

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie

am Klinikum rechts der Isar

**Verbesserte hepatische und osteogene Differenzierung humaner
Ad-MSCs älterer Spender durch epigenetische Modifikation mit
5-Azacytidin und BIX 01294**

Xueying Yan

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. K. Nüssler,

Eberhard- Karls-Universität Tübingen

2. Univ.-Prof. Dr. P. Bibertaler

Die Dissertation wurde am 04.10.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch
die Fakultät für Medizin am 12.12.2012 angenommen

Für meine Eltern

I.	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Einleitung	5
1.1	Stammzellen	5
1.2	Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	6
1.2.1	Herkunft und Eigenschaften der MSCs	6
1.2.2	Anwendung der MSCs	6
1.2.3	MSCs in Lebererkrankungen	7
1.2.4	Hepatische Differenzierung der MSCs	8
1.2.5	Wichtige hepatische Funktionen	9
1.2.6	MSCs in Knochenkrankungen	10
1.2.7	Osteogene Differenzierung der MSCs	10
1.3	Regulierung der Selbsterneuerung der Stammzellen	12
1.3.1	Stammzellproliferation	12
1.3.2	Selbsterneuerung der Stammzellen	12
1.3.3	Pluripotenz und Pluripotenzmarker	13
1.4	Mechanismen der Zellalterung	13
1.5	Überblick Epigenetik	14
1.5.1	DNA-Methylierung	14
1.5.2	DNA-Demethylierung	15
1.5.3	DNA-Hydroxymethylierung	15
1.5.4	5-Azacytidin	17
1.5.5	BIX 01294	18
1.6	Zielsetzung und prinzipieller Versuchsaufbau	19
1.6.1	Zielsetzung	19
1.6.2	Versuchsaufbau	19
2	Materialien und Methoden	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Humanes Fettgewebe	21
2.1.2	Verwendete biologische Materialien	21
2.1.3	Verwendete Chemikalien	22
2.1.4	Verwendete Kits	25
2.1.5	Verbrauchsmaterial	26
2.1.6	Verwendete Geräte	27

2.1.7	Software.....	28
2.2	Methoden _____	29
2.2.1	Isolierung und Zellkultur der Ad-MSCs	29
2.2.2	Passagierung und Ausplattieren der Zellen für Experimente	29
2.2.3	Bestimmung spezifischer Oberflächenmarker mittels FACS -Analyse	29
2.2.4	Inkubation von Ad-MSCs mit AZA und BIX.....	30
2.2.5	Immunozytofluoreszenz-Färbung für Ki 67.....	30
2.2.6	Protokoll für 5-Methylcytosin (5mC) und 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC)	31
2.2.7	Probenbefestigung, Bilderfassung und Auswertung	32
2.2.8	Ribonukleinsäure (RNA) und DNase I-Verdauung.....	33
2.2.9	Herstellung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA).....	34
2.2.10	Bestimmung der Genexpressionen durch Quantitative Real-Time PCR	34
2.2.11	Hepatische Differenzierung der Ad-MSCs.....	36
2.2.12	Messung der Glukoseproduktion.....	37
2.2.13	Messung der Harnstoffproduktion	37
2.2.14	Messung der Phase I / II Enzymaktivität	38
2.2.15	Sulforhodamin B-Färbung.....	40
2.2.16	Osteogene Differenzierung der Ad-MSCs	41
2.2.17	Bestimmung der Alkalinen Phosphatasen (AP)-Aktivität.....	41
2.2.18	Von Kossa-Färbung	42
2.2.19	Alizarin Rot-Färbung	43
2.2.20	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse _____	45
3.1	Charakterisierung des Immunphänotyps der Ad-MSCs _____	45
3.2	Zellproliferation durch die Ki 67-Immunfärbung _____	45
3.2.1	Unterschied des Proliferationsanteils zwischen jungen und alten Ad-MSCs.....	45
3.2.2	AZA und BIX Behandlungen haben den Proliferationsanteil von alten Ad-MSCs gesteigert.	45
3.3	Genexpression pluripotenter Gene _____	47
3.3.1	Der Altersbedingte Unterschied pluripotenter Gene in Ad-MSCs	47
3.3.2	Die Behandlung mit AZA und BIX führte zu einer erhöhten Genexpression von Pluripotenzmarkern .	48
3.4	Genomische Verteilung von 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) und 5-Methylcytosin (5mC)	51
3.4.1	Der altersbedingte Unterschied von 5hmC und 5mC in alten und jungen Ad-MSCs.....	51
3.4.2	Der Einfluss von AZA und BIX auf die Verteilung von 5hmC und 5mC in alten und jungen Ad-MSCs ...	51
3.5	Genexpression der TET Gene _____	54
3.5.1	Der altersbedingte Unterschied von TET Genen in Ad-MSCs	54

3.5.2	Die <i>TET</i> -Genexpression wurde durch die Behandlung mit AZA und BIX verändert.	55
3.6	Verbesserung der hepatischen Differenzierung der Ad-MSCs älterer Spender _____	57
3.6.1	Altersbedingte basale Harnstoffproduktion in HLCs differenziert aus jungen und alten Ad-MSCS	57
3.6.2	Verbesserung der Harnstoffproduktion in alten HLCs nach AZA-Vorbehandlung	57
3.6.3	Altersbedingte basal Glukoseproduktion in HLCs	58
3.6.4	Verbesserung der Glukoseproduktion in HLCs nach AZA-Vorbehandlung	59
3.6.5	Altersbedingte Abschwächung der Basalaktivität von Phase I /II Enzymen	60
3.6.6	Die Verbesserung der Phase I / II Enzymaktivität alter HLCs durch Vorbehandlung mit AZA	62
3.7	Verbesserung der osteogenen Differenzierung von Ad-MSCs aus alten Spendern _____	64
3.7.1	Altersabhängige basale AP-Aktivität der OLCs	64
3.7.2	BIX-Vorbehandlung verbessert die AP Aktivität in alten OLCs	64
3.7.3	Altersbedingte Abschwächung der ECM-Mineralisierung	65
3.7.4	Die Vorbehandlung mit AZA und BIX verbessert die ECM-Mineralisierung alter OLCs	66
4	<i>Diskussion</i> _____	68
II.	<i>Zusammenfassung</i> _____	77
III.	<i>Tabellenverzeichnis</i> _____	79
IV.	<i>Abbildungsverzeichnis</i> _____	80
V.	<i>Literaturverzeichnis</i> _____	81
VI.	<i>Danksagung</i> _____	97

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar pro Liter
µm	Mikrometer
5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
Ad-MSCs	Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe
AHMC	3-(2-N,N-diethylaminoethyl)-7-hydroxy-4-methylkumarin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMI	Akute Myokardischämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMMC	3-(2-N,N-diethyl-N-methylaminoethyl)-7-methoxy-4-methylkumarin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ASCs	Adulte Stammzellen
ATP	Adenosintriphosphat
AZA	5-Azacytidin
BFC	7-Benzoyloxy-4(trifluoromethyl) Kumarin
BIX	BIX 01294
BM-MSCs	Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark

Abkürzung	Beschreibung
BSA	Bovine Serum Albumin
CD-Marker	Cluster of Differentiation Marker
cDNA	komplementär DNA (komplementäre DNA)
CHC	3-cyano-7-hydroxykumarin
CpG	C-Phosphat-G-Site der DNA
CTP	Cytidintriphosphat
CYP450	Zytochrom P450-Isoenzym
DEX	Dexamethason
Diff.	Differenzierte (Zellen)
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	Extrazelluläre Zellmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFC	7-Ethoxy4(trifluoromethyl) Kumarin
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Epithelium-Mesenchymal-Transition
ESLD	End-stage liver disease
ESCs	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluoreszenzaktiviertes Zellsorting
FCS	Fetales Rinderserum
FGF4	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4

Abkürzung	Beschreibung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLOX	Glukose-Oxygen-Scavenging (Glukose-Sauerstoff-ergatternd)
GNG	Glukoneogenese
GSH	Glutathion
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFC	7-Hydroxykumarin
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HLC	Hepatocyte-like cell (Hepatozyten-ähnliche Zelle)
HMT	Histonmethyltransferase
IgG	Immunglobulin G
iPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen
ITS	Insulin-Transferrin-Natrium Selenit
LIN28	cell lineage abnormal 28 (abnormale Zellabstammung 28)
M	mol pro Liter
MBD	Methyl-GpG-binding-Domain
MDS	Myeloidysplastisches Syndrom
MET	Mesenchymal-Epithelial-Transition
MFC	7-Methoxy-4(trifluoromethyl)kumarin
Min.	Minute
ml	Milliliter

Abkürzung	Beschreibung
MELD	Model for End-stage Liver Disease
mM	Millimol pro Liter
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
NANOG	Nanog Homöoboxprotein
NIC	Nicotinamid
nm	Nanometer
OCT4	Octamer-verbundener Transkriptionsfaktor 4
OLCs	Osteoblast-like Cells (Osteoblasten-ähnliche Zellen)
OSM	Oncostatin M
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pNP	4-Nitrophenol
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-	Reverse Transkription minus
SOX2	Sex determining region Y (SRY)-box 2 (geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2)
SRB	Sulforhodamin B
TET	Ten-Eleven Translokationsproteinfamilie
Undiff.	Undifferenzierte (Zellen)

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen findet man in allen mehrzelligen Organismen. Sie können sich erneuern und in verschiedene spezialisierte Zelltypen ausdifferenzieren. In Säugetieren werden bisher drei verschiedene Arten von Stammzellen unterschieden: embryonale Stammzellen (ESCs), die aus der inneren Zellmasse der Blastozysten isoliert werden, adulte/somatische Stammzellen (ASCs), die sich in verschiedenen Gewebearten befinden, und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs), die durch Reprogrammierung aus nicht-pluripotenten somatischen Zellen entstanden sind. Die ESCs verfügen über die beste Differenzierungskapazität, denn sie können sich zu den Zelllinien aller drei Keimblätter ausdifferenzieren. Allerdings ist ihre Verwendung *in vivo* aufgrund des hohen Risikos von Tumorgenese und ethischen Bedenken bis jetzt eingeschränkt. Die iPSCs besitzen zwar ein ähnlich hohes Differenzierungspotenzial, aber auch eine ähnlich hohe Gefahr von Tumorgenese wie die ESCs (Takahashi *et al.*, 2007). Adulte Stammzellen sind in allen Gewebearten von Säugetieren zu finden. Ihre ursprünglichen Gewebenischen bestimmen die Entwicklung der ASCs hin zu den entsprechenden Zelllinien (Young und Black, 2004). (Abbildung 1).

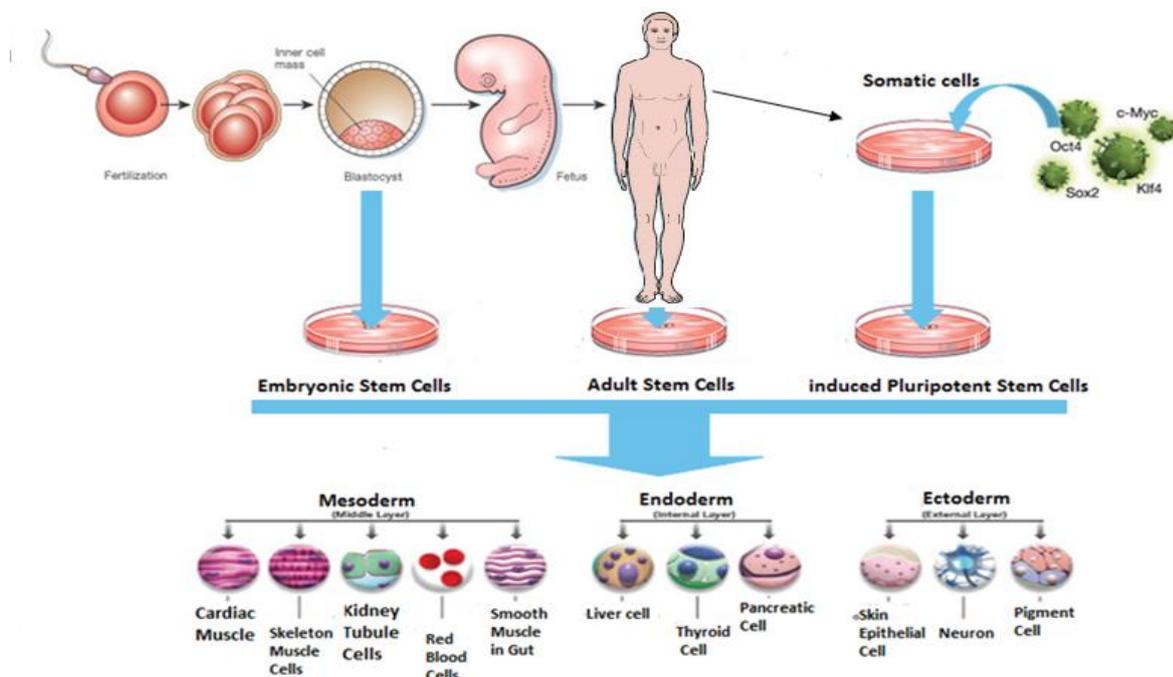


Abbildung 1: Die unterschiedlichen Arten von Stammzellen und ihre Herkunft (Donovan und Gearhart, 2001)

1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

1.2.1 Herkunft und Eigenschaften der MSCs

Die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) gehören zu den adulten Stammzellen, die nach der Geburt aus bestimmten Geweben *in vivo* isoliert werden können. Diese Gewebe, wie z.B. Fett, Knochenmark, Muskeln, stammen ursprünglich aus dem mesodermalen Keimblatt (Meirelles und Nardi, 2009). Eine der zentralen Eigenschaften der MSCs ist ihre Multipotenz. D. h. sie sind in der Lage, sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Somit können sie sich nicht nur zu mesodermalen Zellen entwickeln, wie z. B. Osteoblasten, Knorpelzellen, Sehnenzellen, Apidozyten und Myozyten, sondern auch zu endodermalen, wie z. B. Hepatozyten, oder zu ektodermalen, wie z. B. Nervenzellen, differenzieren. Die Umwandlung von Zellen eines Keimblatts in Zellen eines anderen Keimblattes nennt man Transdifferenzierung (Baksh *et al.*, 2004). Die andere Eigenschaft der MSCs ist ihr Selbsterneuerungspotenzial: So verfügen humane MSCs aus Fettgewebe (Ad-MSCs) beispielweise über eine signifikant kürzere Zellverdopplungszeit (2-4 Tage) als humane Knochenmark-MSCs (BM-MSCs). *In vitro* wurde die Expression der Stammzellmarker Sox2 und Oct4 in Ad-MSCs bis zu 10 Passagen lang nachgewiesen (Izadpanah *et al.*, 2006). Um als MSCs charakterisiert zu werden, müssen die Zellen mindestens die folgenden Kriterien erfüllen (Dominici *et al.*, 2006):

- (i) Sie müssen unter standardisierten Gewebekulturbedingungen an Plastik haften können.
- (ii) Sie müssen bestimmte Zelloberflächenmarker, wie z. B. CD 73, CD 90 und CD 105 exprimieren während andere Marker, wie z. B. CD 45, CD 34, CD 14, CD 11b, CD 79 alpha, CD19 und HLA-DR nicht vorkommen dürfen.
- (iii) Sie müssen dazu in der Lage sein, sich unter spezifischen *in vitro* Bedingungen in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren.

1.2.2 Anwendung der MSCs

Die neuartige Stammzell-basierte Therapie bietet Heilungsmöglichkeiten in vielen Fällen an, wo die moderne Medizin ihre Grenzen erreicht. Die adulten Stammzellen können sowohl dem Patienten direkt als Behandlungsmittel transplantiert werden (Smith *et al.*, 2006; Spitkovsky und Hescheler, 2008), als auch durch Tissue-Engineering-Verfahren für künstliche Organe verwendet werden (Chang *et al.*, 2009). Außerdem sind Stammzellen in *in vitro* Toxizitätstests einsetzbar (Knight, 2008). Darüber hinaus wurden potenzielle Anwendungen von Stammzellen

im Tierversuch für bestimmte Krankheitsmodelle entwickelt (Halpern *et al.*, 2011; Hargus *et al.*, 2012).

Da MSCs aus verschiedenen adulten Geweben leicht isoliert werden können und ein geringes Tumorrisiko haben so wie das Immunsystem beeinflussen können, stellen diese Zellen einen idealen Zelltyp für eine Patienten-spezifische Zelltherapie dar. Bereits im Jahre 1995 wurde die erste klinische Studie zur autologen Transplantation von MSCs mit 15 Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen durchgeführt (Lazarus *et al.*, 1995). In den vergangenen Jahren wurden weitere klinische Studien über die Machbarkeit und die Effizienz einer MSC-Therapie durchgeführt (Wang *et al.*, 2012).

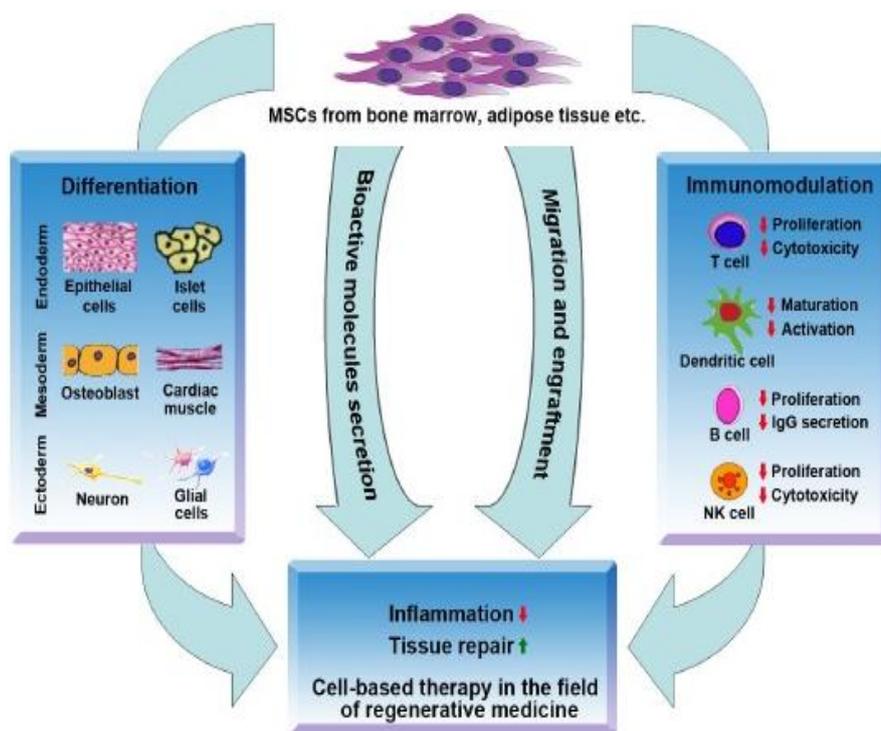


Abbildung 2: Das therapeutische Anwendungspotenzial der MSCs (Wang *et al.*, 2012)

1.2.3 MSCs in Lebererkrankungen

Die Leber verfügt eine ausgeprägte Regenerationsfähigkeit. Aber bei schweren Schädigungen durch chronische Lebererkrankungen verlieren die Leberzellen (Hepatozyten) ihre Erneuerungsfähigkeit. In diesem Fall kann die Leber ihre Funktion nicht mehr erhalten, was anschließend zu Leberversagen führt (Li *et al.*, 2011). Die orthotope Lebertransplantation (OLT) ist zur Zeit die einzige Heilungsmöglichkeit für Patienten mit einer Lebererkrankung im Endstadium (End-Stage Liver Disease, ESLD) (O'Leary *et al.*, 2008). Aufgrund der geringen

Organspendebereitschaft sowie anderer logistischer Probleme sind allein im Jahr 2011 800 Patienten, die im EUROTRANSPLANT Register auf der Warteliste geführt wurden, verstorben (Oosterlee und Rahmel, 2011). Die Zelltherapie mit primären Hepatozyten wurde von Forschern als eine Alternative für die OLT durchgeführt. Allerdings hat diese Methode das gleiche Problem wie die OLT: nämlich hauptsächlich mangelnde Organspendebereitschaft (Nussler *et al.*, 2011). Darüber hinaus führt die Kryokonservierung primärer Hepatozyten über einen längeren Zeitraum zu einem Qualitätsverlust (Pai *et al.*, 2012), weshalb zahlreiche extrahepatische Zelltypen untersucht wurden, die eventuell hepatische Eigenschaften aufweisen. Dabei wurde herausgefunden, dass die Therapie mit adulten Stammzellen, insbesondere MSCs, einen potenziellen Ansatz zur Heilung von Lebererkrankungen darstellen. Klinische Phase I Studien mit MSCs in Patienten mit ESLD zeigten eine große Sicherheit (Mohamadnejad *et al.*, 2007). Die Leberfunktion und der MELD-Score (Model for End-Stage Liver Disease Score, Schweregrad einer Lebererkrankung) dieser Patienten wurde durch eine MSC-Injektion signifikant verbessert (Mohamadnejad *et al.*, 2007; Kharaziha *et al.*, 2009). Im Tiermodell können MSCs durch die Hemmung der Aktivierung von Ito-Zellen die Leberfibrose abschwächen (Pan *et al.*, 2011). Außerdem sind MSCs in der Lage, durch direkten Zellkontakt bioaktive Zytokine auszuschütten und die Proliferation sowie die Zellfunktion von Hepatozyten verbessern (Gomez-Aristizabal *et al.*, 2009).

1.2.4 Hepatische Differenzierung der MSCs

Zurzeit werden verschiedene Methoden entwickelt, mit denen MSCs *in vivo* und *in vitro* zu Zellen mit Hepatozyten-ähnlichen Eigenschaften differenzieren können. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4 (FGF-4) ist entscheidend für die Endodermetabilierung in der embryonalen Entwicklung (Wells und Melton, 1999). Früher wurde davon ausgegangen, dass nur Zellen des Endoderms zu Hepatozyten differenzieren können (Schwartz *et al.*, 2002). Jedoch wurde berichtet, dass sich exokrine Pankreastumorzellen, die nicht aus dem Endoderm stammen, durch Dexamethason (Dex) zu einem hepatischen Phänotyp umwandeln konnten (Shen *et al.*, 2000). Zellen aus dem Knochenmark konnten durch die Behandlung mit dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) zu Hepatozyten differenzieren (Oh *et al.*, 2000). Zudem kann Dex zusammen mit den Zytokinen HGF, Oncostatin M (OSM) und FGF die Spontandifferenzierung von ESCs zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen fördern (Hamazaki *et al.*, 2001). Inspiriert von den vorliegenden Ergebnissen, haben Schwartz *et al.* im Jahre 2002 Protokolle mit FGF-4 und HGF entwickelt, damit MSCs *in vitro* zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen (HLCs) differenzieren

konnten. Diese HLCs exprimieren typische hepatische Marker und zeigen ähnliche funktionelle Aktivitäten wie Hepatozyten (Schwartz *et al.*, 2002). Seo *et al.* haben die hepatische Differenzierung durch die Verwendung von HGF, OSM und Dimethylsulfoxid (DMSO) untersucht (Seo *et al.*, 2005). Banas *et al.* haben CD 105-positive Ad-MSCs mit mehreren Zusätzen, wie Transferrin, Hydrocortison, BSA, Ascorbinsäure, EGF-Insulin, Dexamethason, HGF, FGF1, FGF4, und OSM inkubiert, und zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen differenziert (Banas *et al.*, 2007). Aurich *et al.* haben zum ersten Mal Ad-MSCs vor der hepatischen Differenzierung mit dem epigenetischen Inhibitor 5-Azacytidin (AZA) behandelt, und danach eine verbesserte hepatische Funktion sowie ein effizienteres Anwachsen der HLCs *in vivo* beobachtet (Aurich *et al.*, 2009).

1.2.5 Wichtige hepatische Funktionen

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan. Sie wirkt bei der Synthese wichtiger Proteine, der Gerinnungsfaktoren und Galensalze mit. Darüber hinaus kann sie die Homöostase des Körpers aufrechterhalten, z. B. ein Drittel des menschlichen Glykogens wird in der Leber gespeichert. Bei Bedarf können Hepatozyten mittels Glukoneogenese das gespeicherte Glykogen wieder zu Glukose umsetzen (Nelson, 2000). Des Weiteren spielt die Leber die zentrale Rolle in der Entgiftung. Körpereigene und körperfremde Substanzen (Xenobiotika) werden durch die sogenannte Biotransformation ausgeschieden. Die Biotransformation verläuft in mehreren Phasen wobei zwei Phasen entscheidend sind. In der Phase I wird durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse eine polare funktionelle Gruppe in das Substrat (häufig Medikamente) gekoppelt, so dass es hydrophiler wird. Der wichtigste Mechanismus ist die Oxidation durch Zytochrom P 450 (CYP 450). Die induzierbare CYP-Aktivität ist ein entscheidender Phänotyp der Hepatozytenfunktion (Vanhaecke und Rogiers, 2006). Die wichtigsten CYP 450-Enzyme, welche 90% der Oxidation von toxischen Substanzen im Körper übernehmen, sind CYP 3A4/5 (52%), CYP 2D6 (30%), CYP 2B6 (25%), CYP 1A2 (4 - 6%) und CYP 2E1 (2 - 5%) (Zuber *et al.*, 2002). In der zweiten Phase kommt es zu einer Konjugation des nun hydrophilen Stoffes mit einem körpereigenen Stoff. Ist ein Molekül bereits hydrophil, entfällt die Phase I und es durchläuft nur die Phase II. Die hydrophilen Moleküle, die auf diese Weise biotransformiert wurden, werden am Ende entweder über die Nieren oder über die Galle ausgeschieden (Glue und Clement, 1999). Zur Entgiftung in der Leber zählt auch noch die Bildung von Harnstoff. Giftige Ammoniumionen werden zuerst in Hepatozyten durch den Harnstoffzyklus in Harnstoff umgewandelt und anschließend über die Nieren aus dem Körper ausgeschieden (Burton, 2000).

Um die potenzielle Anwendung der hepatisch differenzierten Ad-MSCs zu bewerten, ist es notwendig, eine funktionelle Charakterisierung der HLCs in den *in vitro* Untersuchungen vorzunehmen (Snykers *et al.*, 2011). In unseren Versuchen, liegt der Schwerpunkt der funktionellen Charakterisierung auf der Harnstoffproduktion und dem Glukoseumsatz sowie auf der enzymatischen Aktivität der Phase I und II Biotransformation.

1.2.6 MSCs in Knochenerkrankungen

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe. Durch das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten (Knochenbildung) und Osteoklasten (Knochenabbau) befindet sich das Knochengewebe in einer ständigen Rekonstruktion (MacDonald und Gowen, 1993; Zaidi *et al.*, 1993). Die Knochenheilung ist ein Prozess, der mehrere Phasen durchläuft. Dabei wird das Knochengewebe durch die desmale und/oder enchondrale Ossifikation wiederhergestellt (Schindeler *et al.*, 2008; Marsell und Einhorn, 2011). Komplexe Knochenbrüche und -defekte lassen sich jedoch nicht einfach reparieren. Die Knochenheilung wird sehr stark vom Alter der Patienten beeinflusst (Martin, 1993). Deshalb sind in den letzten Jahren zahlreiche Methoden erforscht worden, um die Knochenheilung bei alten Patienten zu beschleunigen. Im Verfahren der *in vivo* Osteogenese wurde festgestellt, dass sich die Osteoprogenitorzellen aus MSCs entwickeln können (Pricola und Lorenz, 2010). Somit spielen die MSCs in der Knochenheilung eine wichtige Rolle (Bruder *et al.*, 1994). Im Jahre 1989 wurde bereits berichtet, dass die Heilung von Knochendefekten durch MSC Transplantation in Ratten verbessert werden konnte (Ohgushi *et al.*, 1989) und im Jahr 2001 wurde bereits die erste klinische Studie mit BM-MSC im Bereich der Knochenheilung durchgeführt (Quarto *et al.*, 2001). Bis heute wurde die Wirkung der MSC-basierten Therapie bereits in zahlreichen klinischen Studien bei verschiedenen Knochenerkrankungen, wie z. B. in Fehlheilung von Knochenfrakturen, Osteogenesis imperfecta (Glasknochenkrankheit), oder der Hypophosphatasie durchgeführt (Undale *et al.*, 2009). Darüber hinaus sind MSCs auch dafür geeignet, osteoartikuläre pädiatrische Erkrankungen (Norambuena *et al.*, 2012) sowie Knochentumore (Hamada *et al.*, 2005) zu behandeln.

