

# **Analyse der tumorinduzierten Osteolyse in riesenzellhaltigen Knochentumoren des Menschen (Homo sapiens)**

vorgelegt von

**Manuela Wüiling**

aus Gütersloh

**Dissertation**

zu Erlangung des Doktorgrades

im Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

Hamburg 2002

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. med. G. Delling

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Prof. Dr. L. Renwranz

Tag der Disputation: 26.04.2002

Hamburg, den 12. April 2002

Prof. Dr. U. Wienand  
Dekan

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I-III
<b>A. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>B. Einleitung</b> .....	3
<b>B.1. Aufbau des menschlichen Knochens</b> .....	3
B.1.1. Struktureller und zellulärer Aufbau .....	3
B.1.2. Osteoblasten .....	3
B.1.3. Osteoklasten .....	4
B.1.4. Interaktion der Zellarten .....	4
<b>B.2. Klassifizierung von Knochentumoren</b> .....	5
B.2.1. osteoblastische Knochentumoren .....	5
B.2.2. osteolytische Knochentumoren .....	5
<b>B.3. Der Riesenzelltumor des Knochens (RZT)</b> .....	6
B.3.1. Klinische Daten .....	6
B.3.2. Morphologische und histologische Charakteristika .....	7
B.3.3. Histogenese des Riesenzelltumors .....	8
<b>B.4. Merkmale der mesenchymalen Stammzellen (MSC)</b> .....	10
B.4.1. Vorkommen und Differenzierung der MSC .....	10
B.4.2. Charakteristische Markerexpression der MSC .....	12
<b>B.5. Ziele der Arbeit</b> .....	14
<b>C. Material</b> .....	15
<b>C.1. Bezugsquellen der Geräte</b> .....	15
<b>C.2. Bezugsquellen der Chemikalien</b> .....	16
<b>C.3. Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien</b> .....	17
<b>C.4. verwendete Oligonukleotide</b> .....	17
<b>C.5. klonierte Plasmidvektoren</b> .....	19
<b>C.6. verwendete Bakterienstämme</b> .....	20
<b>C.7. verwendete Antikörper</b> .....	20
C.7.1. primäre Antikörper .....	20
C.7.2. sekundäre Antikörper .....	22
<b>C.8. Restriktionsenzyme</b> .....	22
<b>C.9. Bezugsquellen der Zelllinien</b> .....	22
<b>C.10. Daten der untersuchten Riesenzelltumoren</b> .....	23

---

<b>D. Methoden</b> .....	25
<b>D.1. Kultivierung und Stimulierung der Riesenzelltumoren</b> .....	25
D.1.1. Präparation des Tumorgewebes .....	25
D.1.2. Kryokonservierung der RZT-Stromazellen.....	26
D.1.3. Osteoblastendifferenzierung der RZT-Stromazellen .....	26
D.1.4. Adipozytendifferenzierung der RZT-Stromazellen.....	27
D.1.5. Chondroblastendifferenzierung der RZT-Stromazellen.....	28
D.1.6. Aufkonzentrierung des konditionierten RZT-Kulturmedium.....	29
D.1.7. Boyden-Chamber Assay mit Huvec.....	29
<b>D.2. Chemische und immunologische Färbungen der Tumorzellen</b> .....	31
D.2.1. APAAP-Methode zur Immunzytochemie und Immunhistologie .....	31
D.2.2. Enzymnachweis der alkalischen Phosphatase.....	33
D.2.3. Enzymnachweis der tartrat-resistenten sauren Phosphatase.....	33
D.2.4. von Kossa Färbung der mineralisierten Matrix.....	34
D.2.5. Färbung von Lipidvakuolen mit Scharlachrot.....	35
D.2.6. Safranin O-Färbung der Proteoglykane .....	35
D.2.7. Kernfärbung mit Hämalaun .....	36
D.2.8. Immunfluoreszenz .....	36
<b>D.3. Isolierung und Nachweis von mRNA</b> .....	38
D.3.1. RNA-Isolierung mit Trizol .....	38
D.3.2. Gelelektrophorese zur Auftrennung von Gesamt-RNA .....	39
D.3.3. Reverse Transkription und PCR mit dem Titan OneStep RT-PCR Kit.....	40
D.3.4. Atlas human Cancer 1.2 cDNA Arrays .....	40
<b>D.4. Isolierung und Nachweis von DNA</b> .....	44
D.4.1. cDNA Synthese.....	44
D.4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion mit dem Taq PCR Core Kit .....	44
D.4.3. Agarose-Gelelektrophorese .....	45
D.4.4. Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	46
D.4.5. Aufreinigung der PCR-Produkte .....	46
D.4.6. Transformation von E.coli .....	47
D.4.7. Klonanalyse mit dem Qiaprep Spin Mini Kit.....	48
D.4.8. Hydrolyse der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	49
D.4.9. Plamidisolierung mit Qiagen Maxi-Preps.....	49
D.4.10. Cycle-Sequencing der transformierten DNA-Fragmente .....	50

D.4.11. Real-Time PCR.....	51
<b>E. Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
<b>E.1. Identifizierung der neoplastischen Zellen des Riesenzelltumors.....</b>	<b>53</b>
E.1.1. Histologische und funktionelle Charakterisierung der Zelltypen des Riesenzelltumors in vitro .....	53
E.1.2. Immunzytologischer Nachweis von Differenzierungsmarkern.....	54
E.1.3. Doppelmarkierung der RZT-Stromazellen mit Immunfluoreszenz.....	55
E.1.4. Verifizierung der Markerexpression mittels mRNA-Expression .....	55
E.1.5. In vivo Nachweis der Differenzierungsmarker an Gefrierschnitten.....	56
<b>E.2. Nachweis des Differenzierungspotentials der RZT-Stromazellen .....</b>	<b>61</b>
E.2.1. In vitro Differenzierung zu Osteoblasten.....	61
E.2.2. In vitro Differenzierung zu Adipozyten.....	61
E.2.3. In vitro Differenzierung zu Chondroblasten.....	61
E.2.4. Unterscheidung von RZT-Stromazellen und die Hämatopoese unterstützenden Zellen anhand ihrer Zytokinexpression.....	63
<b>E.3. Analyse der differentiellen Genexpression des RZT-Stromazellen.....</b>	<b>65</b>
E.3.1. Vergleich der mRNA Expression von RZTSC mit MSC mittels cDNA-Arrays .....	65
E.3.2. Verifizierung des Expressionsmusters mit Real-Time PCR.....	70
<b>E.4. Einfluß der RZT-Stromazellen auf die Tumorangiogenese.....</b>	<b>76</b>
E.4.1. Expression der mRNA angiogenetischer Faktoren.....	76
E.4.2. Induktion der Migration von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen durch konditioniertes Medium des Riesenzelltumors .....	79
<b>F. Diskussion.....</b>	<b>81</b>
<b>G. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>H. Anhang.....</b>	<b>.....</b>
H.1. Plasmidkarte des pCR2.1 Klonierungsvektor .....	.....
H.2. Plasmidkarte des pCRII Klonierungsvektor .....	.....
H.3. Ergebnisse der Immunzytologie und Immunhistologie der Riesenzell-tumoren und Kontrollzellen .....	.....
<b>I. Abkürzungen.....</b>	<b>.....</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>.....</b>
<b>Erklärungen.....</b>	<b>.....</b>

## **A. Zusammenfassung**

Der Riesenzelltumor (RZT) des menschlichen Knochens ist eine lokal aggressive Neoplasie, die eine massive Lyse der Knochenmatrix hervorruft. Im Tumorgewebe lassen sich drei verschiedene Zelltypen unterscheiden. Die mehrkernigen Riesenzellen entsprechen in ihrer Markerexpression den Osteoklasten und sind für die Osteolyse verantwortlich. Sie entstehen durch Fusion von Monozyten, die aus dem Blut ins Tumorgewebe migrieren und dort zu mehrkernigen Riesenzellen differenzieren. Die neoplastische Komponente des Riesenzelltumors ist eine mononukleäre, fibroblastenähnliche Stromazelle. Die Stromazellen sind als einzige Komponente des Riesenzelltumors zur Proliferation in Zellkultur fähig, wohingegen die Monozyten und die mehrkernigen Riesenzellen nach wenigen Passagen in Apoptose gehen. Das Ursprungsgewebe der neoplastischen RZT-Stromazellen war bisher nicht bekannt.

Es wurde Primärmaterial von 14 verschiedenen Riesenzelltumoren in Zellkultur überführt und die Expression der Oberflächenmarker SH2, SH3, SH4, ALCAM und Stro1, welche für mesenchymalen Stammzellen beschrieben wurden, überprüft. Die RZT-Stromazellen entsprachen in ihrer Markerexpression den undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen (MSC). Sie sind im Gegensatz zu ihren Ursprungszellen in vivo nicht mehr zur Differenzierung in die verschiedenen mesenchymalen Zelltypen fähig. Durch eine geeignete Stimulation konnte, analog zu den MSC, eine in vitro Differenzierung der RZT-Stromazellen in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten induziert werden. Zur Analyse der differentiellen Genexpression wurden „human Cancer 1.2 cDNA-Arrays“ eingesetzt. Es wurden die Expressionsprofile der Stromazellen von fünf verschiedenen Riesenzelltumoren mit der mRNA Expression von zwei mesenchymalen Stammzellpopulationen verglichen. Die RZT-Stromazellen unterschieden sich in 29 differentiell exprimierten Genen von den MSC. Von diesen 29 Genen zeigten vier Gene eine verringerte Expression in den RZT-Stromazellen, während 25 Gene verstärkt exprimiert wurden. Die Expressionsunterschiede von zehn dieser Gene, die eine besondere Relevanz für die Tumorentstehung annehmen ließen, wurden mit „Real-Time PCR“ Analysen bestätigt. Die Gene mit einer verringerten Expression im RZT kodieren für das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin (*FN1*) und den Gewebeinhibitor der Matrix-Metalloproteinase 3 (*TIMP3*). Eine erhöhte Expression wurde bei folgenden Genen beobachtet: *JUN*, *NME2*, *IL6*, *PLAB*,

*DCN*, *CTSL*, *CALM1* und *LRP1*. Bei ihren Genprodukten handelt es sich um die Transkriptionsfaktoren c-Jun und NM23-H2, die Zytokine Interleukin-6 und „Macrophage Inhibitory Cytokine-1“, die extrazellulären Proteine „Bone Proteoglycan-2“, Cathepsin L, und die intrazellulären Regulatoren Calmodulin und das „ $\alpha$ 2-Macroglobulin Receptor-associated Protein“.

Da die mehrkernigen Riesenzellen aus Blutmonozyten, die ins Tumorgewebe einwandern, entstehen, ist die Angiogenese für die zelluläre Komposition des Riesenzelltumors essentiell. In „Real-Time PCR“ Analysen konnte eine erhöhte mRNA-Expression von Oncostatin M, Angiopoetin-1 und des Angiopoetinrezeptors Tie2/Tek festgestellt werden, während die mRNA von Angiopoetin-2 und der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) vermindert exprimiert wurden. Die mRNA des VEGF-Rezeptor Typ II (*KDR*) wurde weder in den RZT-Stromazellen noch in MSC exprimiert. In Migrationsexperimenten konnte eine chemotaktische Wirkung des konditionierten Riesenzelltumormediums auf Endothelzellen beobachtet werden. Die Induktion der Endothelzellmigration war VEGF unabhängig, wie durch Inhibition mit einem VEGF-Antikörper nachgewiesen wurde.

In dieser Arbeit gelang erstmalig die Identifizierung und Charakterisierung der neoplastischen Komponente des Riesenzelltumors als mesenchymale Stammzelle. Durch Auswertung der Expressionsunterschiede zwischen RZT-Stromazellen und MSC konnten zahlreiche Gene bestimmt werden, deren Identifizierung zum besseren Verständnis der Entstehung und zellulären Interaktion im Riesenzelltumors beiträgt.

## **B. Einleitung**

### **B.1. Aufbau des Knochengewebes**

#### **B.1.1. Struktureller und zellulärer Aufbau**

Das Knochengewebe besteht aus zwei morphologisch unterschiedlichen Strukturen, dem äußeren kortikalen und dem inneren trabekulären Knochen, welche die gleiche zelluläre Zusammensetzung, aber verschiedene biologische Funktionen besitzen. Der kortikale Knochen weist einen höheren Mineralisationsgrad auf und trägt zur Stabilisierung des Skelettsystems bei. Der trabekuläre Knochen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Hämatopoese durch Interaktion mit dem blutbildenden Knochenmark. Neben den hämatopoetischen Zellen treten im Knochenmark, wie auch im kortikalen Knochen zwei verschiedenen Zelltypen, die Osteoblasten und die Osteoklasten auf, die an dem Auf-, Ab-, und Umbau (Remodeling) des Knochengewebes beteiligt sind (Guise and Mundy, 1998; Mundy, 1999).

#### **B.1.2. Osteoblasten**

Bei den Osteoblasten handelt es sich um die knochenbildenden Zellen, die aus mesenchymalen Stammzellen entstehen (Alsina et al., 1996; Aubin, 1998). Die Osteoblasten produzieren die Knochengrundsubstanz (Osteoid), welche hauptsächlich aus Collagen Typ I und weiteren nichtcollagenen Matrixproteinen wie Osteopontin, Osteonectin und Bone Sialoprotein besteht. Die organische Knochenmatrix wird durch Einlagerung von Calciumphosphat und Calciumkarbonat in Form von Calciumapatit entlang der Collagenfasern mineralisiert (Lian J.B., 1999). Während der Mineralisation wird bei einem Großteil der Osteoblasten der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet, ein geringer Anteil der Osteoblasten wird von der mineralisierten Matrix eingeschlossen und differenziert zu Osteozyten, die keine Matrixbestandteile mehr synthetisieren. Die Osteozyten bilden ein zusammenhängendes Netzwerk durch Ausbildung von Zellkontakten mit zytoplasmatischen Zellfortsätzen. Ihre Funktionen sind bisher nicht im Detail bekannt, aber es wird eine Beteiligung an der Initiation des Remodelings diskutiert (Hakeda et al., 2000).

### **B.1.3. Osteoklasten**

Der Knochenaufbau durch Osteoblasten steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem Knochenabbau durch Osteoklasten. Bei Osteoklasten handelt es sich um große, mehrkernige Zellen mit bis zu 20 Kernen, die durch die Fusion von mononucleären Vorläuferzellen, bei denen es sich entweder um CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Vorläuferzellen oder um Blutmonozyten handelt, entstehen (Athanasou and Sabokbar, 1999; Hattersley et al., 1991; Hayase et al., 1997). Die Osteoklasten sind die terminale Differenzierungsstufe dieser Zellreihe. Durch Kontakt von Osteoklasten mit der Knochenoberfläche bildet sich an der Zellunterseite eine sogenannte „sealing zone“ durch Adhäsion von Rezeptormolekülen der Zellmembran an die Matrixproteine des Knochens. Unterhalb dieser „sealing zone“ bildet sich eine spezialisierte Zellmembran mit zahlreichen sekretorischen Membranproteinen, die „ruffled border“. In diesem abgeschlossenen Kompartiment tritt durch die Aktivität des Enzyms H<sup>+</sup>-ATPase eine Ansäuerung des pH-Wertes auf (Blair et al., 1989; Vaananen et al., 1990), wodurch der enzymatische Abbau der mineralisierten Knochenmatrix durch eine Vielfalt von lysosomalen Enzymen wie z.B. die tartrat-resistente saure Phosphatase (Oddie et al., 2000), die Carboanhydrase (Martin et al., 1998) und Cathepsin K ermöglicht wird (Bossard et al., 1996) .

### **B.1.4. Interaktion der Zellarten**

Um das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau zu gewährleisten, ist eine Koordination der Differenzierung und der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten notwendig (Atkins et al., 2000; Gori et al., 2000; Owens et al., 1996; Reddy and Roodman, 1998). Die Zellfunktionen unterliegen der Regulation sowohl durch systemische Hormone, als auch durch lokal synthetisierte Faktoren wie Interleukine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (Heymann et al., 1998; Martin et al., 1998), wobei dem „Macrophage Colony Stimulating Factor“ (M-CSF) und dem kürzlich identifizierten „Osteoclast Differentiation Factor“ (ODF) besondere Bedeutung beigemessen wird (Lacey et al., 1998; Tanaka et al., 1993; Udagawa et al., 1995). Beide Faktoren werden von Zellen der Osteoblastenlinie gebildet und sind für die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen zu Osteoklasten und deren Aktivierung essentiell (Quinn et al., 1998). Bei Störung dieser Homeostase von Auf- und Abbau („uncoupling“)

im Alter, aber auch durch Stoffwechselstörungen, Metastasen oder Neoplasien des Knochengewebes, tritt eine Überfunktion einer dieser Zellarten auf, die entweder eine Osteopetrose durch vermehrte Osteoblastenaktivität oder eine Osteolyse durch vermehrte Osteoklastenfunktion hervorruft (Manolagas, 2000; Roodman, 2001).

## B.2. Klassifizierung von Knochentumoren

Knochentumoren sind die häufigste Tumorerkrankung bei Kindern und Jugendlichen. Die Gruppe der primären Knochentumoren lässt sich anhand ihrer histologischen Merkmale unter anderem in zwei Hauptgruppen unterteilen: die knochenbildenden, osteoblastischen Tumoren und die knochenabbauenden, osteolytischen Tumoren, die aufgrund der Bildung von osteoklastenähnlichen, mehrkernigen Riesenzellen eine ausgeprägte Destruktion der mineralisierten Knochenmatrix hervorrufen. Die Ursprungsgewebe dieser Tumoren sind häufig nicht genau definiert, deswegen handelt es sich bei der gegenwärtig verwendeten Klassifikation nicht nur um eine histogenetische, sondern auch um eine phänotypische Klassifizierung, die sich am vorherrschenden Differenzierungsmuster orientiert (Mirra, 1989).

### B.2.1. osteoblastische Knochentumoren

In der Gruppe der osteoblastischen Knochentumoren werden Neoplasien mit unterschiedlicher Malignität und Zellart zusammengefasst. Charakteristisches Merkmal dieser Gruppe ist die Synthese einer extrazellulären Matrix, deren Komposition in Abhängigkeit der Ursprungszelle des Tumors stark variieren kann. So gibt es neben den osteoidbildenden auch knorpelbildende Tumoren, deren Tumorzellen eine chondroblastische Differenzierung aufweisen und fibrosierende Tumoren, die eine bindegewebsartige Matrix bilden. Bei verschiedenen Tumorentitäten kann eine Mischung dieser Matrixkomponenten als differentialdiagnostisch wichtiges Merkmal auftreten (Whyte, 1999).

### B.2.2. osteolytische Knochentumoren

Innerhalb der primären Knochentumoren gibt es eine Gruppe von Neoplasien, die, verursacht von osteoklastenähnlichen, mehrkernigen Riesenzellen, durch eine ausgeprägte Osteolyse imponieren (Salzer-Kuntschik, 1998). Der prominenteste

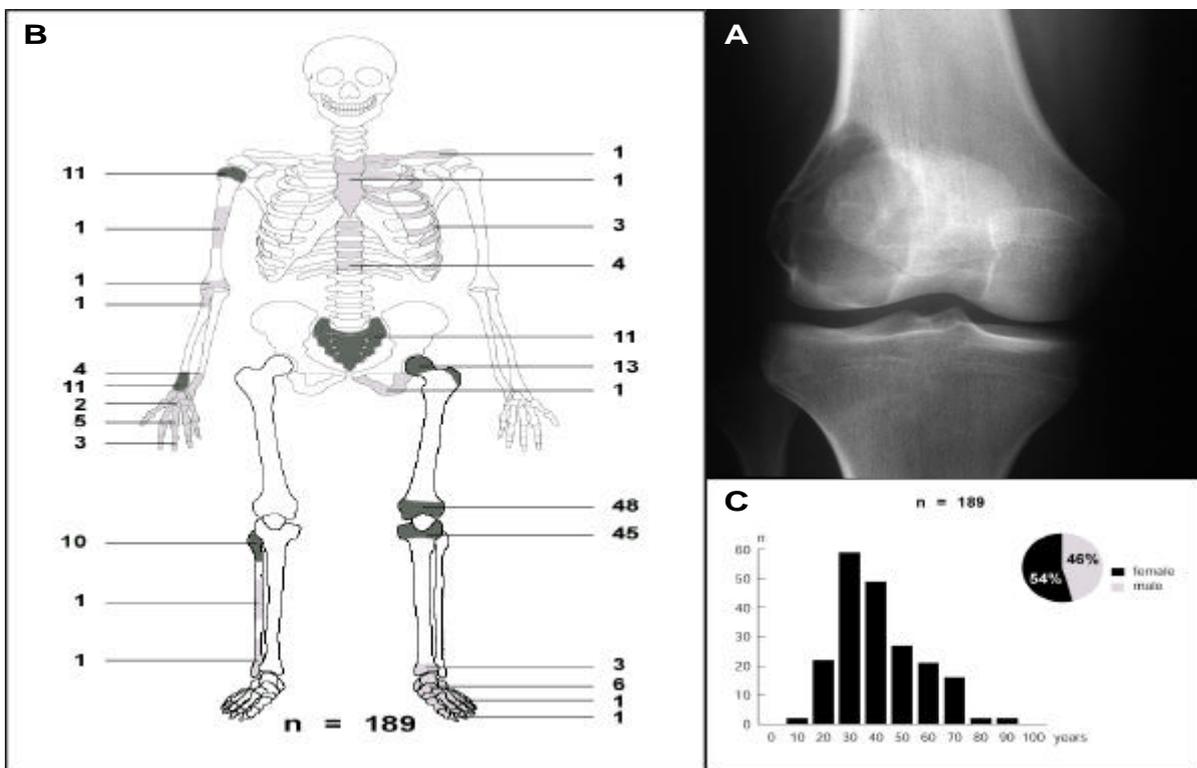
Vertreter der osteolytischen Tumoren ist der Riesenzelltumor, der durch die hohe Anzahl an mehrkernigen Riesenzellen charakterisiert ist.

### B.3. Der Riesenzelltumor des Knochens (RZT)

#### B.3.1. Klinische Daten

Der Riesenzelltumor des Knochens (RZT) ist eine lokal destruktive Neoplasie, deren Dignität bisher nicht geklärt werden konnte (Brien, 1997; Brooks and Pascal, 1984). Die Häufigkeit beträgt 5% aller primären Knochentumoren. Die Rezidivrate des Tumors kann bis zu 50% erreichen, Lungenmetastasen werden in etwa 2% der Fälle beobachtet (Brien, 1997).

Radiologisch imponiert der RZT durch eine lokale Osteolyse der mineralisierten Knochenmatrix (Abb.B.1.A.). Der Tumor geht überwiegend von der Epiphyse der langen Röhrenknochen aus und betrifft fast immer (98%) das ausgereifte Skelett nach Schluß der Epiphysenfuge (Delling, 1977). Die Lokalisation-, Alters- und Geschlechtsverteilung der im Hamburger Knochentumorregister untersuchten 189 Riesenzelltumoren ist in Abbildung B.1. dargestellt.

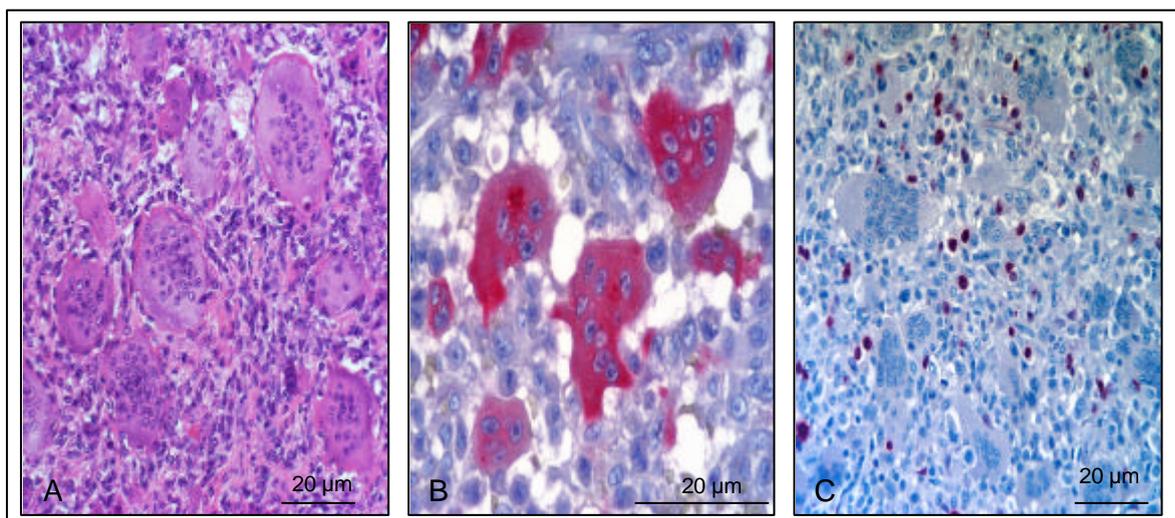


**Abb. B.1.:** **A:** Röntgenbild eines typischen RZT, **B:** Lokalisationen des RZT, **C:** Alters- und Geschlechtsverteilung der 189 diagnostizierten Riesenzelltumoren des Hamburger Tumorregisters.

Es zeigt sich eine Hauptinzidenz in der zweiten und dritten Lebensdekade, wobei eine leichte Prädisposition für Frauen zu beobachten ist (Abb.B.1.C.) (Wulling et al., 2001).

### **B.3.2. Morphologische und histologische Charakteristika**

Nach der Erstbeschreibung von Jaffe et al. im Jahr 1940 (Jaffe and Poartis, 1940) wurde der Riesenzelltumor des Knochens aufgrund seiner morphologischen und histologischen Merkmale auch als „Osteoclastoma“ bezeichnet und somit als Neoplasie der Osteoklastenzelllinie klassifiziert. Die histochemische und immunzytochemische Analyse des Riesenzelltumors führte zur Identifizierung von drei verschiedenen Zelltypen. Die hohe Anzahl an osteoklastenähnlichen, mehrkernigen Riesenzellen war für die Nomenklatur dieser Neoplasie verantwortlich (Abb.B.2.A.). Neben den mehrkernigen Zellen treten noch zwei mononukleäre Zelltypen auf. Die erste besitzt einen runden Zellkern und entspricht Monozyten / Makrophagen (Abb.B.2.B.), die zweite Zelle ist spindelförmig, ähnelt Fibroblasten und wird als Stromazelle bezeichnet (Abb.B.2.C.). Zusätzlich liegt noch eine geringe Anzahl von Lymphozyten im Tumorgewebe vor (Burmester et al., 1983). Trotz dieser genauen morphologischen Charakterisierung konnte die Histogenese und die Interaktion dieser verschiedenen Zellarten nicht im Detail geklärt werden.



**Abb.B.2:** Zelluläre Komponenten des Riesenzelltumors im histologischen Paraffinschnitt. **A:** HE-Übersichtsfärbung 200x Vergrößerung, **B:** immunhistologischer Nachweis des monozytären Markers CD68 auf den Monozyten und Riesenzellen 400x Vergrößerung, **C:** immunhistologischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 auf den fibroblastenähnlichen Stromazellen 200x Vergrößerung,

### **B.3.3. Histogenese des Riesenzelltumors**

Die Kultivierung der Zellen aus Riesenzelltumorgewebe ermöglichte die Identifizierung der fibroblastenähnlichen Stromazelle als neoplastische Zelle des Tumors. Die Stromazelle ist als einzige Zellart zur Proliferation in Zellkultur fähig, während die Monozyten und die mehrkernigen Riesenzellen nach kurzer Zeit in Apoptose gehen (Wulling et al., 2001; Zheng et al., 2001). Der Verlust der mehrkernigen Riesenzellen führte zu der Hypothese, daß es sich bei den Monozyten und Riesenzellen um reaktive Zellen handelt, die von den Stromazellen zur Infiltration des Tumorgewebes stimuliert werden (Komiya et al., 1990). Die Entdeckung des Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), eines chemotaktisch wirksamen Proteins im Medium der Riesenzelltumoren, unterstützte die Theorie, daß die Monozyten sekundär in das Tumorgewebe einwandern (Zheng et al., 1998). Zusätzlich wurde die Expression von Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), der ebenfalls chemotaktisch auf Monozyten wirkt, in den Stromazellen des Riesenzelltumors nachgewiesen. Der TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor wird von den multinukleären Riesenzellen und den Monozyten exprimiert (Zheng et al., 1994). Durch fortlaufende Studien der Osteoklastenentwicklung und -aktivierung wurde auch die Entstehung der mehrkernigen Riesenzellen des Riesenzelltumors aufgeklärt. Die Osteoklasten entstehen aus einer hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark, die sie mit den Monozyten gemeinsam haben. Die mononukleären Vorläuferzellen fusionieren zu den mehrkernigen Osteoklasten, bei denen es sich um die terminal differenzierten Zellen dieser Linie handelt (Quinn et al., 1998). Der Nachweis von monozytären Markern (Huang et al., 1993) auf den Riesenzellen unterstützt die Annahme, daß die neoplastischen Stromazellen die Fusion der Monozyten zu mehrkernigen Riesenzellen induzieren (Goldring et al., 1987; Hanaoka et al., 1970).

Durch Transplantation von *in vitro* expandierten Stromazellen des Riesenzelltumors in immundefiziente SCID-Mäuse konnte die Bildung von mineralisierter Matrix nachgewiesen werden, zusätzlich exprimieren die Stromazellen nach *in vitro* Differenzierung den Osteoblastenmarker alkalische Phosphatase. Anhand dieser Ergebnisse scheint es sich bei den RZT-Stromazellen um eine Vorläuferzelle des Osteoblasten zu handeln (James et al., 1996; Joyner et al., 1992). *In vivo* tritt keine alkalische Phosphatase

Enzymaktivität und nur selten eine Osteoidbildung im Riesenzelltumor auf (Roux et al., 1996). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde die Riesenzelltumorzelllinie GCT23 etabliert, die auch nach Subkultivierung mehrkernige Riesenzellen durch Fusion der mononukleären Tumorzellen ausbildet (Grano et al., 1994). Trotz dieser Untersuchungen konnte die Ursprungszellart dieser RZT-Zelllinie bisher nicht eindeutig bestimmt werden.

Anhand der biochemischen und physiologischen Merkmale entsprechen die mehrkernigen Riesenzellen den normalen Osteoklasten. Die Riesenzellen exprimieren die Osteoklastenmarker tartrat-resistente saure Phosphatase, den Vitronektinrezeptor und den Calcitoninrezeptor, weiterhin sind sie in der Lage, mineralisierte Matrix abzubauen (Horton et al., 1985; Komiya et al., 1990). Der Unterschied zwischen den mehrkernigen Riesenzellen und Osteoklasten besteht in der höheren Fusionsrate, so daß die Riesenzellen bis zu 100 Zellkerne enthalten, während normale Osteoklasten durchschnittlich 3–15 Zellkerne aufweisen. Das Fusionsprotein Meltrin- $\alpha$  (ADAM-12) ist an der Fusion von Myotuben beteiligt (Gilpin et al., 1998) und wurde außerdem als wichtiger Faktor bei der Fusion von mononukleären Vorläuferzellen zu Osteoklasten identifiziert (Abe E., 1998). Der Nachweis einer Korrelation der Expression von ADAM-12 und der Osteoblastendifferenzierung unterstreicht die Bedeutung dieses Fusionsproteins für das Remodeling des Knochens (Inoue et al., 1998). Das lokal aggressive Verhalten der Riesenzelltumoren kann aus der Expression der Matrix Metalloproteinasen MMP2 (Typ IV Collagenase), MMP3 (Stromelysin) und MMP9 resultieren, die eine Destruktion der Knochenmatrix bewirken (Sasaguri et al., 1992; Schoedel et al., 1996). Durch eine spezifische RT-PCR konnte die RNA-Expression der Zytokine TGF- $\beta$ 1, M-CSF, GM-CSF, SCF, IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 und TNF- $\alpha$  in Gesamtpräparaten des Tumorgewebes nachgewiesen werden (Atkins et al., 2000). Diese Zytokine beeinflussen die Differenzierung und Lebensdauer von Osteoklasten, doch ihre genaue Wirkungsweise und ihr Einfluß auf die Entstehung von Riesenzelltumoren ist noch nicht geklärt (O'Keefe et al., 1997; Roux et al., 1996; Zheng et al., 1994). Bisher ist von dem im RZT produzierten Interleukin-1 bekannt, daß es die Expression der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) erhöht. Der Anstieg der MMP9 Expression korreliert mit Gefäßeinbrüchen und der Entstehung von Lungenmetastasen in Riesenzelltumoren (Masui et al., 1998; Ueda et al., 1996).

Die Beschreibung des für die Osteoklastenentwicklung essentiellen „Osteoclast Differentiation Factors“ (ODF) und seiner beiden Rezeptoren „Osteoprotegerin“ (OPG) und „Receptor Activator of NFκB“ (RANK) führte zu einem besseren Verständnis der direkten Interaktion zwischen Osteoblasten, Osteoklasten und Knochenmarkszellen (Lacey et al., 1998; Simonet et al., 1997).

Vor kurzer Zeit wurde eine verstärkte Expression von ODF auf der Membran der Stromazellen im Riesenzelltumor identifiziert (Atkins et al., 2000). Der inhibierende ODF-Rezeptor OPG wird sezerniert und bindet an ODF, um dessen osteoklastenaktiverende Funktion zu verhindern. Er wird in Riesenzelltumoren nur in geringer Menge synthetisiert. Der zweite ODF-Rezeptor RANK wurde auf der Membran der Riesenzellen detektiert und vermittelt die Aktivierung durch die Stromazellen. Die Bestimmung des Verhältnisses von ODF zu OPG in Riesenzelltumoren könnte bei der Diagnose eines Riesenzelltumors im Vergleich zu anderen, riesenzellreichen Knochtumoren sinnvoll sein (Atkins et al., 2000).

## B.4. Merkmale der mesenchymalen Stammzellen (MSC)

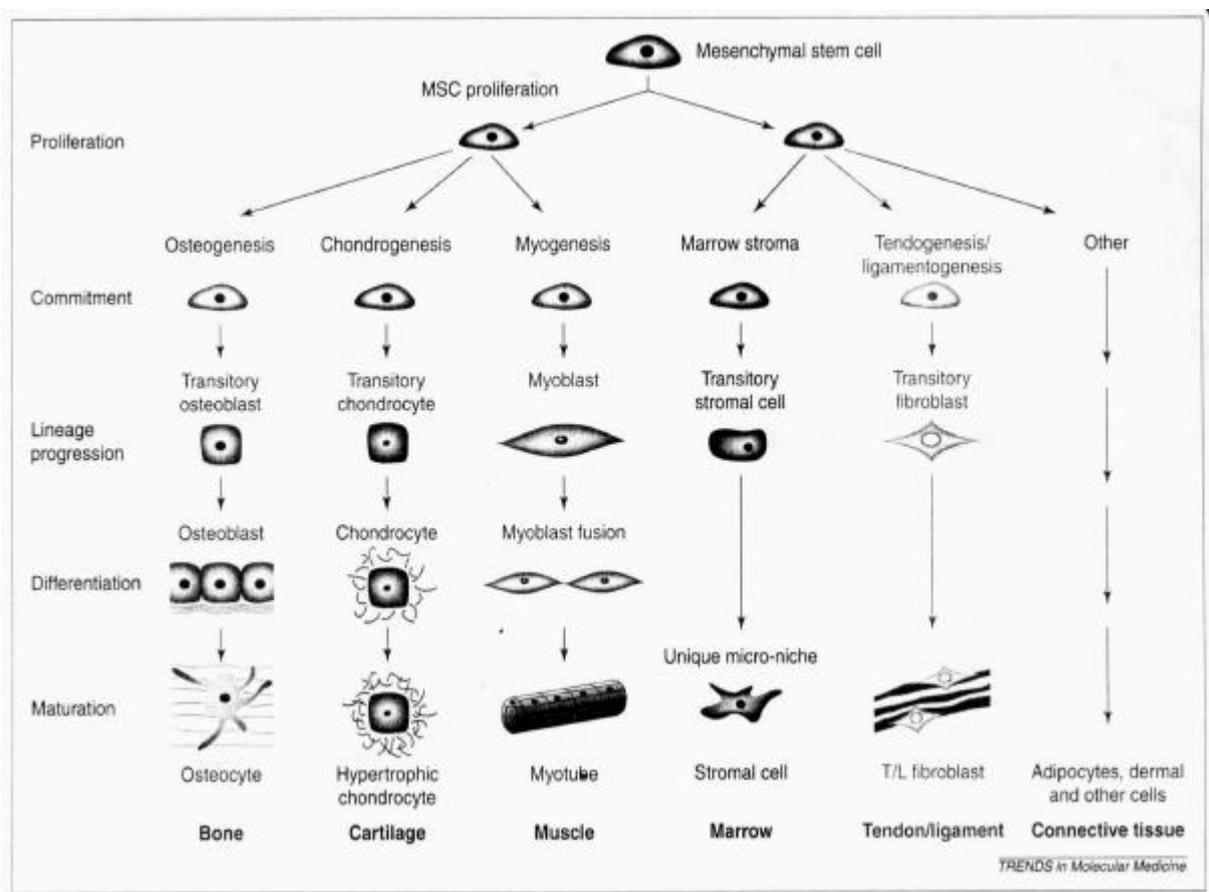
### B.4.1. Vorkommen und Differenzierung der MSC

Osteoblasten entstehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks, die im Verlauf ihrer Differenzierung charakteristische Zellstadien durchlaufen. Diese mesenchymale Differenzierungsreihe wurde als erstes von Caplan et al. (Caplan, 1991) in Analogie zur hämatopoetischen Differenzierungsreihe postuliert (siehe Abb.B.3.). Erst im Jahre 1992 konnte diese Hypothese durch die Identifizierung dieser mesenchymalen Stammzelle mit monoklonalen Antikörpern (Haynesworth et al., 1992) verifiziert werden.

Bei den mesenchymalen Stammzellen handelt es sich um spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellen, die zu einem Prozentsatz von 0,01%-0,001% im adulten Knochenmark (Campagnoli et al., 2001) und im peripheren Blut (Zvaifler et al., 2000) vorkommen und das Potential sowohl zur Differenzierung als auch zur Selbsterneuerung besitzen (Minguell et al., 2001). Die mesenchymale Stammzelle kann in vitro als Vorläuferzelle aller mesenchymalen Gewebe dienen (Pittenger et al., 1999). Sie ist bei geeigneter Stimulierung nicht nur zur Differenzierung in Osteoblasten (Haynesworth et al., 1992a; Jaiswal et al., 1997), Chondrozyten (Wakitani et al., 1994), Adipozyten (Beresford, 1992) und Hämatopoese-

unterstützenden Stromazellen (Majumdar et al., 1998) fähig, sondern kann auch in Muskelzellen (Wakitani et al., 1995), Sehnenzellen (Minguell et al., 2001), Nervenzellen (Kopen et al., 1999) und Leberzellen (Petersen et al., 1999) differenzieren. Nach Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in ein Versuchstier konnte eine komplette Regeneration eines Knochens mit Knochenmark beobachtet werden (Owen and Friedenstein, 1988).

Die Existenz dieser pluripotenten, mesenchymalen Stammzelle konnte auch in anderen Säugetieren wie Kaninchen, Ratten und Mäusen nachgewiesen werden (Young et al., 2001).



