

**Die MMP9- und OPG-Expression von dermalen Fibroblasten und
mesenchymalen Stammzellen nach Stimulation durch Myelom- und
Hodgkinzelllinien.**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Jana Christina Kloos
aus
Mönchengladbach

Berichter: Herr Professor
Dr.med. Johann Lorenzen

Herr Universitätsprofessor
Dr.rer.nat. Wilhelm Jahnen-Dechent

Tag der mündlichen Prüfung: 16. August 2006

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

meinen Eltern

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen wurden von Frau Dipl.-Biol. S. Neuß-Stein kultiviert. Die Durchführung der Sequenzierung der Amplifikate bei der Primer-Etablierung übernahm freundlicherweise Frau S. Reuschenberg.

Alle anderen dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Lorenzen und Mitglieder seiner Forschungsgruppe von mir selbst ausgeführt worden.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	MORBUS HODGKIN	1
1.1.1	<i>Geschichte und Inzidenz.....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Histologie und Ätiologie.....</i>	<i>1</i>
1.1.3	<i>Klassifikation und Therapie</i>	<i>2</i>
1.1.4	<i>Die verwendeten Hodgkin-Zelllinien</i>	<i>3</i>
1.2	MULTIPLES MYELOM	4
1.2.1	<i>Geschichte und Inzidenz.....</i>	<i>4</i>
1.2.2	<i>Pathologie und Ätiologie.....</i>	<i>5</i>
1.2.3	<i>Klassifikation und Therapie</i>	<i>5</i>
1.2.4	<i>Die Osteolysen beim Multiplen Myelom</i>	<i>6</i>
1.2.5	<i>Die verwendeten Myelom-Zelllinien</i>	<i>7</i>
1.3	OPSTEOPROTEGERIN (OPG)	8
1.3.1	<i>Klassifikation und Struktur.....</i>	<i>8</i>
1.3.2	<i>Das OPG, RANK und RANKL-Modell.....</i>	<i>9</i>
1.4	MATRIX METALLOPROTEINASE 9 (MMP9).....	11
1.4.1	<i>Klassifikation und Struktur.....</i>	<i>11</i>
1.4.2	<i>Metastasierung und Angiogenese.....</i>	<i>12</i>
1.4.3	<i>MMP9 als Knochenlysator.....</i>	<i>13</i>
1.5	FRAGESTELLUNG	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	MATERIAL, LÖSUNGEN UND PUFFER	15
2.2	ZELLKULTUR.....	18
2.2.1	<i>Isolierung der Fibroblasten</i>	<i>19</i>
2.2.2	<i>Isolierung der mesenchymalen Stammzellen.....</i>	<i>20</i>
2.2.3	<i>Behandlung und Stimulation von Fibroblasten und Stammzellen</i>	<i>21</i>
2.3	RNA – EXTRAKTION.....	23
2.3.1	<i>Methodik.....</i>	<i>23</i>
2.3.2	<i>Arbeitsprotokoll.....</i>	<i>23</i>
2.3.3	<i>DNase-Verdau.....</i>	<i>25</i>

II

2.4	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER RNA-KONZENTRATION	25
2.4.1	<i>Methodik</i>	25
2.4.2	<i>Arbeitsprotokoll</i>	25
2.5	REVERSE TRANSKRIPTASE.....	26
2.5.1	<i>Methodik</i>	26
2.5.2	<i>Arbeitsprotokoll</i>	27
2.6	REAL TIME PCR MIT DER LIGHT CYCLER-TECHNIK	28
2.6.1	<i>Methodik</i>	28
2.6.2	<i>Arbeitsprotokoll</i>	29
2.7	AGAROSEGELELEKTROPHORESE DES PCR-PRODUKTES	33
2.7.1	<i>Methodik</i>	33
2.7.2	<i>Arbeitsprotokoll</i>	33
2.8	STATISTISCHE VERFAHREN.....	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	ETABLIERUNGEN DER PCR.....	35
3.1.1	<i>Etablierung der PCR zum Nachweis von MMP9</i>	35
3.1.2	<i>Etablierung der PCR zum Nachweis von OPG</i>	37
3.1.3	<i>Prüfung der Spezifität des PCR-Produktes</i>	39
3.1.4	<i>Konzentrationsabschätzung mit Hilfe verschiedener Standardgeraden</i>	40
3.2	MMP9-EXPRESSION VON FIBROBLASTEN UND MESENCHYMALEN STAMMZELLEN	43
3.2.1	<i>MMP9-Expression nach Stimulation durch Myelom-Zelllinien</i>	43
3.2.2	<i>MMP9-Expression nach Stimulation durch Hodgkin-Zelllinien</i>	46
3.3	OPG-EXPRESSION VON FIBROBLASTEN UND MESENCHYMALEN STAMMZELLEN	49
3.3.1	<i>OPG-Expression nach Stimulation durch Myelom-Zelllinien</i>	49
3.3.2	<i>OPG-Expression nach Stimulation durch Hodgkin-Zelllinien</i>	52
4	DISKUSSION	55
4.1	DISKUSSION DER ERGEBNISSE IM BEZUG AUF DIE OSTEOLYSEN BEIM MULTIPLEN MYELOM	55
4.1.1	<i>Die OPG-Expression nach Stimulation durch Myelomzelllinien</i>	56

4.1.2	<i>Die OPG-Expression nach Stimulation durch Hodgkinzelllinien.....</i>	57
4.1.3	<i>Die MMP9-Expression.....</i>	58
4.1.4	<i>Therapieoptionen der Osteolysen beim Multiplen Myelom</i>	59
4.2	DIE BEDEUTUNG VON MMP9 IN DER PATHOLOGIE DES MORBUS HODGKIN	60
4.2.1	<i>Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse nach Hodgkinstimulation.....</i>	60
4.2.2	<i>MMP9 als Angiogenesefaktor</i>	60
4.3	DAS KNOCHENMARKMODELL.....	62
4.3.1	<i>Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen.....</i>	62
4.3.2	<i>Der Ausschluss der direkten Zell-Zell-Interaktion durch den Gebrauch konditionierter Medien</i>	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	65