1.2.7 Osteogene Differenzierung der MSCs

Die osteogene Differenzierung der MSCs *in vitro* hat Ähnlichkeit mit dem chondromalen Ossifikationsprozess. Dabei werden MSCs direkt zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen induziert. Diese Differenzierung kann mit einer mineralisierten extrazellulären Matrix (ECM) identifiziert

werden (Gregory *et al.*, 2005). Bis heute sind viele Protokolle für die osteogene Differenzierung von MSCs etabliert worden (Hanada *et al.*, 1997; Jaiswal *et al.*, 1997). L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Strukturformel in Abbildung 3a) wird verwendet, um die Kollagenanreicherung der Zellmatrix und die Zellproliferation zu verbessern (Hata und Senoo, 1989; Jaiswal *et al.*, 1997). β -Glycerolphosphat (Strukturformel in Abbildung 3b) fördert die Mineralisierung der extrazellulären Matrix (Chung *et al.*, 1992; Fratzl-Zelman *et al.*, 1998). Cholecalciferol (Vitamin D₃, Strukturformel in Abbildung 3c) wird in der Haut gebildet, dann in der Leber zu 25-Hydroxy Vitamin D umgewandelt und anschließend in der Niere zu seiner aktiven Form 1,25-dihydroxy Vitamin D umgewandelt. Die aktivierenden Vitamin Ds binden im Blut an Vitamin-D-bindenden Proteine und fördern somit die Kalziumaufnahme und Knochenbildung im Körper. Bereits mit einer geringen Menge Cholecalciferol kann die osteogene Differenzierung der BM-MSCs induziert werden (Song *et al.*, 2011).

Die Kapazität der osteogenen Differenzierung von MSCs wird meistens durch die Messung der Alkalischen Phosphatase (AP) Aktivität und der Mineralisierung der extrazellulären Matrix charakterisiert (Kroeze *et al.*, 2011).

In unserem Labor haben wir kürzlich das Differenzierungspotenzial von BM-MSCs und Ad-MSCs mittels eines vergleichenden und optimierten Protokolls miteinander verglichen (Ehnert *et al.*, 2011). Die differenzierten Zellen aus beiden MSC-Typen zeigten eine vergleichbare osteogene Funktion. Die Mineralisierung in BM-MSCs war ca. 7 Tage früher zu beobachten als in Ad-MSCs. Allerdings ist die Verwendung von BM-MSCs durch die Tatsache eingeschränkt, dass sie viel langsamer als Ad-MSCs proliferieren und somit wäre eventuell die kritische Masse an benötigten BM-MSCs für den klinischen Einsatz teurer, als bei Ad-MSCs (Ehnert *et al.*, 2011).

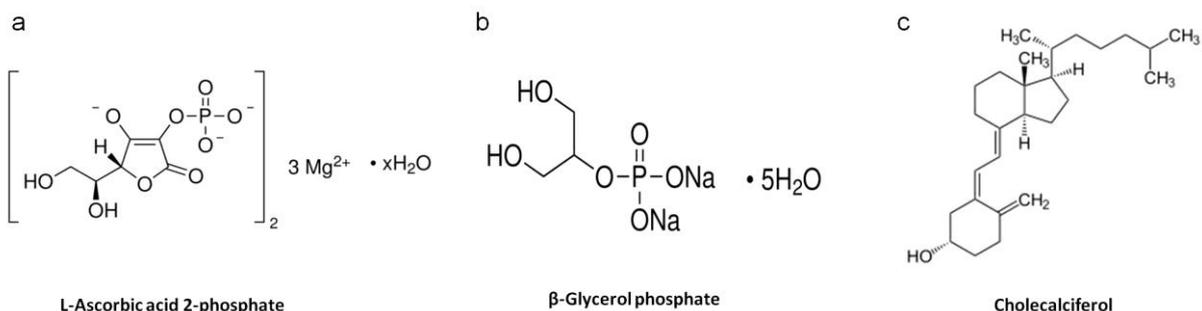


Abbildung 3: Chemische Strukturen der L-Ascorbinsäure, des β -Glycerolphosphats und des Cholecalciferols

1.3 Regulierung der Selbsterneuerung der Stammzellen

1.3.1 Stammzellproliferation

Die Proliferation von Stammzellen ist die Vermehrung der Zellzahl durch ständige Zellteilung. Eine Proliferation ohne Differenzierung gehört zu den wichtigsten Eigenschaften der Selbsterneuerung von Stammzellen. Die Regulation der Proliferation in undifferenzierten Stammzellen ist noch relativ unklar (Bethesda, 2009). ESCs können sich mehr als vier Monate kontinuierlich teilen, ohne zu differenzieren (Thomson *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2005). Die Proliferation von iPSCs ist jener der ESCs ähnlich, aber sie sind immer noch eingeschränkt wegen ihrer ungenügenden Reprogrammierungseffizienz (Wu *et al.*, 2009). Die Zellzahl von MSCs verdoppelt sich *in vitro* normalerweise innerhalb von 2 bis 4 Tagen. Die Verdopplungszeit hängt jedoch von den Kulturmedien und der Zelldichte ab (Izadpanah *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2006). In den späten Passagen von MSCs ist ihre Verdopplungszeit signifikant verlängert (Izadpanah *et al.*, 2006). In MSCs verkürzt sich die Telomerlänge nach mehreren Passagen (Estes *et al.*, 2006), aber ob die Telomerase-Aktivität aufrechterhalten bleibt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Katz *et al.*, 2005; Estes *et al.*, 2006; Izadpanah *et al.*, 2006), obwohl bereits beobachtet wurde, dass eine maligne Transformation bei kontinuierlichem Passagieren bei MSCs aufgetreten ist (Rubio *et al.*, 2005).

1.3.2 Selbsterneuerung der Stammzellen

Die Selbsterneuerung ist eine der wichtigsten Eigenschaften aller Stammzellen. Sie bezeichnet die Zellteilung bei gleichzeitiger Erhaltung des undifferenzierten Zustandes, d. h. die Tochterzellen behalten das multipotente oder sogar pluripotente Differenzierungspotenzial der Mutterzelle bei (He *et al.*, 2009). Diese Eigenschaft existiert in allen Stammzellen, aber dies bedeutet nicht, dass sie sich immer selbst vollständig erneuern können. Die Selbsterneuerung von Stammzellen wird von externen und internen Faktoren beeinflusst. Der Mechanismus unterliegt einer komplizierten Regulation, wobei das interaktive Netzwerk der Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 eine zentrale Rolle spielt. Diese drei Transkriptionsfaktoren fördern die Expression von Genen, die die Pluripotenz der ESCs nach der Zellteilung aufrechterhalten. (Zhang und Wang, 2008; He *et al.*, 2009). Epigenetische Regulatoren wie die DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und Nicht-codierende RNA Sequenzen spielen bei der Expression und Wirkweise dieser Transkriptionsfaktoren eine

entscheidende Rolle und bleiben bei der Selbsterneuerung der ESCs weitestgehend erhalten (Teven *et al.*, 2011; Mohamed Ariff *et al.*, 2012).

1.3.3 Pluripotenz und Pluripotenzmarker

Pluripotenz wurde als das Potenzial definiert, mit dem sich die Stammzellen in alle Zelltypen des Körpers ausdifferenzieren können (Tanaka *et al.*, 2002). Die Selbsterneuerung der pluripotenten Stammzellen wird von einem komplizierten Mechanismus reguliert. Die Transkriptionsfaktoren. NANOG, OCT4, SOX2 und LIN28A sind die Hauptfaktoren dieses Regulierungsnetzwerkes. OCT4 (Octamer-verbundener Transkriptionsfaktor 4, auch bekannt als POU domain transcription factor) ist entscheidend für die Pluripotenz der Embryoblasten und der ESCs in Kultur (Nichols *et al.*, 1998; Niwa *et al.*, 2000). SOX2 (ex determining region Y (SRY)- box 2) ist ebenfalls erforderlich für die Pluripotenzerhaltung der ESCs (Avilion *et al.*, 2003; Masui *et al.*, 2007). Das Homöoboxprotein Nanog ist ebenfalls sehr wichtig für die Pluripotenz der Embryoblasten (Mitsui *et al.*, 2003). Die Herunterregulierung von Nanog macht die ESCs anfällig für eine Spontandifferenzierung (Chambers *et al.*, 2003). Lin28 wird in undifferenzierten ESCs stark exprimiert. Dieses Protein ist durch seine inhibitorische Wirkung auf die microRNA let-7g an der Regulierung der Schlüsseltranskriptionsfaktoren Nanog, Oct4 und Sox2 (Marson *et al.*, 2008) beteiligt. Das LIN28 Protein reguliert das Wachstum, die Entwicklung und den Metabolismus von Stammzellen, wobei die miRNA-125b durch LIN28/let-7 die mesodermale Differenzierung der hESCs fördern (Wong *et al.*, 2012). Die vorliegenden Pluripotenzmarker sind vor ihrer Differenzierung in ESCs konstant exprimiert. Die unterschiedlichen Kombinationen solcher Marker sind entscheidend für die iPSCs-Generierung. Allerdings sind die Anwesenheit und die Funktion dieser Marker in adulten Stammzellen nach wie vor noch nicht vollständig aufgeklärt (Tsai *et al.*, 2012).

1.4 Mechanismen der Zellalterung

Die Alterung von Zellen ist ein komplexer Prozess, der alle Organe im Körper betrifft und mit zunehmender Lebensdauer zur Verschlechterung der Organfunktionen führt (Kirkwood, 2005). So verliert beispielweise die Haut mit zunehmendem Alter ihre Elastizität, die Knochen werden spröder, brechen daher leichter und heilen langsamer. Darüber hinaus ist ein Rückgang der Neurogenese und der Hämatopoese zu beobachten (Sharpless und DePinho, 2007). Dieser molekulare Alterungsprozess wurde anhand verschiedener Theorien erklärt. Eine dieser

Theorien zufolge spielen die Verkürzung der Telomere und die Aktivität der Telomerase die Hauptrolle in der so genannten replikativen Alterung (Armanios, 2009). Darüber hinaus ist die oncogen-induzierte Voralterung ein zusätzlicher Mechanismus, der durch den oxidativen Stress ausgelöst werden kann (Beausejour *et al.*, 2003). In den letzten Jahren ist die epigenetische Regulierung im Alterungsprozess immer detaillierter beschrieben worden (Berdasco und Esteller, 2012).

1.5 Überblick Epigenetik

Der epigenetische Mechanismus besteht hauptsächlich aus dem Umbau von Nukleosomen, der Histonmodifikation und der DNA-Methylierung. Die epigenetische Modifikation verfügt über zwei zentrale Aspekte. Erstens ist eine epigenetische Veränderung umkehrbar, d.h. sie verursacht keine genomischen Veränderungen von DNA-Sequenzen. Zweitens ist sie erblich, so dass die Tochterzellen über den gleichen Phänotypen wie die Elternzellen verfügen (Snykers *et al.*, 2009; Blomen und Boonstra, 2011). Die einzigartigen Eigenschaften einer Zelle werden durch die epigenetische Regulierung bestimmt. Der epigenetische Zustand wird während der zellulären Entwicklung dynamisch modifiziert, und somit werden die entsprechenden Gene nach bestimmten Aufgaben exprimiert oder reprimiert (Sasaki und Matsui, 2008; Blomen und Boonstra, 2011).

1.5.1 DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung handelt sich um eine kovalente Modifikation, die vorwiegend am Dinucleotid der CpG im Genom im Wirbeltier stattfindet. Die Methylierung setzt das Cytosin zu 5-Methylcytosin um. Dieser Prozess wird von den DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert (Sasaki und Matsui, 2008). Das 5-Methylcytosin (5mC) ist eine methylierte Struktur der DNA-Base Cytosin. Die Funktionen des 5mCs sind in den verschiedenen Organismen unterschiedlich. In Wirbeltieren findet die Methylierung meistens auf den CpG Dinucleotiden statt. Ungefähr 70 - 80% der CpG-Cytosine sind methyliert (Colot und Rossignol, 1999; Chahwan *et al.*, 2010).

Bei der DNA-Duplizierung wird auf den neugebildeten DNA-Strängen das gleiche Methylierungsmuster eingerichtet und somit wird die epigenetische Modifikation an die beiden Tochterzellen vererbt (Jaenisch und Bird, 2003). Eine bekannte Funktion der DNA-

Methylierung ist die Regulierung der Transkriptionsaktivität vieler Gene, welche eine entscheidende Rolle in der Stammzellenentwicklung und der Selbsterneuerung spielen (Berdasco und Esteller, 2011). Darüber hinaus wurde häufig berichtet, dass die DNA-Methylierung im Prozess der Zellalterung eine wichtige Rolle einnimmt (Wilson und Jones, 1983; Nilsson *et al.*, 2005).

1.5.2 DNA-Demethylierung

Die Methylierung der DNA wird durch die DNMTs durchgeführt. Allerdings ist es bisher noch unklar, wie die Methylgruppe vom Cytosin in der DNA entfernt wird. Bis heute wurde noch keine „DNA-Demethylase“ entdeckt, weshalb die DNA-Methylierung lange Zeit als ein stabiler und unumkehrbarer Prozess betrachtet (Ooi und Bestor, 2008) wurde. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass ein Prozess der DNA-Demethylierung in ESCs stattfinden kann. Dieser Prozess kann entweder passiv durch die Inhibierung der DNMTs induziert werden (Reik und Dean, 2001) oder durch die Aktivierung bestimmter Enzyme (Rai *et al.*, 2008; Popp *et al.*, 2010) ausgelöst werden.

1.5.3 DNA-Hydroxymethylierung

Das 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) ist eine DNA-Pyrimidin-Stickstoffbase, die bereits 1950 entdeckt worden ist (Wyatt und Cohen, 1952). Diese hat aber erst seit 2009 an Bedeutung gewonnen, weil es auch als Teil der DNA identifiziert wurde (Kriaucionis und Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009). Das 5hmC ist vom Pluripotenzstatus der ESCs abhängig. Es ist während der Embryonalentwicklung stark angereichert und verringert sich jedoch während der Differenzierung der ESCs. Außerdem ist die Expression von 5hmC bei der Entstehung von iPSCs (Ruzov *et al.*, 2011) zu beobachten. Über seine Bedeutung in MSCs ist bisher noch nichts bekannt. Die Umwandlung vom 5mC zu 5hmC wird von TET-Proteinen katalysiert, was anschließend zu einer aktiven Demethylierung des methylierten Cytosins (Ito *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2011) führt (Abbildung 4).

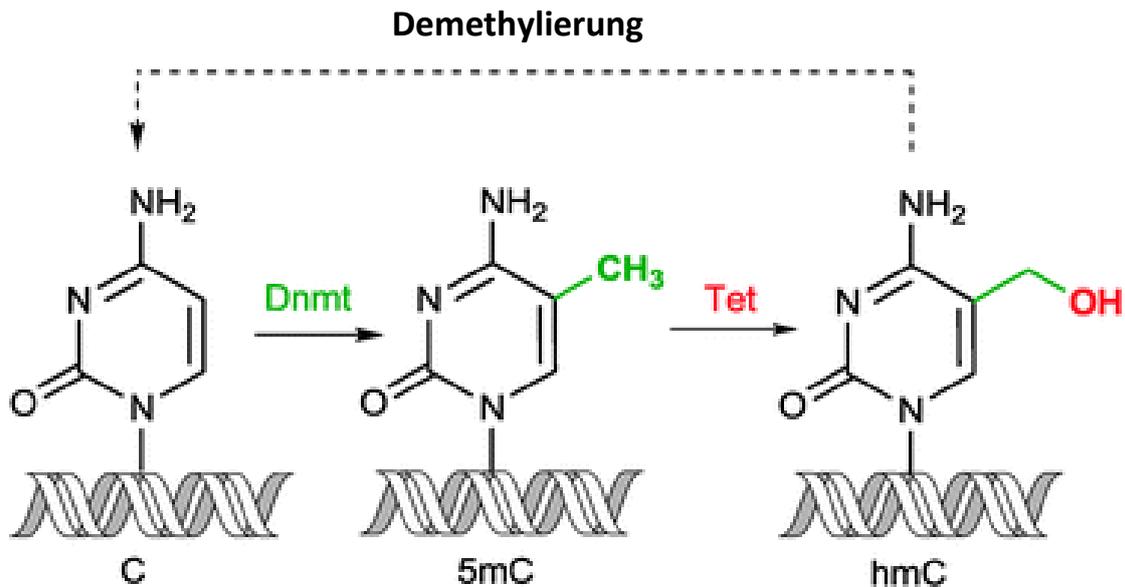


Abbildung 4: Ein Schaubild der Umwandlung der DNA-Methylierung durch Hydroxymethylierung zur Demethylierung (Kriukiene *et al.*, 2012)

1.5.3.1 Die TET-Proteine

Die TET-Proteinfamilie (Ten-Eleven Translocation family proteins) besteht aus drei Proteinen: TET 1, 2 und 3 (Abbildung 5). Sie sind Fe (II) und α -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase (Ito *et al.*, 2010). Der am besten charakterisierte Effekt der TET-Proteine ist ihre Katalysierung der Umwandlung von 5mC zu 5hmC. In ESCs wird diese Umwandlung hauptsächlich von TET1 gesteuert (Kriaucionis und Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009). Eine Cys-Proteindomäne existiert in allen drei TET-Proteinen für ihre katalytische Aktivität. TET1 und TET3 besitzen noch zusätzlich eine CXXC-Domäne (Abbildung 5), mit diesem Strukturelement bindet TET1 und TET3 an die DNA CpG-Insel und kann deshalb zu einer Erholung der DNA führen (Tahiliani *et al.*, 2009; Szwagierczak *et al.*, 2010). TET2 und TET3 sind in humanen ESCs relativ gering exprimiert (Ruzov *et al.*, 2011). Die Verteilung und die Wirkung der TET-Proteine sind in adulten Stammzellen weitestgehend unbekannt.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der drei TET-Proteine (Williams *et al.*, 2012)

1.5.4 Niedermolekulare Chemikalien für die epigenetische Reprogrammierung

Behandlung mit niedermolekularen Chemikalien hat viele Vorteile in der regenerativen Medizin gezeigt. Sie können die Zellen/Gewebe rationell erreichen, außerdem ist ihre Wirkweise präzise und umkehrbar (Li *et al.*, 2012). Mit Hilfe von Hochdurchsatz-Screenings wurden viele Chemikalien identifiziert, die die Selbsterneuerung und Pluripotenz von Stammzellen möglicherweise regulieren können (Ao *et al.*, 2011). Aus unseren Vorversuchen wurden 5-Azacytidin und BIX 01294 ausgewählt, da beide die DNA Methylierung reduziert haben.

1.5.5 Azacytidin

5-Azacytidin (AZA) ist ein Analogon von Cytosin, es wurde 1964 erstmals von Sorm und Vesely in Prag synthetisiert (Sorm *et al.*, 1964). Nach der Entdeckung seiner demethylierenden Aktivität in den 1980er Jahren erlebte diese Substanz eine Renaissance und wird seither vor allem bei Patienten mit MDS und AML eingesetzt (Daskalakis *et al.*, 2010). In Zellen wurde AZA über einen Nukleosid-spezifischen Transportmechanismus durch mehrere enzymatisch gesteuerte Phosphorylierungsschritte in das aktive Nukleotid 5-Aza-CTP umgewandelt. Nur 10 bis 20% des Azacytidins werden nach einer enzymatischen Umwandlung mittels einer Ribonukleotid-Reduktase in 5-Aza-dCTP, in die DNA integriert. Die eingefügten 5-Aza-dCTP-Nukleotide binden die DNMTs durch einen kovalenten Komplex, was anschließend zu einer Blockierung der aktiven DNA-Methyltransferase führen kann. Wenn dieses Cytosin-Analogon in einer entsprechend großen Anzahl vorhanden ist, entsteht zunächst eine hemimethylierte DNA. Durch weitere Zellteilungen kommt es zu einem reduzierten Zustand der DNA-Methylierung und letztendlich wird somit die Reaktivierung der Genexpression ausgelöst (Daskalakis *et al.*, 2010).

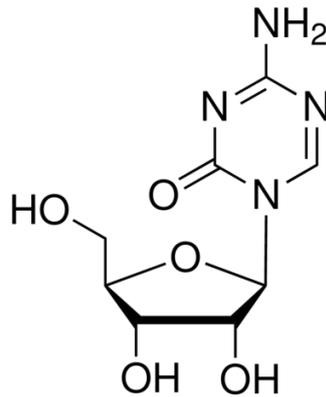


Abbildung 6: Die chemische Struktur von 5-Azacytidin

1.5.6 BIX 01294

BIX 01294 (BIX) ist ein Diazepin-Quinazolinamin-Derivat. Es hemmt selektiv die Histon-Lysin-Methyltransferase (HMT) und kann somit die HMT-Zielgene reprimieren, wodurch die G9a-HMT-abhängige Histon-3-Lysin 9 (H3K9me) Methylierung blockiert ist. (Kubicek *et al.*, 2007). BIX 01294 wurde in einigen Protokollen für die Induktion von iPSCs als Ersatz für das ektopische OCT4 und cMyc eingesetzt (Takahashi und Yamanaka, 2006; Shi *et al.*, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die hemmende Wirkung von BIX nicht nur auf dem Histon festgestellt wurde, sondern auch zusammen mit DNMTs die DNA-Methylierung beeinflusst (Chang *et al.*, 2009).

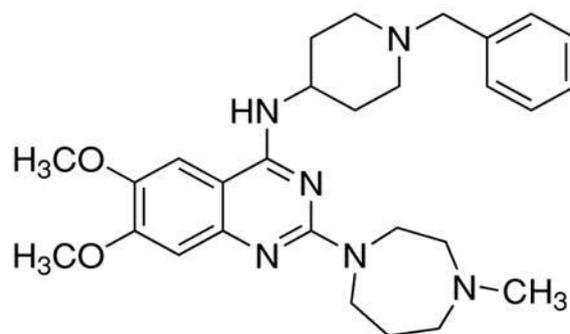


Abbildung 7: Die chemische Struktur von BIX 01294

1.6 Zielsetzung und prinzipieller Versuchsaufbau

1.6.1 Zielsetzung

Mit dem nachfolgenden Versuchsaufbau sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Wie unterscheiden sich die Stammzellfunktionen und der epigenetische Status junger und alter Ad-MSCs?
- Führt eine Behandlung der Ad-MSC mit AZA und BIX zu einer gesteigerten Selbsterneuerung dieser Zellen?
- Führt eine Behandlung der Ad-MSC mit AZA und BIX zu einer verbesserten osteogenen und hepatischen Differenzierung?
- Welche Einflüsse hat die Behandlung mit AZA und BIX auf die DNA-Hydroxymethylierung in jungen und alten Ad-MSCs?

1.6.2 Versuchsaufbau

Die isolierten Ad-MSCs wurden in Abhängigkeit vom Alter des Spenders in zwei Gruppen ‚jung‘ (< 45 Jahre) und ‚alt‘ (> 60 Jahre) eingeteilt. Danach wurden die Ad-MSCs beider Gruppen jeweils mit AZA (5 μ M, 20 μ M) und BIX (0,1 μ M, 0,2 μ M) für 24 h bzw. 48 h behandelt und der epigenetische Status validiert. Anschließend wurden osteogene und hepatische Differenzierungen durchgeführt, um zu sehen, ob eine epigenetische Behandlung zu einer Veränderung der Differenzierung führt.

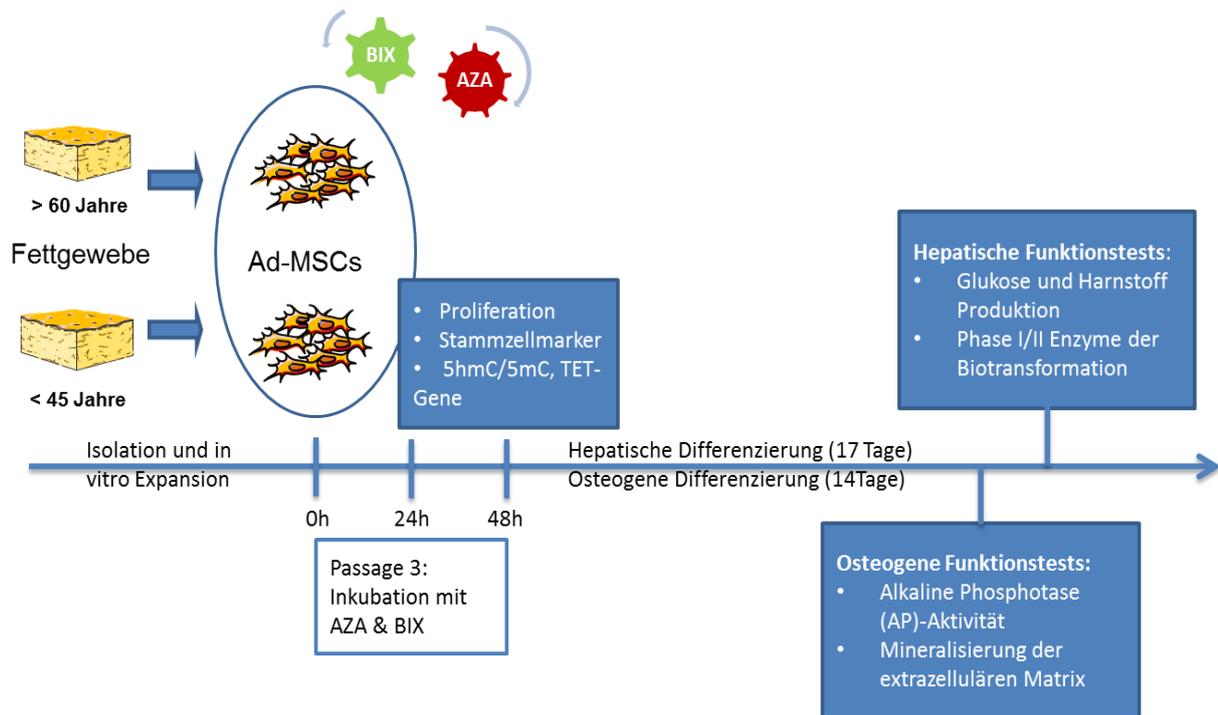


Abbildung 8: Der Versuchsaufbau dieses Projekts

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Humanes Fettgewebe und Spenderinformationen

Das Fettgewebe für die Isolation der Zellen, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München und in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen der Eberhard Karls Universität Tübingen von Patienten unterschiedlichen Alters entnommen. An beiden Standorten wurde eine Genehmigung durch die jeweilige Ethikkommission erteilt. Nach Aufklärung durch einen Arzt wurden die Gewebeprobe im Rahmen von Operationen des Hüftgelenks oder des Abdomens entnommen. Insgesamt wurden Ad-MSCs von 27 Spender (12 jungen: < 45 Jahre alt, 15 alten: > 60 Jahre alt) für diese Arbeit verwendet. Für jeden einzelnen Versuch wurden die Ad-MSCs mindestens aus 3 jungen und 3 alten Spender benutzt. Im Ergebnisteil wird die Spenderanzahl mit „N“, die technischen Replikate mit „n“ bezeichnet.