**Abb.B.3.:** Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzelle aus adulten Knochenmark in verschiedene Gewebetypen (Caplan and Bruder, 2001).

#### **B.4.2. Charakteristische Markereexpression der MSC**

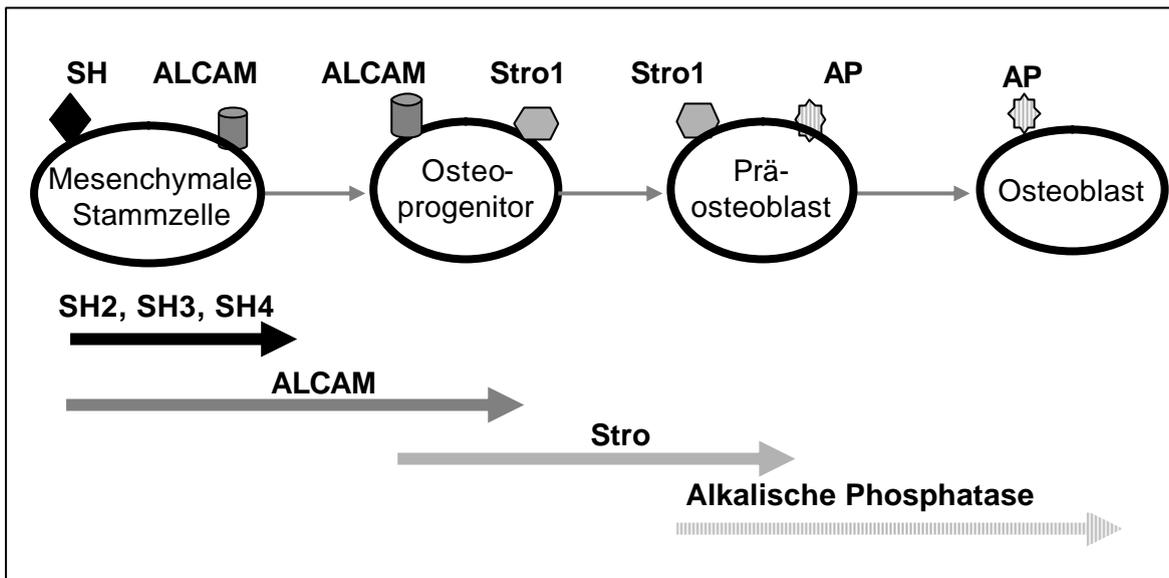
Das gesteigerte Interesse an den multipotenten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks führte zur Beschreibung geeigneter Isolierungs-, Kultivierungs- und Differenzierungsmethoden, aber auch zu einer detaillierten Charakterisierung

dieser Zellen anhand der Expression stadienspezifischer Marker, deren Expressionsmuster in Abbildung B.4. dargestellt ist.

Die Antigene der Marker SH2, SH3 und SH4 werden nur auf mesenchymalen Stammzellen gefunden. Das von SH2 gebundene Antigen entspricht dem TGF- $\beta$  Rezeptor Endoglin (CD105) (Barry et al., 1999). Die Antigene der Marker SH3 und SH4 konnten kürzlich als zwei verschiedene Epitope des CD73 Antigens identifiziert werden (Barry et al., 2001). Der Antikörper SB10 ist gegen frühe osteoblastäre Vorläufer im embryonalen Periost gerichtet (Bruder et al., 1997), während im adulten Knochenmark werden nur wenige osteoblastäre Vorläufer, die noch keine alkalische Phosphatase exprimieren, mit SB10 angefärbt werden (Cortes et al., 1999). Die antigene Determinante des Antikörpers SB10 ist identisch mit dem Activated Leucocyte Cellular Adhesion Molecule (ALCAM /CD166) (Bruder et al., 1998).

Ein weiterer Antikörper, Stro1, erkennt eine Subpopulation der Knochenmarksstromazellen, die eine multipotente Stammzelle beinhaltet und in Osteoblasten differenzieren kann (Simmons and Torok-Storb, 1991). Das von Stro1 gebundene Antigen ist bisher noch nicht bekannt. Mit Hilfe der genannten Marker und dem osteoblastenspezifischen Enzym alkalische Phosphatase ist eine differenzierungsspezifische Identifizierung von osteoblastären Vorläuferzellen möglich. Im Verlauf der Differenzierung läßt sich eine sukzessive Expressionsänderung dieser Marker beobachten (Minguell et al., 2001).

Neben den Differenzierungsmarkern wurden zahlreiche spezifische Zytokine, Zytokinrezeptoren, Adhäsions- und Matrixmoleküle in den mesenchymalen Stammzellen beschrieben, die in Tabelle B.1. aufgeführt sind (Minguell et al., 2001; Pittenger et al., 1999). Es handelt sich um Wachstumsfaktoren und Chemokine, die an der Regulation der Hämatopoese beteiligt sind und deren Expression sich im Verlauf der Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen verändert (Haynesworth et al., 1996). Dieses Expressionsprofil legt eine essentielle Funktion der mesenchymalen Stammzelle als Knochenmarksstromazelle und eine Beteiligung an der Regulation der hämatopoetischen Differenzierung nahe (Majumdar et al., 2000).



**Abb.B.4.:** Expression von stadienspezifischen Differenzierungsmarkern im Verlauf der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten.

Marker	Bezeichnung	Literatur
Spezifische Antigene	SH2, SH3, SH4, SB10, Stro1	(Bruder et al., 1997; Haynesworth et al., 1992; Simmons and Torok-Storb, 1991)
Zytokine	IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, LIF	(Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998)
Zytokinrezeptoren	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, IFN $\gamma$ R, TNFR 1 und 2, TGF $\beta$ R 1 und 2,	(Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998; Pittenger et al., 1999)
Wachstumsfaktoren	GM-CSF, G-CSF, M-CSF, SCF	(Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998)
Wachstumsfaktor-rezeptoren	SCFR, G-CSFR, $\beta$ FGFR, PDGFR, EGFR	(Conget and Minguell, 1999; Satomura et al., 1998)
Adhäsionsmoleküle	ICAM1 und 2, VCAM, ALCAM, LFA-3, Lectin, Endoglin, CD44, $\alpha$ v $\beta$ 3, $\alpha$ v $\beta$ 5	(Bruder et al., 1998; Conget and Minguell, 1999; Pittenger et al., 1999)
Extrazelluläre Matrixproteine	Collagen Typ I, III, IV, V, VI, Fibronectin, Laminin, Hyaluron, Proteoglycane	(Chichester et al., 1993; Conget and Minguell, 1999; Prockop, 1997)

**Tabelle B.1.:** Zusammenfassung der Markerexpression der mesenchymalen Stammzellen

**B.5. Ziele der Arbeit**

Die osteolytische Aktivität des Riesenzelltumors beruht auf einer massiven Aktivierung von Osteoklasten durch die neoplastische Stromazelle dieses Tumors. Die Ursprungszellart der neoplastischen RZT-Stromazellen war bisher nicht bekannt. Zur Analyse der Genexpression der RZT-Stromazellen war die Charakterisierung der Ausgangszellart notwendig. Aufgrund der beschriebenen osteoblastären Differenzierung in vitro und im Tierversuch (James et al., 1996; Joyner et al., 1992) lag die Entstehung der RZT-Stromazelle aus einer Osteoblastenvorläuferzelle nahe. Der Einsatz von neu beschriebenen osteoblastären Differenzierungsmarkern ermöglicht die Charakterisierung der neoplastischen Stromazelle des Riesenzelltumors innerhalb der Osteoblastendifferenzierung und die Auswahl einer korrespondierenden Normalzellart. Anschließend sollte die differentielle Genexpression der RZT-Stromazellen und der Ursprungszellart bestimmt werden, um anhand von Expressionsunterschieden die neoplastische Transformation der RZT-Stromazelle und ihre Auswirkung auf die Entstehung und Aufrechterhaltung der zellulären Zusammensetzung des Riesenzelltumors festzustellen. Der Riesenzelltumor ist ein geeignetes Modellsystem, um die komplexen Interaktionen und Regulationsmechanismen zwischen hämatopoetischen Zellen und mesenchymalen Zellen im Knochengewebe zu untersuchen.

## **C. Material**

### **C.1. Bezugsquellen der Geräte**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>
Applied Biosystems, Weiterstadt	PCR-Gerät	GeneAmp PCR System 9700
Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenziergerät	ABI PRISM® 377 DNA Sequencer
Beckman, Krefeld	Zentrifuge, nicht gekühlt (15/50ml)	GS-6 Centrifuge Rotor: GH-3.8
Beckman, Krefeld	Zentrifuge, gekühlt (1,5 / 2 ml) (15 / 50 ml)	Avanti 30 Centrifuge Rotor: F2402H F0685
BioRad, Hamburg	Spannungsgeber 1	Power Pac 300
BioRad, Hamburg	Spannungsgeber 2	Model 200/2.0 Power Supply
Eppendorf, Hamburg	Pipetten	Eppendorf Reference 10 µl, 100 µl, 100µl
Eppendorf, Hamburg	Thermoschüttler	Thermomixer comfort
Gesellschaft für Laboratorien, Burgwedel	Hybridisierungsin- kubator	GFL 7601
Heraeus Instruments, Hanau	Zellkultur-Inkubator	BBD 6220
Heraeus Instruments, Hanau	Zellkultur-Sterilbank	HeraSafe
Integra Bioscience	Pipettierhilfe	Pipetboy aku
MS Laborgeräte, Heidelberg	Röntgenfilm- Entwicklermaschine	Optimax Typ TR
MS Laborgeräte, Heidelberg	Geldokumentgerät	Intas
New Brunswick	Inkubator	Incubator Shaker
Olympus, Hamburg	Invers-Mikroskop	IX 50
Packard, Dreieichen	Flüssigkeitsszintillations- analysator	2500TR
Perkin Elmer, Überlingen	Photometer	UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10
Roche Diagnostics, Mannheim	Real-Time-PCR-Gerät	Light Cycler
Zeiss, Jena	Fluoreszenz-Mikroskop	Axiophot 2

**C.2. Bezugsquellen der Chemikalien**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>
Amersham Pharmacia, Freiburg	Ready to go You-Prime cDNA Kit
Ambion, Wiesbaden	DNase Inactivation Reagent
Applied Biosystems, Weiterstadt	Big Dye Terminator Kit
Biosource, Nivelles (Belgien)	Actin Primer
Clontech, Heidelberg	Atlas Human Cancer 1,2 cDNA-Arrays Atlas Pure mRNA Isolation System Oligonukleotidsequenzen der Arraygene Atlas Image 2.0 Auswertungssoftware
Dade Behring AG, Düringen, Switzerland	Diff-Quick <sup>®</sup> Kit
Dako, Hamburg	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Kit APAPP-Puffer Tabletten Immunomount Mounting Medium
Fluka, Taufkirchen	Safranin O Scharlachrot
Gibco BRL, Karlsruhe	Alpha Modified Eagle Medium Amphoterecin B Fötales Kälberserum DNase I Dulbeccos Modified Eagle Medium Glutamin RPMI-Medium Phosphatpuffer PBS Penicillin Streptomycin Trypsin-EDTA Trizol <sup>™</sup>
Invitrogen, Groningen (Niederlande)	Oligonukleotide TA-Cloning Kit
Merck, Darmstadt	Mayers Hemalaun Kernechtrot
Molecular Probes, Leiden (Niederlande)	Slow Fade Kit
New England Biolabs, Frankfurt	Restriktionsenzyme
Qiagen, Hilden	Taq PCR Core Kit Qiaquick Gel Extraktion Kit Qiaquick PCR Purification Kit Qiaprep Spin Miniprep Kit Maxi Preps
Roche, Mannheim	Titan One Step RT-PCR Kit Light-Cycler Fast Start DNA Master SYBR GreenI
Sigma	alle weiteren Chemikalien

**C.3. Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien**

Bezugsquelle	Bezeichnung
BD Falcon, Heidelberg	15 ml Zentrifugenröhrchen 50 ml Zentrifugenröhrche 25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen Plastik Einwegpipetten Plastikpetrischalen Zellschaber
Biozym, Hess. Oldendorf	sterile Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl und 1000 µl 0,5 ml Reaktionsgefäße 50 µl PCR-Reaktionsgefäße 50 µl PCR-Stripes
Braun Aesculap AG, Tuttlingen	sterile Einmalskalpelle
Eppendorf, Hamburg	Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml UVetten RNase-freie UV-Küvetten
Marienburg, Hamburg	Objekträger Deckgläser
Millipore	0,2µm und 0,45µm Sterilfilter Centriprep YM-3 Säulen
Nunc, Wiesbaden	6-well Multiwellplates 96-well Mltiwellplatten Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup> Chamberslides
Roche, Mannheim	Light Cycler Capillaren
Roth, Karlsruhe	Glas-Pasteurpipetten Hybridisierungszylinder Metallpnzetten
Schott	Glaswaren

**C.4. verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz 5'® 3'	PCR Produkt	Ann T.	AC-number
Actin uni	CTGGCCGGGACCTGACTGACT	587 bp	60°C	M10277
Actin rev	CTAGAAGGATTTGCGGTGGACGAT			
Alcam uni2	GTGACAATACAAGTGCTGCC	636 bp	58°C	L38608
Alcam rev2	CCTCTGTTTGGTTTATGACG			
A2M uni	Clontech Oligo C39-65	391 bp	57°C	M63959
A2M rev	Clontech Oligo C39-66			
A2M2 uni	GAAATTCTCCGGCGAAGAACC	249 bp	54°C	M63959
A2M2 rev	ACTCAGCCTCAGTGCTGTAG			

Name	Sequenz 5'® 3`	PCR Produkt	Ann T.	AC-number
BPG2 uni	Clontech Oligo C148-255	236 bp	55°C	M14219
BPG2 rev	Clontech Oligo C148-256			
Calm uni	Clontech Oligo CA066-691	191 bp	55°C	D45887
Calm rev	Clontech Oligo CA066-692			
CatL uni	Clontech Oligo CA313-561	230 bp	54°C	X12451
CatL rev	Clontech Oligo CA313562			
End uni	TGCCACTGGACACAGGATAA	806 bp		X72012
End rev	GATGAGGACGGCATCGAGAT			
Fibr uni	Clontech Oligo C82_R-595	196 bp	54°C	X02761
Fibr rev	Clontech Oligo C82_R-596			
GAPDHuni	TGATGACATCAAGAAGGTGG	246 bp	55°C	M33197
GAPDHrev	TTTCTTACTCCTTGGAGGCC			
IL-1α uni	ATGGCCAAAGTTCCAGACATGTTTG	808 bp	56°C	X02531
IL-1α rev	GGTTTTCCAGTATCTGAAAGTCAGT			
IL-6 uni	Clontech Oligo 85	425 bp	55°C	X04602
IL-6 rev	Clontech Oligo 86			
Jun uni	Clontech Oligo 539	376 bp	57°C	J04111
Jun rev	Clontech Oligo 540			
LIF uni	AACAACCTCATGAACCAGATCAGGAG C	405 bp		M63420
LIF rev	ATCCTTACCCGAGGTGTCAGGGCCG TAGG			
Mic1 uni	Clontech Oligo CA033-467	211 bp	55°C	AF01977
Mic1 rev	Clontech Oligo CA033-468			0
NM23 uni	Clontech Oligo 1133	282 bp	56°C	L16785
Nm23 rev	Clontech Oligo 1134			
ppary uni	GTA CTCTTGAAGTTTCAGGTC	399 bp		XM0030
ppary rev	ATGGGTGAACTCTGGGAGA			59
TIMP3 uni	Clontech Oligo 539	241 BP	56°C	Z30183
TIMP3 rev	Clontech Oligo 540			

**C.5. Klonierte Plasmidvektoren**

<b>Name</b>	<b>Vektor</b>	<b>Insert</b>	<b>Größe</b>	<b>Quelle</b>
pA2M2	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	249 bp cDNA des humanen $\alpha$ 2Macroglobulin Rezeptor associated Protein Genes	4149 bp	diese Arbeit
pBPG2	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	236 bp cDNA des humanen Bone Proteoglycan 2 Genes	4136 bp	diese Arbeit
pCalm	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	191 bp cDNA des humanen Calmoulin Genes	4091 bp	diese Arbeit
pCatL	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	230 bp cDNA des humanen Cathepsin L Genes	4130 bp	diese Arbeit
pFib	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	196 bp cDNA des humanen Fibronectin Genes	4096 bp	diese Arbeit
pGAP-DH	pCRII Vektor Invitrogen	246 bp cDNA des humanen GAPDH Genes	4194 bp	S.Loges, UKE
pIL-6	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	425 bp cDNA des humanen Interleukin-6 Genes	4325 bp	diese Arbeit
pJun	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	376 bp cDNA des humanen c- Jun Genes	4276 bp	diese Arbeit
pMIC	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	211 bp cDNA des humanen Macrophage Inhibitory Cytokine- 1 Genes	4111 bp	diese Arbeit
pNM	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	282 bp cDNA des humanen NM23-H2 Genes	4182 bp	diese Arbeit
pTIMP	pCR2.1 TA-Vektor Invitrogen	241 bp des humanen Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Genes	4141 bp	diese Arbeit

**C.6. verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Herkunft
Escherichia coli INV $\alpha$ F <sup>-</sup>	F' <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi1 gyrA96</i> <i>relA1</i> $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 $\lambda$ <sup>-</sup>	Invitrogen TA- Kloning Kit

**C. 7. verwendete Antikörper****C.7.1. primäre Antikörper**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Nummer	Quelle
CD14	Mouse-anti Human, monoclonal	1:100	M0825	DAKO, Hamburg
CD34	Mouse-anti Human, monoclonal	1:50	AHS3401	Biosource, Nivelles (Belgien)
CD51/CD61	Mouse-anti Human, monoclonal	1:100	Mab2256	Chemicon, Hofheim
CD68 pGM1	Mouse-anti Human, monoclonal	1:50	M0876	DAKO, Hamburg
CD117 c-kit p145 <sup>kit</sup>	Mouse-anti Human monoclonal	1 : 100 1 : 200	Mab 8869	Chemicon, Hofheim
CD146 Muc18	Mouse-anti Human monoclonal	1 : 100	8050-31-T100	Alexis, Grünberg
CD166 ALCAM clone 3A6	Mouse-anti Human, monoclonal	1 : 100	393-020	Alexis, Grünberg
Collagen Typ I	Rabbit-anti Human, polyclonal	1:50	PS047	Monosan, Beutelsbach
Collagen Typ II	Rabbit-anti Human, polyclonal	1 : 50	PS 048	Monosan, Beutelsbach
Endoglin	Mouse-anti Human, monoclonal	1:100	Mab2152	Chemicon, Hofheim
Ki67	Mouse-anti Human, monoclonal	1:50	Mab4062	Chemicon, Hofheim

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Nummer	Quelle
MDM2, N-20	Rabbit-anti- Human, polyclonal	1:100	sc-813	Santa Crus Heidelberg
Osteonectin	Rabbit-anti- human polyclonal	1: 100	Mab1858	Chemicon, Hofheim
Osteopontin	Rabbit-anti Human polyclonal	1:100	Mab1870	Chemicon, Hofheim
PCNA	Mouse-anti Human, monoclonal	1:100	Mab424	Chemicon, Hofheim
PPAR $\gamma$	Mouse-anti Human, monoclonal	1: 100	sc-7273	Santa Cruz, Heidelberg
RANK	Rabbit-anti Human, polyclonal	1 :100	AB1861	Chemicon, Hofheim
RANKL	Rabbit-anti Human, polyclonal	1:100	AB1862	Chemicon, Hofheim
Ras	Mouse-anti Human, monoclonal	IH 1 : 500	R02120	Transduct Lab. Pharmingen, Heidelberg
StemCell FaktorClone13 302.6	Mouse-anti Human, monoclonal	1100	MAB655	R&D Systems, Wiesbaden
SH2, SH3, SH4	Mouse-anti Human, monoclonal	Unverdünnt	HB-10743 HB-10744 HB-10745	ATCC, Manassas (USA)
Stro1-AK	Mouse-anti Human, monoclonal	Unverdünnt		Developmen tal Studies Hybridoma Bank (USA)
THY-1.1 CDw90	Mouse-anti Human, monoclonal	1:100	AHU0052	Biosource, Nivelles, ( Belgien )
Vimentin	Mouse-anti Human, monoclonal	1 :50	M0725	DAKO, Hamburg

**C.7.2. sekundäre Antikörper**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Nummer	Quelle
APAAP-IgG, monoclonal, human	Maus	1 :50	D0651	DAKO, Hamburg
Kanninchen-Anti-Maus IgG	Kanninchen	1:50	ZO412	DAKO, Hamburg
Maus Anti-Kaninchen IgG	Maus	1:50	M0737	DAKO, Hamburg
FITC-markiert Anti-Maus IgG	Kanninchen	1:20	F0261	DAKO, Hamburg
FITC-markiert Anti-Maus IgG	Ziege	1:25	F0479	DAKO, Hamburg
TRITC-markiert Anti-Ziege IgG	Esel	1:200	A-1157	Molekulare Probes, MO BI TEC, Göttingen
TRITC-markiert Anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:400	A-11011	Molekulare Probes, MO BI TEC, Göttingen

**C.8. Restriktionsenzyme**

Name	Puffer	Temperatur	Erkennungsstelle	Nummer	Sonstiges
<i>Bam</i> HI	BamH1	37°C	5´G/GATCC 3´	136L	Sticky-ends
<i>Eco</i> RI	Eco R1	37°C	5´G/AATTC 3´	101L	Sticky-ends
<i>Hind</i>	NEB2	37°C	5´A/AGCTT 3´	104L	Sticky-ends

**C.9. Bezugsquelle der Zelllinien**

Bezugsquelle	Zelllinie
ATCC, Manassas (USA)	MG63, humanes Osteosarcom SH2, SH3, SH4 Hybridoma
Biowhittaker, Verviers, Belgien	Humane Mesenchymale Stammzellen
DGMZ, Braunschweig	Saos2, humanes Osteosarcom
Developmental Studies Hybridoma Bank (USA)	Stro1-Hybridoma
Abt. Neurochirurgie, UKE	Humane Umbilicord Vein Endotehial Cells (Huvecs)

**C.10. Daten der untersuchten Riesenzelltumoren**

<b>Tumor</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschl -echt</b>	<b>Methoden</b>
RZT1	distale Ulna rechte Epiphyse	42	m	Zytochemie, IF, PCR
RZT2	proximale Tibia rechte Epiphyse	34	w	Resorbtion, Zytochemie PCR
RZT3	proximaler Femur rechte Epiphyse	17	w	Zytochemie, Histologie Differenzierung
RZT4	distaler Femur rechte Epiphyse	60	w	Zytochemie
RZT5	proximale Tibia rechte Epimetaphyse	47	m	Histochemie, IF, PCR
RZT6	Os ischiium links	57	w	Zytochemie, PCR, IL-1 $\alpha$ Stimulierung, cDNA Arrays
RZT7	proximale Tibia linke Epiphyse	25	m	Resorbtion, Zytochemie Histologie, PCR, Differenzierung
RZT8	distaler Radius rechte Epiphyse	63	w	Zytochemie, Histologie, PCR IL-1 $\alpha$ Stimulierung, cDNA-Arrays
RZT9	distales Femur rechte Epiphyse	32	m	Resorbtion, Zytochemie Differenzierung, IL-1 $\alpha$ Stimulierung, cDNA-Arrays, Real-Time PCR
RZT10	distales Femur linke Epiphyse	24	m	Zytochemie, Differenzierung cDNA-Arrays, Real-Time PCR
RZT11	Os Sacrum	46	m	Resorbtion, Zytochemie Differenzierung, cDNA-Arrays. Real-Time PCR
RZT12	Proximale Tibia, rechte Epiphyse	41	m	Zytochemie, Differenzierung Real-Time PCR
RZT13	distaler Femur rechte Epiphyse	24	w	Zytochemie, Real-Time PCR
RZT14	proximale Fibula, rechte Epiphyse	43	m	Zytochemie

## D. Methoden

### D.1. Kultivierung und Stimulierung der Riesenzelltumoren

#### D.1.1. Präparation von Tumorgewebe

Zur Gewinnung von Zellkulturmaterial wird Tumorgewebe mechanisch und enzymatisch zerkleinert, um einen Monolayer der RZT-Stromazellen zu erhalten. Die überschüssigen Erythrozyten werden durch eine Zentrifugation entfernt

#### Kulturmedium

Modified Eagles Medium,  $\alpha$ -Modifikation ( $\alpha$ -MEM)

10% Fötale Kälberserum (FCS)

200 mM Glutamin

100 U/ml Penicillin

100  $\mu$ g/ml Streptomycin

#### Verdauungslösung

2% Collagenase Typ 1      436 U/mg

2% Dispase                      0,5 U/mg

100 mg jedes Enzym in 500 ml  $\alpha$ -MEM+Pen/Strep lösen

filtrieren mit 0,45  $\mu$ m und 0,2  $\mu$ m Filter

#### 0,1x Trypsin-EDTA in 1X PBS Puffer

0,5 g/L Trypsin-EDTA

0,2 g/L EDTA

#### 1x PBS-Puffer: Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

9,0 g/l NaCl

0,726g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O

0,21 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

#### Durchführung

Das frische Tumorgewebe wird unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend werden 10 ml Verdauungslösung zum Tumorgewebe gegeben und die Suspension über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am

folgenden Tag wird die Zellsuspension abgenommen, bei Raumtemperatur 5 min mit 100x g zentrifugiert und mit 1x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wird das Zellpräzipitat in neuem  $\alpha$ -MEM aufgenommen und in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gegeben. Die Zellen werden dann unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen bis zu einer Zelldichte von 80-90% kultiviert. Konfluente Zellen werden mit 0,1x Trypsin-EDTA Lösung von den Flaschen gelöst. Dazu werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 5 min mit 2ml 0,1x Trypsin-EDTA Lösung bei 37°C inkubiert. Danach werden sie in einer Zelldichte von ca. 5000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät und für weitere Versuche eingesetzt.

### **D.1.2. Kryokonservierung der RZT-Stromazellen**

#### Gefriermedium

50% Fötale Kälberserum

40% Modified Eagles Medium,  $\alpha$ -Modifikation ( $\alpha$ -MEM)

10% Dimethylsulfoxid

#### Durchführung

Die Tumorzellen werden bis zur 100%igen Konfluenz bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, mit 1x PBS gewaschen und mit 10 ml 1x PBS mit einem Zellschaber aus den 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gelöst. Die Zellsuspension wird bei 100x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Gefriermedium gelöst und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **D.1.3. Osteoblastendifferenzierung der RZT-Stromazellen**

#### Osteoblastendifferenzierungsmedium

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), high Glucose

10% fötalem Kälberserum

200 mM Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

0,1 µM Dexamethason

10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat

5 mM Ascorbinsäure-Phosphat

filtrieren mit 0,45 µm und 0,2 µm Filter

### Durchführung

Die adhärennten Tumorzellen und Kontrollzellen werden mit 0,1x Trypsin-EDTA Lösung von den Flaschen abgelöst. Es werden  $2 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  bis zu einer 80% Konfluenz inkubiert. Während der vierwöchigen Inkubationszeit in Osteoblastendifferenzierungsmedium wird alle drei Tage das Medium gewechselt. Nach der vierwöchigen Stimulierung werden die Zellen für 10 min in gekühltem Methanol fixiert. Der Nachweis der Osteoblastendifferenzierung erfolgt durch von Kossa Färbung der mineralisierten Matrix und Nachweis der alkalischen Phosphatase Aktivität .

### **D.1.4. Adipozytendifferenzierung der RZT-Stromazellen**

#### Adipogenesis Induktionsmedium

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), high Glucose

1 $\mu$ M Dexamethason

0,2 mM Indomethacin

0,01 mg/ml Insulin

0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin

10% Fötale Kälberserum

100 U/ml Penicillin

100  $\mu$ g/ml Streptomycin

#### Adipogenesis Maintenance Medium

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) high Glucose

0,01 mg/ml Insulin

10% Fötale Kälberserum

100 U/ml Penicillin

100  $\mu$ g/ml Streptomycin

### Durchführung

Die Tumorzellen und Kontrollzellen werden mit 0,1% Trypsin-EDTA Lösung abgelöst. Es werden  $2 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  eingepflegt und bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  bis zu einer 80% Konfluenz inkubiert. Während der dreiwöchigen Inkubationszeit in Adipogenesis Induktionsmedium wird alle drei Tage das Medium gewechselt. Anschließend werden die Zellen sieben Tage in Adipogenesis Maintenance

Medium inkubiert. Die unstimulierten Zellen werden vier Wochen nur mit Adipogenesis Maintenance Medium kultiviert. Nach der Stimulierung werden die Zellen für 10 min in gekühltem Methanol fixiert. Der Nachweis der Adipozytendifferenzierung erfolgt durch Färbung der Fettvakuolen mit Sudanrot-Färbung und immunzytochemischen Nachweis der ppar $\gamma$ -Expression.

#### **D.1.5. Chondroblastendifferenzierung der RZT-Stromazellen**

##### Chondroblasten Induktionsmedium

DMEM high Glucose

0,1  $\mu$ M Dexamethason

0,17 mM Ascorbinsäurephosphat

0,35 mM Proline

6,25  $\mu$ g/ml Bovine Insulin

6,25  $\mu$ g/ml Transferrin

6,25  $\mu$ g/ml Selenous Acid

5,33  $\mu$ g/ml Linoleic Acid

25 mg/ml Bovine Serum Albumin

0,1  $\mu$ g/ml TGF- $\beta$ 3

##### Durchführung

Die Tumorzellen werden mit 0,1x Trypsin-EDTA Lösung abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen werden in Polystyrenröhrchen transferiert und durch eine 5 min Zentrifugation mit 150x g pelletiert. Das Pellet wird in 0,5 ml komplettem Chondroblasten Induktionsmedium resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur mit 150x g zentrifugiert. Der Ansatz wird bei 37°C, 5% CO $_2$  inkubiert und alle 2-3 Tage das Medium erneuert. Nach vierwöchiger Stimulation werden die Zellen 30 Minuten in 10% Formalin fixiert. Das Zellpellet wird in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 30 min entwässert und nach einer 30 min Xylolbehandlung in Paraffin eingebettet. Von dem Paraffinblock werden 5  $\mu$ m dicke Schnitte erstellt, die zum Nachweis chondrozytenspezifischer Marker mit Safranin O gefärbt werden. Der Nachweis des knorpelspezifischen Collagen Typ II erfolgt mittels Immunzytochemie.

### **D.1.6. Aufkonzentrierung des konditionierten Riesenzelltumor-Kulturmedium**

Zur Analyse der chemotaktisch wirksamen Faktoren, die von den Riesenzelltumorzellen in das Kulturmedium sezerniert werden, werden Zellkulturen für 48 h in serumfreiem Medium inkubiert, das Medium gesammelt und mit einer CentriprepYM-3 (Millipore) Säule aufkonzentriert.

#### Serumfreies Medium

DMEM/ HAM F12 Medium

5 ml HEPES-Puffer 25 mM

2 ml Glutamin 10 mM

2 ml Na-Pyruvat 10 mM

0,5 mg/ml Linoleic Acid Albumin

5 µg/ml Insulin

5 µg/ml Transferin

#### Durchführung

Das serumhaltige Wachstumsmedium wird von den Riesenzelltumorzellen entfernt und durch 10 ml serumfreies Medium ersetzt. Nach der 48 h Inkubationszeit wird das konditionierte Riesenzelltumormedium gesammelt. 15 ml Medium werden in eine Centriprep YM-3 Säule pipettiert. Die Säule wird 95 min bei 3000x g zentrifugiert bis eine Aufkonzentrierung auf 1 ml erreicht wird. Dieses aufkonzentrierte, konditionierte Riesenzelltumormedium wird als chemotaktisches Agens im Boyden Chamber Assays eingesetzt.

### **D.1.7. Boyden-Chamber Assay mit Huvec**

Der Boyden-Chamber Assay dient zur Testung des Migrationsverhaltens von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen. Dabei werden auf eine Seite eines Filters Zellen aufgebracht, während auf der anderen Seite des Filters sich verschiedene Testsubstanzen befinden, welche die Migration der Zellen hemmen bzw. fördern können, bzw. bei denen diese Eigenschaft abgeklärt werden soll.

#### PBS/0,1%BSA

100 ml PBS

100 mg Bovines Serumalbumin (BSA)

### Boyden-Medium

100 ml Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)

1 ml Glutamin 200 mM

1 ml Penicillin 100 U/ml

1 ml Streptomycin 100 µg/ml

1 ml Amphotericin B 250g/ml

100 mg BSA

### Durchführung

Die Boydenmembran muß am Tag vor dem Versuch mit Collagen beschichtet werden, damit die Zellen adhären können. Dazu wird 3,5 ml Vitrogen mit 100 ml 0,1% Essigsäure gemischt und der Filter bei 37°C über Nacht in der Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wird der Filter mit 1x PBS + 0,1% BSA mehrmals gewaschen und anschließend unter der Werkbank getrocknet. Als Endothelzelllinie werden humane Nabelschnur Endothelzellen (Huvec) eingesetzt. Die Huvec werden zweimal mit Boyden-Medium gewaschen. Vor der letzten Zentrifugation für 5 min bei 800x g werden die Zellen gezählt, und auf eine Anzahl von 300.000 Zellen / ml in Boyden-Medium verdünnt, das entspricht 15.000 Zellen / Well bei 96er Well für den Boyden Chamber Assay.

Das konditionierte Riesenzelltumormedium wird mit dem Boyden-Medium in einer Verdünnungsreihe von 0%-100% konditioniertem Medium verdünnt, jede Verdünnungsstufe wird als Triplet aufgetragen. Die 96-well Platte der unteren Kammer der Boyden Chamber wird mit 30 µl Riesenzelltumormedium pro Well luftblasenfrei befüllt und die Kammer verschlossen. Bei Zugabe des VEGF-Antikörpers wird dieser in der Konzentration von 20 µg/ml mit dem Riesenzelltumormedium in die Wells der unteren Kammer pipettiert. Die Huvec werden gut durchmischt jeweils 50 µl pro Well randomisiert pipettiert. Die Kammer wird für 4-5 Stunden bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die Oberseite des Filters (nicht migrierte Seite) wird mit angefeuchteten Q-Tips abgewischt, um die nicht migrierten Zellen zu entfernen. Die Zellen auf der Unterseite des Filters (migrierte Zellen) werden mit dem Diff-Quick Kit (May-Grünwald Färbung) für jeweils 3 min blau angefärbt.

Der Filter wird getrocknet, bei 40 facher Vergrößerung werden fünf große Foto-Felder pro Well ausgezählt und das Ergebnis mit 2 multipliziert. Vorher wird bei

geringerer Vergrößerung die Verteilung der Zellen in dem jeweiligen Well beurteilt. Nach dem Zählen wird die Standardabweichung innerhalb der einzelnen Triplikates berechnet und das Ergebnis graphisch ausgewertet. Die Versuche wurden in der Abteilung für Neurochirurgie, Labor für Hirntumorbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, von Dr. M. Brockmann durchgeführt und ausgewertet.

## **D.2. chemische und immunologische Färbungen der Tumorzellen**

### **D.2.1. APAAP-Methode zur Immunhistochemie und Immunzytochemie**

Die APAAP-Methode basiert auf der spezifischen Bindung eines monoclonalen oder polyclonalen Primärantikörpers an das Antigen der fixierten Zellen. Unspezifische Bindungsstellen werden durch Präinkubation in Normalserum abgeblockt. Als Brückenantikörper wird, abhängig vom Primärantikörper, ein Kaninchen- oder Maus-IgG gewählt, welcher an den Primärantikörper bindet. Anschließend bindet ein mit dem Enzym alkalische Phosphatase markierter Tertiärantikörper an den Brückenantikörper, so daß bei Zugabe des phosphorylierten Farbstoffes Naphtol-AS-MX-Phosphat eine Hydrolyse der Naphtholphosphatester zu einem Phenolderivat und freiem Phosphat auftritt. Die Phenole reagieren mit dem Diazoniumsalz Fast Red TR zu einem rot-violetten Farbstoff, so daß es zur Niederschlagsfärbung des Farbstoffs auf den Antikörperbindenden Zellen kommt. Die Bindung mehrerer alkalischer Phosphatase-markierter Antikörper an den Brückenantikörper führt zur Signalverstärkung der Immunreaktion. Die endogene alkalische Phosphatase Aktivität des Knochengewebes wird durch Zusatz von Levamisol zur Substratlösung inhibiert.

#### Saponin-Blockingpuffer

0,1 g Rinderserumalbumin

0,05 g Saponin

in 100 ml 1x PBS lösen

3,8 ml Blockingpuffer mit 200 µl Normal Goat Serum mischen

#### Verdünnungspuffer für Antikörper

1% Rinderserumalbumin in RPMI-Medium

3,8 ml Verdünnungspuffer mit 200 µl Normal Goat Serum mischen

### Neufuchsin-Farblösung

1 Tris-Puffertablette in 1 ml H<sub>2</sub>O dest. lösen

1 Puffertablette Neufuchsin zugeben, lösen

### Durchführung

Die Tumorzellen und die Kontrollzellen werden bei 37°C bis zur Semikonfluenz von 50-70% in Multiwell-Kulturschalen kultiviert. Alternativ dazu wird Tumormaterial nach der Entnahme in Stickstoff gefroren und mit einem Kryostaten 0,3-0,5 µm dünne Schnittpräparate angefertigt. Sowohl die Zellen als auch die Gefrierschnitte werden 10 min bei Raumtemperatur in gekühltem Methanol fixiert. Für den Antikörper Stro1 wird der Fixierungsschritt auf 1 min gekürzt, um die Antigenbindungsstelle zu erhalten. Die unspezifischen Bindungsstellen werden durch eine 20 min Inkubation in Blockingpuffer bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgt eine 30 min Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper in der angegebenen Verdünnung. Der überschüssige Antikörper wird mit 1x PBS abgewaschen und die Präparate 30 min mit dem Sekundärantikörper, der bei monoklonalen Primärantikörpern ein 1:50 verdünnter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (Z412) ist, inkubiert. Bei polyklonalen Primärantikörpern wird zuerst 30 min ein 1:50 verdünnter Maus-Anti-Kaninchen Antikörper (M737) und nach einem Waschschrift mit 1x PBS 30 min ein Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (Z412) eingesetzt. Nach Entfernung des Sekundärantikörpers mit 1x PBS werden die Präparate 30 min mit dem 1:50 verdünnten alkalische Phosphatase-markierten Anti-Maus IgG inkubiert, mit 1x PBS gewaschen und 25 min mit der Farblösung gefärbt. Bei Bindung des Primärantikörpers tritt eine Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase und eine rote Niederschlagsfärbung auf den Zellen auf, die lichtmikroskopisch ausgewertet und dokumentiert wird. Zur besseren Übersicht wird eine Kernfärbung der Gefrierschnitte für 5 min mit Mayers Hämalaun durchgeführt und die Zellen 10 min in Leitungswasser gebläut. Zur Auswertung wird die Intensität der Färbung und die Menge der gefärbten Zellen beurteilt, um verschiedenen Zelltypen und die Anzahl der Tumorzellen im Präparat zu identifizieren.

