278-281 (1998).
77. Shiraki, M. *et al.* Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 1438-1445 (1997).
78. Cauley, J.A. *et al.* Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk--The Study of Osteoporotic Fractures. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1175-1181 (1999).
79. Johnston, J.M., Cauley, J.A. & Ganguli, M. Apo E 4 and hip fracture risk in a community-based study of older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **47**, 1342-1345 (1999).
80. Salamone, L.M. *et al.* Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 308-314 (2000).
81. Pluijm, S.M. *et al.* Effects of gender and age on the association of apolipoprotein E epsilon4 with bone mineral density, bone turnover and the risk of fractures in older people. *Osteoporos. Int.* **13**, 701-709 (2002).

82. Dick, I.M. *et al.* Apolipoprotein E4 is associated with reduced calcaneal quantitative ultrasound measurements and bone mineral density in elderly women. *Bone* **31**, 497-502 (2002).
83. Long, J.R. *et al.* APOE haplotypes influence bone mineral density in Caucasian males but not females. *Calcif. Tissue Int.* **75**, 299-304 (2004).
84. Saupe, J., Shearer, M.J. & Kohlmeier, M. Phylloquinone transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**, 204-208 (1993).
85. Booth, S.L. *et al.* Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1201-1208 (2000).
86. Stulc, T., Ceska, R., Horinek, A. & Stepan, J. Bone mineral density in patients with apolipoprotein E type 2/2 and 4/4 genotype. *Physiol Res.* **49**, 435-439 (2000).
87. von Muhlen, D.G., Barrett-Connor, E., Schneider, D.L., Morin, P.A. & Parry, P. Osteoporosis and apolipoprotein E genotype in older adults: the Rancho Bernardo study. *Osteoporos. Int.* **12**, 332-335 (2001).
88. Gerdes, L.U., Vestergaard, P., Hermann, A.P. & Mosekilde, L. Regional and hormone-dependent effects of apolipoprotein E genotype on changes in bone mineral in perimenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1906-1916 (2001).
89. Zajickova, K., Zofkova, I., Hill, M., Horinek, A. & Novakova, A. Apolipoprotein E 4 allele is associated with low bone density in postmenopausal women. *J. Endocrinol. Invest* **26**, 312-315 (2003).
90. Sennels, H.P. *et al.* Association between polymorphisms of apolipoprotein E, bone mineral density of the lower forearm, quantitative ultrasound of the calcaneus and osteoporotic fractures in postmenopausal women with hip or lower forearm fracture. *Scand. J. Clin. Lab Invest* **63**, 247-258 (2003).
91. Efstathiadou, Z., Koukoulis, G., Stakias, N., Challa, A. & Tsatsoulis, A. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with spinal bone mineral density in peri- and postmenopausal Greek women. *Maturitas* **48**, 259-264 (2004).

92. Schoofs, M.W. *et al.* ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam study. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1490-1496 (2004).
93. Wong, S.Y. *et al.* The prevalence of Apo E4 genotype and its relationship to bone mineral density in Hong Kong Chinese. *J. Bone Miner. Metab* **23**, 261-265 (2005).
94. Gimble, J.M. The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol.* **2**, 304-312 (1990).
95. Dodds, R.A., Gowen, M. & Bradbeer, J.N. Microcytophotometric analysis of human osteoclast metabolism: lack of activity in certain oxidative pathways indicates inability to sustain biosynthesis during resorption. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 599-606 (1994).
96. Nuttall, M.E. & Gimble, J.M. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone* **27**, 177-184 (2000).
97. Lamon-Fava, S. *et al.* Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1226-1231 (1998).
98. Koshihara, Y., Hoshi, K., Okawara, R., Ishibashi, H. & Yamamoto, S. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J. Endocrinol.* **176**, 339-348 (2003).
99. Pan, L.C. & Price, P.A. The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 6109-6113 (1985).
100. Ducy, P. *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**, 448-452 (1996).
101. Schilling, A.F. *et al.* Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 274-282 (2005).
102. Tzameli, I. *et al.* Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 36093-36102 (2004).

103. Nuttall, M.E. & Gimble, J.M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 290-294 (2004).
104. Nuttall, M.E., Patton, A.J., Olivera, D.L., Nadeau, D.P. & Gowen, M. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 371-382 (1998).
105. Pittenger, M.F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
106. Beresford, J.N., Bennett, J.H., Devlin, C., Leboy, P.S. & Owen, M.E. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* **102 (Pt 2)**, 341-351 (1992).
107. Gimble, J.M. *et al.* Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J. Cell Biochem.* **58**, 393-402 (1995).
108. Lecka-Czernik, B. *et al.* Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* **143**, 2376-2384 (2002).
109. Akune, T. *et al.* PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest* **113**, 846-855 (2004).
110. Lagace, T.A. *et al.* Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Invest* **116**, 2995-3005 (2006).

7 Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis beinhaltet alle fachsprachlichen Abkürzungen und Kurzbezeichnungen.

Angloamerikanische Kürzel wurden weitestgehend übersetzt.

AK	Antikörper
aP2	Adaptor- related Protein 2
Apo E	Apolipoprotein E
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	revers transkribierte mRNA
Chol	Cholesterol
CM	Chylomikronen
CR	Chylomikronen- Remnants
DAPI	4',6- Diamino- 2- phenylindol- dihydrochlorid
dlk1	delta- like- Protein 1
dNTP's	Desoxynucleotid-5'-triphosphat
DTT	1,4- Dithiothreit
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	Epidermal Groth Factor
FBS	Fetales Bovines Serum
GZP	Gesamtzellprotein
HDL	High- density- lipoprotein
hMSC	human mesenchymal stem cell
IDL	Intermediate density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	LDL- Rezeptor
LPL	endotheliale Lipoproteinlipase
LRP1	LDL- Rezeptor- related- Protein 1
PAGE	Polyacrylamid- Gel- Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion

P/S	Penicillin/ Streptomycin
PPAR γ	Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Gamma
RAP	Rezeptor- Assoziiertes- Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT- PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
T20	Tert 20
TBE	TRIS- Borat- EDTA- Puffer
TG	Triglycerid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan-hydrochlorid
TRL	Triglycerid- rich- lipoprotein
VLDL	Very low density lipoprotein
VLDLR	VLDL- Rezeptor
w/v	Masse/Volumen

weitere Abkürzungen:

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d. h.	das heißt
ggf.	gegebenenfalls
s.	siehe
S.	Seite
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
z. Z.	zur Zeit

8 Danksagung

Mein Dank gilt

Frau Prof. Dr. Dr. Beisiegel und Dr. Andreas Niemeier

für die Überlassung des Themas

und die große Unterstützung,

sowie allen Mitarbeitern des Labors

- insbesondere *Walter Tauscher*

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und dass ich die Dissertation bisher keinem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung gegeben oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

10 Lebenslauf

Name	Lisa Buddrus
Geburtsdatum	24.05.1982
Geburtsort	Hamburg
Nationalität	deutsch
Eltern	Dr. Volker Buddrus Monika Buddrus, geb. Kopnarski
Familienstand	ledig
Schul Ausbildung	1988-1992 Grundschule Sander Strasse 1992-1997 Hansa Gymnasium Bergedorf 1997-2001 Gymnasium Schwarzenbek 2001 Abitur
Studium	2002- 2008 Medizinstudium an der Universität Hamburg
Examen	April- Juni 2008
Dissertation	Juli 2005- März 2006 im Labor von Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel, UKE, Hamburg
Berufslaufbahn	seit September 2008 Assistenzärztin Abteilung für Endoprothetik Sana Klinikum Sommerfeld