2.1.2 Verwendete biologische Materialien

Name	Producer
Mouse monoclonal anti- 5mCIgG1 Antikörper	Active Motif , CA, USA
Rabbit polyclonal anti-5hmC Antikörper	Active Motif , CA, USA
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG1 (γ 1) Antikörper	Invitrogen, NY, USA
Alexa Fluor® 555 donkey anti-goat IgG Antikörper	Invitrogen, NY, USA
Alexa Fluor® 555 Goat Anti-Rabbit IgG Antikörper	Invitrogen, NY, USA
DMEM-high glucose, 4,5 g/L	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Gibco, NY, USA
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich

Name	Producer
Fetal Bovine Serum (gold)	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
goat polyclonal anti-Ki 67 IgG	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
HEPES	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Insulin Transferin Natrium Selenite (ITS)	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
L-Glutamine	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin und Streptomycin	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Primer (Tabelle 3)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg Deutschland
Rekombinantes humanes EGF	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Rekombinantes humanes FGF-4	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Rekombinantes humanes HGF	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Trypsin / EDTA	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Name	Producer
2- Propanol, Isopropylalkohol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-(2-(N,N-diethylamino) ethyl) -7-hydroxy-4-methyl-Coumarin (AHMC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
3-(2-N,N-diethyl-N-methylaminoethyl) -7-methoxy-4-methylcoumarin (AMMC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
3-cyano-7-hydroxycoumarin (CHC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Name	Producer
4-Methylumbelliferone (4-MU)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4-Nitrophenol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (pNPP)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
7-Benzyloxy-4(trifluoromethyl)kumarin (BFC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
7-Ethoxy-4(trifluoromethyl)coumarin (EFC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
7-Ethoxycoumarin (7EC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
7-Hydroxy-4(trifluoromethyl)coumarin (HFC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
7-Hydroxycoumarin (HC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
7-Methoxy-4(trifluoromethyl)coumarin (MFC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Acetatsäure, purum = 99,0%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alamar Blue Reagenz	Biozol, Eching, Deutschland
Alizarinrot S (C.I.58005)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BIX 01294	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Brij-35	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cetylpyridiniumchlorid- Monohydrat, 98%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform, > 99% z. Synthese	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cholecalciferol, 99%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Coumarin, purum, $\geq 97,0$ %, fluorescence indicator (C)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cyanblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Axon, Kaiserslautern, Deutschland

Name	Producer
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dibenzylfluoresceine (DBF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dicumarol (Dic)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol, > 99,8% vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluoresceine, standard Fluka, for fluorescence (Fl)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fluoromount-GTM	SouthernBiotech, AL, USA
Formaldehydlösung 37% p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Kollagen	Eigenprodukt aus Rattenschwänzen
Kollagenase II	Biochrome, Berlin, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Monochlorobimane (MCB)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
N- (1-naphthyl)ethylenediamine-dihydrochloride	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
N, N-Dimethylformamid (99,9%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat, wasserfrei (99,5% Ph. Eur.)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Name	Producer
Natriumthiosulfat, wasserfrei, 99% p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nicotinamid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
o-Phthalaldehyde	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
peqGOLD® Trifast	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Probenecid (Pro)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Resorufin ethyl ether (7ER)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Resorufin sodium salt (Res)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Salicylamide (Sal)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Silbernitrat 99%, Ph.Eur.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sulforhodamin B Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau 0,5%	Biochrome, Berlin, Deutschland
Tween 20, Ph. Eur.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Glycerolphosphat-dinatriumsalz hydrat	AppliChem, Gatersleben, Deutschland

2.1.4 Verwendete Kits

Name	Hersteller
DNase I, RNase-free	Fermantas, Ontario, Canada
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermantas, Ontario, Canada
DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR Kit	Finnzym, Vantaa, Finland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Multiwellplatten	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Einmal-Injektionskanülen Sterican®	BBraun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen Inject®, 2-teilig	BBraun, Melsungen, Deutschland
Einfrierröhrchen (2 ml) für Zellen	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Pasteurpipetten 150mm + 230mm, glas	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße Multiply® -Strip	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten 2,5; 5; 10; 25 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plastikküvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 15, 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter 0,20 µm	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Skalpelle, No 10	Feather, Osaka, Japan
Zellschaber, 20 mm Lamelle	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturschalen 10 cm ²	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturflaschen, steril 75 und 175 cm ²	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich

2.1.6 Verwendete Geräte

Name	Hersteller
ABI StepOnePlus Real Time PCR instrument	Applied Biosystems Inc., Foster City, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
EVOS fl Fluoreszenzmikroskop	AMG, WA USA
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, München, Deutschland
NanoDrop®	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Inkubator HERAccl 150	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Intas Gel iX Image Instrument	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Sterilwerkbank, MSC Advantage	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Video-Bild-System Vi-Cell XR	Beckman Coulter, USA
Wasserbad inkl. Thermostat	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.7 Software

Name	Hersteller
EndNote X5	Japone/ Team LnDL, Thomas Reuters, San Francisco, USA
FlowJo	Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA
Graph Pad Prism 5.04	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageJ 1.45s	National Institute of Health, USA
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
OMEGA Software für FLUOstar, V1.10	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung und Zellkultur der Ad-MSCs

Zur Isolation der Ad-MSCs wurde Fettgewebe mittels eines Skalpells in ca. 3×3 Millimeter große Stücke zerkleinert. Zur Entfernung der hämatopoetischen Zellen wurden die Gewebestücke dreimal mit 40 ml PBS gewaschen. Dafür wurde das zerkleinerte Gewebe in 40 ml PBS suspendiert, bei 430 g während 10 Min. ohne Bremse zentrifugiert und danach die untere wässrige Phase abgesaugt. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte der Verdau des Gewebes mittels einer sterilen 0,075% (w/w) Kollagenase Type II-Lösung in PBS bei 37°C für 30 bis 60 Min. bis eine Emulsion entstand. Zur Beendigung des Verdau wurde serumhaltiges DMEM (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS) verwendet. Nach einer weiteren Zentrifugierung für 10 Min. bei 600 x g wurde der Überstand entfernt und danach das Zellpellet in PBS resuspendiert und durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) filtriert. Nach der Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Trypanblau-Methode wurden die Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (1,8 x 10³ Zellen/cm²). Der erste Mediumwechsel erfolgte 24 h nach der Isolation. Danach wurde das Medium regelmäßig alle drei bis vier Tage gewechselt. Sobald eine Konfluenz von 80-90% erreicht wurde, wurden die Zellen passagiert.

2.2.2 Passagierung und Ausplattieren der Zellen für Experimente

Die Ad-MSCs wurden in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop analysiert und ihre Dichte in Prozent der von ihnen bedeckten Fläche geschätzt. Bei einer Dichte von mehr als 80% wurden die Zellen passagiert oder für Experimente auf Kollagen-beschichteten Platten ausgesät. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer lichtmikroskopischen Kontrolle der abgelösten Zellen wurde das Ad-MSC-Kulturmedium zugesetzt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde für 10 Min bei 600 x g zentrifugiert; die Zellen gezählt und auf die vorbereiteten Flaschen beziehungsweise Platten bei einer Dichte von 10 x 10⁴ Zellen ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.3 Bestimmung spezifischer Oberflächenmarker mittels FACS -Analyse

Die humanen Ad-MSCs wurden von Passage eins bis Passage drei in 175 cm² Kulturflaschen kultiviert. Sobald eine Konfluenz von 80 bis 90% erreicht wurde, wurden die Zellen mittels

Trypsin vom Plastik abgelöst und eine Zentrifugierung bei 650 x g für 5 Min. mit anschließender Resuspension in PBS durchgeführt. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit den folgenden monoklonalen Antikörpern markiert: Mouse anti-human CD 14: FITC, Mouse anti-human CD 45: FITC (Biozol, Eching, Deutschland), Mouse anti-human CD 105: PE (Southern Biotech, Birmingham, USA) und Mouse anti-human CD 90: APC (BioLegend, San Diego, USA). Die Erfassung der markierten Zellen erfolgte mittels des FACS Canto II. Falls vom Hersteller keine anders lautenden Angaben für bestimmte Antikörper gemacht wurden, wurden alle Antikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/10⁶ Zellen in einem Volumen von 100 µl verwendet. Für jedes Experiment wurde eine Isotypen-Kontrolle durchgeführt. Die Auswertung der erfassten Daten erfolgte mit Hilfe der FlowJo Software.

2.2.4 Inkubation von Ad-MSCs mit AZA und BIX

In Passage 3 wurden die Ad-MSCs mit AZA (5 µM, 20 µM) und BIX (0,1 µM, 0,2 µM) für 24 h und 48 h im Kulturmedium (DMEM, 10 % FCS) inkubiert (5 % CO₂).

2.2.5 Immunozytofluoreszenz-Färbung für Ki 67

Das Ki 67 Protein wird ausschließlich in proliferierenden Zellkernen exprimiert, und kann während aller Phasen des Zellzyklus, außer der G₀-Phase (Ruhestand) (Gerdes *et al.*, 1983) detektiert werden. Wegen des engen Zusammenhangs zwischen der Zellproliferation und der Ki 67-Expression ist dieses Protein ein spezifischer Marker für das Wachstum einer bestimmten Zellpopulation (Scholzen und Gerdes, 2000). Die Ki 67-Expression wird meistens durch Immunfärbung angezeigt. Mit spezifischen Antikörpern gegen das Ki 67 Antigen und den fluoreszenten sekundären Antikörper werden Ki 67-positive Zellen markiert und quantifiziert.

- Fixieren von Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA)

Die Ad-MSCs von Passage 2 wurden auf 12 mm Deckgläser in 24-Well-Platen zu Passage 3 ausplattiert, 2 × 10⁴ Zellen/Well. Die Deckgläser wurden zuvor mit Kollagen beschichtet. Vor der Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 600 µl 4% PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und danach dreimal mit PBS gewaschen, um den Rest des PFA zu entfernen.

- Permeabilisierung: 600 µl 0,5% Triton pro Well, 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert
- Blockierung der unspezifischen Bindung von IgG: dreimal mit 1 ml PBS gewaschen, 10%

FCS in PBS, 600 µl pro Well, eine Stunde bei RT inkubiert

- Primärer Antikörper:
Ki 67: goat polyclonal IgG (Santa Cruz) 1:50
in PBS mit 1% FCS und 0,1% Tween verdünnt, 400 µl pro Well, zwei Stunden bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen
- Sekundärer Antikörper:
Donkey anti-goat Alexa 555 (Invitrogen) 1:200
in PBS mit 1% FCS und 0,1% Tween verdünnt, 400 µl pro Well, präzise eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert, und danach dreimal mit PBS gewaschen
- Hoechst-Färbung: Hoechst-Farbstoff (zur Anfärbung von Nuklei) mit PBS auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt; 400 µl pro Ansatz verwendet und bei RT für 20 Min. inkubiert. Schließlich wird noch zweimal mit PBS gewaschen.

2.2.6 Protokoll für 5-Methylcytosin (5mC) und 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC)

- Fixieren von Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA): siehe 2.2.5 gleichfalls wie Immunofluoreszenzfärbung der Ki 67
- Permeabilisierung: 600 µl 0,5% Triton pro Well, 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert
- Denaturierung der dsDNA: Entfernung von Triton, gefolgt von der Zugabe von 600 µl 4N HCl pro Well für 15 Min., bei RT inkubiert, um die dsDNA zu denaturieren
- Blockierung der unspezifischen Bindung von IgG: dreimal mit 1 ml PBS gewaschen, 600 µl 10% FCS in PBS pro Well, und eine Stunde bei RT inkubiert
- Primäre Antikörper:
5-hmC: Rabbit polyclonal (Active Motif) Verdünnung 1:1000
5-mC: Mouse monoclonal IgG1 (Active Motif) Verdünnung 1:1000
in PBS mit 1% FCS und 0,1% Tween) verdünnt, 400 µl pro Well für zwei Stunden bei RT inkubiert, plus dreimaliges Waschen mit PBS
- Sekundäre Antikörper:
Goat anti-rabbit Alexa 555 conjugated (Invitrogen) Verdünnung 1:200
Goat anti-mouse IgG1 Alexa 488 conjugated (Invitrogen) Verdünnung 1:200
in PBS mit 1% FCS und 0,1% Tween) verdünnt, 400 µl pro Well für eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubieren, plus dreimaliges Waschen mit PBS

- Hoechst-Färbung: Hoechst-Farbstoff in PBS auf 2 µg/ml verdünnt, 400 µl pro Well, bei RT für 20 Min. inkubiert, plus zweimaliges Waschen mit PBS

2.2.7 Zellfixierung, Bilderfassung und Auswertung

2.2.7.1 Befestigung der gefärbten Proben

Die Kulturüberstände wurden aus der 48-Well Platen entnommen, kurz unter Leitungswasser gespült und dann bei RT getrocknet, anschließend wurden sie auf die Glasobjektträger übertragen und mit dem Mounting-Medium (Fluoromount G) befestigt. Die Proben wurden dann im Dunkeln bei RT bis zur Mikroskopie aufbewahrt.

2.2.7.2 Bilderfassung der Immunfärbung

Das Bild von jeder Probe wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop, („EVOS fl“ *Advance Microscope Group*) mit identischer Aufnahmezeit und Belichtungsdauer aufgenommen, und als nicht-komprimierte TIFF-Datei (1360 x 1024 Pixel) gespeichert. Für jede Probe wurden vier willkürlich ausgewählte Gebiete fotografiert.

2.2.7.3 Auswertung der Immunfärbung

Die Bilder wurden mit der Software ImageJ 1.45 analysiert. Alle Bilder wurden in 8 Bit-Dateien umgewandelt. Der Kontrast wurde bei allen Bildern in gleichem Maße verstärkt. Die Hintergrundstörung (noise) wurde mit „Despeckle“, „Remove Outliers“ und „Median Filter“ gleichmäßig reduziert.

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität und die Bestimmung der Zellzahl wurden mit dem folgenden Algorithmus in Macros (Tabelle 1) durchgeführt. Für die verschiedenen Farbkanäle wurde ein optimaler Thresholdbereich festgelegt. Die Intensität der Fluoreszenz jedes Bildes wurde als „Integrated Density (IntDen)“ angezeigt. Die Zellzahl wurde als „Count“ bezeichnet. Der Anteil positiver Zellen (Fluoreszenzintensität) wurde mit Hilfe der Hoechst-Färbung quantifiziert.

```

run("8-bit");
setMinAndMax(40, 200);
call("ij.ImagePlus.setDefault16bitRange", 0);
run("Despeckle");
run("Remove Outliers...", "radius=2 threshold=50 which=Bright");
run("Median...", "radius=5");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(20, 254);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area center integrated redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=400-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display
clear summarize record add in_situ");

```

Tabelle 1: Das selbstgeschriebene Macro/Programm des Quantifikationsalgorithmus für die Immunfluoreszenz-Intensität positiver Zellen

2.2.8 Ribonukleinsäure (RNA) und DNase I-Verdauung

Für die reverse Transkription und für die Real-Time PCR wurde die Gesamt-RNA mittels peqGOLD[®] Trifast (Peqlab) aus den Zellen isoliert. Zu diesem Zweck wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen in 1 ml peqGOLD[®] TriFast resuspendiert und bei RT für 5 Minuten lysiert. Nach der Lyse wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben für 15 Sekunden gemischt und zur Trennung der Phasen für 5 Min. bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugierung ($12 \times 10^4 \times g$, 10 Min. bei 4°C) und der vollständigen Phasentrennung wurde die oberste, wässrige Phase zur weiteren RNA-Isolation vorsichtig abgenommen. Zur Präzipitation der RNA wurde die wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt, für 10 Minuten bei RT inkubiert und dann zentrifugiert ($12 \times 10^4 \times g$, 10 Min., bei 4°C). Das RNA-Pellet wurde in 75%igem Ethanol zweimal gewaschen ($12 \times 10^4 \times g$, 5 Min., bei 4°C). Die Ethanol-Reste wurden während der Lufttrocknung (5-10 Min. bei RT) des RNA-Pellets entfernt und die RNA in 50 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Um die genomische DNA zu entfernen, wurde die RNA mit DNase I (1 U/µg RNA), 10 x Reaktionspuffer mit MgCl₂ (1 µl in 10 µl) und Nuklease-freiem Wasser (angesetzt bis zu 10 µl) während 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde sie mit 50 mM EDTA (1 µl /10 µl Reaktion) während 10 Min. bei 65°C inkubiert, um die DNase I-Verdauung zu blockieren.

2.2.9 Herstellung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Die cDNA wurde nach dem Protokoll des *First Strand cDNA Synthesis Kits* von Fermentas hergestellt. Die verdaute RNA wurde zuerst mit Oligo(dT)18 Primer (1 µl in 10 µl), Random Hexamer Primer (1 µl in 10 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt und bei 65°C für 5 Min. inkubiert, dann auf Eis gekühlt, und mit dem 5× Reaktionspuffer (4 µl in 20 µl) gelöst; RiboLock RNase Inhibitor (1 U in 20 µl), 10 mM dNTP Mix (2 µl in 20 µl) und M-MuLV Reverse Transcriptase (1 U in 20 µl) zuerst für 5 Min. bei 25°C, dann für 60 Min. bei 37 °C inkubiert. Schließlich erfolgte noch eine zusätzlich Inkubation für 5 Min. bei 70°C, um die cDNA-Synthese zu beenden.

RT minus Kontrolle (RT-): wurde parallel eine ‚RT‘-Kontrollreaktion von jeder RNA angesetzt und nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Das Rezept für die RT minus Kontrolle enthält alle Komponenten mit Ausnahme der M-MuLV Reverse Transcriptase, die durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde. Ein positives PCR-Ergebnis der RT minus Kontrolle zeigt eine Kontamination durch genomische DNA an.

2.2.10 Bestimmung der Genexpressionen durch Quantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde mit dem Step One Plus[®] Real-Time PCR-System durchgeführt. Der Reaktionsmix wurde nach der Anleitung des Herstellers des SYBr Green Kits angesetzt (*DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR Kit*, Finnzym, Finnland) (Tabelle 2). Das Laufprogramm für die RT-PCR und für die entsprechende Schmelzkurve wurde nach der folgenden Tabelle erstellt (Tabelle 4). Die Ergebnisse wurden mittels der $\Delta\Delta C_T$ Methode ausgewertet (Pfaffl, 2001; Fleige *et al.*, 2006).

Substanzen	Volume in 20 µl reaction [µl]
Template cDNA	V_1 (maximal 200 ng in 20 µl)
Primer Forward	V_2 (Konzentration 200-500 nM)
Primer Reverse	V_3 (Konzentration 200-500 nM)
2x Master Mix	10
50 × ROX passive reference dye	0.4
Nukleasefreies Wasser	$20 - (V_1 + V_2 + V_3 + 10 + 0,4)$ µl

Tabelle 2: Reaktionsrezept der RT-PCR

	Forward (5'→3') Sequenz (Länge)	Reverse (5'→3') Sequenz (Länge)
TET1	GTAAATGGCCCAAGTCAGA (20)	CAGCTTCTGGGACATTAGCA (20)
TET2	GAGACGCTGAGGAAATACGG (20)	TGGTGCCATAAGAGTGGACA (20)
TET3	CAGAACGCTGTGATCGTCAT (20)	AACTTGCGAGGTGTCTTGCT (20)
NANOG	AACTGGCCGAAGAATAGCAA (20)	ACTGGATGTTCTGGGTCTGG (20)
OCT4	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA (20)	GCCTCAAATCCTCTCGTTG (20)
LIN28A	CCGAACCCCATGCGCACGTT(20)	TTTGCAGGTGGCTGCGCCAAG(21)
SOX2	CATGCACCGCTACGACG (17)	CGGACTTGACCACCGAAC (18)
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC (20)	GGCATGGACTGTGGTCATGAG (21)

Tabelle 3: Die verwendeten Primersequenzen

Stufe	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Holdings- Stufe	Initiale Denaturierung	95°C	7 Min	1
Zyklus-Stufe	Denaturierung	95°C	10 s	40 Zyklen
	„Annealing“/„Extension“	59°C*	30 s	
Stufe der Schmelzkurve	Schritt 1	95°C	5 s	1
	Schritt 2	65°C	5 s	1
	Schritt 3	95°C	15 s	1
		„Temperature increment“	0,5°C	-

Tabelle 4: Laufprogramm: für die RT-PCR

* Die Annealingtemperatur wurde für jeden Primer einzeln optimiert.

2.2.11 Hepatische Differenzierung der Ad-MSCs

Die isolierten Ad-MSCs wurden ab Passage 3 auf Kollagen beschichtete Platten mit einer Dichte von 15×10^4 Zellen/cm² ausplattiert und in DMEM-Medium (2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) mit 10% igem FCS bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Ad-MSCs von jungen und alten Spendern wurden mit oder ohne 20 µM AZA für 24 h inkubiert. Die Konzentration und Inkubationsdauer des AZA wurde in Vorversuchen optimiert. Ad-MSCs wurden mittels eines dreiteiligen Protokolls (Seeliger *et al.*, 2012) (Tabelle 5) in Hepatozyten-ähnliche Zellen differenziert. Zur Bewertung des hepatischen Phänotyps wurde die Produktion von Harnstoff und Glukose, sowie die Phase I / II-Enzymaktivität am Ende der hepatischen Differenzierung (18. Tag) getestet.

24 h	DMEM	10% FCS
	1% Penicillin/Streptomycin	AZA (20 µM)
3 Tage	DMEM	1% FCS
	1% Penicillin/ Streptomycin	20 ng/ml hEGF
7 Tage	DMEM	1% FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin	1% ITS
	1 µM Dexamethasone	5 mM Nicotinamid
	3 ng/ml hFGF-4	
7 Tage	DMEM	1% FCS
	1 % Penicillin/Streptomycin	1% ITS
	1 µM Dexamethasone	5 mM Nicotinamid
	20 ng/ml hHGF	

Tabelle 5: Übersicht über die hepatische Differenzierung

2.2.12 Messung der Glukoseproduktion

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Reaktionspuffer (1 mM MgCl₂ und 1 mM Na-Pyruvat in PBS, steril filtriert) und 10 mM L-Laktat im Reaktionspuffer für 24 h bei 37°C inkubiert. Durch den Einsatz des Laktats wurde die Gluconeogenesekapazität der Zellen getestet. Schließlich wurden 100 µl des Überstandes von jeder Probe mit 150 µl GLOX-Lösung (250 mM TRIS, 0,2 mM EDTA, 0,04 % Glukoseoxidase, 0,007 % Peroxidase, 0,01 % o-Dianisidin, pH = 8.0) vermischt. Diese Mischung wurde dann über 2 h bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 420 nm gemessen.

2.2.13 Messung der Harnstoffproduktion

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 24 h mit Reaktionspuffer (PBS, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na-Pyruvat) inkubiert. Für die Stimulation wurde parallel mit 0,3 M NH₄Cl in Reaktionspuffer oder mit 0,3 M NH₄Cl und 0,1 M Ornithin im Reaktionspuffer inkubiert. Nach

Ablauf der Inkubation von 24 Stunden wurden 80 µl Überstand mit 60 µl o-Phthaldehyd-Lösung (1,5 mM o-Phthaldehyd, 4 mM Brij-35, 0,75 M H₂SO₄) und 60 µl NED-Reagenz (2,3 mM N-(1-naphthyl)ethylenediamin-dihydrochlorid, 0,08 M Borsäure, 4 mM Brij-35, 2,25 M H₂SO₄) für 2 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit reagierte der zu detektierende Harnstoff mit dem o-Phthaldehyd zu 1,3-Dihydroxyisoindolin welches mit der NED-Reagenz durch eine Substitutionsreaktion zu einem aromatischen, intensiv gefärbten Produkt führte. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 505 nm. Die Konzentration wurde mittels einer Standardkurve ermittelt.

2.2.14 Messung der Phase I / II Enzymaktivität

Die verschiedenen Phase I / II Enzyme wurden mittels einer modifizierten Fluoreszenz-basierten Methode gemessen (Donato, 2004). Dabei wurden den zu untersuchenden Enzymen ein bestimmtes Substrat zugeordnet (Tabelle 6), welches durch die Inkubation mit den Zellen in ein fluoreszierendes Stoffwechselprodukt umgesetzt wurde. Dieses Produkt wurde schließlich fluometrisch quantifiziert.

Phase I Enzymaktivität			Phase II Enzymaktivität		
Reaktion	Substrat	Substrat-konz.	Metabolit (Phase I) Substrat (Phase II)	Substrat-konz.	Anregung/Emission
CYP1A1/2	7-ethoxy-kumarin	25 µM	7-hydroxykumarin	50 µM	355 nm / 460 nm
CYP2A6	Kumarin	50 µM			
CYP2D6	AMMC	10 µM	AHMC	5 µM	
			CHC	12.5 µM	
			Monochlorobimane	50 µM	
			4-methylumbelliferon	12.5 µM	
CYP2B6	EFC	30 µM	HFC	25 µM	355 nm / 520 nm
CYP2E1	MFC	5 µM			
CYP3A4	BFC	5 µM			
CYP2C8/9	Dibenzyl-fluoreszein	12,5 µM	Fluoreszein	0,25 µM	485 nm / 520 nm
CYP1/2A1	7-ethoxy-resorufin	7,5 µM	Resorufin	1 µM	544 nm / 590 nm

Tabelle 6: Untersuchte Phase I/II Enzyme und die verwendeten Substrate

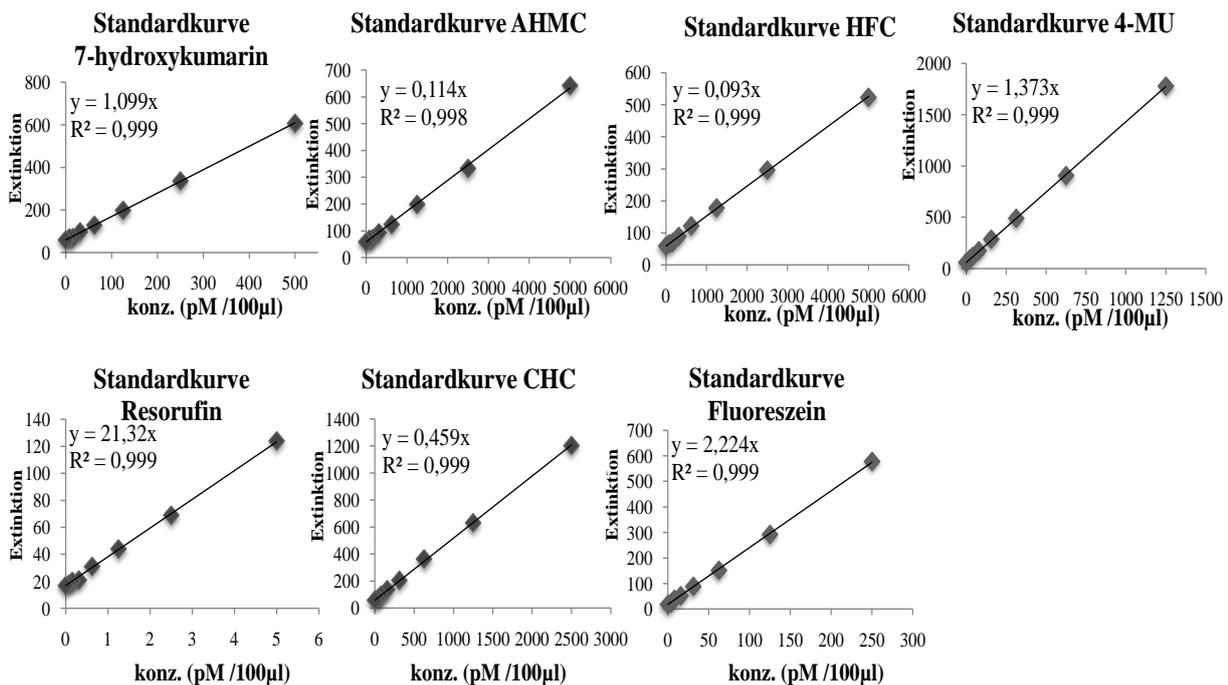


Abbildung 9: Standardkurven der untersuchten enzymatischen Produkte

Die Stocklösungen der Substrate wurden im DMEM-Medium bis zur vorgegebenen Endkonzentration gemischt und die Substrate der Phase I mit der Zugabe von 15 µl/ml Salicylamide Puffer (100 µM in DMSO), 10 µl/ml Probenecid Puffer (200 mM in DMSO) und 1 µl/ml Dicumarol Puffer (10 mM in DMSO) am spontanen Zerfall gehindert. Vor der Zugabe der Substratlösungen wurden für jedes zu untersuchende Enzym 2 Wells mit Fixationspuffer (0,5% Triton in Methanol) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit der jeweiligen Substratlösung inkubiert und über 120 Minuten fluorimetrisch gemessen. Diese Werte wurden mittels der Standardkurven quantifiziert (Abbildung 9). Die umgesetzte Substratmenge wurde mit dem Gesamtprotein, das mittels Sulforhodamin B Färbung erfasst wurde, berechnet.

2.2.15 Sulforhodamin B-Färbung

Ad-MSCs wurden auf 96-Well-Platten mit 99% Ethanol für 60 Minuten bei -20°C fixiert und anschließend mit der SRB-Lösung (0,4% SRB in 1% Essigsäure) für 30 Min. bei RT auf einem Schwenkinkubator inkubiert. Dabei bindet sich das SRB an die protonierten Aminosäuren der Zelloberflächen. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen viermal mit einer 1%igen

Essigsäurelösung gewaschen. Das gebundene SRB wurde danach mittels 100 µl Tris-Puffer (10 mM, pH = 10,5) pro Well gelöst und die Menge des nun wieder gelösten SRB im Tris-Puffer photometrisch bestimmt (Voigt, 2005). Dazu wurde die Absorption bei 565 nm und 690 nm (Hintergrund) gemessen und die beiden Werte voneinander subtrahiert.

2.2.16 Osteogene Differenzierung der Ad-MSCs

Junge und alte Ad-MSCs wurden zu Passage 3 jeweils 10000 Zellen/cm² auf Zellkulturplatten ausplattiert. Danach wurden die Zellen mit 5 µM AZA und 0,2 µM BIX und rein Kulturmedium für 48h inkubiert (Die Konzentration und Zeit der Behandlung wurden in Vorversuchen ausgewählt), dann für 14 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Das osteogene Differenzierungsmedium enthält DMEM 4,5 g/l Glukose, 0,5%iges FCS, 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µM, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 10 mM β-Glycerolphosphat, 25 mM HEPES, 1,5 mM CaCl₂ und 5 µM Cholecalciferol (Ehnert *et al.*, 2011). Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Anschließend wurde das osteogene Potential dieser Osteoblasten-ähnlichen Zellen (Osteoblast-like Cells, OLCs), mittels AP-Aktivität, Alizarin Rot-Färbung und von Kossa-Färbung validiert.

2.2.17 Bestimmung der Alkalinen Phosphatasen (AP)-Aktivität

Die AP-Aktivität wird durch die Reaktion der Zellen mit *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) getestet. Durch diese Reaktion wird ein gelbes wasserlösliches Produkt des pNPPs erzeugt (Abbildung 10), das bei einer Wellenlänge von 405 nm messbar ist (Snyder *et al.*, 1972; Bourguet *et al.*, 2003).