### **D.2.2. Enzymnachweis der alkalischen Phosphatase Aktivität mit dem Sigma alkalische Phosphatase Kit**

Das Enzym alkalische Phosphatase wird in Präosteoblasten und Osteoblasten exprimiert und dient als Nachweis Matrix-bildender Osteoblasten in Knochengewebe und Zellkulturen.

#### Alkalische FRV/FBB Lösung

5 mg/ml Fast red violet LB salz in 0,4 mol/L HCL

5 mg/ml Fast blue BB salz in 0,4 mol/L HCL

#### Alkalische Phosphatase Farblösung

1 ml Natrium Nitrit, 0,1mol/L

1 ml FRV/FBB Alkalische Lösung: 5mg/mlFast red violet LB salz,  
45 ml H<sub>2</sub>O dest.

1 ml Naphtol AS-Bi Alkalische Lösung, 4mg/ml, pH 9,5

#### Durchführung

Die Natriumnitritlösung und die alkalische FRV/FRB Lösung werden durch invertieren gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in 45 ml Wasser mit der Naphtol AS-BI Lösung gemischt und sofort zur Farbreaktion eingesetzt. Die fixierten Zellen oder Gefrierschnitte werden 15 min in der Farblösung gefärbt, anschließend 2 min in H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und 2 min mit Hämaun gefärbt. Die Hämaunfärbung wird 10 min in Leitungswasser gebläut und die Präparate in wässrigem Eindeckmittel (Mounting Medium) eingedeckt. Die Beurteilung der alkalischen Phosphatase Reaktion erfolgt anhand der roten Niederschlagsfärbung in den blau gefärbten Zellen.

### **D.2.3. Enzymnachweis der tartrat-resistenten sauren Phosphatase Aktivität**

Der Nachweis der Enzymaktivität der tartrat-resistente sauren Phosphatase, beruht auf der hydrolytischen Aktivität des Enzyms in sauren pH-Werten unter 5. Während die unspezifisch saure Phosphatase auch in Makrophagen nachgewiesen werden kann, ist nur der Enzymkomplex der Osteoklasten in der Lage, auch bei Zugabe von Tatratt Phosphatbindungen zu hydrolysieren. In vitro wird die Enzymaktivität durch Hydrolyse des phosphorylierten Farbstoffes

Naphthol-AS-MX-Phosphat in ein Phenolderivat und freies Phosphat nachgewiesen. Die Phenole reagieren mit dem Diazoniumsalz Fast Red Violett LB-Salz zu einem rot-violetten Farbkomplex.

#### TRAP-Puffer, pH 5,0

40 mM Na-Acetat 3,28g/l

10 mM Na-Tartrat 2,3g/l

#### Farblösung

1mg Napthol-AS-MX-Phosphat in 100 µl N-N-Dimethylformamid lösen

add. 10 ml TRAP-Puffer

add. 6 mg Fast-Red-Violet LB-Salz

#### Durchführung

Die Tumorzellen werden mit 0,1x Trypsin-EDTA Lösung abgelöst. Es werden 2 x 10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> auf sterile Deckgläser in Multiwell-Zellkulturschalen ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> bis zu einer 60-70% Konfluenz inkubiert. Die Zellen werden in kaltem Methanol 10 min fixiert. 200 µl der Farblösung werden auf jedes Deckglas pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die überschüssige Farblösung wird mit 1x PBS abgewaschen, die Deckgläser werden mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckt und die Intensität der Farbreaktion im Durchlichtmikroskop beurteilt.

#### **D.2.4. von Kossa Färbung der mineralisierten Matrix**

Die von Kossa Färbung beruht auf dem Austausch der Kalziumionen in der mineralisierten extrazellulären Matrix des Knochengewebes durch Silberionen, die durch UV-Bestrahlung zu elementarem Silber reduziert werden, wodurch es zu einer Schwärzung der kalzifizierten Areale kommt. Diese Färbung dient zum Nachweis von aktiven Osteoblasten. Die Gegenfärbung mit dem Anilinfarbstoff Kernechtrot beruht auf der Bildung eines Farblackes mit Aluminumsulfat, der die Kerne rot anfärbt.

#### 1% Silbernitratlösung

1g Silbernitrat in 100 ml Wasser lösen

### Kernechtrotlösung

1% Aluminiumsulfatlösung in Wasser

0,1% Kernechtrotlösung aus 0,1 g Farbstoff in 100 ml 1% Aluminiumsulfatlösung herstellen und 1 Tropfen Eisessig zugeben.

### Durchführung

Die Zellen werden 10 min in kaltem Methanol fixiert und mit H<sub>2</sub>O dest. abgespült. Die 1% Silbernitratlösung wird auf die Zellen pipettiert und für 10 min mit UV-Licht bestrahlt, bis eine Schwarzfärbung der mineralisierten Strukturen auftritt. Es folgt eine 5 min Gegenfärbung mit Kernechtrot.

### **D.2.5. Färbung von Lipidvakuolen mit Scharlachrot**

Die Anfärbung der Lipide mit dem Diazofarbstoff Scharlachrot ist eine rein physikalische Färbung und beruht auf der besseren Löslichkeit des Farbstoffes in Lipiden, so daß er aus niedrig konzentrierten alkoholische Lösungen in die Fettzellen diffundiert.

### Azeton-Scharlachrot-Lösung

Scharlachrot wird bis zur Sättigung in einem Gemisch aus 50% Alkohol/Aceton gegeben. Vor jedem Gebrauch wird die Lösung filtriert.

### Durchführung

Die Zellen werden vor der Färbung durch eine 3 min Behandlung mit 50% Alkohol permeabilisiert, bevor sie 10 min in der Scharlachrotlösung gefärbt werden. Anschließend werden die Zellen mit 50% Alkohol abgespült und die Kerne durch eine 5 min Gegenfärbung mit Meyers-Hämalaun dargestellt, wodurch die roten Fettvakuolen im Cytoplasma der Zellen gut vom blau angefärbten Hintergrund zu unterscheiden sind.

### **D.2.6. Safranin O Färbung der Proteoglykane**

Safranin O ist ein positiv geladener Azinfarbstoff, mit einem Absorptionsmaximum bei 530 nm Wellenlänge. Der Farbstoff bewirkt eine unspezifische Färbung durch stöchiometrische Bindung des Farbstoffes an saure Gruppen, wodurch Kerne,

aber auch Grundsubstanzen wie Glycosaminoglykane und Proteoglykane, angefärbt werden.

#### Durchführung

1g Safranin O wird in 100 ml Ethanol gelöst und nach Zugabe von 50 ml aqua dest. gemischt. Die Schnitte werden 24 h in der Farblösung inkubiert und anschließend in 1% HCL-Ethanol differenziert. Die Gegenfärbung der Präparate erfolgt für 2-3 min in Mayers Hämalaun mit anschließendem 10 min bläuen in Leitungswasser. Die Zellkerne sind dunkelblau und die Knorpelgrundsubstanz rot angefärbt.

#### **D.2.7. Kernfärbung mit Hämalaun**

Der Farbstoff Hämalaun ist ein Di-Kaliumsulfat oder Di-Aluminumsulfat (Alaun) des Hämatoxylin, das Komplexerbindungen mit den Aluminiumionen eingeht. Hämalaun ist ein positiver Farbstoff, der an saure Strukturen bindet. Die selektive Kernfärbung wird durch eine Ansäuerung der Färbelösung erreicht, wodurch sich das positiv geladene Hämalaun mit den Phosphatgruppen der DNA verbindet. Durch die pH Wert Änderung über pH3 wird die Farbe stabilisiert, da der Farbstoff im alkalischen Milieu schlecht löslich ist. Die Kerne werden dunkelblau angefärbt.

#### Durchführung

Die Zellen oder Gefrierschnitte werden 10 min in kaltem Methanol fixiert und mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen. Die Färbung mit Mayers Hämalaun dauert 5-7 min, bis die Zellkerne rot-violet gefärbt sind. Der Farbstoff wird mit H<sub>2</sub>O dest. abgespült und 10 min in Leitungswasser gebläut. Die Präparate werden mit wässrigem Eindeckmittel eingedeckt.

#### **D.2.8. Immunfluoreszenz**

Das Prinzip der Immunfluoreszenz beruht auf der Bindung von spezifischen Antikörpern an ihr Antigen auf oder innerhalb der Zellen. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt durch Bindung eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers, der speziesspezifisch das Fc-Fragment des Primärantikörpers erkennt. Durch Einsatz von monoklonalen und polyklonalen Primärantikörper, die von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten

Sekundärantikörpern gebunden werden, kann eine Doppelfärbung der Tumorzellen mit den Proliferationsmarkern und Differenzierungsmarkern im gleichen Präparat durchgeführt werden

#### 0,0025% Digitonin-Gebrauchslösung

10 µl der 100% Stammlösung mit 10 ml 1x PBS-Puffer +  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  verdünnen

#### 1x Waschpuffer

1x PBS +  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  mit 0,1% Tween

über Nacht bei 37°C schütteln

#### 2% Blockingpuffer

1g Milchpulver in 50 ml 1x PBS +  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  lösen

über Nacht bei 37°C schütteln, mit Faltenfilter filtrieren

#### Verdünnungspuffer für Antikörper

1% Milchpulver und 0,1% Tween in 1x PBS+  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

über Nacht bei 37°C schütteln, mit Faltenfilter filtrieren

#### Durchführung

Die konfluenten Zellen werden nach dem Lösen mit 0,1x Trypsin-EDTA auf Chamberslides ausgesät, über Nacht bei 37°C inkubiert und mit 3,7% PBS-gepuffertem Formaldehyd 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrift in 1x PBS +  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  werden die Zellen mit 0,0025% Digitonin-Gebrauchslösung 9 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die unspezifischen Bindungen werden durch eine 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit Blockingpuffer blockiert. Die monoklonalen Primärantikörper SH2 und SH4 werden unverdünnt eingesetzt, der ALCAM/CD166 Antikörper wird in 200 µl Verdünnungspuffer verdünnt, zuerst 30 min bei Raumtemperatur, dann 30 min bei 37°C inkubiert. Der FITC-markierte Ziege Anti-Maus Antikörper wird 1:25 verdünnt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als zweiter Primärantikörper wird der polyklonale Kaninchen Anti-Human Antikörper MDM2 30 min bei Raumtemperatur und 30 min bei 37°C inkubiert. Der TRITC-markierte Ziege Anti-Kaninchen Antikörper wird 1:400 verdünnt und 1h bei 37°C inkubiert. Zwischen den Antikörperinkubationen wird die Probe jeweils 3x mit dem Waschpuffer gewaschen. Es folgt eine 5



2,5 µl DNase I (1 U/µl )

17,5 µl H<sub>2</sub>O dest.

Der Reaktionsansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 30 min werden 10 µl DNase Inactivation Reagent (Ambion) zu dem DNase Ansatz pipettiert und invertiert. Durch 2 min Zentrifugation mit 10000x g bei Raumtemperatur wird die DNase pelletiert und der RNA-haltige Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Kontrolle des Reinheitsgrades wird eine Gelelektrophorese der RNA durchgeführt.

### **D.3.2. Gelelektrophorese zur Auftrennung von Gesamt-RNA**

Zur Untersuchung der RNA wird ein formaledyhdhaltiges Agarosegel gegossen. Der Zusatz von Formaldehyd verhindert den Abbau der RNA-Proben durch ubiquitär vorhandene RNAsen. Die Qualität der Gesamt-RNA ist an der Konzentration der 18S- und 28S ribosomalen RNA (rRNA) Banden erkennbar, die bei einer Größe von 1,9 kb bzw. 5,0 kb bandieren. Bei der Präparation sollte die Konzentration der 28S-RNA doppelt so hoch wie die der 18S-rRNA sein.

#### 5x Formaldehyd- Laufpuffer

0,1 M MOPS-Puffer, pH 7,0,

40 mM Natriumacetat,

5 mM EDTA, pH 8

pH mit 2 m NaOH auf 7,0 einstellen

sterilfiltrieren und in dunkler Flasche aufbewahren

#### Gelladepuffer

0,03% Bromphenolblau

40% Glycerin in H<sub>2</sub>O dest

#### Durchführung

Für ein 1% Gel werden 1g Agarose in 60 ml H<sub>2</sub>O dest. aufgekocht, mit 20 ml 5 x Formaldehyd-Laufpuffer, 18 ml 37% Formaledyhd und 5 µl der 10 µg/ml Ethidiumbromidlösung gemischt und ein ca. 0,5 cm dickes Agarosegel gegossen. 3 µl jeder RNA-Probe wird mit 2 µl Gelladepuffer gemischt und das Gel in 1x

Formaldehyd-Laufpuffer bei 70 V für 2 h unter einem Abzug elektrophoretisch aufgetrennt.

### **D.3.3. Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion (PCR) mit dem Titan OneStep RT-PCR-Kit**

Das Enzym AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transkriptase benutzt RNA als Template zur cDNA-Synthese. Diese cDNA wird in der folgenden PCR-Reaktion als Template der Taq (Thermus aquaticus) DNA-Polymerase genutzt, um mit spezifischen Primern das gesuchte Gen zu amplifizieren.

#### 1. Mastermix

pro Reaktionsansatz

2 µl Primer, 10 µM

4 µl dNTP, 10 mM

2 µl DTT

10 µl H<sub>2</sub>O dest.

#### 2. Mastermix

pro Reaktionsansatz

14 µl H<sub>2</sub>O dest.

10 µl Reaktionspuffer

1 µl Enzymmix

Es werden zuerst beide Mastermixe hergestellt. Je 20 µl Mastermix 1 wird mit 5 µl Gesamt-RNA gemischt, bevor 25 µl Mastermix 2 zugeben wird. Der Ansatz wird abzentrifugiert und im Perkin Elmer GeneAmp™ 950 Thermocycler unter folgenden Reaktionsbedingungen inkubiert.

#### Reaktionsbedingungen

30 min 50 °C, Reverse Transkription

5 min, 95°C

1 min, 95°C

1 min, 55°C - 58°C primerspezifisch } 30 Zyklen

2 min, 68°C

7 min 68°C

Die Größe der PCR-Fragmente wird in einem 1,5% Agarosegel überprüft.

### **D.3.4. Atlas human Cancer 1.2 c-DNA Arrays**

Die Atlas cDNA Arrays (Clontech) sind Macroarrays, bei denen 200-600 bp lange cDNA-Fragmente verschiedener Genfragmente auf einer Nylonmembran immobilisiert wurden. Der von uns genutzte Atlas human Cancer 1,2 Array liefert

1,176 DNA-Fragmente, deren Relevanz in der Tumorbiologie und Tumorentstehung bekannt ist. Zur Quantifizierung der Expression sind ebenfalls einige Haushaltsgene auf den Arrays vorhanden. Aus der Gesamt-RNA der RZT-Stromazellen und der mesenchymalen Stammzellen wird mit Hilfe von Oligo-dT magnetischen Beads PolyA-RNA isoliert. Diese wird mit einem Primermix, der den Genen des Arrays angepaßte Oligonukleotidprimer enthält, in cDNA transkribiert, die während der reversen Transkription mit radioaktiven Phosphat markiert wird. Nach Hybridisierung der radioaktiv markierten Probe an den Array erfolgt die Auswertung der gebundenen DNA im Phosphorimager, so daß eine quantitative Auswertung der Daten durch Einsatz der Atlas Image 2.0 Software (Clontech) ermöglicht wird. Die Schwärzung der Signale aller Arrays wird gemessen und miteinander verglichen. Der Intensitätsabgleich erfolgt über die Expression der Haushaltsgene, die für jeden Array normiert werden muß.

#### Puffer für Hybridisierung

Waschpuffer 1 : 2 x SSC, 1 % SDS

Waschpuffer 2 : 0,1x SSC, 0,5 % SDS

20x SSC : 175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat, auf 1 l H<sub>2</sub>O dest. , pH 7,0

20% SDS : 200g Natriumdodecylsulfat auf 1 l H<sub>2</sub>O dest.

#### Atlas Pure Poly A-RNA Isolation System

Zur Isolierung von PolyA-RNA wird die mit Trizol gewonnenen Gesamt-RNA eingesetzt.

#### Streptavidin-Magnetic Bead Preparation

Die Streptavidin-gekoppelten magnetischen Beads werden resuspendiert. Pro eingesetzter Probe werden 15 µl Beads in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aliquotiert und mit 400 µl 1x Binding-Puffer gewaschen. Die Beads werden im Magnetfeld abgetrennt und der Puffer abpipettiert. Dieser Waschschrift wird 3x wiederholt. Anschließend werden die Beads in 15 µl 1x Binding-Puffer resuspendiert.

### Poly-A-RNA Anreicherung der mRNA

Es werden 25 µl Gesamt-RNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aliquotiert und mit 20 µl H<sub>2</sub>O dest. auf eine Gesamtvolumen von 45 µl aufgefüllt. 1 µl biotinylierte Oligo-dT Primer werden mit der RNA gemischt und 2 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Die Probe wird für 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor 45 µl 2x Bindungspuffer zugegeben wird. 15 µl gewaschene Streptavidin-gekoppelte magnetische Beads werden resuspendiert und zu jeder RNA-Probe gegeben. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur mit 1500 rpm für 25-30 min auf einem Thermomixer (Eppendorf) gemischt. Die an die magnetischen Beads gebundene PolyA-RNA wird im Magnetfeld aufgetrennt, der Überstand abpipettiert und die Beads in 50 µl 1x Waschpuffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wird dreimal wiederholt. Anschließend werden die PolyA-RNA Beads in 6 µl H<sub>2</sub>O dest. resuspendiert und zur cDNA Synthese verwendet.

### cDNA-Synthese

Zuerst wird ein Mastermix für alle radioaktiven Markierungsreaktionen erstellt.

pro Reaktion werden

4 µl	5x Reaktionspuffer
0,5 µl	100 mM DTT
2 µl	10x dNTP-Mix
5 µl	α <sup>32</sup> dATP ( 3000 Ci/mmol, 10µCi/µl )
2µl	Reverse Transkriptase

miteinander gemischt. Die 6 µl PolyA-RNA-Beads werden mit 1 µl CDS-Primer gemischt, 2 min bei 70°C in einem PCR-Thermocycler (Robocycler Gradient 40, Stratagene) inkubiert und für 2 min auf 50°C gekühlt. Jeweils 13,5 µl Mastermix werden zu jedem Beads-Primer-Mix pipettiert und für 25 min bei 50°C inkubiert.

Zur Beendigung der reversen Transkription werden 2 µl Terminationsmix zugegeben und der Ansatz 5 min bei 70°C inkubiert

### Säulenchromatographie

Zur Abtrennung von nicht inkorporiertem, radioaktiv markierten Phosphat wird eine Säulenchromatographie durchgeführt. Der Reaktionsansatz der cDNA Synthese wird im Magnetfeld von den magnetischen Beads abgetrennt und mit 180 µl NT2-

Puffer verdünnt. Die 200 µl Probe werden auf eine NucleoSpin Säule pipettiert und 1 min bei 15.000x g zentrifugiert. Die cDNA bindet bedingt durch das Puffermilieu an das Säulenmaterial, während ungebundene Nukleotide in dem dreimaligen Waschschrift mit 400 µl NT3-Puffer durch 1 min Zentrifugation bei 15.000x g entfernt werden. Die cDNA wird mit 100 µl NE Puffer und durch eine Zentrifugation für 1 min bei 15.000x g von der Säule eluiert und die Aktivität der Probe im Scintillationszähler gemessen. Die Probe sollte mindestens eine Aktivität von 5-20x 10<sup>6</sup> cpm aufweisen.

#### Hybridisierung der cDNA an die Atlas human Cancer 1.2 Arrays

Die angefeuchteten Atlas Arrays werden luftblasenfrei in den Hybridisierungszylinder transferiert. Pro Array werden 10 ml ExpressHyb Hybridisierungslösung auf 68°C vorgewärmt. 1 mg Heringssperma-DNA werden 5 min auf 100°C erhitzt, mit der Hybridisierungslösung gemischt und in den Hybridisierungszylinder pipettiert. Es folgt eine 30 minütige Präinkubation der Arrays bei 68°C unter ständiger Rotation im Hybridisierungsschrank.

Die P<sup>32</sup>-markierte cDNA Probe wird mit 5µl C<sub>0</sub>t-1 DNA gemischt, 2 min bei 100°C aufgekocht und 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wird die markierte Probe direkt in die Hybridisierungslösung in den Hybridisierungszylinder pipettiert und über Nacht bei 68°C unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wird der Array dreimal für je 30 min mit Waschlösung 1 bei 68°C inkubiert, darauf folgt ein 30 min Waschschrift mit höherer Stringenz in Waschlösung 2, ebenfalls bei 68°C. Der Array wird mit 2x SSC für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und in Plastikfolie gewickelt.

Die Auswertung erfolgt nach zwei Tagen mit einem Phosphorimager und nach zweiwöchiger Belichtung bei -70°C auf einen Röntgenfilm. Der Vergleich der Arrays mit den Kontrollzellen erfolgt mit Hilfe der Atlas Image 2.0 Auswertungssoftware.

Zur weiteren Verwendung kann die markierte cDNA durch Strippen der Arrays entfernt werden. Dazu werden 500 ml 0,5% SDS aufgekochen und die Array für 10 min in das kochende SDS gegeben. Die Lösung wird 10 min abgekühlt und der Array in Waschlösung 1 gewaschen. Wenn noch Radioaktivität meßbar ist, wird der Vorgang wiederholt. Der Array kann entweder für die nächste Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C in Plastikfolie gelagert werden.

## D.4. Isolierung und Nachweis von DNA

### **D.4.1. cDNA-Synthese mit dem Ready To Go You-Prime Kit**

Zur quantitativen Analyse der RNA Expression wird diese durch das Enzym Reverse Transkriptase in Gesamt cDNA kopiert. Dazu werden Hexamere Oligonukleotide, die an statistisch im Genom verteilten komplementären Sequenzen binden, als Primer eingesetzt, um eine quantitative Aussage über die RNA Expression zu ermöglichen.

#### **Durchführung**

Es werden 5 µg Gesamt-RNA in 32,5 µl aqua dest. gelöst und für 10 min bei 65°C zur Aufschmelzung von Sekundärstrukturen inkubiert. Nach 2 min auf Eis wird die RNA zum kompletten Reaktionsansatz pipettiert. Nach Zugabe von 0,7 µl Random Primern wird der Ansatz gemischt und 1h bei 37°C inkubiert. Die neu synthetisierte cDNA wird für weitere Analysen wie PCR genutzt.

### **D.4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit dem Taq PCR Core Kit**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion bietet die Möglichkeit, durch Auswahl zweier spezifischer Oligonukleotidsequenzen, die einen Bereich des gesuchten Zielgenes flankieren, diese DNA Sequenz selektiv zu amplifizieren. Das Enzym taq- (Thermus aquaticus) Polymerase ist thermostabil, so daß es auch bei der Denaturierung des DNA-Doppelstranges in Einzelstrang-DNA aktiv bleibt und nach Anlagerung der Primer den komplementären Doppelstrang synthetisiert, wodurch eine logarithmische Zunahme der Ausgangs-DNA auftritt. Die Größe des gesuchten PCR-Produktes wird in einem 1,5% Agarosegel überprüft.

#### **50 µl Reaktionsansatz**

1 µg Template DNA  
0,1 µM forward Primer  
0,1 µM reverse Primer  
1 µl dNTP-Mix 200 µM  
10 µl Q-Solution  
5 µl 10x PCR-Puffer  
0,25 µl taq-Polymerase  
26,75 µl H<sub>2</sub>O dest

Pro Reaktionsansatz werden 5 µl cDNA in PCR Eppis vorgelegt und mit 45 µl Reaktionsansatz gemischt. Der Gesamtansatz wird abzentrifugiert und in einem Perkin Elmer GeneAmp™ 950 Thermocycler unter folgenden Reaktionsbedingungen inkubiert.

#### Reaktionsbedingungen

5 min, 95°C

1 min, 95°C

1 min, primerspezifische Temperatur

2 min, 72°C

7 min 72°C

} 30 Zyklen

Die Konzentration und Größe der PCR-Produkte wird in einem 1,5 % Agarosegel überprüft.

#### **D.4.3. Agarose -Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese kann sowohl zur analytischen Auftrennung von Nucleinsäuren als auch bei der präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt werden. Die verwendeten Agarose-Konzentrationen sind von der Größe der aufzutrennenden Nucleinsäuren abhängig. Zur Isolierung von der PCR-Produkte wird ein 1,5% Agarosegel hergestellt, zur Auftrennung der Plasmid-DNA werden 1% Gele eingesetzt. 5 µl Proben-DNA werden 2 µl Gelladepuffer gemischt. Die Gele werden in 1x TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt und mit 5 µl der 10 µg/ml Ethidiumbromid pro 100 ml Lösung gefärbt. Die Laufbedingungen für einen 13 cm x 15 cm Gelträger waren 100 V, 80 mA für 2 h. Im Anschluß an die Elektrophorese werden die Gele im UV-Durchlicht bei 345 nm Wellenlänge mit einem „Intas“ Geldokumentationsgerät fotografiert.

#### Tris-Bor-EDTA-Puffer : TBE

10,8 g/L Tris-Base

5,5 g Borsäure

9,3 g/L EDTA

pH, 7,3-7,5

#### **D.4.4. Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Um reine DNA für Klonierungen oder Sequenzierungsreaktionen zu gewinnen, werden die PCR-Produkte auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Bindung an eine Sepharosesäule aufgereinigt.

##### Durchführung

Die PCR-Produkte der erwarteten Größe werden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht des DNA-Fragmentes wird bestimmt und pro 100 mg Gel/DNA werden 300 µl QG-Puffer zugegeben. Der Ansatz wird 10 min bei 50°C unter schütteln inkubiert, bis die Agarose gelöst ist. 800 µl der in QG-Puffer gelösten Agarose werden auf eine Quiagen-Gelextraktionssäule pipettiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Nach 1 min Zentrifugation bei 13.000x g wird der Durchlauf verworfen und die restliche Agarose auf die Säule pipettiert. Der Zentrifugationsschritt wird wiederholt, die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend die DNA mit 30 µl durch eine 1 min Zentrifugation bei 13.000 rpm in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

#### **D.4.5. Aufreinigung von PCR-Produkten**

Vor der Klonierung der PCR-Produkte werden diese mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt, um überschüssige Primer, Nukleotide und Enzyme abzutrennen.

##### Durchführung

Der 50 µl PCR-Reaktionsansatz wird mit 250 µl PB-Puffer gemischt. Der gesamte Ansatz wird auf eine Qiaquick Säule pipettiert und 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Die Säule wird mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend nochmal 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und das PCR-Produkt mit 30 µl EB Puffer oder H<sub>2</sub>O dest. durch eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000x g eluiert. Die gereinigte PCR wird direkt zur Klonierung eingesetzt.

### **D.4.6. Transformation von E.coli**

Zur Klonierung wird der TA-Kloning Kit (Invitrogen) eingesetzt. Das zur PCR verwendete Enzym taq-Polymerase besitzt eine Terminale Transferase Aktivität, welche Template unspezifisch ein Desoxyadenosin an das 3'-Hydroxyende jedes PCR-Produktes anhängt. Der pCR2.1 Vektor ist bereits linearisiert und hat in seiner „multiple cloning side“ einzelsträngige Desoxythymidin Enden. Die Ligation des PCR-Produktes in den pCR2.1 Vektor erfolgt durch das Enzym T4-DNA Ligase. Die zirkuläre Plasmid-DNA wird in chemisch kompetente E.coli INV $\alpha$ F<sup>-</sup> transformiert. Das Plasmid kodiert eine Ampicillinresistenz, so daß die Transformanten auf Ampicillin-haltigem Medium selektiert werden. Außerdem kodiert der Plasmidvektor das LacZ-Fragment, in dem die multiple cloning side liegt. Nach Insertion des PCR Produktes kommt es zur Inaktivierung des LacZ Fragmentes. Die Transformanten sind nicht in der Lage, daß Enzym  $\beta$ -Galactosidase zu synthetisieren und die Glycosidbindung des Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -d-Galactopyranosid zu spalten und bilden keinen blauen Indolfarbstoff. Sie wachsen in weißen Kolonien auf den Agarplatten.

#### LB-Medium

1% Trypton                    10 g/l

0,5 % Yeast-Extrakt      5 g/l

1% NaCl                    10 g/l

pH 7,0

für Agarplatten 15 g/l Agar zugeben, autoklavieren,

50  $\mu$ g/ml (50 mg/l) Ampicillin zugeben

#### X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml)

40 mg X-Gal (Sigma) in 1 ml N,N-Dimethylformamid lösen

im Dunkeln bei -20°C lagern

40  $\mu$ l der Stammlösung auf die LB-Platten geben

15 min trocknen lassen

#### Durchführung :

10 $\mu$ l Ligationsansatz herstellen aus

2  $\mu$ l frisch synthetisiertes PCR-Produkt

2 µl Vektor pCR 2.1

1 µl Ligationspuffer

4 µl H<sub>2</sub>O dest.

1 µl T4-DNA-Ligase (4,0 U)

herstellen und über Nacht bei 14°C ligieren.

Von dem Ligationsansatz werden 2 µl abgenommen und in 50 µl E.coli INVλF<sup>-</sup>-Zellen

transformiert. Dazu werden die Zellen mit der DNA 30 min auf Eis inkubiert und dann

30 sec bei 42 °C erhitzt . Nach einer weiteren Inkubation fü 20 min auf Eis werden 250 µl SOC-Medium zu jedem Ligationsansatz gegeben und 1 h bei 37°C mit 200 rpm horizontal geschüttelt. Jeweils 50 µl und 200 µl des Ansatzes werden auf Ampicillin und X-Gal haltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die weißen Kolonien werden mit einem Zahnstocher von den Platten abgenommen und sowohl auf einer neuen LB-Platte als auch als Flüssigkulturen für Klonanalysen eingepft.

#### **D.4.7. Klonanalyse mit dem Qiaprep Spin Mini Kit**

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt nach Aufschluß der Bakterien mit SDS-haltigen Puffern über die Bindung an eine Silizium Säule.

##### Durchführung

5 ml Übernachtkultur der transformierten E.coli INVαF<sup>-</sup> wird 5 min bei 10.000x g zentrifugiert. Das Pellet wird in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und mit 250 µl P2-Puffer durch invertieren gemischt. Der Ansatz wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 350 µl Quiagenpuffer 3 gemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000x g wird der Überstand auf eine Qiaprep Säule pipettiert und 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Die Säule wird zuerst mit 500 µl PB Puffer und anschließend mit 750 µl PE-Puffer gewaschen, bevor die DNA mit 50 µl EB-Puffer durch 1 min Zentrifugation bei 10.000x g in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert wird. Zur Beurteilung der Insertgröße wird die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert.

#### **D.4.8. Hydrolyse der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische palindrome Nukleotidsequenzen und hydrolysieren die Phosphodiesterbindung der DNA innerhalb der Erkennungssequenz, so daß entweder „blunt-ends“ oder überstehende 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl-Enden entstehen. Die Erkennungssequenzen der verschiedenen Restriktionsenzyme liegen in der "multiple cloning side" des Vektors pCR2.1.

##### 20 µl Restriktionsansatz

0,5 µl Plasmid-DNA

2 µl 10 x Restriktionspuffer

1 µl Restriktionsenzym

14 µl H<sub>2</sub>O dest.

Der Ansatz wird 1 h bei 37°C inkubiert. Das PCR-Produkt kann mit einer Restriktionsendonuklease vom Vektor getrennt und die Größe in einem Agarosegel überprüft werden.

#### **D.4.9. Plasmid-Isolierung mit Qiagen Maxi-Preps**

Zur Isolierung von großen Plasmidmengen wird der Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Isolationsbedingungen gleichen dem Qiaprep Spin Mini Kit. Die Plasmid-DNA wird nach Aufschluß der Zellen an eine Säulenmatrix gebunden und nach Abtrennung von Verunreinigungen durch Änderung der Pufferbedingungen eluiert.

##### Durchführung:

100 ml Übernachtkultur der transformierten E.coli INV $\alpha$ F<sup>-</sup> werden bei 6.000x g für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml P1-Puffer resuspendiert, mit 10 ml P2-Puffer gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml P3-Puffer werden die Proben 20 min auf Eis inkubiert und bei 20.000x g 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wird auf eine Qiagen 500 Säule aufgetragen, die zuvor mit 10 ml QBT Puffer equilibriert wurde. Nachdem die Probe durchgelaufen ist, wird die Säule mit 60 ml QC Puffer gewaschen, anschließend wird die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wird mit 10.5 ml Isopropanol

durch eine 30 min Zentrifugation mit 15.000x g gefällt, das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und in 100-500 µl H<sub>2</sub>O dest. gelöst.

#### **D.4.10. Cycle Sequenzierung der transformierten DNA-Fragmente**

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Basierend auf dem Prinzip der PCR-Reaktion wird die Plasmid-DNA als Template genutzt und durch das Enzym Apli-Taq DNA Polymerase amplifiziert. Der neu synthetisierte DNA-Doppelstrang wird durch Verwendung der BigDye Primer mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Reaktionsansätze werden anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamidgel auf einem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer elektrophoretisch aufgetrennt.

#### **Durchführung**

Zur Amplifizierung des Inserts wurde eine PCR-Reaktion DNA mit den spezifischen Primern auf der isolierten Plasmid-durchgeführt.

Es werden 500 ng Plasmid und 15 pmol des spezifischen Primers pro PCR-Reaktion eingesetzt.

#### **20 µl Reaktionsansatz**

0,5 µl Primer

2 µl Big Dye Farbstoff

6 µl Half Therm Puffer

2 µl DNA in H<sub>2</sub>O dest.

9,5 µl H<sub>2</sub>O dest.

#### **Reaktionsbedingungen**

96°C	10 sec	} 25 Zyklen
50°C	5 sec	
60°C	4 min	

Zur Abtrennung von nicht gebundenen Nukleotiden und Oligonukleotiden wird die Sequenzierreaktion mit DyEx-Säulen aufgereinigt.

#### **Durchführung :**

Die Säulen werden 3 min bei 2.000x g zentrifugiert. Anschließend wird die gesamte Sequenzierreaktion direkt auf die Säule pipettiert und 3 min bei 2.000x g zentrifugiert. Das Eluat wird mit 45 µl absolutem Ethanol durch eine Zentrifugation für 20 min bei 10.000x g gefällt, daß Ethanol entfernt und das Pellet getrocknet.

Die Auftrennung der Proben auf einem Polyacrylamid-Sequenziergel erfolgte durch den Sequenzierservice des Institutes für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, (Prof. Richter), Universitätskrankenhaus Eppendorf. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Blastn (Altschul et al., 1997) für Nukleinsäuren mit aktuellen Datenbankeinträgen "GenBank R" (Benson et al., 2000) des Nationale Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, verglichen, um zu überprüfen, ob die Sequenz des untersuchten PCR-Fragmentes mit dem gesuchten Gen übereinstimmt.

#### **D.4.11. Real Time PCR**

Die Methode der Real-Time PCR dient zur quantitativen Messung von PCR Produkten, um eine Aussage über die Ausgangskonzentration der mRNA zu erhalten. Dazu wird die mRNA der Tumore und Kontrollzellen mit dem „Ready to Go You Prime Kit“ in cDNA transkribiert und in einer 1: 10 Verdünnung zur PCR-Reaktion im Light-Cycler System mit dem dazu etablierten Fast Start DNA Master SYBR GreenI“ Kit eingesetzt. Der Vorteil des Light Cyler Systems besteht in einer geringen Menge der Template DNA, die logarithmisch ansteigt. Die Menge an neu gebildeten PCR-Produktes wird mittels Fluoreszenz gemessen. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR GreenI besitzt im ungebundenen Zustand eine geringe Eigenfluoreszenz, die durch Bindung an die kleine Furche des DNA-Doppelstrangs deutlich meßbar erhöht wird. Die Fluoreszenz wird nach jedem Elongationsschritt der PCR gemessen, so daß eine exponentielle Zunahme des Amplifikats in jedem Zyklus der PCR analysiert werden kann. Zur Charakterisierung der PCR-Produkte wird am Anschluß an die PCR eine Schmelzkurve erstellt, bei welcher der Reaktionsansatz langsam auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenzabnahme kontinuierlich gemessen wird. Während Primerdimere bei 75°C bis 80°C schmelzen, hat das Amplifikat einen Schmelzpunkt bei 85°C bis 95°C, so daß Verunreinigungen erkannt werden.

Zur Konzentrationsbestimmung wird eine Verdünnungsreihe des Plasmid-kodierten Zielgens erstellt, die zur Berechnung der cDNA Konzentration in den Tumoren dient.

#### Reaktionsansatz :

Die Lösung 1A und 1B werden in direkt vor Gebrauch gemischt.

2  $\mu$ l cDNA 1:10 verdünnt

2,4  $\mu$ l  $MgCl_2$

2  $\mu$ l forward Primer 5  $\mu$ M

2  $\mu$ l reverse Primer 5  $\mu$ M

2  $\mu$ l SyberGreen Master Mix

9,6  $\mu$ l  $H_2O$  dest.

#### Reaktionsbedingungen

Denaturierung 10 min 95 °C

15 sec 95°C

5 sec primerspezifische Temperatur

10 sec 72°C

} 40 Zyklen

#### Schmelzkurve

erhitzen von 60 bis 95°C in 0,1 sec Schritten mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung

Von jeder cDNA wird als Referenzwert die Konzentration des konstitutiv exprimierten Haushaltsgenes Glycerinaldehyphosphat-Dehydrogenase bestimmt und die cDNA-Konzentration normiert. Von den Expressionsdaten aller Tumore und Referenzgewebe werden die Mittelwerte gebildet. Die Expressionsunterschiede werden mit dem Tabellenprogramm Excel ausgewertet und graphisch dargestellt.

## **E. Ergebnisse**

### **E.1. Identifizierung der neoplastischen Zellen des Riesenzelltumor**

#### **E.1.1. Histologische und funktionelle Charakterisierung der Zelltypen Riesenzelltumors in vitro**

Das unfixierte Tumormaterial der Riesenzelltumoren, welches zur Diagnostik in die Abteilung Osteopathologie eingesandt wurde, diente als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Zellkulturen. Dazu wurden repräsentative Areale von 14 verschiedenen Riesenzelltumoren mechanisch zerkleinert und nach Collagenaseverdauung in Zellkultur überführt. Die erste Passage der Zellkulturen zeigte drei Zelltypen, die schon im histologischen Gewebeschnitt erkennbar waren: mehrkernige Riesenzellen, Monozyten und spindelförmige Stromazellen. Die mehrkernigen Riesenzellen wurden anhand ihrer TRAP (tartrat-resistenten sauren Phosphatase) Enzymaktivität identifiziert (Abb.E.1.C.). Die osteolytische Aktivität der Riesenzellen konnte durch die Bildung von Resorptionslakunen auf Dentin bestätigt werden (Abb.E.1.A. und B.). Außerdem färbten sich die mehrkernigen Riesenzellen ebenso wie ihre monozytären Vorläuferzellen mit dem Monozytenmarker CD68 (Abb.E.1.D.). Nach der dritten Passage der Riesenzelltumorkulturen waren diese beiden Zelltypen nicht mehr vorhanden, nur die spindelförmigen Stromazellen waren zur Proliferation in Zellkultur fähig und schienen somit die neoplastische Komponente des Riesenzelltumors zu sein. Zur Untersuchung des Proliferationspotentials dieser neoplastischen Stromazellen wurde die Expression der Proliferationsmarker Ki-67, MDM-2, PCNA und ras analysiert, von denen nur der Marker MDM2 eine deutlich positive Reaktion zeigte (Abb.E.1.E.), während Ki67 selten nachweisbar war (Abb.E.1.F.). Das Passagieren der Zellen ermöglichte eine Selektion auf die Stromazellkomponente des Riesenzelltumors. So konnten reine Stromazellkulturen (RZTSZ) zur weiteren Charakterisierung gewonnen werden, die zur Beantwortung folgender Fragestellungen eingesetzt wurden:

1. Aus welcher Zellart entsteht die neoplastische Stromazelle des Riesenzelltumor ?
2. Wodurch unterscheidet sich die neoplastische Stromazelle von ihrer Ausgangszellart ?
3. Welche Veränderung der Genexpression führt zur Akkumulation der Riesenzellen im Tumorgewebe ?