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster defined</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FKS	fetales Kälberserum
HLA	<i>human leucocyte antigen (locus A) system</i>
IST	Insulin Transferrin Selenensäure
kDa	Kilodalton
LC	<i>Light Cycler</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
P	Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF-AB/BB	<i>platelet derived growth factor</i>
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI 8226	Roswell Park Memorial Institute 8226
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 EINLEITUNG

1.1 MORBUS HODGKIN

1.1.1 Geschichte und Inzidenz

Der Morbus Hodgkin (Lymphgranulomatose) zählt zu den malignen Lymphomen. Er wurde erstmals im Jahre 1832 von Thomas Hodgkin beschrieben [1] und 30 Jahre später nach ihm benannt [2]. Hodgkin erkannte, dass es sich bei der von ihm beschriebenen Krankheit nicht um eine sekundäre, entzündungsbedingte Vergrößerung der Lymphknoten handelte, sondern um eine Erkrankung der Lymphknoten selbst [1]. Hiermit wurde die erste maligne Erkrankung des lymphatischen Systems beschrieben.

Die Inzidenz des Morbus Hodgkin liegt in Westeuropa und in den USA bei 2-3:100 000 pro Jahr, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. In industrialisierten Ländern zeigt die Alters-/Inzidenzkurve einen zweigipfeligen Verlauf mit einem ersten Gipfel im 3. und einem zweiten Gipfel im 7. Lebensjahrzehnt [3].

1.1.2 Histologie und Ätiologie

Histologisch ist das Bild des Morbus Hodgkin durch mehrkernige Riesenzellen, die Reed-Sternberg-Zellen, gekennzeichnet, die nach Carl Sternberg [4] und Dorothy Reed benannt wurden. Die Wissenschaftler erkannten erstmals den Zusammenhang zwischen den Riesenzellen und der Hodgkinschen Krankheit. Heute werden die Reed-Sternberg-Zellen als die eigentliche neoplastische Zellpopulation des Morbus Hodgkin angesehen [5]. Im Hodgkin-Tumorgewebe machen die Hodgkin-Reed-Sternberg (H-RS) Zellen nur etwa 0,1-1 Prozent aus. Den Rest des manchmal 50 bis 500 g schweren Lymphknotens bilden CD-4-positive Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile, Fibroblasten und fibrotisches Material [6]. Durch Sekretion bestimmter Mediatorsubstanzen sammeln die H-RS-Zellen diese sogenannten „bystander cells“ (Nachbarzellen) in ihrer Umgebung an, welche durch zelluläre und humo-

rale Interaktion das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen ermöglichen [7]. Die Identifizierung der H-RS-Zellen als monoklonale B-Lymphozyten aus den Keimzentren der Lymphknoten gelang der Gruppe von Rajewsky, Küppers und Hansmann im Jahr 1994 [8].

Die Ursachen des Morbus Hodgkin sind bis heute nicht bekannt. Immer wieder wird in diesem Zusammenhang eine infektiöse bzw. virale Genese diskutiert. Hierfür sprechen insbesondere die klinischen Zeichen wie Nachtschweiß, Fieber, Gewichtsabnahme, Juckreiz und allgemeines Krankheitsgefühl. Als pathomorphologisches Korrelat finden sich reaktive Zellen wie Lymphozyten, Eosinophile und Monozyten [7]. Das Epstein-Barr-Virus ist immer wieder als möglicher Auslöser der Krankheit im Gespräch, da sein Virusgenom in 50-70 Prozent der Tumorzellen der Morbus-Hodgkin-Patienten gefunden werden konnte. Auch dieser Faktor scheint jedoch nur einer von vielen zu sein, da in Westeuropa bis zum 30. Lebensjahr etwa 95% der Bevölkerung mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert sind, es jedoch nur in ca. 60% der Tumorzellen nachgewiesen werden konnte.

1.1.3 Klassifikation und Therapie

Die WHO-Klassifikation der malignen Lymphome und Leukämien aus dem Jahr 1999 [9] trennt die Non-Hodgkin- von den Hodgkin-Lymphomen. Die Hodgkin-Lymphome werden wiederum in die Untergruppen des klassischen Morbus Hodgkin (95-97% der Fälle) und des lymphozytenreichen, nodulären Paragranuloms (3-5% der Fälle) gegliedert.

Die klassische Form der Hodgkinschen Krankheit kann histologisch das Bild einer nodulären Sklerose mit gemischter Zellularität bzw. lymphozytenarmer Form aufweisen oder in lymphozytenreicher klassischer Form vorliegen .

Zur Therapie der klassischen Form wird heute eine stadienabhängige Chemo-Radio-Therapie entsprechend den Protokollen der Deutschen Hodgkin-Studiengruppe (DHSG) angewendet [7]. Mit einer optimalen Behandlung werden ca. 70% der Patienten geheilt, wobei in der prognostisch ungünstigeren Gruppe der mischzelligen und lymphozytenarmen Formen die Überlebensrate bei 50%, in der prognostisch günstigeren Gruppe der lymphozytenreichen Form bei 90% liegt.

1.1.4 Die verwendeten Hodgkin-Zelllinien

Zelllinie L428

Die Zelllinie L428 gehörte zu den ersten in vitro Kulturen von Hodgkin-Zellen, die im Jahre 1978 von Diehl und Mitarbeitern etabliert werden konnte [10]. Die Zellen wurden aus dem Pleuraexsudat einer 37jährigen weiblichen Patientin im Stadium IVB des Morbus Hodgkin gewonnen [11]. Die Diagnose eines Morbus Hodgkin mit dem histologischen Subtyp einer nodulären Sklerose wurde vorausgehend von 2 Pathologen unabhängig gestellt [12]. Schaad et al. wiesen in der Zelllinie sowohl Hodgkin als auch Reed-Sternberg Zellen nach [12]. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass L428 mit dem Genotyp von Vorläufer-B Zellen kompatibel ist [13]. Sie wird zu den B-Zell-Linien gezählt, da sie die B-Zell assoziierten CD-Marker CD19 und CD24 exprimiert [11]. In den Zellen konnte kein EBV-Genom nachgewiesen werden, sie tragen jedoch einen EBV-Rezeptor. Nach bisherigen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass die Zelllinie L428 eine repräsentative Hodgkin-Zelllinie in vitro darstellt [14].

