

**Die Bedeutung von Apolipoprotein E für die
Differenzierung von Osteoblasten *in vitro***

Für meine Eltern

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Dissertation

**Die Bedeutung von Apolipoprotein E für die
Differenzierung von Osteoblasten *in vitro***

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Vorgelegt von

Annette Götz aus Bamberg

Hamburg 2009

Dekan: Prof. Dr. Dr. Uwe Koch-Gromus

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

10.09.2010

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel (Vorsitzende)
2. PD Dr. med. Andreas Niemeier
3. PD. Dr. rer. nat. Thorsten Schinke
4. Prof. Dr. med. Michael Amling (Stellvertreter)

1	Einleitung	6
1.1	Lipoproteinstoffwechsel	6
1.1.1	Lipoproteine und Lipoproteinstoffwechsel	6
1.1.2	Apolipoproteine	7
1.1.3	Apolipoprotein E	8
1.1.4	Lipoprotein-Rezeptoren	10
1.2	Knochenstoffwechsel	10
1.2.1	Funktion des Knochens	10
1.2.2	Knochenspezifische Zellen	11
1.2.3	Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen ...	12
1.3	Interaktionen zwischen Lipid- und Knochenstoffwechsel	14
1.3.1	Lipoproteinstoffwechsel im Knochen	14
1.3.2	Bedeutung von ApoE für den Knochenstoffwechsel	15
1.4	Wnt/β-catenin Signaltransduktionskaskade	16
1.4.1	Bedeutung der kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktions- kaskade für Osteoblasten	18
1.4.2	Zusammenhang zwischen ApoE und kanonischer wnt/ β -catenin Signaltransduktion	20
1.5	Ziel der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Allgemeine Zellkultur	23
2.1.1	Lösungen und Medien	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
2.1.3	Zelllinien	24
2.1.4	Differenzierung humaner MSC Tert20 Zellen zu Osteoblasten	24
2.1.5	Präparation und Differenzierung primärer muriner Osteoblasten	25
2.1.6	Herstellung von wnt3a-Medium und Kontrollmedium	26
2.2	ApoE-Elisa	27
2.3	125I-Chylomikronen Remnant Aufnahme	28
2.4	Herstellung von Gesamtzelllysat	28
2.4.1	Gesamtzellprotein	29
2.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry	29

2.5	Western Blot Analyse	29
2.6	Immunfluoreszenz	31
2.7	Reporter-Assay zur Aktivitätsbestimmung des Transkriptionsfaktors Lef/TCF	32
2.8	RNA-Präparation	33
2.9	Quantitative RT- PCR	33
2.10	Osteoprotegerin-Elisa	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Charakterisierung der humanen mesenchymalen Stammzelllinien mit lentiviraler ApoE Überexpression und shRNA ApoE Knockdown	38
3.1.1	ApoE-Expression	39
3.1.2	¹²⁵ I-Chylomikronen Remnant Aufnahme	42
3.2	Vergleichende Untersuchung des osteogenen Differenzierungs- verhaltens der genetisch modifizierten humanen mesenchymalen Stammzelllinien	43
3.2.1	Expression osteogener Differenzierungsmarker in hMSC Tert20 Zellen im Zeitverlauf	43
3.2.2	ApoE-Expression während der osteogenen Differenzierung von hMSC Tert20 Zellen im Zeitverlauf	44
3.2.3	Expression osteogener Differenzierungsmarker in den genetisch modifizierten hMSC Tert20 Zelllinien während der osteogenen Differenzierung	45
3.2.4	Expression osteogener Differenzierungsmarker in hMSC Tert20 Zellen nach Stimulation mit exogenem ApoE	48
3.2.5	Expression osteogener Differenzierungsmarker in hMSC Tert20 Zellen nach Reduktion der extrazellulären ApoE-Konzentration	50
3.3	Einfluss von ApoE auf die wnt/β-catenin Signaltransduktionskaskade in humanen MSC Tert Zellen	51
3.3.1	Prüfung der Stimulierbarkeit von hMSC Tert20 Zellen durch wnt3a ...	51
3.3.2	Ermittlung der wnt3a stimulierten Aktivität des Transkriptionsfaktors Lef/TCF in den verschiedenen hMSC Tert20 Zelllinien	52
3.3.3	Osteoprotegerin Expressionsanalyse mittels qRT-PCR	53
3.3.4	Einfluss von ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation	54

3.4	Einfluss von ApoE auf die wnt/β-catenin Signaltransduktionskaskade in primären murinen Osteoblasten	55
3.4.1	Einfluss von ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation	56
3.4.2	Osteoprotegerin Expressionsanalyse	57
4	Diskussion	59
4.1	Inhibition der osteogenen Differenzierung durch ApoE	59
4.2	ApoE-Isoform abhängige Effekte auf das Differenzierungsverhalten	63
4.3	Inhibition der wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade durch ApoE	64
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang	
	Abkürzungsverzeichnis	77
	Lebenslauf	80
	Danksagung	81
	Erklärung	82

1 Einleitung

1.1 Lipoproteinstoffwechsel

1.1.1 Lipoproteine und Lipoproteinstoffwechsel

Nahrungslipide spielen eine wichtige Rolle als Energiequelle im menschlichen Organismus. Sie bilden aufgrund ihrer wasserunlöslichen Eigenschaften mizelläre Komplexe mit Proteinen, um im hydrophilen Milieu des Blutstromes transportiert werden zu können. Die Lipoproteine werden aufgrund ihrer Dichten in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Chylomikronen haben die geringste Dichte und den höchsten Lipidanteil unter den Lipoproteinen. Sie entstehen in den Mukosazellen der duodenalen Schleimhaut und enthalten die mit der Nahrung aufgenommenen Triglyceride und Cholesterol. Durch die intestinalen Lymphgänge gelangen sie über den Ductus thoracicus schließlich in den Blutkreislauf. Chylomicronen Remnants (CR) sind Abbauprodukte der Chylomikronen. Sie entstehen, nachdem durch die Lipoproteinlipase hydrolysierte Fettsäuren an die umliegenden Gewebe abgegeben wurden. Anschließend werden sie durch spezifische Rezeptoren in die Leber aufgenommen (Mahley and Ji, 1999; Heeren et al., 2006).

Im Gegensatz zu Chylomikronen wird *very low density lipoprotein* (VLDL) aus der Leber sezerniert. Durch Lipolyse und Austausch von Lipoproteinen entstehen *intermediär density lipoprotein* (IDL) und *low density lipoprotein* (LDL). Die LDL transportieren Cholesterin zu den extrahepatischen Geweben und regulieren die Cholesterinbiosynthese (Brown and Goldstein, 1986).

High density lipoprotein (HDL) mit seinen drei Unterfraktionen HDL₁, HDL₂ und HDL₃ ist das kleinste Lipoprotein mit der höchsten Dichte und ist für den reversen Cholesteroltransport aus der Peripherie in die Leber verantwortlich. In der Leber wird das internalisierte Cholesterin entweder direkt oder nach Umwandlung in Gallensäuren ausgeschieden (Lewis and Rader, 2005).

Tabelle 1.1: Überblick über die Charakteristika der Lipoproteine

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	0,93	0,93-1,006	1,019-1,063	1,063-1,21
Durchmesser (nm)	75-1200	30-80	18-25	5-12
Triglyceride (%)	86	55	6	4
Cholesterin u. Cholesterinester (%)	5	19	50	19
Phospholipide (%)	7	18	22	34
Apolipoproteine	2 AI, AII, AIV, C I-III, B48, E	8 CI-III, B100, E	22 B100, E	42 AI, AII, AIV, C I-III, E, D

1.1.2 Apolipoproteine

Der Proteinanteil der Lipoproteine, die Apolipoproteine, haben verschiedene Aufgaben. Sie sind für die Struktur der Lipide verantwortlich, aktivieren oder deaktivieren metabolische Vorgänge, und haben entscheidende Transportfunktionen. Heute sind mindestens 20 verschiedene Apolipoproteine beschrieben. Mit Ausnahme der Apolipoproteine B, die aufgrund ihrer Struktur fest mit dem Lipidkern assoziiert sind und somit nicht austauschbar sind, können andere Lipoproteine, je nach Stoffwechsellage, zwischen den einzelnen Lipoproteinklassen ausgetauscht werden.

Tabelle 1.2: Überblick über die wichtigsten Apolipoproteine und deren Funktion

(modifiziert nach Schwandt P, 2006)

A-I	Strukturprotein der HDL, Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptoren
A-II	Aktivierung der hepatischen Lipase
A-IV	Triglyceridstoffwechsel, Aktivierung der LCAT
A-V	Erniedrigung der Plasmatriglyceride
B-100	Strukturprotein der VLDL, IDL und LDL, Bindung an LDL-Rezeptor
B-48	Strukturprotein der Chylomikronen
C-I	Unterdrückung der Bindung von Lipoproteinen an LDL-Rezeptor und LRP, Aktivierung der LCAT
C-II	Aktivierung der Lipoproteinlipase
C-III	Inhibition der Lipoproteinlipase
E	Ligand für den LDLR sowie LRP1, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen
(a)	Beeinflussung der Blutgerinnung und Fibrinolyse, Inhibition der Angiogenese, Tumorsuppression

ApoE spielt durch seine Interaktionen mit transmembranständigen Zelloberflächenrezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie eine Schlüsselrolle im Lipidtransport.

1.1.3 Apolipoprotein E

Das ApoE-Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert, wird aus 299 Aminosäuren gebildet und hat ein Molekulargewicht von 34kDa (Zannis et al., 1991). Der Großteil des im Plasma zirkulierenden ApoE stammt aus der Leber, wobei ca. 20-30% des ApoE in extrahepatischen Geweben sezerniert wird.

ApoE besteht aus einer amphipathischen α -helikalen Bindedomäne und einer davon unabhängig gefalteten Domäne, die Interaktionen mit anderen Rezeptoren vermittelt. Die beiden Domänen sind über eine *hinge*-Region miteinander verbunden. Die N-terminale Domäne des ApoE vermittelt die Interaktion mit Rezeptoren, die C-terminale Domäne ist die lipidbindende Domäne.

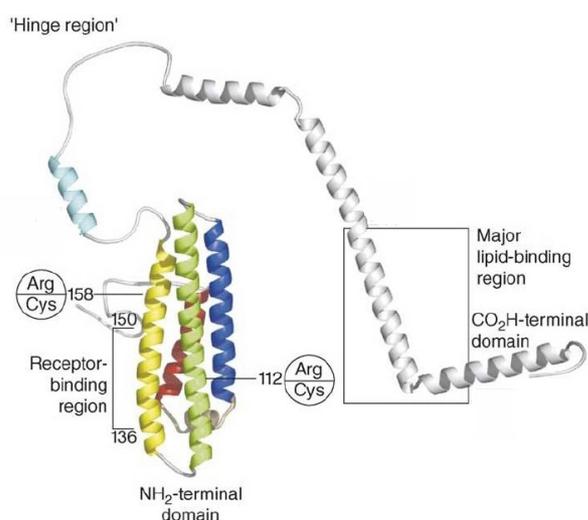


Abbildung 1.1: 3D Struktur des Apolipoprotein E (Hatters et al., 2006);

Aufgrund eines genetischen Polymorphismus und posttranslationaler Modifikation kommt ApoE in humanen Zellen in mehreren Isoformen vor. Es sind drei Hauptisoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 zu nennen. Für diesen Polymorphismus sind drei unabhängige Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ verantwortlich (Utermann et al., 1977). Diese Allele kommen in der Bevölkerung in unterschiedlicher Häufigkeit vor; $\epsilon 3$ ist mit einer Allelfrequenz von 70-85 % das häufigste, gefolgt von $\epsilon 4$ mit 12-18 % und $\epsilon 2$ mit 3-12 %. Der häufigste Typ ApoE 3 gilt als Normaltyp und besitzt an den Positionen 112 und 158 Cystein- und Argininreste. ApoE2 hingegen weist zwei Cysteinreste und ApoE4 zwei Argininreste auf (Weisgraber et al., 1981).

Tabelle 1.3: Apolipoprotein E Polymorphismus; Unterschiede in der Häufigkeit, Funktion und Rezeptoraffinität der ApoE-Isoformen (Hatters et al., 2006)

Isoform	Häufigkeit	Aminosäurevariation		Rezeptoraffinität	Assoziierte Pathologie
		112	158		
ApoE2	7%	Cys	Cys	niedrig	fam. Dysbetalipoproteinämie
ApoE3	78%	Cys	Arg	hoch	unbekannt
ApoE4	15%	Arg	Arg	hoch	Alzheimer Demenz, Atherosklerose

Murines ApoE, welches im Gegensatz zum Menschen keine Isoformen aufweist, ist dem humanen ApoE3 sehr ähnlich.

Durch die Strukturveränderungen in der rezeptorbindenden Region von ApoE gibt es isoformabhängige Funktionsunterschiede, die mit unterschiedlichen pathophysiologischen Veränderungen in Zusammenhang gestellt werden können. So kommt es bei der Isoform ApoE2 durch eine verminderte Bindekapazität zu einem verzögerten Abbau von Chylomikronen. Als Folge kommt es durch eine Anhäufung von Chylomikronen und Chylomikronen Remnants im Blut zur Entstehung familiärer Dysbetalipoproteinämie (Breslow et al., 1982), Atherosklerose und kardiovaskulären Krankheiten (Zhang et al., 1992). ApoE4 ist mit der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten einschließlich der Alzheimer Demenz assoziiert (Saunders et al., 2000). Darüber hinaus wird vermutet, dass von ApoE4 ebenfalls ein atherogener Effekt ausgeht (Heeren et al., 2001; Heeren et al., 2003). Als Ligand für Lipoproteinrezeptoren ist ApoE verantwortlich für die zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen und somit für die Versorgung der Zelle mit lipophilen Nahrungsbestandteilen (Lamon-Fava et al., 1998). Nachdem diese ApoE-vermittelt in die Zellen aufgenommen wurden, wird ApoE anschließend aus den triglyceridreichen Lipoproteinen recycelt. In diesem Prozess sind ebenfalls isoformabhängige Unterschiede beschrieben. So kommt es durch unvollständiges Recycling von ApoE4 zu einem verminderten reversen Cholesteroltransport und dadurch zur Gefahr der Atherosklerose. Vom Lipoproteinstoffwechsel unabhängig sind darüber hinaus unter anderem Auswirkungen auf die Immunmodulation (Jofre-Monseny et al., 2008) und die Thrombozytenaggregation (Riddell et al., 1997) beschrieben.

Auf die speziellen Funktionen für den Knochenstoffwechsel wird im Einzelnen in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

1.1.4 Lipoprotein-Rezeptoren

Die Rezeptoren der Lipoproteine sind Transmembranproteine, die die Endozytose von Lipoproteinen in die Zelle vermitteln (Brown and Goldstein, 1986). Der LDL-Rezeptor (LDLR) wird ubiquitär in allen Zellen des Körpers exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der Cholesterinhomöostase (Brown et al., 1997). Lipoproteinrezeptoren ähnlicher Struktur werden unter dem Oberbegriff der LDL-Rezeptorfamilie zusammengefasst. Zu dieser Gruppe gehören u.a. der VLDL-Rezeptor (VLDLR) (Takahashi et al., 1992), das *LDL receptor related protein 1* (LRP1) (Herz et al., 1988), der Megalin/*LDL receptor related protein 2* (Saito et al., 1994) und der ApoE Rezeptor2 (ApoER2) (Kim et al., 1996). Im Gegensatz zum LDLR und LRP1, die maßgeblich an der hepatischen Clearance von Chylomikronen Remnants beteiligt sind, wird VLDLR vorwiegend in Muskeln und Fettgewebe exprimiert (Takahashi et al., 1992). Alle Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie sind in der Lage ApoE zu binden, unterscheiden sich jedoch in ihrer Bindungsaffinität. Die Aufnahme von Chylomikronen Remnants in die Leber findet ApoE-vermittelt über LRP1 statt (Beisiegel et al., 1989; Beisiegel et al., 1991). In Osteoblasten wurde ebenfalls eine Expression von LRP1, und auch von den Lipoproteinrezeptoren LDLR und VLDLR, sowie die zelluläre Aufnahme von Chylomikronen Remnants nachgewiesen (Niemeier et al., 2005).

Außer dem LDL-Rezeptor selbst vermitteln alle anderen Mitglieder dieser Gruppe zudem Signale verschiedener Signaltransduktionswege. Entfernte Verwandte der LDL-Rezeptorfamilie sind LRP5 und LRP6. Sie sind Co-Rezeptoren der Frizzled (Fz) Rezeptorfamilie und spielen eine wichtige Rolle bei der kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade. Diese hat vielfältige Funktionen in der Embryonalentwicklung, der Organogenese sowie bei der Regulation zahlreicher Differenzierungsvorgänge, u.a. auch der osteoblastären Differenzierung (He et al., 2004; Westendorf et al., 2004).

1.2 Knochenstoffwechsel

1.2.1 Funktion des Knochens

Das menschliche Skelett dient der Stabilität und Bewegungsfähigkeit des Körpers und dem Schutz innerer Organe.

Knochen besteht zu 80% aus anorganischen und zu 20% aus organischen Anteilen. Der größte Teil des anorganischen Materials setzt sich aus Kalziumphosphaten zusammen. Der organische Teil, der dem Knochen seine mechanische Festigkeit verleiht, besteht vorwiegend aus Typ1 Kollagen. Kollagen entsteht aus Prokollagen, das von Osteoblasten gebildet wird. Es wird bereits in sehr frühen Stadien der Differenzierung sezerniert. Nach der Organisation der Kollagene beginnt die Mineralisierung. Hierbei spielen vor allem nichtkollagene Proteine

eine Rolle. Die nichtkollagenen Proteine machen 10% der organischen Knochenmatrix aus, und sind essentiell für die Knochenbildung. Hierzu zählen z.B. Alkalische Phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Bone Sialoprotein (BSP) und Osteocalcin (OCN). Die Alkalische Phosphatase existiert in verschiedenen Isoformen in Nieren, Intestinum, Plazenta, Leber und Knochen. Die knochenspezifische Isoform der Alkalischen Phosphatase ist für die Knochenbildung und die Kalzifizierung bedeutend und reflektiert die Aktivität der Osteoblasten. Osteopontin und Bone Sialoprotein sind durch ihre Bindungsfähigkeit an Hydroxylapatit an der Mineralisierung der Knochenmatrix beteiligt. Osteocalcin (*bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein*, BGP, BGLAP), als osteoblastenspezifisches Protein korreliert mit der Osteoblastenaktivität. Es bindet ebenfalls an Hydroxylapatit und Kalzium und steigt während der Mineralisierung an. Es spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Knochenmineralisierung (Hauschka, 1986).

Über seine mechanische Funktion hinaus besitzt der Knochen als Speicher für stoffwechselrelevante Mineralien wie Kalzium und Phosphat eine metabolische Funktion. Die Kalziumhomöostase wird durch Parathormon, Kalzitinin und Vitamin D3 reguliert. Im Falle einer Hypokalziämie zum Beispiel kommt es zu einer Ausschüttung von Parathormon aus der Nebenschilddrüse. Dies führt, über eine Aktivierung von Osteoklasten, zur schnellen Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen, wodurch der Serumspiegel wieder angehoben wird. Kalzitinin, der von der Schilddrüse gebildete Parathormon-Antagonist, fördert im Falle einer Hyperkalziämie die Kalziumaufnahme in den Knochen.

Ein weiterer Regulator der Kalzium- und Phosphathomöotase des Knochens ist Vitamin D3 (Reichel et al., 1989). Aktiviertes Vitamin D3 führt zu einer Steigerung der Rückresorption von Kalzium im Darm und in der Niere. Ein Vitamin D-Mangel führt zu einer negativen Kalziumbilanz, einer Untermineralisierung des Knochens und zur Entstehung von Rachitis und Osteomalazie.

1.2.2 Knochenspezifische Zellen

Die knochenspezifischen Zellen werden in zwei Hauptzelltypen eingeteilt. Die Osteoblasten sind für die Knochenbildung zuständig, während Osteoklasten die knochenresorbierende Funktion übernehmen. Knochen kann auf zweierlei Weise entstehen, entweder direkt durch die sogenannte desmale Ossifikation, oder indirekt durch die chondrale Ossifikation über von Chondroblasten gebildete Knorpelsubstanz. Der Knochenaufbau erfolgt bei beiden Ossifikationsformen über die Osteoblasten.

Osteoblasten

Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs. In Anwesenheit bestimmter Differenzierungsstimuli können sie aus mesenchymalen Stammzellen entstehen. Während die Vorstufen noch in der Lage sind sich zu teilen, besitzen reife Osteoblasten diese Fähigkeit nicht mehr. Osteoblasten sind für die Bildung der Knochenmatrix verantwortlich. Zunächst bilden sie aus Kollagenen ein Fasernetz, das als Osteoid bezeichnet wird. Erst durch die anschließende Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen findet die Mineralisierung statt. Hierfür sind vor allem die nichtkollagenen Proteine von Bedeutung, deren Funktion bis heute nicht in allen Teilen aufgeklärt ist. Der Knochen erhält erst nach abgeschlossener Mineralisierung des Osteoids seine Festigkeit. An der Oberfläche gelegene Zellen nennt man *bone lining cells*. Sie können erneut zur Knochenbildung reaktiviert werden. Komplette von Knochenmatrix umschlossene Zellen werden als Osteozyten bezeichnet. Sie sind durch ihre Zellfortsätze miteinander verbunden und bilden so ein dichtes Netzwerk. Sie vermitteln hauptsächlich sensorische Signale. Durch Sclerostin, ein osteozytenspezifisches Protein, sind sie maßgeblich an der Regulation der Knochenmasse beteiligt (ten Dijke et al., 2008). Sclerostin interagiert mit LRP5/6 und besitzt eine inhibitorische Wirkung auf die wnt-Signaltransduktionskaskade (Ellies et al., 2006).

Osteoklasten

Osteoklasten leiten sich von der Macrophagenlinie der hämatopoetischen Stammzellen ab. Es handelt sich um mehrkernige Riesenzellen, die für den Abbau der Knochenmatrix verantwortlich sind. Sie lösen zunächst die Hydroxylapatitkristalle aus der Knochenmatrix heraus und zersetzen anschließend enzymatisch das von den Osteoblasten gebildete Osteoid.

Osteoblasten und Osteoklasten stehen in ständiger Kommunikation miteinander, um ein Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und Resorption zu gewährleisten. Hierbei spielt zum einen die Aktivierung reifer Zellen eine Rolle, zum anderen können Vorläuferzellen zur Proliferation und Differenzierung stimuliert werden. Kommt es zu einem Ungleichgewicht, führt dies zu pathologischen Veränderungen wie z.B. Osteoporose oder Osteopetrose und damit einhergehenden Problemen.

1.2.3 Osteogene Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen

Pluripotente mesenchymale Stammzellen sind bindegewebige Vorläuferzellen, die sich durch Teilung selbst erhalten oder verschiedenartig differenzierte Tochterzellen hervorbringen. Als Bestandteile des adulten Knochenmarkstromas lassen sie sich aus dem Knochenmark

isolieren und unter geeigneten Kulturbedingungen ex vivo expandieren. Die Zellen sind dazu in der Lage in verschiedene Gewebetypen zu differenzieren. Je nach Stimulation können Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen entstehen. Diese Entwicklung ist durch spezifische zelluläre Mediatoren und Interaktionen reguliert. Vorläuferzellen früherer Stadien vermögen noch unterschiedliche Differenzierungswege einzuschlagen und sind dazu in der Lage sich gegenseitig zu beeinflussen. Auch reife Adipozyten beeinflussen durch das Hormon Leptin die osteoblastäre Differenzierung (Ducy et al., 2000). Osteoblasten beeinflussen ebenfalls zum Beispiel über *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), ein Mastergen der osteoblastären Differenzierung, die Zelllinienentwicklung aus mesenchymalen Vorläuferzellen.

Bei der osteogenen Differenzierung entstehen aus mesenchymalen Stammzellen über Osteoprogenitorzellen zunächst Präosteoblasten und schließlich reife Osteoblasten. Für jedes Stadium der Differenzierung ist die Expression verschiedener Differenzierungsmarker charakteristisch (Liu et al., 1994). Kollagen I wird als Hauptbestandteil des Osteoids eher zu den frühen Markerproteinen der osteoblastären Differenzierung gezählt. Osteocalcin, eines der wenigen osteoblastenspezifischen Proteine, gilt dagegen als späterer Differenzierungsmarker.

Humane mesenchymale Stammzellen

In dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen verwendet, die über einen retroviralen Vektor mit humaner Telomerase transfiziert wurden (hMSC Tert20) (Simonsen, 2002). Durch die Telomeraseexpression wurden die Zellen vor altersbedingter Schädigung geschützt und somit immortalisiert. Die Zellen wurden aus humanem Knochenmarkspirat eines gesunden Spenders generiert. Sie zeigen einen unveränderten Karyotyp und haben ihre Pluripotenz erhalten. Sowohl die Proliferationsrate nach mehreren hundert Zellteilungen als auch die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung ist unverändert (Simonsen, 2002). Aufgrund dieser Eigenschaften, zusammen mit der Tatsache, dass die Zellen einfach und schnell zu kultivieren sind, eignen sie sich besonders, um molekulare Mechanismen der osteoblastären Differenzierung zu untersuchen.