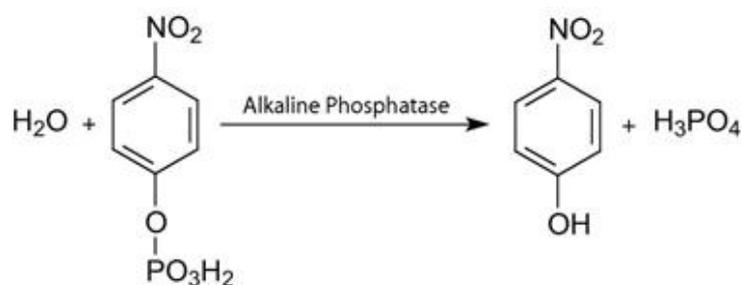


Abbildung 10: Alkaline Phosphatase katalysiert die Umwandlung von pNPP zu p-Nitrophenol

Die Zellen wurden bis zur AP-Messung in 96-Well-Platten kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde jedes Well mit 100 μ l AP-Substratlösung: 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (pNpp) 1,3 mg/ml in AP-Puffer (50 mM Glyzine, und 100 mM Tris-Base, 1 mM $MgCl_2$ in ddH_2O , PH = 10,5), bei 37°C für 120 Min. inkubiert. Gleichzeitig wurden Triplikate der AP-Substratlösung in einer leeren 96-Well-Platte als Hintergrund inkubiert. Danach wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Nach der Messung wurden die Zellen mit 99% Ethanol fixiert und mittels SRB-Färbung wurde die relative Proteinmenge quantifiziert.

Die Standardkurve wurde mittels einer Serienverdünnung von 4-Nitrophenol-Lösung (pNp) erstellt. Durch diese Verdünnung wurde die AP-Aktivität der Zellen in die entsprechende pNp-Produktion umgerechnet, und schließlich mit der Inkubationszeit und der Proteinmenge normalisiert (Abbildung 11).

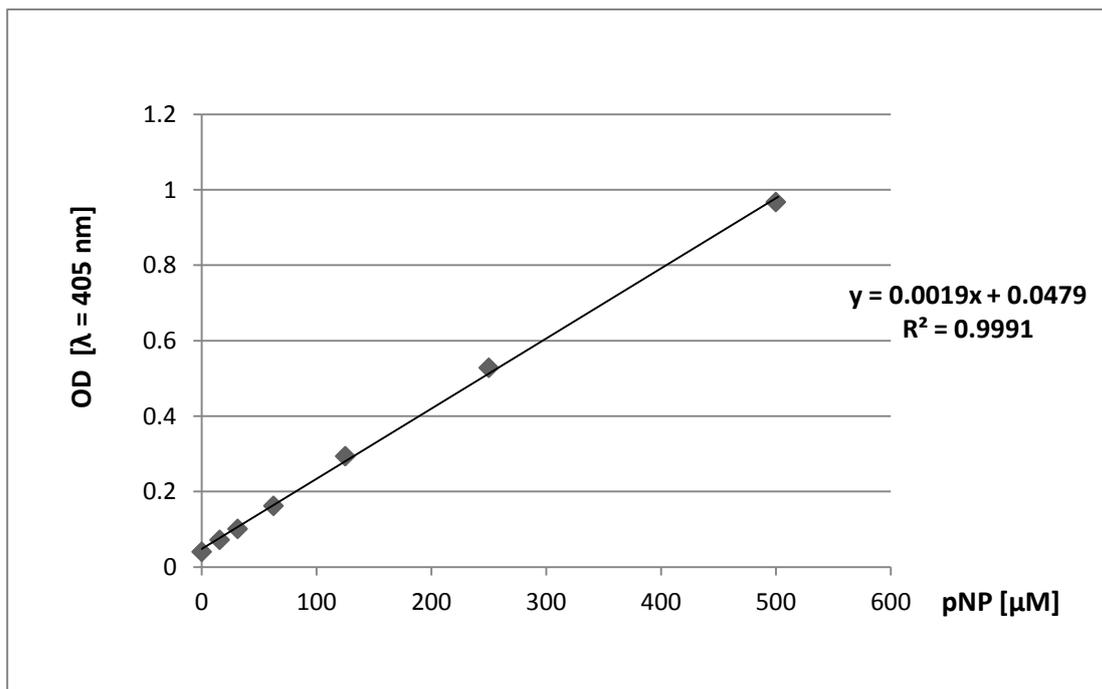


Abbildung 11: Standardkurve der AP-Aktivität

2.2.18 Von Kossa-Färbung

Die Zellen wurden einmal mit Leitungswasser gewaschen und danach mit 99% Ethanol für eine Stunde bei RT fixiert. Der Ethanol wurde abgenommen und dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Die Zellen wurden mit 3% Silbernitratlösung bedeckt, für 30 Min. bei RT auf einem

Schwenkinkubator inkubiert, und schließlich dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit der Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung bedeckt, für 2 Min. inkubiert und sofort danach dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Nach diesem Schritt wurde die Mineralisierung der Zellmatrix dunkelbraun bis schwarz gefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit der Natriumthiosulfat-Lösung für 5 Min. bei RT inkubiert, um das restliche Silberbitrat zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen dreimal mit Leitungswasser gewaschen und bei RT getrocknet.

2.2.19 Alizarin Rot-Färbung

Die Zellen wurden einmal mit Leitungswasser gewaschen, dann mit 99% Ethanol für eine Stunde bei 20°C fixiert. Danach wurde das Ethanol abgenommen und die Zellen dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Als nächstes wurden sie mit Alizarin-Rot-Lösung (0,5% Alizarin Rot S in ddH₂O gelöst, PH = 4) bei RT inkubiert. Nach 10 Min. Inkubation wurden die Zellen vorsichtig viermal mit Leitungswasser gewaschen, und bei RT getrocknet. Die gefärbten Zellen wurden zuerst unter dem Mikroskop fotografiert. Zur Quantifizierung wurde die Färbung mit 10% Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (10 g Cetylpyridiniumchlorid in 100 ml ddH₂O) abgelöst. Dabei wurde 500 µl Cetylpyridiniumchlorid-Lösung pro Well (in 48-Well-Pallete) hinzugegeben. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

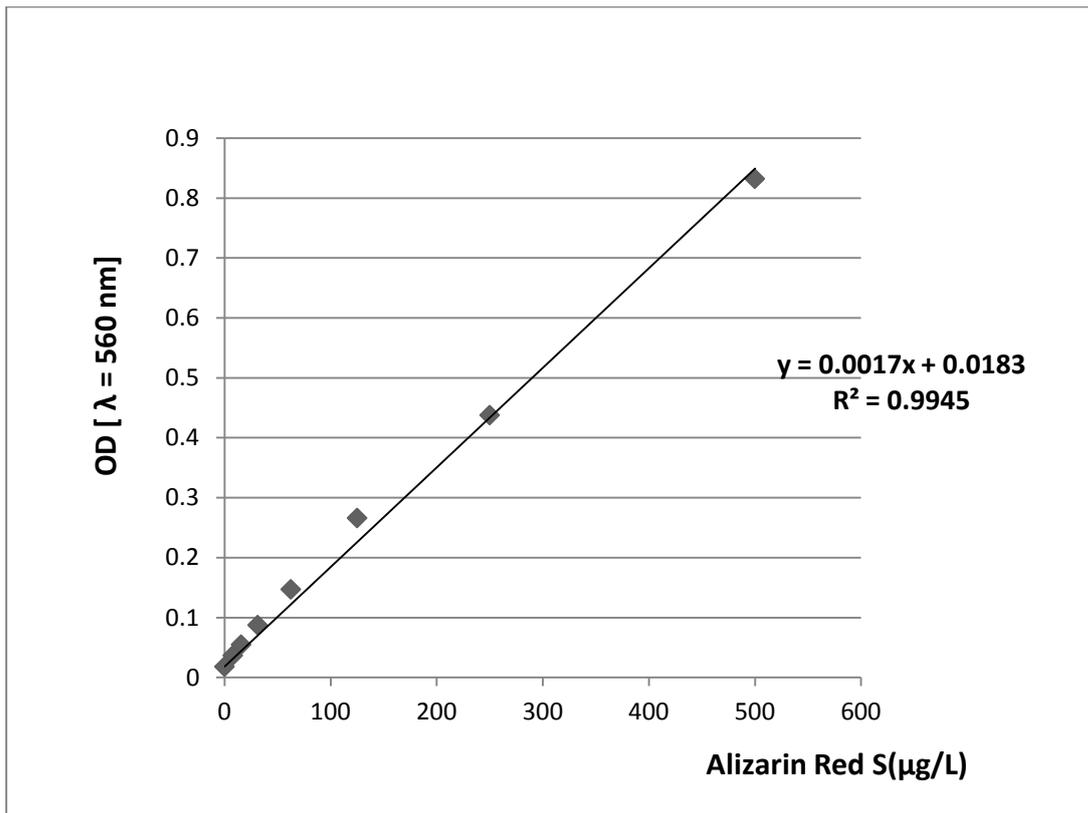


Abbildung 12: Standardkurve der Alizarin Rot/Cetylpyridiniumchlorid -Lösung

2.2.20 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit der Software GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA) statistisch ausgewertet. Zuerst wurde der Verteilungstyp der Datenreihe mit dem Kolmogorov-Smirnov Test bestimmt, ob er eine Normalverteilung ist. Die statistische Analyse von zwei Gruppen wurde mit dem t-Test (bei Normalverteilungen) oder dem Mann-Whitney Test (bei Nicht-Normalverteilungen) durchgeführt. Die Analyse von drei oder mehr Gruppen erfolgte die statistische Auswertung mittels One-Way ANOVA. Als Post-Hoc Test wurden entsprechend der Verteilung der Daten der Bonferroni's Multiple Comparison Test oder den Dunn's Multiple Comparison Test benutzt. Als statistisch ausreichendes Signifikanzniveau wurde für jede Auswertung ein *P*-Wert kleiner als 0,05 festgelegt. In den Abbildungen bedeutet: * *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,001, **** *P* < 0,0001.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Immunphänotyps der Ad-MSCs

CD 105 und CD 90 sind repräsentative Oberflächenmarker für mesenchymale Stammzellen. CD-Marker wurden mittels Durchflusszytometrie detektiert. Die isolierten Ad-MSCs waren positiv für CD 105 ($84,49 \pm 1,2$ %, Passage 3) und CD 90 ($86,17 \pm 0,9$ %, Passage 3) Sie waren jedoch negativ für die typischen hämatopoetischen Oberflächenmarker CD 14 und CD 45 (N=3, n=2).

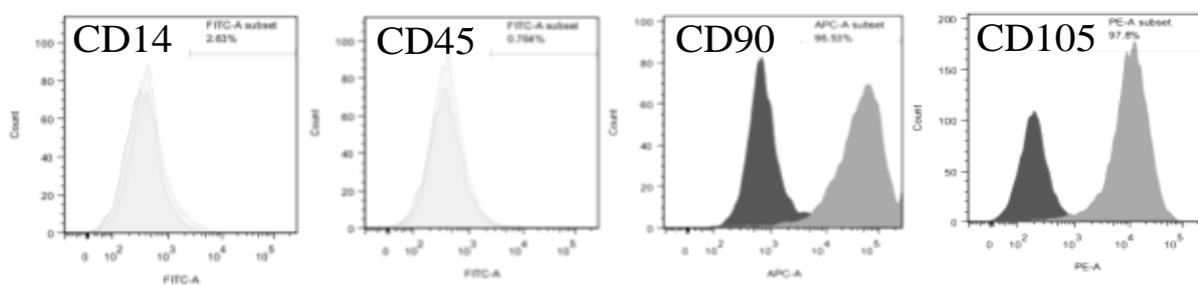


Abbildung 13: Der Immunphänotyp der isolierten Ad-MSCs in Passage 3: Eine signifikante Menge der Ad-MSCs ist positiv für CD 90 und CD 105, und negativ für CD 14 und CD 45.

3.2 Zellproliferation durch die Ki 67-Immundefärbung

3.2.1 Unterschied des Proliferationsanteils zwischen jungen und alten Ad-MSCs

Die Ad-MSCs alter Spender (> 60 Jahre) wiesen im Vergleich zu den Ad-MSCs junger Spender (< 45 Jahre) einen signifikant niedrigen Positivanteil der Ki 67-Färbung auf: Jung, $69,22 \pm 2,62$ %, Alt $55,7 \pm 5,57$ % Mittelwert \pm Standardfehler, N = 3, n = 5; * $P = 0,0217$ vs. unbehandelten Zellen (Abbildung 14).

3.2.2 AZA und BIX Behandlungen haben den Proliferationsanteil von alten Ad-MSCs gesteigert.

Die Ad-MSCs aus den beiden Gruppen wurden mit AZA (5 μ M, 20 μ M) und BIX (0,2 μ M) in DMEM-Medium für 48 Stunden inkubiert. In den jungen Ad-MSCs, führten die Behandlungen mit 20 μ M AZA und mit 0,2 μ M BIX zu einer Reduktion der Anteils der Ki 67-positiven Zellen, während die Behandlung mit 5 μ M AZA die Proliferation nicht verändert hat (Abbildung 15a).

In alten Spendern dagegen führte die Behandlung mit 5 μM AZA und 0,2 μM BIX zu einer signifikanten Erhöhung der Zellproliferation (Abbildung 15b, Tabelle 7) (N=3, n=4).

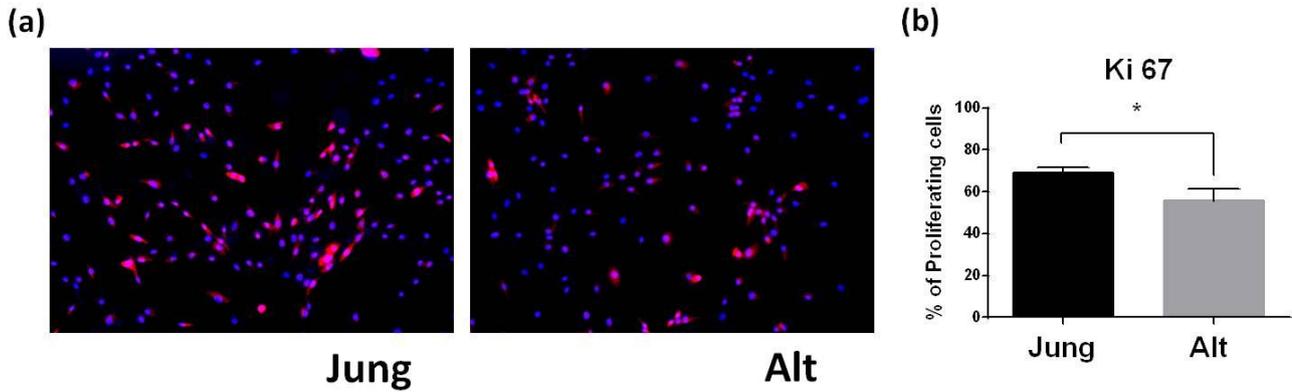


Abbildung 14: Immunfärbung für Ki 67: Altersbedingte Unterschied in Proliferation der Ad-MSCs.

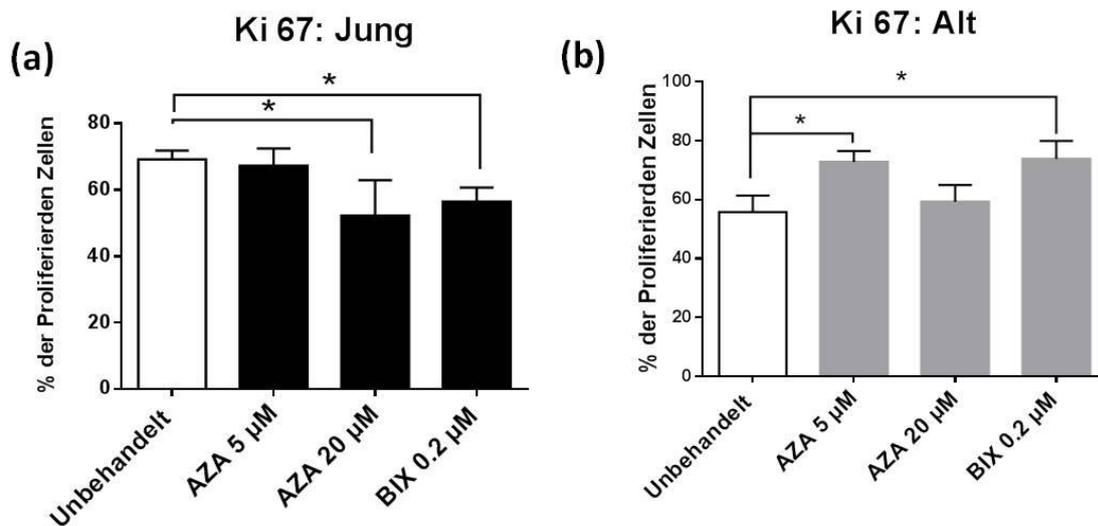


Abbildung 15: Die Veränderungen der Proliferation der Ad-MSCs durch die Behandlungen mit AZA und BIX

	Jung	P-Werte (vs. unbehandelt)	Alt	P-Werte (vs. unbehandelt)
Unbehandelt	69,22 ± 2,636%		55,72 ± 5,565%	
AZA 5 µM	67,28 ± 5,243%	0,7331	72,78 ± 3,678%	0,0211
AZA 20 µM	52,25 ± 10,65 %	0,0407	59,25 ± 5,625%	0,6897
BIX 0,2 µM	56,48 ± 4,220%	0,0141	73,78 ± 6,082%	0,0469

Tabelle 7: Der Anteil der Ki 67-positiven Ad-MSCs nach den Behandlungen mit AZA und BIX (Mittelwert ± Standardfehler; N = 3, n = 4)

3.3 Genexpression pluripotenter Gene

3.3.1 Der Altersbedingte Unterschied pluripotenter Gene in Ad-MSCs

Ad-MSCs junger Spender zeigten eine höhere Genexpression von *NANOG*, *OCT4* und *LIN28A* als alte Ad-MSCs (Relative Expression durch *GAPDH* normalisiert: *NANOG*: Jung: $9,9 \times 10^{-4}$, Alt: $3,4 \times 10^{-4}$; $P = 0,0212$ *OCT4*: Jung: $2,3 \times 10^{-4}$, Alt: $1,3 \times 10^{-4}$, $P = 0,0209$ vs. unbehandelten Zellen; *LIN28A*: Jung: $P = 0,969$ vs. unbehandelten Zellen, Alt: $P = 0,369$ vs. unbehandelten Zellen). Allerdings wurde das *SOX2* Gen wurde in alten Ad-MSCs signifikant höher exprimiert als in jungen Ad-MSCs (Jung: $9,2 \times 10^{-6}$, Alt: $9,4 \times 10^{-4}$, $P = 0,0032$ vs. unbehandelten Zellen) (N = 4, n = 3) (Abbildung 16).

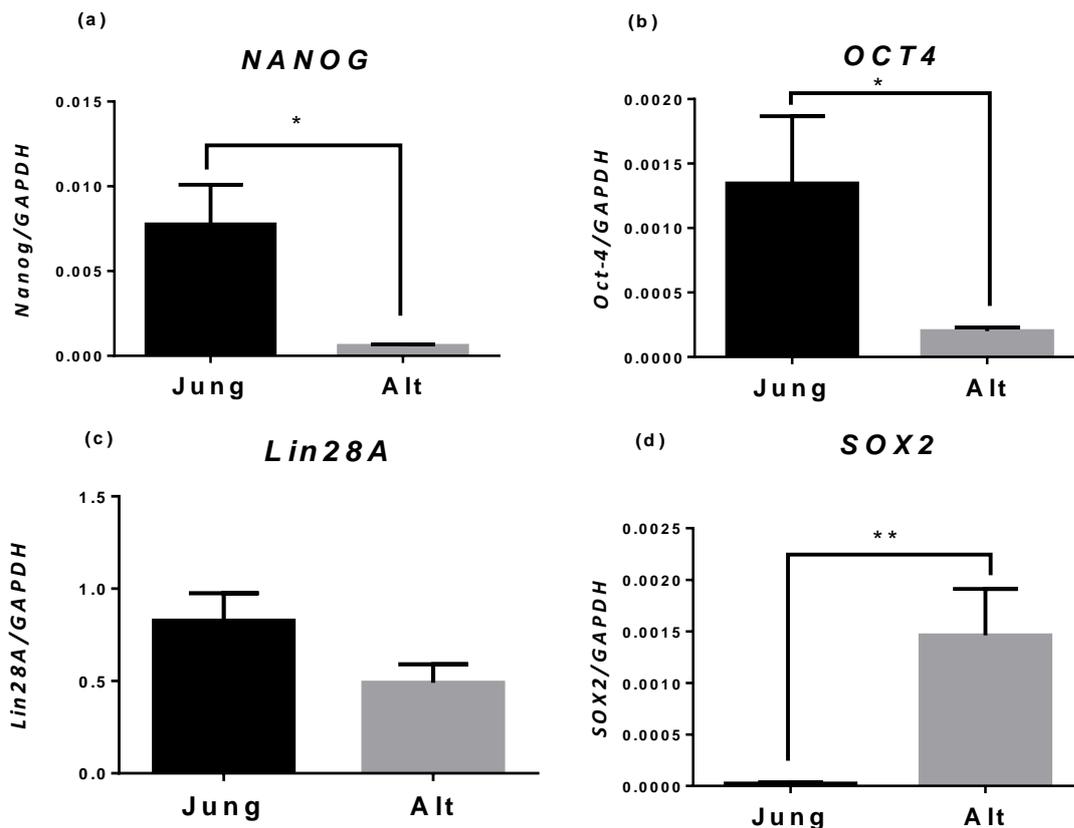


Abbildung 16: Altersbedingte Unterschiede von Pluripotenzmarkern in Ad-MSCs: (a-c) NANOG, OCT4 und LIN28A zeigen verminderte Genexpression in den Ad-MSCs alter Spender, während die (d) SOX2 Genexpression in den alten Spendern signifikant erhöht ist

3.3.2 Die Behandlung mit AZA und BIX führte zu einer erhöhten Genexpression von Pluripotenzmarkern

Im Vergleich zu den unbehandelten Ad-MSCs desselben Spenders, zeigten die Ad-MSCs die mit AZA und BIX behandelt wurden, eine erhöhte Genexpression von *NANOG*, *OCT4* und *LIN28A*. *NANOG* wurde in jungen Spendern nach der AZA-Behandlung signifikant höher exprimiert (AZA: 5 μ M 48 h, $1,946 \pm 0,301$ -fach, $P = 0,0012$ vs. unbehandelten Zellen) als in alten Spendern. Das *NANOG*-Gen wurde durch die BIX-Behandlung am höchsten exprimiert (BIX: 0,2 μ M, 48 h, $1,483 \pm 0,3163$ -fach). Die *OCT4*-Expression in Ad-MSCs erhöhte sich nach der Behandlung mit AZA und BIX wie folgt: In jungen Spendern steigerte sich die *OCT4*-Expression nach der AZA-Behandlung signifikant (AZA: 5 μ M 48 h, $1,462 \pm 0,2135$ -fach, $P =$

0,0061 vs. unbehandelten Zellen), während in alten Spendern signifikanter Unterschied nach BIX-Behandlung zu beobachten war (BIX: 0,2 μ M 48 h, $1,413 \pm 0,3748$ -fach, $P = 0,0135$ vs. unbehandelten Zellen). Die *LIN28A*-Expression war nach beiden Behandlungen signifikant erhöht: in den jungen Ad-MSCs erhöhte sie sich $2,140 \pm 0,6019$ -fach nach der BIX-Behandlung und in alten Spendern $2,563 \pm 0,6013$ -fach nach der AZA-Inkubation. Das *SOX2*-Gen wurde allerdings nach der Behandlung mit BIX und AZA in den alten Spendern signifikant niedriger exprimiert (BIX: 0.1 μ M 24 h, $0,1953 \pm 0,05689$ vs. unbehandelten Zellen) (Mittelwert \pm Standardfehler, N = 4, n = 3) (Abbildung 17).

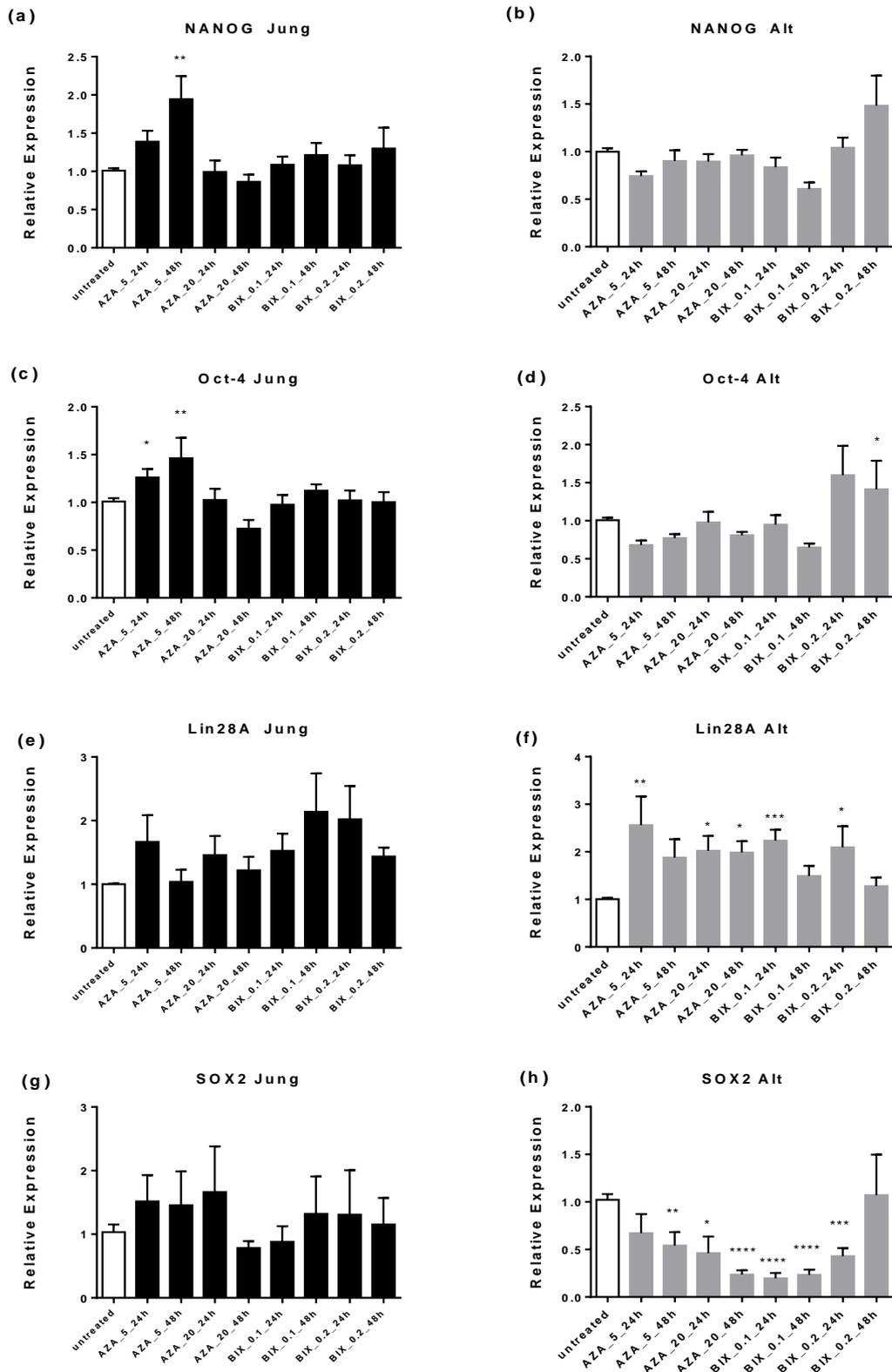


Abbildung 17: Die Veränderung der Pluripotenzmarker nach der Behandlung mit AZA und BIX

3.4 Genomische Verteilung von 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) und 5-Methylcytosin (5mC)

3.4.1 Der altersbedingte Unterschied von 5hmC und 5mC in alten und jungen Ad-MSCs
Ad-MSCs, die aus alten Spendern isoliert wurden, zeigten eine niedrigere Basalexpression von 5hmC als Ad-MSCs von jungen Spendern (Jung: 6774 ± 816 ; Alt $5588 \pm 668,8$; $P = 0,3464$ vs. unbehandelten Zellen), während 5mC- in alten Ad-MSCs signifikant höher exprimiert wurde (Jung: $6173 \pm 670,6$; Alt 10251 ± 2402 , $*P = 0,0482$ vs. unbehandelten Zellen) (Mittelwert \pm Standardfehler, $N = 3$, $n = 4$) (Abbildung 18, Abbildung 19).