*Aus welcher Zellart entsteht die neoplastische Stromazelle des Riesenzelltumor ?*

### E.1.2. Immunzytologischer Nachweis von Differenzierungsmarkern in den RZT-Stromazellen

Zur Charakterisierung der neoplastischen Stromazellen wurde die Expression verschiedener mesenchymaler Differenzierungsmarker immunzytologisch an den fixierten Zellkulturen nachgewiesen. Eine Übersicht über die Ergebnisse aller immunzytologischer Färbungen ist im Anhang H.3. dargestellt. Die Stromazellen des Riesenzelltumors exprimierten die mesenchymalen Stammzellmarker SH2, SH3 und SH4 (Haynesworth, Baber, and Caplan, 1992). Die Färbung mit dem SH3-Antikörper war deutlich schwächer (Abb.E.2.A.-C.). Außerdem zeigten die Zellen eine deutliche Reaktion mit dem CD166-Antigen ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule), das auch auf mesenchymalen Stammzellen und frühen Ostoblastenvorläuferzellen beschrieben wurde (Abb.E.2.D.) (Bruder et al., 1998). Ein variabler Anteil der Zellen exprimiert den Marker Stro1 (Abb.E.2.E.), der auf undifferenzierten Knochenmarksstromazellen entdeckt wurde (Simmons and Torok-Storb, 1991), und den Differenzierungsmarker Thy1 (Abb.E.2.F.) (Chen et al., 1999). Weiterhin wurde die Synthese der osteoblastären Proteine Osteonectin und Osteopontin immunzytologisch nachgewiesen (Abb.E.2.G.+H.). Das von differenzierten Osteoblasten gebildete Enzym alkalische Phosphatase wurde nicht in der RZT-Stromazellen gefunden. Ebenfalls wurden die hämatopoetischen Marker  $\kappa$ kit und Stem Cell Factor (SCF) (Gattei et al., 1996) nicht von den Zellen exprimiert, so daß es sich bei den neoplastischen RZT-Stromazellen nicht um osteoklastäre Vorläuferzellen handeln könnte.

Eine korrespondierende Markerexpression konnte auch in mesenchymalen Stammzellen detektiert werden, während in primären Osteoblasten und in der Osteosarkomzelllinie SAOS2 nur das Enzym alkalische Phosphatase exprimiert wurde. Um eine Kontamination der Zellkulturen durch Fibroblasten auszuschließen, wurden primäre Hautfibroblasten mit den genannten Markern gefärbt und zeigten keine Reaktion.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen der Riesenzelltumoren und Vergleichsgewebe ist in Tabelle E.1. aufgeführt.

Antikörper Zelltyp	SH2	SH3	SH4	ALC AM	Thy1	Stro1	AP	MDM 2	Ki67
<b>RZTSZ (14 Fälle)</b>	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+/-
Mesenchymale Stammzellen	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Knochenmark- stromazellen	+	+/-	+	+	+	+/-	-	+/-	-
Saos-2 Osteo- sarkomzelllinie	-	-	-	-	-	-	+	+	+
normale Osteoblasten	-	-	-	-	-	-	+	-	-
normale Haut- fibroblasten	-	-	-	-	-	-	-	-	+

**Tabelle E.1.:** Zusammenfassung der immunzytologischer Färbungen der Stromazellen (RZTSZ) der 14 untersuchten Riesenzelltumoren und der Kontrollzellen

### E.1.3. Doppelmarkierung der RZT-Stromazellen

Zur Bestätigung der Hypothese, daß die proliferierende Komponente des Riesenzelltumors die mesenchymalen Marker exprimiert, wurde eine Doppelfärbung der RZT-Stromazellen mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt. Die RZT-Stromazellen exprimierten sowohl den Proliferationsmarker MDM2 als auch den Differenzierungsmarker SH2. Die Färbung zeigte eine deutliche Koexpression beider Marker innerhalb einer Zelle (Abb.E.3.A.-C.), bei der es sich aufgrund ihrer fibroblastenähnlichen Morphologie um die Stromakomponente des Riesenzelltumors handelt. Ebenso wurde eine Koexpression von MDM2 und SH4 bzw. ALCAM nachgewiesen. Dieser Versuch bestätigte, daß die proliferierende Stromazelle die frühen mesenchymalen Differenzierungsmarker exprimiert, die sie als mesenchymale Stammzelle charakterisieren.

### E.1.4. Verifizierung der Markerexpression mittels mRNA Nachweis

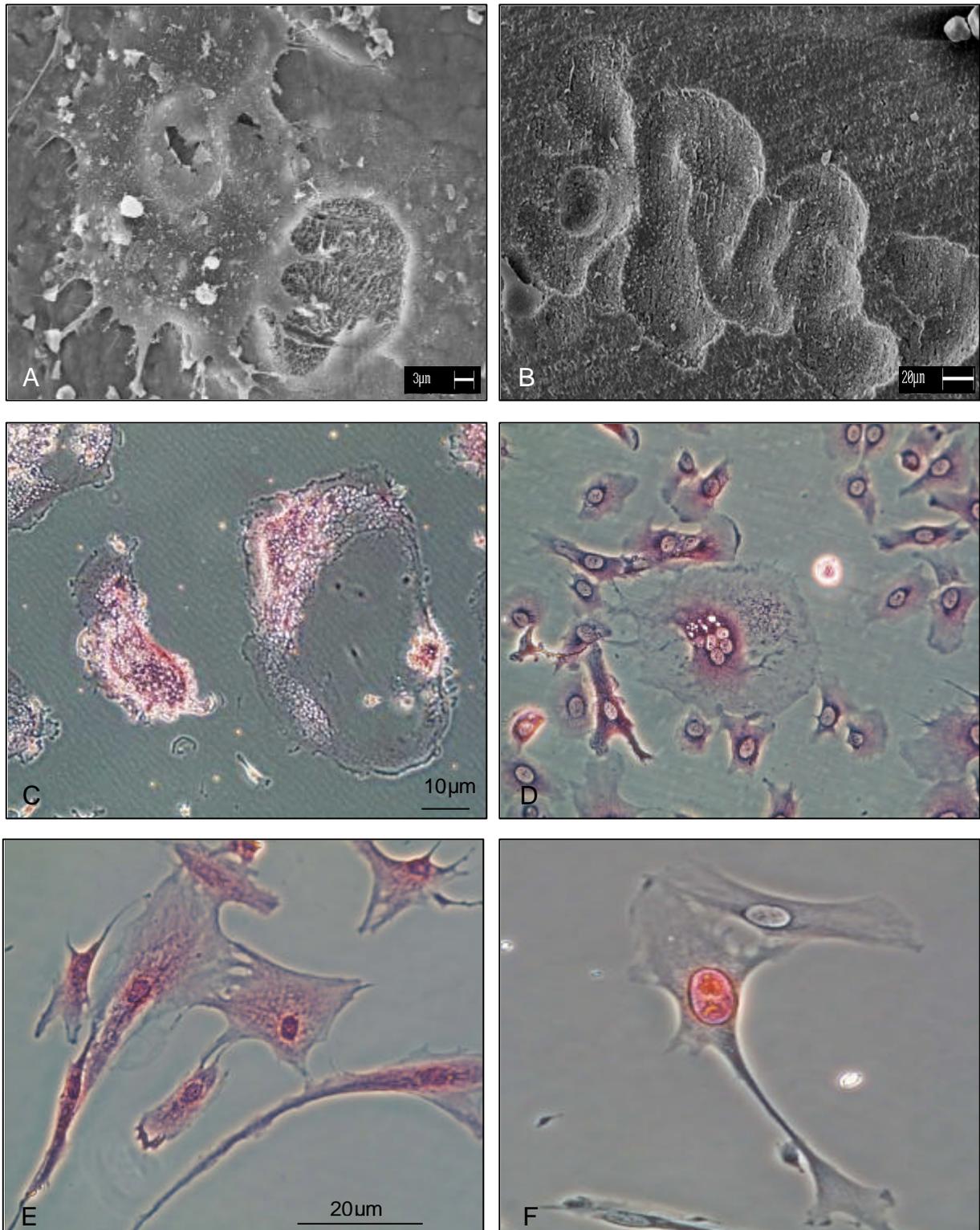
Zur Überprüfung der immunzytochemischen Daten wurde die Expression der Marker Endoglin (SH2) und ALCAM auf mRNA Ebene untersucht. Mittels RT-PCR konnte die Expression eines spezifischen 806 bp PCR-Produktes von Endoglin und eines 636 bp PCR-Produkt von ALCAM in den Stromazellen von fünf verschiedenen Riesenzelltumoren und in mesenchymalen Stammzellen detektiert werden (Abb.E.5.). Zur Kontrolle der mRNA-Konzentration wurde ebenfalls die

Aktin mRNA-Expression der Zellen verglichen und ergab ein PCR-Produkt von 587 bp. Da die mRNA-Sequenzen der Marker SH3, SH4 und Stro1 noch nicht bekannt waren, konnte deren Expression nicht mit RT-PCR überprüft werden.

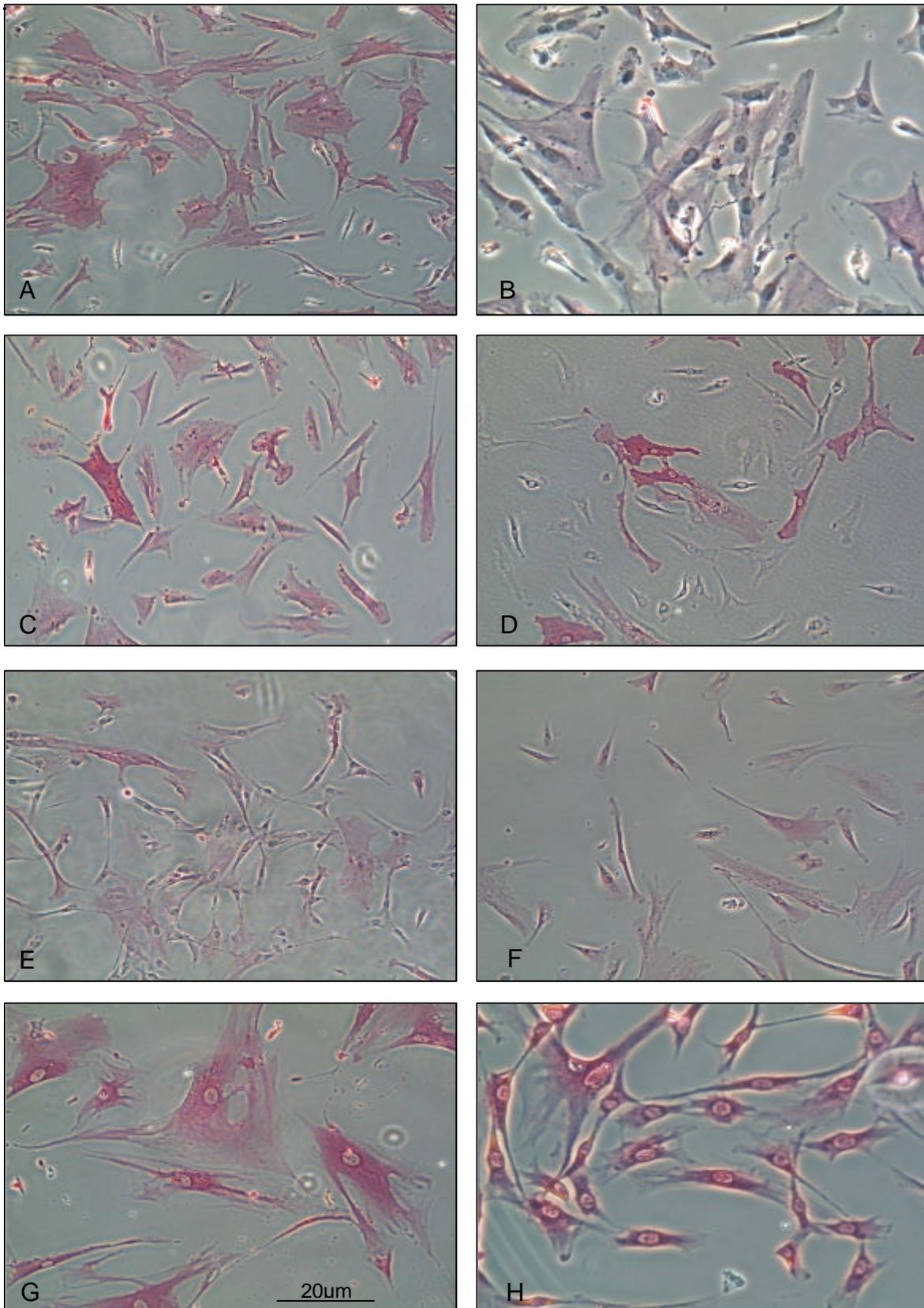
#### E.1.5. In vivo Nachweis der Differenzierungsmarker an Gefrierschnitten

Da in Zellkulturen eine vom Ausgangsmaterial divergente Markerexpression auftreten kann, wurde die in vivo Expression von SH2, SH3, SH4 und Stro1 immunhistologisch an Gefrierschnitten von Riesenzelltumoren bestimmt (Abb.E.4.).

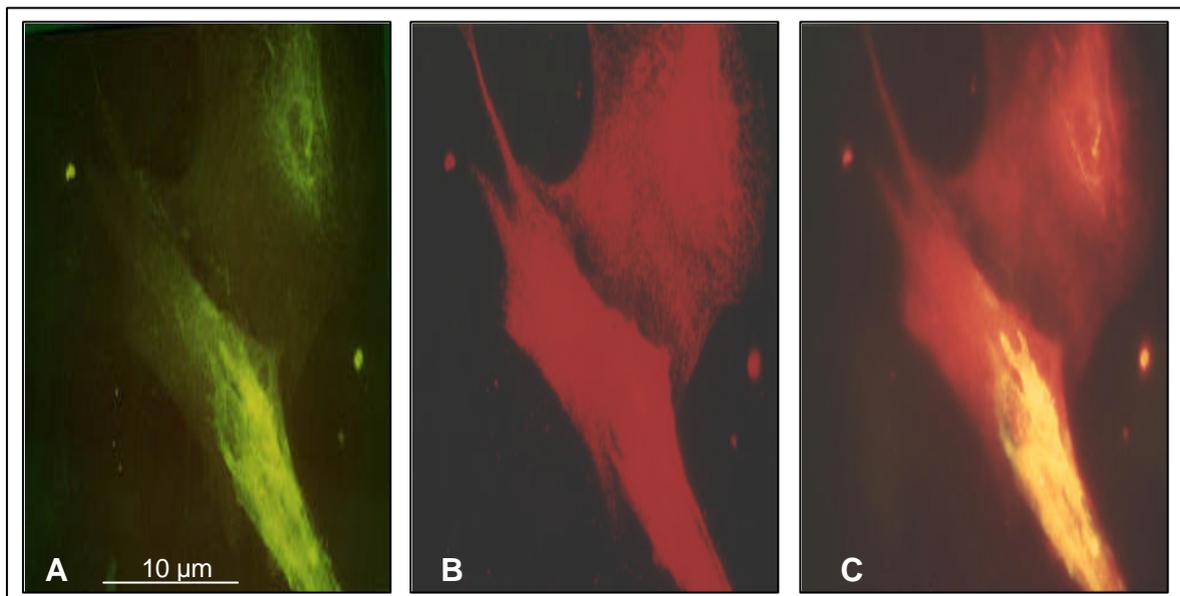
Anhand des in vivo und in vitro Nachweises der frühen Differenzierungsmarker (siehe Abb.B.4.) wurde die neoplastische Stromazelle des Riesenzelltumors als undifferenzierte mesenchymale Stammzelle des Knochenmarks charakterisiert. Da die mesenchymalen Stammzellen im Knochen zur Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten in der Lage sind (Pittenger et al., 1999), wurde dieses multilineäre Differenzierungspotential auch in den Stromazellen des Riesenzelltumors überprüft.



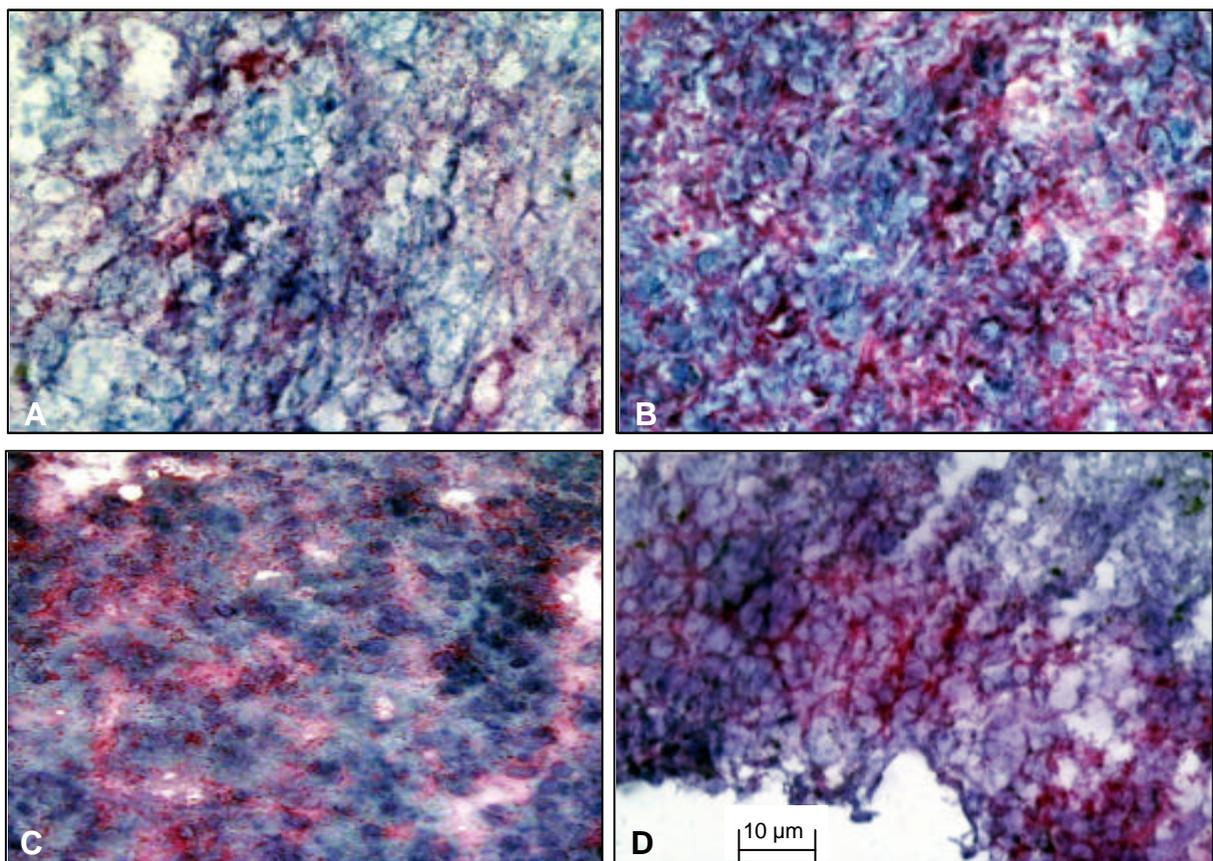
**Abb.E.1.A.+B.:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von RZT-Zellkulturen (Passage 0) auf Dentin. **A:** Mehrkernige Riesenzelle des Riesenzelltumors über einer Resorptionslakune 1750x Vergrößerung; **B:** Resorptionslakune nach osteolytischer Aktivität einer Riesenzelle auf Dentin 377 μm; **Abb. E.1.C.-F.:** Immunzytologische und enzymatische Färbungen der Riesenzelltumore in Zellkultur (Passage 0) mit der APAAP-Methode, 100x Vergrößerung; **C:** TRAP-Enzymaktivität; **D:** CD68-AK; **E:** MDM2-AK; **F:** Ki67-AK; 200x Vergrößerung.



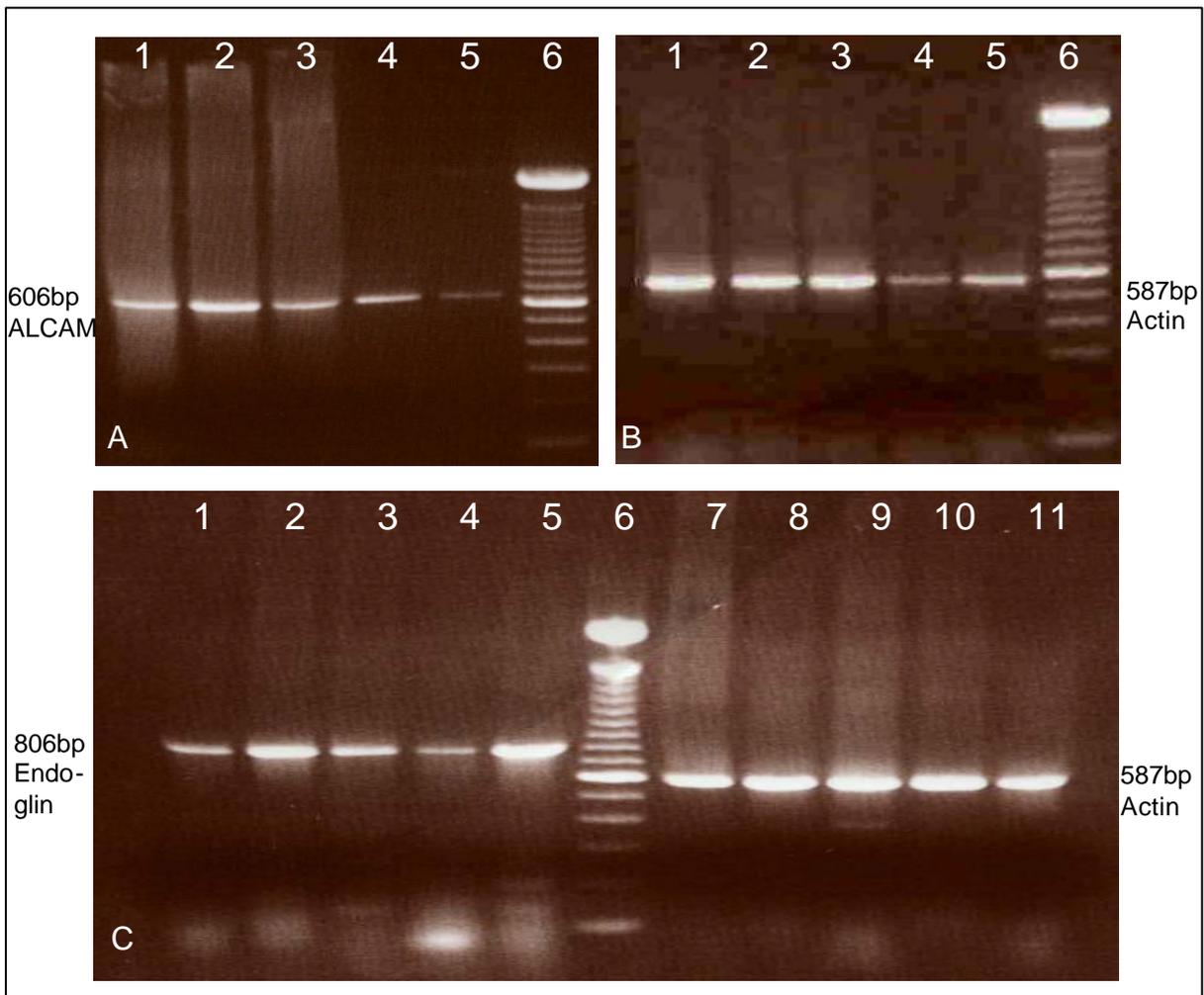
**Abb.E.2.:** Immunzytologische Färbung der RZT-Stromazellen in Zellkultur (Passage 2 und 3) mit der APAAP-Methode und Antikörpern gegen Differenzierungsantigene, 200x Vergrößerung. **A:** SH2-AK; **B:** SH3-AK; **C:** SH4-AK; **D:** ALCAM-AK; **E:** Thy1-AK; **F:** Stro1-AK; **G:** Osteonectin-AK; **H:** Osteopontin-AK



**Abb.E.3.:** Doppelmarkierung der RZT-Stromazellen in Zellkultur mit Immunfluoreszenz, 400x Vergrößerung; **A:** SH2-AK FITC-Markierung; **B:** MDM2-AK TRITC-Markierung; **C:** SH2 und MDM2 Doppelmarkierung.



**Abb.E.4.:** Immunhistologischer Nachweis der Differenzierungsmarker an Gefrierschnitten der Riesenzelltumoren mit der APAAP-Methode und monoklonalen Antikörpern, 100x Vergrößerung, Gegenfärbung mit Hämalaun. **A:** SH2-AK; **B:** SH4-AK; **C:** ALCAM-AK; **D:** Stro1-AK;



**Abb.E.5.:** Die RT-PCR der RZT-Stromazellen wurde auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt.

**Abb.E.5.A.:** 606 bp ALCAM PCR-Produkt; 1: RZT1, 2: RZT2, 3: RZT5, 4: RZT6, 5: RZT7, 6: 100 bp Marker;

**Abb.E.5.B.:** 587 bp  $\beta$ -Actin PCR-Produkt, 1: RZT1, 2: RZT2, 3: RZT5, 4: RZT6, 5: RZT7, 6: 100 bp Marker;

**Abb.E.5.C.:** Spuren 1-5: 806 bp Endoglin PCR-Produkt; Spuren: 7-11 587 bp  $\beta$ -Actin PCR-Produkt, 1: MSC, 2: RZT5, 3: RZT6, 4: RZT8, 5: RZT9, 6: 100 bp Marker, 7: MSC, 8: RZT5, 9: RZT6, 10: RZT8, 11: RZT9.

## **E.2. Nachweis des Differenzierungspotentials der RZT-Stromzellen**

### **E.2.1. In vitro Differenzierung zu Osteoblasten**

Nach vierwöchiger Stimulierung mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium (Jaiswal et al., 1997) zeigten die RZT-Stromazellen eine Differenzierung in mineralisierende Osteoblasten, die anhand der Bildung von mineralisierter Matrix durch eine von Kossa Färbung und die alkalische Phosphatase Enzymaktivität der Zellen nachgewiesen wurde (Abb.E.6.A.+C.).

### **E.2.2. In vitro Differenzierung zu Adipozyten**

Zur Induktion der Adipozytendifferenzierung wurden die RZT-Stromazellen drei Wochen mit Adipozyten-Differenzierungsmedium (Pittenger et al., 1999) stimuliert, wodurch sich ihre Morphologie von einer spindelförmigen in eine runde Zellart veränderte. Die Bildung von Fettvakuolen im Zytoplasma der Zellen wurde durch Färbung mit dem lipophilen Farbstoff Sudanrot dargestellt (Abb.E.6.E.+F.). Der Nachweis des adipozytenspezifischen Transkriptionsfaktors ppar $\gamma$  erfolgte immunhistologisch mit der APAAP-Methode. Beide Färbungen zeigten eine positive Reaktion in den RZT-Stromazellen.

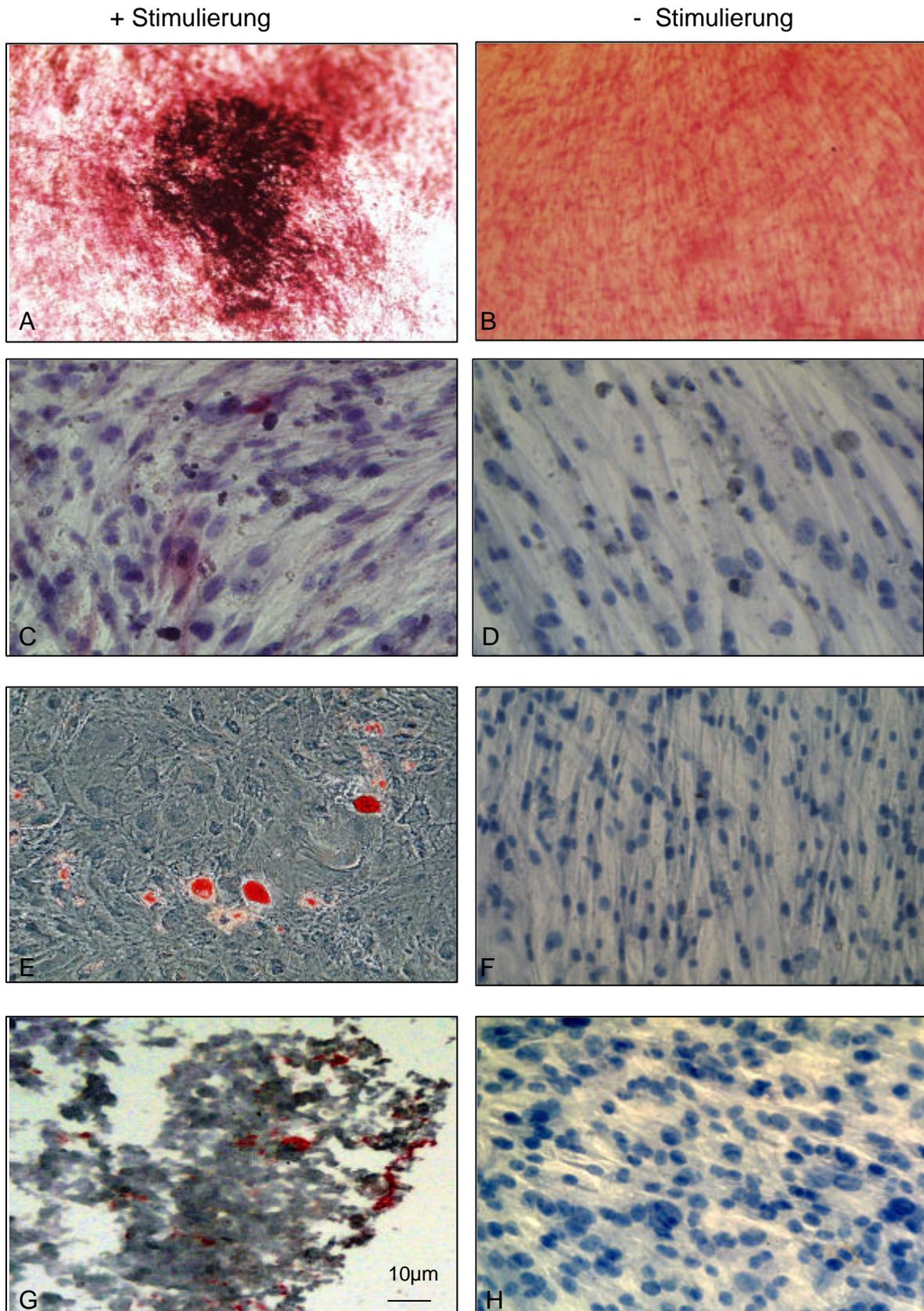
### **E.2.3. In vitro Differenzierung zu Chondroblasten**

Nach vierwöchiger Stimulierung der pelletierten RZT-Stromazellen mit Chondroblasten-Differenzierungsmedium (De Bari, Dell'Accio, and Luyten, 2001) zeigten die aggregierten Stromazellen eine deutliche immunhistologische Färbung mit dem Chondroblastenmarker Collagen Typ II (Abb.E.6.G.+H.).

Die unstimulierten Stromazellen zeigten keine spontane Differenzierung in einen der genannten Zelltypen (Abb.E.6.B;D;F;H), sondern behielten ihre fibroblastenähnliche Morphologie und ihren undifferenzierten Phänotyp bei.

Als positive Kontrolle wurden mesenchymale Stammzellen mit den gleichen Differenzierungsmedien behandelt, welche ein korrespondierendes, multipotentes Differenzierungsspektrum wie die RZT-Stromazellen aufwiesen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß die neoplastische Stromazelle aus einer mesenchymalen Stammzelle entsteht.

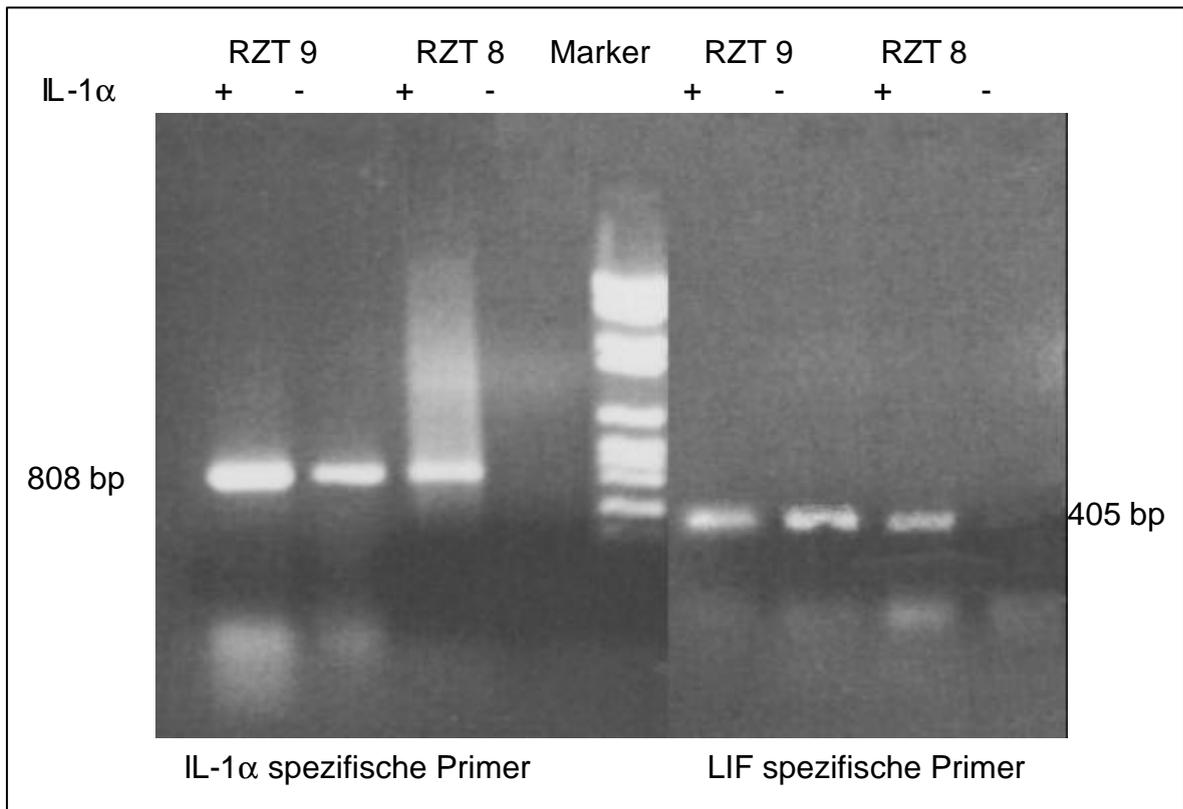


**Abb.E.6.:** In vitro Differenzierung der RZT Stromazellen, 100x Vergrößerung; A-D: Osteoblastendifferenzierung; **A und B:** von Kossa Färbung; **C und D:** alkalische Phosphatase Reaktion; **E und F:** Nachweis der Adipozytendifferenzierung mit Sudanrot-Färbung ; **G und H:** Nachweis der Chondrozytendifferenzierung mit Collagen TypII Immunhistochemie: **A. C. E. G :** stimulierte Zellen: **B. D. F. H:** unstimulierte Zellen.

#### E.2.4. Unterscheidung von RZT-Stromazellen und die Hämatopoese unterstützenden Stromazellen anhand ihrer Zytokinexpression

Die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (MSC) sezernieren hämatopoetisch wirksame Zytokine und sind zur Unterstützung der Blutbildung im Knochenmark fähig (Majumdar et al., 2000). Die mesenchymalen Stammzellen unterscheiden sich jedoch in ihrer Zytokinexpression von den die Hämatopoese unterstützenden Stromazellen (Majumdar et al., 1998). Durch Stimulierung mit Interleukin-1 $\alpha$  wird die Expression von Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und Leukämia Inhibitory Factor (LIF) in den mesenchymalen Stammzellen deutlich erhöht, wohingegen die Expression der beiden Zytokine in den die Hämatopoese unterstützende Stromazellen durch IL-1 $\alpha$  nicht beeinflusst wird.

In späten Passagen ( $\geq$  Passage 3) der RZT-Stromazellen konnte nach Stimulierung mit IL-1 $\alpha$  eine Induktion der mRNA-Expression von IL-1 $\alpha$  und LIF gezeigt werden. Mit RT-PCR und spezifischen Primerpaaren wurde die Bildung eines 808 bp großen PCR-Produktes für IL-1 $\alpha$  und eines 405 bp PCR-Produktes für LIF nachgewiesen (Abb.E.7.). In frühen Passagen ( $\leq$  Passage 1) der Riesenzelltumor-kulturen (RZT9 in Abb.E.7.) trat auch ohne IL-1 $\alpha$  Stimulierung eine IL-1 $\alpha$  und LIF Expression auf. Diese Expression beruht auf der Interleukin-1 Produktion durch tumoreigene Monozyten und mehrkernige Riesenzellen (Atkins et al., 2000), die in den späten Passagen nicht mehr vorhanden war. Ebenfalls wurde die Expression von LIF mRNA in den mehrkernigen Riesenzellen des RZT beschrieben (Gouin et al., 1999). Da die mehrkernigen Riesenzellen bis zur ersten Passage in den Riesenzelltumorkulturen nachweisbar sind, können sie für die Bildung der LIF mRNA verantwortlich gemacht werden. Eine reine RZT-Stromazellkultur bedarf jedoch der Stimulation mit IL-1 $\alpha$  zur Induktion der Zytokinexpression (Abb.E.7., RZT8). Somit gleichen die RZT-Stromazellen in der Transkriptionsregulation dieser beiden Zytokine den mesenchymalen Stammzellen.



**Abb.E.7.:** RT-PCR zum Nachweis der Expression von IL-1 $\alpha$  und LIF in Riesenzelltumoren. Die Zellkulturen des RZT9, Passage 1 exprimieren mit und ohne IL-1 $\alpha$  Stimulation mRNA für IL-1 $\alpha$  (Spur 1 und 2) und für LIF (Spur 6 und 7). In Passage 4 des RZT8 kann die Bildung eines PCR-Produktes von IL-1 $\alpha$  (Spur 3) und von LIF (Spur 8) nur nach Induktion durch IL-1 $\alpha$  nachgewiesen werden. Die unstimulierten Zellen bilden weder IL-1 $\alpha$  (Spur 4) noch LIF (Spur 9).