Die osteoblastäre Differenzierung kann durch die Stimulation mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 eingeleitet werden. 1,25(OH)Vit.D3 induziert die Synthese von Osteocalcin und anderen für die Differenzierung relevanten Genen und fördert so die osteoblastäre Differenzierung (Zhang et al., 1997; Reichel et al., 1989; Sun et al., 2008). Ascorbat ist ein wichtiger Co-Faktor bei Hydroxylierungsreaktionen und wird z.B. für die

Biosynthese von Kollagen benötigt. β -Glycerophosphat dient als Phosphatspender und unterstützt so die Mineralisierung von Osteoblasten.

1.3 Interaktionen zwischen Lipid- und Knochenstoffwechsel

1.3.1 Lipoproteinstoffwechsel im Knochen

Da es sich bei Knochen um ein metabolisch hoch aktives Gewebe handelt, müssen Osteoblasten mit Nährstoffen versorgt werden, um ihre anabole Funktion aufrechterhalten zu können. Sie benötigen essentielle Fettsäuren sowie die lipophilen Vitamine A, D, E und K, die an Lipoproteine gebunden transportiert werden.

Wie oben erwähnt ist LRP1, als ApoE bindendes Protein, wichtig für die Aufnahme von Lipoproteinen und wird größtenteils in der Leber exprimiert (Beisiegel et al., 1989; Beisiegel et al., 1991). In Osteoblasten wurde die Expression von LRP1, und in geringerem Maße auch von den Lipoproteinrezeptoren LDLR und VLDLR nachgewiesen. Die zelluläre Aufnahme von Chylomikronen Remnants (CR) wurde ebenfalls gezeigt (Niemeier et al., 2005). Diese Entdeckung bekräftigte den Zusammenhang zwischen Lipid- und Knochenstoffwechsel. Anhand von Mausmodellen wurde auch *in vivo* gezeigt, dass der Knochen eine erhebliche Aufnahmekapazität für Chylomikronen Remnants besitzt und somit maßgeblich an der postprandialen Lipoprotein clearance aus dem Blut beteiligt ist (Niemeier et al., 2008).

Während den Vitaminen A, D und E alternative Transportproteine zur Verfügung stehen, wird Vitamin K im Blutplasma ausschließlich an Lipoproteine assoziiert transportiert (Lamon-Fava et al., 1998). Die lipophilen Vitamine haben vielfältige Funktionen. Für den Knochenmetabolismus sind vor allem Vitamin K und Vitamin D von Bedeutung. Vitamin D fördert zum einen die Transkription einiger Matrixgene wie zum Beispiel Osteocalcin, Alkalische Phosphatase oder Osteopontin. Zum anderen hat Vitamin D einen stimulierenden Effekt auf die Osteoblastenaktivität und -differenzierung (Sun et al., 2008). Vitamin D steuert zudem die Calcium- und Phosphathomöostase des Knochens (Reichel et al., 1989).

Vitamin K wird in Lipoproteinen über LRP1 in humane Osteoblasten aufgenommen (Niemeier et al., 2005; Lamon-Fava et al., 1998). Es fungiert als Co-Faktor der γ -Glutamylcarboxylase und ist für die posttranslationale Carboxylierung von Glutamylresten spezifischer Proteine verantwortlich. Zu dieser Gruppe zählen die *Matrix-gla*-Proteine, die auch in Herz, Niere und Lunge vorhanden sind, sowie Osteocalcin, das sog. *bone-gla*-Protein. Carboxyliertes Osteocalcin hat eine höhere Affinität zum Hydroxylapatit als nicht-carboxyliertes Osteocalcin. Vitamin K hat demzufolge über Osteocalcin einen Einfluss auf die Mineralisierung des Knochens. Des Weiteren inhibiert Vitamin K die Osteoklastenaktivität (Koshihara et al., 2003).

1.3.2 Bedeutung von ApoE für den Knochenstoffwechsel

Durch einige Studien der letzten Jahre wurde deutlich, dass ApoE im Knochenstoffwechsel eine Rolle spielt. ApoE vermittelt als Ligand für Lipoproteinrezeptoren die Endozytose von Lipoproteinen in Osteoblasten.

Außerdem wurde in ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine gesteigerte Knochenbildung festgestellt, während die Knochenresorption unverändert bleibt (Schilling et al., 2005). Eine Erklärungsmöglichkeit ist die fehlende ApoE-vermittelte Aufnahme von triglyceridreichen Lipoproteinen. *In vitro* werden mit Vitamin K angereicherte Chylomikronen Remnants von Osteoblasten aufgenommen, wodurch eine Erhöhung des carboxylierten Osteocalcins erreicht wird. Dies kann die erhöhten Konzentrationen an untercarboxyliertem Osteocalcin im Serum ApoE-defizienter Mäuse erklären. Osteocalcin-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls erhöhte Knochenformationsraten (Ducy et al., 1996). Eine Erklärung hierfür wäre, dass die erhöhte Knochenformationsrate ApoE-defizienter Mäuse mit der Menge an untercarboxyliertem Osteocalcin in Zusammenhang steht.

Darüber hinaus wird über Assoziationen zwischen den verschiedenen ApoE Isoformen und Knochenveränderungen berichtet. In klinisch epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass ApoE4 mit einer verminderten Knochendichte assoziiert ist. In einer Studie mit 284 postmenopausalen Japanerinnen wurde eine Reduktion der Knochendichte bei ApoE4 Allelträgern beobachtet, die auf eine Reduktion der Osteoblastenaktivität durch ApoE4 zurückgeführt wurde (Shiraki et al., 1997). In einer weiteren Studie mit 219 Hämodialyse-Patienten wurde der ApoE4 Genotyp mit einem erhöhten Frakturrisiko in Verbindung gebracht (Kohlmeier et al., 1998). In zahlreichen weiteren Studien der folgenden Jahre wurden ebenfalls Assoziationen zwischen ApoE Genotypen und Knochenmetabolismus beschrieben (Cauley et al., 1999; Johnston et al., 1999; Sanada et al., 1998). In anderen Studien konnten diese ApoE-abhängigen Effekte im Bezug auf Knochendichte und Frakturrisiko nicht bestätigt werden (Bagger et al., 2007; Gerdes et al., 2001; Lui et al., 2003; Macdonald et al., 2008; Sennels et al., 2003; von Muhlen et al., 2001). Die größte Studie zu diesem Themengebiet mit 5.857 älteren Frauen und Männern stammt aus Rotterdam, wobei sich eine Assoziation zwischen dem ApoE4 Genotyp und Knochenmineralisierung, Frakturrate oder Osteoporose nicht bestätigte (Schoofs et al., 2004). Insgesamt existieren aus den letzten 10 Jahren 24 Studien, wovon 12 über eine Assoziation zwischen Knochenformation und ApoE Isoformen berichten, während 12 der Studien keine Assoziation beobachteten. Abschließend kann kein eindeutiges Fazit bezüglich des Einflusses der ApoE Isoformen auf den Knochen gezogen werden.

1.4 Wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade

Die Proteine der wnt-Familie vermitteln fundamentale biologische Prozesse wie Embryogenese, Organogenese und Tumorentstehung. Wnt-Proteine sind sowohl bei der Regulation von Knochenneubildung und -erhaltung während der Embryogenese als auch beim Erwachsenen involviert (Glass et al., 2005; Krishnan et al., 2006). In Säugetieren sind ca. 20 wnt-Proteine bekannt. Sie bestehen jeweils aus 350-400 Aminosäuren und werden in 12 Unterfamilien eingeteilt (Clevers, 2006). Neben einem sog. nichtkanonischen PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg und einem wnt/ Ca^{2+} Signalweg, auf die hier nicht genauer eingegangen wird, ist der sogenannte kanonische wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg der am besten Verstandene (Miller, 2002). Obwohl eine Regulation durch andere wnt-Signalwege nicht ausgeschlossen werden kann, ist für den Knochenstoffwechsel vorwiegend der kanonische wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg von Bedeutung (Bodine and Komm, 2006). Er ist in großem Maße von der Regulation der Stabilität und der Menge des intrazellulären Proteins β -catenin abhängig.

In Abwesenheit eines wnt-Signals ist ein Degradierungskomplex bestehend aus Axin, *Glycogen-Synthase-Kinase -3 β* (GSK-3 β) und *Adenomatosis Polyposis Coli* (APC) aktiv. Das Protein Axin hält den gesamten Degradierungskomplex zusammen. Die GSK-3 β ist für die Phosphorylierung des β -catenins und die damit verbundene Ubiquitination verantwortlich. Durch die Ubiquitination wird der Abbau in Proteasomen ermöglicht. APC ist ein Tumor-Suppressor-Protein und erhöht hier die Affinität des Komplexes für β -catenin, um eine effektive Phosphorylierung von β -catenin zu ermöglichen. Im Nukleus findet die Transkription *lymphoid enhancer factor/T-cell factor* (Lef/TCF) abhängiger Gene statt. In Abwesenheit von β -catenin im Nukleus bindet ein Co-Repressor-Protein *Groucho* an Lef/TCF, wodurch die Transkription Lef/TCF-abhängiger Gene verhindert wird.

In Anwesenheit extrazellulärer wnt-Proteine binden diese an den Frizzled(Fz)/LRP5/6 Co-Rezeptor Komplex. Dadurch aktivieren sie über einen bislang unbekanntem Mechanismus das zytoplasmatische Protein *Dishevelled* (Dsh) und verschiedene andere Proteine, die an Dsh binden (z.B die Casein Kinase). Als Folge wird der Degradierungskomplex inaktiviert, und es kommt zu einer Akkumulation von β -catenin im Zytoplasma. Der intrazelluläre Anstieg ermöglicht ein Eindringen von β -catenin in den Nukleus. Dort verdrängt es den Co-Repressor *Groucho*, bindet an Lef/TCF und stimuliert so die Transkription von wnt-Zielgenen (Logan and Nusse, 2004). Als osteoblastenspezifische Zielgene sind hier vor allem die Antagonisten Osteoprotegerin (OPG) und *Rezeptor Aktivator of NF kappaB Ligand* (RANKL) zu nennen. Sie spielen eine zentrale Rolle für das sogenannte Knochen-Remodeling.

(<http://www.STanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>)

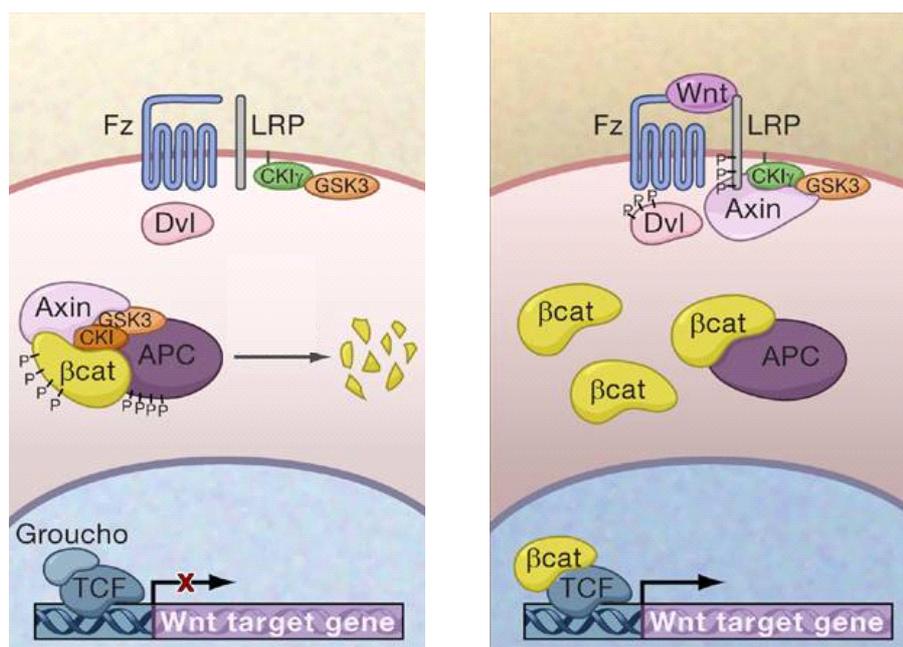


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der wnt/β-catenin Signaltransduktionskaskade (Clevers, 2006)

Links: In Abwesenheit eines wnt-Signals ist ein APC-Axin-GSK-3β Degradierungskomplex aktiv, der für die Phosphorylierung des β-catenins und der damit verbundenen Ubiquitination und dem folgenden Abbau in Proteasomen verantwortlich ist. Dadurch kann im Nucleus *Groucho* über die Bindung an TCF die Transkription TCF-abhängiger Gene verhindern.

Rechts: Wnt bindet an Fz/LRP Co-Rezeptor Komplex und aktiviert *Dishevelled* (Dsh). Dadurch wird der Degradierungskomplex inaktiviert, was eine intrazelluläre Akkumulation von β-catenin zur Folge hat. Im Nucleus verdrängt β-catenin *Groucho*, bindet an TCF und stimuliert die Transkription von wnt-Zielgenen.

Zusammenfassend können drei für die wnt/β-catenin Signaltransduktionskaskade spezifische Schritte festgehalten werden. Erstens, die extrazellulären wnt-Proteine, die die Signaltransduktionskaskade in Gang setzen. Zweitens, eine folgende Akkumulation von β-catenin, zunächst im Zytoplasma und anschließend auch im Zellkern. Und drittens, die durch β-catenin stimulierte Transkription Lef/TCF abhängiger Zielgene.

Wnt3a, welches in primitiven Insekten und Mausembryonen exprimiert wird, gilt als etablierter Aktivator der kanonischen wnt/β-catenin Signaltransduktionskaskade (Miller, 2002).

Lithium Chlorid (LiCl), ein Inhibitor der GSK3β, verhindert die Phosphorylierung des β-catenins und den damit verbundenen Abbau. Es kann als Stimulus der Signaltransduktionskaskade verwendet werden.

1.4.1 Bedeutung der kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade für Osteoblasten

Wie bereits in Abschnitt 1.1.4 erwähnt, vermitteln Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie als Co-Rezeptoren Signale der wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade. Verschiedene wnt-Gene sind während der Osteoblastenentwicklung exprimiert und in der Lage, deren Entwicklung zu begünstigen. Die Bedeutung der wnt-Proteine wird unter anderem dadurch bestärkt, dass wnt3a Knockout Mausembryonen extreme skelettale Fehlbildungen aufweisen (Ikeya and Takada, 2001).

LRP 5/6- Co-Rezeptoren der wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade

LRP5 und LRP6 sind Co-Rezeptoren von Frizzled (He et al., 2004). Mäuse, die Mutationen in LRP5 und LRP6 tragen, zeigen sowohl eine verminderte Knochendichte als auch Deformitäten in den Gliedmaßen (Holmen et al., 2004).

LRP5-Knockout Mäuse zeigen eine verminderte Knochenmasse und erhöhte Frakturraten (Kato et al., 2002). Versuche mit LRP5 Knockout Mäusen haben außerdem gezeigt, dass sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung der Osteoblasten in diesen Mäusen signifikant reduziert sind. LRP5 Mutationen sind mit familiärer Osteoporose sowie anderen metabolischen Erkrankungen assoziiert (Magoori et al., 2003a; Holmen et al., 2004; Kato et al., 2002). Beim Menschen können LRP5 Mutationen zu familiärer Osteoporose führen (Boyden et al., 2002; Little et al., 2002). Kinder, die unter einer Form der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung Osteogenesis Imperfekta (osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG)) mit verringerter Knochenmasse und erhöhter Frakturanfälligkeit leiden, haben einen mutationsbedingten Funktionsverlust des LRP5 (Gong et al., 2001). Die Entdeckungen, dass ein Funktionsverlust von LRP5 sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen zu einer reduzierten Knochenmasse führt, bestärkten den Zusammenhang zwischen wnt-Signaltransduktion und der Regulation des Knochenstoffwechsels. Neueste Studien haben allerdings gezeigt, dass, obwohl LRP5 ein Co-Rezeptor des wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges ist, die reduzierte Knochenmasse bei LRP5 Knockout Mäusen nicht auf einen Osteoblasten-spezifischen LRP5 Verlust, sondern auf eine Inhibition der duodenalen Serotoninsynthese zurückzuführen ist (Yadav et al., 2008). Der LRP5-Knockout Effekt auf den Knochen ist bei Mäusen demzufolge wahrscheinlich nicht durch die LRP5-Defizienz der Osteoblasten bedingt.

Unabhängig davon spielen die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade und ihre Co-Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Osteoblastenentwicklung. *Gain-of-function*-Mutationen

von LRP5 führen durch eine gesteigerte wnt Signaltransduktion zu einer vermehrten Knochenmasse (Boyden et al., 2002).

LRP6 beeinträchtigt zwar nicht wie LRP5 die Knochenbildung, aktiviert aber ebenfalls über Interaktionen mit wnt-Proteinen die Transkription wnt-abhängiger Gene. Eine Inaktivierung von LRP6 beeinflusst über Lef/TCF abhängige, osteoblastenspezifische Gene die Knochenresorption (Glass et al., 2005; Kato et al., 2002; Kubota et al., 2008).

β-Catenin

β-Catenin ist das Schlüsselement der wnt/β-catenin Signaltransduktionskaskade. Mäuse mit *Gain-of-function*- und *Loss-of-function*-Mutationen von β-catenin in Osteoblasten zeigen Veränderungen bezüglich ihrer Knochenmasse. Bei β-catenin defizienten Mäusen kommt es durch die Herunterregulation der Osteoprotegerin-Expression, einem Lef/TCF abhängigen Zielgen der wnt/β-catenin Signaltransduktion, in Osteoblasten zu verminderter Knochenmasse und erhöhter Osteoklastenaktivität. *Gain-of-function*-Mutationen dagegen zeigten entsprechend vermehrte Knochenmasse (Glass et al., 2005). Die kanonische wnt-Signaltransduktionskaskade in Osteoblasten spielt also eine negativ regulatorische Rolle bei der Knochenresorption.

OPG/RANKL-System

Wnt-Proteine fördern die Expression des Lef/TCF abhängigen Zielgens Osteoprotegerin (OPG) und regeln gleichzeitig seinen Gegenspieler *Rezeptor Aktivator of NF kappaB Ligand* (RANKL) herunter, wodurch die Knochenresorption unterdrückt wird (Logan and Nusse, 2004). Das OPG/RANKL-System spielt für das sogenannte Knochen-*remodeling* eine wichtige Rolle.

Sowohl Osteoprotegerin als auch RANKL sind von Osteoblasten (OB) synthetisierte Proteine. Osteoblasten haben also neben ihrer Knochenmatrix bildenden Funktion auch noch die Aufgabe, die Differenzierung von Osteoklasten zu regulieren. Über RANKL wird durch die Bindung an seinen Rezeptor, Rezeptor Aktivator of NF kappaB (RANK), die Differenzierung von Präosteoklasten zu reifen Osteoklasten (OK) stimuliert. Osteoprotegerin, als löslicher Rezeptor hingegen ist in der Lage, RANKL abzufangen und so die Stimulation zu verhindern.

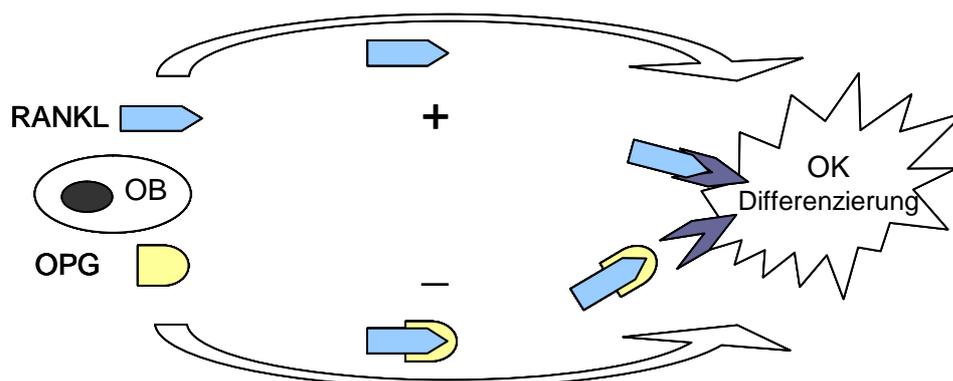


Abbildung 1.3: Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten durch das OPG/RANKL System.

Der kanonische wnt Signaltransduktionsweg wird über viele verschiedene extrazelluläre natürliche Antagonisten wie z.B. *Soluble Frizzles-related proteins* (SFRPs), *Cerberus*, *wnt-inhibitory factor* (WIF1), *Dickkopf* (DKK), *connective tissue growth factor* (CTGF), *Wise* and *sclerostin*, die mit wnt-Proteinen oder ihren Co-Rezeptoren interagieren, reguliert (Rawadi and Roman-Roman, 2005).

1.4.2 Zusammenhang zwischen ApoE und kanonischer wnt/ β -catenin Signaltransduktion

Im Zusammenhang mit anderen Zellsystemen werden modulatorische isoformspezifische Effekte des ApoE auf die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade beschrieben. Da wnt-Proteine regulatorische Bedeutung für die Differenzierung von Osteoblasten haben, könnten diese Effekte ebenfalls für den Knochenmetabolismus von Bedeutung sein.

So inhibiert ApoE4 in undifferenzierten PC12 Zellen (Phäochromozytomzellen der Ratte) den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg. In Zellen, die mit LRP5 transfiziert wurden, wurde in geringerem Ausmaß ebenfalls eine Inhibition durch die Isoformen ApoE2 und ApoE3 beobachtet (Caruso et al., 2006). Bei der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten werden ebenfalls ApoE-Effekte auf den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg diskutiert. Hier werden aufgrund bekannter Interaktionen mit LRP-Rezeptoren vor allem Verknüpfungen zwischen LRP6 und ApoE untersucht (De Ferrari et al., 2007).

Es existieren Daten, die darauf hindeuten, dass LRP1 durch eine Komplexbildung mit Frizzled (Fz) den Fz/LRP5/6 Co-Rezeptor Komplex stört und so den kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg hemmt. (Zilberberg et al., 2004). Durch die Funktion als Ligand für den LDLR sowie für LRP1 besteht ebenfalls ein Zusammenhang zwischen ApoE und kanonischer wnt/ β -catenin Signaltransduktion. Auch beim VLDL Rezeptor, einem weiteren Mitglied der LDLR-Familie, wurde bereits eine negativ regulierende Funktion auf den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg beschrieben (Chen et al., 2007). Ob ApoE seine

inhibitorische Wirkung auf den Knochenstoffwechsel ebenfalls über Interaktionen mit Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie über den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg vermittelt, ist nicht bekannt. Obwohl eine Interaktion zwischen LRP5/LRP6 und ApoE auf zellulärer und molekularer Ebene nicht ausreichend belegt ist, gibt es Vermutungen, dass ApoE über LRP5/6 in die Regulation des wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges involviert ist (Kim et al., 1998; Magoori et al., 2003b).

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Zusammenhang zwischen endogener Apolipoprotein E (ApoE) Expression und der osteogenen Differenzierung *in vitro* geprüft werden.

Es soll die Hypothese geprüft werden, dass ApoE einen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung von Osteoblasten ausübt, und dass der postulierte Effekt isoformabhängig ist.

Hierzu werden Experimente mit genetisch modifizierten, humanen mesenchymalen Stammzelllinien (hMSC Tert20) mit einer Überexpression der ApoE-Isoformen E3 und E4 und mit reduzierter ApoE-Expression durchgeführt.

Anhand dieses Zellmodells sollen Unterschiede in der Expression osteogener Differenzierungsmarker auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene untersucht werden.

Außerdem soll an humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC Tert) und an primären murinen Osteoblasten geprüft werden, ob die vermutete Inhibition der osteogenen Differenzierung durch ApoE über den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Hierzu werden ebenfalls Proteinanalysen und mRNA Expressionsanalysen durchgeführt, um den Effekt von ApoE auf den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg anhand seiner Schlüsselemente zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Zellkultur

2.1.1 Lösungen und Medien

Ascorbinsäure	(Merck)
Fetal Bovine Serum (FCS)	(Gibco, South America)
α MEM (ohne Zusätze)	(Sigma)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Invitrogen)
Collagenase (Type Ia)	(Sigma)
D-MEM Glutamax31966	Gibco (Invitrogen)
Dispase (grade II)	Gibco (Invitrogen)
D-PBS	Gibco (Invitrogen)
FBS HyClone	(HyClone)
Glycerol-2-phosphate	(Sigma)
Trypsin EDTA	Gibco (Invitrogen)
1,25 Dihydroxy-cholecalciferol (Vitamin D3)	(Sigma-Aldrich) 83,3ng[~50 μ l] in Isopropanol/ 20ml Medium)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

CO ₂ -Brutschrank	APT Line CB (Binder GmbH)
Falcons	(Greiner)
Feinwaage	BP 410S (Sartorius)
Steriflip Vacuum Filter	(Millipore)
Gefäße, Cell Strainer, Pipetten	(Falcon)
Lichtmikroskop CKX31	(Olympus)
Pipettierhilfe	Accujet (Brand)
Sicherheitswerkbank	Klasse 2 Hera Safe (Heraeus)
Vortexer VF2	(Janke+Kunkel, IKA)
Wärmebad	(GFL)
Wärmekasten	(Heraeus)
Zellkulturplatten, -flaschen	(Nunc)
Zellspachtel	(TPP)
Zentrifugen	Tischzentrifuge Typ 1-15K (Sigma) Laborzentrifuge Rotana TRC (Hettich)
1,5ml und 2ml Gefäße	(Eppendorf)

2.1.3 Zelllinien

Die Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind mesenchymale Stammzellen eines gesunden ApoE3-Spenders. Sie wurden durch Insertion der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase immortalisiert (Simonsen, 2002). Durch lentiviralen Gentransfer wurde das Apolipoprotein E in diesen Zellen überexprimiert, durch shRNA die Expression herunterreguliert. Entsprechende Kontrollen mit leerem Vektor bzw. randomisierter anti-sense RNA wurden ebenfalls generiert (Born Stephan, 2008). Bei der Transfektion der Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4 sowie der Kontrolllinie T20-Empty Lenti wurde zusätzlich zu ApoE auch GFP (grün fluoreszierendes Protein) mit in die Zellen eingebracht, so dass die Infektion der Zellen einfach und schnell unter dem Mikroskop geprüft werden konnte. Die Zelllinie T20-shApoE sowie die entsprechende Kontrollzelllinie sind zusätzlich mit einer Puromycin-Resistenz ausgestattet und wurden durch puromycinhaltiges Medium selektioniert.