Zelllinie HDLM2

Diese Hodgkin-Zelllinie wurde 1982 aus dem Pleuraexsudat eines 74jährigen Patienten mit nodulärer Sklerose Stadium VI isoliert. Sie besitzt ebenfalls den für H-RS-Zellen typischen Immunophänotyp, was bedeutet, dass sie die Antigene CD15, CD25, CD30, CD71 und HLA-DR exprimiert. Im Gegensatz zu L428 wird sie den Hodgkin-Zelllinien mit T-Zelleigenschaften zugeordnet, da sie positiv auf die T-Zell Marker CD2 und CD4 reagiert [14]. Eine zusätzliche Untersuchung zeigt keine Killerzell-Aktivität [15]. In den Zellen der Zelllinie HDLM2 lässt sich mit Hilfe einer RT-PCR kein EBV-Virus nachweisen. Es wurde jedoch entdeckt, dass die Zellen der Linie HDLM2 einen hypodiploiden Chromosomensatz mit 36 Chromosomen aufweisen. In Kultur beträgt ihre Verdopplungszeit ca. 3-5 Tage, die Zellen der Zelllinie L428 verdoppeln ihre Anzahl in 42-46 Stunden. Auch die Zelllinie HDLM2 zählt nach den Untersuchungen von Drexler [15] zu den Hodgkinzelllinien, die eine Untersuchung der Erkrankung unter in vitro Bedingungen ermöglichen. Es muss jedoch bedacht werden, dass sie mit ihrer T-Zell-Zugehörigkeit nicht die Mehrzahl der Hodgkin-Erkrankungen repräsentiert, bei denen meist ein B-Zell-Genotyp zu finden ist.

1.2 MULTIPLES MYELOM

Das Multiple Myelom (Plasmozytom, Morbus Kahler) ist ein von transformierten Plasmazellen ausgehendes Malignom, welches den niedrig malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet wird. Charakteristisch für die Erkrankung sind multiple osteolytische Herde, eine Verdrängung der normalen Blutbildung und eine monoklonale Gammopathie.

1.2.1 Geschichte und Inzidenz

Die erste Diagnose eines Multiplen Myeloms als „mollities et fragilitas ossium“ (weiche und zerbrechliche Knochen) wurde im Jahre 1845 durch den Arzt Dr. William MacIntyre in London gestellt. Bereits ein Jahr später nach dem Tod des Patienten veröffentlichte der Chirurg Mr. John Dalrymple seine Untersuchungen, nach denen die befallenen Knochen auffällige Zellen enthielten, welche jedoch erst im Jahr 1900 als Plasmazellen identifiziert werden konnten. Im Jahre 1848 kam es zur Veröffentlichung der Untersuchungsergebnisse des auffälligen Patientenurins durch Dr. Henry Bence Jones, der eine „eigenartige albuminöse Substanz“, sowie Kalziumphosphat und Kalziumoxalotkristalle beschrieb [16]. Diese Ig-Leichtketten im Urin des Patienten wurden später nach ihrem Erstbeschreiben als Bence-Jones-Proteine bezeichnet.

Die Bezeichnung des Multiplen Myeloms führte Rustizky 1873 ein, um die multiplen Plasmazellläsionen im Knochen zu charakterisieren. Es folgte eine weitere, ausführliche Untersuchung der Erkrankungen durch Otto Kahler 1889, woraufhin das Synonym des Morbus Kahler eingeführt wurde [17].

Die jährliche Inzidenz des Multiplen Myeloms liegt bei 3:100000, wobei eine stark steigende Tendenz im Alter zu beobachten ist (80jährige: 30-40:100000) und Männer häufiger als Frauen betroffen sind [18]. Auffällig sind zudem ethnische und geographische Unterschiede. So erkrankten in Nordamerika Schwarze im Verhältnis zu Weißen doppelt so häufig an einem Multiplen Myelom. In China liegt die Inzidenz der Erkrankung deutlich niedriger (1:100000) als in den westlichen Industrieländern. Hier ist das Multiple Myelom heutzutage für etwa 1-2% aller durch Malignome hervorgerufene Todesfälle verantwortlich [19].

1.2.2 Pathologie und Ätiologie

Das Multiple Myelom entsteht meist durch die maligne Proliferation eines Plasmazell-Klons, der in der Regel monoklonale Immunglobuline (meist IgG und IgA) bzw Ig-Leichtketten produziert. Diese Leichtketten sind in Urin und Blut als sogenannte Bence-Jones Proteine nachweisbar. Aus der Produktion monoklonaler Antikörper durch die Tumorzellen resultiert ein charakteristischer Myelom-Gradient in der Serumelektrophorese. Die Menge des produzierten Immunglobulins lässt einen Rückschluss auf die Tumormasse zu und dient als Verlaufsparmeter der Erkrankung.

Der Tumor und seine Produkte können zu unspezifischen Symptomen wie Anämie und Immundefizienz durch fortschreitende Knochenmarksinfiltration, Nephropathie und Osteopathie führen. Die Osteopathien manifestieren sich vorwiegend in stammnahen Knochen wie Becken, Sakrum, Brust- und Lendenwirbelsäule, Rippen und Schädel und zeigen eine ausgestanzt wirkende Osteolyse. Folge dieser Knochenlysen sind sowohl pathologische Frakturen als auch Hyperkalzämiesyndrome bei massiv gesteigerter Osteoklastentätigkeit.

In den meisten Fällen bleibt die Ausbreitung des Multiplen Myeloms auf den Knochenmarkraum begrenzt. Kommt es zu einer Manifestation außerhalb des Knochenmarks, spricht man von einem extramedullären Myelom, dessen Zellen nicht mehr auf ihre spezifische Knochenmarksumgebung angewiesen sind [18].