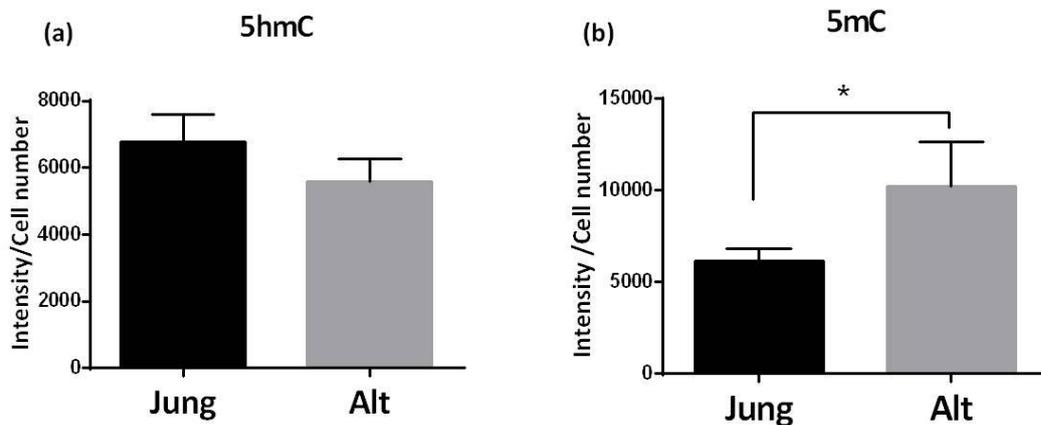


Abbildung 18: Altersbedingte Unterschiede der Expression von 5hmC (a) und 5mC (b) in Ad-MSCs

3.4.2 Der Einfluss von AZA und BIX auf die Verteilung von 5hmC und 5mC in alten und jungen Ad-MSCs

Ad-MSCs von jungen und alten Spendern wurden mit $5 \mu\text{M}$ AZA und $0,2 \mu\text{M}$ BIX behandelt, und die Expression von 5hmC und 5mC mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Die Behandlungen mit AZA und BIX führten zu einer signifikanten Erhöhung der 5hmC-Expression in alten Ad-MSCs. Andererseits war nach der Behandlung mit AZA eine Reduktion von 5mC in alten Ad-MSCs zu beobachten, während die BIX-Behandlung keine Änderung bei der 5mC-Expression bewirkte (Abbildung 19b, Abbildung 20c, d). Die Behandlungen von jungen Ad-

MSCs mit AZA und BIX führten nicht zu signifikanten Veränderungen der Expression von 5hmC und 5mC (Abbildung 19a, Abbildung 20a, b) (Tabelle 8); (N=3, n = 4).

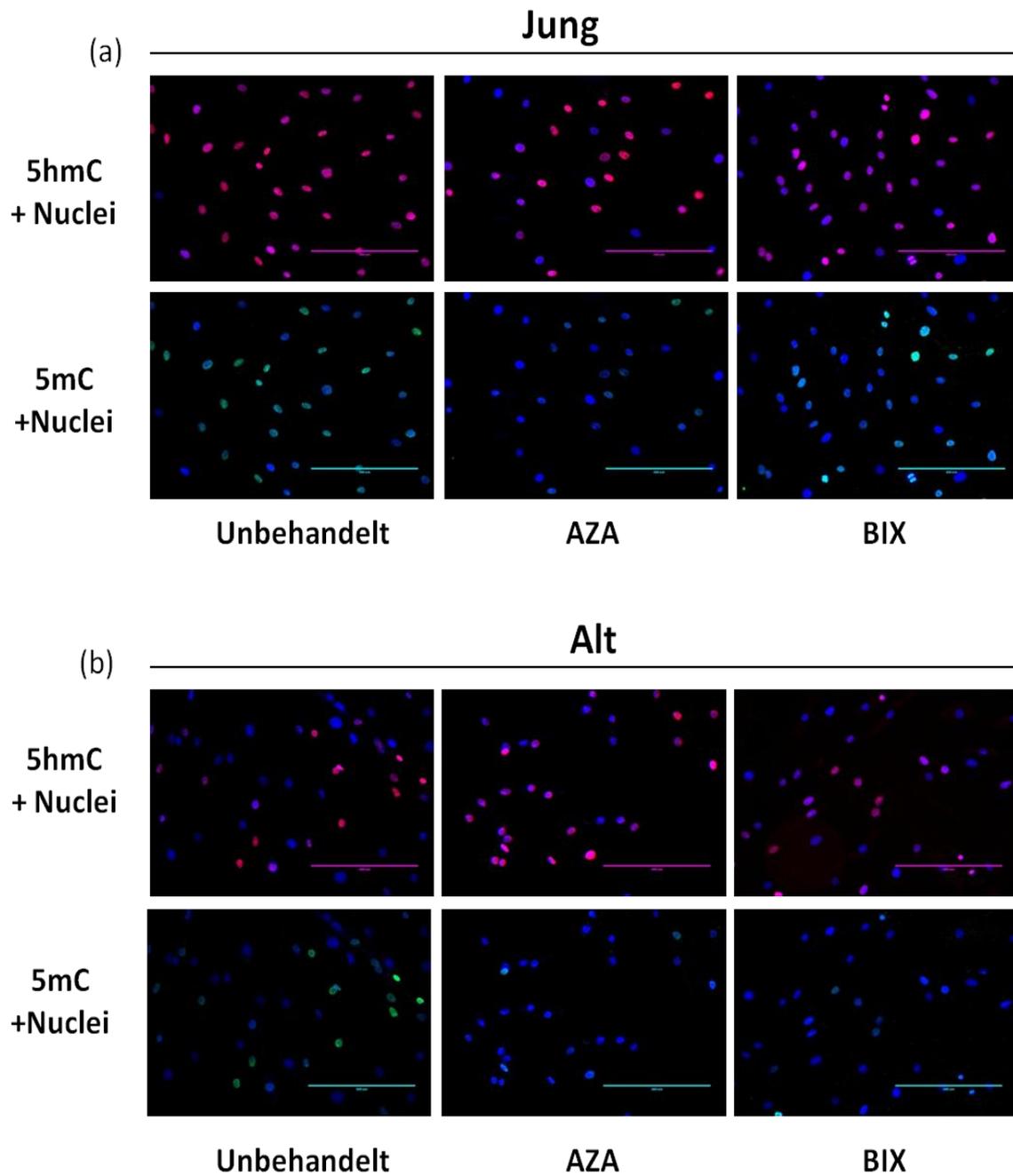


Abbildung 19: Die Verteilung von 5mC und 5hmC mit und ohne Behandlungen mit AZA und BIX in jungen und alten Ad- MSCs. Rot: 5hmC, Grün: 5mC, Blau: Nuclei (Hoechst)

5hmC	Jung (Mittelwert ± Standardfehler)	P-Werte (vs. unbehandelt)	Alt (Mittelwert ± Standardfehler)	P-Werte (vs. unbehandelt)
Unbehandelt	6961 ± 878,2		5588 ± 668,8	
AZA 5 µM	8092 ± 986,7	0,4060	17578 ± 4379	0,0379
BIX 0.2 µM	8500 ± 781,3	0,2069	12928 ± 1864	0,0053
5mC	Jung (Mittelwert ± Standardfehler)	P-Werte (vs. unbehandelt)	Alt (Mittelwert ± Standardfehler)	P-Werte (vs. unbehandelt)
Unbehandelt	5518 ± 623,1		10251 ± 2402	
AZA 5 µM	6748 ± 851,5	0,2576	6608 ± 2451	0,3211
BIX 0,2 µM	6657 ± 604,7	0,2070	10768 ± 1557	0,8560

Tabelle 8: Die Quantifizierung der 5hmC- und 5mC-Färbung ohne und nach der Behandlung mit AZA oder BIX

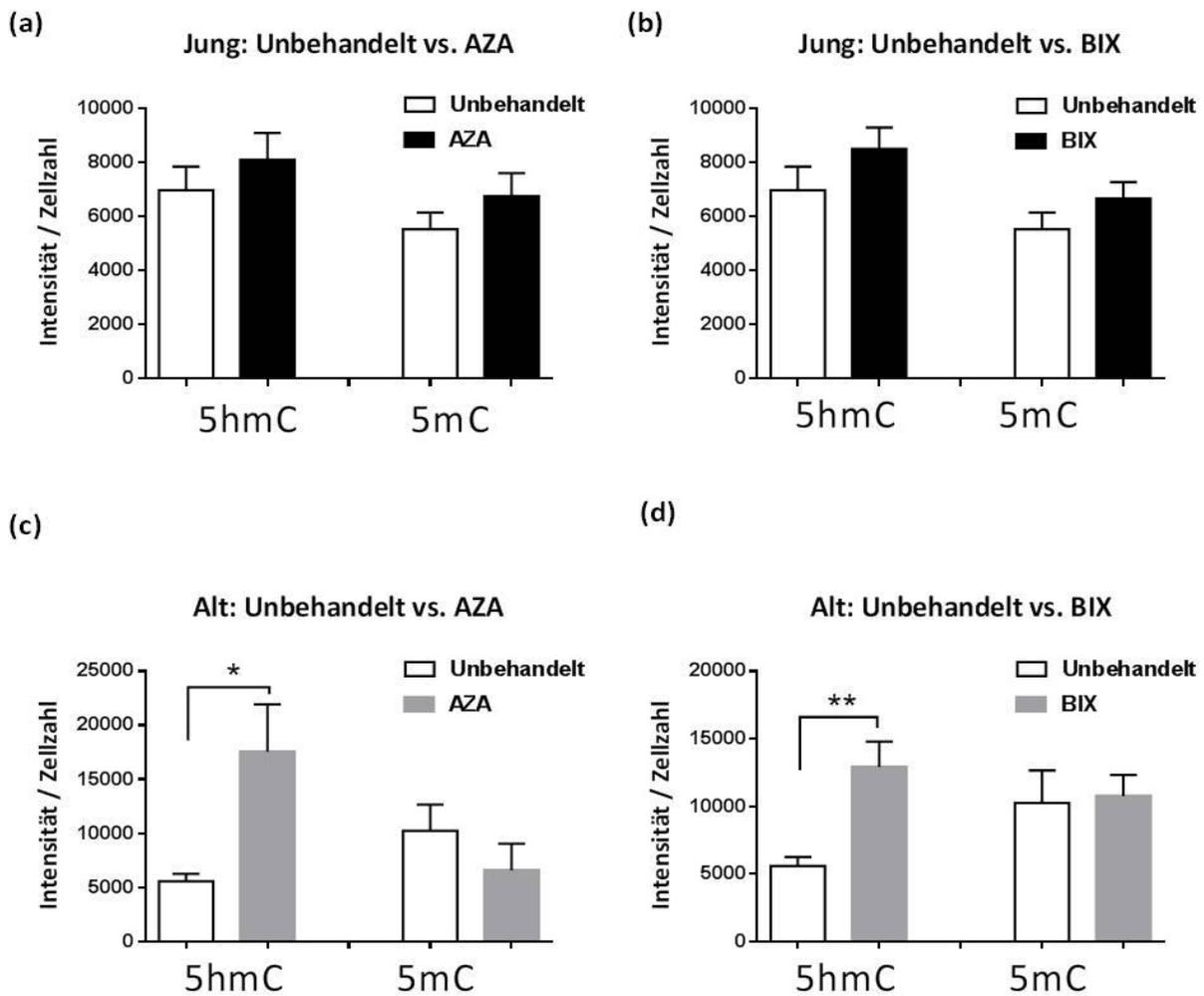


Abbildung 20: Die Veränderung der Expression von 5hmC und 5mC in jungen und alten Ad-MSCs nach der Behandlung mit AZA (a, c) und BIX (b, d).

3.5 Genexpression der TET Gene

3.5.1 Der altersbedingte Unterschied von TET Genen in Ad-MSCs

Die *TET1* und *TET3*-Gene wurden in jungen Ad-MSCs auf der mRNA-Ebene stärker exprimiert als in alten Ad-MSCs (Relative Expression durch *GAPDH* normalisiert, *TET1*: Jung $0,008266 \pm 0,003808$, Alt $0,004839 \pm 0,0007556$, $P = 0,2168$; *TET3* Expression: Jung $0,0005886 \pm 7,005e-005$, Alt $0,0003403 \pm 3,454e-005$, $**P = 0,0028$), während die Expression des *TET2*-Gens in beiden Altersgruppen ähnlich exprimiert war (*TET2*: Jung $0,02750 \pm 0,003233$, Alt $0,02541 \pm 0,001724$; $P = 0,5741$) (Abbildung 21); (N=4, n=3).

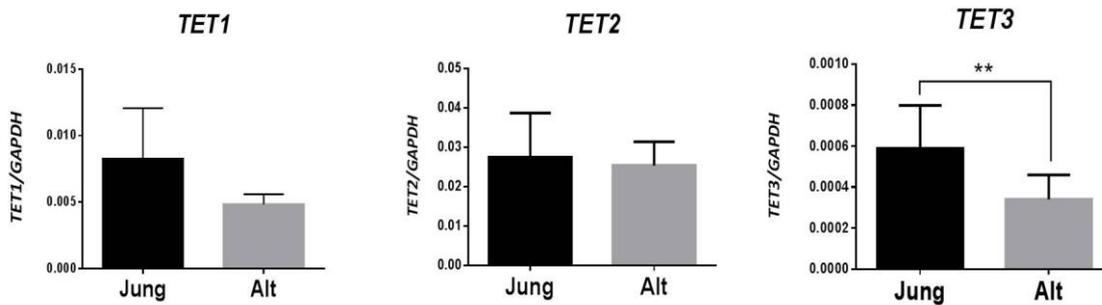


Abbildung 21: Altersbedingte Unterschiede der Genexpression der *TET* Familie

3.5.2 Die *TET*-Genexpression wurde durch die Behandlung mit AZA und BIX verändert.

Junge und alte Ad-MSCs wurden mit AZA und BIX behandelt. Danach wurde die Expression der *TET1*, *TET2* und *TET3*-Gene mittels qRT-PCR gemessen und mit unbehandelten Ad-MSCs desselben Spenders verglichen: in jungen Spendern wurde das *TET1* Gen nach der BIX-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant höher exprimiert (am höchsten bei BIX: 0,1 μ M, 48h: $1,712 \pm 0,1307$ -fach, $***P < 0,0001$). In den Ad-MSCs alter Spender wurde *TET1* nach der Behandlung mit 20 μ M AZA leicht erhöht ($1,220 \pm 0,3248$ -fach). Die *TET2*-Expression stieg nach beiden Behandlungen signifikant an: in jungen Spendern jedoch am höchsten bei BIX 0,2 μ M, 48 h ($2,281 \pm 0,6760$ fach; $*P = 0,044$) und in alten Ad-MSCs am stärksten nach der Inkubation mit 5 μ M AZA ($1,410 \pm 0,1319$ -fach, $***P = 0,0004$). Das *TET3* Gen wurde nach beiden Behandlungen signifikant höher exprimiert; in den jungen Ad-MSCs am höchsten bei AZA 5 μ M 24 h ($2,127 \pm 0,2985$ -fach, $***P < 0,0001$) und bei BIX 0,1 μ M 24h ($2,226 \pm 0,2587$ -fach, $***P < 0,0001$). In alten Ad-MSCs wurde *TET3* auch signifikant erhöht, und zwar am höchsten bei AZA 20 μ M 48 h ($2,550 \pm 0,6618$ -fach, $P = 0,0007$), und bei 0,1 μ M BIX 48h ($2,358 \pm 0,6342$ -fach, $**P = 0,0018$) (Abbildung 22); (N=4, n=3).

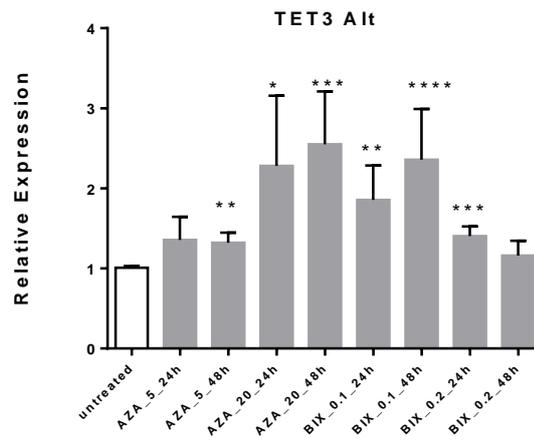
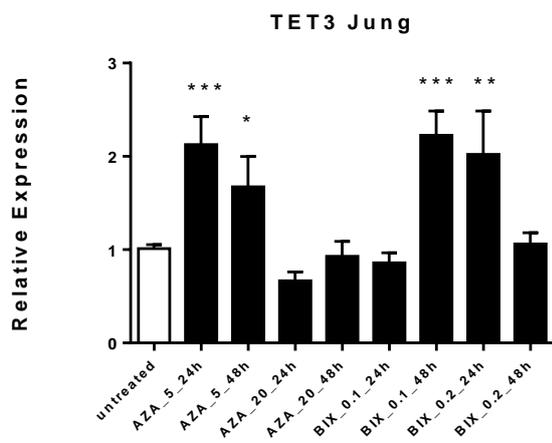
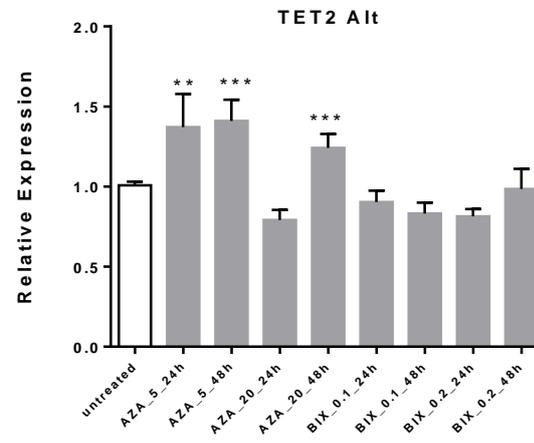
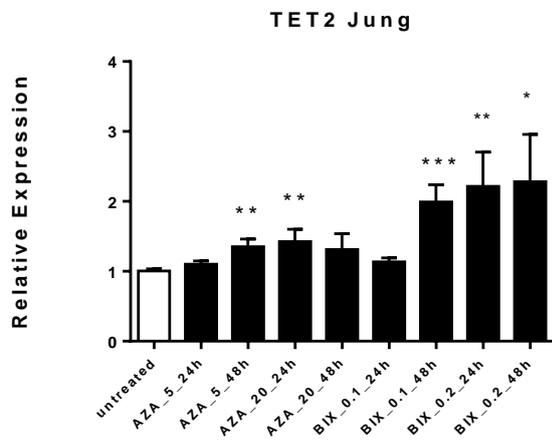
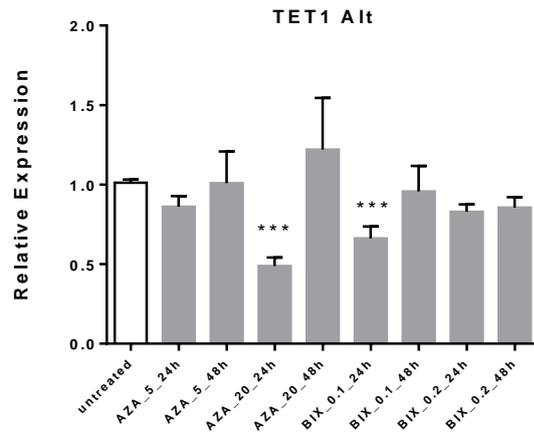
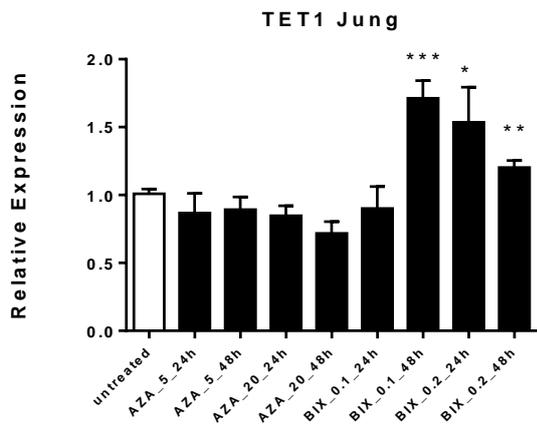


Abbildung 22: Die Veränderung der TET-Genexpression nach den Behandlungen mit AZA und BIX in jungen und alten Ad-MSCs

3.6 Verbesserung der hepatischen Differenzierung der Ad-MSCs älterer Spender

3.6.1 Altersbedingte basale Harnstoffproduktion in HLCs differenziert aus jungen und alten Ad-MSCS

Durch das hepatische Differenzierungsverfahren von Ad-MSCS wurde gezeigt, dass die basale Harnstoffproduktion in alten und jungen Spendern vergleichbar ist. Aber durch die Gabe von Ammoniumchlorid (NH_4Cl) mit Ornithin wurde eine höhere Harnstoffproduktion in den alten HLCs induziert (Abbildung 23); (N=3, n=4).

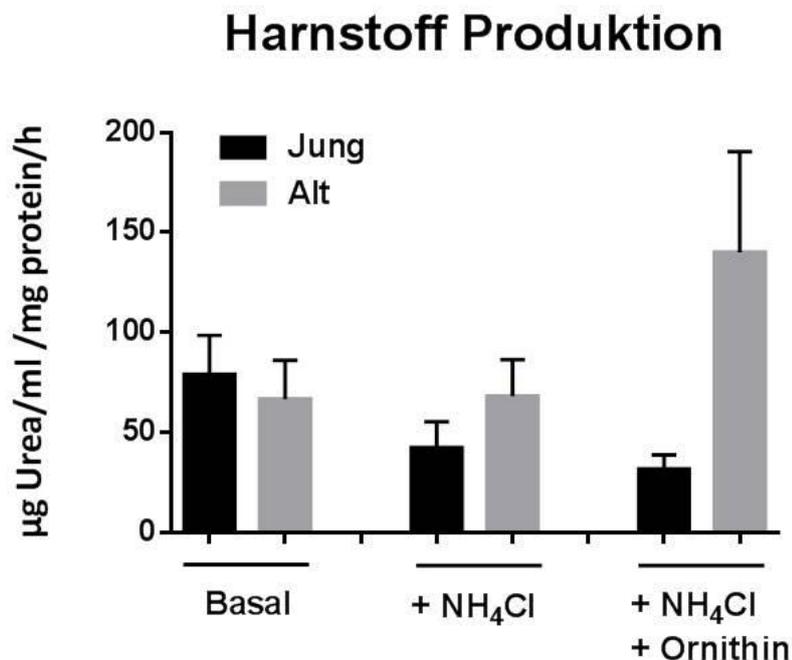


Abbildung 23: Die Harnstoffproduktion der HLCs aus jungen und alten Spendern

3.6.2 Verbesserung der Harnstoffproduktion in alten HLCs nach AZA-Vorbehandlung

In den mit AZA vorbehandelten HLCs wurde am Ende der Differenzierung eine vermehrte Harnstoffproduktion beobachtet. Dieser ansteigende Trend war sowohl bei der Basalproduktion als auch nach der Zugabe von NH_4Cl und von der Kombination von NH_4Cl und Ornithin höher als in den unbehandelten HLCs (Abbildung 24b). Allerdings war diese Änderung nur in den HLCs aus Ad-MSCs alter Spender zu beobachten. Die Behandlung mit AZA hat jedoch die Harnstoffsynthese in HLCs von jungen Ad-MSCs nicht verbessert (Abbildung 24a); (N = 3, n =

4).

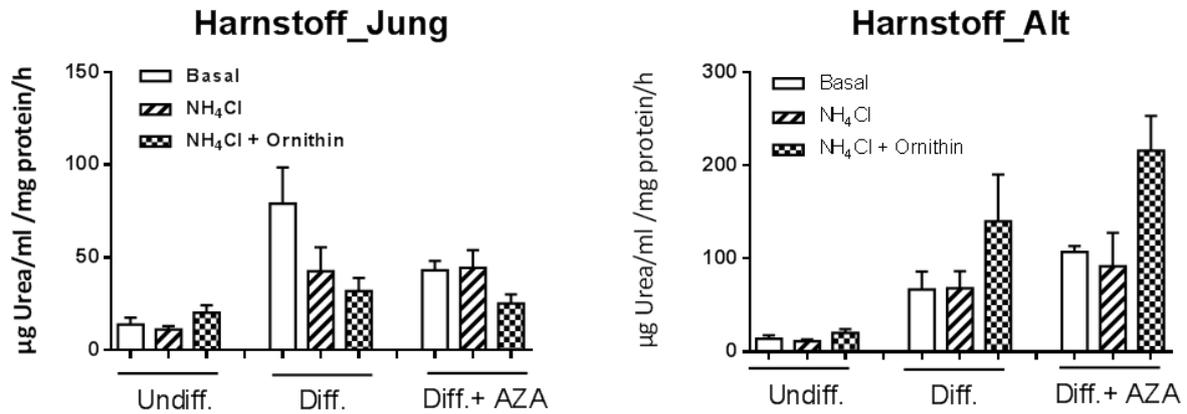


Abbildung 24: Hepatische Differenzierung: Verbesserung der Harnstoffproduktion in HLCs nach der AZA-Behandlung in alten Ad-MSCs.

3.6.3 Altersbedingte basal Glukoseproduktion in HLCs

Die gemessene Glukoseproduktion in jungen HLCs sind auf Basalebene signifikant höher als in den alten HLCs: Jung: $150,8 \pm 49,29$, Alt: $33,23 \pm 18,76$ nmol Glukose/ml/mg Protein/h, $*P = 0,0015$. Die Laktat-induzierte Glukoseproduktion ist viel höher in HLCs differenziert von jungen Ad-MSCs als in HLCs von alten Ad-MSCs: Jung: $367,4 \pm 170,4$, Alt: $67,08 \pm 42,58$; 76 nmol Glukose/ml/mg Protein/h, $P = 0,0021$ (Mittelwert \pm Standardfehler, $N = 3$, $n = 4$) (Abbildung 25).

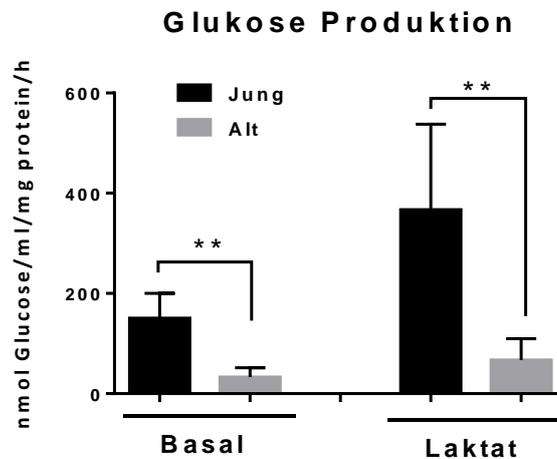


Abbildung 25: Hepatische Differenzierung: Der altersbedingte Unterschied der Glukoseproduktion in Ad-MSCs

3.6.4 Verbesserung der Glukoseproduktion in HLCs nach AZA-Vorbehandlung

Die AZA-Vorbehandlung von Ad-MSCs führt zu einer vermehrten Glukoseproduktion in HLCs, die von alten und jungen Ad-MSCs differenziert wurden. In jungen HLCs wurde jedoch nur eine Erhöhung nach Laktatgabe beobachtet, (+ Laktat: ohne AZA: $383,3 \pm 101,1$; mit AZA $851,6 \pm 409,6$ nmol Glukose/ml/mg Protein/h, $P = 0,2790$) (Abbildung 27b), während die Glukosekonzentration im Überstand von alten HLCs signifikant erhöht war. (Basal: ohne AZA $33,23 \pm 18,76$, mit AZA $539,9 \pm 98,60$, $****P < 0,0001$; +Laktat: ohne AZA $67,08 \pm 42,58$, mit AZA $415,5 \pm 15,61$ $****P = 0,0007$) (Mittelwert \pm Standardfehler, $N = 3$, $n = 4$) (Abbildung 27).

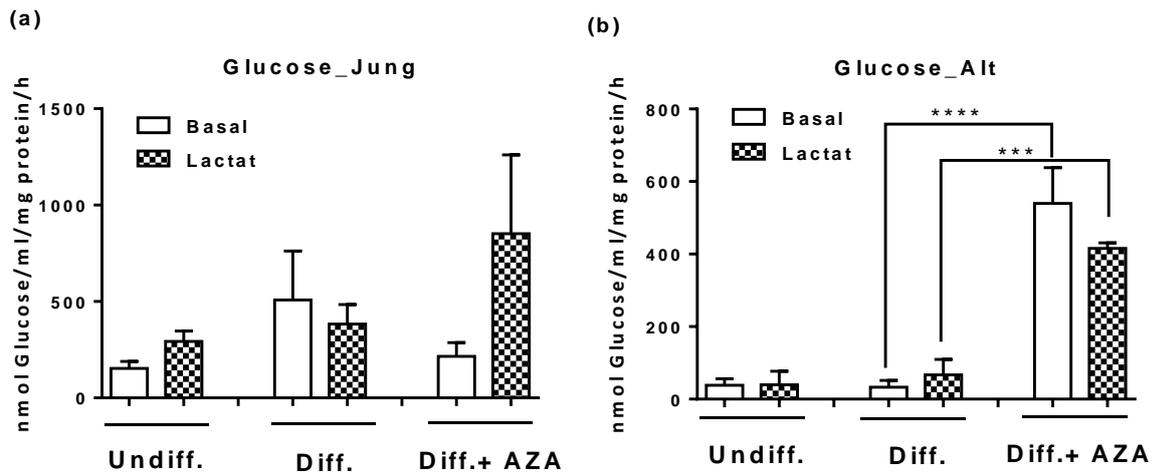


Abbildung 26: Hepatische Differenzierung: Verbesserung der Glukoseproduktion in den HLCs durch AZA-Behandlung

3.6.5 Altersbedingte Abschwächung der Basalaktivität von Phase I /II Enzymen

Von den getesteten Phase I und Phase II Enzymen (Tabelle 6), wurde die Enzymaktivität bei der Phase I (CYP 1A1/2, CYP2B6) und der Phase II (AHMC- und CHC-Konjugation) in den HLCs von jungen Spendern merklich hochreguliert. In HLCs aus alten Ad-MSCs war die Aktivität dieser Enzyme jedoch sehr viel niedriger (Mittelwert \pm Standardfehler, N = 3, n = 4) (Abbildung 27, Tabelle 9).