Des Weiteren wurden Experimente mit primären murinen Osteoblasten von ApoE-defizienten Mäusen, verglichen mit genetisch unveränderten Mäusen (Wildtyp), durchgeführt. Die Zellen wurden aus den Calvarien 3-4 Tage alter Mäuse präpariert und differenziert. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und primären Zellen.

Tabelle 2.1:

Bezeichnung	Herkunft	Funktion
hMSC Tert20	Humane mesenchymale Stammzelle (Simonsen, 2002)	Wildtyp (Spender: E3/3)
T20-Empty Lenti	Humane mesenchymale Stammzelle	Virus-Vektor Kontrolle für Überexpression
T20-hApoE3	Humane mesenchymale Stammzelle	Überexpression ApoE3
T20-hApoE4	Humane mesenchymale Stammzelle	Überexpression ApoE4
T20-Lenti sh scrambled	Humane mesenchymale Stammzelle	shRNA Kontrolle
T20-shApoE	Humane mesenchymale Stammzelle	shRNA Knockdown gegen ApoE
pmOB ApoE WT	Primäre murine Osteoblasten	Wildtyp (Kontrolle)
pmOB ApoE KO	Primäre murine Osteoblasten	ApoE Knockout

2.1.4 Differenzierung von hMSC Tert20 Zellen zu Osteoblasten

Die Zellen wurden in *Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium* (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37°C und 5% CO₂ in T75 Zellkulturflaschen kultiviert. Es fand im Abstand von drei Tagen ein Mediumwechsel statt. Je nach Dichte der Zellen wurden diese abtrypsiniert und im Verhältnis 1:10 passagiert.

Zur osteoblastären Differenzierung wurden die Zellen je nach Experiment auf Zellkulturplatten mit 10.000 Zellen pro well auf einer 12-well-Platte oder mit 50.000 Zellen pro well auf einer 6-well-Platte ausgesetzt und bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Sättigung im Inkubator kultiviert. Nach einem standardisierten Protokoll wurden die Zellen durch Zugabe von Differenzierungsmedium, bestehend aus Standardmedium, β -Glycerophosphat (10 μ l/ml Medium), Ascorbat (10 μ l/ml Medium) und Vitamin D3 (83,3ng[~50 μ l] in Isopropanol/ 20ml Medium), zur osteogenen Differenzierung stimuliert. Ascorbat ist ein wichtiger Co-Faktor bei Hydroxylierungsreaktionen und γ -Carboxylierungen, z.B. für die Hydroxylierung von Kollagen. Phosphat ist ein wichtiger Bestandteil bei der Mineralisierung von Osteoblasten. β -Glycerophosphat diente als Phosphatspender. Vitamin D3 wurde wegen des bekannten Effekts auf die osteoblastäre Genexpression und als Differenzierungsstimulus zugefügt (Zhang et al., 1997; Reichel et al., 1989). Dieses so zusammengesetzte Differenzierungsmedium wurde erstmalig gegeben sobald die Zellen miteinander in Zell-Zell-Kontakt standen und subkonfluent (ca. 80% des Bodens bedeckend) gewachsen waren. Dieser Tag wurde standardmäßig als Tag 0 festgelegt. Das Medium wurde jeden dritten Tag erneuert. Die Zellkulturen wurden bis zu 12 Tage differenziert. Zellen und Zellkulturüberstände wurden geerntet und im Anschluss auf Protein- oder RNA-Ebene untersucht.

2.1.5 Präparation und Differenzierung primärer muriner Osteoblasten

AntifectN liquid	(Schülke)
Chirurgisches Einmal-Skalpell	(Braun)
Diethylether	(Roth)

Zur Gewinnung primärer Osteoblasten wurden die Parietalblätter der Calvarien drei Tage alter ApoE-defizienter Mäuse (ApoE KO) sowie die genetisch unveränderter Mäuse (Wildtyp) als Kontrolle (ApoE WT) präpariert. Um die Calvarien zu präparieren, wurden die Mäuse zuvor mit Diethyletherdampf getötet und anschließend in einer Antifect-Lösung desinfiziert. Von den präparierten Parietalblättern wurden vorsichtig Blut- und Geweberückstände mit dem Skalpell entfernt und bis zum Ende der Präparation in gekühltem PBS aufbewahrt. Nach der Präparation aller Parietalblätter wurde das PBS verworfen und die primären Osteoblasten wurden in einem Digestionsmedium mit Kollagenase und Dispase (50ml alpha-MEM, 50mg Kollagenase Typ Ia, 100mg Dispase 2) durch einen enzymatischen Verdau isoliert. Während des Verdaus wurden die Parietalblätter im Digestionsmedium fünfmal 10 Minuten im Orbitalshaker bei 37°C und 180rpm inkubiert; nach jedem Durchgang erfolgte ein Wechsel des Digestionsmediums. Nach dem enzymatischen Verdau wurden die gesammelten

Überstände der letzten drei Durchgänge durch einen Cellstrainer, mit einer Porengröße von 0,4µm, filtriert und anschließend bei 1300rpm fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zunächst in 1ml Kulturmedium (alpha-MEM, 10% HyClone FBS, 1% P/S) resuspendiert. Mit Hilfe einer Zählkammer von Neubauer wurden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die primären Osteoblasten wurden auf Zellkulturplatten mit 30.000 Zellen pro well auf einer 12-well-Platte ausgesetzt und bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Sättigung im Inkubator kultiviert. Ein erster Wechsel des Mediums erfolgte innerhalb der nächsten 24 Stunden, um Zelltrümmer und nicht adhärenente Zellen zu entfernen.

Zur osteoblastären Differenzierung wurden die Zellen durch Zugabe von Induktionsmedium, bestehend aus Kulturmedium, β-Glycerophosphat (10µl/ml Medium) und Ascorbat (10µl/ml Medium) stimuliert.

Dieses so zusammengesetzte Differenzierungsmedium wurde erstmalig gegeben, sobald die Zellen subkonfluent gewachsen waren. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Die Zellkulturen wurden 6-12 Tage differenziert und anschließend auf Protein- oder RNA-Ebene untersucht.

2.1.6 Herstellung von wnt3a-Medium und Kontrollmedium

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die zur Herstellung von wnt3a-Medium und Kontrollmedium verwendeten Zelllinien.

Tabelle 2.2:

Bezeichnung	Herkunft	Funktion
L-Cells	Murine Fibroblasten (31) LGC	Kontrolle
L-Cells wnt3a	Murine Fibroblasten (Willert et al., 2003) LGC	wnt3a Produktion

Zur Herstellung von wnt3a-Medium wurden die Zellen (L-Cells wnt3a) in T75 Flaschen für drei Tage bis zur 80%igen Subkonfluenz in 10ml Standardmedium in Kultur gehalten. Das Medium wurde abgenommen, steril filtriert, und es wurde erneut 10ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Der Überstand wurde nach drei Tagen erneut abgenommen, ebenfalls steril filtriert und mit dem ersten Teil vermengt. Das gewonnene wnt3a-Medium (CM wnt3a) kann bei 4°C gelagert werden.

Das Kontrollmedium (CM) wurde auf die gleiche Weise hergestellt.

Zur Stimulation der Zellen wurde eine Verdünnung mit Standardmedium (DMEM mit 10% FCS und 1% P/S) im Verhältnis 1:2 eingesetzt.

2.2 ApoE-Elisa

Blocking Puffer	0,1M Na ₂ HPO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , (p.A), 0,12M NaCl (p.A.), 1%BSA (Merk 112018), 1,0mM EDTA (Titriplex III, Merk), 0,055% Tween 20 (BioRad), pH 7,0
ELISA-Reader	Biotrak II (Amersham Biosciences)
Kontrollserum	37mg/ml- Range 31-43µg/ml (Behring)
Microtiter strips	Immuno-modules, Maxisorp (Nunc)
Plasma-Pool Standard	64ng/ml, 32ng/ml, 16ng/ml, 8ng/ml, 4ng/ml, 2ng/ml, 1ng/ml in Blockingpuffer
Substratlösung	25ml H ₂ O, 1ml Substratpuffer (Malonic acid 1,3M, Na-Acetate 0,6M NaOH 1,1M) 1ml H ₂ O ₂ , 1ml Tetramethylbenzidine (TMB)
Waschlösung	PBS +0,05% Tween 20

Um die Apolipoprotein E Konzentrationen in den Überständen der verschiedenen Zelllinien zu bestimmen, wurde ein Elisa (Enzyme-linked immuno Sorbent Assay) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein immunologisches Nachweisverfahren. Mit Hilfe spezifischer Antikörper, die zuvor mit einem Enzym markiert wurden, können u.a. Proteine durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden. Hierbei wurden zunächst die zu bestimmenden Zellkulturüberstände der verschiedenen Linien in entsprechende Verdünnung gebracht. Die Überstände der ApoE überexprimierenden Zellen wurden im Verhältnis 1:100 mit Blocking-Lösung verdünnt, während bei den restlichen Zelllinien eine 1:2 Verdünnung ausreichte. Außerdem wurde eine Plasma-Pool Standardreihe mit bekannter Konzentration pipettiert, die bei der Auswertung als Eichreihe diente. Zusätzlich wurde ein Kontroll-Serum (ApoE von Behring) mit bekannter Konzentration von 37µg/ml 1:6.000 verdünnt, um die Funktionalität des Elisa's zu überprüfen.

Es wurden pro well je 100µl der Proben, der Standards und des Kontrollserums in Doppelwerten aufgetragen und bei 37°C für 90min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit 300µl Waschpuffer wurden pro well 100µl der Antikörperlösung (goat anti ApoE-HRP, polyclonal (Genetex) 1:2000) aufgetragen und unter leichtem Schütteln für 60min bei 37°C inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit drei Waschzyklen.

Zur Entwicklung und photometrischen Messung wurden pro well 250µl der Substratlösung pipettiert. Nach einer ca. 20minütigen Inkubationszeit im Dunkeln (RT) entwickelte sich durch die Reaktion von Peroxidase und Substratlösung ein blauer Farbstoff. Die Farbreaktion wurde mit 50µl 2M H₂SO₄ gestoppt und anschließend die Extinktion bei 450nm gemessen. Die ApoE-Konzentration der Proben wurde anhand der Extinktionswerte der Standardreihe errechnet.

2.3 ¹²⁵I-Chylomikronen Remnant Aufnahme

Automatic Gamma Counter	1272 Clinigamma (LKB Wallac)
Zelllinien	hMSC Tert20 T20-Empty Lenti T20-hApoE3 T20-hApoE4
¹²⁵ I –Triglyceridreiche Lipoproteine (TRL)	0.9mg/ ml
5% Lipoprotein defizientes Serum (LPDS)	

Es wurden 500ml FCS mit 176,8g KBr versetzt und 12 Stunden bei 38000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die aufgrund ihrer geringeren Dichte flottierenden Lipoproteine abgenommen und das verbleibende Serum viermal 24 Stunden gegen jeweils frischen LPDS-Puffer in Dialyse-Schläuchen (Servapor, Serva, Heidelberg, Deutschland) dialysiert. Das aufgereinigte Serum wurde durch einen Sterilfilter filtriert. Das LPDS wurde vom Institut nach der oben beschriebenen Methode hergestellt und mir für meine Versuche zur Verfügung gestellt.

Um die Funktionalität des sekretierten ApoE der überexprimierenden Zelllinien zu untersuchen, wurde ein Aufnahme Assay mit ¹²⁵I-Chylomikronen Remnants durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst 100.000 Zellen/well pro Linie auf einer 12-well-Platte in Dreifachwerten ausgesetzt und für 24 Stunden in 10% FCS-Medium und für 24 weitere Stunden in 5% LPDS-Medium in Kultur gehalten. Die Versuchsansätze wurden aus je 1,8ml Medium (3x 600µl/well der Zellkulturüberstände) und 5–20µg/ml ¹²⁵I –TRL hergestellt. Das Restmedium wurde von den Zellen abgesaugt und verworfen. Nach einem Waschschrift mit warmem PBS wurden anschließend vorsichtig je 500ml des radioaktiven Ansatzes pro well auf die Zellen pipettiert und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die radioaktiven Überstände abgenommen und entsprechend entsorgt. Die Zellen wurden dreimal für 2 Minuten mit je 1ml kaltem PBS-Heparin (100U/ml) und ein weiteres mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500µl 0,1M NaOH resuspendiert und anschließend wurde der radioaktiv markierte Anteil pro Volumen mit einem Gammacounter der Firma Packard gezählt. Anhand einer Proteinbestimmung nach Lowry (s.u.) wurden die counts/ml auf mg Zellprotein umgerechnet.

2.4 Herstellung von Gesamtzelllysat

BSA- Standard	2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,0125 mg/ml, 0,0625mg/ml BSA ddH ₂ O
Folin-Reagenz	Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Merck)1:1 in ddH ₂ O
Lowry Lösung A	2% Na ₂ CO ₃ , 0,02% NaK-Tratat in 0,1M NaOH
Lowry Lösung B	0,5% CuSO ₄ , 5% SDS

Lowry Lösung C	50:1 Lösung A: Lösung B
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail 1mM PMSf in DMSO + 10mM Leupeptin, 10mM Aprotinin, 1mM Pepstatin, 10mM ALLN
RB- Puffer	Resuspensionspuffer 50mM Tris HCl pH 8,0, 2mM CaCl ₂ , 80 mM NaCl, 1% Triton X 100, ad 10ml

2.4.1 Gesamtzellprotein

Um Gesamtzellprotein zu gewinnen, wurden die Zellen nach dem Ernten in 30-200µl RB-Puffer mit PIC (1:1000) resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis lysiert. Nach dem Scheren der DNA mit einem Ultraschall-Sonifier für 10sec. bei einer Amplitude von 30% wurde das Lysat für 30 Minuten bei 4°C mit 13.000rpm zentrifugiert, um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstände wurden abgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte nach SDS-Lowry. Ein Standard mit bekannter BSA-Konzentration und die zu bestimmenden Proben wurden mit 0,1M NaOH verdünnt. Hierbei wurden je 20µl des Standards und 2µl der Proben mit NaOH auf 100µl gebracht und anschließend 1ml der Lowry-Lösung C zugegeben. Durch kurzes Vortexen wurden die Proben gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. In alkalischer Lösung kommt es zur Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und Kupfer-Ionen. Kupfer wird im Proteinkomplex reduziert. Nach Zugabe von 100µl Folin-Reagenz folgte eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln. Der entstandene blaue Farbumschlag resultiert aus der Reaktion des reduzierten Kupfers auf das Folin-Reagenz und kann zur quantitativen Proteinbestimmung mittels Photometrie genutzt werden. Für die Messung wurden je 300µl pro well in Doppelwerten in eine farblose 96well Microtiterplatte mit flachem Boden pipettiert und mit einem Photometer bei 760nm gemessen. Anhand der mitgemessenen Standardwerte wurde eine Eichreihe mit linearer Steigung erstellt und anhand dieser die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.5 Western Blot Analyse

Blockinglösung	10%Milchpulver in TBS+Tween
Blottingpuffer:	56,2g Glycin, 12,1g Tris, 1l Methanol, ad 5l H ₂ O
BSA	(Applichem, Biochemica)
Entwicklungsmaschine	X-OMAT 1000 Processor (Kodak)

Loading-Puffer	1:2:1 Mecaptoethanol (Serva): 10%SDS: Bromphenolblau in (Merk) /Glycerol 87%
Lumi-Light	Western Blotting Substrate (Roche)
Mini Gel	4-12% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen)
Nitrozellulosemembran	0,45µm (Whatman)
Ponceaulösung	(Serva)
Power Supply	Power PAC 200 (BioRad)
Rainbow marker	RPN800 (Amersham/GE Healthcare)
Röntgenfilm	Hyperfilm ECL (Amersham)
Röntgenkassette	18x24cm (Rego)
Running- Puffer	NuPAGE SDS(Invitrogen) 1:20 in dd H ₂ O
Scanner	scanjet 3970 (hp)
Schüttler	VIBRAXX (Janke+Kunkel, IKA)
TBS-T	150mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 1% Tween-20
Thermomixer	(Eppendorf)
10 x PBS	80g NaCl, 2g KCl, 26,8g Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O, 2,4g KH ₂ PO ₄ , ad 1L ddH ₂ O, pH: 7,0
1 x PBS	100ml 10x PBS, ad 1L dd H ₂ O
1. Antikörper	in Blockinglösung
2. Antikörper	in TBS-T +5%BSA

Tabelle 2.3: primäre Anikörper

Bezeichnung	Firma	Wirt	Größe	Verdünnung
α-ApoE	Chemicon	Ziege	~34 kDa	1:2500
α-β-aktin	Sigma	Maus	~44 kDa	1:10-50.000
α-β-catenin	Santa Cruz	Maus	~81-104 kDa	1:200
α-GAPDH	Novus Biologicals	Ziege	~30-40 kDa	1:15.000

Tabelle 2.4: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Firma	Wirt	Verdünnung
goat- α-mouse-Po	Jackson Immuno Research	Maus	1:5000
donkey- α- goat -Po	Jackson Immuno Research	Maus	1:5000

Beim Western Blot Verfahren werden zunächst Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran übertragen. Spezifische primäre Antikörper (AK) binden an die zu bestimmende Proteinbande. Über sekundäre unspezifische

Antikörper, die mit einem Enzym markiert sind, kann durch Zugabe eines wasserstoffperoxidhaltigen Substrates eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst werden. Durch Belichten eines Röntgenfilms können so die Proteinbanden dargestellt werden.

Nachdem der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben bestimmt worden war, wurden alle Proben mit Wasser verdünnt und so auf einen einheitlichen Proteingehalt (10µl-50µl) gebracht. Nachdem Loading-Puffer im Verhältnis 1:2 dazugegeben wurde, folgte eine 10 minütige Denaturierung bei 60-95°C. Der Molekulargewichtsmarker wurde auf die gleiche Weise behandelt. Nach kurzem Abzentrifugieren der Proben wurden zwischen 10-30µl pro Geltasche auf ein „NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gel“ aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-140mA und konstanter Volt-Zahl in NuPAGE SDS-Running Puffer. Die so aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einem Tank-Blot-Verfahren in Blottingpuffer für drei Stunden bei 400mA und 4°C auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Nachdem die Membran zur Kontrolle der Gleichmäßigkeit mit Ponceau S angefärbt, dies dokumentiert und anschließend mit PBS wieder entfärbt wurde, wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch mindestens 30minütiges Schwenken in Blockinglösung abgesättigt.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Darauf folgten fünf Waschschrte (1x PBS, 4x TBS-T für 10min), eine 90minütige Inkubation im Sekundärantikörper sowie eine wiederholte Waschreihe mit TBS-T (4x10min).

Zum Detektieren der gesuchten Banden wurden zunächst Lumi-Light Western Blotting Substrate 1 und 2 im Verhältnis 1:2 gemischt, auf die Membran gegeben und diese für zwei Minuten inkubiert. Durch die entstandene Chemilumineszenz wurden die gesuchten Banden auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.6 Immunfluoreszenz

Blocking-Lösung	2% BSA in PGS
DAPI-Lösung zur Kernfärbung	(5µl/100ml PBS) (Sigma)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100 (Zeiss)
Fluoromount	(SouthernBiotech)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	LSM 510 META (Zeiss)
PFA (Paraformaldehyd)	4% PFA in ddH ₂ O +1% 1M NaOH
PGS	0,5g Glycin; 0,05g Saponin ad 100ml PBS
PGST	0,5g Glycin; 0,05g Saponin ad 100ml PBS +1% TritonX 100

Tabelle 2.5: primäre Antikörper

Bezeichnung	Firma	Wirt	Verdünnung
α -ApoE HRP	Gene Tex	Ziege	1:25

Tabelle 2.6: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Firma	Wirt	Verdünnung
goat- α -HRP Cy3 (rot)	Jackson Immuno Research	Ziege	1:250

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Proteine mit Hilfe fluoreszierender Antikörper sichtbar gemacht. Dieses Verfahren eignet sich gut, um die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zellen sichtbar zu machen.

Dafür wurden Zellen in einer 24-well-Platte à 75.000 Zellen/well auf Coverslips ausgesät und 24 Stunden in Kultur gehalten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Coverslips mit je 1ml 4% Paraformaldehyd pro well für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mehrmals für 5min mit PBS gewaschen. Um die Zellen für die Antikörper zu permeabilisieren, folgten drei weitere Waschgänge zu je 5 Minuten in 1ml PGST.

Zum Blocken der unspezifischen Bindungen wurden je 60 μ l Blocklösung auf Coverslips pipettiert und diese für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden je 50 μ l Erst-Antikörper-Lösung, in entsprechender Verdünnung in Blocklösung, auf die Coverslips aufgetragen und diese in einer Feuchtkammer eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach zweimaligem Dippen in PBS und erneutem zweimaligen Waschen mit PGST erfolgte die 45minütige Inkubation mit der Zweit-Antikörper-Lösung, die zusätzlich Dapi-Lösung im Verhältnis 1:1000 zur Anfärbung der Zellkerne enthielt.

Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Coverslips mit den Zellen nach unten auf den mit ca. 4 μ l Fluoromount betropften Objektträger gelegt, getrocknet und anschließend kühl und dunkel gelagert.

Die Ergebnisse wurden durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie dokumentiert.

2.7 Reporter Assay zur Aktivitätsbestimmung des Transkriptionsfaktors Lef/TCF

In eukaryontischen Zellen, die mit einem für die Luciferase codierenden Vektor transfiziert wurden, können Luciferase *Reporter Gene Assays* zur quantitativen Messung der Expression von Luciferase eingesetzt werden. Diese Reporter Assays zur Bestimmung der

Aktivität der Transkriptionsfaktorfamilie Lef/TCF wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kassem (Odense, Dänemark) durchgeführt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen/well auf einer 24-well-Platte ausgesetzt und durch eine 24 stündige Inkubation mit 150ng *SuperTop* und 10ng *SV40 Renilla Vektor* transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 50%igem CM *wnt3a* für 24 Stunden stimuliert und im Anschluss die Luciferaseaktivität mit einem Lumimeter gemessen.

2.8 RNA-Präparation

Nanodrop	ND- 1000 UV-Vis Spectrophotometer (PeqLab)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen)
Trizol	(Invitrogen)

Für die Isolierung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Zellen wurden in 1ml Trizol (Invitrogen) gelöst und lysiert. Zu den Proben wurden 200µl Chloroform gegeben und nach 15 Sekunden langem Vortexen für 15 Minuten (13000rpm, RT) zentrifugiert. Der entstandene obere klare Überstand mit den enthaltenen Nukleinsäuren wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA zu fällen, wurden 600ml 96%iges Ethanol hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend auf die RNeasy Zentrifugationssäulen gegeben und entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

Abschließend wurde die RNA mit 30µl DPEC-H₂O (Qiagen) von der Säule eluiert und mittels NanoDrop die Konzentration bestimmt. Die Angabe der Konzentration erfolgte in [ng/µl].

2.9 Quantitative RT-PCR

cDNA Reverse Transkriptase

Zur Herstellung der komplementären cDNA, aus der vorher isolierten RNA, wurde das High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet und nach dessen Protokoll gearbeitet. Für die Herstellung der cDNA durch die reverse Transkriptase wurden 1µg RNA eingesetzt. Diese wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25µl RNA-Lösung gebracht. Je RNA-Probe wurden 25µl RNA-Lösung und 25µl RT-Mastermix pipettiert. Die Synthese der cDNA erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: 10 Minuten bei 25°C, 120 Minuten bei 37°C, 5 Minuten bei 85°C und bis zum Ende konstant bei 4°C gehalten.