Die Ätiologie der Erkrankung ist weiterhin ungeklärt. Gesichert ist jedoch ein gehäuftes Auftreten der Erkrankung bei strahlenexponierten Personen. Andere Risikofaktoren wie chronische Infektionen, Chemikalien und Umweltgifte werden diskutiert, lassen sich jedoch nicht sicher belegen [18].

1.2.3 Klassifikation und Therapie

Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms erfolgt nach den von Durie und Salmon 1975 festgelegten klinischen Kriterien und erlaubt eine Abschätzung der Tumorzellmasse. Klinische Parameter dieser Klassifikation in drei Stadien sind die Höhe des Serumkalziums, des Hämoglobins, die Knochenstruktur, die Paraproteinkonzentration im Serum und das Auftreten von Bence-Jones-Proteinen im Urin [18].

Verschiedene Therapieansätze wie die Behandlung mit Melphalan, die Anwendung einer hochdosierten Chemotherapie und die Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation haben die mediane Überlebensdauer nach der Diagnosestellung zwar auf 19 bis 50 Monate erhöht, es gibt für die Erkrankung jedoch bis heute keine Heilung.

1.2.4 Die Osteolysen beim Multiplen Myelom

1.2.4.1 Der intakte Knochenstoffwechsel

Im physiologischen Knochenstoffwechsel herrscht ein Gleichgewicht zwischen Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenneubildung durch Osteoblasten, wobei der Neubildung immer eine Resorption vorausgeht.

Die beiden Zellarten stammen von unterschiedlichen Vorläuferzellen ab. Die Osteoblasten differenzieren sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen des Knochenmarks über den Zwischenschritt eines Präosteoblasten. Sie sind für die Synthese der organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz wie Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine verantwortlich und können sich in Osteozyten weiterdifferenzieren.

Osteoklasten sind große, stark verzweigte, bewegliche Riesenzellen und stammen von der Monozyten/Makrophagen-Linie des Knochenmarks ab [20, 21]. Sie entwickeln sich zunächst unter dem Einfluss von M-CSF und RANKL zu unreifen, mehrkernigen Präosteoblasten und später über eine Stimulation mit IL-1 und RANKL zu reifen Osteoklasten.

Die Knochenresorption eines Osteoklasten erfolgt 100-150 mal so schnell wie der Neubau des Knochens durch einen Osteoblasten. Aus diesem Grund ist die Ausgewogenheit der beiden Komponenten eine zentrale Voraussetzung für eine intakte Knochengrundsubstanz.

1.2.4.2 Osteolysen

Die Osteolysen beim Multiplen Myelom sind durch eine zu hohen Osteoklasten-Aktivität zu erklären. Hierdurch ist das physiologische Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und –neubildung zu Gunsten der Resorption verschoben und es kommt zu Osteolyseherden im Knochen.

Der Osteoklast lysiert den Knochen, indem er Proteasen zum Matrixverdau und Säure zur Minerallösung abgibt. Eine wichtige Protease ist hierbei die Matrix Metalloproteinase 9 (siehe

1.4). Die Aktivierung der Osteoklasten erfolgt über eine Vielzahl von Faktoren (TNF, IL-6, PTH u.v.a.), die jedoch meist nicht primär auf den Osteoklasten, sondern auf Osteoblasten und Stromazellen wirken. Diese stimulieren ihrerseits die Osteoklastentätigkeit. Die zentrale Rolle in der Osteoklastenstimulation durch Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks scheinen jedoch das RANK/RANKL/OPG-System (siehe 1.3.2) und die Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β zu spielen [22]. Die Chemokine werden von Myelomzellen sezerniert [23], gehören zur RANTES-Familie und werden als Aktivatoren von Monozyten angesehen. Des Weiteren stimulieren sie die RANKL-Expression durch Stromazellen und fördern somit die erhöhte Knochenresorption durch die Osteoklasten. Zudem induziert MIP-1 α eine höhere Differenzierungsrate der Osteoklasten, wodurch es zu einer weiteren Zunahme des Knochenabbaus kommt [22].

1.2.5 Die verwendeten Myelom-Zelllinien

Zelllinie U266

Die Zellen dieser humanen Myelom-Zelllinie wurden 1968 aus dem Blut eines 53-jährigen Mannes im Terminalstadium eines Multiplen Myeloms gewonnen. Es handelt sich um IgE-Lambda-produzierende Zellen, wobei erwähnt sei, dass nur sehr wenige Zelllinien mit einer monoklonalen IgE-Produktion vorhanden sind. Auch In-vivo ist eine IgE-Produktion beim Multiplen Myelom nur in einem Prozent der Krankheitsfälle nachweisbar.

Zelllinie IM9

Die Zellen der Zelllinie IM9 werden als B-lymphoblastoide Zellen beschrieben und wurden aus dem Knochenmark einer Frau mit Multiplem Myelom im Jahre 1967 gewonnen. Sie produzieren IgG und auf ihrer Oberfläche wurden Insulin- und Calcitoninrezeptoren nachgewiesen.

Zelllinie RPMI8226

Die Zelllinie RPMI8226 wurde aus dem Blut eines 61-jährigen Mannes mit Multiplem Myelom mit IgG Lambda-Typ gewonnen. Die IgG-Expression ist 54% der Patienten nachweisbar. Untersuchungen zeigten, dass die vorliegenden Myelomzellen ausschließlich Lambda-Leichtketten und keine schweren Ketten produzieren und sezernieren.