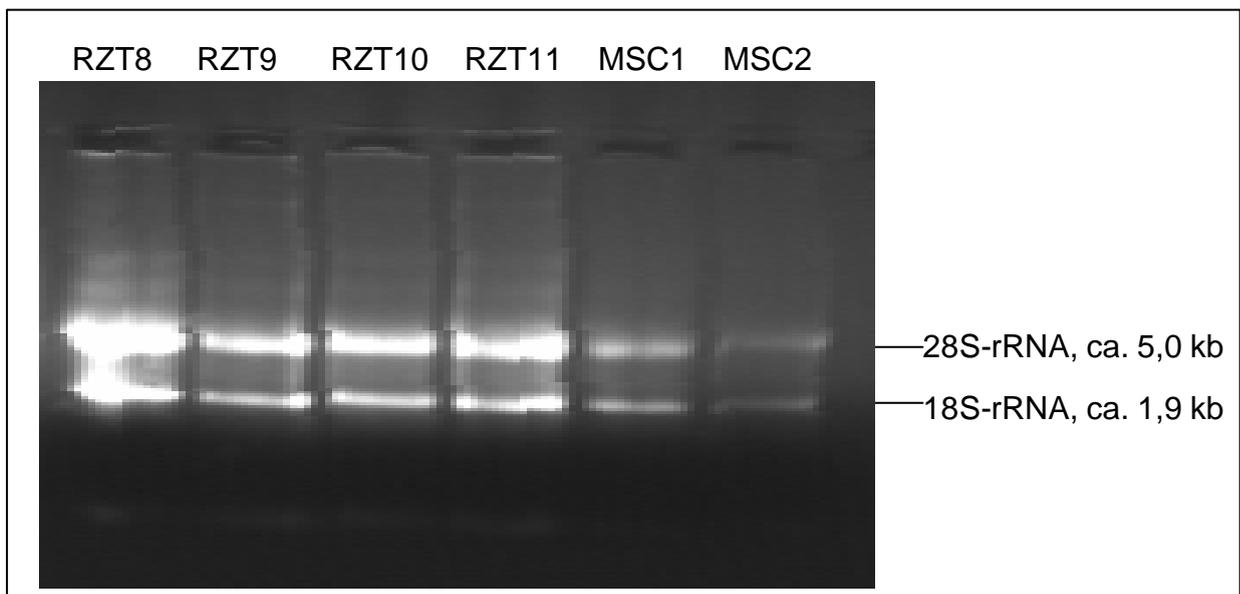
*Wodurch unterscheidet sich die neoplastische Stromazelle des Riesenzelltumors von ihrer Ausgangszellart ?*

### **E.3. Analyse der differentiellen Genexpression der RZT-Stromazellen**

Nachdem die mesenchymale Stammzelle als Ursprungszelle der neoplastischen Stromazelle des Riesenzelltumors bestimmt werden konnte, sollte die Analyse der Genexpression beider Zelltypen Aufschluß über die Veränderungen nach der neoplastischen Transformation zur RZT-Stromazelle geben.

#### **E.3.1. Vergleich der mRNA Expression der RZTSZ mit MSC mittels cDNA-Arrays**

Zur Untersuchung der Expressionsunterschiede wurden „Atlas human Cancer 1.2 cDNA Arrays“ (Clontech) eingesetzt, die eine Analyse von zahlreichen, für die Tumorbilogie relevanten Genen ermöglichen. Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA der Riesenzelltumoren und mesenchymalen Stammzellen wurde auf einem 1,5% EtBr-Agarosegel überprüft. (Abb.E.8.).



**Abb.E.8.:** RNA-Gel zur Überprüfung des Reinheitsgrades und der Konzentration der Gesamt-RNA.

Aus der Gesamt-RNA wurde mit dem Atlas Pure PolyA-RNA Isolation System mRNA isoliert und mit den cDNA-Arrays ausgewertet. Der Vergleich der mRNA-Expression der mesenchymalen Stammzellen mit den RZT-Stromazellen zeigte ein sehr ähnliches Expressionsmuster in den beiden Zelltypen, wie in Abbildung E.9.A. und B. erkennbar ist. Dieses Expressionsprofil bestätigte zusätzlich die

zellphysiologischen Daten, daß die neoplastische Stromazelle des Riesenzelltumors aus einer mesenchymalen Stammzelle entsteht.

Es wurde die mRNA-Expression der Stromazellen von fünf verschiedenen RZT mit der mRNA-Expression von zwei verschiedenen, kommerziell erhältlichen mesenchymalen Stammzellpopulationen verglichen. Die Auswertung der cDNA-Arrays erfolgte mit der Atlas Image 2.0 Auswertungssoftware (Clontech). Die Genexpression jedes Arrays wurde durch Abgleich der Expression mit dem ebenfalls auf dem Array vorhandenen Haushaltsgen Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) normiert, um tumorunabhängige mRNA-Konzentrationsunterschiede auszuschließen. Die Expressionsprofile der fünf RZT-Stromazellpopulationen wurden durch die Auswertungssoftware miteinander verrechnet, um ein Patienten übergreifendes Expressionsprofil aller Riesenzelltumoren zu erhalten. Ebenso wurden die Arrays der mesenchymalen Stammzellpopulationen untereinander abgeglichen. Anschließend wurden die erhaltenen Expressionsdaten aller Riesenzelltumorarrays mit denen der mesenchymalen Stammzellen verglichen (Abb.E.9.C.). Sowohl das Verhältnis der Genexpressionen als auch die Differenz der absoluten Expressionswerte wurde bestimmt. Der Schwellenwert des Expressionsverhältnisses wurde auf den Faktor 1.5 festgelegt, als Schwellenwert der absoluten Expression wurde eine Differenz der Intensitäten von 1500 bestimmt. Die Auswertung der Arrays ergab eine Anzahl von 29 Genen, bei denen sich die Expression in den RZT-Stromazellen von den mesenchymalen Stammzellen unterschied (Abb.E.11.). Vier Gene zeigten eine erniedrigte Expression im RZT-Stromazellen (Tabelle E.2.A.), (blaue Markierung in Abb. E.11), während bei 25 Genen die Expression im erhöht war (Tabelle E.2.B.), (rote Markierung in Abb.E.11.). Die grün gekennzeichneten Markierungen in Abbildung E.11. stellen Gene dar, deren Expressionsstärke sich in den RZT-Stromazellen nicht von den mesenchymalen Stammzellen unterschied. Aus den 29 differentiell exprimierten Genen wurden zehn Gene ausgewählt (Tabelle E.2. fett markiert), die eine besondere Relevanz für die Tumorentstehung aufweisen und deren Expression mit Real-Time PCR überprüft wurde.

Die weiteren 19 Gene (Tabelle E.2. kursiv markiert) wurden nicht verifiziert, so daß ihr Einfluß auf die Biologie des Riesenzelltumors in dieser Arbeit nicht weiter geklärt wurde.

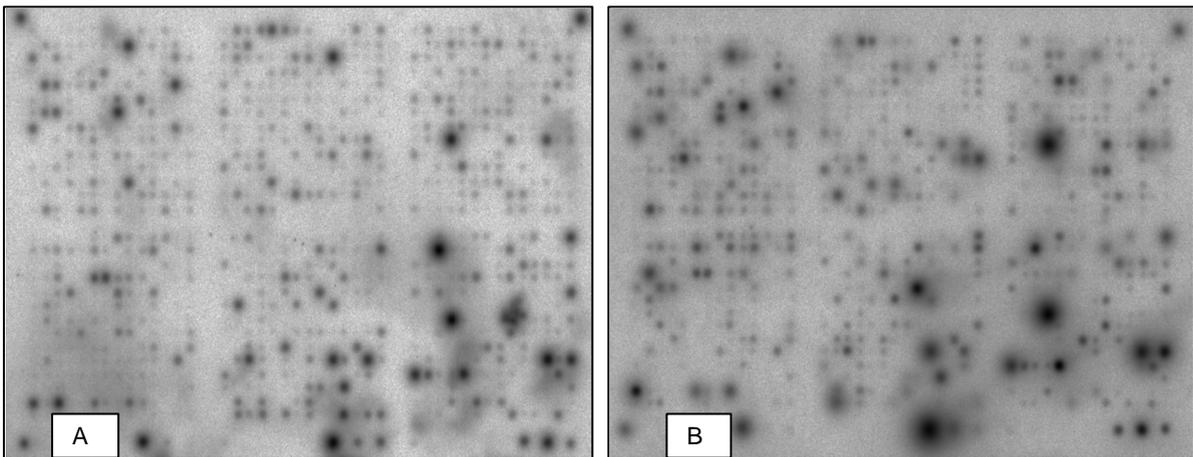
Lokalisation auf dem Array	Bezeichnung des Gens	GDB-Name	Genbank Nummer	Funktion
A08g	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3	<i>TIMP3</i>	Z30183	Protease Inhibitor Onkogen
F03b	Fibronectin precursor	<i>FN1</i>	P02751	Extrazelluläres Matrixprotein
F04h	<i>regulator of G protein signalling4</i>	<i>RGS4</i>	U27768	Hormon Rezeptor
F14j	<i>40S ribosomales Protein</i>	<i>RPS16</i>	M60854	Ribosomales Protein

**Tabelle E.2.A.:** Gene mit verringerter Expression in den RZT-Stromazellen bei Vergleich mit mesenchymalen Stammzellen

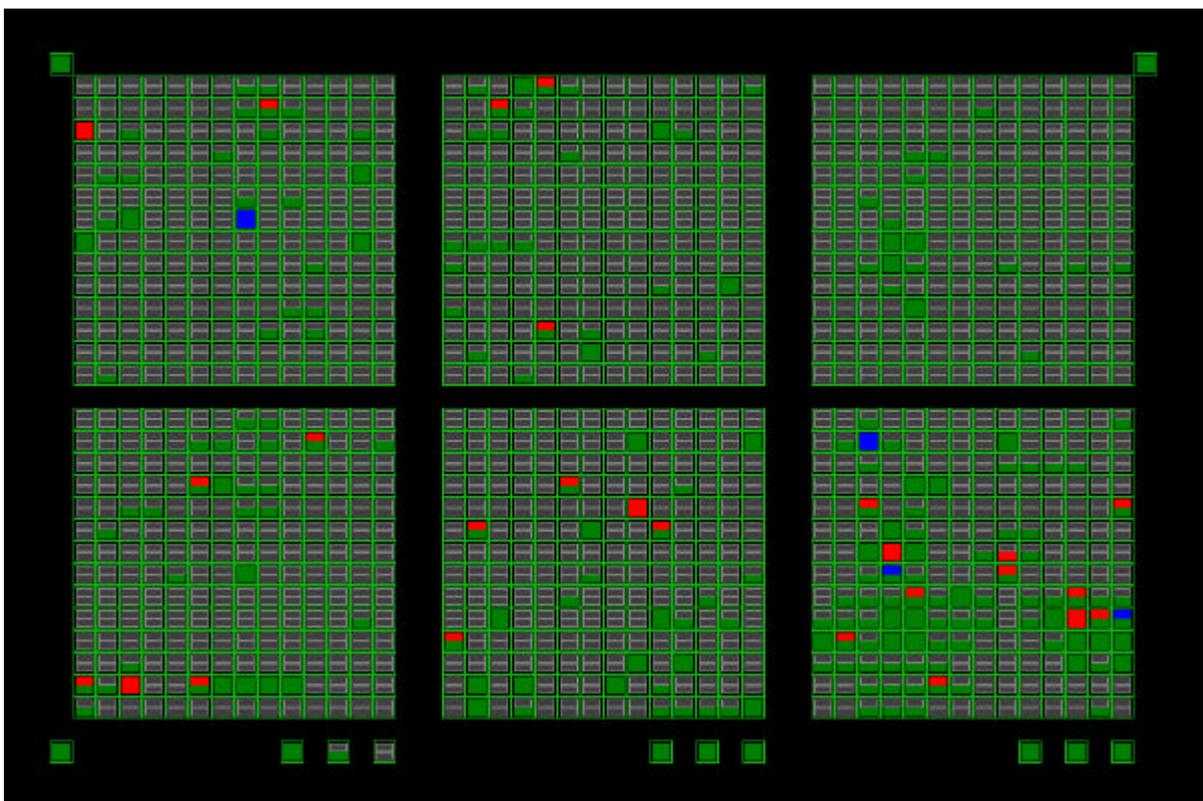
Lokalisation auf dem Array	Bezeichnung des Gens	GDB-Name	Genbank Nummer	Funktion
A01c	c-jun proto-oncogene	<i>Jun</i>	J04111	Transkriptionsfaktor
A09b	NM23-H2, Non-metastatic protein 23, c-myc purine-binding transcription factor puf	<i>NME2</i>	L16785	Transkriptionsfaktor
B03b	a2-macroglobulin receptor-associated protein = D03m	<i>LRP1</i>	M63959	Rezeptor assoziiertes Protein
B05a	<i>IGF-binding protein 4</i>	<i>IGFBP 4</i>	M62403	Extrazelluläres Protein
B05l	Calmodulin	<i>CALM1</i>	D45887	Kalzium bindendes Protein
D01m	<i>Transmembrane protein sex precursor</i>	<i>Hs.777 38</i>	X87852	Rezeptor assoziiertes Protein
D03m	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 =B03b	<i>LRP1</i>	X13916	Rezeptor assoziiertes Protein
D06m	<i>Cytosolic superoxide dismutase 1</i>	<i>SOD1</i>	K00065	Xenobiotischer Metabolismus
D11B	Bone Proteoglycan 2 precursor, Decorin	<i>DCN</i>	M14219	Oberflächenantigen
E1k	Cathepsin L	<i>CTSL</i>	X12451	Cystein Protease

<i>E02f</i>	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>	<i>IGFBP 3</i>	<i>M31159</i>	<i>Wachstumsfaktor</i>
<i>E06d</i>	<i>Growth-arrest-specific protein</i>	<i>GAS6</i>	<i>L13720</i>	<i>Wachstumsfaktor</i>
<b>E09e</b>	<b>Macrophage Inhibitory cytokine-1</b>	<b>PLAB</b>	<b>AF019770</b>	<b>Wachstumsfaktor</b>
<b>E10f</b>	<b>Interleukin-6 precursor</b>	<b>IL-6</b>	<b>X04602</b>	<b>Interleukin</b>
<i>F02k</i>	<i>40S ribosomal protein S5</i>	<i>RPS5</i>	<i>U14970</i>	<i>Ribosomales Protein</i>
<i>F03e</i>	<i>fatty acid synthase</i>	<i>FASN</i>	<i>S80437</i>	<i>Lipid Metabolismus</i>
<i>F04g</i>	<i>Vimentin</i>	<i>VIM</i>	<i>X56134</i>	<i>Intermediär-filament Protein</i>
<i>F05i</i>	<i>transmembrane protein 21 precursor</i>	<i>n.v.</i>	<i>P49755</i>	<i>Transmembran-ales Protein</i>
<i>F9g</i>	<i>gravin</i>	<i>AKAP1 2</i>	<i>M96322</i>	<i>Zytoskeletales Protein</i>
<i>F9h</i>	<i>TRAM</i>	<i>TRAM</i>	<i>X63679</i>	<i>Transmembran-ales Protein</i>
<i>F12i</i>	<i>ribonuclease 6 precursor</i>	<i>RNASE 6PL</i>	<i>U85625</i>	<i>mRNA Prozessierung</i>
<i>F12j</i>	<i>elongation factor 1 alpha</i>	<i>EEF1A 1</i>	<i>M27364</i>	<i>Translationsfaktor</i>
<i>F13j</i>	<i>elongation factor 2</i>	<i>EEF2</i>	<i>X51466</i>	<i>Translationsfaktor</i>
<i>F14e</i>	<i>BIGH3</i>	<i>TGFBI</i>	<i>M77349</i>	<i>Mikrofilament Protein</i>

**Tabelle E.2.B.:** Gene mit erhöhter Expression in den RZT-Stromazellen bei Vergleich mit mesenchymalen Stammzellen



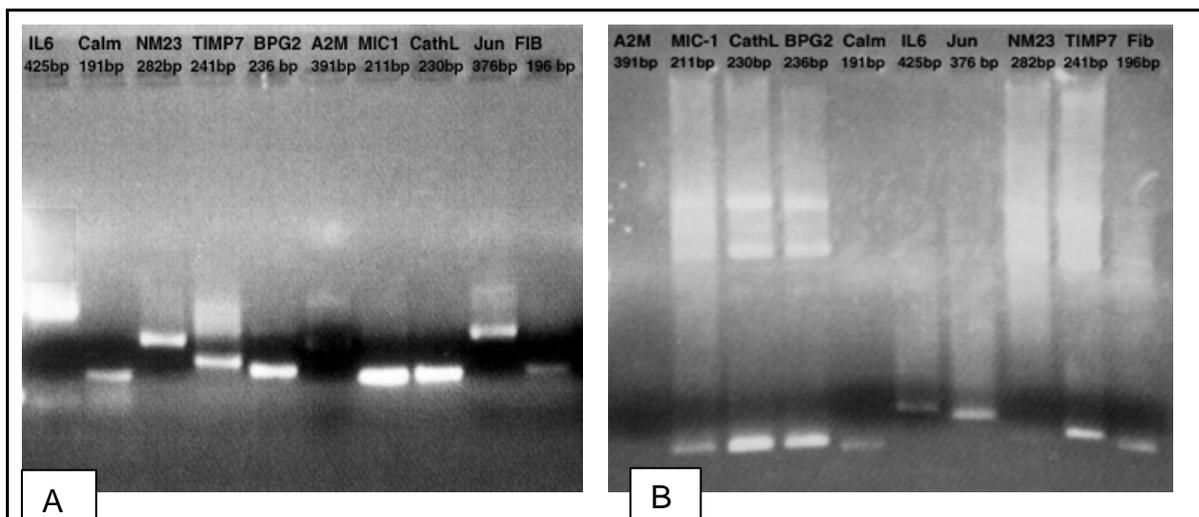
**Abb.E.9.:** Primärdaten der Atlas human Cancer 1.2 Arrays mit radioaktivem  $P_{32}$  markiert und auf einem Phosphoimager ausgewertet. **A:** cDNA-Expressionsprofil einer mesenchymalen Stammzellpopulation. **B:** cDNA Expressionsprofil des Riesenzelltumors RZT7



**Abb. E.9.C.:** Auswertung der Expressionsprofile aller RZT-Stromazellen im Vergleich zu der Expression von mesenchymalen Stammzellen. Die Arrays wurden auf ihre GAPDH Expression normiert und mit der Atlas Image 2.0 Software abgeglichen. Die roten Markierungen stellen eine erhöhte Expression im Riesenzelltumor dar, während die blauen Markierungen eine erniedrigte Expression kennzeichnen. Die grünen Markierungen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen beiden Zellarten an.

### E.3.2. Verifizierung des Expressionsprofils mit Real-Time PCR Analyse

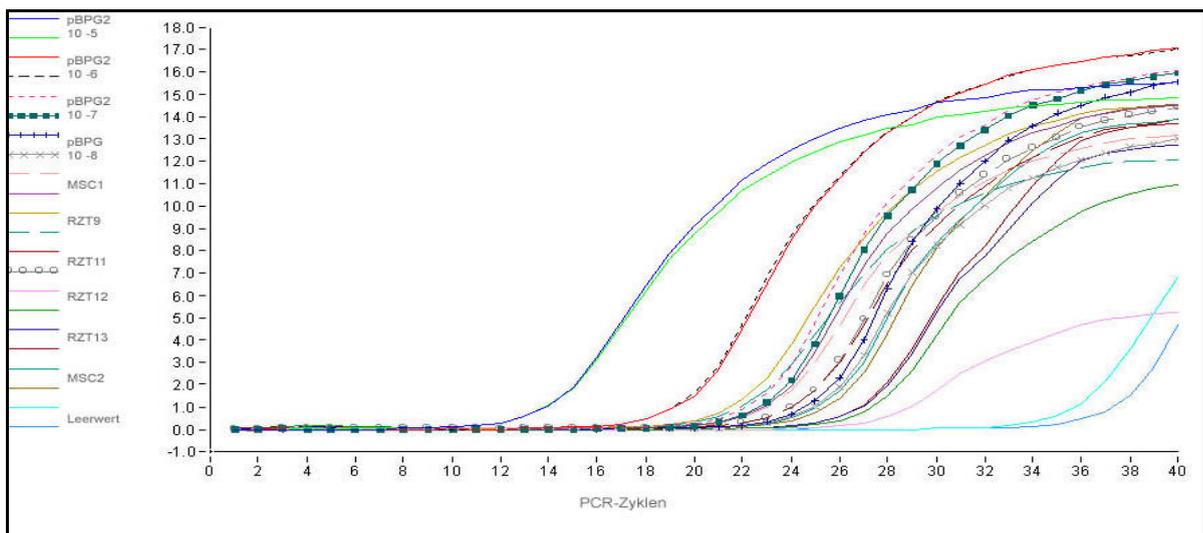
Die Real-Time PCR Analyse bietet eine verlässliche Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression, deshalb wurden die Expressionsunterschiede der zehn ausgewählten Gene mit Real-Time PCR verifiziert. Zur Erstellung einer Standardreihe, die zur Berechnung der mRNA-Konzentrationen notwendig war, wurde eine konventionelle PCR der untersuchten Gene mit spezifischen Primern durchgeführt und die PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 kloniert (Anhang H.1.: Plasmidkarte des pCR.2.1-Vektor). Die zur Klonierung eingesetzten PCR-Produkte sind in Abbildung E.10.A. dargestellt. Die PCR der Plasmid-DNA ist in Abbildung E.10.B. abgebildet. Die Identität der klonierten Genfragmente wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Plasmid-DNA jedes Gens wurde als Standardreihe zur Real-Time PCR eingesetzt.



**Abb.E.10.A.:** PCR der cDNA der RZT-Stromazellen mit den zehn differentiell exprimierten Genen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% EtBr-Agarosegel aufgetragen und ihre Größe bestimmt. 1: Interleukin-6, 2: Calmodulin 1, 3: NM23-H2, 4: TIMP7, 5: Bone Proteoglycan 2, 6:  $\alpha$ 2-Macroglobulin-RaP, 7: MIC-1, 8: Cathepsin L, 9: c-Jun, 10: Fibronectin.

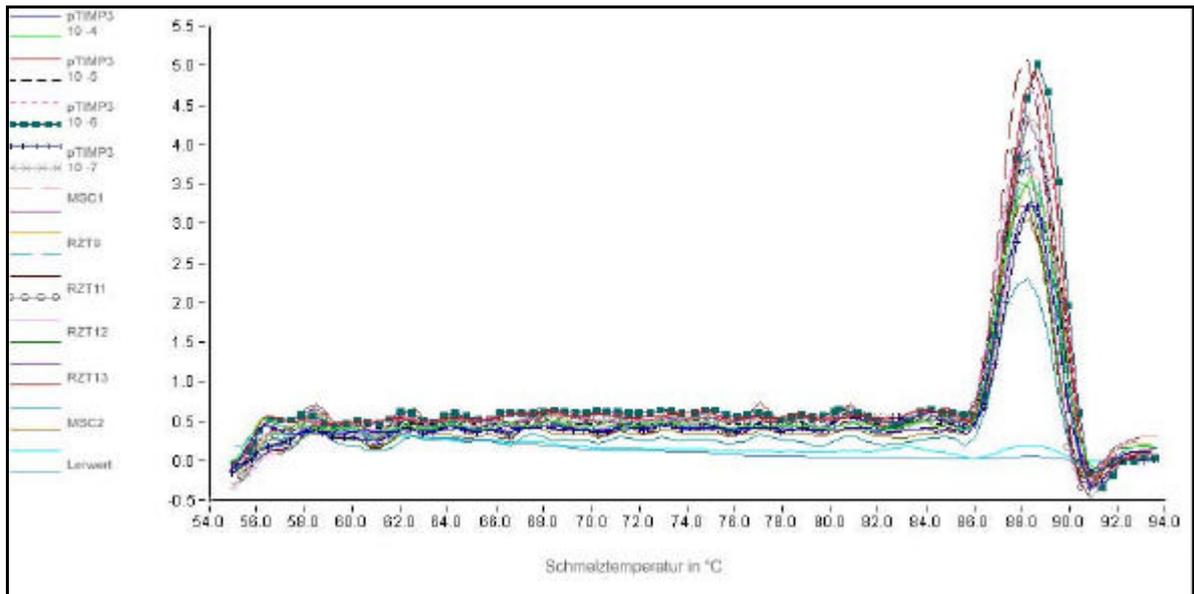
**Abb.E.10.B.:** PCR der Plasmid-DNA mit den zehn differentiell exprimierten Genen; 1:  $\alpha$ 2-Macroglobulin-RaP, 2: MIC-1, 3: Cathepsin L, 4: Bone Proteoglycan 2, 5: Calmodulin 1, 6: Interleukin-6, 7: c-Jun, 8: NM23-H2, 9: TIMP7, 10: Fibronectin.

Die Auswertung der Real-Time PCR im Light Cycler (Roche) erfolgte durch Messung der Fluoreszenzzunahme durch Bildung neuer Doppelstrang-DNA während jedes PCR-Zyklus. In Abbildung E.11.A. ist der Verlauf der Amplifikation der PCR-Produkte von den vier Standardverdünnungen der Plasmid-DNA und der untersuchten Proben beispielhaft für das PCR-Produkt des Bone Proteoglycan 2 dargestellt. Für jede Probe wurden Doppelwerte bestimmt und aus diesen der Mittelwert berechnet.



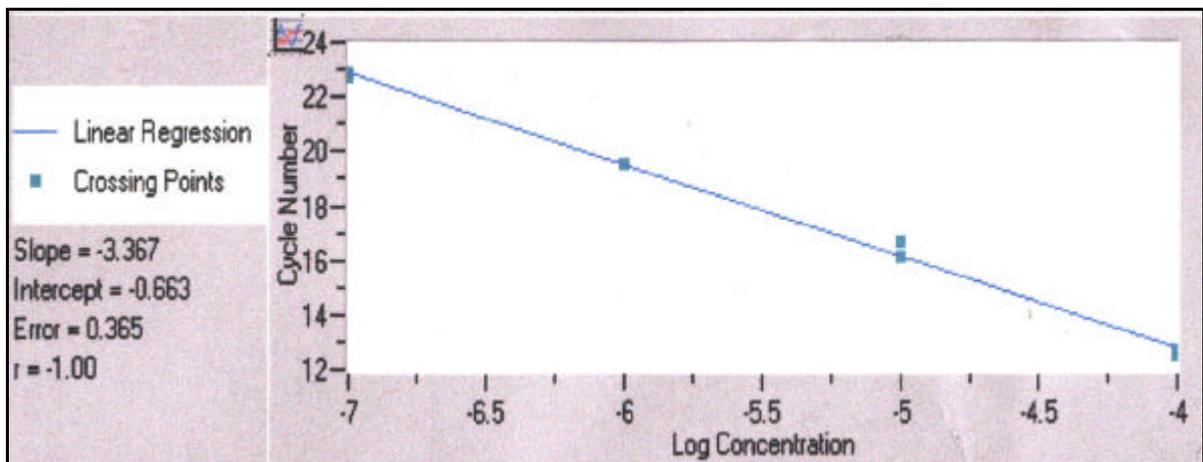
**Abb.11.A.:** Graphische Darstellung der Fluoreszenz der einzelnen PCR-Reaktionen über der Zykluszahl.

Die PCR-Reaktion folgte einer Sättigungskurve, in Abhängigkeit von der eingesetzten Ausgangskonzentration der DNA. Die beiden Negativkontrollen ohne DNA stiegen deutlich später durch Bildung von Oligonukleotiddimeren an. Um die Spezifität der PCR zu überprüfen, wurden die Amplifikate direkt im Anschluß an die PCR-Reaktion von 55°C auf 95°C erhitzt und die Abnahme der Fluoreszenz durch Dissoziation des DNA-Doppelstranges kontinuierlich über den gesamten Vorgang aufgenommen. Die aus diesen Daten erstellte Schmelzkurve ist in Abbildung E.11.B. exemplarisch für das TIMP3 PCR-Produkt abgebildet. Ein Schmelzpunkt zwischen 85°C-95°C ist typisch für humane Doppelstrang-DNA, während Oligonukleotiddimere bei 70°C-75°C schmelzen. Falls in der Schmelzkurve noch Peaks bei anderen Temperaturen auftreten, ist davon auszugehen, daß es sich dabei entweder um Oligonukleotiddimere oder um Kontaminationen handelt.



**Abb.E.11.B.:** Schmelzkurve der TIMP3-PCR. Die Fluoreszenzintensität  $-df/dt$  wurde über der Temperatur in  $^{\circ}\text{C}$  aufgetragen. Der spezifische Schmelzpunkt dieses PCR-Produktes lag bei  $88^{\circ}\text{C}$ .

Aus dem Verlauf der Amplifikationskurven der Standardverdünnungsreihe wurde die Standardkurve ermittelt, anhand derer die Konzentrationen der unbekannt Proben bestimmt wurden. Die Standardreihe des TIMP3-Plasmides in den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  bis  $10^{-8}$  ist in Abb.E.11.C. dargestellt.



**Abb.E.11.C.:** Standardkurve des TIMP3-Plasmides. Dargestellt ist die Zykluszahl über den Logarithmus der Konzentration.

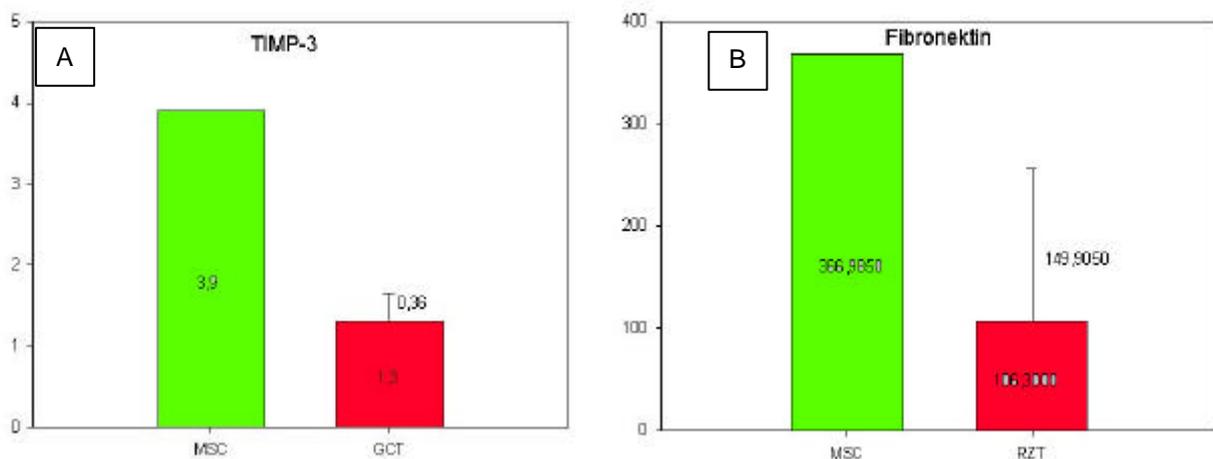
Die Schnittpunkte der Proben mit der Standardkurve ("crossing points") wurden berechnet, woraus sich die Konzentration der Proben ergab. Zur Normierung der mRNA-Konzentrationsunterschiede verschiedener Präparationen wurde die Expression jedes Genes auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH

abgeglichen. Es wurde die Expression der Gene in fünf verschiedenen Riesenzelltumoren und zwei mesenchymalen Stammzellpopulationen bestimmt.

Die Werte zeigten individuelle, patientenspezifische Schwankungen, die durch Berechnung eines Mittelwertes der mRNA-Konzentrationen sowohl der RZT-Stromazellen als auch der mesenchymalen Stammzellpopulationen ausgeglichen wurde. Für die Expressionwerte der RZT-Stromazellen wurde die Standardabweichung berechnet und in Abbildungen E.12. und E.13. dargestellt. Die Daten der Genexpression aller Gene ist in Tabelle E.3 zusammengefasst.

Gen \ Zellart	MSC1	MSC2	RZT9	RZT11	RZT12	RZT13
Fibronectin	159.615	574.355	12.193	12.417	35.150	365.440
TIMP3	5.635	2.101	1.955	0.803	1,905	0.601
A2-Macroglobulin	7.403	11.892	48.839	14.706	25.567	17,321
Bone Proteoglycan 2	0.306	0.131	1.096	0.763	0.131	0.049
Calmodulin	0.402	0.244	0.677	1.675	0.026	0.228
Cathepsin L	2.326	1.458	6.448	7.509	5,567	2.003
Interleukin-6	8.406	15.235	49.161	37.417	25.489	29.969
c-Jun	0.132	0.272	0.113	0.657	0.582	0.534
MIC-1	0.006	0.019	0.0196	0.201	0.049	0.079
NM23	0.166	0.219	0.206	0.343	0.593	0.118

**Tabelle E.3.:** Zusammenfassung der mRNA-Expressionsdaten der Real-Time PCR aller RZT-Stromazellen und mesenchymalen Stammzellen nach Normierung auf die GAPDH Expression. Die Daten sind in Abbildung E.12. und E.13. grafisch dargestellt.



**Abb.E.12.:** Quantifizierung der reduzierten Genexpression in den RZT-Stromazellen mit Real-Time PCR. MSC-Probenanzahl n=2, RZT-Probenanzahl n=4;

**Abb.E.12.A.:** verminderte TIMP3 Expression in den RZT-Stromazellen.

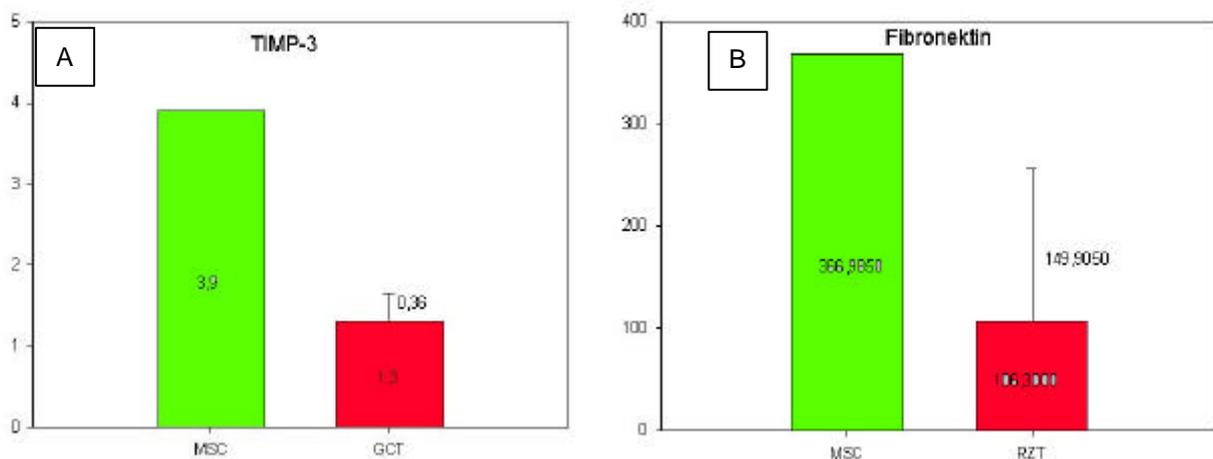
**Abb.E.12.B.:** verminderte Fibronectin-Expression in den RZT-Stromazellen.

abgeglichen. Es wurde die Expression der Gene in fünf verschiedenen Riesenzelltumoren und zwei mesenchymalen Stammzellpopulationen bestimmt.

Die Werte zeigten individuelle, patientenspezifische Schwankungen, die durch Berechnung eines Mittelwertes der mRNA-Konzentrationen sowohl der RZT-Stromazellen als auch der mesenchymalen Stammzellpopulationen ausgeglichen wurde. Für die Expressionwerte der RZT-Stromazellen wurde die Standardabweichung berechnet und in Abbildungen E.12. und E.13. dargestellt. Die Daten der Genexpression aller Gene ist in Tabelle E.3 zusammengefasst.

Gen \ Zellart	MSC1	MSC2	RZT9	RZT11	RZT12	RZT13
Fibronectin	159.615	574.355	12.193	12.417	35.150	365.440
TIMP3	5.635	2.101	1.955	0.803	1,905	0.601
A2-Macroglobulin	7.403	11.892	48.839	14.706	25.567	17,321
Bone Proteoglycan 2	0.306	0.131	1.096	0.763	0.131	0.049
Calmodulin	0.402	0.244	0.677	1.675	0.026	0.228
Cathepsin L	2.326	1.458	6.448	7.509	5,567	2.003
Interleukin-6	8.406	15.235	49.161	37.417	25.489	29.969
c-Jun	0.132	0.272	0.113	0.657	0.582	0.534
MIC-1	0.006	0.019	0.0196	0.201	0.049	0.079
NM23	0.166	0.219	0.206	0.343	0.593	0.118

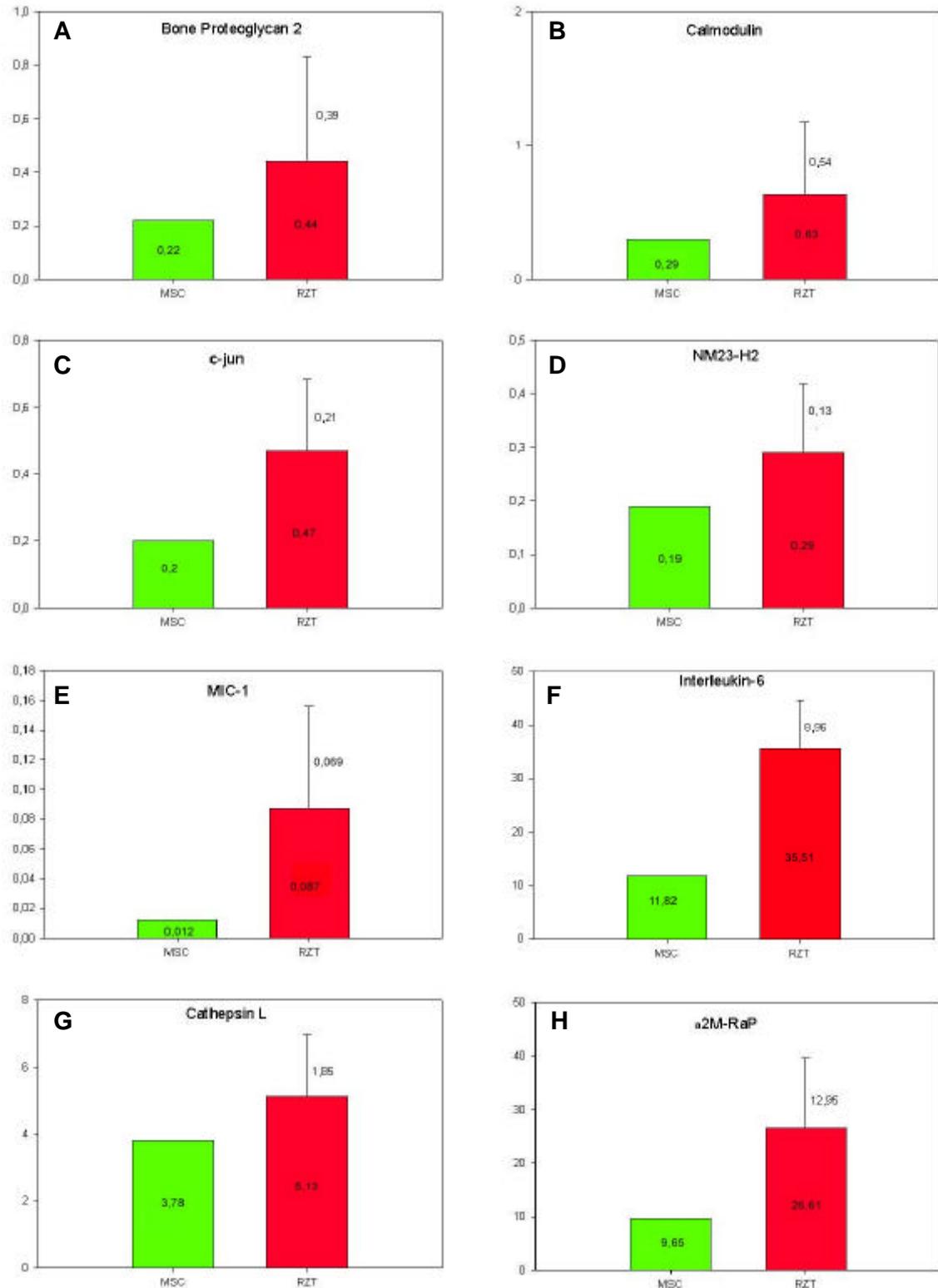
**Tabelle E.3.:** Zusammenfassung der mRNA-Expressionsdaten der Real-Time PCR aller RZT-Stromazellen und mesenchymalen Stammzellen nach Normierung auf die GAPDH Expression. Die Daten sind in Abbildung E.12. und E.13. grafisch dargestellt.