- RT-Mastermix:
- 5µl Reverse Transcription Buffer (10x)
 - 5µl Reverse Transcription Buffer (10x)
 - 2µl dNTPs Mix (25x)
 - 5µl Random primer (10x)
 - 2,5µl MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)
 - 2,5µl RNase Inhibitor
 - 8µl Nuclease-free (DEPC-treated) H₂O

TaqMan™-Prinzip

Die Real-time-PCR mit dem TaqMan™-Prinzip ist dadurch gekennzeichnet, dass die Quantifizierung einer Ausgangsmenge von Template-DNA möglich ist, und die Amplifikation des Templates hinsichtlich ihrer Kinetik verfolgt werden kann. Neben den Primern wird der PCR-Reaktion ein weiteres Oligonukleotid (Sonde/Probe) zugefügt. Dieses bindet sequenzspezifisch die Template-DNA im Bereich des zu amplifizierenden Fragments. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Reporter sind Fluoreszenzfarbstoffe, die jeweils durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Quencher sind Reaktionspartner, die in Form von Licht aufgenommene Energie als Schwingungsrelaxation abgeben. Das Anregungsspektrum des Quenchers entspricht dabei dem Emissionsspektrum des Reporters, sodass durch die räumliche Nähe das vom Reporter emittierte Licht vom Quencher absorbiert wird, der wiederum über Schwingungsrelaxation die aufgenommene Energie abbaut. Das TaqMan™-Prinzip nutzt hierbei die 5'... 3'-Exonucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase aus. Bei der Elongation trifft die Taq-DNA-Polymerase nach Anlagerung der Primer auf das 5'-Ende der Sonde und baut dieses durch ihre 5'... 3'-Exonucleaseaktivität ab. Dadurch wird die räumliche Nähe von Reporter und Quencher aufgehoben, und der Reporter emittiert Licht seines charakteristischen Spektrums, welches durch optische Detektoren gemessen wird. Die Messung der Fluoreszenzintensität durch die Detektoren erfolgt während jedes PCR-Zyklus. Je größer die Anzahl der Amplifikate wird, desto mehr Reporter-moleküle werden freigesetzt und entsprechend nimmt auch die Fluoreszenzintensität zu.

Tabelle 2.7: Untersuchte Gene und dazugehörige Primer

AoD	Gen	Assay ID	Sequenz
hTBP= hTAF1	TATA box binding protein	Hs00270322_m1	AAGCAGGTAACACAGGAAGGTGAAG
hApoE	Apolipoprotein E	Hs00171168_m1	GGAAGTGGGGCGCTGATGGACGAG
hCol1a1	Collagen 1a1	Hs00164004_m1	AGACGAAGACATCCCACCAATCACC

Die Osteoprotegerin-Konzentration der Proben wurde anhand der Extinktionswerte der Standardreihe errechnet.

3 Ergebnisse

Die durchgeführten Versuche lassen sich thematisch in drei Abschnitte gliedern.

Erstens wurden die humanen mesenchymalen Stammzelllinien mit lentiviraler ApoE Überexpression und shRNA ApoE Knockdown hinsichtlich ihrer ApoE-Expression untersucht und charakterisiert. Hierzu wurde die ApoE-Konzentration auf mRNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Immunchemisch wurden sowohl durch Western Blot Analysen und ApoE-Elisa intra- und extrazelluläre Proteinanalysen durchgeführt als auch Unterschiede der ApoE-Expression mittels Immunfluoreszenz optisch dargestellt. Die Funktionalität des endogen überexprimierten Apolipoproteins wurde durch ein Aufnahmeexperiment mit ¹²⁵Iod-markierten triglyceridreichen Lipoproteinen (TRL) in diesem Zusammenhang getestet.

Der zweite Teil beschäftigte sich mit der Untersuchung der Unterschiede des osteogenen Differenzierungsverhaltens der genetisch modifizierten Zelllinien. Hierzu wurde die mRNA Expression osteogener Differenzierungsmarker sowohl von Zelllinien mit einer Überexpression der ApoE-Isoformen E3 und E4 sowie von einer Zelllinie mit einer reduzierten ApoE-Expression bestimmt.

Der dritte Abschnitt befasst sich mit dem Einfluss von ApoE auf den kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg. In Abhängigkeit von ApoE sowie etablierter Stimulatoren des wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges wurden β -catenin Western Blot Analysen durchgeführt. Ferner wurde auf mRNA Ebene die Expression des Lef/TCF abhängigen Zielgens Osteoprotegerin untersucht. Diese Experimente wurden ergänzend zu denen mit humanen mesenchymalen Stammzellen zusätzlich mit primären murinen Osteoblasten durchgeführt. Darüber hinaus wurde durch Reporter Assays die Aktivität des Transkriptionsfaktors Lef/TCF in den humanen mesenchymalen Stammzelllinien bestimmt.

3.1 Charakterisierung der humanen mesenchymalen Stammzelllinien mit lentiviraler ApoE Überexpression und shRNA ApoE Knockdown

Die Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind mesenchymale Stammzellen eines gesunden ApoE3/3 Spenders. Sie wurden durch Insertion der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase immortalisiert (Simonsen, 2002). Durch lentiviralen Gentransfer wurde in diese Zellen Apolipoprotein E3 und Apolipoprotein E4 überexprimiert, durch shRNA die Expression von ApoE herunterreguliert. Entsprechende Kontrollen mit leerem Vektor bzw. randomisierter anti-sense RNA wurden ebenfalls generiert (Born Stephan, 2008). Eine Zelllinie mit einer Überexpression der Isoform ApoE2 stand für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht zur Verfügung.

Diese Zelllinien mit genetisch modifizierter ApoE-Expression und ihre Kontrollen wurden in unserem Labor bereits vor Beginn meiner Arbeit hergestellt, diesbezüglich jedoch noch nicht charakterisiert. Folgende Zelllinien wurden verwendet:

hMSC Tert20	immortalisierte parentale humane Zellen eines E3/3 Spenders
T20-Empty Lenti	Kontrollzellen mit leerem Virus-Vektor
T20-hApoE3	genetisch modifizierte ApoE3 überexprimierende Zellen
T20-hApoE4	genetisch modifizierte ApoE4 überexprimierende Zellen
T20-Lenti sh scrambled	Kontrollzellen mit shRNA
T20-shApoE	genetisch modifizierter ApoE Knockdown

Im Folgenden werden die eben erklärten Abkürzungen zur Benennung der Zelllinien verwendet.

Um diese sechs verschiedenen Linien der parentalen hMSC Tert20 Zelllinie miteinander vergleichen zu können, sind gleiche Grundvoraussetzungen von großer Bedeutung. Da das Wachstum der unterschiedlichen Linien leicht voneinander abweicht, war ein Test zur Bestimmung der optimalerweise auszuplattierenden Zellzahl notwendig. Hierzu wurden die Zellen mit Zellzahlen zwischen 2.000 und 20.000 Zellen pro cm² auf 6 und 12-well-Platten ausgesetzt. Der optimale Zeitpunkt, um mit einer Induktion zur osteogenen Differenzierung dieser Zellen zu beginnen, ist erreicht, wenn die Zellen miteinander in Zell-Zell-Kontakt stehen und ca. 80% der Fläche mit Zellen bedeckt ist. Man bezeichnet diesen Zustand als subkonfluent.

Die optimale Zellzahl, um nach 2-3 Tagen ein subkonfluentes Stadium der Zellen zu erreichen, wurde bei allen Zelllinien bei Zellzahlen zwischen 10.000 und 20.000 Zellen/cm² beobachtet. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Differenzierungsexperimente standardmäßig je 10.000 Zellen pro well auf 12-well Platten und 50.000 Zellen/well auf 6-well Platten ausplattiert und so möglichst einheitliche Bedingungen für die folgenden Experimente geschaffen.

Sobald die Zellen ein subkonfluentes Wachstum erreicht hatten, wurden sie entweder mit Differenzierungsstimuli induziert oder als Kontrolle ohne Zusätze in Kultur gehalten.

3.1.1 ApoE-Expression

Der Gentransfer für die Entstehung der verschiedenen Zelllinien war erst kürzlich in unserem Labor erfolgt. Aus diesem Grund wurden die Zelllinien zunächst bezüglich ihrer unterschiedlichen ApoE-Expression charakterisiert. Hierzu wurde die ApoE-Konzentration sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR als auch auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse, Elisa und Immunfluoreszenz untersucht.

Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen/well auf 12-well-Platten ausgesetzt. Ab dem Zeitpunkt der Subkonfluenz, der bei allen weiteren Versuchen standardmäßig als Tag 0 festgelegt wurde, wurden die Zellen 12 Tage in Kultur gehalten. Die osteogene Differenzierung durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 erfolgte standardmäßig ab dem Tag 0 alle drei Tage. An Tag 12 wurden die Zellen geerntet, 3 wells gemittelt und im Anschluss RNA präpariert. Die Überstände wurden ebenfalls gepoolt und mittels ApoE-Elisa die unterschiedlichen Konzentrationen der Zellkulturüberstände bestimmt.

Abbildung 3.1A zeigt die basale ApoE-Konzentration der verschiedenen Zelllinien auf RNA-Ebene mit quantitativer RT-PCR gemessen. Abbildung 3.1B zeigt die mit einem ApoE-Elisa gemessene Konzentration des sekretierten ApoE in den jeweiligen Zellkulturüberständen der Zelllinien. Während in der quantitativen RT-PCR die ApoE-Konzentration der überexprimierenden Zellen T20-hApoE3 und T20-hApoE4 einen Anstieg um das ca. 100fache, verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe zeigt, können in den Zellkulturüberständen mittels ApoE-Elisa sogar 300fache Anstiege gemessen werden. Der Unterschied zwischen den beiden Isoformen der ApoE überexprimierenden Zelllinien ist nicht signifikant. Die Zellen der T20-shApoE Linie weisen eine deutliche Reduktion der ApoE-Konzentration auf. Die Kontrollzelllinien T20-Empty Lenti und T20-Lenti sh scrambled zeigen bezüglich ihrer ApoE-Konzentrationen im Vergleich zur parentalen Zelllinie hMSC Tert20 keine signifikanten Unterschiede. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s.= nicht signifikant, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$

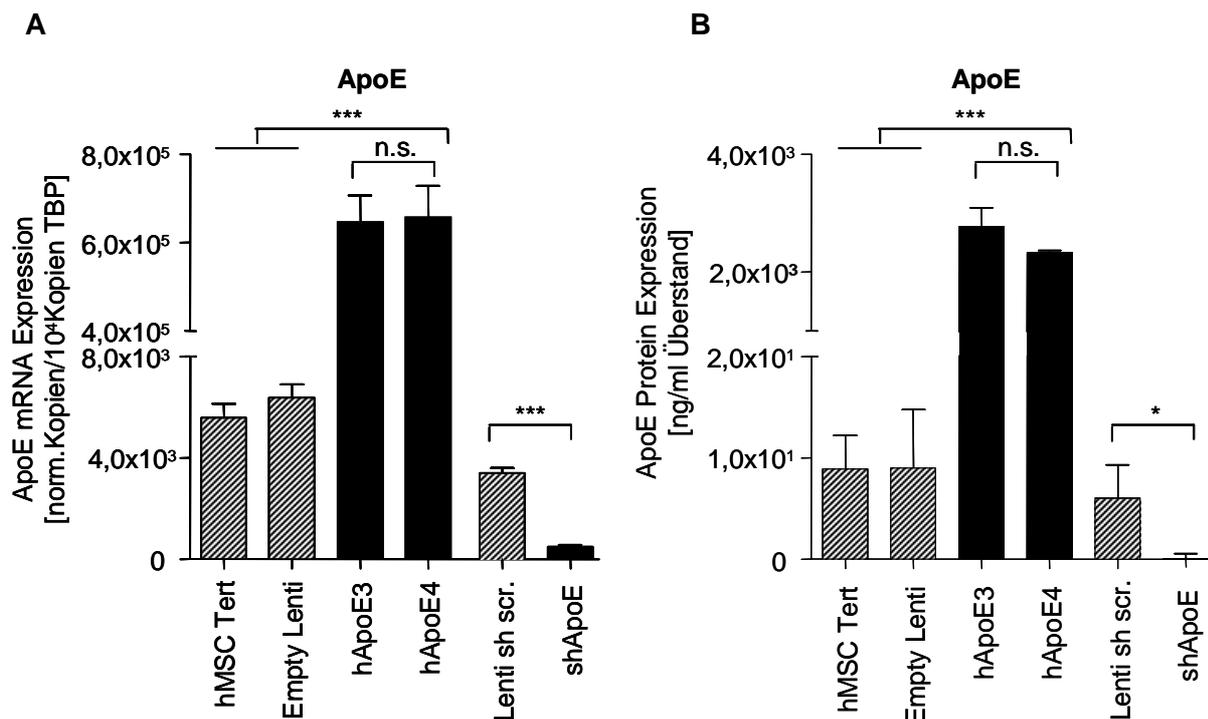


Abbildung 3.1: ApoE-Expression der verschiedenen hMSC Tert20 Zelllinien

A) mRNA-Expression

B) Protein-Konzentration in den Zellkulturüberständen

Die osteogene Differenzierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte standardmäßig über 12 Tage durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3. Erhöhte ApoE-Konzentrationen der Zelllinien mit ApoE-Überexpression sind sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zu sehen. Die ApoE-Expression der Zelllinie T20-sh ApoE ist reduziert. (n=2, in 4fach Werten gemessen)

In Abbildung 3.2 ist die ApoE-Konzentration der verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot Verfahren auf Proteinebene dargestellt. Die Zelllinien wurden 12 Tage auf 12-well-Platten à 10.000 Zellen/well in Kultur gehalten und ab Tag 0 alle drei Tage mit frischem Medium versorgt. Die Zellen wurden durch Zugabe von Ascorbat, β -Glycerophosphat und Vitamin D3 zur osteogenen Differenzierung stimuliert.

Zur Western Blot Analyse wurden 25 μ g Gesamtzellprotein pro Spur auf ein SDS-PAGE Gradientengel aufgetragen. Als primärer Antikörper wurde ein anti-ApoE Antikörper der Firma Chemicon verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter *goat-anti-mouse* Antikörper der Firma Jackson Immuno Research verwendet. Die Inkubation erfolgte 90min bei Raumtemperatur. Als Ladekontrolle wurde ein GAPDH Antikörper der Firma Novus Biologicals mit entsprechendem Sekundärantikörper *HRP donkey-anti-goat* Antikörper eingesetzt.

Das Ergebnis zeigt starke ApoE Banden (34 kDa) bei den ApoE überexprimierenden Zellen. Die ApoE-Konzentrationen der Zellen T20-hApoE3 sind verglichen mit T20-hApoE4 geringfügig stärker. Während der Differenzierung scheint die ApoE-Konzentration der ApoE

überexprimierenden Zellen minimal abzunehmen. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

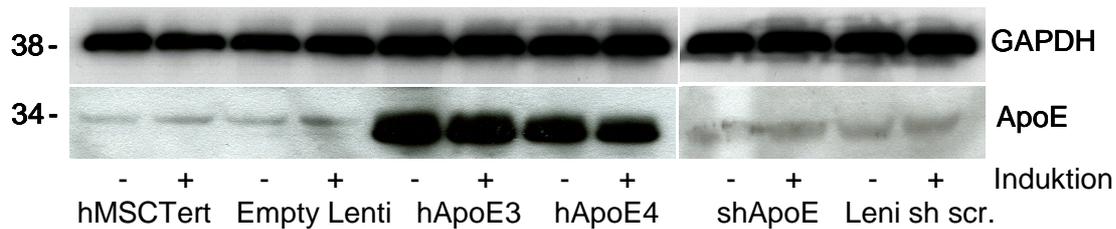
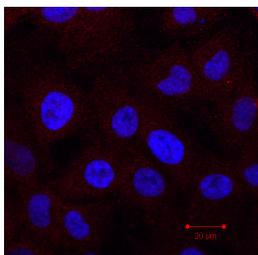


Abbildung 3.2: Western Blot Analyse der ApoE-Expression aus Gesamtzellprotein.

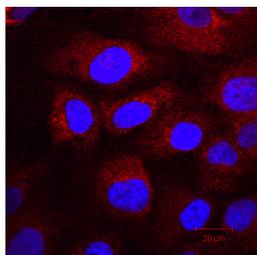
Dargestellt ist die Western Blot Analyse der ApoE-Expression der verschiedenen Zelllinien ohne (-) und mit (+) osteogener Differenzierung über 12 Tage durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3. Die Analyse erfolgte aus 25 μ g Gesamtzellprotein mit einem anti-ApoE Antikörper der Firma Chemicon. In beiden ApoE überexprimierenden Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4 sind starke ApoE-Banden (34 kDa) zu sehen.

In Abbildung 3.3 wurde die Überexpression von ApoE in den Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4, verglichen mit der Kontrollzelllinie T20-Empty Lenti mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Um die unterschiedlichen Zellen mit Immunfluoreszenzfarbstoffen anzufärben, wurden diese mit einer Zellzahl von 75.000 Zellen/well auf einer 24-well-Platte auf Coverslips ausplattiert und nach 24 Stunden angefärbt. Der primäre Antikörper gegen ApoE (*HRP anti-ApoE*) wurde sekundär mit einem *goat-anti-HRP Cy3* Antikörper inkubiert und erscheint in der Abbildung rot. Die Zellkerne wurden mit einer DAPI-Färbung blau abgefärbt. Die Abbildungen wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop erstellt. Die verstärkte rote Anfärbung der überexprimierenden Zellen ist deutlich zu erkennen. Vergleicht man die Rotfärbung der beiden Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4 miteinander, so ist eine leichte Zunahme der Intensität in der Färbung der T20-hApoE3 Zellen zu erkennen.

A T20-Empty Lenti



B T20-hApoE3



C T20-hApoE4

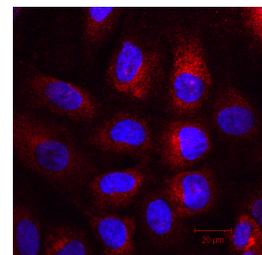


Abbildung 3.3: ApoE Immunfluoreszenzfärbung.

Angefärbt wurden die Zelllinien mit ApoE Überexpression (T20-hApoE3 und T20-hApoE4) und die Kontrollzelllinie T20-Empty Lenti. Die Färbung erfolgte mit einem anti-ApoE HRP Antikörper der Firma GeneTex und wird hier rot dargestellt. Die Zellkerne sind mit einer Dapi-Lösung blau angefärbt worden. Die Abbildungen wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop erstellt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle Zelllinien hinsichtlich der endogenen ApoE Konzentration sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene die erwartete Expression aufweisen. Die Kontrollzelllinien zeigen nur geringe Abweichungen gegenüber der parentalen hMSC Tert Zelllinie und scheinen als Kontrollen für weitere Versuche geeignet.

Im Anschluss an den Expressionsnachweis wurde die Funktionalität des endogen überexprimierten Apolipoproteins für beide Isoformen geprüft.

3.1.2 ¹²⁵I-Chylomikronen Remnant Aufnahme

Um zu überprüfen, ob das von den überexprimierenden Zellen sekretierte Apolipoprotein E funktional ist, wurden zelluläre Aufnahme Assays mit ¹²⁵I-Chylomikronen Remnants (CR) durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 100.000 Zellen/well auf einer 12-well-Platte ausgesetzt. Nachdem sie 24 Stunden in Standardmedium in Kultur gehalten worden waren, wurde ihnen für weitere 24 Stunden durch Umsetzen auf Medium mit Lipoprotein defizientem Serum (LPDS) extrazelluläres ApoE entzogen. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit ¹²⁵Iod-markierten Chylomikronen Remnants inkubiert. Da ApoE über LRP1 die zelluläre Aufnahme von Chylomikronen Remnants vermittelt, konnte auf diese Weise die Aufnahme der Chylomikronen Remnants und damit die Funktionalität des ApoE in den Zellen nachgewiesen werden. Mit einem Gammacounter wurde zunächst der radioaktiv markierte Anteil pro Volumen gemessen. Anhand einer Proteinbestimmung der Zelllysate wurden die gemessenen Werte im Anschluss auf counts/mg Zellprotein umgerechnet.

In Abbildung 3.4 zeigt sich deutlich, dass die Aufnahme an ¹²⁵Iod-markierten Chylomikronen Remnants bei den Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4, verglichen mit der parentalen hMSC Tert20 Zelllinie und der Kontrollzelllinie T20-Empty Lenti dreifach höher ist. Das von den überexprimierenden Zellen mehr produzierte ApoE hat demzufolge einen stimulatorischen Effekt auf die Aufnahme der Chylomikronen Remnants in die Zelle und ist somit funktional. Zwischen den beiden ApoE Isoformen ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der CR Aufnahme zu erkennen. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s.= nicht signifikant, ***p ≤ 0,005.

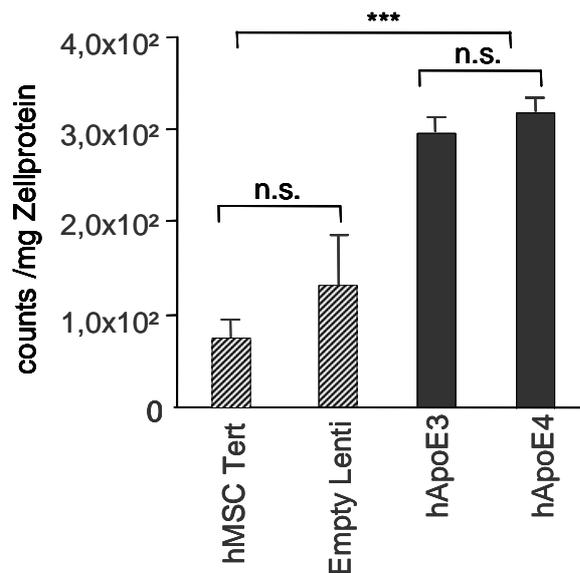


Abbildung 3.4: ^{125}I -Chylomikronen Remnants Aufnahme der verschiedenen Zelllinien.

Durch eine 24 stündige Inkubation mit 5%LPDS Medium wurde den Zellen extrazelluläres ApoE entzogen. Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation mit $5\mu\text{g/ml}$ ^{125}I -TRL. Dargestellt ist die Aufnahme an ^{125}I -Chylomikronen Remnants in die genetisch modifizierten Zellen. Die Aufnahme der ApoE überexprimierenden Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4 ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. (n=3)

Nachdem sowohl die basale ApoE-Expression der Zellen untersucht wurde und auch die Funktionalität des endogen überexprimierten ApoE nachgewiesen wurde, wurde das osteogene Differenzierungsverhalten der Zelllinien in Abhängigkeit zu der endogenen ApoE-Konzentration beleuchtet.

3.2 Vergleichende Untersuchung des osteogenen Differenzierungsverhaltens der genetisch modifizierten humanen mesenchymalen Stammzelllinien

3.2.1 Expression osteogener Differenzierungsmarker in hMSC Tert20 Zellen im Zeitverlauf

Um zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit verwendeten hMSC Tert20 Zellen in der Lage sind osteogen zu differenzieren, wurde vorab die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase und Osteocalcin im Zeitverlauf an Tag 0, Tag 6 und Tag 12 mittels quantitativer RT-PCR gemessen.

hMSC Tert20 Zellen wurden dazu auf 12-well-Platten à 10.000 Zellen/well in Kultur gehalten und ab Tag 0 alle drei Tage mit frischem Medium versorgt. Die Zellen wurden durch Zugabe von Ascorbat, β -Glycerophosphat und Vitamin D3 zur osteogenen Differenzierung stimuliert und im Zeitverlauf an Tag 0, Tag 6, und an Tag 12 geerntet.

Abbildung 3.5 zeigt, dass die Konzentration der Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase und Osteocalcin in hMSC Tert20 Zellen im zeitlichen Verlauf deutlich ansteigen. Eine Steigerung der Expression von Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase gelten als

Nachweis osteogener Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Owen et al., 1990). Die Fähigkeit von hMSC Tert20 Zellen osteogen zu differenzieren wurde somit nochmals bestätigt.

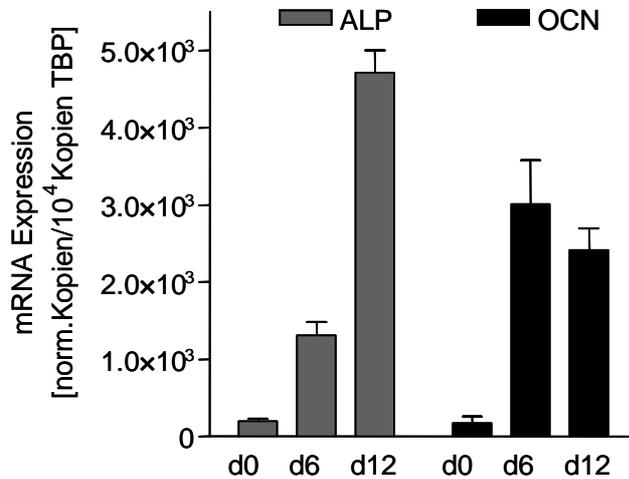


Abbildung 3.5: Expression osteogener Differenzierungsmarker in hMSC Tert20 Zellen nach Stimulation mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 im Zeitverlauf

Darstellung des mittels qRT-PCR gemessenen Anstieges der Expression von Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin auf mRNA Ebene während der osteogenen Differenzierung im Zeitverlauf von Tag 0 bis Tag 12. Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte standardmäßig durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3.

3.2.2 ApoE-Expression während der osteogenen Differenzierung von hMSC Tert20 Zellen im Zeitverlauf

Im Anschluss wurde in einer Zeitreihe der Verlauf der ApoE-Expression während der osteogenen Differenzierung von hMSC Tert20 Zellen untersucht.

hMSC Tert Zellen wurden auf 12-well-Platten à 10.000 Zellen/well in Kultur gehalten und ab Tag 0 alle drei Tage durch Induktion von β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 zur osteogenen Differenzierung stimuliert. Die Zellen wurden im Zeitverlauf an Tag 3, Tag 6, Tag 9 und an Tag 12 geerntet.