Die ca. 120 etablierten Myelomzelllinien wurden von Drexler und Matsuo im Jahr 2000 [15] in hinreichend und unzureichend charakterisierte Myelomzelllinien und EBV⁺ B-lymphoblastoide Zelllinien unterteilt. Hierbei wurden die Zelllinien U266 und RPMI8226 als repräsentative in vitro Zelllinien des Multiplen Myeloms mit negativem EBV-Nachweis beschrieben. Die Zellen der Zelllinie IM9 wurden als B-lymphoblastoide Zellen mit positivem EBV-Nachweis eingeordnet. Das Myelom ist jedoch im Gegensatz zum M. Hodgkin keine EBV-assoziierte Erkrankung und es konnte noch keine EBV-DNA in Myelomzellen nachgewiesen werden. EBV⁺ B-lymphoblastoide Zelllinien können somit nicht als repräsentative Myelomzelllinien angesehen werden. Sie können zwar aus dem Gewebe / Blut eines an MM erkrankten Patienten gewonnen werden, man kann sie jedoch im Gegensatz zu repräsentativen Myelomzelllinien genauso aus dem Gewebe eines gesunden Menschen kultivieren [15]. Die Immunprofile der verschiedenen Zelllinienarten zeigen ebenfalls große Unterschiede und auch in ihrer Kulturmorphologie liegen die MM Zelllinien in Suspension als einzelne Zellen vor, die B-lymphoblastoiden Zellen bilden hingegen große Verklumpungen. Aus den genannten Gründen muss die Zelllinie IM9 unter anderen Gesichtspunkten betrachtet werden als die Zelllinien U266 und RPMI8226.

1.3 OPSTEOPROTEGERIN (OPG)

1.3.1 Klassifikation und Struktur

Das Protein Osteoprotegerin (OPG) wurde 1997 in Untersuchungen zu TNF-Rezeptor-spezifischen Molekülen erstmals beschrieben [24]. Die anschließenden Versuche mit transgenen Mäusen, welche eine Überexpression des gefundenen Proteins aufwiesen, zeigten eine Osteopetrose der Tiere. Diese Osteopetrose fand ihre Begründung in einem starken Osteoklastenabfall, der durch eine Schlüsselfunktion von OPG in der Osteoklastenentwicklung erklärt werden konnte [24]. Der gleiche Faktor wurde, von embryonalen Fibroblasten exprimiert, als Inhibitor der Osteoklastogenese von Tsuda et al. nahezu zeitgleich entdeckt [25]. Das neu entdeckte Protein wird heute einheitlich als Osteoprotegerin (OPG) bezeichnet.

OPG wurde in vielen verschiedenen Geweben wie Leber, Herz, Lunge, Niere, Gehirn und Knochen nachgewiesen [26]. Es scheint auch außerhalb der Osteoklastenaktivierung eine Rolle zu spielen, denn es führte bei OPG-Knockout-Mäusen neben der starken Osteoporose

auch zu schweren Verkalkungen der großen Arterien. OPG wird seit diesen Untersuchungen auch im Bereich der Arterioskleroseentstehung eine Bedeutung zugesprochen [27].

Betrachtungen der genauen Molekülstruktur kamen zu dem unter Abbildung 1.1 dargestellten Aufbau des Proteins.

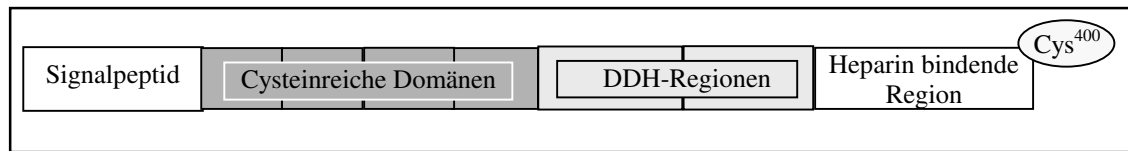


Abb.1.1: Domänenstruktur von OPG

Das exprimierte Protein besteht nach Abspaltung des 21 AS langen Signalpeptids aus 380 AS. Es lässt sich in drei verschiedene Domänenbereiche unterteilen, wobei N-terminal 4 cysteinreiche Domänen und C-terminal eine Heparin-bindende Domäne vorliegen. Mittig befinden sich zwei „Death-Domains“-homologe Regionen (DDH-Regionen), die bei dem strukturell sehr ähnlichen TNF-Rezeptor p55 beschrieben wurden [24, 28].

1.3.2 Das OPG, RANK und RANKL-Modell

Nachdem OPG als osteoprotektiver Faktor entdeckt worden war, wurde auch bald der passende Ligand gefunden, wobei dieser schon unter den Bezeichnungen TRANC und RANKL als TNF-Ligand bekannt war. RANKL wird in von Osteoblasten exprimiert und bindet über seinen Rezeptor RANK an Osteoklasten und ihre Vorläuferzellen (siehe Abb.1.2 Nr.6). Aus dieser Ligand-Rezeptor-Interaktion resultiert eine verstärkte Aktivierung und Differenzierung der Osteoklasten und schließlich eine vermehrte Knochenresorption [29]. OPG, das unter anderem von den Stromazellen sezerniert wird (Nr.3), ist in diesem Prozess der direkte Gegenspieler von RANKL, wodurch es einen protektiven Einfluss auf den Knochen hat [24]. OPG bindet RANKL (Nr.4) und verhindert somit das Zusammentreffen von RANKL und RANK. Hieraus ist zu ersehen, dass die Osteoklastenaktivität maßgeblich durch das Verhältnis von OPG zu RANKL bestimmt wird.