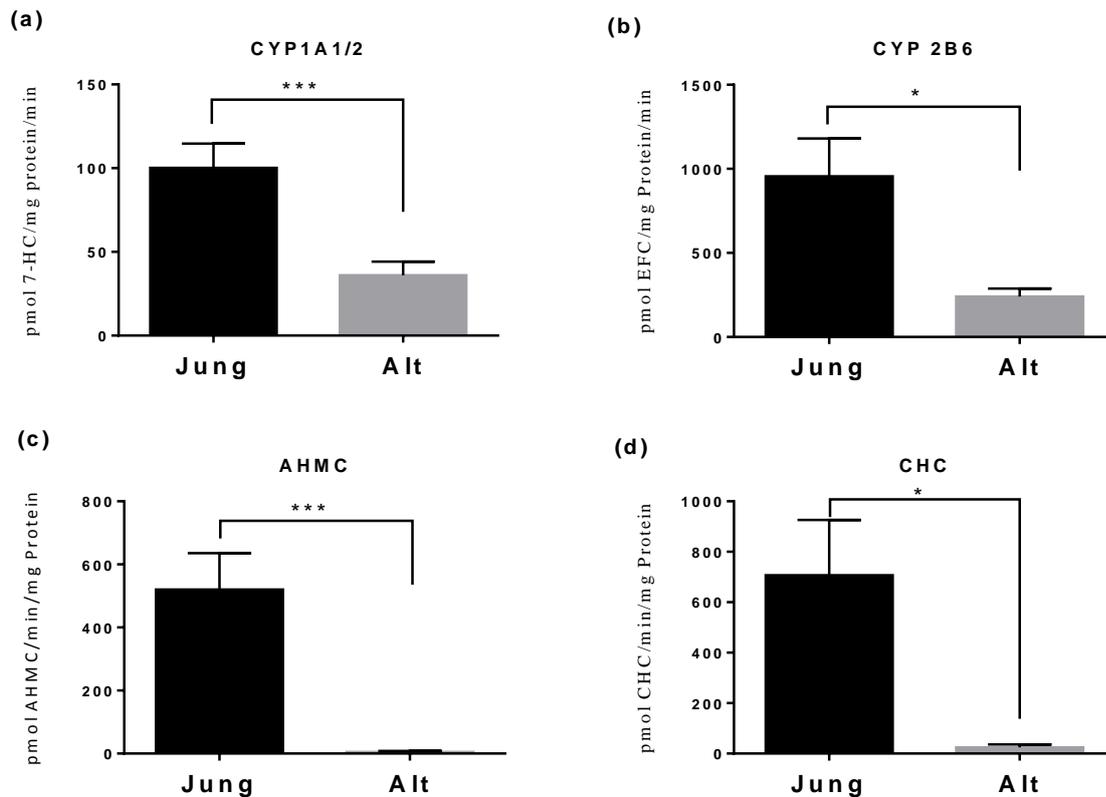


Abbildung 27: Hepatische Differenzierung: Altersbedingte Abschwächung der Phase I / II Enzymaktivität in HLCs.

	Jung	Alt	P-Wert
CYP 1A1/2 (pmol 7-HC/mg Protein/min)	100,2 ± 14,53	33,23 ± 18,76	0,0008
CYP 2B6 (pmol EFC/mg Protein/min)	955,7 ± 225,2	240,7 ± 46,89	0,0139
AHMC-Konjugation (pmol AHMC/mg Protein/min)	520,4 ± 115,5	4,957 ± 3,433	< 0,0001
CHC-Konjugation (pmol CHC/mg Protein/min)	706,9 ± 219,4	24,90 ± 11,48	0,014

Tabelle 9: Hepatische Differenzierung: Altersbedingte Abschwächung der Phase I / II Basalaktivität

3.6.6 Die Verbesserung der Phase I / II Enzymaktivität alter HLCs durch Vorbehandlung mit AZA

Die basale Enzymaktivität von CYP 1A1/2, CYP 2B6, der AHMC-Konjugation und der CHC-Konjugation ist in alten HLCs und ohne AZA-Vorbehandlung ähnlich niedrig wie in undifferenzierten Ad-MSCs. Nach AZA-Vorbehandlung von alten Ad-MSCs mit anschließender Differenzierung demonstrierten die HLCs jedoch eine signifikante Erhöhung der Phase I/II Enzymaktivität (Abbildung 28b, d, f, h). Im Gegensatz dazu, führte die AZA-Vorbehandlung von jungen Ad-MSCs mit anschließender Differenzierung zu HLCs nicht zu einer Verbesserung der CYP 1A1/2-, CYP 2B6- und AHMC-Aktivität. Einzig die CHC-Konjugation in mit AZA vorbehandelten jungen HLCs war erhöht (Tabelle 10), (Abbildung 28a, c, e, g), (Mittelwert \pm Standardfehler, N = 3, n = 4).

Jung	Diff.	Diff. + AZA	P-Wert
CYP 1A1/2 (pmol 7-HC/mg Protein/min)	100,2 \pm 14,53	83,59 \pm 16,01	0,2974
CYP 2B6 (pmol EFC/mg Protein/min)	955,7 \pm 225,2	902,1 \pm 252,6	0,8755
AHMC-Konjugation (pmol AHMC/mg Protein/min)	520,4 \pm 115,5	391,0 \pm 162,3	0,5156
CHC-Konjugation (pmol CHC/mg Protein/min)	706,9 \pm 219,4	1141 \pm 505,4	0,4389
Alt	Diff.	Diff. + AZA	P-Wert
CYP 1A1/2 (pmol 7-HC/mg Protein/min)	36,09 \pm 8,121	112,5 \pm 16,10	0,0028
CYP 2B6 (pmol EFC/mg Protein/min)	240,7 \pm 46,89	790,9 \pm 152,4	<0,0001
AHMC-Konjugation (pmol AHMC/mg Protein/min)	4,957 \pm 3,433	328,8 \pm 112,6	0,0061
CHC-Konjugation (pmol CHC/mg Protein/min)	24,90 \pm 11,48	310,7 \pm 170,3	0,9273

Tabelle 10: Hepatische Differenzierung: Verbesserung der Phase I /II Enzymaktivität der HLCs durch AZA-Vorbehandlung.

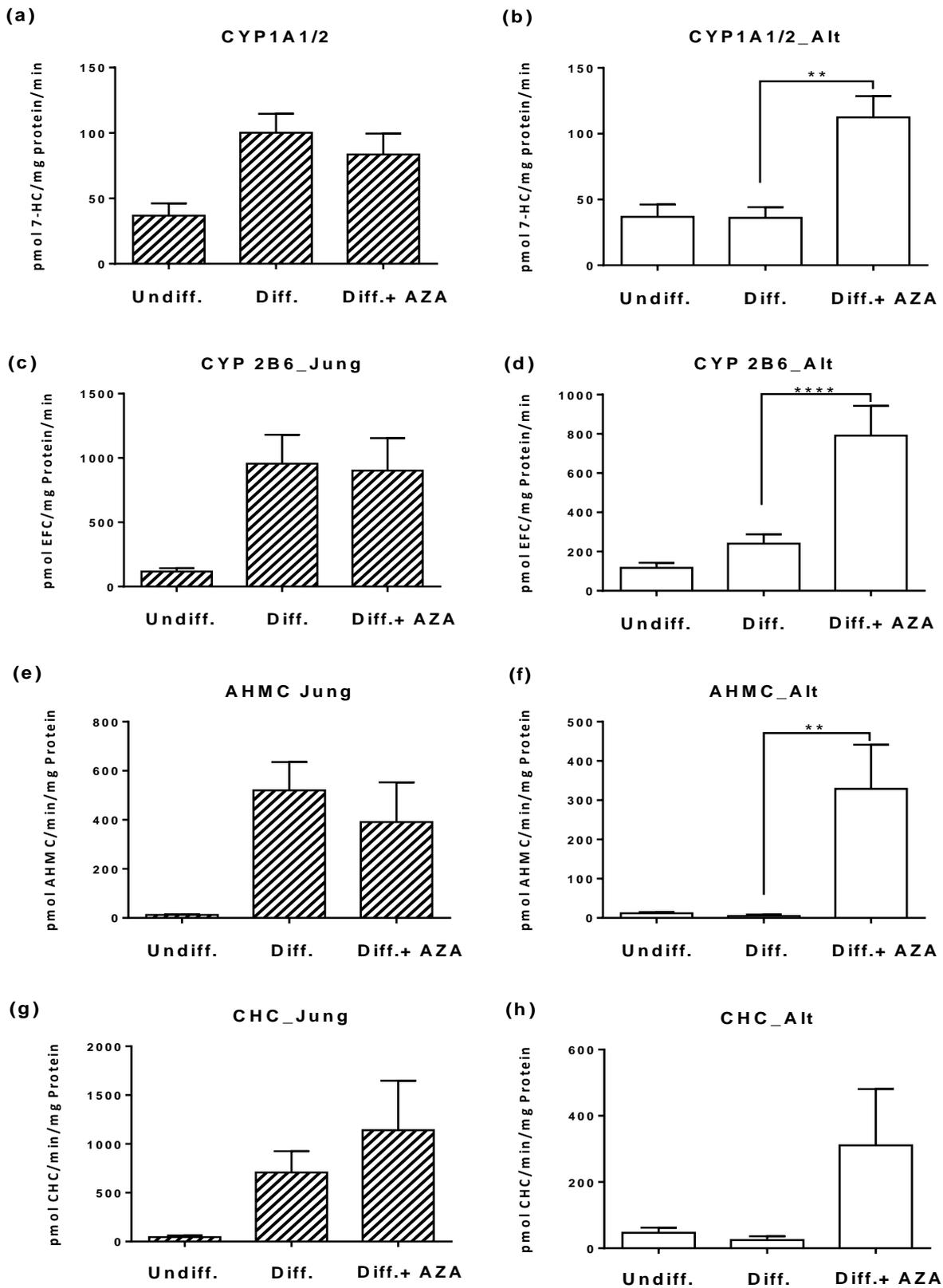


Abbildung 28: Hepatische Differenzierung: Verbesserung der Phase I/II Enzymaktivität durch AZA-Vorbehandlung in HLCs aus jungen und alten Ad-MSCs.

3.7 Verbesserung der osteogenen Differenzierung von Ad-MSCs aus alten Spendern

3.7.1 Altersabhängige basale AP-Aktivität der OLCs

Die basale AP-Aktivität in den differenzierten OLCs aus jungen Spendern ist signifikant höher als in den OLCs aus alten Spendern (Jung: $1,182 \pm 0,2682$, Alt: $0,4003 \pm 0,05757$ μM pNP/Min./mg Protein, $*P = 0,0411$) (Abbildung 29); (Mittelwert \pm Standardfehler, $N = 4$, $n = 4$).

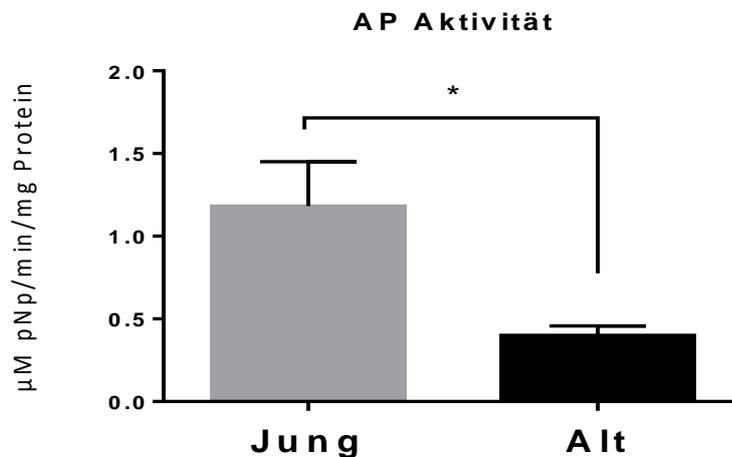


Abbildung 29: Osteogene Differenzierung: Der altersbedingte Unterschied der AP-Aktivität in OLCs

3.7.2 BIX-Vorbehandlung verbessert die AP Aktivität in alten OLCs

Die Vorbehandlung alter Ad-MSCs mit $0,2$ μM BIX für 48 h bewirkt eine signifikante Erhöhung der AP-Aktivität in differenzierten Zellen (OLCs) auf $1,38 \pm 0,147$ -fach im Vergleich zu unbehandelten Zellen. ($*P = 0,0228$) (Abbildung 30b). Im Gegensatz dazu, führte die BIX-Behandlung junger Ad-MSCs mit anschließender Differenzierung nicht zu einer Veränderung der AP-Aktivität in OLCs (Abbildung 30a). Ferner zeigten unsere Ergebnisse eindeutig, dass die Vorbehandlung von Ad-MSCs mit AZA die AP-Aktivität in OLCs in beiden Altersgruppen nicht verbessert (Mittelwert \pm Standardfehler, $N = 4$, $n = 4$).

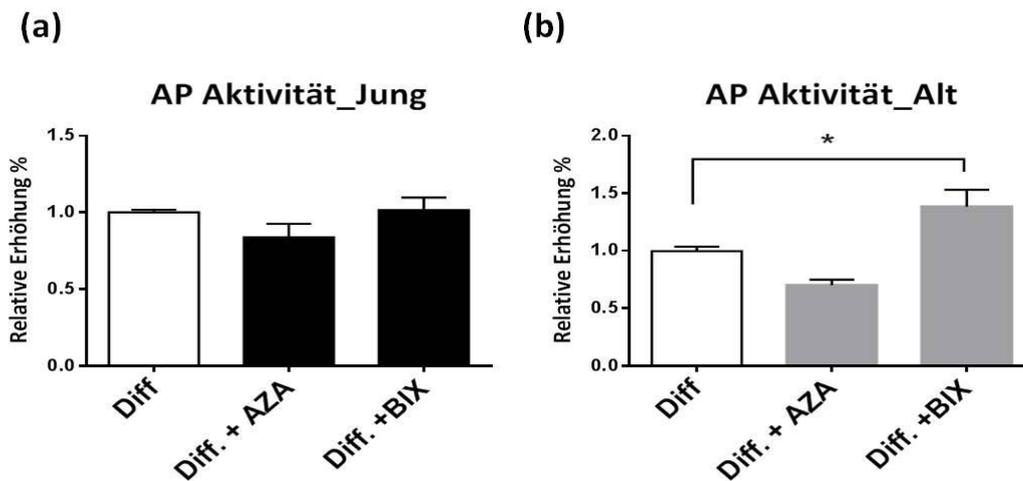


Abbildung 30: Osteogene Differenzierung: Die BIX-Vorbehandlung hat die AP-Aktivität alter OLCs signifikant verbessert.

3.7.3 Altersbedingte Abschwächung der ECM-Mineralisierung

Am Ende der 14-tägigen Differenzierung zeigte sich, dass die Intensität der Alizarin Rot-Färbung und der von Kossa-Färbung in alten OLCs signifikant schwächer waren. Alizarin Rot: Jung: $659,4 \pm 123,1$; Alt: $245,7 \pm 69,14$ $\mu\text{g/L}$ Alizarin Rot, $**P = 0,0081$; von Kossa: Jung: $202,4 \pm 5,285$; Alt: $148,8 \pm 7,280$, $***P < 0,0001$; (Mittelwert \pm Standardfehler, $N = 4$, $n = 3$). Wir können ausgehen, dass die Mineralisierung der ECM mit zunehmendem Alter des Spenders signifikant abgeschwächt wurde (Abbildung 31).

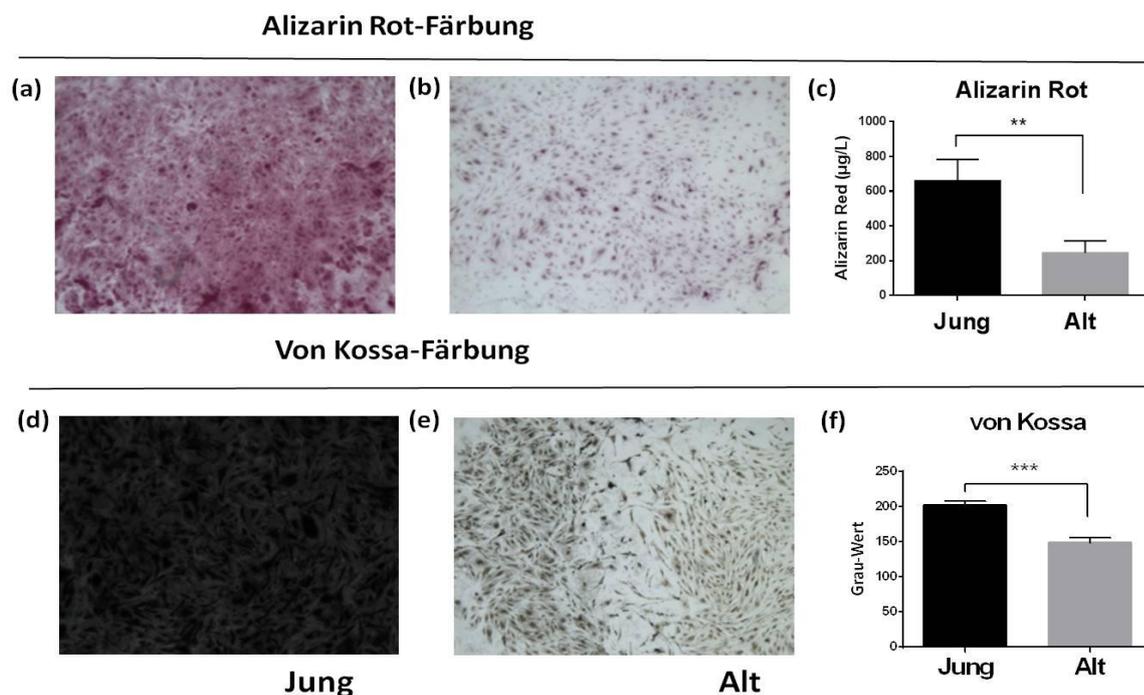


Abbildung 31: Osteogene Differenzierung: Die altersbedingte Abschwächung der ECM-Mineralisierung in OLCs

3.7.4 Die Vorbehandlung mit AZA und BIX verbessert die ECM-Mineralisierung alter OLCs

Im Vergleich zu den OLCs, die ohne Vorbehandlung mit AZA und BIX aus Ad-MSCs entwickelt wurden. Die vorbehandelten OLCs aus beiden Altersgruppen zeigten eine deutlich verstärkte Mineralisierung an. In jungen OLCs wurde die Alizarin Rot-Färbung durch die AZA-Vorbehandlung auf $1,60 \pm 0,29$ -fach ($P = 0,0745$), durch die BIX-Vorbehandlung auf das $2,40 \pm 0,65$ -fach ($*P = 0,0475$) von den unbehandelten OLCs verstärkt (Abbildung 32a). In alten OLCs wurde die Mineralisierung weiter verstärkt. Die Alizarin Rot-Färbung in alten OLCs wurde durch die AZA-Vorbehandlung auf $9,53 \pm 4,6$ -fach ($*P = 0,0363$), und durch die BIX-Vorbehandlung auf das $5,69 \pm 3,06$ -fache ($P = 0,1309$) im Vergleich zu unbehandelten OLCs verstärkt (Abbildung 32b), (Mittelwert \pm Standardfehler; $N = 4$, $n = 3$). Die von Kossa-Färbung hat eine ähnliche Verbesserung der Mineralisierung durch AZA und BIX in alten OLCs gezeigt (Abbildung 32c); ($N = 4$, $n = 3$).

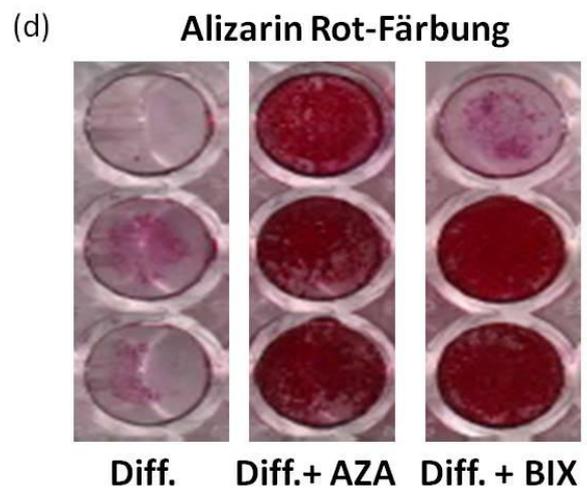
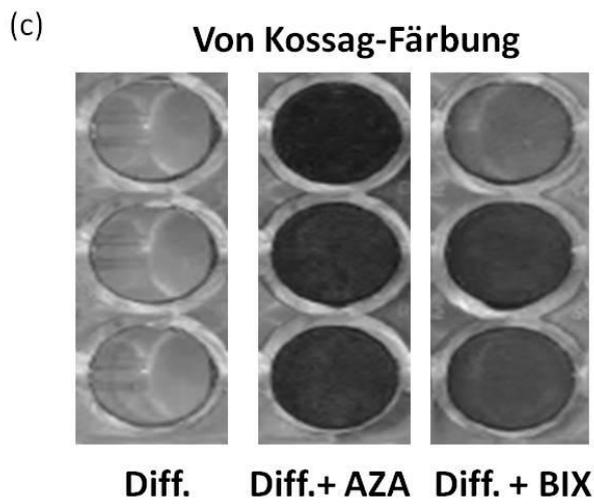
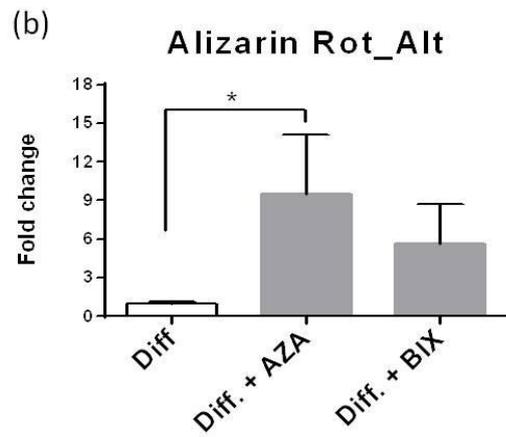
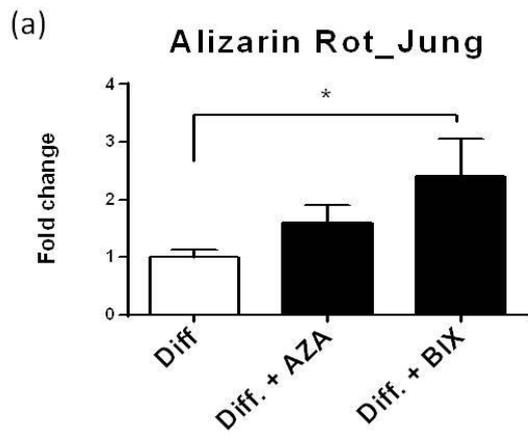


Abbildung 32: Osteogene Differenzierung: Die Vorbehandlung mit AZA und BIX hat die Mineralisierungskapazität der OLCs verbessert.

4 Diskussion

Viele Gesellschaften sehen sich vermehrt mit einer zunehmend überalterten Bevölkerung konfrontiert, wodurch die so genannten altersbedingten Erkrankungen zunehmen. Dies führt aktuell zu einem Umdenken hinsichtlich neuer chirurgischer Behandlungsstrategien oder in der Medikamentenentwicklung.

Die Zelltherapie hat in den vergangenen zehn Jahren vermehrt die Hoffnung genährt, dass ein breites Spektrum altersbedingter Krankheiten geheilt oder zumindest in ihrem Verlauf positiv beeinflusst werden kann. Basierend auf dieser Vorstellung wurden neue Behandlungsstrategien erdnen, die jedoch bisher nur zu einem sehr geringen Teil umgesetzt werden konnten.

Die Zelltherapie wurde insbesondere bei folgenden Indikationen als sinnvoll angesehen: Knochenheilung, Lebererkrankungen, Defekte in der Hämatopoese, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes Mellitus, neurodegenerative Erkrankungen, Muskelerkrankungen, Autoimmunkrankheiten, Trauma des Rückenmarks, und auch bei verschiedenen Tumoren. Schätzungen zufolge gibt es allein in den USA schon über 100 Mio. Patienten, die potenziell durch Zelltherapie behandelt werden könnten. (Kuo *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2011; Strauer und Steinhoff, 2011). Stammzellen können entweder als ‚integrierte‘ Teilnehmer direkt bei der Wiederherstellung von Geweben/Organfunktionen mitwirken, oder als Träger funktionieren, die bestimmte Signalkomplexe zu den Zielgeweben transportieren, ohne sich tatsächlich in die Gewebe zu integrieren (Daley und Scadden, 2008). Unter Berücksichtigung von Sicherheitsaspekten und der immunologischen Toleranz, ist eine so genannte „autologe“ Stammzelltransplantation, die am meisten zu begünstigende Transplantationsform. Bei einer autologen Stammzelltherapie werden funktionelle Stammzellen von einzelnen Patienten entnommen, dann jedoch *in vitro* kultiviert, expandiert, und entsprechend der therapeutischen Strategie dem Spender wieder zugeführt (Perin, 2005). Die meisten Zielkrankheiten der autologen Stammzelltransplantation, stehen jedoch in einem engen Bezug zum ansteigenden Alter der Patienten. Dabei wurde entdeckt, dass die adulten Stammzellen selbst einem Alterungsprozess unterliegen (Dimmeler und Leri, 2008; Rando und Chang, 2012).

Altersbedingte Schädigungen von Stammzellenfunktionen in Ad-MSCs

Proliferation: Grundsätzlich haben unsere Ergebnisse gezeigt, dass die Stammzellfunktionen von Ad-MSCs altersabhängig sind, und von den jeweiligen Kulturbedingungen beeinflusst werden können. Viele Faktoren wirken sich auf diese Proliferationskapazität von MSCs aus; wie etwa die Anwesenheit spezifischer Wachstumsfaktoren wie z.B. Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2), was zu einer erhöhten Verdoppelungsrate von MSCs führt (Rodriguez *et al.*, 2002; Bianchi *et al.*, 2003). Ferner spielt die Zelldichte bei der Proliferation von MSCs eine wichtige Rolle. Eine niedrige Zelldichte (100 Zellen/cm²) führt zu einer schnelleren Wachstumsrate der MSCs als eine höhere Zellkultur-dichte (5000 Zellen/cm²) (Colter *et al.*, 2000; Both *et al.*, 2007). Zusätzlich haben wir und andere Arbeitsgruppen zeigen können, dass weitere Faktoren, wie zum Beispiel autologes Serum oder hypoxische Bedingungen, die Proliferation von MSCs zusätzlich fördern können (Yilmaz *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2012). Basierend auf diesen Tatsachen wurde eine ‚Standard Operating Procedure‘ erarbeitet, und bei allen Versuchen verwendet. Für die hepatische und die osteogene Differenzierung wurden 10000 Zellen/cm² ausplattiert und unter standardisierten Mediumbedingungen (Medium plus Antibiotika plus Serum) kultiviert, um ein standardisiertes Wachstum der Zellen zu gewährleisten.

Neben den Kulturbedingungen wird die Zellproliferation von Ad-MSCs aber auch vom Alter des Spenders beeinflusst. Dies wiederum hat sehr wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluss auf deren Regenerationskapazität. Wir haben hier eindeutig zum ersten Mal unter standardisierten Bedingungen zeigen können, dass sich die Proliferationsfähigkeit und die Regenerationskapazität von Ad-MSCs mit zunehmendem Alter abschwächen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass MSCs einzelner Spender nach mehreren Passagen eine reduzierte Proliferationskapazität aufweisen (Yew *et al.*, 2011). Dies wird vor allem mit der Theorie der Telomerlänge erklärt, welche bekanntlich im Alter verkürzt ist (Kveiborg *et al.*, 1999; Sharpless, 2010). Allerdings wurde ebenfalls berichtet, dass die Telomerlänge von MSCs nicht vom ursprünglichen Alter der Spender abhängt. Es wurde jedoch nur eine sehr schwache Telomeraseaktivität überhaupt beobachtet (Parsch *et al.*, 2004). In unseren Versuchen wurden alle Spenderzellen in Passage 3 verwendet. Dadurch können wir die Effekte der ‚künstlichen‘ Zellalterung durch kontinuierliche Subkultivierung ausschließen.