Abbildung 3.6 zeigt, dass die ApoE-Konzentration in Zellen, die osteogen differenzieren, im zeitlichen Verlauf um den Faktor 4 (von 1000 auf 4000 Kopien) ansteigt. Zellen, die ohne Differenzierungsstimuli in Kultur gehalten wurden, exprimieren 8mal mehr ApoE.

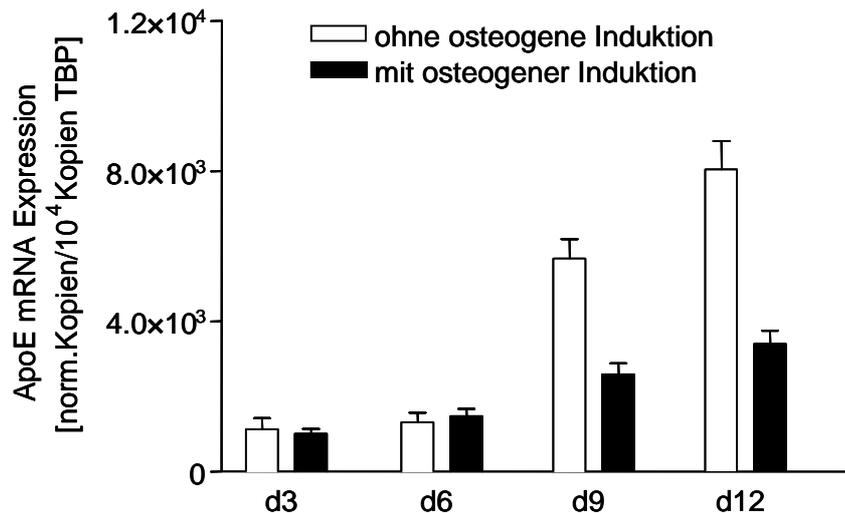


Abbildung 3.6: ApoE-Expression während der osteogenen Differenzierung von hMSC Tert Zellen im Zeitverlauf

Ansteigen der ApoE-Expression im Zeitverlauf von Tag 3 bis Tag 12 um den Faktor 8 ohne osteogene Induktion. Mit osteogener Induktion ist der Anstieg auf das 4fache reduziert. Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte standardmäßig durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hMSC Tert20 Zellen, die sich undifferenziert vermehren, doppelt so viel ApoE exprimieren, verglichen mit Zellen, die zur osteogenen Differenzierung stimuliert werden. Unabhängig davon steigt, im zeitlichen Verlauf gesehen, die Expression während der osteogenen Differenzierung an.

3.2.3 Expression osteogener Differenzierungsmarker in den genetisch modifizierten hMSC Tert20 Zelllinien während der osteogenen Differenzierung

Die osteoblastäre Differenzierung, gemessen an den Differenzierungsmarkern Osteocalcin und Kollagen I α 1, wurde im Folgenden in Bezug auf die Unterschiede in der endogenen ApoE-Expression der verschiedenen hMSC Tert20 Zelllinien untersucht.

Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen/well auf 12-well-Platten ausgesetzt und 6 bzw. 12 Tage in Kultur gehalten. Medienwechsel und Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 erfolgten ab dem Tag 0 alle drei Tage. An Tag 6 und an Tag 12 wurden die Zellen geerntet, 3 wells gemittelt, und im Anschluss RNA präpariert.

Die Abbildungen 10A, B, C und D zeigen die Expressionsanalyse der Differenzierungsmarker Osteocalcin und Kollagen I α 1 mittels quantitativer RT-PCR, gemessen nach einer Differenzierungszeit von 6 und 12 Tagen. Die absoluten Kopienzahlen der einzelnen Gene wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf relative Einheiten umgerechnet. Man sieht sowohl an Tag 6 als auch an Tag 12 eine leichte Verringerung der Expression der osteogenen

Differenzierungsmarker in den Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4. In der Zelllinie T20-shApoE ist jedoch ein massiver Anstieg der Differenzierungsmarker um ca.70%, verglichen mit der dazugehörigen Kontrollzelllinie T20-Lenti sh scrambled zu erkennen.

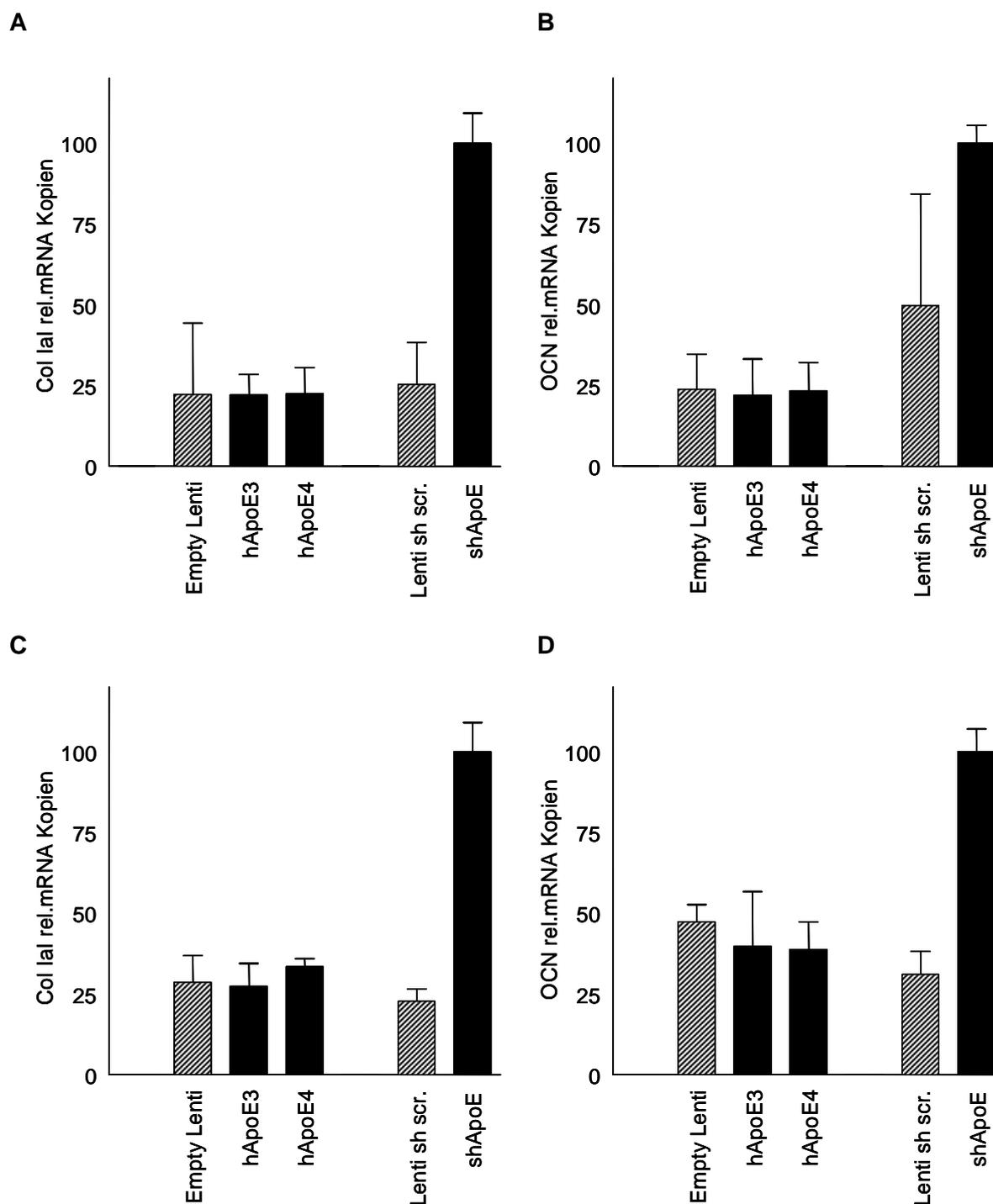


Abbildung 3.7 mRNA Expressionsanalyse in hMSC Tert Zelllinien mit genetisch modifizierter ApoE-Expression

A) Kollagen I α 1- an Tag 6 der Differenzierung

B) Osteocalcin- an Tag 6 der Differenzierung

C) Kollagen I α 1- an Tag 12 der Differenzierung

D) Osteocalcin- an Tag 12 der Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte standardmäßig durch Induktion mit β -Glycerolphosphat, Ascorbat und Vitamin D3. Es zeigt sich an Tag 6 und an Tag 12 ein 50-75%iger Anstieg der Expression der Differenzierungsmarker Kollagen und Osteocalcin in Zellen reduzierter ApoE-Expression (T20-shApoE).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann festgehalten werden, dass ein Mangel an endogenem ApoE in hMSC Tert20 Zellen einen Anstieg der Expression der Differenzierungsmarker Kollagen I α 1 und Osteocalcin auf über das Doppelte zur Folge hat. Diese Beobachtung wäre mit einem inhibitorischen Effekt von ApoE auf die Expression osteogener Differenzierungsmarker, der bei Reduktion von ApoE ausbleibt, in Einklang zu bringen.

Nachdem die Bedeutung des endogen produzierten ApoE für das osteogene Differenzierungsverhalten der hMSC Tert20 Zelllinien untersucht wurde, wurde im Anschluss der Einfluss von exogen zugeführtem ApoE auf die Differenzierung von Osteoblasten untersucht. Das nachfolgende Experiment beschäftigt sich mit der Hypothese, dass exogen zugeführtes ApoE einen negativen Effekt auf das Differenzierungsverhalten von Osteoblasten ausübt.

3.2.4 Expression osteogener Differenzierungsmarker in hMSC Tert Zellen nach Stimulation mit exogenem ApoE

Um die Auswirkungen von exogenem ApoE auf das Differenzierungsverhalten zu untersuchen, wurden hMSC Tert20 Zellen während der Differenzierung zusätzlich mit exogenem ApoE aus den Zellkulturüberständen der überexprimierenden Zelllinien stimuliert.

Hierzu wurden hMSC Tert20 Zellen auf 12-well Platten à 10.000 Zellen/well ausgesetzt und ab dem Tag 0 alle drei Tage mit frischem Medium versorgt. Frisches Standardmedium mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin wurde hierzu im Verhältnis 1:2 mit Zellkulturüberständen der in T75-Kulturflaschen parallel gehaltenen Zelllinien hMSC Tert20, T20-hApoE3 und T20-hApoE4 gemischt. Das so entstandene Stimulationsmedium wurde standardmäßig mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 in entsprechender Konzentration versetzt. Die Zellen wurden für 12 Tage differenziert. An Tag 12 wurden die Zellen geerntet, 3 wells gemittelt und im Anschluss RNA präpariert. Die unterschiedlichen ApoE-Konzentrationen der Zellkulturüberstände wurden mittels ApoE-Elisa bestimmt.

Die gemessenen ApoE-Konzentrationen der Zellkulturüberstände zeigen erhöhte ApoE-Konzentrationen in den Überständen der Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4 im Vergleich zur parentalen hMSC Tert20 Zelllinie, wobei T20-hApoE3 im Vergleich zur Isoform T20-hApoE4 40% mehr ApoE sezerniert. Die Expression der Differenzierungsmarker Kollagen I α 1 und Osteocalcin nimmt durch die Inkubation mit ApoE-haltigem Zellkulturüberstand ab. Die Expression der Alkalischen Phosphatase verringert sich nach Inkubation mit ApoE4, durch ApoE3-Inkubation steigt diese an. Die hohe Standardabweichung lässt diese Werte allerdings wenig aussagekräftig erscheinen. Der durch ApoE4 erzielte Effekt scheint im Verhältnis zur im Zellkulturüberstand enthaltenen

Konzentration größer als der durch ApoE3, ist jedoch nicht signifikant. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: *** $p \leq 0,005$, * $p \leq 0,05$.

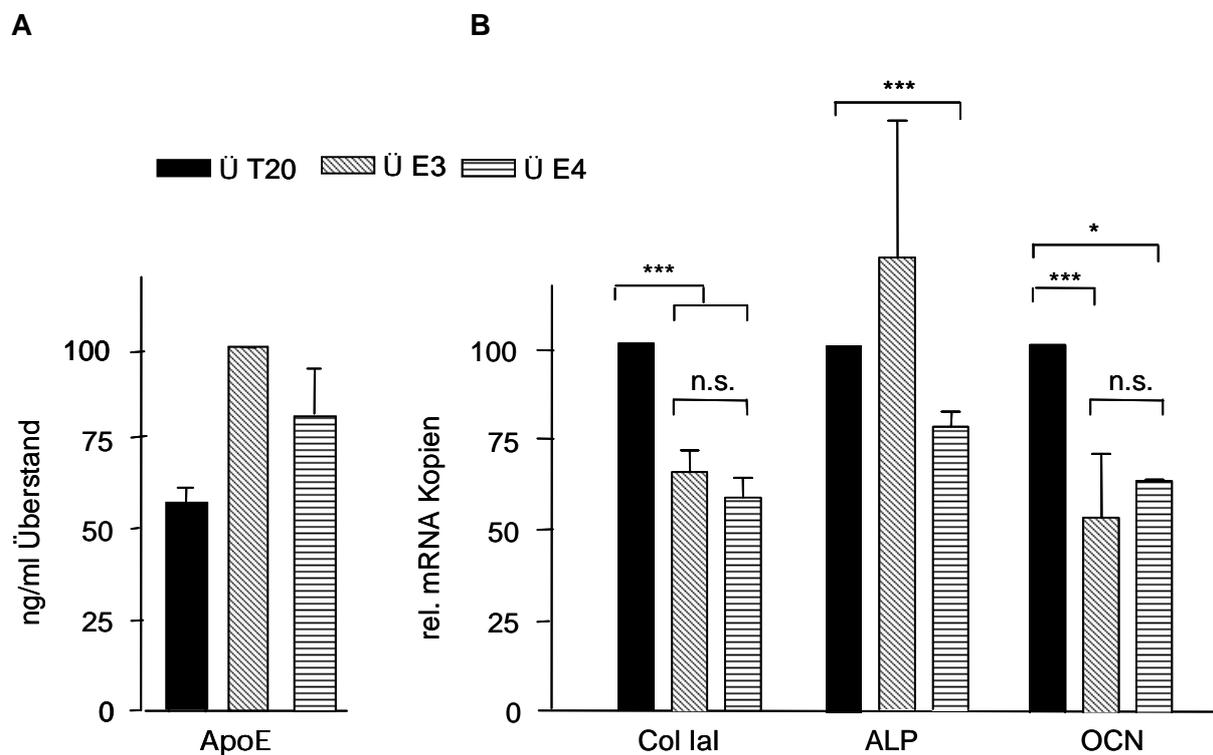


Abbildung 3.8: Expressionsanalyse osteogener Differenzierungsmarker nach Stimulation mit exogenem ApoE

A) ApoE-Expressionsanalyse der Zellkulturüberstände

B) mRNA Expressionsanalyse der Differenzierungsmarker Kollagen 1a1, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin nach Inkubation mit exogenem ApoE an d12 der Differenzierung von hMSC Tert Zellen

Die Inkubation erfolgte mit den Überständen der verschiedenen genetisch modifizierten Zelllinien hMSC Tert20, T20-hApoE3 und T20-hApoE4. Das Induktionsmedium wurde im Verhältnis 1:2 aus Standardmedium und aus den Überständen der Zelllinien hMSC Tert20, T20-hApoE3, T20-hApoE4 zusammengesetzt. Die osteogene Differenzierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte standardmäßig über 12 Tage durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3. Die mRNA Kopienzahlen wurden auf relative Einheiten umgerechnet. (n=2, in 4fach Werten gemessen)

Die Inkubation mit ApoE-haltigem Medium hat einen inhibitorischen Effekt auf die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Kollagen 1a1, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin differenzierter hMSC Tert20 Zellen. Um zu prüfen, ob durch eine Reduktion der extrazellulären ApoE-Konzentration im Standardmedium in entgegengesetzter Art und Weise ein Anstieg der osteogenen Differenzierungsmarker Kollagen 1a1, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin induziert wird, wurden Zellen in LPDS-Medium differenziert.

3.2.5 Expression osteogener Differenzierungsmarker in hMSC Tert20 Zellen nach Reduktion der extrazellulären ApoE-Konzentration

Anstelle des normalerweise verwendeten Standardmediums mit 10% fötalem Kälberserum wurde für dieses Experiment 5% Lipoprotein-defizientes Serum (LPDS) zum Standardmedium zugegeben. Die Zellen wurden in LPDS-Medium in Kultur gehalten und ihnen somit im Standardkulturmedium enthaltenes extrazelluläres ApoE entzogen.

Hierzu wurden hMSC Tert20 Zellen á 10.000 Zellen/well auf 12-well-Platten ausgesetzt. Die Differenzierung erfolgte ab Tag 0 für zwei Tage. Die eine Hälfte der Zellen wurde standardmäßig als Kontrolle mit 10% fötalem Kälberserum-haltigem Medium mit Ascorbat, β -Glycerophosphat, Vitamin D3 induziert. Die andere Hälfte wurde ebenfalls für zwei Tage mit Differenzierungsmedium induziert, jedoch auf Basis von LPDS-Medium. An Tag 2 wurden die Zellen geerntet und im Anschluss RNA präpariert.

Durch das Umsetzen der Zellen auf LPDS Medium und den damit verbundenen Entzug von exogenem ApoE wurde ein signifikanter Anstieg der Expression der Differenzierungsmarker Kollagen I α 1, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin beobachtet. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: *** $p \leq 0,005$.

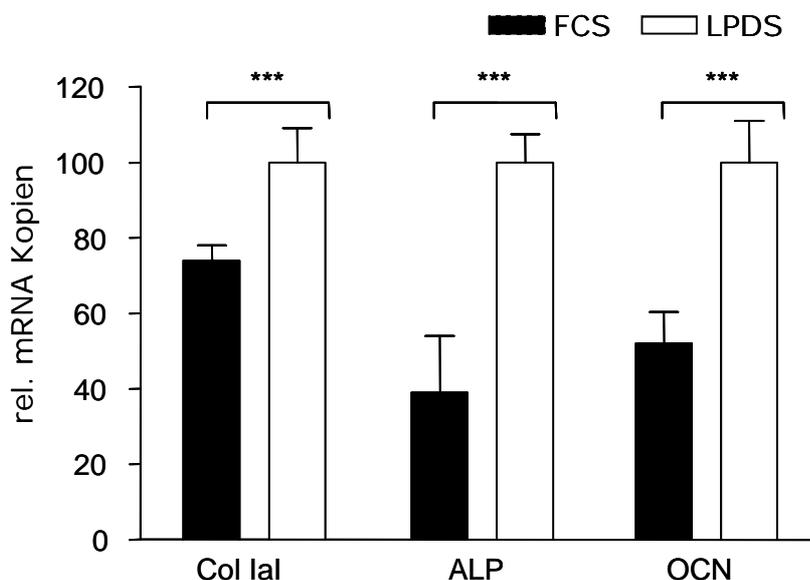


Abbildung 3.9: Expression von Kollagen I α 1, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin in hMSC Tert20 Zellen als Reaktion auf Lipoprotein-defizientes Medium

Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte über 2 Tage durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 in Lipoprotein-defizientem Medium. (ein Experiment; in 4fach Werten gemessen). Die mRNA Kopienzahlen wurden auf relative Einheiten umgerechnet.

Die Untersuchungen des osteogenen Differenzierungsverhaltens in Abhängigkeit von der ApoE-Expression der verschiedenen Zelllinien zeigen, dass ApoE einen inhibitorischen Effekt auf die Expression verschiedener Differenzierungsmarker während der osteoblastären

Differenzierung hat. Dieser Effekt ist durch die Zugabe und Reduktion von extrazellulärem ApoE beeinflussbar.

3.3 Einfluss von ApoE auf die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade in humanen MSC Tert Zellen

Der kanonische wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg spielt in der Osteoblastendifferenzierung eine wichtige Rolle. Die folgenden Experimente befassen sich mit der Fragestellung, ob der inhibierende Effekt von ApoE auf die osteoblastäre Differenzierung über den wnt/ β -catenin Signalweg vermittelt wird.

3.3.1 Prüfung der Stimulierbarkeit von hMSC Tert20 Zellen durch wnt3a

β -Catenin besitzt eine Schlüsselrolle im kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg. Extrazelluläre wnt-Proteine setzen die Signalkaskade in Gang. Dadurch wird ein Degradierungskomplex inaktiviert, was eine intrazelluläre Akkumulation von β -catenin zur Folge hat. Im Zellkern führt dies zur Aktivierung der Transkription abhängiger Zielgene. In diesem Experiment wurde mittels β -catenin Western Blot Analysen die Stimulierbarkeit humaner MSC Tert20 Zellen durch wnt3a untersucht. Zusätzlich wurde die Stimulierbarkeit des wnt/ β -catenin Signalwegs durch Lithiumchlorid (LiCl) getestet. LiCl verhindert über eine Inhibition der GSK-3 β den Abbau von β -catenin und kann als intrazellulärer Stimulus des Signalwegs verwendet werden.

Basal wurden bei den verschiedenen hMSC Tert20 Zelllinien mittels β -catenin Western Blot Analysen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der β -catenin Akkumulation gemessen. Zur Prüfung der Stimulierbarkeit wurden die Zellen mit Zellzahlen von 50.000 Zellen/well auf 6-well-Platten ausgesetzt und drei Tage standardmäßig durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3 differenziert. Während der letzten vier Stunden der Differenzierung wurden die Zellen zusätzlich mit LiCl (40mM), mit rekombinantem wnt3a (50ng/ml) und mit konditioniertem Medium mit wnt3a (CM wnt3a) und ohne wnt3a (CM L-cells) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und im Anschluss Gesamtzellprotein für Western Blot Analysen präpariert. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamtzellprotein pro Spur auf ein SDS-PAGE Gradientengel aufgetragen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper anti- β -catenin der Firma Santa Cruz erfolgte über Nacht bei 4°C. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter *goat-anti-mouse* Antikörper der Firma Jackson Immuno Research verwendet. Als Ladekontrollen wurden anti- β -aktin und anti-GAPDH Antikörper mit entsprechenden Sekundärantikörpern (Peroxidase-konjugierter *goat-anti-mouse* Antikörper, HRP *donkey-anti-goat*) eingesetzt.

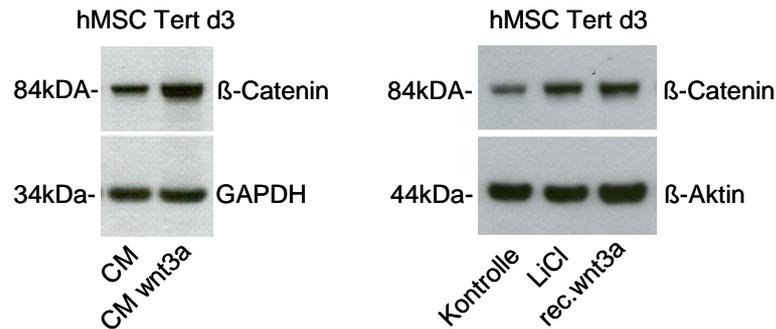


Abbildung 3.10: β-catenin Western Blot Analyse aus Gesamtzellprotein (10µg) von hMSC Tert Zellen

Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte über 3 Tage durch Induktion mit β-Glycerolphosphat, Ascorbat und Vitamin D3. Während der letzten 4 Stunden wurden die Zellen mit konditioniertem Medium mit wnt3a (CM wnt3a) und ohne wnt3a (CM I-cells) stimuliert. Außerdem fand eine Stimulation mit LiCl (40mM) und mit rekombinatem wnt3a (50ng/ml) statt.

Eine Intensitätszunahme der β-catenin Banden ist sowohl durch LiCl, einem etablierten Stimulator des wnt/β-catenin Signalwegs als auch durch die Gabe von wnt3a zu erreichen. Somit wurde gezeigt, dass hMSC Tert20 Zellen durch rekombinantes wnt3a, durch konditioniertes Medium von wnt3a exprimierenden Zellen und durch LiCl stimulierbar sind.

3.3.2 Ermittlung der wnt3a stimulierten Aktivität des Transkriptionsfaktors Lef/TCF in den verschiedenen hMSC Tert20 Zelllinien

Durch Reporter-Assays zur Bestimmung der Aktivität der Transkriptionsfamilie Lef/TCF sollten zwei Fragestellungen untersucht werden. Zum einen wurde die Stimulierbarkeit der hMSC Tert Zelllinien verschiedener ApoE-Expression gemessen, zum anderen wurden gleichzeitig die Unterschiede in der Stimulierbarkeit der verschiedenen Zelllinien untereinander getestet. Diese Versuche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kassem (Odense, Dänemark) durchgeführt.

Die Zellen wurden nach Transfektion mit SuperTop Reagenz und *SV40 Renilla Vektor* für 24 Stunden mit wnt3a-Medium stimuliert. Zur Stimulation wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit Standardmedium verwendet.

Basal, ohne wnt3a Stimulation, wurde bei keiner Zelllinie eine Aktivität der Transkriptionsfaktorfamilie Lef/TCF gemessen. Nach wnt3a Stimulation wird deutlich, dass sich alle Zelllinien stimulieren lassen. Die Luciferaseaktivität der Zelllinie T20-shApoE zeigt im Vergleich zur entsprechenden Kontrolllinie eine vierfach erhöhte Aktivität. Isoformspezifische Unterschiede zwischen T20-hApoE3 und T20-hApoE4 sind nicht vorhanden. Dies zeigt, dass eine ApoE-Reduktion zu einer enormen Steigerung der Transkription Lef/TCF abhängiger Gene führt.