**Abb.E.12.:** Quantifizierung der reduzierten Genexpression in den RZT-Stromazellen mit Real-Time PCR. MSC-Probenanzahl n=2, RZT-Probenanzahl n=4;

**Abb.E.12.A.:** verminderte TIMP3 Expression in den RZT-Stromazellen.

**Abb.E.12.B.:** verminderte Fibronectin-Expression in den RZT-Stromazellen.



**Abb.E.13.:** Quantifizierung der Genexpression in den RZT-Stromazellen. Es wurde die absolute mRNA-Menge in  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  nach Normierung der Werte auf GAPDH dargestellt. MSC-Probenanzahl  $n=2$ , RZT-Probenanzahl  $n=4$ ;

**A:** Bone Proteoglycan 2; **B:** Calmodulin; **C:** c-Jun; **D:** NM23; **E:** MIC-1; **F:** Interleukin 6; **G:** Cathepsin L; **H:**  $\alpha$ 2-Macroglobulin Rezeptor-assoziiertes Protein

*Welche Veränderung der Genexpression führt zur Akkumulation der Riesenzellen im Tumorgewebe ?*

#### **E.4. Einfluß der RZT-Stromazellen auf die Tumorangiogenese**

##### **E.4.1. Expression der mRNA angiogenetischer Faktoren**

Der Riesenzelltumor ist ein stark vaskularisierter Tumor. Die Monozyten und mehrkernigen Riesenzellen, die in großer Anzahl im Tumorgewebe vorliegen, entstehen aus hämatopoetischen Zellen, die aus den Blutgefäßen in den Tumor einwandern und dort zu mehrkernigen Riesenzellen fusionieren. Die Angiogenese ist somit für die zelluläre Komposition dieses Tumors bedeutsam.

Die von uns verwendeten „human Cancer 1.2 cDNA-Arrays“ lieferten eine Anzahl von Genen, die für die Entstehung des Riesenzelltumors relevant sein könnten. Eine Beteiligung an der Anlockung und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in mehrkernige Riesenzellen ist jedoch nur für die Zytokine MIC-1 und IL-6 anzunehmen.

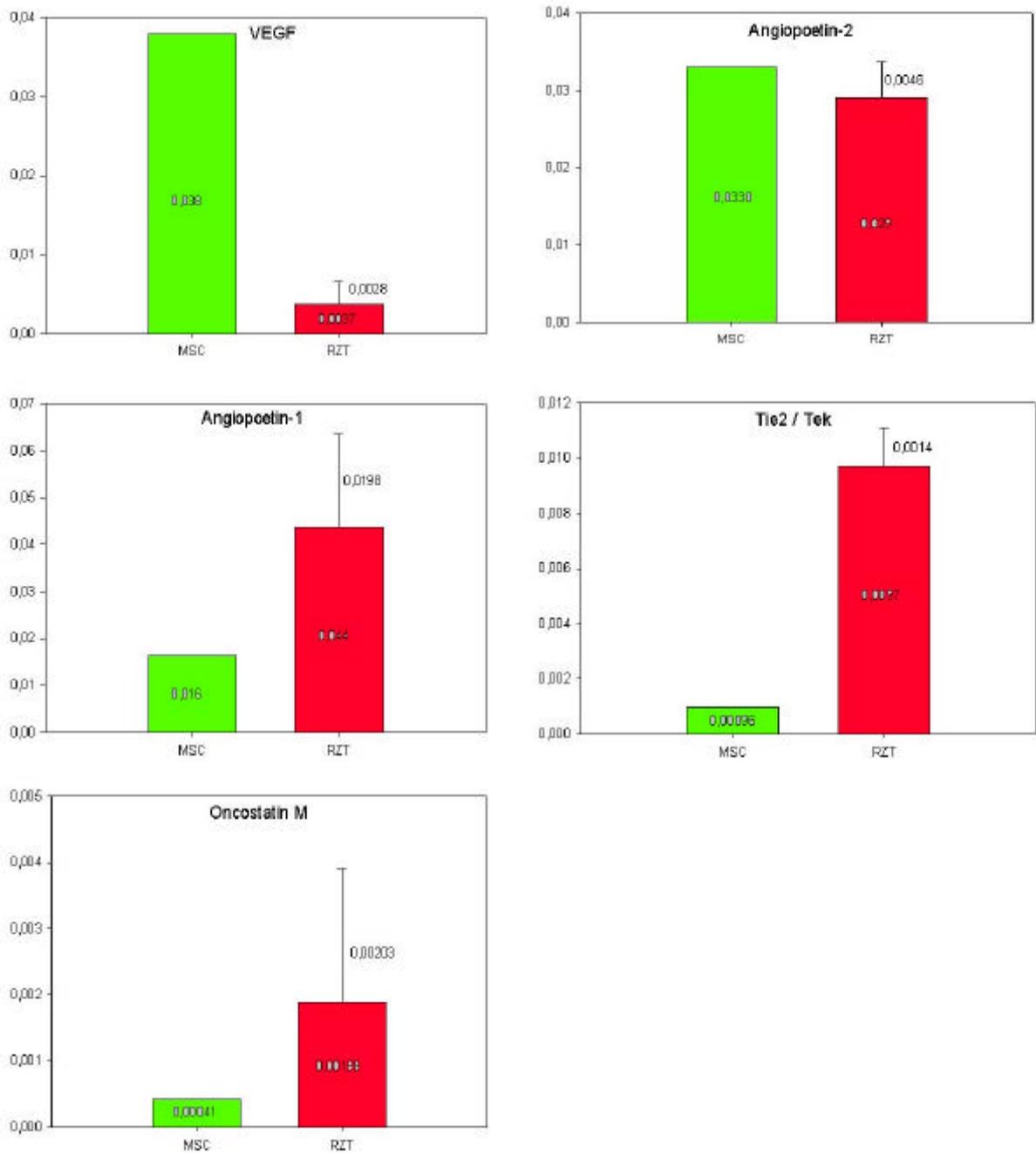
Zur Untersuchung weiterer Faktoren, die einen positiven Einfluß auf die Invasion von hämatopoetischen Zellen aufweisen könnten, wurde die mRNA-Expression von einigen bekannten, angiogenetisch wichtigen Faktoren und deren Rezeptoren auf den RZT-Stromazellen und den mesenchymalen Stammzellen mit Real-Time PCR untersucht. Als relevante Faktoren wurde die Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, OncostatinM, aber auch des VEGF-Rezeptors Typ II (KDR/Flk-1) und des Angiopoietin-Rezeptors Tie2/Tek bestimmt. Es wurde die mRNA Expression in zwei mesenchymalen Stammzellpopulationen und vier Riesenzelltumoren analysiert. Die Durchführung und Auswertung der Real-Time PCR Experimente erfolgte auf dem Light Cycler (Roche) wie bereits für die Verifizierung der cDNA-Arrays beschrieben. Die mRNA-Expression aller Gene wurde durch Abgleich auf die Expression des Haushaltsgens *GAPDH* normiert. Die Expressionsdaten aller untersuchten Zellpopulationen sind in Tabelle E.4. zusammengefasst. Die Werte zeigten auch bei diesen Genen individuelle, patientenspezifische Schwankungen die durch Berechnung eines Mittelwertes der mRNA-Konzentrationen sowohl der RZT-Stromazellen als auch der mesenchymalen Stammzellpopulationen ausgeglichen wurde. Die Mittelwerte der mRNA-Expression der RZT-Stromazellen und mesenchymalen Stammzellen sind in Abbildung E.14. grafisch dargestellt.

Zellart Gen	MSC1	MSC2	RZT9	RZT10	RZT11	RZT12	RZT13
VEGF	0,00585	0,0764	0,00756	0,00061	0,00074	neg	0,00366
Angiopoetin 1	0,0123	0,021	0,0712	0,0561	0,00392	0,0119	0,0561
Angiopoetin 2	0,0617	0,0048	0,0131	0,00739	0,00717	0,00159	0,000176
Tie2-Tek	0,0002	0,00051	0,0023	0,00053	0,00064	0,0044	0,0012
KDR	neg	neg.	neg.		neg.	neg	
Oncostatin M	0.00049	0.00034	0.00005	0.0055	0.00246	0.00134	0.000006

**Tabelle E. 4.:** Zusammenfassung der mRNA-Expressionsdaten der angiogenetischen Faktoren aller RZT-Stromazellen und mesenchymalen Stammzellen nach Normierung auf die GAPDH Expression.

Die Auswertung der Expressionsunterschiede der angiogenetischen Faktoren in RZT-Stromazellen und mesenchymalen Stammzellen zeigte eine um den Faktor 10 verringerte VEGF mRNA-Expression in den RZT-Stromazellen (Abb.E.14.A.). Die mRNA-Expression des VEGF-Rezeptor Typ II (KDR) konnte weder in den mesenchymalen Stammzellen noch in den RZT-Stromazellen mit Real-Time PCR detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA des Rezeptors Tie-2/Tek, der als Rezeptor der Angiopoetine wirkt (Horner et al., 2001), in den RZT-Stromazellen deutlich höher exprimiert als in den mesenchymalen Stammzellen (Abb.E.14.B.).

Der Liganden des Tie2/Tek Rezeptor Angiopoetin-1 zeigten eine 4-fach erhöhte mRNA-Expression in den RZT-Stromazellen (Abb.E.14.C.), wohingegen der zweite Ligand Angiopoetin-2 nur geringe Expressionsunterschiede zwischen den RZT-Stromazellen und den mesenchymalen Stammzellen zeigte (Abb.E.14.D.). Die mRNA des Zytokine Oncostatin M wurde in den RZT-Stromazellen deutlich mehr gebildet als in den mesenchymalen Stammzellen (Abb.E.14.E.). Die Analyse der mRNA Expression zeigte deutliche Expressionsunterschiede der angiogenetisch wirksamen Faktoren zwischen den RZT-Stromazellen und den mesenchymalen Stammzellen.



**Abb.E.14.:** Graphische Darstellung der mRNA Expression der angiogenetischen Faktoren in RZT-Stromazellen und mesenchymalen Stammzellen. MSC-Probenanzahl n=2, RZT-Probenanzahl n=5; **A:** VEGF; **B:** Tie2/Tek; **C:** Angiopoetin-1; **D:** Angiopoetin-2; **E:** Oncostatin M.

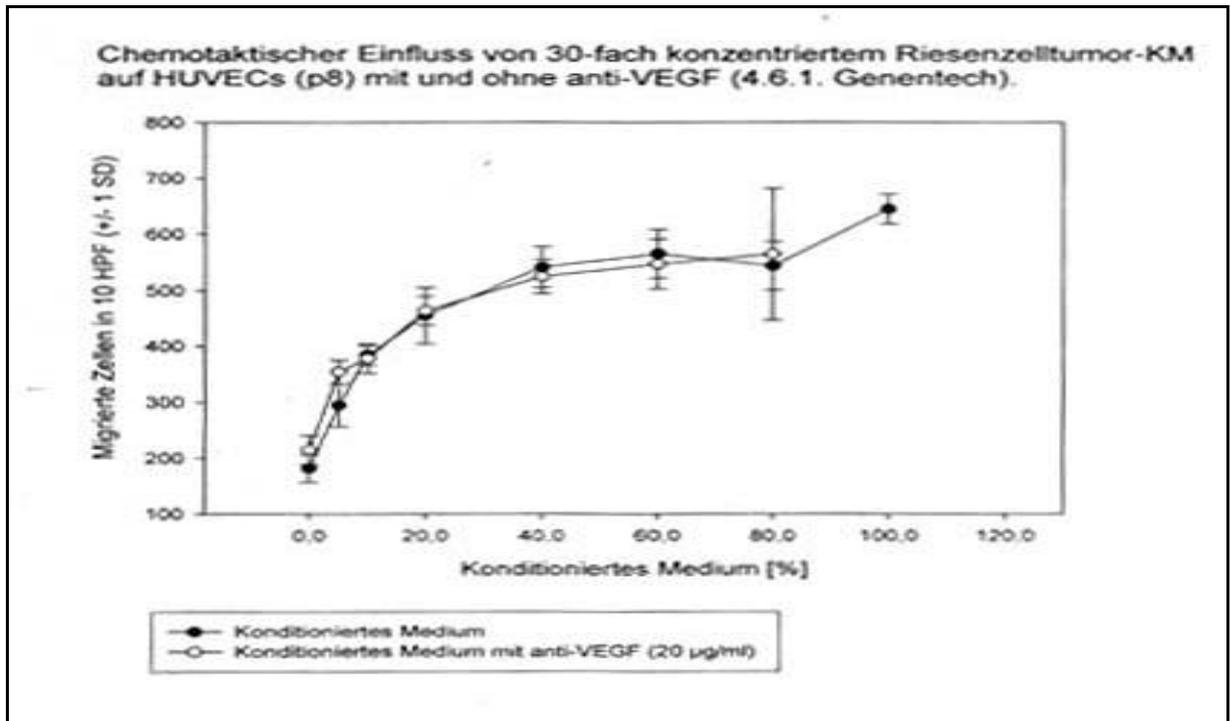
Der Einfluß der Expressionsunterschiede dieser angiogenetischen Zytokine auf die Migration von hämatopoetischen Zellen wurde in funktionellen Tests untersucht.

#### E.4.2. Induktion der Migration von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen durch konditioniertes Medium des Riesenzelltumors

Durch Verwendung des Boyden Chamber Assays kann überprüft werden, ob die RZT-Stromazellen Faktoren sezernieren, die eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen und hämatopoetische Zellen aufweisen. Damit wäre eine wichtige Voraussetzung für die Tumorangiogenese und die anschließende Infiltration mit Blutmonozyten geschaffen. Das konditionierte RZT-Kulturmedium wird in ansteigender Konzentration als Induktor der Migration von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (**H**uman **U**mbilicord **V**ene **E**ndothelial **C**ells, Huvec) eingesetzt. Aus der Sättigungskurve in Abb.E.14. (schwarze Markierung) ist zu erkennen, daß die Migrationsaktivität der Huvec in Abhängigkeit von der Konzentration des konditionierten Riesenzelltumormediums bis zu einem Maximalwert ansteigt. Die Riesenzelltumoren induzieren damit eine Migration von Endothelzellen und somit eine Vaskularisierung des Tumorgewebes.

Aus der Literatur ist bekannt, das VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen und hämatopoetische Zellen besitzt (Hattori et al., 2001) und von Riesenzelltumoren gebildet wird (Zheng et al., 2000). Durch Zugabe eines inhibierendes Antikörpers zum Riesenzelltumormedium sollte der Einfluß des VEGF auf die Zellmigration verhindert werden. Wie jedoch in Abbildung E.15. (weiße Markierung) zu erkennen ist, wird der chemotaktische Effekt des Riesenzelltumormediums auf die Endothelzellen nicht durch VEGF hervorgerufen, sondern muß durch andere Chemokine bedingt sein.

Das Chemokin Angiopoetin-1 besitzt einen positiven Einfluß auf die Migrationsaktivität von Huvec (Carlson et al., 2001). Da Angiopoetin-1 in den RZT-Stromazellen hoch reguliert wurde, ist seine Beteiligung an der chemotaktischen Aktivität des Riesenzelltumormediums sehr wahrscheinlich und sollte weiter getestet werden.



**Abb.E.15.:** Darstellung des Migrationsverhaltens von Huvec in Abhängigkeit von der Konzentration des konditionierten Riesenzelltumormedium im Boyden-Chamber Assay (schwarze Markierung). Die weiß gekennzeichneten Punkte stellen das Migrationsverhalten der Zellen bei Zugabe von Anti-VEGF-Antikörper zum konditionierten Riesenzelltumormedium dar.

## **F. Diskussion**

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß durch die genaue Charakterisierung der neoplastischen Stromazellen des Riesenzelltumors die mesenchymale Stammzelle als Ursprungszelle identifiziert werden konnte. Die Ergebnisse erweitern die morphologischen und physiologischen Daten von Goldring et al. (Goldring et al., 1987), welche die Zusammensetzung des Riesenzelltumors (RZT) aus drei verschiedenen Zelltypen demonstrierten. Die bei der Erstbeschreibung des RZT von Jaffe (Jaffe and Poartis, 1940) postulierte Neoplasie des Osteoklasten konnte aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten und anderer Publikationen zur Entstehung des Riesenzelltumors modifiziert werden (Wulling et al., 2001; Zheng et al., 2001).

Des Weiteren konnten mit Hilfe innovativer Techniken (cDNA-Arrays, Real-Time PCR) verschieden Gene identifiziert werden, die an der Entstehung des RZT beteiligt sein könnten. Erste funktionelle Untersuchungen zur Angiogenese im Riesenzelltumor bewiesen die Sekretion von Chemokinen, die eine Migration von Endothelzellen induzieren und damit die Interaktion der Tumorkomponenten ermöglichen.

### ***Die neoplastische Stromazelle des Riesenzelltumors entsteht aus einer undifferenzierten , mesenchymalen Stammzelle des Knochenmarks.***

Die Stromazelle des Riesenzelltumors exprimiert die frühen Differenzierungsmarker SH2, SH3, SH4, CD166 und Stro1. Diese Markerkombination konnte bisher nur auf undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden (Bruder et al., 1998; Haynesworth et al., 1992; Simmons and Torok-Storb, 1991b). Durch die Induktion der Differenzierung in die verschiedenen mesenchymalen Zelltypen nimmt die Expression dieser Marker ab (Bruder et al., 1998; Gronthos et al., 1994; Haynesworth et al., 1992).

Das Antigen SH2 entspricht dem TGF- $\beta$  Rezeptor Typ III Endoglin (CD105), der auf Knochenmarksstromazellen beschrieben wurde (Barry et al., 1999; Fleming et al., 1998; Robledo et al., 1998). Endoglin ist ein Membranglykoprotein, welches als Homodimer oder Heterodimer gemeinsam mit dem TGF- $\beta$  Rezeptor Typ I die Liganden TGF- $\beta$ 1 und 3 binden kann (Cheifetz et al., 1992). Bisher wurde bereits die Expression von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 und der TGF- $\beta$  Rezeptoren Typ I und II im Riesenzelltumor nachgewiesen (Franchi et al., 2001; Zheng et al., 1994).

Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  und seine Rezeptoren verhindern eine weitere Differenzierung von frühen Osteoblastenvorläuferzellen (Bruder et al., 1997). Für die RZT-Stromazellen wurde die TGF- $\beta$  Expression die Erhaltung des undifferenzierten Phänotyps bedeuten.

Im Gegensatz zu seiner inhibitorischen Wirkung auf Osteoblasten induziert TGF- $\beta$  die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten (Kurihara et al., 1990; Manolagas, 1995). Im Riesenzelltumor ist TGF- $\beta$  für die Chemotaxis der Monozyten ins Tumorgewebe mit verantwortlich (Zheng et al., 1994).

Die Antigene der Marker SH3 und SH4 wurden kürzlich als zwei verschiedene Epitope des CD73 Antigens identifiziert (Barry et al., 2001). Das CD73 Antigen ist eine 5´Ekto-Nukleotidase und ein signaltransduzierendes Membranprotein (Airas et al., 2000; Resta et al., 1998). CD73 wurde in lymphoiden Geweben und auf Endothelzellen nachgewiesen. Es ist für die Aktivierung von B-Lymphozyten und die Interaktion von Lymphozyten und Endothelzellen von Bedeutung (Yamashita et al., 1998). Außerdem ist CD73 an der Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen beteiligt und ein Einfluß auf die Differenzierung und Interaktion von mesenchymalen Stammzellen und hämatopoetischen Zellen wird angenommen (Barry et al., 2001). Das Antigen SH3 wurde in vitro und in vivo in den RZT-Stromazellen deutlich geringer exprimiert als SH2 und SH4. Eine Erklärung für den Expressionsunterschied des CD73-Antigens könnte die Verwendung der Immunhistologie sein, die keine valide Quantifizierungsmethode darstellt. Außerdem wurden unverdünnte Hybridomaüberstände verwendet, deren Konzentration und Affinität des spezifischen Antikörpers und der daraus resultierenden Detektionsgrenzen nicht genau bekannt waren.

Das Antigen ALCAM (CD166) entspricht dem Marker SB10, der auf embryonalen Periostzellen beschrieben wurde (Bruder et al., 1998). Im postnatalen Gewebe wird ALCAM außer auf mesenchymalen Stammzellen und frühen Osteoblastenvorläuferzellen auch auf Leukozyten, Monozyten, hämatopoetischen Vorläuferzellen, Endothelzellen und Perizyten gefunden (Bowen et al., 1995; Cortes et al., 1999; De Bari et al., 2001; Degen et al., 1998). Durch Bindung an seinen Korezeptor CD6 oder Homodimerisierung unterstützt ALCAM die Zell-Zell-Interaktion (Bowen and Aruffo, 1999) und die Adhäsion von hämatopoetischen

Zellen an die mesenchymalen Zellen des Knochenmarks (Uchida et al., 1997). Der Anteil an ALCAM exprimierenden Zellen im adulten Knochenmark ist sehr gering. In den Gefrierschnitten des Riesenzelltumors wies jedoch ein Großteil der Zellen diesen Marker auf. Diese Beobachtung läßt einen gesteigerten Anteil an MSC ähnlichen Zellen im RZT vermuten.

Die Beschreibung des Markers Stro1 erfolgte auf Osteoblastenvorläuferzellen im Knochenmark, doch bleibt er im Verlauf der Differenzierung erhalten und ist noch in differenzierten Osteoblasten nachweisbar. Erst bei Beginn der Mineralisierung wird Stro1 nicht mehr gebildet (Gronthos et al., 1999) Das Stro1 Antigen kann somit nicht als direkter Marker der MSC bezeichnet werden.

Der Marker Thy-1 wurde auf undifferenzierten humanen Knochenmarksstromazellen, welche die mesenchymale Stammzellfraktion enthalten, beschrieben (Stewart et al., 1999). Analog zu dieser Beschreibung zeigten die RZT-Stromazellen und die MSC eine schwache Reaktion mit dem Thy-1 Antikörper.

Die Expression der Matrixmoleküle Osteonectin und Osteopontin wurde in der mesenchymalen Differenzierung erst ab dem Präosteoblastenstadium beschrieben (Bruder et al., 1997). Im Gegensatz zu diesem Befund konnten in dieser Arbeit die beiden Marker auf den RZT-Stromazellen und den MSC nachgewiesen werden. Dieses geänderte Expressionsmuster könnte auf die erhöhte Proliferationsrate der Zellen in Zellkultur zurückzuführen sein, da MSC im Knochenmark normalerweise als ruhende Zellen vorliegen. Zusätzlich wurde eine erhöhte Osteonektinsynthese bereits in anderen Tumoren als Zeichen einer erhöhten Proliferation beobachtet (Sage, 1997). Daneben wird die Osteopontinsynthese durch TGF- $\beta$  induziert, während die Bildung der osteoblastenspezifischen Proteine Osteocalcin und alkalische Phosphatase verhindert wird (Breen et al., 1994). Die TGF- $\beta$  Expression im Riesenzelltumor könnte das Expressionsprofil der Proteine in den RZT-Stromazellen gegenüber der normalen, differenzierungsspezifischen Expression in Osteoblasten erklären. Außerdem konnte in knock-out Mäusen gezeigt werden, daß Osteopontin nicht nur die Angiogenese, sondern auch die Akkumulation und Aktivität von Osteoklasten

fördert (Asou et al., 2001), so daß Osteopontin diese Funktion auch im RZT zukommen könnte.

Die Färbung der Kryostatschnitte des Riesenzelltumors zeigte eine starke Anreicherung von Zellen, welche die frühen Differenzierungsmarker exprimieren, während im normalen Knochenmark nur 0,1%-0,01% der Zellen diese Marker aufwiesen. Somit ist die Anzahl an mesenchymalen Stammzellen im Riesenzelltumorgewebe deutlich erhöht, wodurch die Entstehung der RZT-Stromazellen aus mesenchymalen Stammzellen anzunehmen ist.

***Die RZT-Stromazellen besitzen in vitro das gleiche Differenzierungspotential wie die MSC, doch sind sie in vivo nicht zur Differenzierung fähig.***

Die mesenchymalen Stammzellen und die RZT-Stromazellen können durch Verwendung geeigneter Stimulationsmedien in vitro in die verschiedenen mesenchymalen Zellen, wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren (Pittenger et al., 1999). Die Differenzierung der MSC ist im gesunden Knochenmark von zahlreichen Faktoren, wie Hormonen und Zytokinen, aber auch vom Alter des Patientens abhängig (Nuttall and Gimble, 2000; Nuttall et al., 1998). Im Riesenzelltumor findet in vivo keine oder nur eine sehr geringe Differenzierung der Stromazellen statt. Erst durch Transplantation von in vitro vermehrten RZT-Stromazellen an die Calvarien von SCID-Mäusen war eine in vivo Differenzierung in Osteoblasten möglich (James et al., 1996; Joyner et al., 1992). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß durch die neoplastische Transformation der RZT-Stromazellen entweder ihre Differenzierung inhibiert wird oder das Differenzierungsaktivatoren fehlen, so daß die RZT-Stromazellen ihren undifferenzierten Phänotyp beibehalten. Mit Hilfe von cDNA-Arrays sollte die Identität der daran beteiligten, tumorrelevanten Faktoren geklärt werden.

***Die RZT-Stromazellen könnten aus pluripotenten, prähämatopoetischen, prämesenchymalen Stammzellen entstehen, doch existieren bisher noch keine Marker zur eindeutigen Identifizierung dieser Zellen.***

Kontrovers zu den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen steht die Beschreibung der Riesenzelltumorzelllinie GCT23, die nach bis zu 18 Passagen in Zellkultur noch mehrkernige Riesenzellen ausbildet und somit eine Neoplasie der

Osteoklastenlinie darstellt (Zambonin Zallone et al., 1995). Doch bildeten nur drei der 16 untersuchten RZT mehrkernige Riesenzellen in Zellkultur, während die anderen 13 RZT einen mononukleäre Zellkomponente aufwiesen (Grano et al., 1994; Zambonin Zallone et al., 1995). Die Autoren diskutieren die Existenz von zwei Tumorentitäten mit unterschiedlicher Genese, die bisher jedoch nicht validiert werden konnte.

Eine mögliche Erklärung der divergierenden Ergebnisse ist die Entstehung des Riesenzelltumors aus einer pluripotenten Stammzelle, die sowohl in hämatopoetische als auch in mesenchymale Gewebe differenzieren kann. Im Knochenmark von Mäusen konnte eine pluripotente Vorläuferzelle identifiziert werden, die zur Differenzierung in mesenchymale und hämatopoetische Zellen in der Lage ist. Im Gegensatz zu den mesenchymalen Stammzellen benötigen diese pluripotenten, prähämatopoetischen, prämesenchymalen Stammzellen die Zugabe von TGF- $\beta$  als essentielle Wachstumsanforderung (Hall et al., 2001). Die erhöhte TGF- $\beta$  Expression in den Riesenzelltumoren würde die Wachstumsbedingungen dieser Zellen erfüllen (Kurihara et al., 1990; Zheng et al., 1994). Die erste Beschreibung einer humanen Stammzelle, die zur Differenzierung in hämatopoetische und mesenchymale Zellen in der Lage ist, charakterisierte diese als CD34<sup>+</sup> und Stro1<sup>+</sup> (Huang and Terstappen, 1992; Huang and Terstappen, 1994), wohingegen neuere Studien sie als CD34<sup>-</sup> beschreiben (Huss, 1997; Huss, 2000). Die Expression des CD34 Antigen ist in vitro vermindert, wodurch diese divergierenden Beobachtungen auftreten können (Simmons and Torok-Storb, 1991a). Die Zugabe von Interleukin-6 fördert die Ausbildung des mesenchymalen Phänotyps der pluripotenten Zellen, während durch Supplementierung von Stem Cell Faktor der hämatopoetische Phäntyp induziert wird (Huss, 1997). Die erhöhte Expression von Interleukin-6 im Riesenzelltumor könnte somit die fibroblastenähnliche Morphologie der in dieser Arbeit untersuchten RZT-Stromazellen bedingen. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die pluripotenten Stammzellen die mesenchymalen Marker SH2, SH3 und SH4 exprimieren und somit als Ausgangszelle der RZT-Stromazellen in Betracht kommen.

***Die RZT-Stromazellen ähneln Perizyten, doch unterscheiden sie sich in den Differenzierungsbedingungen und in der Expression der alkalischen Phosphatase.***

Außer den pluripotenten Stammzellen sind nur Perizyten zu einer Differenzierung in das für mesenchymale Stammzellen beschriebene Spektrum in der Lage (Brighton et al., 1992; Doherty et al., 1998b). Aufgrund ihrer Lokalisation um die Gefäße kommen Perizyten in fast allen Geweben vor. Im Gehirn spezialisieren sich die Perizyten zu Gehirnmakrophagen (Thomas, 1999) und im Knochenmark liegen sie als sogenannte retikuläre Zellen vor, die jedoch die Endothelzellen der Gefässinus nicht mehr umgeben (Nehls and Drenckhahn, 1993). Im Gegensatz zu MSC und RZT-Stromazellen bilden Perizyten aus der Retina ohne Zusatz von Dexamethason und  $\beta$ -Glycerolphosphat zum Kulturmedium mineralisierte Nodules aus (Schor et al., 1995). Deshalb werden sie als mögliche Osteoblastenvorläuferzellen in Betracht gezogen (Diefenderfer and Brighton, 2000). Da Perizyten neben den osteoblastären Marker Osteonectin und Osteopontin auch das Enzym alkalische Phosphatase exprimieren (Doherty et al., 1998a), welches in den MSC und RZT-Stromazellen nicht nachgewiesen werden konnte, scheinen die RZT-Stromazellen nicht direkt aus Perizyten zu entstehen.

***Die mesenchymale Stammzelle als Ausgangszelle der RZT-Stromazelle könnte für die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung im Riesenzelltumor verantwortlich sein.***

Die durch MSC induzierte Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung erfolgt über sezernierte Zytokine und Interaktionen von hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen (Majumdar et al., 2000), entsprechend wird auch die Genese der Riesenzellen durch die RZT-Stromazellen induziert.

Sowohl in den MSC als auch in den RZT-Stromazellen, konnte das Zytokine Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) detektiert werden, welches an der Aktivierung der Osteoklasten bzw. der mehrkernigen Riesenzellen beteiligt ist (Heymann and Rousselle, 2000; Malaval et al., 1998). Die Expression von LIF wurde bereits in Riesenzelltumoren beschrieben (Gouin et al., 1999; Soueidan et al., 1995).

Oncostatin M gehört wie LIF zur gp130 Zytokinfamilie und reguliert konzentrationsabhängig sowohl die Osteoblasten als auch die Osteoklastendifferenzierung (Jay et al., 1996; O'Brien et al., 1999; Richards et al.,

2000). Im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung bewirken LIF und Oncostatin M eine erhöhte Proliferation und Synthese von Matrixmolekülen, während die alkalische Phosphatase Aktivität inhibiert wird (Bohic et al., 1998; Jay et al., 1996). Die Regulation der Osteoklastendifferenzierung durch Oncostatin M wird über Osteoblasten vermittelt, welche den Rezeptoren für Oncostatin M besitzen. Auf den Osteoklasten wurden keine LIF und Oncostatin M Rezeptoren nachgewiesen (Bellido et al., 1996; O'Brien et al., 1999). Auf den mehrkernigen Riesenzellen wurde der LIF-Rezeptor detektiert, doch ist nicht bekannt, ob sie auch den Oncostatin M Rezeptor exprimieren (Soueidan et al., 1995). Die Expressionsunterschiede des LIF-Rezeptors könnten für eine unterschiedliche Zytokinregulation der Riesenzellen und für ihre Anreicherung im RZT verantwortlich sein.

Kürzlich wurde auch der Osteoclast Differentiation Factor (ODF) auf den RZT-Stromazellen und sein Rezeptor RANK auf den mehrkernigen Riesenzellen identifiziert (Atkins et al., 2001; Huang et al., 2001). Damit konnte ein für die Osteoklastenaktivierung wichtiger Zell-Zell-Interaktionsmechanismus zwischen MSC und hämatopoetischen Vorläuferzellen auch für die RZT-Stromazellen postuliert werden.

Im Verlauf der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten oder Adipozyten wird die Expression von ODF vermindert, so daß differenzierte Osteoblasten eine geringere Beteiligung an der Osteoklastendifferenzierung als ihre Vorläuferzellen haben (Mbalaviele et al., 2000; Mbalaviele et al., 1999). Die Osteoklastenaktivierung durch undifferenzierte mesenchymale Stammzellen unterstützt die These der RZT-Entstehung aus dieser Zellart.

***Die Auswertung der cDNA-Arrays lieferte zehn differentiell exprimierte Gene, die für die Tumorentstehung relevant sein könnten.***

***Die in den RZT-Stromazellen geringer exprimierten Gene kodieren für die Proteine Fibronectin und den Gewebeinhibitor der Matrix Metalloproteinase-3 (TIMP-3).***

TIMP-3 ist ein Matrixprotein, das an Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix bindet (Yu et al., 2000). Neben der klassischen Funktion als Inhibitor von membrangebundenen Matrix-Metalloproteinasen (Brew et al., 2000) besitzt TIMP-3 weitere, für den RZT wichtige Funktionen (Bian et al., 1996). Die verringerte mRNA-Expression von TIMP-3 könnte die Invasion von Endothelzellen ins Tumorgewebe erleichtern, da TIMP-3 die Angiogenese durch gehemmte chemotaktische Wirkung von VEGF und FGF auf Endothelzellen inhibiert (Anand-Apte et al., 1997).

TIMP-3 ist außerdem ein Inhibitor des TNF- $\alpha$  converting Enzyms (TACE), das zur Familie der ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain) gehört (Amour et al., 1998). Es stabilisiert die Membranrezeptoren der Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 (Amour et al., 1998), wodurch eine erhöhte Sensitivität der Zellen für diese beiden Zytokine vorliegt. Die im RZT gebildeten Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  (Atkins et al., 2000; O'Keefe et al., 1997) bewirken eine Differenzierung von Osteoklasten und könnten die erhöhte Fusionsrate der mehrkernigen Riesenzellen und die osteolytische Aktivität des Riesenzelltumors hervorrufen (Devlin et al., 1998). Zusätzlich wurde in den cDNA-Arrays eine erhöhte IL-6 mRNA Expression in den RZT-Stromazellen nachgewiesen.

In viral transformierten NIH-3T3 Zellen konnte TIMP-3 als Tumorsuppressorgen identifiziert werden (Andreu et al., 1998), während es in nicht-transformierten, Fibroblasten ein adhäsionsunabhängiges Wachstum und die Ausbildung eines transformierten Phänotyps fördert (Yang and Hawkes, 1992). Diese unterschiedlichen Funktionen von TIMP-3 lassen eine Beurteilung seiner Bedeutung für den Riesenzelltumor zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu. Da die Tumorgenese als Prozeß mit mehreren Transformationsprozessen betrachtet wird, könnte die verminderte Expression von TIMP-3 zu verschiedenen Zeitpunkten der RZT-Entstehung wirksam werden.

In den cDNA-Arrays wurde außerdem eine verminderte Expression der Fibronektin mRNA detektiert. Fibronektin ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix des Knochens und dient der Adhäsion von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Dao et al., 1998; Verfaillie et al., 1991). Durch Adhäsion der hämatopoetischen Zellen an die extrazelluläre Matrix wird ihre Proliferation gehemmt und die Differenzierung beeinflusst (Hurley et al., 1995; Kerst et al., 1993). Eine Veränderung der extrazellulären Matrixproteine im RZT könnte zu einer höheren Anzahl von Osteoklastenvorläuferzellen führen und somit direkt an der Ausbildung des osteolytischen Phänotyps beteiligt sein. Die Fibronektinexpression wird von TGF- $\beta$  inhibiert (Breen et al., 1994), so daß die höhere mRNA Konzentration den RZT-Stromazellen könnte durch die erhöhte TGF- $\beta$  Synthese im RZT verursacht werden könnte.

***Die Gene mit einer erhöhten Expression in den RZT-Stromazellen kodieren funktionell sehr unterschiedliche Genprodukte wie die Transkriptionsfaktoren c-Jun und NM23-H2, die Zytokine IL-6 und MIC-1, die extrazellulären Proteine Bone Proteoglykan-2 und Cathepsin L und die intrazellulären Regulatoren Calmodulin 1 und das  $\alpha$ 2-Macroglobulin Rezeptor-assoziierte Protein.***

***Die erhöhte Expression der mRNAs, die für die der Transkriptionsfaktoren c-Jun und NM23 kodieren, könnte die neoplastische Transformation der RZT-Stromazellen ausgelöst haben.***

Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist ein Regulator des Zellzyklus und führt bei Überexpression zur neoplastischen Transformation (Musti et al., 1996; Schutte et al., 1989). Darüber hinaus aktiviert c-Jun die Transkription der in den RZT-Stromazellen exprimierten Matrix Metalloproteinasen MMP-2, MMP-3 und MMP-9 (Rao et al., 1999; Sasaguri et al., 1992; Teti et al., 1998). In den Genen der im Riesenzelltumor detektierten MMPs wurden in der 3'-Promotorregion zusätzliche Bindungsstellen des AP1-Transkriptionsfaktors beschrieben (Benbow and Brinckerhoff, 1997; Westermarck and Kahari, 1999). Da die Mitglieder der Jun-Familie im AP1-Komplex den essentiellen Faktor zur DNA-Bindung darstellen, könnte eine gesteigerte c-Jun mRNA-Expression im RZT eine gesteigerte MMP-

Transkription bedingen (Angel and Karin, 1991; Karin et al., 1997; Vincenti et al., 1996).