Pluripotenzmarker

Pluripotenzmarker unterscheiden sich signifikant zwischen jungen und alten Ad-MSCs. Die Gene *OCT4* und *NANOG* sind in alten Ad-MSCs auffällig niedrig exprimiert. *OCT4* (auch bekannt als *POU domain transcription factor*) ist einer der ersten entdeckten Transkriptionsfaktoren, der entscheidend für die Entwicklung und Differenzierung der ESCs ist (Nichols *et al.*, 1998). Es ist im Embryoblast (*inner cell mass*) exprimiert und spielt als Regulator bei der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle (Nichols *et al.*, 1998; Babaie *et al.*, 2007). Das Homöoboxprotein *NANOG* wurde erst später entdeckt. Es ist ebenfalls verantwortlich für die Pluripotenzhaltung im Embryoblast und wird im Differenzierungsprozess zum Erwachsenewebe allmählich herunterreguliert (Chambers *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2004). In BM-MSCs wurden ähnliche Expressionsmuster von *OCT4* und *NANOG* wie in den ESCs festgestellt. In der undifferenzierten Phase von MSCs, reguliert *OCT4* die Gene der basalen Stammzellfunktionen (*Notch1*, *Wnt1*, *FoxD3*, β -Catenin, *HDAC1*, und *Myst1*) und ist für die mesodermale Linien-spezifische Differenzierung (*MYF5*, *SOX9* und *PH4*) verantwortlich. Ein ‚knock-down‘ von *OCT4* führt zu erheblichen Änderungen in der Zellmorphologie (Greco *et al.*, 2007). Ferner hat *OCT4* in MSCs einen Einfluss auf die Expression von *NANOG* und *SOX2* (Boiani und Scholer, 2005).

Die ektopische Überexpression von *Oct4* und *Nanog* fördert die Proliferation und Chondrogenese von MSCs. Die adipogene Differenzierung wird jedoch interessanterweise von einer *Oct4*-Überexpression umgekehrt beeinflusst (Liu *et al.*, 2009). Kürzlich wurde berichtet, dass eine erhöhte Expression von *Oct4* und *Nanog* die Proliferation und das Differenzierungspotenzial in der frühen Passage von MSCs positiv beeinflusst. Erklärt wird dies mit einer Hochregulierung von *Dnmt1* in den späteren Passagen der MSCs (Tsai *et al.*, 2012).

LIN28 ist ein post-transkriptionaler Regulator für eine Untergruppe von *let-7* mRNAs und verhält sich wie ein ‚Repressor‘ für die Expression der microRNA (miRNA). Es wurde gezeigt, dass *Lin28* die Expression von *Oct4* fördert (Piskounova *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2010). miRNAs sind kleine Transkripte, die die Entwicklung von Organismen und Alterungsprozesse beeinflussen (Ibanez-Ventoso *et al.*, 2006). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass miRNAs an altersbedingten Erkrankungen wie z. B. dem Katarakt, beteiligt sind (Peng *et al.*, 2012). Die Expression von *LIN28* wurde in BM-MSCs und MSCs aus der Plazenta nachgewiesen (Jaramillo-Ferrada *et al.*, 2012). Unsere Daten zeigen zum ersten Mal eindeutig, dass die *LIN28A*-Genexpression in adipösen MSCs im Alter reduziert ist. Deshalb gehen wir

davon aus, dass LIN28A in der Zellalterung eine wichtige Rolle spielen könnte. Ferner haben wir beobachtet, dass *LIN28A* sowohl in jungen als auch in alten Ad-MSCs höher exprimiert ist als die anderen untersuchten Pluripotenzgene. Weitere Versuche werden jedoch notwendig sein, um die genauen funktionellen Mechanismen von LIN28 und der miRNA-Regulierung in Ad-MSCs sowie deren mögliche Altersabhängigkeit zu untersuchen.

Unsere Analyse von SOX2 hat in erster Linie gezeigt, dass dieses Gen in Ad-MSCs im Allgemeinen sehr niedrig exprimiert ist, und in einigen Spendern nicht nachweisbar war. Im Gegenteil zur Expression anderer Pluripotenzmarker, war *SOX2* jedoch in den alten Ad-MSCs stärker exprimiert als in den jungen. Es wurde berichtet, dass SOX2 in humanen ESCs in Zusammenarbeit mit Oct4 und Nanog für die Pluripotenzerhaltung verantwortlich ist (Fong *et al.*, 2008; Sikorska *et al.*, 2008). Die Datenlage zu SOX2 in MSCs ist jedoch relativ unklar. So zeigten z. B. Yoon *et al.*, dass eine bestimmte Population von so genannten ‚primitiven‘ Zellen in späteren Passagen von MSCs, eine vergleichbare Sox2-Expression wie MSCs aus den früheren Passagen besitzen. SOX2 Knock-down-Experimente führten zu einer signifikanten Schädigung und Reduzierung der Proliferation sowie der Multipotenz in BM-MSCs. Daraus schloss diese Arbeitsgruppe, dass die Regulierung von Sox2 in MSCs auch von der Zellzahl abhängen könnte (Yoon *et al.*, 2011). Somit könnte SOX2 die osteogene Differenzierung verschlechtern. In einem anderen Bericht wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass die osteogene und chondrogene Differenzierung durch SOX2 Knock-down MSCs verbessert wurde (Park *et al.*, 2012).

Differenzierung

Die osteogene Differenzierung gehört zu den spontanen Differenzierungspotenzialen der Ad-MSCs, da sie eine mesenchymale Herkunft haben. D'Ippolito *et al.* haben bereits 1999 berichtet, dass die Zellzahl der BM-MSCs mit einem osteogenen Potenzial (CFU-F/ALP+) mit steigendem Alter abnimmt, was zu einer altersbedingten Verminderung induzierter Osteoblasten führen könnte (D'Ippolito *et al.*, 1999). Eine andere Arbeit zeigt jedoch, dass die osteogene Differenzierung der Ad-MSCs nicht so stark vom Alter des Spenders beeinflusst wird, wie jene der BM-MSCs (Chen *et al.*, 2012). In unseren Versuchen haben wir dennoch zeigen können, dass Ad-MSCs alter Spender über eine verzögerte und unvollständige osteogene Differenzierung verfügen. Das Differenzierungspotenzial von MSCs wird während ihrer Alterung von der osteogenen Differenzierung hin zur adipogenen Differenzierung verschoben (Kim *et al.*, 2012).

Es ist bereits gezeigt worden, dass SOX2 die Adipogenese in MSCs fördert, während es die osteogene Differenzierung hemmt (Park *et al.*, 2012).

Die hepatische Differenzierung der Ad-MSCs wird als Transdifferenzierung bezeichnet. Durch unser hepatisches Differenzierungsprotokoll werden Ad-MSCs morphologisch und funktionell zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen differenziert (Seeliger *et al.*, 2012). Die differenzierten HLCs können sich *in vivo* teilweise in das Parenchym der Leber integrieren und somit zum Teil die Leberfunktion in experimentellen Krankheitsmodellen verbessern (Banas *et al.*, 2007). Unsere Daten haben eindeutig gezeigt, dass Hepatozyten-ähnliche Zellen aus alten Ad-MSCs eine reduzierte metabolische Aktivität (Glukoneogenese, Harnstoffbildung, Phase I und Phase II) besitzen. In unseren experimentellen Ansätzen haben wir zum ersten Mal nachgewiesen, dass das Spenderalter auch die hepatische Transdifferenzierungskapazität von Ad-MSCs beeinflussen kann.

Die molekularen Mechanismen der Transdifferenzierung von Ad-MSCs in Hepatozyten-ähnliche Zellen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Mesenchymal-Epithelial-Transition (MET) an der möglichen Transdifferenzierung von Ad-MSCs beteiligt ist, da Hepatozyten-ähnliche Zellen aus Ad-MSCs eine höhere Expression des Epithelialmarkers E-cadherin aufweisen als undifferenzierte Ad-MSCs (Yamamoto *et al.*, 2008). Der gegensätzliche Prozess von MET, die Epithelium-Mesenchymal-Transition (EMT), ist ein zentraler Mechanismus in der Tumorprogression und Metastasierung, welcher durch die Blockierung der oncogen-induzierten Alterung initiiert wird (Laberge *et al.*, 2012) (Weinberg, 2008). Ob die MET jedoch auch an der Zellalterung der Ad-MSCs beteiligt ist, ist noch nicht näher erforscht.

Modifikationen von alten Ad-MSCs durch AZA und BIX

Wir haben vor Kurzem nachgewiesen, dass AZA und BIX bei bestimmten Konzentrationen und Behandlungszeiten die genomische DNA-Methylierung von Ad-MSCs generell reduzieren kann (Seeliger *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung in alten Ad-MSCs eine signifikant erhöhte Expression von 5-Methylcytosin (5mC), ein Marker für die DNA-Methylierung nachgewiesen. Die Proliferation der alten Ad-MSCs wurde nur durch AZA (5 μ M-48h) erhöht, während in jungen Ad-MSCs nach der Behandlung mit AZA und BIX eine Inhibition der Proliferation zu beobachten war. Ferner konnten wir zeigen, dass die Behandlungen von alten Ad-MSCs mit AZA und BIX deren Stammzellcharakteristika

signifikant modifiziert. So wurden die Pluripotenzgene *OCT4*, *NANOG* und *LIN28A* in jungen und alten Ad-MSCs durch die Behandlungen mit AZA und BIX hochreguliert. Die Genexpression von *OCT4* und *NANOG* wurde in alten Ad-MSCs durch die BIX-Behandlung (0,2 μ M-48h) hochreguliert, während *LIN28A* in alten Ad-MSCs durch die beide Behandlungen signifikant stärker exprimiert wurde. Auch die geschädigte Differenzierungskapazität in alten Ad-MSCs wurde durch die Behandlung von AZA und BIX verbessert. Diese Ergebnisse suggerieren, dass das niedrigere Pluripotenzpotential alter Ad-MSCs durch die Behandlung mit AZA und BIX reaktiviert wurde, indem ihr DNA-Methylierungsstatus herunterreguliert wurde.

In den MSCs wurden einige unmethylierte Promoterbereiche auf linienspezifischen Genen entdeckt, die ähnliche Aufgaben besitzen wie sie bei der Zellentwicklung von ESCs zu finden sind (Sorensen *et al.*, 2010). Gewebsspezifische Untersuchungen für die DNA-Methylierung haben gezeigt, dass der DNA-Methylierungszustand nicht nur große Unterschiede zwischen verschiedenen Gewebetypen, z. B. zwischen dem Fett und der Leber, aufweist, sondern auch vom Alter des Spenders abhängig ist (Thompson *et al.*, 2010). Deshalb scheint es notwendig zu sein, den DNA-Methylierungsstatus an speziellen Promoterbereichen der Pluripotenzgene zu analysieren, um den Zusammenhang zwischen dem Alter und der Differenzierungskapazität von MSCs besser zu verstehen.

BIX 01294 war ursprünglich als ein spezifischer Inhibitor der G9a HMTase charakterisiert worden (Kubicek *et al.*, 2007). Diese klein-molekulare Chemikalie wurde als Ersatz für Oct-4 in der Erzeugung von iPSCs verwendet, um die Effizienz der Induktion der Pluripotenz zu erhöhen (Medvedev *et al.*, 2011) (Shi *et al.*, 2008). Diese Reprogrammierung verlangt eine höhere Konzentration von BIX (> 0,5 μ M) in somatischen Zellen. In unseren Versuchen wurden Pluripotenzmarker erhöht und die osteogene Differenzierung in alten Ad-MSCs bereits bei niedrigen BIX-Konzentrationen verbessert. Dies hat den Vorteil, dass das Tumorrisiko in Ad-MSCs, das bei höheren Konzentrationen von BIX erhöht ist, reduziert wird.

5-Azacytindin (AZA) ist bekannt für seine Inhibition von DNMT1 und DNMT3a, die für die Methylierung der DNA verantwortlich sind (Pali *et al.*, 2008). In den vergangenen Jahren wurden jedoch auch andere Funktionen der DNMTs identifiziert. So wurde gezeigt, dass DNMTs auch gegen die Zellalterung wirken können. So und Kollegen haben gezeigt, dass die Inhibition von DNMT1 und DNMT3b die Alterung von Nabelschur-MSCs induziert (So *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Dnmt1-Expression im Mausgehirn mit zunehmendem Alter abnimmt (Dzitoyeva *et al.*, 2012). Daher erscheint es uns nicht ausreichend

zu sein, die Verbesserung der Stammzellfunktion durch die Demethylierung der alten Ad-MSCs nach der Behandlung mit AZA allein durch deren Wirkung als DNMT-Inhibitor zu erklären. Deswegen haben wir versucht, den DNA-Demethylierungsstatus auch mittels der Änderung der DNA-Hydroxymethylierung zu analysieren (Tollervey und Lunyak, 2012).

DNA-Hydroxymethylierung

Die Hydroxymethylierung ist ein Schlüsselprozess in der DNA-Demethylierung. 5hmC ist einer der wichtigsten Marker in diesem Prozess (Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010). Es kann sowohl zusammen mit den DNMTs die passive DNA-Demethylierung fördern, als auch bei der aktiven DNA-Demethylierung mitwirken (Valinluck und Sowers, 2007; Cimmino *et al.*, 2011).

5hmC findet man hauptsächlich in embryonalen Stammzellen und in neuronalen Geweben (Ruzov *et al.*, 2011). Unsere Versuche haben zum ersten Mal die Existenz von 5hmC in MSCs gezeigt. Darüber hinaus ist die Expression von 5hmC in alten Ad-MSCs signifikant niedriger als in den jungen. Über die direkte Verbindung zwischen der DNA-Hydroxymethylierung und dem Alterungsprozess liegen bisher noch keine Berichte vor. Es wurde nur in einer einzigen Arbeit gezeigt, dass die 5hmC-Expression auf der mitochondrialen DNA im Mausgehirn mit zunehmenden Alter abnimmt (Chouliaras *et al.*, 2012; Dzitoyeva *et al.*, 2012). Die 5mC-5hmC Umwandlung fördert die DNA-Demethylierung und wirkt bei der Aufrechterhaltung der Stammzellfunktion in ESCs mit (Ito *et al.*, 2010). Somit könnte die reduzierten 5hmC-Expression in alten Ad-MSCs deren abgeschwächte Stammzellfunktionen erklären.

Die *TET*-Proteine sind die Katalase für die 5mC-5hmC Umwandlung. Ito *et al* haben WT (Wild Type) *TET1*, *TET2* und *TET3* von Menschen und Mäusen sowie ihre katalytische Mutanz untersucht. Dabei haben sie festgestellt, dass all diese *TET*-Proteine fähig waren, *in vitro* das 5mC zu 5hmC umzuwandeln. Danach wurde das 5hmC zu 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC) umgesetzt und anschließend von unmethyliertem Cytosin umgewandelt (Ito *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2011). In alten Ad-MSCs haben wir eine verringerte Expression von *TET1* und *TET3* beobachtet, während die *TET2*-Genexpression nicht vom Spenderalter beeinflusst wurde. Bisher ist *TET1* das am besten erforschte Enzym der *TET*-Proteinfamilie. Es wurde als die Hauptkatalase während der DNA-Hydroxymethylierung in ESCs identifiziert (Cimmino *et al.*, 2011). Die Rolle von *TET3* in Ad-MSC ist noch gar nicht erforscht worden. Es wurde nur in einigen Untersuchungen berichtet, dass *TET3* in den Oozyten und Zygoten am höchsten exprimiert. Dort vermehrt *TET3* die 5hmC-Expression erheblich (Gu *et al.*, 2011). In

diesem Versuch entspricht die reduzierte Expression von *TET1* und *TET3* in alten Ad-MSCs der niedrigeren 5hmC-Expression. *TET2* wurde meistens in der Tumorgenese des hämatopoetischen Systems beobachtet. Der Verlust der *TET2*-Expression führte zur Tumorprogression in der myeloischen Leukämie (Albano *et al.*, 2011; Chou *et al.*, 2011). In Ad-MSCs wurde kein signifikanter altersbedingter Unterschied beobachtet.

Die Behandlung mit AZA und BIX hat zu einer komplizierteren Veränderung der *TET*-Genexpression geführt: In jungen Ad-MSCs sind *TET1* und *TET2* durch BIX höher exprimiert, während diese Erhöhung von *TET1* und *TET2* in alten Ad-MSCs nach der AZA-Behandlung beobachtet wurde. *TET3* wurde durch die beiden Behandlungen um ein Vielfaches höher exprimiert, und zwar in alten stärker als in jungen Ad-MSCs. Die Erhöhung der *TET1*-Expression war in den alten Ad-MSCs jedoch sehr eingeschränkt. Bei AZA 20 µM 24h wurde sie sogar herunterreguliert. Eine solch unterschiedliche Reaktion der *TET*-Genexpression auf die Behandlung mit AZA und BIX weist daraufhin, dass *TET1*, *TET2* und *TET3* durch unterschiedliche Mechanismen die 5mC-5hmC Umwandlung katalysieren. Es ist ebenfalls möglich, dass diese Enzyme in der epigenetischen Regulierung über andere Wirkungen verfügen. *TET2* und *TET3* haben eine wichtigere Wirkung auf die epigenetische Regulierung der Zellalterung als *TET1*. Aufgrund der Theorie der passiven DNA-Demethylierung nehmen wir an, dass wegen der direkten und indirekten Hemmung der DNMTs durch die Behandlung mit AZA und BIX, die *TET*-Proteine mehr 5mC erkennen können, wodurch mehr 5hmC entstehen würde, was zur Demethylierung führen könnte (Abbildung 33).

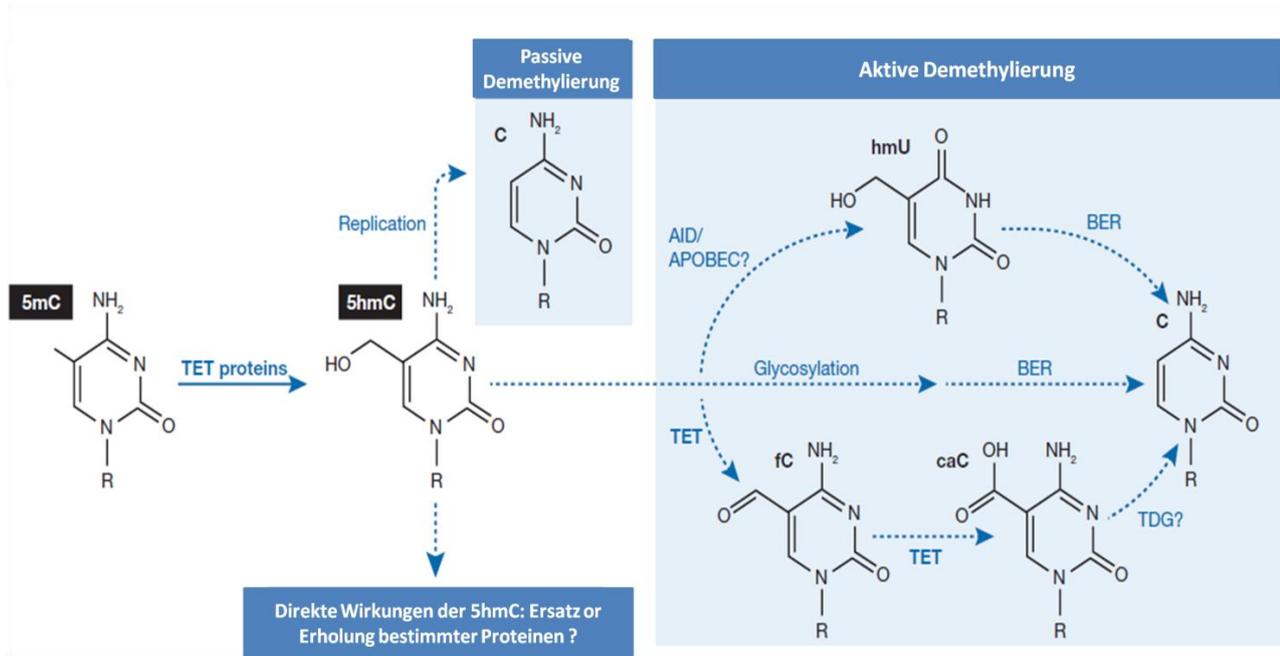


Abbildung 33: Die Rolle der 5hmC und TET Proteine in der passiven und aktiven DNA-Demethylierung (Williams *et al.*, 2012)

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stammzellfunktionen der humanen Ad-MSCs mit zunehmenden Spenderalter sich verschlechtert. Die reduzierte Expression der Pluripotenzmarker (NANOG, OCT4 und LIN28) in alten Spendern stimmt mit deren verschlechterten Proliferation und Differenzierungskapazität überein. Es ist nötig und auch interessant, weiter zu erforschen, was für eine Rolle SOX2 in der Selbsterneuerung und Differenzierung der Ad-MSCs spielt, da dieser Transkriptionsfaktor mit zunehmendem Alter vermehrt exprimiert wurde. Zweitens wurde es erstmals im Rahmen der Epigenetik festgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen dem DNA-Demethylierungsstatus und dem Alterungsprozess der Stammzellen existiert. AZA und BIX-Behandlungen können die Differenzierungskapazität verbessern, davon haben hauptsächlich die Ad-MSCs aus alten Spendern profitiert. Dieser einfache Einsatz von niedermolekularen Chemikalien stellt ein großes Potenzial für der autologen Zelltherapie dar. Da die Patienten mit regenerativen Defekten meistens in höherem Alter sind, erscheint es daher sinnvoll, deren Ad-MSCs mit Hilfe epigenetischer Inhibitoren *in vitro* oder selbst *in vivo* zu verjüngen respektive deren Regenerationskapazität zu stimulieren.

II. Zusammenfassung

Die humanen mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (Ad-MSCs) sind eine ideale Quelle für die autologe Zelltherapie zur Behandlung vieler Erkrankungen. In früheren Versuchen wurde häufig eine Verschlechterung Differenzierungspotenziale der MSCs beobachtet, die durch das zunehmende Alter der Spender oder durch replikative Zellalterung bedingt sein kann. In unseren Versuchen wurden Einflüsse der Alterung auf die Stammzellfunktionen und des epigenetischen Status der Ad-MSCs untersucht. Danach wurden diese Zellen mit den klein-molekularen Chemikalien 5-Azacytidin (AZA) und BIX 01294 (BIX) behandelt, um die altersbedingte Funktionsverschlechterung epigenetisch zu verhindern und ihre Funktionen wieder zu verbessern.

Ad-MSCs wurden je nach dem Alter des Spenders in die Gruppen ‚jung‘ (< 45 Jahre) und ‚alt‘ (> 60 Jahre) eingeteilt. In den beiden Gruppen wurde ihre Proliferation mittels Ki 67-Färbung, und ihre Selbsterneuerungskapazität durch qPCR-Messung der Pluripotenzgenexpression (*NANOG*, *OCT-4*, *LIN28A*, *SOX2*) bestimmt. Danach wurde ihr hepatisches und osteogenes Differenzierungspotential durch entsprechende funktionelle Messungen beurteilt. Zur Bewertung der epigenetischen Mechanismen der Ad-MSCs wurden die DNA-Demethylierungsmarker 5hmC und 5mC sowie die Expression der TET-Gene untersucht.

Die jungen und die alten Ad-MSCs unterschieden sich in mehreren Aspekten voneinander: die Proliferation und die Expression der Pluripotenzmarker (*NANOG*, *OCT-4*, *LIN28A*) waren in alten Ad-MSCs reduziert. Dementsprechend waren ihre osteogenen und hepatischen Funktionen nach der Differenzierung schwächer als in den jungen Ad-MSCs. Die einzige Ausnahme bildete *SOX2*, das mit zunehmendem Alter höher exprimiert war. Darüber hinaus wurden in alten Ad-MSCs eine höhere Expression von 5mC und eine niedrigere Expression von 5hmC beobachtet. Die Expression von *TET1* und *TET3* war in den alten Ad-MSCs ebenfalls höher. Nach der Behandlung mit AZA und BIX, waren die Proliferation und die Expression von *NANOG*, *OCT-4*, *LIN28A* erhöht, während die *SOX2*-Expression niedriger war. Danach wurde eine signifikante Verbesserung der osteogenen und hepatischen Differenzierungen festgestellt. Der zugrunde liegende Demethylierungsprozess wurde auch durch diese Behandlung modifiziert. Die Expression von 5hmC war nach der Behandlung mit AZA und BIX in alten Ad-MSCs erhöht, während jene 5mC-Expression durch die AZA-Behandlung reduziert war. *TET2* und *TET3* wurden durch die Behandlungen mit AZA und BIX signifikant höher exprimiert. Zusammenfassend lassen sich die folgenden Ergebnisse festhalten: Die Zellalterung führt zu einem Verlust der Stammzellfunktion der Ad-MSCs. Die verringerte DNA-Demethylierung ist

im Alterungsmechanismus der MSCs von großer Bedeutung. Die Behandlung mit AZA und BIX könnte eine einfache und leistungsstarke Modifikationsmethode sein, um Ad-MSCs mit Alterungsproblemen zu verjüngen, damit sie in der potenziellen klinischen Anwendung ihre Wirkung optimal entfalten können.

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Das selbst geschriebene Macro der Quantifikationsalgorithmus für Immunfluoreszenz-Färbung	33
Tabelle 2 Reaktionsrezept der RT-PCR	35
Tabelle 3 Die verwendeten Primersequenzen	35
Tabelle 4 Laufprogramm für die RT-PCR	36
Tabelle 5 Übersicht über die hepatische Differenzierung	37
Tabelle 6 Untersuchte Phase I/II Enzyme und die verwendeten Substrate	39
Tabelle 7 Der Anteil der Ki 67-positiven Ad-MSCs nach den Behandlungen mit AZA und BIX	47
Tabelle 8 Die Quantifizierung der 5hmC- und 5mC-Färbung ohne/nach der Behandlung mit AZA und BIX	53
Tabelle 9 Hepatische Differenzierung: Altersbedingte Abschwächung der Phase I / II Basalaktivität	61
Tabelle 10 Hepatische Differenzierung: Verbesserung der Phase I /II Enzymaktivität der HLCs durch AZA-Vorbehandlung.	错误！未定义书签。

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die unterschiedlichen Arten von Stammzellen und ihre Herkunft	5
Abbildung 2 Das therapeutische Anwendungspotenzial der MSCs	7
Abbildung 3 Chemische Strukturen der L-Ascorbinsäure, des β -Glycerolphosphats und des Cholecalciferols.....	11
Abbildung 4 Umwandlung der DNA-Methylierung durch Hydroximethylierung zur Demethylierung	16
Abbildung 5 Schematische Darstellung der drei TET-Proteine.	17
Abbildung 6 Die chemische Struktur von 5-Azacytidin	18
Abbildung 7 Die chemische Struktur von BIX 01294.....	18
Abbildung 8 Der Versuchsaufbau dieses Projekts.....	20
Abbildung 9 Standardkurven der untersuchten enzymatischen Produkte	40
Abbildung 10 Alkaline Phosphatase katalysiert die Umwandlung von pNPP zu p-Nitrophenol	41
Abbildung 11 Standardkurve der AP-Aktivität	42
Abbildung 12 Standardkurve der Alizarin Rot/Cetylpyridiniumchlorid -Lösung.....	44
Abbildung 13 Der Immunophänotyp der isolierten Ad-MSCs in Passage 3.	45
Abbildung 14 Immunfärbung für Ki67: Altersbedingte Unterschied in Proliferation der Ad-MSCs.....	46
Abbildung 15 Die Veränderungen der Proliferation der Ad-MSCs durch die Behandlungen mit AZA und BIX	46
Abbildung 16 Altersbedingte Unterschiede von Pluripotenzmarkern in Ad-MSCs.....	48
Abbildung 17 Die Veränderung der Pluripotenzmarker nach der Behandlung mit AZA und BIX	50
Abbildung 18 Altersbedingte Unterschiede der Expression von 5hmC (a) und 5mC (b) in Ad-MSCs.....	51
Abbildung 19 Die Verteilung von 5mC und 5hmC mit und ohne Behandlungen mit AZA und BIX.....	52
Abbildung 20 Die Veränderung der Expression von 5hmC und 5mC in jungen und alten Ad-MSCs.	54
Abbildung 21 Altersbedingte Unterschied der Genexpression von TET Familie.....	55
Abbildung 22 Die Veränderung der TET-Genexpression nach den Behandlungen mit AZA und BIX in jungen und alten Ad-MSCs.....	56
Abbildung 23 Hepatische Differenzierung:Die Harnstoffproduktion der HLCs aus jungen und alten Spendern.....	57
Abbildung 24 Hepatische Differenzierung: Verbesserung der Harnstoffproduktion in HLCs nach der AZA-Behandlung in alten Ad-MSCs.....	58
Abbildung 25 Hepatische Differenzierung:Der altersbedingte Unterschied der Glukoseproduktion der Ad-MSCs..	59
Abbildung 27 Hepatische Differenzierung: Altersbedingte Abschwächung der Phase I / II Enzymaktivität in HLCs.	61
Abbildung 29 Osteogene Differenzierung: Der altersbedingte Unterschied der AP-Aktivität in OLCs	64
Abbildung 30 Osteogene Differenzierung: Die BIX-Vorbehandlung hat die AP-Aktivität alter OLCs verbessert.	65
Abbildung 31 Osteogene Differenzierung: Der altersbedingte Abschwächung der ECM-Mineralisierung in OLCs ...	66
Abbildung 32 Osteogene Differenzierung: Die Vorbehandlung mit AZA und BIX hat die Mineralisierungskapazität der OLCs verbessert.	67
Abbildung 33 Die Rolle der 5hmC und TET Proteine in der passiven und aktiven DNA-Demethylierung	76

V. Literaturverzeichnis

- Albano, F., Anelli, L., Zagaria, A., Coccaro, N., Minervini, A., Rossi, A. R. und Specchia, G. (2011). Decreased TET2 gene expression during chronic myeloid leukemia progression. *Leuk Res* 35(11): e220-222.
- Ao, A., Hao, J. und Hong, C. C. (2011). Regenerative chemical biology: current challenges and future potential. *Chem Biol* 18(4): 413-424.
- Armanios, M. (2009). Syndromes of telomere shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 45-61.
- Aurich, H., Sgodda, M., Kaltwasser, P., Vetter, M., Weise, A., Liehr, T., Brulport, M., Hengstler, J. G., Dollinger, M. M., Fleig, W. E. und Christ, B. (2009). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58(4): 570-581.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. und Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17(1): 126-140.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T. C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T. und Adjaye, J. (2007). Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25(2): 500-510.
- Baksh, D., Song, L. und Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8(3): 301-316.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H. und Ochiya, T. (2007). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 46(1): 219-228.
- Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. und Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo Journal* 22(16): 4212-4222.
- Berdasco, M. und Esteller, M. (2011). DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Res Ther* 2(5): 42.