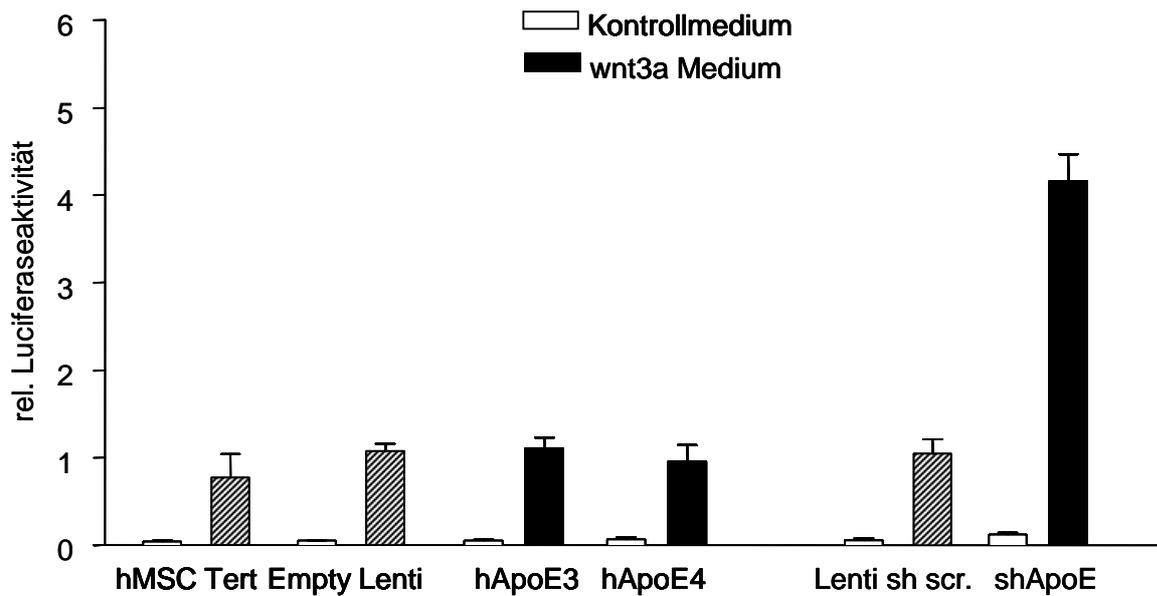


Abbildung 3.11: Reporter Assays zur Aktivität der Transkriptionsfaktorfamilie Lef/TCF

Dargestellt ist die Luciferaseaktivität der verschieden genetisch modifizierten hMSC Tert20 Zelllinien ohne Stimulation mit wnt3a (CM I-cells) und mit Stimulation mit konditioniertem wnt3a-Medium (CM wnt3a) für 24h. Die Luciferaseaktivität wurde mit einem Lumimeter gemessen und ist in relativen Einheiten angegeben. Eine Stimulierbarkeit der Luciferaseaktivität ist in allen Zelllinien zu sehen. Reduzierte ApoE-Expression verursacht einen vierfach erhöhten Anstieg.

3.3.3 Osteoprotegerin Expressionsanalyse mittels qRT-PCR

Das von Osteoblasten gebildete Osteoprotegerin (OPG) ist ein Lef/TCF abhängiges Zielgen des wnt/ β -catenin Signalweges. Eine Messung der Osteoprotegerin-Expression mittels qRT-PCR sollte weiter Aufschluss über den Einfluss der endogenen ApoE-Expression auf den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg geben.

Die Zellen wurden hierfür mit einer Zellzahl von 50.000 Zellen/well auf 6-well-Platten ausgesetzt und ab dem Tag 0 alle drei Tage mit frischem Differenzierungsmedium mit Ascorbat, β -Glycerophosphat und Vitamin D3 induziert. Als Messzeitpunkte wurden Tag 1, Tag 2, Tag 3, und Tag 6 ausgewählt, um nähere Aussagen bezüglich des Zeitverlaufs treffen zu können.

Während sich die unterschiedlichen Zelllinien zu Anfang eher gleichförmig verhalten, ist ab dem dritten Tag der osteogenen Differenzierung ein deutliches Auseinanderweichen zwischen der Zelllinie T20-shApoE und den übrigen Zelllinien zu erkennen. Die Osteoprotegerin-Expression der Zelllinie T20-shApoE steigt von Tag 3 bis Tag 6 im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle auf das 4fache an. Die in T20-shApoE Zellen gemessene Expression von Osteoprotegerin, einem Lef/TCF abhängigen Zielgen, passt zur gemessenen Steigerung des Transkriptionsfaktors Lef/TCF.

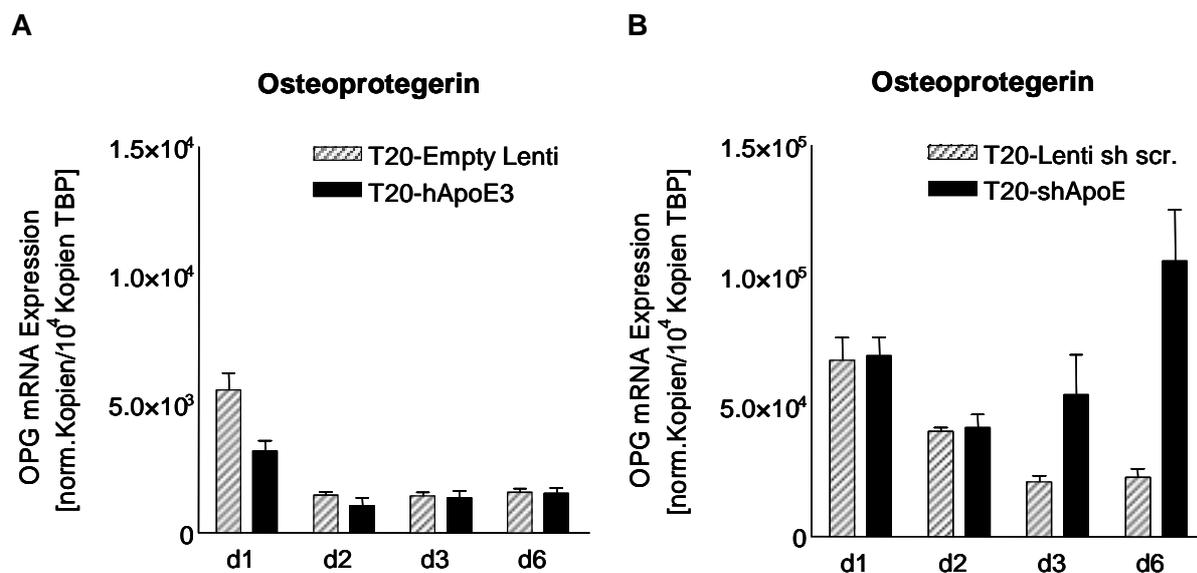


Abbildung 3.12: Osteoprotegerin-Expressionsanalyse im Zeitverlauf von Tag 1 bis Tag 6.

A) ApoE überexprimierende Zelllinie T20-hApoE3 mit Kontrolle

B) Zelllinie mit reduzierter ApoE-Expression T20-shApoE mit Kontrolle

Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3.

3.3.4 Einfluss von ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um den Einfluss von ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation zu untersuchen. Hierzu wurden β -catenin Western Blot Analysen aus Gesamtzellprotein humaner MSC Tert20 Zellen durchgeführt. Durch Inkubation mit rekombinantem ApoE wurde der Einfluss von exogenem ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation herausgearbeitet.

Zur β -catenin Western Blot Analyse aus Gesamtzellprotein von hMSC Tert20 Zellen wurden 10.000 Zellen/well auf 12-well-Platten ausgesetzt und ab dem Tag 0 alle drei Tage mit frischem Differenzierungsmedium mit Ascorbat, β -Glycerophosphat und Vitamin D3 induziert. Die osteogene Differenzierung erfolgte über die Dauer von 6 und 12 Tagen. Während der letzten 48 und 24 Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit 10 μ g rekombinantem ApoE und 50ng rekombinantem wnt3a stimuliert.

Abbildung 3.13 zeigt, dass sowohl an Tag 6 (A) als auch an Tag 12 (B) der osteogenen Differenzierung durch rekombinantes ApoE eine Reduktion der Intensität der β -catenin Banden hervorgerufen wird. Durch eine Stimulation mit rekombinantem wnt3a wird eine leichte Zunahme der Intensität der β -catenin Banden ebenfalls sowohl an Tag 6 und an Tag 12 sichtbar. Da an Tag 12 allerdings auch ein Anstieg der Ladekontrolle GAPDH zu sehen ist,

kann hier kein eindeutiger Rückschluss auf eine vermehrte β -catenin Akkumulation gezogen werden. Eine kombinierte Stimulation mit rekombinantem wnt3a und rekombinantem ApoE zeigt eine Reduktion von β -catenin, die an Tag 6 auf Kontrollzellenniveau und an Tag 12 sogar darüber hinaus zurückreguliert wird.

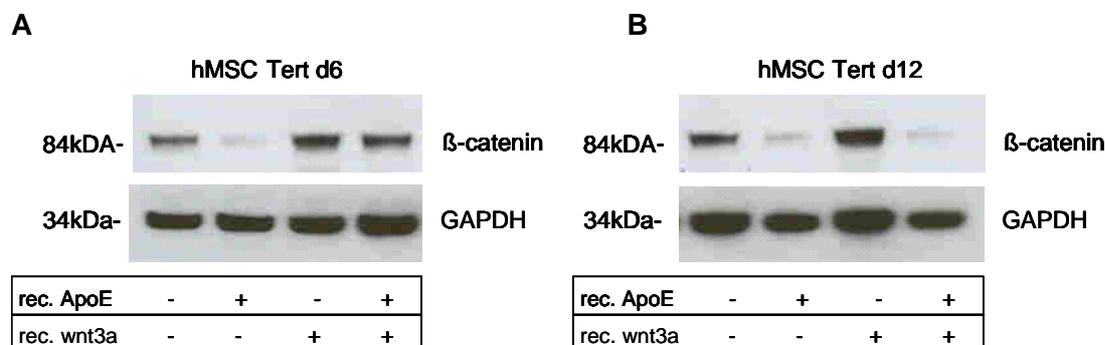


Abbildung 3.13: β -catenin Western Blot Analyse nach Stimulation mit ApoE und wnt3a.

A) Gesamtzellprotein von hMSC Tert20 Zellen an Tag 6 der Differenzierung

B) Gesamtzellprotein von hMSC Tert20 Zellen an Tag 12 der Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte standardmäßig durch Induktion mit β -Glycerophosphat, Ascorbat und Vitamin D3. Während der letzten 48 und 24 Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit rekombinantem ApoE (10 μ g) und rekombinantem wnt3a (50ng) stimuliert. Eine Stimulation der β -catenin Akkumulation durch rekombinantes wnt3a sowie eine Reduktion durch Induktion mit rekombinantem ApoE ist zu sehen.

Anhand dieser Experimente wird deutlich, dass sich die intrazelluläre β -catenin Akkumulation durch Zugabe von rekombinantem wnt3a stimulieren und durch ApoE inhibieren lässt.

3.4 Einfluss von ApoE auf die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade in primären murinen Osteoblasten

Durch Versuche mit primären murinen Osteoblasten ApoE-defizienter Mäuse können Auswirkungen einer absoluten ApoE-Defizienz im Vergleich zur bisher untersuchten Reduktion der endogenen ApoE-Expression in T20-shApoE Zellen untersucht werden und ergänzende Aussagen getroffen werden. Hierzu wurden β -catenin Western Blot Analysen aus Gesamtzellprotein durchgeführt, um den Einfluss von ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation zu untersuchen. Anhand der primären Zellen unterschiedlicher ApoE-Expression wurden die Auswirkungen des endogenen ApoE getestet. Durch Inkubation mit rekombinantem ApoE wurde der Einfluss von exogenem ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation herausgearbeitet. Des Weiteren wurden Osteoprotegerin Analysen auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene durchgeführt.

3.4.1 Einfluss von ApoE auf die intrazelluläre β -catenin Akkumulation

Die primären Zellen wurden präpariert und mit einer Zellzahl von 30.000 Zellen/well auf 12-well-Platten ausgesetzt. Sie wurden bis zur Subkonfluenz in Kultur gehalten und ab Tag 0 alle drei Tage mit frischem Differenzierungsmedium für 12 Tage differenziert. Ein Teil wurde zusätzlich ab Tag 4 bei jeder weiteren Induktion mit rekombinantem ApoE (10 μ g/ml) stimuliert. Bei der Western Blot Analyse wurden jeweils 5-10 μ g des Gesamtzellproteins pro Spur auf ein SDS-PAGE Gradientengel aufgetragen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper anti- β -catenin der Firma Santa Cruz erfolgte über Nacht bei 4°C. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter *goat-anti-mouse* Antikörper der Firma Jackson Immuno Research verwendet. Als Ladekontrollen wurden anti- β -aktin und anti-RAP Antikörper mit entsprechendem Sekundärantikörper (Peroxidase-konjugierter *goat-anti-mouse* Antikörper) eingesetzt.

Bei primären murinen Osteoblasten wurde, nach 12 Tagen osteogener Differenzierung, im Vergleich zwischen primären murinen Osteoblasten vom ApoE-Knockout Typ und primären murinen Wildtyp Osteoblasten bereits basal erhebliche Unterschiede in der β -catenin Akkumulation gesehen.

Vergleicht man die β -catenin Expression (81-104 kDa) von Wildtyp-Zellen mit der ApoE-defizienter Zellen, sieht man bei primären murinen Osteoblasten mit ApoE-Defizienz eine deutlich stärkere β -catenin Bande. Nach Stimulation der Zellen unveränderter ApoE Expression mit rekombinantem ApoE ist β -catenin wesentlich schwächer. Auch im ApoE-Knockout-Modell lässt sich eine Intensitätsreduktion von β -catenin durch die Stimulation mit rekombinantem ApoE erkennen. Vergleicht man die durch exogenes rekombinantes ApoE hervorgerufene Reduktion der unterschiedlichen Zellmodelle, ist die β -catenin Konzentration im Zelllysate von Zellen mit ApoE-Knockout gegenüber der von Wildtyp-Zellen stärker ausgeprägt.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass sich im Gesamtzellprotein von primären murinen Osteoblasten mit ApoE-Knockout mehr β -catenin befindet als in primären murinen Osteoblasten unveränderter ApoE-Expression. In beiden Zellmodellen ist die β -catenin Konzentration durch exogen zugeführtes ApoE reduzierbar. Eine verstärkte β -catenin Akkumulation in primären murinen ApoE-defizienten Osteoblasten wird durch Stimulation mit rekombinantem ApoE über das Niveau von Wildtyp-Osteoblasten hinaus zurückreguliert.

Demzufolge inhibiert sowohl endogen produziertes sowie exogen zugeführtes ApoE die β -catenin Akkumulation und scheint demzufolge den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg negativ zu beeinflussen.

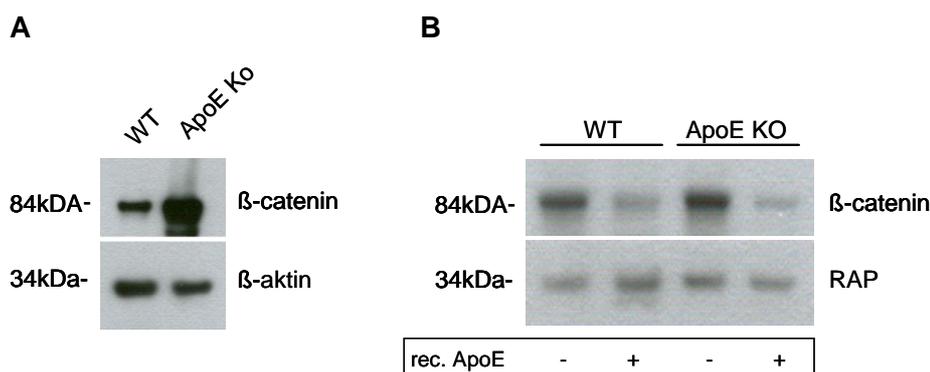


Abbildung 3.15: β-catenin Western Blot Analyse aus Gesamtzellprotein primärer muriner ApoE defizienter Osteoblasten (ApoE KO) und Osteoblasten unveränderter ApoE-Expression (ApoE WT).

A) Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte standardmäßig über 12 Tage durch Induktion mit β-Glycerophosphat und Ascorbat.

B) Die osteogene Differenzierung der Zellen erfolgte standardmäßig über 12 Tage durch Induktion mit β-Glycerophosphat und Ascorbat. Zusätzlich fand ab dem vierten Tag der Differenzierung alle drei Tage eine Induktion mit rekombinarem ApoE statt (10μg).

3.4.2 Osteoprotegerin Expressionsanalyse

Eine Messung der Osteoprotegerin-Expression auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene nach Stimulation mit rekombinarem wnt3a und rekombinarem ApoE wurde durchgeführt um Aufschluss über den Einfluss von exogenem und endogenem ApoE auf den wnt/β-catenin Signaltransduktionsweg in primären murinen Osteoblasten zu gewinnen.

Aus den Calvarien drei Tage alter Mäuse wurden primäre Osteoblasten isoliert. Sie wurden mit einer Zellzahl von 30.000 Zellen/well auf 12-well-Platten ausgesetzt und bis zur Subkonfluenz in Kultur gehalten. Die Induktion mit β-Glycerophosphat und Ascorbat zur osteogenen Differenzierung erfolgte ab Tag 0 alle drei Tage. Die Zellen wurden 12 Tage differenziert und in den letzten 48 und 24 Stunden zusätzlich mit rekombinarem ApoE (5μg/ml) und rekombinarem wnt3a (50ng/ml) stimuliert. An Tag 12 wurden die Zellen geerntet und anschließend RNA präpariert. Die Zellkulturüberstände wurden für Proteinanalysen bei -20°C aufbewahrt.

Vergleicht man die Osteoprotegerin-Expression der Wildtyp Zellen mit der von Zellen mit ApoE-Knockout, sieht man auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene in primären murinen Osteoblasten mit ApoE-Knockout eine gesteigerte Osteoprotegerin-Konzentration. Nach Stimulation der Zellen mit rekombinarem murinem wnt3a wird eine Steigerung des Osteoprotegerins auf mRNA- und auf Proteinebene deutlich. Insgesamt ist die Osteoprotegerin-Expression von primären murinen Osteoblasten mit ApoE-Knockout im Vergleich zu Wildtyp Osteoblasten sowohl mit als auch ohne Stimulation mit rekombinarem wnt3a gesteigert. In beiden Zellmodellen ist die Osteoprotegerin-Expression durch exogen zugeführtes ApoE reduzierbar.

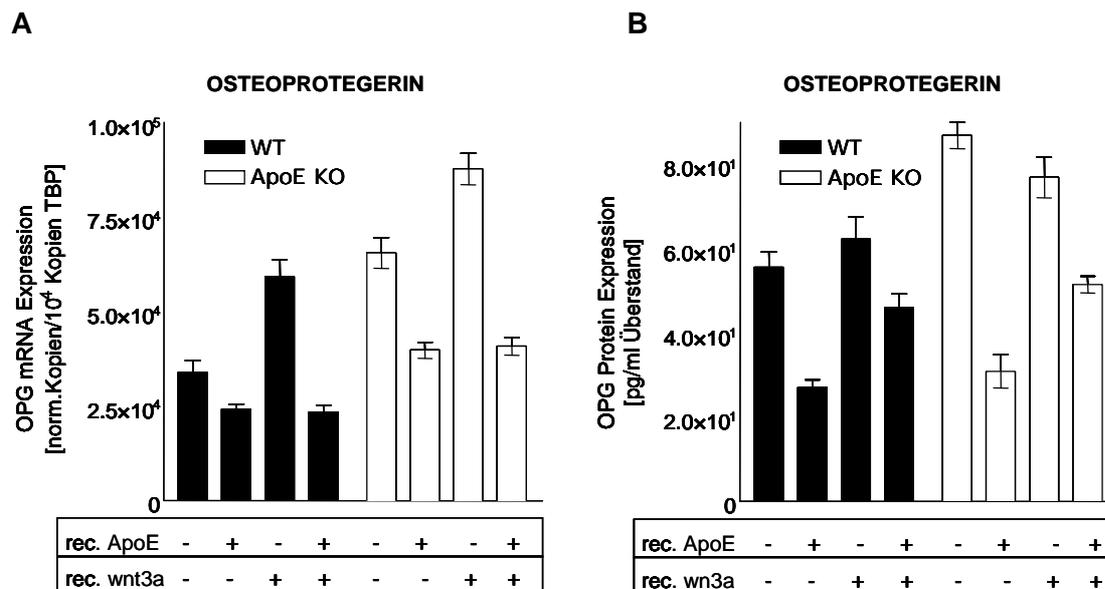


Abbildung 3.14: Osteoprotegerin-Expression in primären murinen Osteoblasten

A) mRNA-Expression

B) Proteinkonzentration in Zellkulturüberständen

Die osteogene Differenzierung der primären murinen Zellen erfolgte standardmäßig über 12 Tage durch Induktion mit β -Glycerophosphat und Ascorbat. Während der letzten 48 und 24 Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit 5 μ g rekombinarem ApoE und 50ng rekombinarem wnt3a stimuliert.

Ein Anstieg der Osteoprotegerin-Expression durch rekombinantes wnt3a ist sowohl auf mRNA Ebene sowie auf Proteinebene zu sehen. Eine Reduktion durch Induktion mit rekombinarem ApoE ist ebenfalls vorhanden. Die Konzentrationen sowie die Unterschiede nach Stimulation sind im ApoE-defizienten Zellmodell, verglichen mit dem Wildtyp unveränderter ApoE-Expression, stärker ausgeprägt.

4 Diskussion

Die Zusammenhänge zwischen dem Energiestoffwechsel, dem Lipidstoffwechsel und dem Knochenstoffwechsel gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an wissenschaftlichem Interesse. In diesem Kontext ist Apolipoprotein E ein interessantes potentiell verbindendes Element, dessen Rolle jedoch noch nicht komplett verstanden wird.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von ApoE auf die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* untersucht. Hierzu wurden immortalisierte humane mesenchymale Knochenmarksstammzellen (hMSC Tert) mit unterschiedlicher, genetisch modifizierter ApoE-Expression hinsichtlich ihres osteogenen Differenzierungsverhaltens untersucht.

Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese geprüft, dass der Einfluss von ApoE auf die osteoblastäre Differenzierung über den kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Hierzu wurden, ergänzend zu dem humanen Zellmodell, Versuche mit primären murinen ApoE-defizienten Osteoblasten verglichen mit Wildtyp Osteoblasten durchgeführt.

4.1 Inhibition der osteogenen Differenzierung durch ApoE

Es ist bekannt, dass genetische ApoE-Defizienz im Mausmodell zu einer erhöhten Knochenformationsrate führt (Schilling et al., 2005). Dies könnte durch eine verminderte Aufnahme von Lipoproteinen und damit von Vitamin K erklärbar sein. *In vitro* werden mit Vitamin K angereicherte Chylomikronen Remnants von Osteoblasten aufgenommen, wodurch eine Erhöhung des carboxylierten Osteocalcins erreicht wird (Niemeier et al., 2005). Wird diese Aufnahme reduziert, führt dies zu einem verminderten Vitamin K Gehalt und zu erhöhten Konzentrationen von untercarboxyliertem Osteocalcin. Osteocalcin-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls erhöhte Knochenformationsraten (Ducy et al., 1996). Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Menge an untercarboxyliertem Osteocalcin mit der erhöhten Knochenformationsrate ApoE-defizienter Mäuse in Zusammenhang steht. Carboxyliertes Osteocalcin besitzt im Vergleich zu nichtcarboxyliertem Osteocalcin eine erhöhte Affinität zum Hydroxylapatit und lagert sich in den Mineralisierungszonen des Osteoids ein (Hauschka, 1986; Newman et al., 2002).

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe mit primären murinen Osteoblasten deuten darauf hin, dass die erhöhte Knochenformationsrate ApoE-defizienter Mäuse durch eine Inhibition der osteogenen Differenzierung durch ApoE bedingt ist. Aufgrund dessen haben wir Anlass zur Annahme, dass ApoE auch die osteogene Differenzierung humaner MSC Tert20 Zellen *in vitro* inhibiert.

Um diese Hypothese zu prüfen und den molekularen Mechanismus weiter aufzuklären, wurden Experimente mit humanen MSC Tert Zelllinien genetisch modifizierter ApoE-Expression durchgeführt.