In Osteoblasten wird eine erhöhte c-Jun Synthese nur während der Proliferation der Vorläuferzellen, aber nicht in differenzierten Osteozyten beobachtet (McCabe et al., 1996; Oyama et al., 1998). In Rattenosteoblasten wurde in den Promotoren der osteoblastenspezifischen Gene Osteocalcin und alkalische Phosphatase eine Bindungsstelle des AP1-Komplexes gefunden. Die Expression dieser Gene wird durch Bindung von c-Jun inhibiert (McCabe et al., 1995; Owen et al., 1990). Da diese beiden Marker im RZT nicht nachweisbar waren, könnte die mRNA Überexpression von c-Jun ihre Synthese in den RZT-Stromazellen beeinflusst, während Osteonectin und Osteopontin exprimiert werden.

In Muskelzellen, die ebenfalls aus mesenchymalen Stammzellen entstehen, inhibiert c-Jun die Differenzierung, da es die Expression und die DNA-Bindung des muskelspezifischen Transkriptionsfaktors MyoD verhindert (Bengal et al., 1992; Pedraza-Alva et al., 1994). MyoD ist homolog zu dem mesenchymalen Transkriptionsfaktor Twist, der die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen reguliert (Lee et al., 1999). Ob und in welcher Weise dieser Transkriptionsfaktor auch von c-Jun reguliert wird, ist bisher nicht bekannt, könnte jedoch für die Entstehung des Riesenzelltumors bedeutsam sein.

Die Differenzierung von Chondrozyten wird ebenfalls durch eine erhöhte c-Jun Expression inhibiert (Kameda et al., 1997), so daß c-Jun als genereller Inhibitor der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in ihre differenzierten Phänotypen betrachtet werden kann. Die mRNA-Überexpression von c-Jun könnte somit auch im Riesenzelltumor ein wesentlicher Inhibitor der Differenzierung der RZT-Stromazellen sein.

Da die Aktivität des c-Jun Proteins durch Interaktion mit Inhibitoren reguliert wird, muß die erhöhte mRNA-Expression in den Riesenzelltumoren nicht zwingend in einer gesteigerten c-Jun Proteinaktivität resultieren (Musti et al., 1996). Die Inhibition der c-Jun Aktivität durch Glykokortikoide wie Dexamethason würde die in vitro Differenzierung der RZT-Stromazellen nach Dexamethasonstimulierung erklären (James et al., 1996; Joyner et al., 1992). In vivo würde die Differenzierung der RZT-Stromazellen durch c-Jun verhindert (Jonat et al., 1990).

Das *NME* Gen kodiert das Enzym Nukleosid-Diphosphat Kinase B (NM23-H2) und wird auch als c-Myc Transkriptionsfaktor Puf bezeichnet (Postel et al., 1993). Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor katalysiert das Enzym die Phosphorylierung von Nukleosid-Diphosphaten zu Nukleosid-Triphosphaten (Gilles et al., 1991; Postel, 1998). Eine Überexpression dieses Gens wurde in zahlreichen soliden Tumoren und auch in benignen Neoplasien nachgewiesen (Lacombe et al., 1991). NM23-H2 wird in der S-Phase des Zellzyklus synthetisiert, die Überexpression zeigt eine erhöhte Proliferationsaktivität der Zellen in der frühen Phase der Tumorentstehung an (Cipollini et al., 1997; Ohneda et al., 1994). Die mRNA-Überexpression von NM23-H2 könnte ein Grund für die neoplastische Transformation der MSC und die resultierende Entstehung des RZT sein. Als Transkriptionsaktivator des *c-myc* Gens könnte NM23-H2 für die im RZT beobachtete Überexpression von c-Myc mit verantwortlich sein (Gamberi et al., 1998; Postel, 1999).

Die mRNA von NM23-H2 wird in nicht metastasierenden Zellen höher exprimiert als in metastasierenden Zellen (Bevilacqua et al., 1989; Steeg et al., 1988). Die erhöhte Expression im RZT könnte ein Anzeichen für die geringe Metastasierungsrate dieses Tumor sein. Eine verminderte NM23-H2 mRNA-Expression könnte somit als Marker für ein erhöhtes Metastasierungsrisiko des RZT fungieren.

Bei bisherigen immunhistologischen Untersuchungen konnte nur in vier von 13 RZT-Fällen in den Stromazellen das NM23-H2 Protein detektiert werden. In den Riesenzellen wurden schwache Signale beobachtet (Oda et al., 1995). Da schon in Prostatakarzinomen eine erhöhte NM23-H2 mRNA Expression nicht mit einer erhöhten Proteinexpression korrelierte (Igawa et al., 1994), sollte dies für die RZT-Stromazellen überprüft werden. Der Nachweis des NM23-H2 Proteins in den Riesenzellen bleibt hingegen fragwürdig, da NM23-H2 nur in proliferierenden Zellen gebildet wird (Cipollini et al., 1997), während die Riesenzellen terminal differenziert sind und somit ihre Proliferationskapazität verloren haben (Komiya et al., 1990; Zheng et al., 2001).

***Das Bone Proteoglykan 2 und das  $\alpha$ 2-Macroglobulin Rezeptor-assoziiertes Protein sind regulatorische Proteine, deren mRNA-Überexpression den***

***Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die RZT-Stromazellen modulieren könnte.***

Das Bone Proteoglykan 2 (BPG2), auch Dekorin genannt, ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das zur Familie der leucinreichen Proteoglykane gehört und die Matrixzusammensetzung und Zellproliferation reguliert (Iozzo et al., 1999). Die erhöhte BPG2 mRNA-Expression kann im Riesenzelltumor durch die gesteigerte mRNA-Expression von c-Jun bedingt sein. Im BPG2-Promotor wurde eine AP1-Bindungsstelle identifiziert, so daß eine erhöhte c-Jun Konzentration die BPG2 mRNA-Expression regulieren kann (Lin et al., 1997). Die BPG2-Expression wird zusätzlich von TGF- $\beta$  modifiziert und könnte durch die TGF- $\beta$  Produktion im Riesenzelltumor weiter erhöht werden (Takeuchi et al., 1993).

Welche Konsequenz die erhöhte BPG2 mRNA-Expression im RZT hat ist anhand der Literaturdaten schwer abzuschätzen. Das BPG2-Protein modifiziert über die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix die Interaktion von Zellen und Matrixkomponenten (Neame et al., 2000), außerdem reguliert es durch Interaktion mit Wachstumsfaktoren deren Funktion (Munz et al., 1999; Santra et al., 2000). In Makrophagen inhibiert BPG2 die Apoptose und fördert ihre Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (Xaus et al., 2001), wodurch es eine Anreicherung der Makrophagen im RZT bewirken könnte.

Das  $\alpha$ 2-Macroglobulin Rezeptor-assoziierte Protein ( $\alpha$ 2MRaP) ist eine Untereinheit des  $\alpha$ 2-Macroglobulin Rezeptors, der auch als Lipoproteinrezeptor bezeichnet wird (Van Leuven et al., 1995). Dieser Rezeptor wurde auf Makrophagen, Adipozyten, Hepatozyten und Fibroblasten nachgewiesen (Corvera et al., 1989; Hussaini et al., 1990; Ney et al., 1984). Da der Ligand  $\alpha$ 2-Macroglobulin an Zytokine, Matrix-Metalloproteinasen und Wachstumsfaktoren (IL-1 $\beta$ , IL-6, FGF, TGF- $\beta$ ) bindet und deren Funktion moduliert (Borth and Luger, 1989; Dennis et al., 1989), könnte die vermehrte Assoziation von  $\alpha$ 2MRaP an seinen Rezeptor die Funktion dieser Faktoren im RZT beeinflussen. Der  $\alpha$ 2-Macroglobulin Rezeptor ist an der Internalisierung und dem Abbau von  $\alpha$ 2-Macroglobulin / MMP-13 Komplexen beteiligt. Dieser Abbau wird durch Bindung des  $\alpha$ 2MRaP an den Rezeptor inhibiert (Barmina et al., 1999). Unter Berücksichtigung des breiten Funktionsspektrum und der Vielzahl von Liganden dieses Rezeptors erscheint eine Spezifizierung seiner möglichen Funktionen im RZT zu diesem Zeitpunkt schwierig.

***Die Überexpression der mRNA von Cathepsin L und Calmodulin 1 könnte die Proliferation der RZT-Stromazellen beeinflussen.***

Cathepsin L ist eine lysosomale Proteinase (Katunuma, 1989), die von verschiedenen Zelltypen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder der Aktivierung von Onkogenen sezerniert wird (Hamilton et al., 1991; Kane and Gottesman, 1990). In den RZT-Stromazellen könnte Cathepsin L eine Funktion als Protoonkogen zukommen. Die Nterminale Region des Cathepsin L ist zu dem Onkogen p53 homolog und steigert die DNA-Synthese in den Cathepsin L exprimierenden Zellen (Kasai et al., 1993). Es könnte die neoplastische Transformation der RZT-Stromazellen forcieren. Obwohl Cathepsin L auch im Osteoklasten exprimiert wird (Brighton et al., 1992), schließt die in der Versuchsdurchführung vorgenommene starke Anreicherung der RZT-Stromazellen eine ausschlaggebende Beteiligung der Riesenzellen an der erhöhten Cathepsin L mRNA-Expression aus.

Calmodulin 1 ist ein intrazelluläres calciumbindendes Protein, das durch Bindung an Calcium dessen biologische Wirkung reguliert (Cheung, 1980). Es wird von proliferierenden Zellen exprimiert und stabilisiert die zur DNA-Replikation benötigten Enzyme (Reddy et al., 1992). Es kann daher angenommen werden, daß die erhöhte Calmodulin 1 mRNA-Expression im RZT ein Zeichen für eine höhere Proliferationsaktivität der RZT-Stromazellen ist. Weiterhin wurde eine Regulation der Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen durch Calmodulin 1 beschrieben. Calmodulin 1 stimuliert die Myelopoese durch Induktion der Wachstumsfaktoren IL-3, GM-CSF und G-CSF (Katayama et al., 1990) und könnte die Interaktion von RZT-Stromazellen und Monozyten beeinflussen.

***Die Zytokine Interleukin-6 und MIC-1 könnten eine Invasion von Monozyten und eine Differenzierung in mehrkernige Riesenzellen bewirken.***

Das Zytokin Interleukin-6 wurde in Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten, Knochenmarksstromazellen und Osteoblasten beschrieben und stellt einen generellen Regulator der Osteoklastendifferenzierung dar (Richards, 1998). IL-6 bewirkt in vivo und in vitro die Formation von Osteoklasten aus undifferenzierten Vorläuferzellen und erhöht deren Resorptionsaktivität (Kurihara et al., 1990; Reddy et al., 1994), außerdem koordiniert IL-6 die Aktivität anderer

Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  (Devlin et al., 1998). Im Promoter des *IL-6* Gens wurde eine AP-1 Bindungsstelle identifiziert (Franchimont et al., 1999), so daß die gesteigerte IL-6 mRNA-Expression durch den ebenfalls überexprimierten Transkriptionfaktor c-Jun bedingt sein könnte. Die erhöhte Expression von IL-6 mRNA im RZT bestätigt die Literaturdaten, welche IL-6 als Aktivator der Knochenresorption im RZT beschrieben haben (Ohsaki et al., 1992; Reddy et al., 1994).

Bei dem Macrophage Inhibitory Cytokine1 (MIC-1) handelt es sich um ein Zytokin aus der Transforming Growth Factor / Bone Morphogenic Protein Familie (Fairlie et al., 2001). Die MIC-1 mRNA wird während der enchondralen Knochenbildung im Skelett exprimiert, so daß eine Beteiligung an der Regulation der Ossifikation anzunehmen ist (Paralkar et al., 1998).

Außerdem scheint MIC-1 die späte Phase der Makrophagendifferenzierung zu inhibieren (Takahashi et al., 1995), wodurch eine Differenzierung in die osteoklastäre Linie begünstigt würde. Die genaue Funktion von MIC-1 während der Osteoklastendifferenzierung ist nicht bekannt. Korrespondierend zum RZT wurde in Kolorektal- und in Prostatakarzinomen eine starke Überexpression von MIC-1 mRNA detektiert, wohingegen die Normalzellen keine oder nur eine sehr geringe Expression zeigten (Buckhaults et al., 2001; Welsh et al., 2001). Die Bedeutung der gesteigerten MIC-1 mRNA-Expression ist bisher noch nicht geklärt.

Durch Verwendung der cDNA-Arrays konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die einen Einfluß auf die Tumorgenese und auf die Aufrechterhaltung der zellulären Zusammensetzung des RZT besitzen.

Da der Riesenzelltumor auf eine ständige Invasion neuer Blutmonozyten angewiesen ist, kommt der Vaskularisierung im Riesenzelltumor nicht nur eine Versorgungsfunktion, sondern auch eine direkte Beteiligung an der Aufrechterhaltung der zellulären Komposition zu.

Aufgrund der Entstehung von hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle sind viele angiogenetische Faktoren an der Regulation beider Prozesse beteiligt (Asahara et al., 1997). Die Analyse der Expression angiogenetischer Faktoren zeigte Expressionsunterschiede zwischen

den RZT-Stromazellen und den MSC. Außerdem wurde eine Induktion der Migration von Endothelzellen durch das Riesenzelltumormedium beobachtet,

***Die Expression der VEGF mRNA ist in den RZT-Stromazellen vermindert, so daß VEGF für die Vaskularisierung des RZT nicht relevant zu sein scheint.***

VEGF ist ein multifunktionales Zytokin, welches nicht nur als Mitogen für hämatopoetische Zellen, sondern auch als Aktivator der Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung wirken kann (Niida et al., 1999).

Die Expression von VEGF mRNA wurde bereits im Riesenzelltumor in allen drei Zelltypen beschrieben. Die VEGF mRNA-Expression korreliert mit der biologischen Aggressivität, jedoch nicht mit der Vaskularisierung des RZT (Zheng et al., 2000). Diese Beobachtung bestätigt die in dieser Arbeit durchgeführten Migrationsexperimente, welche nach Elimination von VEGF aus dem RZT-Medium keine Inhibition der Endothelzellmigration aufwiesen.

Da VEGF die Differenzierung zu Osteoblasten stimuliert, könnte die Verminderung der VEGF mRNA-Expression zu einer Reduktion des Differenzierungsinduktors und damit zur Unterstützung des undifferenzierten Phänotyps der RZT-Stromazellen führen (Deckers et al., 2000). Die verminderte VEGF mRNA-Expression wurde in dieser Arbeit nur in den RZT-Stromazellen quantifiziert und läßt keine Aussage über die Gesamtexpression der VEGF mRNA im RZT-Gewebe zu. Die mRNA des VEGF-Rezeptor Typ II (*KDR*) wird im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung nicht exprimiert (Millauer et al., 1993). Diese Ergebnisse stimmen mit dem von uns gefundenen Fehlen einer *KDR* mRNA-Expression auf den MSC und RZT-Stromazellen überein.

***Die erhöhte Expression der mRNA von Angiopoetin-1 und seines Rezeptors Tie2/Tek stellen einen möglichen Mechanismus der VEGF-unabhängigen Angiogenese dar.***

Die Beteiligung von Angiopoetin-1 und seines Rezeptors Tie-2/Tek an der Interaktion von Endothelzellen und gefäßumgebenden Perizyten wurde in knock-out Experimenten nachgewiesen (Patan, 1998; Suri et al., 1996). Im Verlauf der Ossifikation sind sie an der Interaktion von hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen beteiligt (Horner et al., 2001; Huang et al., 1999). Die Bindung von Angiopoetin-1 an seinen Rezeptor bewirkt dessen Phosphorylierung

und Aktivierung der Signaltransduktion in Endothelzellen (Jones et al., 1999). Diese Bindung wird durch den zweiten Tie2/Tek Liganden, Angiopoetin-2, verhindert (Maisonpierre et al., 1997). Da Angiopoetin-2 als Antagonist der Angiopoetin-1 Rezeptorbindung wirkt, könnte die verminderte Expression von Angiopoetin-2 mRNA in den Riesenzelltumoren die von Angiopoetin-1 induzierte Angiogenese unterstützen. Angiopoetin-1 fördert die Migration von Endothelzellen, während sie von Angiopoetin-2 inhibiert wird (Carlson et al., 2001), so daß die erhöhte Angiopoetin-1 mRNA Expression bei einer ebenfalls gesteigerten Angiopoetin-1 Proteinsynthese auch für die chemotaktischen Wirkung des RZT-Mediums verantwortlich sein könnte. Diese Funktion des Angiopoetin-1 muß durch weitere Migrationsversuche mit Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht werden. Weiterhin wäre der Einfluß von Angiopoetin-1 auf die Osteoklastendifferenzierung von Interesse, doch wurde bisher noch kein Zusammenhang beschrieben.

### **Ausblick**

Die Identifizierung der mesenchymalen Stammzellen als Ursprungszellen der RZT-Stromazellen ermöglichte die Identifizierung von 29 differentiell exprimierten Genen im Riesenzelltumor, die einen Einfluß auf die Tumorentstehung besitzen könnten. Diese Genen kodieren unter anderem den Gewebeninhibitor der Matrix Metalloproteinase-3 (TIMP3) und das Protoonkogen c-Jun, deren Expressionsveränderungen die Differenzierung der RZT-Stromazellen inhibieren und somit ihren undifferenzierten Phänotyp hervorrufen könnten. Die Relevanz dieser Gene muß durch funktionelle Tests geklärt werden.

Eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren c-Jun und NM23-H2 in den mesenchymalen Stammzellen wäre eine Möglichkeit, ihre Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und die Differenzierung der MSC zu beobachten. Dazu müßte zuerst eine effiziente Transfektionsmethode für die primären MSC etabliert werden. Bisherig wurde eine Transfektion von MSC nur mit retroviralen Vektoren beschrieben (Mosca et al., 2000). Eine nicht-virale Transfektion wäre vom Vorteil, um den Einfluß von viralen Genen auf das Wachstumsverhalten der MSC auszuschließen. Ebenfalls könnte durch Elimination der überexprimierten Gene in den RZT-Stromazellen ihre Funktion im RZT untersucht.

Der Vergleich der NM23-H2 mRNA-Expression in metastasierenden und in nicht metastasierenden Riesenzelltumoren könnte die Prognose von Lungenmetastasen und deren Frühdiagnostik im RZT erleichtern. Die Bildung von Lungenmetastasen ist für Patienten mit RZT trotz der seltenen Inzidenz das höchste Risiko.

Weiterhin wurden Hinweise auf die Induktion der Tumorangiogenese durch chemotaktische Faktoren im Riesenzelltumormedium beobachtet. Der Nachweis der Überexpression der mRNA von Angiopoetin-1 und seines Rezeptors Tie2/Tek könnte bei einem korrelierenden Anstieg der Proteinkonzentration die Tumorangiogenese und die nachfolgende Einwanderung von Blutmonozyten in das Tumorgewebe hervorrufen. Diese Hypothese muß durch weitere Migrationsversuche überprüft werden. Dabei sollte das chemotaktische Potential des Angiopoetin-1 im RZT-Medium auf Endothelzellen, aber auch auf hämatopoetische Vorläuferzellen untersucht werden.

Außerdem wurde eine erhöhte Expression des *Interleukin-6* Gens und des *Oncostatin M* Gens beobachtet. Ihre Funktion in der Aktivierung der Osteoklasten wurde bereits beschrieben wurde. Die Identifikation dieser Faktoren unterstützt die Hypothese, daß die RZT-Stromazellen die Differenzierung von Monozyten zu mehrkernigen Riesenzellen induzieren, die nur als reaktive Komponente im Riesenzelltumor vorliegen. Durch Vergleich der Expression dieser Faktoren in osteolytischen Knochentumoren mit unterschiedlicher Malignität, wie dem malignen osteolytischen Osteosarkom und der benignen Aneurismatischen Knochenzyste, könnten Aussagen über eine generelle Funktion von Interleukin-6 und Oncostatin M in osteolytischen Knochentumoren getroffen werden. Die Bestimmung dieser Faktoren im Tumorgewebe könnte bei gravierenden Expressionsunterschieden in den osteolytischen Tumoren die Differentialdiagnose dieser radiologisch und histologisch oft sehr homogenen Tumorentitäten vereinfachen.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit wichtige Charakteristika der Entstehung des neoplastischen Phänotyps, der Tumorangiogenese und der zellulären Zusammensetzung des RZT erarbeitet. Diese Ergebnisse könnten über die Erforschung des RZT hinaus einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Differenzierung und Interaktion der Zelltypen im Knochenmark leisten.

## **G. Literaturverzeichnis**

- Abe E., M. H., Yamate T., Taguchi Y., Manolagas S.C.,** (1998). Meltrin-a, a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcif. Tissue Int* **64** :, 508-515.
- Airas, L., Niemela, J. and Jalkanen, S.** (2000). CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. *J Immunol* **165**, 5411-7.
- Alsina, M., Guise, T. A. and Roodman, G. D.** (1996). Cytokine regulation of bone cell differentiation. *Vitam Horm* **52**, 63-98.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V. et al.** (1998). TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* **435**, 39-44.
- Anand-Apte, B., Pepper, M. S., Voest, E., Montesano, R., Olsen, B., Murphy, G., Apte, S. S. and Zetter, B.** (1997). Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**, 817-23.
- Andreu, T., Beckers, T., Thoenes, E., Hilgard, P. and von Melchner, H.** (1998). Gene trapping identifies inhibitors of oncogenic transformation. The tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) and collagen type I alpha2 (COL1A2) are epidermal growth factor-regulated growth repressors. *J Biol Chem* **273**, 13848-54.
- Angel, P. and Karin, M.** (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 129-57.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. and Isner, J. M.** (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7.
- Asou, Y., Rittling, S. R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Shinomiya, K., Nifuji, A., Denhardt, D. T. and Noda, M.** (2001). Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* **142**, 1325-32.
- Athanasou, N. A. and Sabokbar, A.** (1999). Human osteoclast ontogeny and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* **14**, 635-47.
- Atkins, G. J., Bouralexis, S., Haynes, D. R., Graves, S. E., Geary, S. M., Evdokiou, A., Zannettino, A. C., Hay, S. and Findlay, D. M.** (2001). Osteoprotegerin inhibits osteoclast formation and bone resorbing activity in giant cell tumors of bone. *Bone* **28**, 370-7.
- Atkins, G. J., Haynes, D. R., Geary, S. M., Loric, M., Crotti, T. N. and Findlay, D. M.** (2000a). Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone* **26**, 653-61.

- Atkins, G. J., Haynes, D. R., Graves, S. E., Evdokiou, A., Hay, S., Bouralexis, S. and Findlay, D. M.** (2000b). Expression of osteoclast differentiation signals by stromal elements of giant cell tumors. *J Bone Miner Res* **15**, 640-9.
- Aubin, J. E.** (1998). Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* **31**, 73-82.
- Barry, F., Boynton, R., Murphy, M. and Zaia, J.** (2001). The SH-3 and SH-4 Antibodies Recognize Distinct Epitopes on CD73 from Human Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 519-24.
- Barry, F. P., Boynton, R. E., Haynesworth, S., Murphy, J. M. and Zaia, J.** (1999). The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 134-9.
- Bellido, T., Stahl, N., Farruggella, T. J., Borba, V., Yancopoulos, G. D. and Manolagas, S. C.** (1996). Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest* **97**, 431-7.
- Benbow, U. and Brinckerhoff, C. E.** (1997). The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* **15**, 519-26.
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscott, S. J., Weintraub, H. and Verma, I. M.** (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* **68**, 507-19.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A. and Wheeler, D. L.** (2000). GenBank. *Nucleic Acids Res* **28**, 15-8.
- Beresford, J. N., Bennet J.H., Devlin C., Leboy P.S., Owen M.E.** (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell. Sci.*, **102**, 341-351.
- Bevilacqua, G., Sobel, M. E., Liotta, L. A. and Steeg, P. S.** (1989). Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* **49**, 5185-90.
- Bian, J., Wang, Y., Smith, M. R., Kim, H., Jacobs, C., Jackman, J., Kung, H. F., Colburn, N. H. and Sun, Y.** (1996). Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis* **17**, 1805-11.
- Blair, H. C., Teitelbaum, S. L., Ghiselli, R. and Gluck, S.** (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* **245**, 855-7.
- Bohic, S., Pilet, P. and Heymann, D.** (1998). Effects of leukemia inhibitory factor and oncostatin M on bone mineral formed in in vitro rat bone-marrow stromal cell culture: physicochemical aspects. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 506-13.

- Borth, W. and Luger, T. A.** (1989). Identification of alpha 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. Binding of interleukin-1 beta to "F" alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* **264**, 5818-25.
- Bossard, M. J., Tomaszek, T. A., Thompson, S. K., Amegadzie, B. Y., Hanning, C. R., Jones, C., Kurdyla, J. T., McNulty, D. E., Drake, F. H., Gowen, M. et al.** (1996). Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **271**, 12517-24.
- Bowen, M. A. and Aruffo, A.** (1999). Adhesion molecules, their receptors, and their regulation: analysis of CD6-activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) interactions. *Transplant Proc* **31**, 795-6.
- Bowen, M. A., Patel, D. D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A. R., Wang, W. C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J. M., Francke, U. et al.** (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* **181**, 2213-20.
- Breen, E. C., Ignatz, R. A., McCabe, L., Stein, J. L., Stein, G. S. and Lian, J. B.** (1994). TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype. *J Cell Physiol* **160**, 323-35.
- Brew, K., Dinakarandian, D. and Nagase, H.** (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 267-83.
- Brien, E. W., Mirra J.M., Kessler S., Suen M., Ho J.K., Yang W.T.,** (1997). Benign giant cell tumor of bone with osteosarcomatous transformation ("dedifferentiated" primary malignant GCT): report of two cases. *Skeletal-Radiol.* **26**, 246-55.
- Brighton, C. T., Lorich, D. G., Kupcha, R., Reilly, T. M., Jones, A. R. and Woodbury, R. A., 2nd.** (1992). The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop*, 287-99.
- Brooks, J. P. and Pascal, R. R.** (1984). Malignant giant cell tumor of bone: ultrastructural and immunohistologic evidence of histiocytic origin. *Hum Pathol* **15**, 1098-100.
- Bruder, S. P., Horowitz, M. C., Mosca, J. D. and Haynesworth, S. E.** (1997). Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* **21**, 225-35.
- Bruder, S. P., Ricalton, N. S., Boynton, R. E., Connolly, T. J., Jaiswal, N., Zaia, J. and Barry, F. P.** (1998). Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* **13**, 655-63.
- Buckhaults, P., Rago, C., St Croix, B., Romans, K. E., Saha, S., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (2001). Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res* **61**, 6996-7001.
- Burmester, G. R., Winchester, R. J., Dimitriu-Bona, A., Klein, M., Steiner, G. and Sissons, H. A.** (1983). Delineation of four cell types

- comprising the giant cell tumor of bone. Expression of Ia and monocyte-macrophage lineage antigens. *J Clin Invest* **71**, 1633-48.
- Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I. and Fisk, N. M.** (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**, 2396-402.
- Caplan, A. I.** (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641-50.
- Caplan, A. I. and Bruder, S. P.** (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* **7**, 259-64.
- Carlson, T. R., Feng, Y., Maisonpierre, P. C., Mrksich, M. and Morla, A. O.** (2001). Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem* **276**, 26516-25.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J. and Letarte, M.** (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**, 19027-30.
- Chen, X. D., Qian, H. Y., Neff, L., Satomura, K. and Horowitz, M. C.** (1999). Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res* **14**, 362-75.
- Cheung, W. Y.** (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* **207**, 19-27.
- Chichester, C. O., Fernandez, M. and Minguell, J. J.** (1993). Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun* **1**, 93-9.
- Cipollini, G., Berti, A., Fiore, L., Rainaldi, G., Basolo, F., Merlo, G., Bevilacqua, G. and Caligo, M. A.** (1997). Down-regulation of the nm23.h1 gene inhibits cell proliferation. *Int J Cancer* **73**, 297-302.
- Conget, P. A. and Minguell, J. J.** (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* **181**, 67-73.
- Cortes, F., Deschaseaux, F., Uchida, N., Labastie, M. C., Frieria, A. M., He, D., Charbord, P. and Peault, B.** (1999). HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues. *Blood* **93**, 826-37.
- Corvera, S., Graver, D. F. and Smith, R. M.** (1989). Insulin increases the cell surface concentration of alpha 2-macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered transit of the receptor among intracellular endocytic compartments. *J Biol Chem* **264**, 10133-8.
- De Bari, C., Dell'Accio, F. and Luyten, F. P.** (2001). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* **44**, 85-95.
- Deckers, M. M., Karperien, M., van der Bent, C., Yamashita, T., Papapoulos, S. E. and Lowik, C. W.** (2000). Expression of vascular

- endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* **141**, 1667-74.
- Degen, W. G., van Kempen, L. C., Gijzen, E. G., van Groningen, J. J., van Kooyk, Y., Bloemers, H. P. and Swart, G. W.** (1998). MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am J Pathol* **152**, 805-13.
- Delling, G.** (1977). Skelettsystem. In *Pathologie*, vol. Band 5 (ed. W. Remmele), pp. 263-382. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Dennis, P. A., Saksela, O., Harpel, P. and Rifkin, D. B.** (1989). Alpha 2-macroglobulin is a binding protein for basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* **264**, 7210-6.
- Devlin, R. D., Reddy, S. V., Savino, R., Ciliberto, G. and Roodman, G. D.** (1998). IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* **13**, 393-9.
- Diefenderfer, D. L. and Brighton, C. T.** (2000). Microvascular pericytes express aggrecan message which is regulated by BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 172-8.
- Doherty, M., Boot-Handford, R. P., Grant, M. E. and Canfield, A. E.** (1998a). Identification of genes expressed during the osteogenic differentiation of vascular pericytes in vitro. *Biochem Soc Trans* **26**, S4.
- Doherty, M. J., Ashton, B. A., Walsh, S., Beresford, J. N., Grant, M. E. and Canfield, A. E.** (1998b). Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* **13**, 828-38.
- Dumont, D. J., Yamaguchi, T. P., Conlon, R. A., Rossant, J. and Breitman, M. L.** (1992). tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**, 1471-80.
- Fairlie, W. D., Zhang, H. P., Wu, W. M., Pankhurst, S. L., Bauskin, A. R., Russell, P. K., Brown, P. K. and Breit, S. N.** (2001). The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion. *J Biol Chem* **276**, 16911-8.
- Fleming, J. E., Jr., Haynesworth, S. E., Cassiede, P., Baber, M. A. and Caplan, A. I.** (1998). Monoclonal antibody against adult marrow-derived mesenchymal stem cells recognizes developing vasculature in embryonic human skin. *Dev Dyn* **212**, 119-32.
- Franchi, A., Benvenuti, S., Masi, L., Malentacchi, C., Arganini, L., Brandi, M. L. and Santucci, M.** (2001). TGF-beta isoform and receptor expression in giant cell tumor and giant cell lesions of bone. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol* **9**, 170-5.

- Franchimont, N., Durant, D., Rydzziel, S. and Canalis, E.** (1999). Platelet-derived growth factor induces interleukin-6 transcription in osteoblasts through the activator protein-1 complex and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* **274**, 6783-9.
- Gamberi, G., Benassi, M. S., Bohling, T., Ragazzini, P., Molendini, L., Sollazzo, M. R., Merli, M., Ferrari, C., Magagnoli, G., Bertoni, F. et al.** (1998). Prognostic relevance of C-myc gene expression in giant-cell tumor of bone. *J Orthop Res* **16**, 1-7.
- Gattei, V., Aldinucci, D., Quinn, J. M., Degan, M., Cozzi, M., Perin, V., Iulii, A. D., Juzbasic, S., Improta, S., Athanasou, N. A. et al.** (1996). Human osteoclasts and preosteoclast cells (FLG 29.1) express functional c-kit receptors and interact with osteoblast and stromal cells via membrane-bound stem cell factor. *Cell Growth Differ* **7**, 753-63.
- Gilles, A. M., Presecan, E., Vonica, A. and Lascu, I.** (1991). Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J Biol Chem* **266**, 8784-9.
- Gilpin, B. J., Loechel, F., Mattei, M. G., Engvall, E., Albrechtsen, R. and Wewer, U. M.** (1998). A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem* **273**, 157-66.
- Goldring, S. R., Roelke, M. S., Petrisson, K. K. and Bhan, A. K.** (1987). Human giant cell tumors of bone identification and characterization of cell types. *J Clin Invest* **79**, 483-91.
- Gori, F., Hofbauer, L. C., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Khosla, S. and Riggs, B. L.** (2000). The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* **141**, 4768-76.
- Gouin, F., Couillaud, S., Cottrel, M., Godard, A., Passuti, N. and Heymann, D.** (1999). Presence of leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF-receptor chain (gp190) in osteoclast-like cells cultured from human giant cell tumour of bone. Ultrastructural distribution. *Cytokine* **11**, 282-9.
- Grano, M., Colucci, S., De Bellis, M., Zigrino, P., Argentino, L., Zambonin, G., Serra, M., Scotlandi, K., Teti, A. and Zambonin Zalzone, A.** (1994). New model for bone resorption study in vitro: human osteoclast-like cells from giant cell tumors of bone. *J Bone Miner Res* **9**, 1013-20.
- Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S. and Simmons, P. J.** (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* **84**, 4164-73.
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Graves, S. E., Ohta, S., Hay, S. J. and Simmons, P. J.** (1999). Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* **14**, 47-56.
- Guise, T. A. and Mundy, G. R.** (1998). Cancer and bone. *Endocr Rev* **19**, 18-54.

- Hakeda, Y., Arakawa, T., Ogasawara, A. and Kumegawa, M.** (2000). [Recent progress in studies on osteocytes--osteocytes and mechanical stress]. *Kaibogaku Zasshi* **75**, 451-6.
- Hall, F. L., Han, B., Kundu, R. K., Yee, A., Nimni, M. E. and Gordon, E. M.** (2001). Phenotypic differentiation of TGF-beta1-responsive pluripotent premesenchymal prehematopoietic progenitor (P4 stem) cells from murine bone marrow. *J Hematother Stem Cell Res* **10**, 261-71.
- Hamilton, R. T., Bruns, K. A., Delgado, M. A., Shim, J. K., Fang, Y., Denhardt, D. T. and Nilsen-Hamilton, M.** (1991). Developmental expression of cathepsin L and c-rasHa in the mouse placenta. *Mol Reprod Dev* **30**, 285-92.
- Hanaoka, H., Friedman, B. and Mack, R. P.** (1970). Ultrastructure and histogenesis of giant-cell tumor of bone. *Cancer* **25**, 1408-23.
- Hattersley, G., Kerby, J. A. and Chambers, T. J.** (1991). Identification of osteoclast precursors in multilineage hemopoietic colonies. *Endocrinology* **128**, 259-62.
- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N. R., Lyden, D., Tatenos, M., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R. G. et al.** (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **193**, 1005-14.
- Hayase, Y., Muguruma, Y. and Lee, M. Y.** (1997). Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment. *Exp Hematol* **25**, 19-25.
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A. and Caplan, A. I.** (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* **13**, 69-80.
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A. and Caplan, A. I.** (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* **166**, 585-92.
- Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I.** (1992a). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**, 81-8.
- Heymann, D., Guicheux, J., Gouin, F., Passuti, N. and Daculsi, G.** (1998). Cytokines, growth factors and osteoclasts. *Cytokine* **10**, 155-68.
- Heymann, D. and Rousselle, A. V.** (2000). gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* **12**, 1455-68.
- Horner, A., Bord, S., Kelsall, A. W., Coleman, N. and Compston, J. E.** (2001). Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. *Bone* **28**, 65-71.
- Horton, M. A., Lewis, D., McNulty, K., Pringle, J. A. and Chambers, T. J.** (1985). Monoclonal antibodies to osteoclastomas (giant cell bone tumors): definition of osteoclast-specific cellular antigens. *Cancer Res* **45**, 5663-9.

- Huang, L., Xu, J., Kumta, S. M. and Zheng, M. H. (2001). Gene expression of glucocorticoid receptor alpha and beta in giant cell tumour of bone: evidence of glucocorticoid-stimulated osteoclastogenesis by stromal-like tumour cells. *Mol Cell Endocrinol* **181**, 199-206.
- Huang, S. and Terstappen, L. W. (1992). Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* **360**, 745-9.
- Huang, S. and Terstappen, L. W. (1994). Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* **368**, 664.
- Huang, T. S., Green, A. D., Beattie, C. W. and Das Gupta, T. K. (1993). Monocyte-macrophage lineage of giant cell tumor of bone. Establishment of a multinucleated cell line. *Cancer* **71**, 1751-60.
- Huang, X. L., Takakura, N. and Suda, T. (1999). In vitro effects of angiopoietins and VEGF on hematopoietic and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 133-8.
- Hurley, R. W., McCarthy, J. B. and Verfaillie, C. M. (1995). Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest* **96**, 511-9.
- Huss, R. (1997). New definition and methods for isolation of the earliest peripheral blood-derived hematopoietic stem cells. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* **34**, 128-32.
- Huss, R. (2000). Perspectives on the morphology and biology of cd34-negative stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* **9**, 783-93.
- Hussaini, I. M., Srikumar, K., Quesenberry, P. J. and Gonias, S. L. (1990). Colony-stimulating factor-1 modulates alpha 2-macroglobulin receptor expression in murine bone marrow macrophages. *J Biol Chem* **265**, 19441-6.
- Igawa, M., Rukstalis, D. B., Tanabe, T. and Chodak, G. W. (1994). High levels of nm23 expression are related to cell proliferation in human prostate cancer. *Cancer Res* **54**, 1313-8.
- Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Kratzschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y. M., Baron, R. and Blobel, C. P. (1998). Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J Biol Chem* **273**, 4180-7.
- Iozzo, R. V., Moscatello, D. K., McQuillan, D. J. and Eichstetter, I. (1999). Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **274**, 4489-92.
- Jaffe, J. L. L. and Poartis, R. (1940). Giant Cell Tumor of Bone- Its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment. *Arch. Pathol.* **30**, 993-1031.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. and Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* **64**, 295-312.
- James, I. E., Dodds, R. A., Olivera, D. L., Nuttall, M. E. and Gowen, M. (1996). Human osteoclastoma-derived stromal cells: correlation of

- the ability to form mineralized nodules in vitro with formation of bone in vivo. *J Bone Miner Res* **11**, 1453-60.
- Jay, P. R., Centrella, M., Lorenzo, J., Bruce, A. G. and Horowitz, M. C.** (1996). Oncostatin-M: a new bone active cytokine that activates osteoblasts and inhibits bone resorption. *Endocrinology* **137**, 1151-8.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P.** (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-204.
- Jones, N., Master, Z., Jones, J., Bouchard, D., Gunji, Y., Sasaki, H., Daly, R., Alitalo, K. and Dumont, D. J.** (1999). Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem* **274**, 30896-905.
- Joyner, C. J., Quinn, J. M., Triffitt, J. T., Owen, M. E. and Athanasou, N. A.** (1992). Phenotypic characterisation of mononuclear and multinucleated cells of giant cell tumour of bone. *Bone Miner* **16**, 37-48.
- Kameda, T., Watanabe, H. and Iba, H.** (1997). C-Jun and JunD suppress maturation of chondrocytes. *Cell Growth Differ* **8**, 495-503.
- Kane, S. E. and Gottesman, M. M.** (1990). The role of cathepsin L in malignant transformation. *Semin Cancer Biol* **1**, 127-36.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E.** (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-6.
- Kasai, M., Shirasawa, T., Kitamura, M., Ishido, K., Kominami, E. and Hirokawa, K.** (1993). Proenzyme form of cathepsin L produced by thymic epithelial cells promotes proliferation of immature thymocytes in the presence of IL-1, IL-7, and anti-CD3 antibody. *Cell Immunol* **150**, 124-36.
- Katayama, N., Nishikawa, M., Komada, F., Minami, N. and Shirakawa, S.** (1990). A role for calmodulin in the growth of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* **75**, 1446-54.
- Katunuma, N.** (1989). Mechanisms and regulation of lysosomal proteolysis. *Revis Biol Celular* **20**, 35-61.
- Kerst, J. M., Sanders, J. B., Slaper-Cortenbach, I. C., Doorackers, M. C., Hooibrink, B., van Oers, R. H., von dem Borne, A. E. and van der Schoot, C. E.** (1993). Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood* **81**, 344-51.
- Komiya, S., Sasaguri, Y., Inoue, A., Nakashima, M., Yamamoto, S., Yanagida, I. and Morimatsu, M.** (1990). Characterization of cells cultured from human giant-cell tumors of bone. Phenotypic relationship to the monocyte-macrophage and osteoclast. *Clin Orthop*, 304-9.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J. and Phinney, D. G.** (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10711-6.