- Berdasco, M. und Esteller, M. (2012). Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011. *Aging Cell* 11(2): 181-186.
- Bethesda, M. (2009). Stem Cell Basics. In Stem Cell Information, from <http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage.asp>.
- Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomo, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R. und Quarto, R. (2003). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 287(1): 98-105.
- Blomen, V. A. und Boonstra, J. (2011). Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell Mol Life Sci* 68(1): 27-44.
- Boiani, M. und Scholer, H. R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11): 872-884.
- Both, S. K., van der Muijsenberg, A. J., van Blitterswijk, C. A., de Boer, J. und de Bruijn, J. D. (2007). A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 13(1): 3-9.
- Bourguet, P., Blanc-Vincent, M. P., Boneu, A., Bosquet, L., Chauffert, B., Corone, C., Courbon, F., Devillers, A., Foehrenbach, H., Lumbroso, J. D., Mazselin, P., Montravers, F., Moretti, J. L. und Talbot, J. N. (2003). Summary of the Standards, Options and Recommendations for the use of positron emission tomography with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDP-PET scanning) in oncology (2002). *Br J Cancer* 89 Suppl 1: S84-91.
- Bruder, S. P., Fink, D. J. und Caplan, A. I. (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 56(3): 283-294.
- Burton, B. K. (2000). Urea cycle disorders. *Clin Liver Dis* 4(4): 815-830, vi.
- Chahwan, R., Wontakal, S. N. und Roa, S. (2010). Crosstalk between genetic and epigenetic information through cytosine deamination. *Trends in Genetics* 26(10): 443-448.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. und Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5): 643-655.
- Chang, E. I., Bonillas, R. G., El-ftesi, S., Chang, E. I., Ceradini, D. J., Vial, I. N., Chan, D. A., Michaels, J. und Gurtner, G. C. (2009). Tissue engineering using autologous microcirculatory beds as vascularized bioscaffolds. *Faseb Journal* 23(3): 906-915.

- Chang, Y., Zhang, X., Horton, J. R., Upadhyay, A. K., Spannhoff, A., Liu, J., Snyder, J. P., Bedford, M. T. und Cheng, X. (2009). Structural basis for G9a-like protein lysine methyltransferase inhibition by BIX-01294. *Nat Struct Mol Biol* 16(3): 312-317.
- Chen, H. T., Lee, M. J., Chen, C. H., Chuang, S. C., Chang, L. F., Ho, M. L., Hung, S. H., Fu, Y. C., Wang, Y. H., Wang, H. I., Wang, G. J., Kang, L. und Chang, J. K. (2012). Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16(3): 582-593.
- Chou, W. C., Chou, S. C., Liu, C. Y., Chen, C. Y., Hou, H. A., Kuo, Y. Y., Lee, M. C., Ko, B. S., Tang, J. L., Yao, M., Tsay, W., Wu, S. J., Huang, S. Y., Hsu, S. C., Chen, Y. C., Chang, Y. C., Kuo, K. T., Lee, F. Y., Liu, M. C., Liu, C. W., Tseng, M. H., Huang, C. F. und Tien, H. F. (2011). TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood* 118(14): 3803-3810.
- Chouliaras, L., van den Hove, D. L., Kenis, G., Keitel, S., Hof, P. R., van Os, J., Steinbusch, H. W., Schmitz, C. und Rutten, B. P. (2012). Age-related increase in levels of 5-hydroxymethylcytosine in mouse hippocampus is prevented by caloric restriction. *Curr Alzheimer Res* 9(5): 536-544.
- Chung, C. H., Golub, E. E., Forbes, E., Tokuoka, T. und Shapiro, I. M. (1992). Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 51(4): 305-311.
- Cimmino, L., Abdel-Wahab, O., Levine, R. L. und Aifantis, I. (2011). TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell* 9(3): 193-204.
- Colot, V. und Rossignol, J.-L. (1999). Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 21(5): 402-411.
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M. und Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3213-3218.
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A. und Howard, G. A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14(7): 1115-1122.
- Daley, G. Q. und Scadden, D. T. (2008). Prospects for stem cell-based therapy. *Cell* 132(4): 544-548.

- Daskalakis, M., Blagitko-Dorfs, N., Hackanson, B. und Lübbert, M. (2010). Epigenetische Therapie bei Myelodysplastischen Syndromen (MDS). Therapie mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren. *Pharmazie in unserer Zeit* 39(3): 217-227.
- Dimmeler, S. und Leri, A. (2008). Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res* 102(11): 1319-1330.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317.
- Donato, M. T., Jimenez, N., Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J. (2004). Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 32(7): 699-706.
- Donovan, P. J. und Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414(6859): 92-97.
- Dzitoyeva, S., Chen, H. und Manev, H. (2012). Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria. *Neurobiol Aging*.
- Ehnert, S., Häuser, J., Kerler, I., Schmitt, A., Olderøy, M., Freude, T., Neumaier, M., Egaña, T., Schenck, T., Stöckle, U. und Nüssler, A. K. (2011). Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe: Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen? *Regenerative Medizin* 4(1): 6.
- Estes, B. T., Wu, A. W., Storms, R. W. und Guilak, F. (2006). Extended passaging, but not aldehyde dehydrogenase activity, increases the chondrogenic potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 209(3): 987-995.
- Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J. und Pfaffl, M. W. (2006). Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28(19): 1601-1613.
- Fong, H., Hohenstein, K. A. und Donovan, P. J. (2008). Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26(8): 1931-1938.
- Fratzl-Zelman, N., Fratzl, P., Horandner, H., Grabner, B., Varga, F., Ellinger, A. und Klaushofer, K. (1998). Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by beta-glycerophosphate pulse. *Bone* 23(6): 511-520.

- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. und Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31(1): 13-20.
- Glue, P. und Clement, R. P. (1999). Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism--basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol* 19(3): 309-323.
- Gomez-Aristizabal, A., Keating, A. und Davies, J. E. (2009). Mesenchymal stromal cells as supportive cells for hepatocytes. *Mol Ther* 17(9): 1504-1508.
- Greco, S. J., Liu, K. und Rameshwar, P. (2007). Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells* 25(12): 3143-3154.
- Gregory, C. A., Prockop, D. J. und Spees, J. L. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306(2): 330-335.
- Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W., Xie, Z. G., Shi, L., He, X., Jin, S. G., Iqbal, K., Shi, Y. G., Deng, Z., Szabo, P. E., Pfeifer, G. P., Li, J. und Xu, G. L. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477(7366): 606-610.
- Halpern, W., McArthur, M., Galbreath, E., Uhl, E., Buck, W. und Whitley, E. (2011). Stems to GEMs: impact of stem cell technology on engineered animal models. *Vet Pathol* 48(5): 1041-1043.
- Hamada, H., Kobune, M., Nakamura, K., Kawano, Y., Kato, K., Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T. und Niitsu, Y. (2005). Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoagents for gene therapy. *Cancer Sci* 96(3): 149-156.
- Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P. J., Meacham, A. M., Zon, L. I. und Terada, N. (2001). Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 497(1): 15-19.
- Hanada, K., Dennis, J. E. und Caplan, A. I. (1997). Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 12(10): 1606-1614.
- Hargus, G., Cui, Y. F., Dihne, M., Bernreuther, C. und Schachner, M. (2012). In vitro generation of three-dimensional substrate-adherent embryonic stem cell-derived neural aggregates for application in animal models of neurological disorders. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 2: Unit 2D 11.

- Hart, A. H., Hartley, L., Ibrahim, M. und Robb, L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* 230(1): 187-198.
- Hata, R.-I. und Senoo, H. (1989). L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 138(1): 8-16.
- He, S., Nakada, D. und Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 377-406.
- Hung, S. P., Ho, J. H., Shih, Y. R., Lo, T. und Lee, O. K. (2012). Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 30(2): 260-266.
- Ibanez-Ventoso, C., Yang, M., Guo, S., Robins, H., Padgett, R. W. und Driscoll, M. (2006). Modulated microRNA expression during adult lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5(3): 235-246.
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C. und Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466(7310): 1129-1133.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C. und Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333(6047): 1300-1303.
- Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J. M. und Bunnell, B. A. (2006). Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry* 99(5): 1285-1297.
- Jaenisch, R. und Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245-254.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. und Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 64(2): 295-312.
- Jaramillo-Ferrada, P. A., Wolvetang, E. J. und Cooper-White, J. J. (2012). Differential mesengenic potential and expression of stem cell-fate modulators in mesenchymal stromal cells from human-term placenta and bone marrow. *J Cell Physiol* 227(9): 3234-3242.

- Katz, A. J., Tholpady, A., Tholpady, S. S., Shang, H. und Ogle, R. C. (2005). Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23(3): 412-423.
- Kharaziha, P., Hellstrom, P. M., Noorinayer, B., Farzaneh, F., Aghajani, K., Jafari, F., Telkabadi, M., Atashi, A., Honardoost, M., Zali, M. R. und Soleimani, M. (2009). Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21(10): 1199-1205.
- Kim, M., Kim, C., Choi, Y. S., Park, C. und Suh, Y. (2012). Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of Ageing and Development* 133(5): 215-225.
- Kirkwood, T. B. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell* 120(4): 437-447.
- Knight, A. (2008). Non-animal methodologies within biomedical research and toxicity testing. *ALTEX* 25(3): 213-231.
- Kriaucionis, S. und Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324(5929): 929-930.
- Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z. und Klimasauskas, S. (2012). 5-Hydroxymethylcytosine - the elusive epigenetic mark in mammalian DNA. *Chem Soc Rev*.
- Kroeze, R. J., Knippenberg, M. und Helder, M. N. (2011). Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 702: 233-248.
- Kubicek, S., O'Sullivan, R. J., August, E. M., Hickey, E. R., Zhang, Q., Teodoro, M. L., Rea, S., Mechtler, K., Kowalski, J. A., Homon, C. A., Kelly, T. A. und Jenuwein, T. (2007). Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. *Mol Cell* 25(3): 473-481.
- Kuo, T. K., Hung, S. P., Chuang, C. H., Chen, C. T., Shih, Y. R., Fang, S. C., Yang, V. W. und Lee, O. K. (2008). Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 134(7): 2111-2121, 2121 e2111-2113.
- Kveiborg, M., Kassem, M., Langdahl, B., Eriksen, E. F., Clark, B. F. und Rattan, S. I. (1999). Telomere shortening during aging of human osteoblasts in vitro and leukocytes in vivo: lack of excessive telomere loss in osteoporotic patients. *Mechanisms of Ageing and Development* 106(3): 261-271.

- Laberge, R. M., Awad, P., Campisi, J. und Desprez, P. Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 5(1): 39-44.
- Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S. und Caplan, A. I. (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 16(4): 557-564.
- Li, J., Li, M., Niu, B. und Gong, J. (2011). Therapeutic potential of stem cell in liver regeneration. *Front Med* 5(1): 26-32.
- Li, W., Jiang, K. und Ding, S. (2012). Concise review: A chemical approach to control cell fate and function. *Stem Cells* 30(1): 61-68.
- Liu, T. M., Wu, Y. N., Guo, X. M., Hui, J. H., Lee, E. H. und Lim, B. (2009). Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 18(7): 1013-1022.
- MacDonald, B. R. und Gowen, M. (1993). The cell biology of bone. *Baillieres Clin Rheumatol* 7(3): 421-443.
- Marsell, R. und Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury* 42(6): 551-555.
- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J. M., Dennis, L. M., Volkert, T. L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P. A., Bartel, D. P., Jaenisch, R. und Young, R. A. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134(3): 521-533.
- Martin, B. (1993). Aging and strength of bone as a structural material. *Calcif Tissue Int* 53 Suppl 1: S34-39; discussion S39-40.
- Mason, C., Brindley, D. A., Culme-Seymour, E. J. und Davie, N. L. (2011). Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. *Regen Med* 6(3): 265-272.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S. und Niwa, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9(6): 625-635.
- Medvedev, S. P., Grigor'eva, E. V., Shevchenko, A. I., Malakhova, A. A., Dementyeva, E. V., Shilov, A. A., Pokushalov, E. A., Zaidman, A. M., Aleksandrova, M. A., Plotnikov, E. Y., Sukhikh, G. T. und Zakian, S. M. (2011). Human induced pluripotent stem cells

- derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage. *Stem Cells Dev* 20(6): 1099-1112.
- Meirelles, L. D. und Nardi, N. B. (2009). Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience* 14: 4281-4298.
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. und Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24(2): 376-385.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. und Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5): 631-642.
- Mohamadnejad, M., Alimoghaddam, K., Mohyeddin-Bonab, M., Bagheri, M., Bashtar, M., Ghanaati, H., Baharvand, H., Ghavamzadeh, A. und Malekzadeh, R. (2007). Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 10(4): 459-466.
- Mohamed Ariff, I., Mitra, A. und Basu, A. (2012). Epigenetic regulation of self-renewal and fate determination in neural stem cells. *J Neurosci Res* 90(3): 529-539.
- Nelson, D. L. C., M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. USA, Worth Publishers.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. und Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95(3): 379-391.
- Nilsson, O., Mitchum, R. D., Jr., Schrier, L., Ferns, S. P., Barnes, K. M., Troendle, J. F. und Baron, J. (2005). Growth plate senescence is associated with loss of DNA methylation. *J Endocrinol* 186(1): 241-249.
- Niwa, H., Miyazaki, J. und Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24(4): 372-376.
- Norambuena, G. A., Khoury, M. und Jorgensen, C. (2012). Mesenchymal stem cells in osteoarticular pediatric diseases: an update. *Pediatr Res* 71(4 Pt 2): 452-458.
- Nussler, A. K., Zeilinger, K., Schyschka, L., Ehnert, S., Gerlach, J. C., Yan, X., Lee, S. M., Ilowski, M., Thasler, W. E. und Weiss, T. S. (2011). Cell therapeutic options in liver diseases: cell types, medical devices and regulatory issues. *J Mater Sci Mater Med* 22(5): 1087-1099.

- O'Leary, J. G., Lepe, R. und Davis, G. L. (2008). Indications for liver transplantation. *Gastroenterology* 134(6): 1764-1776.
- Oh, S. H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N., Higashio, K. und Namba, M. (2000). Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2): 500-504.
- Ohgushi, H., Goldberg, V. M. und Caplan, A. I. (1989). Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 60(3): 334-339.
- Ooi, S. K. und Bestor, T. H. (2008). The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 133(7): 1145-1148.
- Oosterlee, A. und Rahmel, A. (2011). Eurotransplant International Foundation Annual Report 2011. Leiden, The Netherlands, CIP-GEGEVENS KONINKLIJKE BIBLIOTHEEK, DEN HAAG.
- Pai, M., Spalding, D., Xi, F. und Habib, N. (2012). Autologous bone marrow stem cells in the treatment of chronic liver disease. *Int J Hepatol* 2012: 307165.
- Palii, S. S., Van Emburgh, B. O., Sankpal, U. T., Brown, K. D. und Robertson, K. D. (2008). DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol* 28(2): 752-771.
- Pan, R. L., Wang, P., Xiang, L. X. und Shao, J. Z. (2011). Delta-like 1 serves as a new target and contributor to liver fibrosis down-regulated by mesenchymal stem cell transplantation. *J Biol Chem* 286(14): 12340-12348.
- Park, S. B., Seo, K. W., So, A. Y., Seo, M. S., Yu, K. R., Kang, S. K. und Kang, K. S. (2012). SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ* 19(3): 534-545.
- Parsch, D., Fellenberg, J., Brummendorf, T. H., Eschlbeck, A. M. und Richter, W. (2004). Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med (Berl)* 82(1): 49-55.
- Peng, C. H., Liu, J. H., Woung, L. C., Lin, T. J., Chiou, S. H., Tseng, P. C., Du, W. Y., Cheng, C. K., Hu, C. C., Chien, K. H. und Chen, S. J. (2012). MicroRNAs and cataracts: correlation among let-7 expression, age and the severity of lens opacity. *Br J Ophthalmol* 96(5): 747-751.

- Perin, E. C. (2005). The use of stem cell therapy for cardiovascular disease. *Tex Heart Inst J* 32(3): 390-392.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): e45.
- Piskounova, E., Viswanathan, S. R., Janas, M., LaPierre, R. J., Daley, G. Q., Sliz, P. und Gregory, R. I. (2008). Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J Biol Chem* 283(31): 21310-21314.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E. und Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463(7284): 1101-1105.
- Pricola, K. und Lorenz, H. (2010). Primary Cell Lines and Stem Cells. *Tissue Engineering for the Hand: Research Advances and Clinical Applications*. Chang, J., Gupta, G. New Jersey, World Scientific: 47-49.
- Qiu, C., Ma, Y., Wang, J., Peng, S. und Huang, Y. (2010). Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research* 38(4): 1240-1248.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E. und Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344(5): 385-386.
- Rai, K., Huggins, I. J., James, S. R., Karpf, A. R., Jones, D. A. und Cairns, B. R. (2008). DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* 135(7): 1201-1212.
- Rando, T. A. und Chang, H. Y. (2012). Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell* 148(1-2): 46-57.
- Reik, W. und Dean, W. (2001). DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* 22(14): 2838-2843.
- Rodriguez, J. P., Rios, S. und Gonzalez, M. (2002). Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper. *Journal of Cellular Biochemistry* 85(1): 92-100.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C. und Bernad, A. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65(8): 3035-3039.

- Ruzov, A., Tsenkina, Y., Serio, A., Dudnakova, T., Fletcher, J., Bai, Y., Chebotareva, T., Pells, S., Hannoun, Z., Sullivan, G., Chandran, S., Hay, D. C., Bradley, M., Wilmut, I. und De Sousa, P. (2011). Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res* 21(9): 1332-1342.
- Sasaki, H. und Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 9(2): 129-140.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. und Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19(5): 459-466.
- Scholzen, T. und Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.
- Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S. und Verfaillie, C. M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109(10): 1291-1302.
- Seeliger, C., Culmes, M., Schyschka, L., Yan, X., Damm, G., Wang, Z., Kleeff, J., Thasler, W. E., Hengstler, J., Stockle, U., Ehnert, S. und Nussler, A. K. (2012). Decrease of global Methylation improves significantly hepatic Differentiation of Ad-MSCs: Possible future Application for Urea Detoxification. *Cell Transplant*.
- Seo, M. J., Suh, S. Y., Bae, Y. C. und Jung, J. S. (2005). Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328(1): 258-264.
- Sharpless, N. E. (2010). Hot topics in stem cells and self-renewal: 2010. *Aging Cell* 9(4): 457-461.
- Sharpless, N. E. und DePinho, R. A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 703-713.
- Shen, C. N., Slack, J. M. und Tosh, D. (2000). Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2(12): 879-887.
- Shi, Y., Desponts, C., Do, J. T., Hahm, H. S., Scholer, H. R. und Ding, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 3(5): 568-574.
- Sikorska, M., Sandhu, J. K., Deb-Rinker, P., Jezierski, A., Leblanc, J., Charlebois, C., Ribocco-Lutkiewicz, M., Bani-Yaghoub, M. und Walker, P. R. (2008). Epigenetic modifications

- of SOX2 enhancers, SRR1 and SRR2, correlate with in vitro neural differentiation. *J Neurosci Res* 86(8): 1680-1693.
- Smith, S., Neaves, W. und Teitelbaum, S. (2006). Adult stem cell treatments for diseases? *Science* 313(5786): 439.
- Snyder, S. L., Wilson, I. und Bauer, W. (1972). The subunit composition of Escherichia coli alkaline phosphatase in I M tris. *Biochim Biophys Acta* 258(1): 178-187.
- Snykers, S., De Kock, J., Tamara, V. und Rogiers, V. (2011). Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies. *Methods Mol Biol* 698: 305-314.
- Snykers, S., Henkens, T., De Rop, E., Vinken, M., Fraczek, J., De Kock, J., De Prins, E., Geerts, A., Rogiers, V. und Vanhaecke, T. (2009). Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *Journal of Hepatology* 51(1): 187-211.
- So, A. Y., Jung, J. W., Lee, S., Kim, H. S. und Kang, K. S. (2011). DNA methyltransferase controls stem cell aging by regulating BMI1 and EZH2 through microRNAs. *PLoS One* 6(5): e19503.
- Song, I., Kim, B. S., Kim, C. S. und Im, G. I. (2011). Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 408(1): 126-131.
- Sorensen, A. L., Jacobsen, B. M., Reiner, A. H., Andersen, I. S. und Collas, P. (2010). Promoter DNA methylation patterns of differentiated cells are largely programmed at the progenitor stage. *Mol Biol Cell* 21(12): 2066-2077.
- Sorm, F., Piskala, A., Cihak, A. und Vesely, J. (1964). 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20(4): 202-203.
- Spitkovsky, D. und Hescheler, J. (2008). Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 17(2): 79-90.
- Strauer, B. E. und Steinhoff, G. (2011). 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice. *J Am Coll Cardiol* 58(11): 1095-1104.
- Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C. S., Spada, F. und Leonhardt, H. (2010). Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 38(19): e181.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L. und Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine

- to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324(5929): 930-935.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. und Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5): 861-872.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4): 663-676.
- Tanaka, T. S., Kunath, T., Kimber, W. L., Jaradat, S. A., Stagg, C. A., Usuda, M., Yokota, T., Niwa, H., Rossant, J. und Ko, M. S. (2002). Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res* 12(12): 1921-1928.
- Teven, C. M., Liu, X., Hu, N., Tang, N., Kim, S. H., Huang, E., Yang, K., Li, M., Gao, J. L., Liu, H., Natale, R. B., Luther, G., Luo, Q., Wang, L., Rames, R., Bi, Y., Luo, J., Luu, H. H., Haydon, R. C., Reid, R. R. und He, T. C. (2011). Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells Int* 2011: 201371.
- Thompson, R. F., Atzmon, G., Gheorghe, C., Liang, H. Q., Lowes, C., Grealley, J. M. und Barzilai, N. (2010). Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging Cell* 9(4): 506-518.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. und Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145-1147.
- Tollervey, J. und Lunyak, V. V. (2012). Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 7(8).
- Tsai, C. C., Su, P. F., Huang, Y. F., Yew, T. L. und Hung, S. C. (2012). Oct4 and nanog directly regulate dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell* 47(2): 169-182.
- Undale, A. H., Westendorf, J. J., Yaszemski, M. J. und Khosla, S. (2009). Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc* 84(10): 893-902.
- Valinluck, V. und Sowers, L. C. (2007). Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 67(3): 946-950.

- Vanhaecke, T. und Rogiers, V. (2006). Hepatocyte cultures in drug metabolism and toxicological research and testing. *Methods Mol Biol* 320: 209-227.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 110: 39-48.
- Wang, S., Qu, X. und Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology* 5(1): 19.
- Weinberg, R. A. (2008). Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat Cell Biol* 10(9): 1021-1023.
- Wells, J. M. und Melton, D. A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 393-410.
- Williams, K., Christensen, J. und Helin, K. (2012). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *Embo Reports* 13(1): 28-35.
- Wilson, V. L. und Jones, P. A. (1983). DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 220(4601): 1055-1057.
- Wong, S. S., Ritner, C., Ramachandran, S., Aurigui, J., Pitt, C., Chandra, P., Ling, V. B., Yabut, O. und Bernstein, H. S. (2012). miR-125b promotes early germ layer specification through Lin28/let-7d and preferential differentiation of mesoderm in human embryonic stem cells. *PLoS One* 7(4): e36121.
- Wu, D., Hamilton, B., Martin, C., Gao, Y., Ye, M. und Yao, S. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells by reprogramming human fibroblasts with the stemgent human TF lentivirus set. *J Vis Exp*(34).
- Wyatt, G. R. und Cohen, S. S. (1952). A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids. *Nature* 170(4338): 1072-1073.
- Xie, C. Q., Lin, G., Yuan, D., Wang, J., Liu, T. C. und Lu, G. X. (2005). Proliferative feeder cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells. *Cell Biol Int* 29(8): 623-628.
- Yamamoto, Y., Banas, A., Murata, S., Ishikawa, M., Lim, C. R., Teratani, T., Hatada, I., Matsubara, K., Kato, T. und Ochiya, T. (2008). A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J* 275(6): 1260-1273.
- Yew, T. L., Chiu, F. Y., Tsai, C. C., Chen, H. L., Lee, W. P., Chen, Y. J., Chang, M. C. und Hung, S. C. (2011). Knockdown of p21(Cip1/Waf1) enhances proliferation, the expression of stemness markers, and osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Aging Cell* 10(2): 349-361.

- Yilmaz, M., Ovali, E., Akdogan, E., Durmus, A., Sonmez, M., Dikmen, T. und Omay, S. B. (2008). Autologous serum is more effective than fetal bovine serum on proliferation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Saudi Med J* 29(2): 306-309.
- Yoon, D. S., Kim, Y. H., Jung, H. S., Paik, S. und Lee, J. W. (2011). Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif* 44(5): 428-440.
- Young, H. E. und Black, A. C. (2004). Adult stem cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 276A(1): 75-102.
- Zaidi, M., Pazianas, M., Shankar, V. S., Bax, B. E., Bax, C. M., Bevis, P. J., Stevens, C., Huang, C. L., Blake, D. R., Moonga, B. S. und et al. (1993). Osteoclast function and its control. *Exp Physiol* 78(6): 721-739.
- Zhang, H. und Wang, Z. Z. (2008). Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 103(3): 709-718.
- Zuber, R., Anzenbacherova, E. und Anzenbacher, P. (2002). Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 6(2): 189-198.
- (2012). 5-Azacytidine from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2385?lang=de®ion=DE>
- (2012). BIX 01294 trihydrochloride hydrate from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b9311?lang=de®ion=DE>.
- (2012). Data reports of United Network for Organ Sharing. from www.unos.org/donation/index.php?topic=data
- (2012). Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. from <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/ipsc.html>.
- (2012). Vitamin D3 Story. from <http://www.agdnutrition.com/d3-story.html>.
- (2013-2012). pNPP substrate. from <http://www.biopanda-diagnostics.com/asp/products/pNPP.asp>

VI. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Andreas Nüssler, Leiter des Siegfried Weller Institutes an der BG Unfallklinik Tübingen der Universität Tübingen. Ich bedanke mich für die Überlassung dieser Arbeit, seine geduldige Betreuung, wertvolle Kritik und zahlreichen Diskussionen während meiner Arbeit. Ohne diese Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich besonders bei der Bayrischen Forschungstiftung bedanken. Mit ihrer großzügigen Unterstützung, konnte ich mich in Deutschland auf die Durchführung meiner Doktorarbeit konzentrieren.

Bei Dr. Sabrina Ehnert möchte ich mich herzlich bedanken. Sie hat mich wissenschaftlich geschult und unterstützt mit ihren anregenden Ideen.

Weiterhin danke ich Herrn Luc Koster für die sorgfältige sprachliche Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit.

Ich danke auch Dr. Paul A. de Sousa für seine Unterstützung und Betreuung in SCRM, Edinburgh, UK, wo ich viel über Stammzellforschung gelernt habe.

Weiterhin möchte ich noch Fritz Seidl, Dr. Lilianna Schyschka, Dr. Claudine Seeliger, und Zhiyong Wang am Klinikum rechts der Isar danken, für ihre Hilfe und kontinuierlichen Austausch.

Ich danke allen Kollegen in Tübingen und München für ihre Unterstützung im beruflichen und im täglichen Leben.

In tiefer Verbundenheit möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihr Mitgefühl, ihr Vertrauen und ihr Verständnis bedanken, ohne ihren Beistand wäre meine Doktorarbeit in Deutschland nicht möglich gewesen.