Sowohl durch ApoE-Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR sowie auf Zellproteinebene mittels ApoE Western Blot Analysen, ApoE Elisa und Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen konnte bestätigt werden, dass die Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4 signifikant mehr ApoE exprimieren. In der Zelllinie T20-shApoE wurde eine signifikante Reduktion der ApoE-Expression gezeigt. Die Kontrollzelllinien T20-Empty Lenti und T20-Lenti sh scrambled verhielten sich bezüglich ihrer ApoE-Konzentrationen im Vergleich zur parentalen hMSC Tert20 Zelllinie nicht maßgeblich anders und sind demzufolge als Kontrollen geeignet. Abschnitt 3.1.1 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Nachdem die verschiedenen genetisch modifizierten Expressionen von ApoE bestätigt wurden, wurde im Anschluss die Funktionalität des endogen überexprimierten Apolipoprotein E geprüft. Dieser Prüfung wurde zugrunde gelegt, dass ApoE über ApoE-Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie die zelluläre Aufnahme von Chylomikronen Remnants vermittelt (Brown and Goldstein, 1986; Beisiegel et al., 1989) Über die aufgenommene Menge an Chylomikronen Remnants können Rückschlüsse auf die Funktionalität des sekretierten Apolipoprotein E gezogen werden (Mahley and Ji, 1999). Diese Tatsache wurde in diesem Experiment genutzt, um die Funktionalität von ApoE nachzuweisen. Die graphische Darstellung der unterschiedlichen Aufnahme von ¹²⁵Iod-markierten Chylomikronen Remnants ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Die verbesserte Aufnahme von ¹²⁵Iod-markierten Chylomikronen Remnants auf über das Doppelte, im Vergleich zur Kontrollzelllinie, wurde in beiden ApoE überexprimierenden Zelllinien gemessen. Der leichte Anstieg der Aufnahme durch ApoE3 im Vergleich zur Isoform ApoE4 ist als nicht signifikant zu werten. Die Isoform ApoE3 gilt aufgrund ihrer Häufigkeit als Normaltyp. Während die Rezeptoraffinität der Isoform ApoE2 gegenüber der Isoform ApoE3 reduziert ist, ist die Rezeptoraffinität von ApoE4 nicht verändert (Weisgraber et al., 1981). Die, in gleichem Maße gesteigerte Aufnahme von ¹²⁵Iod-markierten Chylomikronen Remnants durch ApoE3 und ApoE4 spiegelt die unveränderte Rezeptoraffinität der beiden Isoformen wieder.

Dieser erste Abschnitt zur Charakterisierung der Zellen bezüglich ihrer ApoE-Expression und der Funktionalität des endogen überexprimierten ApoE stellte die Grundvoraussetzung für alle weiteren Experimente dar.

Als nächstes wurde die Fähigkeit der Zellen zur osteogenen Differenzierung überprüft. Die verwendeten immortalisierten humanen mesenchymalen Stammzellen haben ihre unveränderte Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung behalten (Simonsen, 2002). Die Zellen wurden nach einem Standardprotokoll differenziert. Der Anstieg der Expression von

Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin (Abb. 3.5) wurde von Tag 0 über Tag 6 und bis Tag 12 im Zeitverlauf gemessen. Das Potential zur osteogenen Differenzierung wurde dadurch für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen erneut belegt. Aufgrund dieser Eigenschaften, zusammen mit der Tatsache, dass die Zellen einfach und schnell zu kultivieren sind, schienen die Zellen besonders geeignet, um molekulare Mechanismen der osteoblastären Differenzierung zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu überprüfen, dass ApoE einen inhibitorischen Effekt auf die osteogene Differenzierung ausübt. Hierzu wurde das Expressionsverhalten osteogener Differenzierungsmarker, in Abhängigkeit von der endogenen ApoE-Expression, untersucht.

Betrachtet man die ApoE-Expression der parentalen hMSC Tert Zelllinie während der osteogenen Differenzierung im Zeitverlauf, fällt auf, dass die Zellen im Laufe der Differenzierung mehr ApoE exprimieren. Es ist bekannt, dass die ApoE-Expression während der adipogenen Differenzierung ebenfalls ansteigt. Während die ApoE-Expression im Laufe der osteoblastären Differenzierung um den Faktor 4 ansteigt, werden bei der adipogenen Differenzierung Anstiege auf das 100fache beobachtet. Die im Zeitverlauf ansteigende ApoE-Expression in humanen MSC Tert Zellen während der osteogenen Differenzierung ist also im Verhältnis eher als gering zu werten. Zahlreiche intrazelluläre- und extrazelluläre Signale regulieren über Transkriptionsfaktoren sowohl Adipogenese als auch Osteoblastogenese (Westendorf et al., 2004; Ross et al., 2000). Es existieren Hinweise, dass reife Osteoblasten über eine Aktivierung des wnt-Signaltransduktionweges eine entscheidende Rolle in der Zelllinienentwicklung von mesenchymalen Vorläuferzellen und damit in der frühen Adipogenese und Osteoblastogenese spielen (Zhou et al., 2008a). Inwiefern ApoE als Regulator der unterschiedlichen Differenzierungswege eine Rolle spielt ist bisher nicht bekannt.

Betrachtet man die Expression von ApoE an Tag 12 ohne Induktion zur osteogenen Differenzierung, zeigen sich auf das Doppelte erhöhte Werte, verglichen mit osteogen differenzierenden Zellen. Zellen, die vermehrt proliferieren und nicht in eine bestimmte Richtung differenzieren, exprimieren also mehr ApoE. Dennoch steigt die ApoE Konzentration im Zeitverlauf gesehen während der osteogenen Differenzierung an. Es könnte sich hierbei um einen negativen Feedback-Mechanismus handeln. ApoE wird mit ansteigender Differenzierungszeit vermehrt exprimiert und dämmt über die postulierte Inhibition die osteoblastäre Differenzierung im Zeitverlauf ein. Im Zeitverlauf lässt sich ab dem dritten Tag ein Ansteigen der Expression von ApoE beobachten. Beobachtet man die Expression osteogener Differenzierungsmarker in T20-shApoE und T20-Lenti sh scrambled, so ist im Zeitverlauf ebenfalls erst zwischen Tag 3 und Tag 6 ein Auseinanderweichen der Expressionen zu erkennen. Die ansteigende ApoE-Konzentration könnte die Inhibition der

Expression osteogener Differenzierungsmarker verursachen und die Tatsache erklären, dass sich die reduzierte endogene ApoE-Konzentration in T20-shApoE Zellen erst nach 3-6 Tagen auf die Expression der Differenzierungsmarker auswirkt. Diese Beobachtung bestärkt die Hypothese, dass ApoE die Differenzierung inhibiert.

Die Expression der unterschiedlichen Differenzierungsmarker ist charakteristisch für bestimmte Stadien der Differenzierung (Liu et al., 1994). Osteocalcin, eines der wenigen Osteoblasten-spezifischen Proteine, eignet sich besonders gut, um das Differenzierungsverhalten zu dokumentieren. Ein weiterer etablierter Marker, um osteogene Differenzierung zu untersuchen, ist die Alkalische Phosphatase, ein Protein, das in seiner knochenspezifischen Isoform ebenfalls gut als Differenzierungsmarker geeignet ist. In den genetisch modifizierten humanen Zelllinien fiel auf, dass die Expression der Alkalischen Phosphatase durch die virusvermittelte modifizierte ApoE-Expression beeinflusst wird. Dieses Phänomen beobachteten wir sowohl in Zellkulturanalysen als auch auf mRNA Ebene. Dieses veränderte Expressionsverhalten könnte auf einen virusbedingten Effekt zurückzuführen sein. Aus diesem Grund führten wir Alkalische Phosphatase Untersuchungen nur in den parentalen humanen MSC Tert20 Zellen durch. Kollagen ist maßgeblich an der organischen Knochenmatrix beteiligt und wurde ebenfalls als Differenzierungsmarker eingesetzt. Eine signifikante Steigerung mehrerer Differenzierungsmarker, wie in Abb.3.5 dargestellt, kann in humanen MSC Zellen als Nachweis der osteogenen Differenzierung gewertet werden (Owen et al., 1990).

Die vermehrte Expression osteogener Differenzierungsmarker in Zellen reduzierter ApoE Expression deuten auf gesteigerte osteogene Aktivität hin. ApoE-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls eine vermehrte Knochendichte und erhöhte Knochenformationsraten. In Daten aus Experimenten mit primären murinen Osteoblasten, die in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt wurden, jedoch noch nicht veröffentlicht sind, zeigen sich in Serumanalysen ApoE-defizienter Mäuse ebenfalls erhöhte Konzentrationen von Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase. Zudem wird eine gesteigerte Mineralisierung der extrazellulären Matrix in Osteoblasten ApoE-defizienter Mäuse beobachtet.

Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 3.7A und 3.7B wird deutlich, dass sowohl an Tag 6 als auch an Tag 12 der osteogenen Differenzierung durch einen Mangel an ApoE in T20-shApoE Zellen die Expression der Differenzierungsmarker Kollagen I α 1 und Osteocalcin über das Doppelte ansteigt. Der inhibitorische Effekt von ApoE auf die Expression osteogener Differenzierungsmarker bleibt bei Abwesenheit von ApoE aus. Durch die Überexpression an endogenem ApoE wird keine signifikante Reduktion der Expression von Kollagen I α 1 und Osteocalcin hervorgerufen. Dies könnte auf eine bereits in hohem Maße vorhandene

Hemmung durch geringe Mengen ApoE zu erklären sein. Es kann also festgehalten werden, dass ein geringer Mangel an ApoE zu einem massiven Anstieg der Differenzierungsmarker führt. Ein ApoE-Mangel stimuliert die osteogene Differenzierung. Diese Ergebnisse sind mit der Beobachtung einer gesteigerten Knochenformationsrate und daraus resultierender vermehrter Knochendichte ApoE-defizienter Mäuse gut in Einklang zu bringen.

Durch Inkubation der hMSC Tert Zellen mit sezerniertem ApoE aus den Überständen der überexprimierenden Zellen T20-hApoE3 und T20-hApoE4 konnte eine Reduktion der Differenzierungsmarkerexpression gemessen und somit ebenfalls eine Inhibition der Differenzierung durch exogenes ApoE bestätigt werden. Dieser Effekt ist durch Umsetzen der Zellen auf Lipoprotein-defizientes Medium und dem damit verbundenen Entzug von extrazellulärem ApoE in umgekehrter Weise auslösbar. Die Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen, dass durch exogenes ApoE eine Modulation der Expression von Differenzierungsmarkern in humanen Osteoblasten *in vitro* stattfindet.

4.2 ApoE-Isoform abhängige Effekte auf das Differenzierungsverhalten

Die Regulation des osteoblastären Differenzierungsverhaltens ist für das Gleichgewicht des Knochenmetabolismus von großer Bedeutung. Es gibt in der Literatur zahlreiche Studien, die den Effekt der ApoE Isoformen auf den Knochenmetabolismus untersuchen.

In einer Studie mit 284 postmenopausalen Japanerinnen wurde als erstes eine Reduktion der Knochendichte und erhöhte Osteocalcin Serumkonzentrationen bei ApoE4 Allelträgern beobachtet, die auf eine Reduktion der Osteoblastenaktivität durch ApoE4 zurückgeführt wurde (Shiraki et al., 1997). In einer Studie mit 219 Hämodialyse-Patienten wurde ein ApoE4 Genotyp mit einem erhöhten Frakturrisiko in Verbindung gebracht (Kohlmeier et al., 1998). In zahlreichen weiteren Studien, die sich in den darauf folgenden Jahren mit ähnlicher Fragestellung beschäftigten, wurden ebenfalls Assoziationen zwischen ApoE Genotypen und Knochenmetabolismus beschrieben (Cauley et al., 1999; Johnston et al., 1999; Sanada et al., 1998). In einer Studie mit 692 Hong Kong Chinesen wurde kein Zusammenhang zwischen ApoE4 und Knochenmineralisierungsdichte, jedoch zwischen ApoE2 und Knochenmineralisierungsdichte beschreiben (Wong et al., 2005). Einige neuere Studien haben keine Assoziationen zwischen ApoE Genotyp Frakturenrate oder Knochendichte beobachten können (Bagger et al., 2007; Gerdes et al., 2001; Lui et al., 2003; Macdonald et al., 2008; Sennels et al., 2003; von Muhlen et al., 2001). Weitere zeigen isolierte Veränderungen einzelner Skelettregionen. Sowohl isolierte Veränderungen des proximalen Femur, der Lendenwirbelkörper und des Calcaneus wurden beschrieben. Des Weiteren sind geschlechterabhängige Unterschiede dokumentiert. Da allerdings nur 6 von 24 Studien mit Kollektiven beider Geschlechter durchgeführt wurden, kann hier kein einheitliches Resultat

beschrieben werden. (Long et al., 2004; Villarreal and Bermudez, 2004; Zajickova et al., 2003).

Die größte Studie zu diesem Themengebiet mit 5.857 älteren Frauen und Männern (Rotterdam Studie) konnte eine Assoziation zwischen ApoE Genotyp und Knochenmineralisierung, Frakturrate oder Osteoporose nicht bestätigen (Schoofs et al., 2004). Bisher konnte kein einheitliches Resultat erreicht werden, ob die Isoformen von ApoE einen unterschiedlichen Einfluss auf den Knochenmetabolismus haben. Viele Einflussfaktoren wie Alter und Geschlecht erschweren zudem die Erforschung in klinischen Studien.

Aus diesem Grund haben *in vitro* Untersuchungen am Zellmodell durch die Schaffung möglichst einheitlicher Konditionen diesbezüglich einen großen Vorteil. Ein deutlicher inhibitorischer Effekt durch ApoE wurde anhand der Ergebnisse in Kapitel 3.2.3- 3.2.5 dieser Arbeit nachgewiesen. Die Ergebnisse bezüglich der isoformspezifischen Auswirkungen von endogenem ApoE zeigen keine signifikanten Unterschiede (Abb.3.7A und B). Die Inkubation mit sezerniertem ApoE der Überstände der Zelllinien T20-hApoE3 und T20-hApoE4 zeigt im Vergleich zu den parentalen hMSC Tert20 Zellen keine signifikant stärkere Reduktion der Expression der Differenzierungsmarker durch ApoE4 als durch ApoE3. Ein eindeutiger isoformabhängiger Effekt wurde demzufolge auch in dieser Arbeit nicht beobachtet. Eine Zelllinie mit einer Überexpression der Isoform ApoE2 stand für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht zur Verfügung. Ergänzende Versuche wären aber wichtig, da ein Einfluss von ApoE2 auf den Knochenstoffwechsel über den Lipidstoffwechsel aufgrund seiner reduzierten Rezeptoraffinität gut möglich wäre. ApoE2 ist mit 3-12% unter den ApoE Isoformen die seltenste mit der geringsten Rezeptoraffinität. ApoE2 zeigt eine verminderte Bindekapazität von Chylomikronen Remnants und Lipoproteinrezeptoren (Schneider et al., 1981). Da Vitamin K ausschließlich über Lipoproteine im Blut transportiert wird und für den Knochenmetabolismus eine entscheidende Rolle spielt, stellt eine Beeinträchtigung des Chylomikronen-Metabolismus gleichzeitig eine Beeinträchtigung des Vitamin K-Transportes dar. Somit könnte eine verminderte Carboxylierung von Osteocalcin durch eine verminderte Aufnahme von Vitamin K und damit durch ApoE2 verursacht werden. Eine Beeinflussung der Mineralisierung des Knochens durch ApoE2 über den Lipidstoffwechsel wäre demzufolge gut denkbar und ist ein wichtiger noch zu untersuchender Aspekt. Aus Zeitgründen konnte diese Hypothese im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr aufgenommen werden.

4.3 Inhibition der wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade durch ApoE

Aus der Literatur geht hervor, dass der kanonische wnt-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle zahlreicher metabolischer Vorgänge im Knochen spielt.

Über die Aktivierung der Expression des Mastergens Runx2 spielt die kanonische wnt-Signaltransduktionskaskade in mesenchymalen Stammzellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der osteoblastären Differenzierung und bei der Skelettentwicklung (Gaur et al., 2005). Auch *in vivo* wurde in Ratten nach oraler Gabe eines GSK-3 β -Inhibitors eine vermehrte Expression von Markerproteinen für die Knochenbildung sowie eine gesteigerte Knochendichte und Festigkeit festgestellt, die die Rolle der wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade für die Osteogenese beschreibt (Kulkarni et al., 2006). Wnt-Proteine sind zudem über das Osteoprotegerin/RANKL System für die Differenzierung der Osteoklasten und damit der Knochenresorption mitverantwortlich und haben somit große Bedeutung für die Knochenbilanz (Logan and Nusse, 2004). Reife Osteoblasten haben über eine Aktivierung des wnt-Signalwegs einen entscheidenden Einfluss auf die Zelllinienentwicklung von mesenchymalen Vorläuferzellen und damit in der frühen Osteoblastogenese (Zhou et al., 2008). Es gibt Schlussfolgerungen, dass wnt-Proteine sowohl bei der Regulation von Knochenhaltung und -neubildung während der Entwicklung, als auch beim Erwachsenen involviert sind (Glass et al., 2005; Krishnan et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, um zu prüfen, ob der Einfluss von ApoE auf die osteoblastäre Differenzierung über den kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Über die Regulation der wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade durch ApoE ist bisher wenig bekannt (Kim et al., 1998; Magoori et al., 2003). Isoformabhängige Unterschiede in der Inhibition des wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges wurden in undifferenzierten PC12 Zellen (Phäochromozytomzellen der Ratte) beobachtet. Obgleich alle Isoformen dazu in der Lage waren den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg zu inhibieren, ging der stärkste Effekt von ApoE4 aus (Caruso et al., 2006). Aufgrund bekannter Interaktionen mit LRP-Rezeptoren werden auch bei der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten über ApoE-Effekte auf den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg diskutiert. Hier wird vor allem ein Zusammenhang zwischen LRP6, ApoE und einer dadurch bedingten Veränderung der wnt-Signaltransduktionskaskade untersucht (De Ferrari et al., 2007).

Die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade besitzt drei charakteristische Schlüsselemente. Durch extrazelluläre wnt-Proteine wird die Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von β -catenin im Zellkern. Dieser initiale Schritt wurde durch Experimente mit wnt3a-Stimulation und anschließenden β -catenin Western Blot Analysen untersucht. β -Catenin aktiviert im Zellkern durch Verdrängung des Ko-Repressor *Groucho* die Transkriptionsfaktorfamilie Lef/TCF. Reporter-Assays zur Bestimmung der Aktivität Lef/TCF abhängiger Gene wurden durchgeführt, um diesen Schritt zu prüfen. Der letzte Schritt in der Untersuchung des

Einfluss von ApoE auf den wnt/ β -catenin Signalweg stellte die Untersuchung der Osteoprotegerin-Expression, einem Zielgen des wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges, dar. Damit wurden in dieser Arbeit alle charakteristischen Schlüsselemente untersucht, um den Einfluss von ApoE auf den Signalweg von allen Seiten zu beleuchten.

Zunächst wurde die Stimulierbarkeit der Zellen durch wnt3a bestätigt (Abb.3.10 u.3.11), da in den verschiedenen humanen MSC Tert20 Zelllinien basal kein Unterschied in der β -catenin Akkumulation festgestellt wurde.

Anhand der folgenden Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von ApoE auf die Lef/TCF Aktivität und auf die Expression von Osteoprotegerin aus Abbildung 3.11 und 3.12 wird deutlich, dass der Mangel an endogenem ApoE in den T20-shApoE Zellen zu einem signifikanten Ansteigen der Lef/TCF Aktivität führt. Die mittels quantitativer RT-PCR gemessenen Osteoprotegerin-Expressionen der hMSC Tert20 Zelllinien unterschiedlicher ApoE-Expression bestätigen durch dreifach erhöhte Werte in T20-shApoE Zellen dieses Ergebnis. β -Catenin Western Blot Analysen zeigen eine deutliche Inhibition der intrazellulären β -catenin Akkumulation nach Stimulation mit exogenem ApoE (Abb.3.13).

Im Juni 2009 wurde von Park et al. beschrieben, dass durch die Telomerase der hMSC Tert20 Zellen die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade beeinflusst wird. Die Telomerase agiert als Ko-Faktor des β -catenin-Transkriptionskomplexes. Die Transkription von Zielgenen des wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges wird durch die Telomerase moduliert (Park et al., 2009). Dieser Einfluss muss bei der Beurteilung der Ergebnisse der durchgeführten Experimente berücksichtigt werden. Da in den durchgeführten Experimenten alle Zelllinien über einen retroviralen Vektor mit humaner Telomerase (telomerase reverse transkriptase) immortalisiert wurden, und sich die Zellen nur hinsichtlich ihrer ApoE-Expression unterscheiden, können dennoch Rückschlüsse des Einflusses von ApoE auf den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg gezogen werden. Die zahlreichen Unterschiede sowohl bei der Aktivität Lef/TCF abhängiger Gene, bei der β -catenin Akkumulation sowie bei der Expression des wnt-Zielgens Osteoprotegerin geben Hinweise, dass ApoE den wnt-Signalweg inhibiert und dies als Weg der Inhibition der osteogenen Differenzierung in Frage kommt.

Ein Charakteristikum des Zellmodells der hMSC Tert Zelllinie besteht darin, dass keine komplette ApoE-Defizienz erreicht werden kann. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass bereits kleinste Mengen von ApoE enorme Auswirkungen auf die Differenzierung haben. Durch einen geringen Mangel an ApoE wurden bereits massive Steigerungen in der Expression osteogener Differenzierungsmarker beobachtet. Aus diesem Grund wurden die Versuche zur Untersuchung des wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges auch mit primären

murinen Osteoblasten aus den Calvarien drei Tage alter ApoE-defizienter Mäuse, verglichen mit genetisch unveränderten Mäusen, durchgeführt.

In der β -catenin Akkumulation der verschiedenen primären murinen Osteoblasten konnten bezüglich der ApoE-Expression bereits basal erhebliche Unterschiede gesehen werden (Abb. 3.15A). Weitere Experimente zur β -catenin-Akkumulation in murinen ApoE Wildtyp-Zellen und ApoE Knockout-Zellen demonstrieren, dass durch einen Mangel an ApoE ein Anstieg der β -catenin Akkumulation hervorgerufen wird. Durch Stimulation mit recombinantem ApoE lässt sich diese Akkumulation eindämmen (Abb.3.15B). Dadurch wird deutlich, dass sowohl exogenes als auch endogenes ApoE in primären murinen Osteoblasten den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg inhibiert.

Die Osteoprotegerin-Expression von primären murinen Osteoblasten mit ApoE Knockout im Vergleich zu primären murinen Osteoblasten unveränderter ApoE-Expression ist gesteigert. Dies macht den Einfluss von endogenem ApoE auf die Expression des wnt-abhängigen Zielgens Osteoprotegerin auch in diesem Zellmodell deutlich. Exogen zugeführtes ApoE reduziert ebenfalls die Osteoprotegerin-Expression in ApoE-Knockout- und Wildtyp-Zellen. Die Ergebnisse im murinen ApoE-Knockout Zellmodell unterstreichen die Ergebnisse des humanen Zellmodelles und geben somit einen eindeutigen Anhalt dafür, dass ApoE die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade inhibiert. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass ApoE über seine Bindung an LRP die Stimulation durch wnt-Proteine inhibiert. Es wäre ebenfalls denkbar, dass wnt-Proteine zusammen mit ApoE auf Lipoproteinen verankert sind und durch deren räumliche Nähe die Rezeptoraffinität reduziert wird. Um den genauen molekularen Mechanismus verstehen zu können und zu erforschen, an welchem Schritt der wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade ApoE genau angreift, bedarf es weiterer Untersuchungen. Vergleichende Versuche mit etablierten Stimulatoren wie zum Beispiel Dickkopf1 (DKK1) mit bekanntem molekularem Mechanismus wären hier denkbar. Die Dickkopf-Familie besteht aus 4 Mitgliedern DKK1-4 mit je 206-366 Aminosäuren. DKK1 ist als Inhibitor des kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweges anerkannt. Es bindet an LRP6 und inhibiert so die Aktivierung des Signalwegs (Zorn, 2001). Zudem wären Immunfluoreszenzfärbungen hilfreich, um Aufschluss über Lokation und Translokation von beteiligten Proteinen zu erhalten.

Eine Modulation der kanonischen wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade durch ApoE wurde sowohl in humanen mesenchymalen Stammzelllinien (hMSC Tert20) sowie in primären murinen Osteoblasten gesehen. Dadurch wird die Hypothese bestätigt, dass die Inhibition der osteogenen Differenzierung durch ApoE, zumindest partiell, über den wnt/ β -catenin Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Abschließend ist festzuhalten, dass von Apolipoprotein E (ApoE) ein inhibitorischer Effekt auf die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC Tert20) *in vitro* ausgeht. Die Hypothese, dass dieser Effekt ApoE isoformabhängig ist, wurde nicht bestätigt. Es wurde bestätigt, dass der inhibitorische Effekt von ApoE auf die osteogene Differenzierung zumindest partiell durch die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade vermittelt wird.

5 Zusammenfassung

Im Mausmodell führt genetische ApoE Defizienz aufgrund einer erhöhten Knochenformation zu einer erhöhten Knochenmasse. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus dieses Phänotyps wird bisher nicht verstanden. Mit dieser Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, dass ApoE die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten direkt inhibiert. Ebenfalls wird postuliert, dass eine unterschiedliche inhibitorische Potenz zwischen den einzelnen ApoE Isoformen (ApoE2, E3, E4) besteht.

Humane mesenchymale Stammzellen mit genetisch modifizierter Überexpression der ApoE Isoformen E3 und E4, sowie mit shRNA vermittelter verminderter ApoE Expression, wurden als Zellmodell verwendet, um den Effekt endogener Unterschiede der ApoE Expression auf das Differenzierungsverhalten zu analysieren. Anhand des shRNA ApoE Knockdown wurde deutlich, dass eine verminderte endogene ApoE Expression zu einer Steigerung der Osteoblastenaktivität führt. Experimente mit exogenem ApoE ergaben hingegen einen inhibitorischen Effekt auf osteogene Differenzierungsmarker und Aktivitätsmarker. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass ApoE einen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten in vitro ausüben kann, wobei die Inhibition durch ApoE4 tendenziell stärker ausfiel als die durch ApoE3. Hinsichtlich der endogenen ApoE Überexpression ergaben sich keine isoform-spezifischen Unterschiede.