- Kurihara, N., Bertolini, D., Suda, T., Akiyama, Y. and Roodman, G. D.** (1990). IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* **144**, 4226-30.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S. et al.** (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-76.
- Lacombe, M. L., Sastre-Garau, X., Lascu, I., Vonica, A., Wallet, V., Thiery, J. P. and Veron, M.** (1991). Overexpression of nucleoside diphosphate kinase (Nm23) in solid tumours. *Eur J Cancer* **27**, 1302-7.
- Lee, M. S., Lowe, G. N., Strong, D. D., Wergedal, J. E. and Glackin, C. A.** (1999). TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J Cell Biochem* **75**, 566-77.
- Lian J.B., S., G.S., Canalis, E., Gehron-Robey, P., Boskey A.L.** (1999). Bone Formation : osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, vol. Fourth Edition (ed. M. J. Favus), pp. 14-27. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lin, J. M., Yamauchi, M. and Sato, S.** (1997). Effects of recombinant interleukin-1 beta on decorin gene expression in human periodontal ligament fibroblast and its possible transcriptional regulation. *J Periodontal Res* **32**, 225-32.
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N. et al.** (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60.
- Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Haynesworth, S. E., Bruder, S. P. and Gerson, S. L.** (2000). Human marrow-derived mesenchymal stem cells (mscs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* **9**, 841-8.
- Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Mosca, J. D., Moorman, M. and Gerson, S. L.** (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* **176**, 57-66.
- Malaval, L., Gupta, A. K., Liu, F., Delmas, P. D. and Aubin, J. E.** (1998). LIF, but not IL-6, regulates osteoprogenitor differentiation in rat calvaria cell cultures: modulation by dexamethasone. *J Bone Miner Res* **13**, 175-84.
- Manolagas, S. C.** (1995). Role of cytokines in bone resorption. *Bone* **17**, 63S-67S.
- Manolagas, S. C.** (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**, 115-37.

- Martin, T. J., Romas, E. and Gillespie, M. T.** (1998). Interleukins in the control of osteoclast differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **8**, 107-23.
- Masui, F., Ushigome, S. and Fujii, K.** (1998). Giant cell tumor of bone: an immunohistochemical comparative study. *Pathol Int* **48**, 355-61.
- Mbalaviele, G., Abu-Amer, Y., Meng, A., Jaiswal, R., Beck, S., Pittenger, M. F., Thiede, M. A. and Marshak, D. R.** (2000). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem* **275**, 14388-93.
- Mbalaviele, G., Jaiswal, N., Meng, A., Cheng, L., Van Den Bos, C. and Thiede, M.** (1999). Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology* **140**, 3736-43.
- McCabe, L. R., Banerjee, C., Kundu, R., Harrison, R. J., Dobner, P. R., Stein, J. L., Lian, J. B. and Stein, G. S.** (1996). Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra- 2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology* **137**, 4398-408.
- McCabe, L. R., Kockx, M., Lian, J., Stein, J. and Stein, G.** (1995). Selective expression of fos- and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp Cell Res* **218**, 255-62.
- Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W. and Ullrich, A.** (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**, 835-46.
- Minguell, J. J., Erices, A. and Conget, P.** (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**, 507-20.
- Mirra, J.** (1989). Bone tumors. Clinical, radiological and pathological correlations. In *Bone tumors..* Philadelphia-London: Lea & Febiger.
- Mosca, J. D., Hendricks, J. K., Buyaner, D., Davis-Sproul, J., Chuang, L. C., Majumdar, M. K., Chopra, R., Barry, F., Murphy, M., Thiede, M. A. et al.** (2000). Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop*, S71-90.
- Mundy, G. R.** (1999). Bone Remodeling. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.*, vol. Fourth Edition (ed. M. J. Favus), pp. 30-32. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilking.
- Munz, C., Naumann, U., Grimm, C., Rammensee, H. G. and Weller, M.** (1999). TGF-beta-independent induction of immunogenicity by decorin gene transfer in human malignant glioma cells. *Eur J Immunol* **29**, 1032-40.
- Musti, A. M., Treier, M., Peverali, F. A. and Bohmann, D.** (1996). Differential regulation of c-Jun and JunD by ubiquitin-dependent protein degradation. *Biol Chem* **377**, 619-24.
- Neame, P. J., Kay, C. J., McQuillan, D. J., Beales, M. P. and Hassell, J. R.** (2000). Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell Mol Life Sci* **57**, 859-63.

- Nehls, V. and Drenckhahn, D.** (1993). The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* **99**, 1-12.
- Ney, K. A., Gidwitz, S. and Pizzo, S. V.** (1984). Changes in the binding of "fast"-form alpha 2-macroglobulin to 3T3-L1 cells after differentiation to adipocytes. *Biochemistry* **23**, 3395-403.
- Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N. and Kodama, H.** (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* **190**, 293-8.
- Nuttall, M. E. and Gimble, J. M.** (2000). Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone* **27**, 177-84.
- Nuttall, M. E., Patton, A. J., Olivera, D. L., Nadeau, D. P. and Gowen, M.** (1998). Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res* **13**, 371-82.
- O'Brien, C. A., Gubrij, I., Lin, S. C., Saylor, R. L. and Manolagas, S. C.** (1999). STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem* **274**, 19301-8.
- Oda, Y., Walter, H., Radig, K., Rose, I., Neumann, W. and Roessner, A.** (1995). Immunohistochemical analysis of nm23 protein expression in malignant bone tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* **121**, 667-73.
- Oddie, G. W., Schenk, G., Angel, N. Z., Walsh, N., Guddat, L. W., de Jersey, J., Cassidy, A. I., Hamilton, S. E. and Hume, D. A.** (2000). Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone* **27**, 575-84.
- Ohneda, K., Fukuda, M., Shimada, N., Ishikawa, N., Ichou, T., Kaji, K., Toyota, T. and Kimura, N.** (1994). Increased expression of nucleoside diphosphate kinases/nm23 in human diploid fibroblasts transformed by SV40 large T antigen or 60Co irradiation. *FEBS Lett* **348**, 273-7.
- Ohsaki, Y., Takahashi, S., Scarcez, T., Demulder, A., Nishihara, T., Williams, R. and Roodman, G. D.** (1992). Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone. *Endocrinology* **131**, 2229-34.
- O'Keefe, R. J., Teot, L. A., Singh, D., Puzas, J. E., Rosier, R. N. and Hicks, D. G.** (1997). Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Lab Invest* **76**, 457-65.
- Owen, M. and Friedenstein, A. J.** (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* **136**, 42-60.
- Owen, T. A., Bortell, R., Yocum, S. A., Smock, S. L., Zhang, M., Abate, C., Shalhoub, V., Aronin, N., Wright, K. L., van Wijnen, A. J. et al.** (1990). Coordinate occupancy of AP-1 sites in the

- vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9990-4.
- Owens, J. M., Gallagher, A. C. and Chambers, T. J.** (1996). Bone cells required for osteoclastic resorption but not for osteoclastic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **222**, 225-9.
- Oyama, M., Chiba, J., Kato, Y., Igarashi, N., Yoshida, M., Ishigami, M., Sugawara, S. and Kobayashi, M.** (1998). Distribution and expression of mRNAs for the proto-oncogenes c-fos and c-jun in bone cells in vivo. *Histol Histopathol* **13**, 671-8.
- Paralkar, V. M., Vail, A. L., Grasser, W. A., Brown, T. A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H. Z., Qi, H., Owen, T. A. and Thompson, D. D.** (1998). Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *J Biol Chem* **273**, 13760-7.
- Patan, S.** (1998). TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* **56**, 1-21.
- Pedraza-Alva, G., Zingg, J. M. and Jost, J. P.** (1994). AP-1 binds to a putative cAMP response element of the MyoD1 promoter and negatively modulates MyoD1 expression in dividing myoblasts. *J Biol Chem* **269**, 6978-85.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and Goff, J. P.** (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-70.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R.** (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7.
- Postel, E. H.** (1998). NM23-NDP kinase. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 1291-5.
- Postel, E. H.** (1999). Cleavage of DNA by human NM23-H2/nucleoside diphosphate kinase involves formation of a covalent protein-DNA complex. *J Biol Chem* **274**, 22821-9.
- Postel, E. H., Berberich, S. J., Flint, S. J. and Ferrone, C. A.** (1993). Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* **261**, 478-80.
- Prockop, D. J.** (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-4.
- Quinn, J. M., Neale, S., Fujikawa, Y., McGee, J. O. and Athanasou, N. A.** (1998). Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int* **62**, 527-31.
- Rao, V. H., Singh, R. K., Delimont, D. C., Schaefer, G. B., Bridge, J. A., Neff, J. R., Sanger, W. G., Sappenfield, J. W., Buehler, B. A. and Finnell, R. H.** (1999). Interleukin-1beta upregulates

- MMP-9 expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 1207-17.
- Reddy, G. P., Reed, W. C., Sheehan, E. and Sacks, D. B.** (1992). Calmodulin-specific monoclonal antibodies inhibit DNA replication in mammalian cells. *Biochemistry* **31**, 10426-30.
- Reddy, S. V. and Roodman, G. D.** (1998). Control of osteoclast differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **8**, 1-17.
- Reddy, S. V., Takahashi, S., Dallas, M., Williams, R. E., Neckers, L. and Roodman, G. D.** (1994). Interleukin-6 antisense deoxyoligonucleotides inhibit bone resorption by giant cells from human giant cell tumors of bone. *J Bone Miner Res* **9**, 753-7.
- Resta, R., Yamashita, Y. and Thompson, L. F.** (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* **161**, 95-109.
- Richards, C. D.** (1998). Interleukin-6. In *Cytokines*, (ed. M.-S. A. R. T. R.), pp. 87-100. New York.
- Richards, C. D., Langdon, C., Deschamps, P., Pennica, D. and Shaughnessy, S. G.** (2000). Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukaemia inhibitory factor, cardiotrophin-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone. *Cytokine* **12**, 613-21.
- Robledo, M. M., Ursa, M. A., Sanchez-Madrid, F. and Teixido, J.** (1998). Associations between TGF-beta1 receptors in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol* **102**, 804-11.
- Roodman, G. D.** (2001). Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* **19**, 3562-71.
- Roux, S., Quinn, J., Pichaud, F., Orcel, P., Chastre, E., Jullienne, A. and De Vernejoul, M. C.** (1996). Human cord blood monocytes undergo terminal osteoclast differentiation in vitro in the presence of culture medium conditioned by giant cell tumor of bone. *J Cell Physiol* **168**, 489-98.
- Sage, E. H.** (1997). Terms of attachment: SPARC and tumorigenesis. *Nat Med* **3**, 144-6.
- Salzer-Kuntschik, M.** (1998). [Differential diagnosis of giant cell tumor of bone]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **82**, 154-9.
- Santra, M., Eichstetter, I. and Iozzo, R. V.** (2000). An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**, 35153-61.
- Sasaguri, Y., Komiya, S., Nakano, R., Yanagi, H., Fukuda, S., Inoue, A. and Morimatsu, M.** (1992). Secretion of matrix metalloproteinases in cultured stromal cells isolated from a giant cell tumor of bone. *Matrix Suppl* **1**, 412.
- Satomura, K., Derubeis, A. R., Fedarko, N. S., Ibaraki-O'Connor, K., Kuznetsov, S. A., Rowe, D. W., Young, M. F. and Gehron Robey, P.** (1998). Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* **177**, 426-38.
- Schoedel, K. E., Greco, M. A., Stetler-Stevenson, W. G., Otori, N. P., Goswami, S., Present, D. and Steiner, G. C.** (1996).

- Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in giant cell tumor of bone: an immunohistochemical study with clinical correlation. *Hum Pathol* **27**, 1144-8.
- Schor, A. M., Canfield, A. E., Sutton, A. B., Arciniegas, E. and Allen, T. D.** (1995). Pericyte differentiation. *Clin Orthop*, 81-91.
- Schutte, J., Viallet, J., Nau, M., Segal, S., Fedorko, J. and Minna, J.** (1989). jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* **59**, 987-97.
- Simmons, P. J. and Torok-Storb, B.** (1991a). CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* **78**, 2848-53.
- Simmons, P. J. and Torok-Storb, B.** (1991b). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **78**, 55-62.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T. et al.** (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-19.
- Soueidan, A., Gan, O. I., Gouin, F., Godard, A., Heymann, D., Jacques, Y. and Daculsi, G.** (1995). Culturing of cells from giant cell tumour of bone on natural and synthetic calcified substrata: the effect of leukaemia inhibitory factor and vitamin D3 on the resorbing activity of osteoclast-like cells. *Virchows Arch* **426**, 469-77.
- Steeg, P. S., Bevilacqua, G., Kopper, L., Thorgeirsson, U. P., Talmadge, J. E., Liotta, L. A. and Sobel, M. E.** (1988). Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* **80**, 200-4.
- Stewart, K., Walsh, S., Screen, J., Jefferiss, C. M., Chainey, J., Jordan, G. R. and Beresford, J. N.** (1999). Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* **14**, 1345-56.
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N. and Yancopoulos, G. D.** (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-80.
- Takahashi, M., Masuyama, J., Ikeda, U., Kasahara, T., Kitagawa, S., Takahashi, Y., Shimada, K. and Kano, S.** (1995). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ Res* **76**, 750-7.
- Takeuchi, Y., Matsumoto, T., Ogata, E. and Shishiba, Y.** (1993). Effects of transforming growth factor beta 1 and L-ascorbate on synthesis and distribution of proteoglycans in murine osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* **8**, 823-30.
- Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Tamura, T., Akatsu, T., Stanley, E. R., Kurokawa, T. and Suda, T.** (1993). Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* **91**, 257-63.

- Teti, A., Farina, A. R., Villanova, I., Tiberio, A., Tacconelli, A., Sciortino, G., Chambers, A. F., Gulino, A. and Mackay, A. R.** (1998). Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein and GRGDSP peptides is RGD and cell shape change dependent. *Int J Cancer* **77**, 82-93.
- Thomas, W. E.** (1999). Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev* **31**, 42-57.
- Uchida, N., Yang, Z., Combs, J., Pourquie, O., Nguyen, M., Ramanathan, R., Fu, J., Welply, A., Chen, S., Weddell, G. et al.** (1997). The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells. *Blood* **89**, 2706-16.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D. M., Martin, T. J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T. et al.** (1995). Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* **182**, 1461-8.
- Ueda, Y., Imai, K., Tsuchiya, H., Fujimoto, N., Nakanishi, I., Katsuda, S., Seiki, M. and Okada, Y.** (1996). Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion. *Am J Pathol* **148**, 611-22.
- Vaananen, H. K., Karhukorpi, E. K., Sundquist, K., Wallmark, B., Roininen, I., Hentunen, T., Tuukkanen, J. and Lakkakorpi, P.** (1990). Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* **111**, 1305-11.
- Van Leuven, F., Hilliker, C., Serneels, L., Umans, L., Overbergh, L., De Strooper, B., Fryns, J. P. and Van den Berghe, H.** (1995). Cloning, characterization, and chromosomal localization to 4p16 of the human gene (LRPAP1) coding for the alpha 2-macroglobulin receptor-associated protein and structural comparison with the murine gene coding for the 44-kDa heparin-binding protein. *Genomics* **25**, 492-500.
- Vincenti, M. P., White, L. A., Schroen, D. J., Benbow, U. and Brinckerhoff, C. E.** (1996). Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **6**, 391-411.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I. and Goldberg, V. M.** (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **76**, 579-92.
- Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A. I.** (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**, 1417-26.
- Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Kern, S. G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr. and Hampton, G.**

- M. (2001). Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* **61**, 5974-8.
- Westermarck, J. and Kahari, V. M.** (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* **13**, 781-92.
- Whyte, M. P.** (1999). Skeletal Neoplasm. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.*, vol. Fourth Edition (ed. M. J. Favus), pp. 397-399. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilking.
- Wulling, M., Engels, C., Jesse, N., Werner, M., Delling, G. and Kaiser, E.** (2001). The nature of giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 467-74.
- Xaus, J., Comalada, M., Cardo, M., Valledor, A. F. and Celada, A.** (2001). Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27(Kip1) and p21(Waf1). *Blood* **98**, 2124-33.
- Yamashita, Y., Hooker, S. W., Jiang, H., Laurent, A. B., Resta, R., Khare, K., Coe, A., Kincade, P. W. and Thompson, L. F.** (1998). CD73 expression and fyn-dependent signaling on murine lymphocytes. *Eur J Immunol* **28**, 2981-90.
- Yang, T. T. and Hawkes, S. P.** (1992). Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10676-80.
- Young, H. E., Duplaa, C., Young, T. M., Floyd, J. A., Reeves, M. L., Davis, K. H., Mancini, G. J., Eaton, M. E., Hill, J. D., Thomas, K. et al.** (2001). Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat Rec* **263**, 350-60.
- Yu, W. H., Yu, S., Meng, Q., Brew, K. and Woessner, J. F., Jr.** (2000). TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* **275**, 31226-32.
- Zambonin Zallone, A., Grano, M., Colucci, S., Zigrino, P., De Bellis, M., Zambonin, G. and Serra, M.** (1995). Human osteoclast-like cells from giant cell tumors of bone: a new tool for investigating bone resorption and osteoclast biology. *Calcif Tissue Int* **56**, S24.
- Zheng, M. H., Fan, Y., Smith, A., Wysocki, S., Papadimitriou, J. M. and Wood, D. J.** (1998). Gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in giant cell tumors of bone osteoclastoma: possible involvement in CD68+ macrophage-like cell migration. *J Cell Biochem* **70**, 121-9.
- Zheng, M. H., Fan, Y., Wysocki, S. J., Lau, A. T., Robertson, T., Beilharz, M., Wood, D. J. and Papadimitriou, J. M.** (1994). Gene expression of transforming growth factor-beta 1 and its type II receptor in giant cell tumors of bone. Possible involvement in osteoclast-like cell migration. *Am J Pathol* **145**, 1095-104.
- Zheng, M. H., Robbins, P., Xu, J., Huang, L., Wood, D. J. and Papadimitriou, J. M.** (2001). The histogenesis of giant cell tumour of

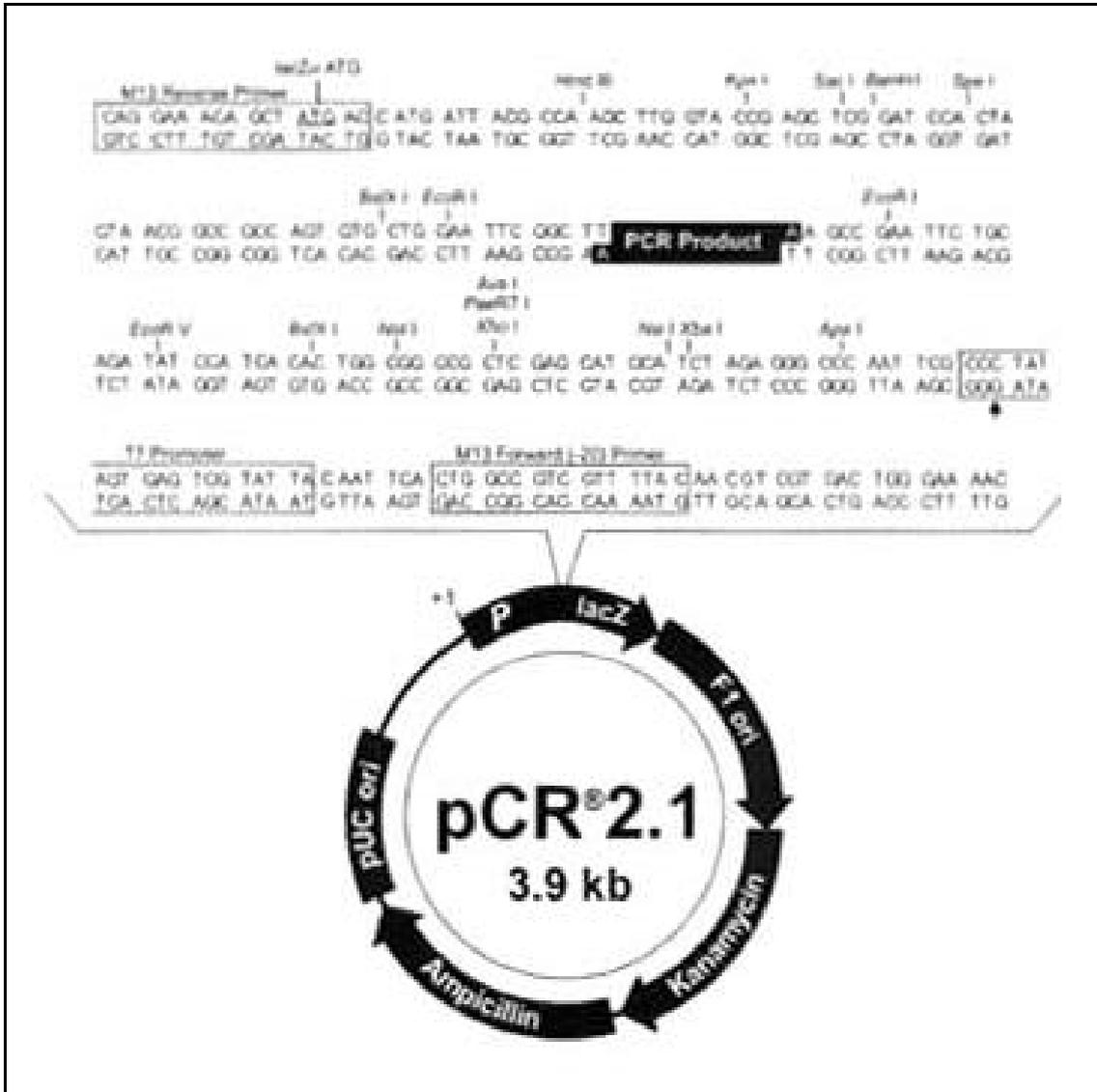
bone: a model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. *Histol Histopathol* **16**, 297-307.

**Zheng, M. H., Xu, J., Robbins, P., Pavlos, N., Wysocki, S., Kumta, S. M., Wood, D. J. and Papadimitriou, J. M.** (2000). Gene expression of vascular endothelial growth factor in giant cell tumors of bone. *Hum Pathol* **31**, 804-12.

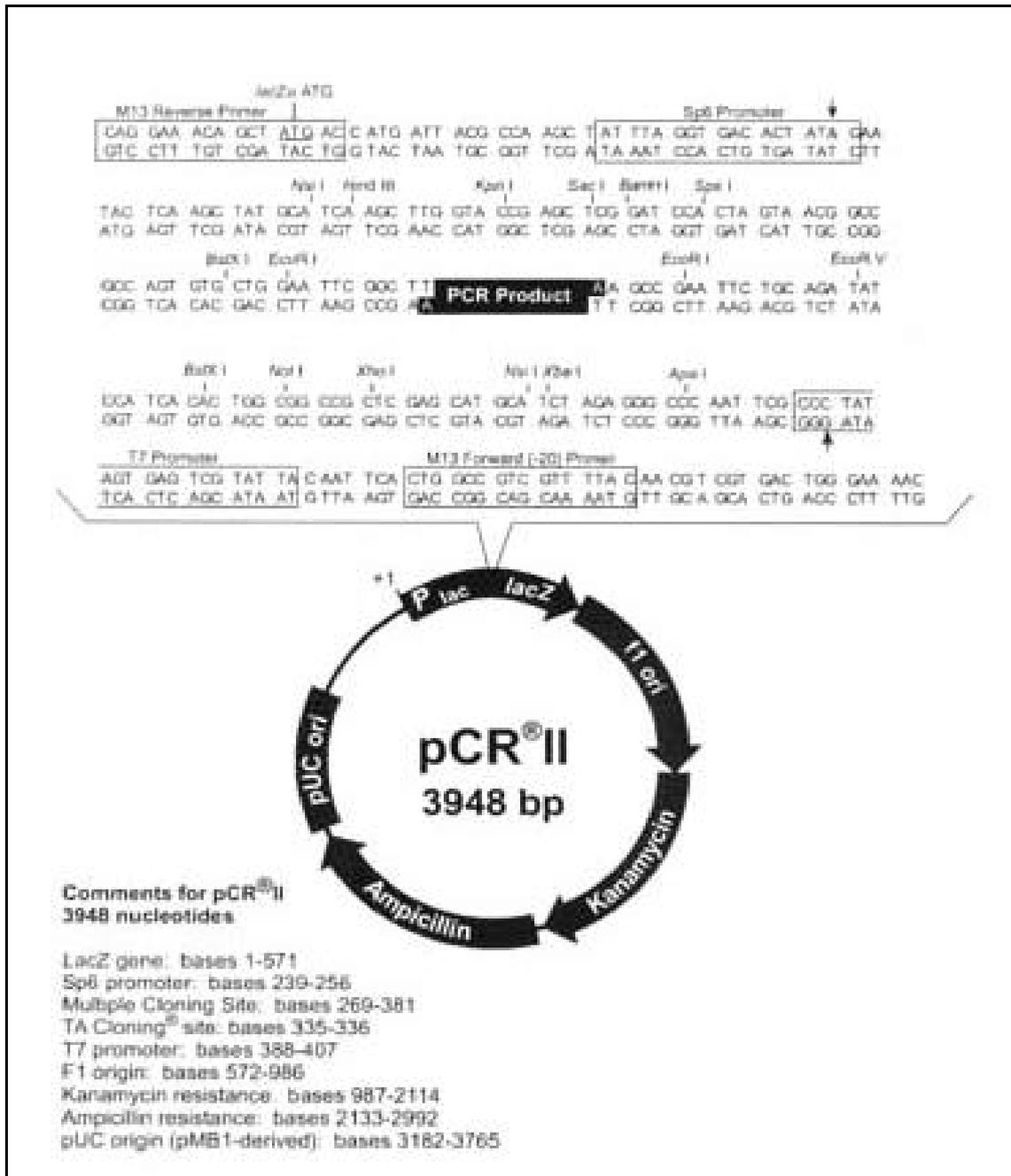
**Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A. and Maini, R. N.** (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* **2**, 477-88.

## H. Anhang

### H.1. Plasmidkarte des Kloniervektors pCR2.1. (Invitrogen)



## H.2. Plasmidkarte des Kloniervektors pCR II (Invitrogen)



### H.3. Ergebnisse der Immunzytologie und Immunhistologie der Riesenzellumore und der Kontrollzellen

#### Immunzytologie der Differenzierungsmarker

Antikörper Zellart	SH2	SH3	SH4	CD166	Stro1
RZT1	+	+	+	+	-
RZT 2	++	+	+++	++	+
RZT 3	+	+	++	+	+/-
RZT 4	+++	+	+++	++	+
RZT 5	++		++	++	+
RZT 6	+	+	+	+	+
RZT 7	+	+	+	+	
RZT 8	+	+	+	+	+
RZT 9	+	+	+	+	+
RZT10	+	+	+	+	+
RZT11	+	+	+	+	
RZT12	+	+	+	+	+/-
RZT13	+	+	+	+	+/-
MSC	+	-	+	+	-
Knochenmark	+	+	+	+	+/-
MG 63	-	-	+	-	+
Saos 2	-	-	-	-	-
Osteoblasten	-	-	-	-	-
Fibroblasten	-	-	-	-	-

Antikörper Zellart	Endoglin	THY1.1	Osteo- nectin	Osteo- pontin	Vimentin
RZT 1	+	+	+	+	+
RZT 2					+
RZT 3					+
RZT 4					
RZT 5	+	+	+	+	
RZT 6	-	+			
RZT 7					+
RZT 8			+		+
RZT 9			+		+
RZT10	+/-		+	+	+
RZT11		-			
RZT12	-	-	+	+	
RZT13	+	-	+	+	
MSC	+	-	+	-	
Knochenmark	+	+			
MG 63	+	n.d.	+	+	
Saos 2	+	+	-	+	
Osteoblasten	-	-			
Fibroblasten	-	-			

**Immunzytologie der Proliferationsmarker**

<b>Antikörper Zellart</b>	<b>MDM2</b>	<b>Ras</b>	<b>Ki-67</b>	<b>PCNA</b>
RZT 1	+	-	+	-
RZT 2		-	-	
RZT 3	+	-		
RZT 4		-		
RZT 5	+	-	-	-
RZT 6	+	+	+	-
RZT 7	+			
RZT 8			-	
RZT9	+	-	-	-
RZT10	+	-		
RZT11	+			
RZT12	-			
RZT13	+			
MSC	+	-	-	+
Knochenmark	-	-	-	-
MG 63	+			
Saos 2	+	+	+	
Osteoblasten			-	
Fibroblasten	-		-	

**Immunzytologie der hämatopoetische Marker**

<b>Antikörper Zellart</b>	<b>CD68</b>	<b>CD34</b>	<b>CD117/ckit</b>	<b>SCF</b>
RZT 1	+			
RZT 2		-	-	-
RZT 3	+		-	-
RZT 4			-	-
RZT 5	-	-	-	-
RZT 6	+			
RZT 7	+			
RZT 8	+			
RZT9	+	-		
RZT10	+			
RZT11	+			
RZT12	+	-		
RZT13	+			
MSC	+	-	+	-
Knochenmark			+/-	
MG 63				
Saos 2				
Osteoblasten				
Fibroblasten				

**Immunzytologie der Osteoklastenmarker**

<b>Antikörper Zellart</b>	<b>TRAP</b>	<b>RANK</b>	<b>RANKL</b>	<b>lvβ3</b>
RZT 1		+	+	
RZT 2				
RZT 3			+	
RZT 4				
RZT 5				
RZT 6			+	
RZT 7			+	
RZT 8	mk : +		+	mk : +
RZT9	mk : +	+	+	mk : +
RZT10	mk : +		+	
RZT11			+	
RZT12				
RZT		+	+	
MSC		+		
Knochenmark				
MG 63			+	
Saos 2			+	
Osteoblasten				
Fibroblasten				

mk: mehrkernige Riesenzellen

**Immunhistologie der Gefrierschnitte mit Differenzierungsmarker**

<b>Antikörper Zelltyp</b>	<b>SH2</b>	<b>SH3</b>	<b>SH4</b>	<b>SH4</b>	<b>MDM2</b>
RZT 3	+	-	++	++	+
RZT 7	+	-	+	+	+
RZT 8	+	-	+	+	+
RZT 9	+	-	+	+	+

## I. Abkürzung

---

l	Liter
LacZ	Z-Untereinheit der $\beta$ -Galactosidase
M	Molar
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
$\alpha$ -MEM	Modified Eagles Medium, $\alpha$ -modifikation
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MSC	Mesenchymale Stammzellen
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
nM	Nanomolar
NaCl	Natriumchlorid
o. D.	optische Dichte
ODF	Osteoclast Differentiation Factor
OPG	Osteoprotegerin, ODF Antagonist
$P^{32}$	radioaktives Phosphat
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RANK	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RZT	Riesenzelltumor
RZTSZ	Riesenzelltumorstromazellen
SDS	Sodium Dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	Saline Sodium Citrat Puffer
taq Polymerase	Thermus Aquaticus DNA-Polymerase

## I. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALCAM	Activated Leucocyte Cell Adhesion Moleule
AP	Alkalischen Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Centimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxyd
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
Huvec	Human Umbillical Cord Vene Endothelial Cells
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen

## I. Abkürzung

---

l	Liter
LacZ	Z-Untereinheit der $\beta$ -Galactosidase
M	Molar
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
$\alpha$ -MEM	Modified Eagles Medium, $\alpha$ -modifikation
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MSC	Mesenchymale Stammzellen
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
nM	Nanomolar
NaCl	Natriumchlorid
o. D.	optische Dichte
ODF	Osteoclast Differentiation Factor
OPG	Osteoprotegerin, ODF Antagonist
$P^{32}$	radioaktives Phosphat
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RANK	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RZT	Riesenzelltumor
RZTSZ	Riesenzelltumorstromazellen
SDS	Sodium Dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	Saline Sodium Citrat Puffer
taq Polymerase	Thermus Aquaticus DNA-Polymerase

## I. Abkürzung

---

TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TBE	Tris Bor EDTA Puffer
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TRAP	Tatrat resistente saure Phosphatase
U	Enzymeinheit (Unit)
u. a.	unter anderem
Ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
%	Prozent

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen Bedanken, deren Hilfe zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Delling für die Bereitstellung des interessanten Themas und den Arbeitsbedingungen im Zentrum für Biomechanik, welche die Entstehung dieser Dissertation ermöglichten. Außerdem bedanke ich mich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die Übernahme des ersten Gutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Renwantz bedanke ich mich für die konstruktive Kritik in Bezug auf meine Manuskripte und die bereitwillige Übernahme des Gutachtens.

Frau Dr. Kaiser danke ich besonders für die engagierte Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit und für die kritischen Anregungen und zahlreichen Vorschläge, die zum Gelingen beigetragen haben.

Bei Frau S. Loges, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bei der Real-Time PCR der angiogenetischen Faktoren und die Bereitstellung der Plasmid-DNA und Oligonukleotidsequenzen.

Herr Dr. M. Brockmann, Abteilung für Neurochirurgie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, danke ich für die Durchführung und Auswertung der Boyden Chamber Assays, sowie für die Anleitung zur praktischen Durchführung dieses Assays.

Bei Dr. S. Marotzki, Abteilung für Toxikologie, Universität Hamburg bedanke ich mich für die großzügige Nutzungsmöglichkeit des Light Cycler PCR Gerätes.

Ich möchte der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Hansestadt Hamburg für die Unterstützung durch das Stipendium des Graduiertenkolleg 476 danken.

Bei allen Mitarbeitern des Zentrum für Biomechanik bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, das nette Arbeitsklima und die aufmunternden Worte, die mir häufig bei der Durchführung meiner Arbeit weitergeholfen haben. Besonders bedanke ich mich bei Herr C. Gentsch für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Riesenzellen, Frau A. Schröder danke ich für die fachlichen Diskussionen, Frau U. Larsen für die Hilfe bei der Kultivierung der Tumorzellen, Frau R. Deiwick für die Organisation von Verwaltungsarbeiten und auch allen anderen, die jetzt nicht explizit aufgeführt wurden.

## Danksagung

---

Allen Mitarbeitern der Abteilung für Osteopathologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, danke ich für ihre Kooperation in Bezug auf das untersuchte Tumormaterial.

Vor allem danke ich meinen Eltern, meinen Schwestern und meinem Freund Franky für ihre Geduld und die emotionale Unterstützung, die mir während meines Studiums und meiner Doktorarbeit sehr geholfen haben.

## Erklärungen

---

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre ebenso, daß ich mich zu keiner Zeit an anderer Stelle um einen Doktorgrad beworben habe.

Hamburg, Februar 2002

## Lebenslauf

Manuela Wüiling  
geboren 06.06.1972  
in Gütersloh

## Studium

---

- 26.04.2002 Disputation im Arbeitsbereich Zoologie des Fachbereichs  
Biologie der Universität Hamburg  
Thema: Analyse der Tumor induzierten Osteolyse in  
riesenzellhaltigen Knochentumoren
- seit 01.2002 Anstellung als Doktorand in einem Forschungsprojekt der  
Deutschen Krebshilfe / Mildreed-Scheel Stiftung  
in der Abteilung Osteopathologie
- 01.1999 – 01.2002 des Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf  
Doktorarbeit im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs  
476 (Molekularbiologie der Osteolyse) in der Abteilung  
Osteopathologie / Zentrum für Biomechanik des
- 11.1997 - 11.1998 Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf  
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie und  
Gentechnologie der Universität Bielefeld  
Thema: Molekularbiologische Analyse der Ammonium-  
abhängigen Expression des Transkriptionsaktivators NifA  
aus *Acetobacter diazotrophicus*
- 09.1993 - 10.1997 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld

## Berufsausbildung

---

- 09.1991- 08.1993 Ausbildung zur medizinisch-technischen Assistentin an  
der Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin  
der Städtischen Krankenanstalten Bielefeld-Mitte  
Abschluß mit staatlicher Prüfung

## Schulbildung

---

- 07.1982 – 06.1991 Städtisches Gymnasium, Gütersloh  
Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife
- 07.1978 – 06.1982 Grundschule Josef -Schule, Gütersloh

Kommentar:

### Publikationen

The origin of the neoplastic stromal cell of the Giant Cell Tumor of Bone.  
J.B.M.R, submitted März 2002

Wuelling M., Engels C., Jesse N., Werner M., Delling G., Kaiser E., 2001  
The nature of giant cell tumor of bone.  
J.Cancer Res.Clin. Oncol., 127: 467-474

Teixera K.R.S., Wuelling M., Morgan T., Galler R., Zellermann E.M., Baldani J.I.,  
Kennedy C., Meletzus D., 1999  
Molecular Analysis of the chromosomal region encoding the nifA and nifB genes of  
Acetobacter diazotrophicus.  
FEMS Microbiol. Letters, 176 (2): 301-309

---

### Präsentationen

---

Wuelling M., Delling G., Kaiser E., 2001  
Differentially Expressed Genes in Human Giant Cell Tumor of Bone.  
ASBMR meeting, Phoenix 2001, SU084

Kaiser E., Wuelling M., Delling G., 2001  
Vortragstitel: Molekularbiologische Klassifizierung der neoplastischen Komponente  
des Riesenzelltumors des Knochens.  
Osteologie-Kongress, Wiesbaden 2001, Fr.06.04.

Wuelling M., Kaiser E., Delling G., 2001  
Vortragstitel: Die mesenchymale Stammzellkomponente im Riesenzelltumor des  
Knochens.  
Symposium "Stem Cells in a nutshell", Universitätskrankenhaus Eppendorf,  
Fr.19.01.2001

Wuelling M., Werner M., Delling G., Kaiser E., 2000  
Giant Cell Tumor of Bone: New approaches to further characterize the neoplastic  
cell origin.  
ASBMR meeting, Toronto 2000, SA109

Wuelling M., Kaiser E., Delling G., 2000  
Vortragstitel: Giant Cell Tumor of Bone: New approaches to further characterize  
the neoplastic cell origin.  
EMSOS meeting, London 2000, Fr.04.05.