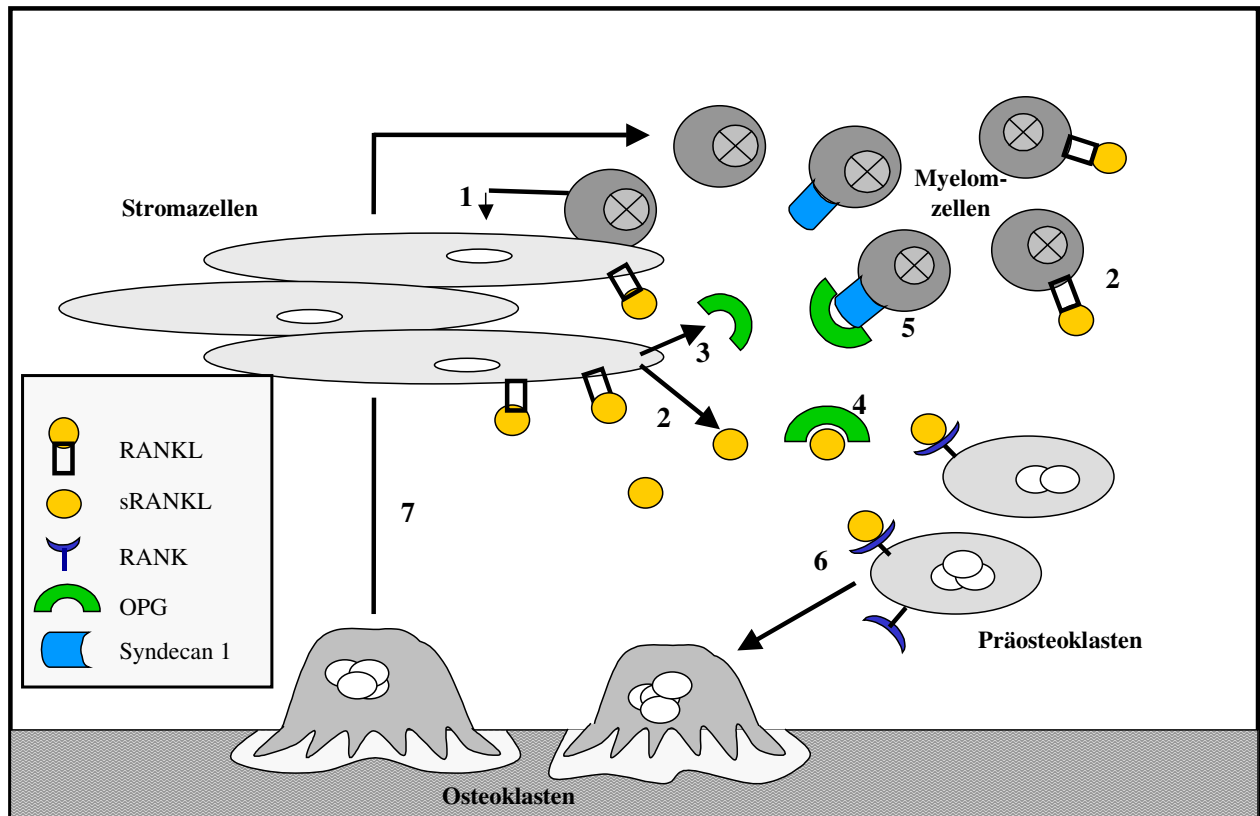


Abb. 1.2: Modell der Knochendestruktion beim multiplen Myelom.

Das Gleichgewicht OPG/RANKL wird durch die Myelomzellen in erheblichem Maße gestört. Die Tumorzellen haben die Fähigkeit, sowohl die RANKL-Expression in ihrer Umgebung zu erhöhen als auch die OPG-Konzentration zu senken. RANKL wird hierbei nicht nur von den Myelomzellen selbst vermehrt sezerniert, sondern auch von den Stromazellen des Knochenmarks verstärkt gebildet (Nr.2) [30, 31]. Für die Stimulation der Stromazellen scheint hierbei ein direkter Zell-Zell-Kontakt zur Myelomzellen erforderlich zu sein (Nr.1). Zunächst wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α als Stimulatoren der RANKL-Expression in den Stromazellen diskutiert. Die Blockierung dieser Faktoren in Kokulturen von Myelom- und Stromazellen zeigte jedoch keine Verminderung der Expressionssteigerung [30]. Die Myelomzelle steigert jedoch nicht nur die RANKL-Konzentration, sondern senkt zusätzlich die OPG-Konzentration, indem OPG an Syndecan, ein Heparansulfatproteoglycan auf der Myelomzellmembran, gebunden und inaktiviert wird (Nr. 5).

Über die beschriebenen Mechanismen kommt es zu einer immer stärkeren Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten, welche ihrerseits über die Abgabe von TGF β , IL-6 und IGF I&II das Tumorwachstum vorantreiben (Nr.7). Eine verminderte Aktivierung der Osteoklasten würde damit nicht nur zu einer geringeren Osteolyse, sondern auch zu einer verlangsamten Zunahme der Tumorzellen führen.

1.4 MATRIX METALLOPROTEINASE 9 (MMP9)

1.4.1 Klassifikation und Struktur

Die erste Matrix Metalloproteinase (MMP) wurde vor über 30 Jahren von Gross und Lapiere in Amphibiengewebe entdeckt [32]. Seitdem sind immer mehr MMPs hinzugekommen, so dass man heute 26 MMPs unterscheidet. Die MMP-Familie wird in fünf große Gruppen unterteilt: Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen, Membrantypen (MT MMP) und andere. Gemeinsam ist allen MMPs, dass sie (1) eine für sie spezifische Komponente der Basalmembran abbauen, (2) bei physiologischem pH aktiv sind, (3) 2 Zn^{++} -Ionen zur Aktivierung benötigen, (4) durch TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) inaktiviert werden und (5) als Enzymvorstufen freigesetzt und extrazellulär aktiviert werden [33].

Die Matrix Metalloproteinase 9 ist auf Chromosom 20 lokalisiert und gehört zusammen mit MMP2 zur Gruppe der Gelatinasen, wobei MMP9 auch als Gelatinase B bezeichnet wird. Ihr Molekulargewicht beträgt 92 kDa im latenten und 86 kDa im aktivierten Zustand. In der extrazellulären Matrix lysiert sie Typ IV-, TypV-Kollagen und Gelatin [34]. Die Domänenstruktur von MMP9 weist zusätzlich zur zinkbindenden Domäne im katalytischen Zentrum drei sich wiederholende TypII-Fibronectin-Domänen auf, welche an Kollagen und Gelatin binden.