Ergänzend zum humanen Zellmodell wurden murine Osteoblasten mit genetisch bedingter ApoE Defizienz analysiert.

Sowohl im humanen als auch im murinen Zellsystem wurde der Einfluss von ApoE auf die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade untersucht. Die zelluläre β -catenin Akkumulation wurde durch ApoE reduziert und durch ApoE Defizienz gesteigert. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors LEF/TCF sowie die Transkription LEF/TCF abhängiger Gene wurden ebenfalls durch ApoE reduziert und durch ApoE Defizienz gesteigert.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ApoE einen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung und Funktion humaner und muriner Osteoblasten ausübt. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition zumindest partiell über die wnt/ β -catenin Signaltransduktionskaskade vermittelt wird. Dadurch kann der Knochenphänotyp ApoE defizienter Mäuse jetzt auf molekularer Ebene erklärt werden. Bezüglich der Frage, ob diesbezüglich Unterschiede zwischen den ApoE Isoformen bestehen, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

6 Literaturverzeichnis

Bagger, Y.Z., Rasmussen, H.B., Alexandersen, P., Werge, T., Christiansen, C., and Tanko, L.B. (2007). Links between cardiovascular disease and osteoporosis in postmenopausal women: serum lipids or atherosclerosis per se? *Osteoporos. Int.* 18, 505-512.

Beisiegel, U., Weber, W., and Bengtsson-Olivecrona, G. (1991). Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8342-8346.

Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., and Stanley, K.K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341, 162-164.

Bodine, P.V. and Komm, B.S. (2006). Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 7, 33-39.

Born Stephan. Herstellung stabiler transgener Zelllinien mittels lentiviralem Gentransfer für Untersuchungen im humanen Lipoproteinstoffwechsel. Diplomarbeit. 2008.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.* 346, 1513-1521.

Breslow, J.L., Zannis, V.I., SanGiacomo, T.R., Third, J.L., Tracy, T., and Glueck, C.J. (1982). Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2. *J. Lipid Res.* 23, 1224-1235.

Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.

Brown, M.S., Herz, J., and Goldstein, J.L. (1997). LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature* 388, 629-630.

Caruso, A., Motolese, M., Iacovelli, L., Caraci, F., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G.C., Gaviraghi, G., and Caricasole, A. (2006). Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells. *J. Neurochem.* 98, 364-371.

Cauley, J.A., Zmuda, J.M., Yaffe, K., Kuller, L.H., Ferrell, R.E., Wisniewski, S.R., and Cummings, S.R. (1999). Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk--The Study of Osteoporotic Fractures. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1175-1181.

Chen, Y., Hu, Y., Lu, K., Flannery, J.G., and Ma, J.X. (2007). Very low density lipoprotein receptor, a negative regulator of the wnt signaling pathway and choroidal neovascularization. *J. Biol. Chem.* 282, 34420-34428.

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

De Ferrari, G.V., Papassotiropoulos, A., Biechele, T., Wavrant De-Vrieze, F., Avila, M.E., Major, M.B., Myers, A., Saez, K., Henriquez, J.P., Zhao, A., Wollmer, M.A., Nitsch, R.M., Hock, C., Morris, C.M., Hardy, J., and Moon, R.T. (2007). Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 9434-9439.

- Ducy,P., Amling,M., Takeda,S., Priemel,M., Schilling,A.F., Beil,F.T., Shen,J., Vinson,C., Rueger,J.M., and Karsenty,G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100, 197-207.
- Ducy,P., Desbois,C., Boyce,B., Pinero,G., Story,B., Dunstan,C., Smith,E., Bonadio,J., Goldstein,S., Gundberg,C., Bradley,A., and Karsenty,G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448-452.
- Ellies,D.L., Viviano,B., McCarthy,J., Rey,J.P., Itasaki,N., Saunders,S., and Krumlauf,R. (2006). Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J. Bone Miner. Res.* 21, 1738-1749.
- Gaur,T., Lengner,C.J., Hovhannisyan,H., Bhat,R.A., Bodine,P.V., Komm,B.S., Javed,A., van Wijnen,A.J., Stein,J.L., Stein,G.S., and Lian,J.B. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* 280, 33132-33140.
- Gerdes,L.U., Vestergaard,P., Hermann,A.P., and Mosekilde,L. (2001). Regional and hormone-dependent effects of apolipoprotein E genotype on changes in bone mineral in perimenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1906-1916.
- Glass,D.A., Bialek,P., Ahn,J.D., Starbuck,M., Patel,M.S., Clevers,H., Taketo,M.M., Long,F., McMahon,A.P., Lang,R.A., and Karsenty,G. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell* 8, 751-764.
- Gong,Y., Slee,R.B., Fukai,N., Rawadi,G., Roman-Roman,S., Reginato,A.M., Wang,H., Cundy,T., Glorieux,F.H., Lev,D., Zacharin,M., Oexle,K., Marcelino,J., Suwairi,W., Heeger,S., Sabatakos,G., Apte,S., Adkins,W.N., Allgrove,J., Arslan-Kirchner,M., Batch,J.A., Beighton,P., Black,G.C., Boles,R.G., Boon,L.M., Borrone,C., Brunner,H.G., Carle,G.F., Dallapiccola,B., De Paepe,A., Floege,B., Halfhide,M.L., Hall,B., Hennekam,R.C., Hirose,T., Jans,A., Juppner,H., Kim,C.A., Keppler-Noreuil,K., Kohlschuetter,A., LaCombe,D., Lambert,M., Lemyre,E., Letteboer,T., Peltonen,L., Ramesar,R.S., Romanengo,M., Somer,H., Steichen-Gersdorf,E., Steinmann,B., Sullivan,B., Superti-Furga,A., Swoboda,W., van den Boogaard,M.J., Van Hul,W., Vikkula,M., Votruba,M., Zabel,B., Garcia,T., Baron,R., Olsen,B.R., and Warman,M.L. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-523.
- Hatters,D.M., Peters-Libeu,C.A., and Weisgraber,K.H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* 31, 445-454.
- Hauschka,P.V. (1986). Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca²⁺-binding protein of bone matrix. *Haemostasis* 16, 258-272.
- He,X., Semenov,M., Tamai,K., and Zeng,X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677.
- Heeren,J., Beisiegel,U., and Grewal,T. (2006). Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 442-448.
- Heeren,J., Grewal,T., Jackle,S., and Beisiegel,U. (2001). Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 42333-42338.
- Heeren,J., Grewal,T., Laatsch,A., Rottke,D., Rinninger,F., Enrich,C., and Beisiegel,U. (2003). Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J. Biol. Chem.* 278, 14370-14378.

- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K.K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* *7*, 4119-4127.
- Holmen, S.L., Giambenedi, T.A., Zylstra, C.R., Buckner-Berghuis, B.D., Resau, J.H., Hess, J.F., Glatt, V., Bouxsein, M.L., Ai, M., Warman, M.L., and Williams, B.O. (2004). Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both *Lrp5* and *Lrp6*. *J. Bone Miner. Res.* *19*, 2033-2040.
- Ikeya, M. and Takada, S. (2001). *Wnt-3a* is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech. Dev.* *103*, 27-33.
- Jofre-Monseny, L., Minihane, A.M., and Rimbach, G. (2008). Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol. Nutr. Food Res.* *52*, 131-145.
- Johnston, J.M., Cauley, J.A., and Ganguli, M. (1999). APOE 4 and hip fracture risk in a community-based study of older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* *47*, 1342-1345.
- Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B.H., Glass, D.A., Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.H., Brayton, C.F., Lang, R.A., Karsenty, G., and Chan, L. (2002). *Cbfa1*-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a *Wnt* coreceptor. *J. Cell Biol.* *157*, 303-314.
- Kim, D.H., Iijima, H., Goto, K., Sakai, J., Ishii, H., Kim, H.J., Suzuki, H., Kondo, H., Saeki, S., and Yamamoto, T. (1996). Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J. Biol. Chem.* *271*, 8373-8380.
- Kim, D.H., Inagaki, Y., Suzuki, T., Ioka, R.X., Yoshioka, S.Z., Magoori, K., Kang, M.J., Cho, Y., Nakano, A.Z., Liu, Q., Fujino, T., Suzuki, H., Sasano, H., and Yamamoto, T.T. (1998). A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E. *J. Biochem.* *124*, 1072-1076.
- Kohlmeier, M., Saupe, J., Schaefer, K., and Asmus, G. (1998). Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif. Tissue Int.* *62*, 278-281.
- Koshihara, Y., Hoshi, K., Okawara, R., Ishibashi, H., and Yamamoto, S. (2003). Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J. Endocrinol.* *176*, 339-348.
- Krishnan, V., Bryant, H.U., and Macdougald, O.A. (2006). Regulation of bone mass by *Wnt* signaling. *J. Clin. Invest.* *116*, 1202-1209.
- Kubota, T., Michigami, T., Sakaguchi, N., Kokubu, C., Suzuki, A., Namba, N., Sakai, N., Nakajima, S., Imai, K., and Ozono, K. (2008). *Lrp6* hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with *Mesd*. *J. Bone Miner. Res.* *23*, 1661-1671.
- Kulkarni, N.H., Onyia, J.E., Zeng, Q., Tian, X., Liu, M., Halladay, D.L., Frolik, C.A., Engler, T., Wei, T., Kriauciunas, A., Martin, T.J., Sato, M., Bryant, H.U., and Ma, Y.L. (2006). Orally bioavailable GSK-3 α /beta dual inhibitor increases markers of cellular differentiation in vitro and bone mass in vivo. *J. Bone Miner. Res.* *21*, 910-920.

- Lamon-Fava, S., Sadowski, J.A., Davidson, K.W., O'Brien, M.E., McNamara, J.R., and Schaefer, E.J. (1998). Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* *67*, 1226-1231.
- Lewis, G.F. and Rader, D.J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* *96*, 1221-1232.
- Little, R.D., Carulli, J.P., Del Mastro, R.G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S.P., Swain, P.M., Zhao, S.C., Eustace, B., Lappe, M.M., Spitzer, L., Zweier, S., Braunschweiger, K., Benchekroun, Y., Hu, X., Adair, R., Chee, L., FitzGerald, M.G., Tulig, C., Caruso, A., Tzellas, N., Bawa, A., Franklin, B., McGuire, S., Nogues, X., Gong, G., Allen, K.M., Anisowicz, A., Morales, A.J., Lomedico, P.T., Recker, S.M., Van Eerdewegh, P., Recker, R.R., and Johnson, M.L. (2002). A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 11-19.
- Liu, F., Malaval, L., Gupta, A.K., and Aubin, J.E. (1994). Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev. Biol.* *166*, 220-234.
- Logan, C.Y. and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781-810.
- Long, J.R., Liu, P.Y., Liu, Y.J., Lu, Y., Shen, H., Zhao, L.J., Xiong, D.H., and Deng, H.W. (2004). APOE haplotypes influence bone mineral density in Caucasian males but not females. *Calcif. Tissue Int.* *75*, 299-304.
- Lui, L.Y., Stone, K., Cauley, J.A., Hillier, T., and Yaffe, K. (2003). Bone loss predicts subsequent cognitive decline in older women: the study of osteoporotic fractures. *J. Am. Geriatr. Soc.* *51*, 38-43.
- Macdonald, H.M., McGuigan, F.E., Lanham-New, S.A., Fraser, W.D., Ralston, S.H., and Reid, D.M. (2008). Vitamin K1 intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: no evidence of gene-nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms. *Am. J. Clin. Nutr.* *87*, 1513-1520.
- Magoori, K., Kang, M.J., Ito, M.R., Kakuuchi, H., Ioka, R.X., Kamataki, A., Kim, D.H., Asaba, H., Iwasaki, S., Takei, Y.A., Sasaki, M., Usui, S., Okazaki, M., Takahashi, S., Ono, M., Nose, M., Sakai, J., Fujino, T., and Yamamoto, T.T. (2003a). Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* *278*, 11331-11336.
- Magoori, K., Kang, M.J., Ito, M.R., Kakuuchi, H., Ioka, R.X., Kamataki, A., Kim, D.H., Asaba, H., Iwasaki, S., Takei, Y.A., Sasaki, M., Usui, S., Okazaki, M., Takahashi, S., Ono, M., Nose, M., Sakai, J., Fujino, T., and Yamamoto, T.T. (2003b). Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* *278*, 11331-11336.
- Mahley, R.W. and Ji, Z.S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* *40*, 1-16.
- Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome Biol.* *3*, REVIEWS3001.
- Newman, P., Bonello, F., Wierzbicki, A.S., Lumb, P., Savidge, G.F., and Shearer, M.J. (2002). The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like

cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.* 17, 426-433.

Niemeier,A., Kassem,M., Toedter,K., Wendt,D., Ruether,W., Beisiegel,U., and Heeren,J. (2005). 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.

Niemeier,A., Niedzielska,D., Secer,R., Schilling,A., Merkel,M., Enrich,C., Rensen,P.C., and Heeren,J. (2008). Uptake of postprandial lipoproteins into bone in vivo: impact on osteoblast function. *Bone* 43, 230-237.

Owen,T.A., Aronow,M., Shalhoub,V., Barone,L.M., Wilming,L., Tassinari,M.S., Kennedy,M.B., Pockwinse,S., Lian,J.B., and Stein,G.S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell Physiol* 143, 420-430.

Park,J.I., Venteicher,A.S., Hong,J.Y., Choi,J., Jun,S., Shkreli,M., Chang,W., Meng,Z., Cheung,P., Ji,H., McLaughlin,M., Veenstra,T.D., Nusse,R., McCrea,P.D., and Artandi,S.E. (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66-72.

Rawadi,G. and Roman-Roman,S. (2005). Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 9, 1063-1077.

Reichel,H., Koeffler,H.P., and Norman,A.W. (1989). The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 320, 980-991.

Riddell,D.R., Graham,A., and Owen,J.S. (1997). Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J. Biol. Chem.* 272, 89-95.

Ross,S.E., Hemati,N., Longo,K.A., Bennett,C.N., Lucas,P.C., Erickson,R.L., and Macdougald,O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.

Saito,A., Pietromonaco,S., Loo,A.K., and Farquhar,M.G. (1994). Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 9725-9729.

Sanada,M., Nakagawa,H., Kodama,I., Sakasita,T., and Ohama,K. (1998). Apolipoprotein E phenotype associations with plasma lipoproteins and bone mass in postmenopausal women. *Climacteric.* 1, 188-195.

Saunders,A.M., Trowers,M.K., Shimkets,R.A., Blakemore,S., Crowther,D.J., Mansfield,T.A., Wallace,D.M., Strittmatter,W.J., and Roses,A.D. (2000). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease: pharmacogenomic target selection. *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 85-94.

Schilling,A.F., Schinke,T., Munch,C., Gebauer,M., Niemeier,A., Priemel,M., Streichert,T., Rueger,J.M., and Amling,M. (2005). Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.* 20, 274-282.

Schneider,W.J., Kovanen,P.T., Brown,M.S., Goldstein,J.L., Utermann,G., Weber,W., Havel,R.J., Kotite,L., Kane,J.P., Innerarity,T.L., and Mahley,R.W. (1981). Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J. Clin. Invest* 68, 1075-1085.

- Schoofs, M.W., van der, K.M., Hofman, A., van Duijn, C.M., Stricker, B.H., Pols, H.A., and Uitterlinden, A.G. (2004). ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam study. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1490-1496.
- Sennels, H.P., Sand, J.C., Madsen, B., Lauritzen, J.B., Fenger, M., and Jorgensen, H.L. (2003). 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.
- Shiraki, M., Shiraki, Y., Aoki, C., Hosoi, T., Inoue, S., Kaneki, M., and Ouchi, Y. (1997). Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1438-1445.
- Simonsen, J.L.e.al. (2002). Telomerase Expression extends the priliverative life-span and maintains the osteogenetoc potencial of human bone marrow stromal cells. *Nature Biotechnol.* 20, 592-596.
- Sun, Y., Yang, X., Li, F., and Dou, Z. (2008). [Study on differentiation of embryonic stem cells into osteoblast in vitro inducing by 1,25(OH)2VD3]. *Zhongguo Xiu. Fu Chong. Jian. Wai Ke. Za Zhi.* 22, 1117-1120.
- Takahashi, S., Kawarabayasi, Y., Nakai, T., Sakai, J., and Yamamoto, T. (1992). 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.
- ten Dijke, P., Krause, C., de Gorter, D.J., Lowik, C.W., and van Bezooijen, R.L. (2008). Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90 *Suppl* 1, 31-35.
- Utermann, G., Hees, M., and Steinmetz, A. (1977). Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* 269, 604-607.
- Villarreal, E. and Bermudez, A. (2004). [Polymorphisms of APO-E in Colombian women with osteoporosis: correlation with clinical and social risk variables]. *Biomedica.* 24, 50-55.
- von Muhlen, D.G., Barrett-Connor, E., Schneider, D.L., Morin, P.A., and Parry, P. (2001). Osteoporosis and apolipoprotein E genotype in older adults: the Rancho Bernardo study. *Osteoporos. Int.* 12, 332-335.
- Weisgraber, K.H., Rall, S.C., Jr., and Mahley, R.W. (1981). Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J. Biol. Chem.* 256, 9077-9083.
- Westendorf, J.J., Kahler, R.A., and Schroeder, T.M. (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341, 19-39.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., III, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- Wong, S.Y., Lau, E.M., Li, M., Chung, T., Sham, A., and Woo, J. (2005). The prevalence of Apo E4 genotype and its relationship to bone mineral density in Hong Kong Chinese. *J. Bone Miner. Metab* 23, 261-265.

- Yadav,V.K., Ryu,J.H., Suda,N., Tanaka,K.F., Gingrich,J.A., Schutz,G., Glorieux,F.H., Chiang,C.Y., Zajac,J.D., Insogna,K.L., Mann,J.J., Hen,R., Ducey,P., and Karsenty,G. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 135, 825-837.
- Zajickova,K., Zofkova,I., Hill,M., Horinek,A., and Novakova,A. (2003). Apolipoprotein E 4 allele is associated with low bone density in postmenopausal women. *J. Endocrinol. Invest* 26, 312-315.
- Zannis,V.I., Kardassis,D., Ogami,K., Hadzopoulou-Cladaras,M., and Cladaras,C. (1991). Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 285, 1-23.
- Zhang,R., Ducey,P., and Karsenty,G. (1997). 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits Osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism. *J. Biol. Chem.* 272, 110-116.
- Zhang,S.H., Reddick,R.L., Piedrahita,J.A., and Maeda,N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468-471.
- Zhou,H., Mak,W., Zheng,Y., Dunstan,C.R., and Seibel,M.J. (2008b). Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 1936-1945.
- Zhou,H., Mak,W., Zheng,Y., Dunstan,C.R., and Seibel,M.J. (2008a). Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 1936-1945.
- Zilberberg,A., Yaniv,A., and Gazit,A. (2004). 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.
- Zorn,A.M. (2001). Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr. Biol.* 11, R592-R595.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
alpha-MEM	alpha minimum essential Medium
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous polyposis coli
Apo	Apolipoprotein
Asc.	Ascorbat
β-Glyc.	β-Glycerophosphat
BSA	bovine serum albumin
BSP	bone sialo protein
BGLAP/BGP	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein
bzw./resp.	beziehungsweise/respektive
Ca	Calcium
ca.	circa
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CM	conditioned medium
CM wnt3a	conditioned medium wnt3a
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col1a1	Kollagen 1 alpha1
CR	Chylomikron Remnants
cTGF	connective tissue growth factor
Cy	Cyanin-Farbstoff
d	dies (lat.) = Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol
ddH ₂ O	doppeldest. Wasser
d.h.	das heißt
DKK	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
D-PBS	Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline
DPEC-H ₂ O	mit Diethyldicarbonat aufgereinigtes Wasser
Dsh	Dishevelled
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elisa	Enzyme-linked immuno Sorbent Assay
GFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
FBS	fetal bovine serum (fötales Kälberserum)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Fz	Frizzled
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GSK3β	Glycogen synthetase Kinase 3β
GZP	Gesamtzellprotein
h	hora (lat.) = Stunde
HDL	high density lipoproteins
hMSC	human mesenchymal stem cell (humane mesenchymalen Stammzellen)
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
incl.	inklusive
ind.	Induzierte
¹²⁵ I	Radiolod

kBr	Kaliumbromid
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
l	Liter
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
LDLR	LDL-Rezeptor
Lef	lymphoid enhancer binding factor
LiCl	Lithium Chlorid
LP	Lipoprotein
LPDS	lipoproteindefizientes Serum
LRP	LDL receptor-related protein
M	Molarität (Stoffmengenkonzentration mol/L)
MEK=MAP	mitogen-activated protein kinase
mA	Milliampere
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
Na	Natrium
OB	Osteoblasten
OCN	Osteocalcin
OK	Osteoklasten
OPN	Osteopontin
OPPG	osteoporosis-pseudoglioma syndrome
OPG	Osteoprotegerin
o.g.	oben genannt
Osf2	Osteoblast specific factor 2
OZ	Osteozyten
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PBS-T	PBS-Tween-Puffer
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pcv	packed cell volumen
PFA	Paraformaldehyd
PGS	PBS, Glycin, Saponin
PGST	PBS, Glycin, Saponin, Tween
pH	pondus Hydrogenii (Wasserstoffpotential)
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKA	Protein Kinase A
pmOB	primäre murine Osteoblasten
pnv	packed nuclear volumen
P/S	PenStrep, Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	quantitative real time PCR
rec.	recombinant
RANK	rezeptor activator of NF kappaB
RANKL	receptor activator of NF- kappaB Ligand
RAP	receptor-associated protein
RB-Puffer	Resuspensions Puffer
RIPA-Puffer	radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Runx2	Runt-related homebox gene 2
S.	Seite
sec.	Sekunde

SFRPs	Soluble Frizzle-related proteins
shRNA	smallhairpin RNA
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sog.	Sogenannte
Std. Abw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBP	TATA-box binding protein/house keeping gene
Tcf	T-cell factor
TERT	durch stabile Telomeraseexpression immortalisierte hMSC
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline-Tween
TG	Triglycerid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRL	Triglycerid rich Lipoprotein
U	Enzymaktivitätseinheit
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
Vit.	Vitamin
VLDL	very-low density lipoproteins
VLDLR	VLDL-Rezeptor
vol	Volumenanteile
WIF1	wnt-inhibitory factor 1
wnt	wnt-Proteine
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Curriculum Vitae

Name: Götz, Annette
Adresse: Heußweg 41a, 20255 Hamburg
Geburtsdatum: 12.12.1980
Geburtsort: Bamberg
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1987 - 1991 Grundschule Wildensorg/ Domschule
1991 - 2001 Franz- Ludwig- Gymnasium Bamberg
2001: Allgemeine Hochschulreife

Studium an der Medizinischen Hochschule Hannover

2001 - 2008 Studium der Humanmedizin
09/2003 1. Abschnitt Ärztliche Prüfung
2006-2007 Praktisches Jahr
07/2008 2. Abschnitt Ärztliche Prüfung

Praktika:

03/2002: *Pflegepraktikum* «Klinikum Bamberg»
09/2002: *Pflegepraktikum* «Klinikum Schellerer», Bamberg
04/2004: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde «Praxis Dr. Götz», Bamberg
09/2004: Neurologie/ Akupunktur China-Japan Friendship Hospital, Beijing
04/2005: Anästhesie «Klinikum Nürnberg»
04/2006: Mund- Kiefer-Gesichtschirurgie Praxis «Dr.Huberth», Bamberg
08–12/2006: Gynäkologie «Klinikum Uelzen»
12/2006–03/2007: Innere Medizin «Nordstadt Krankenhaus», Hannover
04/2007–07/2007: Chirurgie «Spitalzentrum Oberwallis», Visp/Brig (Schweiz)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich der Leiterin des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf, Frau Direktorin Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Möglichkeit der Promotion am Institut herzlich danken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. med. Andreas Niemeier für die Überlassung des Dissertationsthemas und die freundlichen, geduldigen und beratenden Gespräche.

Für die unentwegt geduldige Unterstützung bei der Arbeit im Labor und der experimentellen Durchführung der Versuche möchte ich vor allem Herrn Walter Tauscher, Frau Birgit Henkel, Frau Sandra Ehret, Frau Laura Ochs und Frau Dorothee Lasrich danken. Ein weiteres Dankeschön geht nach Dänemark an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kassem für die nette Zusammenarbeit.

Herzlicher Dank richtet sich auch an Herrn PD Dr. Jörg Heeren sowie an alle anderen Mitarbeiter/innen der Abteilung, die mir bei Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zuletzt und ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Freund Ingo Raab, meinen Geschwistern und meinen Eltern für Ihr Vertrauen, Ihre Anteilnahme, Ihre Unterstützung und dass ich mich in jeglicher Hinsicht auf sie verlassen kann!

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6

Ich erkläre, dass ich die am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Bedeutung von Apolipoprotein E für die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro*

im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf unter der Betreuung von Dr. med Andreas Niemeier mit der Unterstützung von Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hamburg, den 11.11.2009

(Annette Götz)