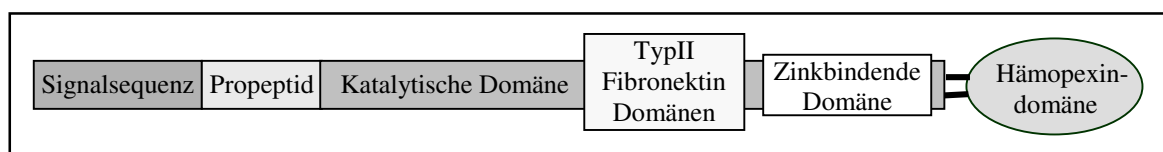


Abb.1.3: Domänenstruktur von MMP9

Eine physiologische Bedeutung hat MMP9 insbesondere in der Embryogenese. Cytotrophoblasten exprimieren maximale Mengen von MMP9 im Zeitraum der Einnistung der Blastozyste in den Uterus [35]. In synovialen, menschlichen Fibroblasten wird MMP9 gleichmäßig stark produziert [36], wobei die Expression von MMP9 in Hautgewebe als Reaktion auf ein Trauma verstärkt werden kann. Zusätzlich kann die MMP9 Expression auch durch exogene Stimulation von Zellen gesteigert werden. Menschliche Hautfibroblasten

produzieren nach Interaktion mit IL- β , TNF- α und TNF- β vermehrt MMP9 [36]. Der Umbau der ECM durch MMP9 ist somit ein wichtiger Vorgang bei Reparaturvorgängen von Geweben, genauso jedoch ein wichtiger Schritt im invasiven Wachstum von Tumoren, der Bildung von Metastasen und der Neovaskularisation.

Die Untersuchungen verschiedener Tumoren ließen eine verstärkte MMP-Produktion erkennen [37], die jedoch nach der Auswertung verschiedener Tumorgewebsschnitte insbesondere auf eine erhöhte MMP-Expression der den Tumor umgebenden Stromazellen zurückzuführen ist [38, 39]. Die erhöhte MMP-Produktion der Stromazellen scheint ihre Begründung in einer Stimulation durch Tumorzellen zu finden.

1.4.2 Metastasierung und Angiogenese

Im Bereich der Tumorausbreitung im Körper spielen die Vorgänge der Metastasierung und der Angiogenese eine zentrale Rolle. Unter Metastasierung versteht man die Ablagerung von Zellen des Primärtumors an verschiedenen Stellen der Körpers [40]. Die metastasierende Zelle muss hierbei sowohl die Ablösung vom Primärtumor und den Ein- und Austritt aus Blut- bzw. Lymphsystem überleben, als auch am Entstehungsort der Metastase eine Angiogenese induzieren [40]. Die MMPs ermöglichen den Vorgang der Metatasierung, indem sie Matrixbarrieren lysieren und die Freisetzung migrationsstimulierender Zytokine fördern. Beim Multiplen Myelom wurde eine Korrelation zwischen der Höhe der MMP-Expression und der Schweregrade des Tumorstadiums nachgewiesen, wobei die höchste MMP-Produktion beim extramedullärem Myelom erreicht wurde [41].

Neben der Metastasierung spielt die Angiogenese eine zentrale Bedeutung in der Tumorphathologie. Das Tumorgewebe ist nur überlebensfähig, wenn eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Blut und Nährstoffen gewährleistet ist. Somit ist es für den Tumor essentiell notwendig, die Bildung neuer Gefäßsystem zu induzieren. Auch in diesem Zusammenhang spielen die MMPs und insbesondere MMP9 eine zentrale Rolle. Kroon et al. konnten nachweisen, dass MMP-defiziente Mäuse eine verringerte Angiogenese in der Embryonal- und der Tumorentwicklung aufweisen [42].

1.4.3 MMP9 als Knochenlysator

MMP9 hat nicht nur im Bereich der Tumorausbreitung zentrale Funktionen, sondern ist auch an der, insbesondere beim Multiplen Myelom bedeutsamen, Osteolyse beteiligt. Lange Zeit wurden die MMPs hierbei als wichtigste osteolytische Komponente angesehen, bis durch die Entdeckung des OPG/RANKL-Systems ihre Bedeutung in den Hintergrund trat. Trotzdem ist insbesondere MMP9 an vielen Prozessen der Osteolyse beteiligt. Die Rekrutierung der Osteoklasten wird von TGF- β gefördert, welcher wiederum zuvor durch MMP9 aktiviert werden muss [43]. Im nächsten Schritt müssen die reifen Osteoklasten im Knochen wandern, um an Resorptionsstellen zu gelangen. Diesen Weg legen sie mit Hilfe von MMP9 zurück, welches die umgebende Matrix lysiert [44]. Am abschließenden Prozess der Knochenresorption ist MMP9 (wie unter 1.2.4.2 beschrieben) ebenfalls maßgeblich beteiligt, indem es neben Kathepsin K und Säure von den Osteoklasten sezerniert wird.

1.5 FRAGESTELLUNG

Da in den letzten Jahren viele biochemische Aspekte der Osteolysen beim Multiplen Myelom in Grundzügen verstanden wurden, ist es sicherlich von Interesse, die Interaktionen zwischen Knochen-, Myelomzellen und mesenchymalen Zellen genauer zu verstehen. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob und inwieweit Stromazellen auch ohne direkte Zellinteraktion zu Myelomzellen die osteolytischen Eigenschaften der Krankheit fördern.

Des Weiteren sollte der Einfluss von Zelllinien des M. Hodgkin als nicht osteolytisch wirkendes Malignom auf die OPG-Expression der Stromazellen und die Rolle von MMP9 in der Angiogenese des M. Hodgkin genauer betrachtet werden. Konkret wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Lässt sich mittels einer humoralen Stimulation mesenchymaler Stammzellen und Fibroblasten durch verschiedenen Lymphomzelllinien (U266, IM9, RPMI8226, L428, HDLM2) eine Expressionsveränderung von MMP9 und OPG erreichen?
2. Werden durch eine verminderte OPG-Expression der mesenchymalen Zellen nach Stimulation durch Myelomzelllinien die osteolytischen Prozesse beim Multiplen Myelom beschleunigt?
3. Inwieweit hat MMP9 einen osteolytischen Einfluss in der Pathologie des Multiplen Myeloms?
4. Welche Rolle spielt das durch mesenchymaler Zellen exprimierte MMP9 als Angiogenesefaktor bei der Hodgkinschen Erkrankung?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL, LÖSUNGEN UND PUFFER

Zellkultur

Material zum sterilen Filtern der Medien:

sterile 20 ml Einmalspritzen (Braun)

sterile Einmalkanülen, pyrogenfrei (1ner-Kanülen, Braun)

sterile 0,22 µm Filter , Millex-Gs (Millipore, France)

sterile Falcon – Tubes

Medium für Fibroblasten und die Zelllinien U266, IM9, RPMI8226, L428, HDLM2

DMEM low glucose (1 x) 500 ml (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria)

10% (50 ml) FKS (PAA Laboratories GmbH)

0,8% Penicillin und Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)

PBS Dulbecco`s (Gipco, U.K.)

Serumarmes Medium für mesenchymale Stammzellen (Ansatz von 500 ml)

300 ml (60%) DMEM low glucose - Medium

200 ml (40%) MCDB-201 (Sigma)

5 ml ITS + BSA - Linoleitic acid

1 nM Dexamethasone

100 µM Ascorbic acid α - phosphate

100 µl Penicillin + 1000 µl Streptomycin

ergänzt mit 10 ng/ml EGF und 10ng/ml PDGF-AB/BB

10 ml (2 %) FKS

RNA-Extraktion

sterile Insulinspritzen (1 ml)

β-Mercaptoethanol

Ethanol (70%), angesetzt mit RNase freiem H₂O

1,5 ml Eppendorfgefäße (2-fach autoklaviert)

Rneasy Mini Kid 50 (Qiagen, Hilden, Deutschland)

DNA-Verdau: DNase I, RNase-free (Roche, Mannheim, Deutschland)

Spectrophotometrische Messung der RNA-Konzentration

Ultrospec 3000; UV/Visible Spectrophotometer; Pharmacia Biotech, Cambridge, England

Quarzküvette

Reverse Transkriptase (RNA ⇌ cDNA)

First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), (Roche)

Es wurde der Random Primer aus dem genannten Kit verwendet.

Quantitative PCR, Light Cycler

Herolab UV-Arbeitshaube (Bestrahlungsdauer: 15 min)

Kühlblock (LC Centrifuge Adapters, Roche, Mannheim, Germany)

Light Cycler instrument (Roche)

Light Cycler Software (Version 5.32)

LightCycler Capillaries (Roche)

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)

Steriles Wasser (2-fach autoklaviert)

PrimerGlycerinaldehydphosphatdehydrogenase

GAPDH	Oligonukleotid – Sequenz (5`-3`)
Forward-Primer	GGC TCT CCA GAA CAT CAT CCC TGC
Backward-Primer	GGG TGT CGC TGT TGA AGT CAG AGG

Matrix-Metalloproteinase 9

MMP 9	Oligonukleotid – Sequenz (5`-3`)
Forward-Primer	TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG
Backward-Primer	GCC ATT CAC GTC GTC CTT AT

Osteoprotegerin

OPG	Oligonukleotid – Sequenz (5`-3`)
Forward-Primer	GCT AAC CTC ACC TTC GAG
Backward-Primer	TGA TTG GAC CTG GTT ACC

Die Oligonukleotid-Primer sind hergestellt durch MWG-Biotech, Ebelsberg, Deutschland

Agarosegelelektrophorese

I) Elektrophoreselaufpuffer: 1 x TBE-Puffer mit 0,15 µg/ml Ethidiumbromid

1 x TBE-Puffer:	1:10 Verdünnung mit A.dest aus 10 x TBE-Puffer
10 x TBE-Puffer:	900 mM TRIS (Merck)
	900 mM Borsäure (Merck)
	10 mM EDTA (pH 8,0)
	auf 1000 ml mit A.dest. auffüllen ⇒ auf pH 8,3 einstellen
Ethidiumbromid:	Stammlösung (1 mg/ml)

II) Elektrophoresegel:

Seakern LE-Agarose (Biozym, Oldendorf)

1 x TBE

150 µl/l Ethidiumbromidstammlösung

Elektrophoresekammern (Blue Marine 100 von Serva, Heidelberg, 10 cm x 7 cm)

III) Loading-Puffer:

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol FF

15% Ficoll

IV) Längenstandard :

100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Germany)

Es werden 15 Banden sichtbar, die die Fragmentlängen 100 – 1500 Basenpaare kennzeichnen. Jeder Abstand zwischen den Banden beinhaltet einen Längenunterschied von 100 Basenpaaren. Bei einer Fragmentlänge von 2072 Basenpaaren wird eine zusätzliche 16. Bande dargestellt.

Verfahren der Sterilisation

Es wurden folgende Materialien im Autoklaven sterilisiert :

1,5 ml Eppendorfgefäße, 2-fach

Destilliertes Wasser (A.dest.), 2-fach

Angewandte Bedingungen: 30 min, 121°C bei 1 bar Überdruck

2.2 ZELLKULTUR

Die Anzüchtung der Zelllinien U266, HDLM2, RPMI-8226, IM9 und L426 erfolgte in DMEM-Medium (siehe 2.1.1), wobei die Zellkultur in einem Heraeus-Brutschrank bei 37°C

mit 5% CO₂ inkubiert wurde. In einer Konzentration von 5×10^6 /ml wurden die Zellen für 24 h in frisches Medium überführt. Sollte das Medium zur Stimulation von Fibroblasten verwendet werden, wurde hierfür ebenfalls DMEM-Medium eingesetzt. Die Stammzell-versuche wurden entsprechend, sowohl in der Anzüchtung als auch in der Stimulation, mit Stammzell-medium durchgeführt.

2.2.1 Isolierung der Fibroblasten

Die verwendeten Fibroblasten wurden aus menschlichen Hautbiopsien unter möglichst sterilen Bedingungen gewonnen.

Arbeitsprotokoll zur Isolierung der Fibroblasten

1. Das Hautstück (Größe ca. 0,5 x 0,5 cm) wird zunächst in serumfreiem DMEM-Medium zur Präparation aufgenommen.
2. In einem separaten Gefäß wird eine Mischung aus Kollagenase III und serumfreiem Medium in einem Verhältnis 1:200 hergestellt. Diese wird in eine Spritze aufgezogen.
3. Nun legt man das Hautstück in eine Petrischale, fixiert es mit einer anatomischen Pinzette und gibt durch einen 0,2-er Filter 3-4 Tropfen des Kollagenase III-Gemisches darauf.
4. Anschließend wird das Hautstück mit einem Einmalskalpell zerkleinert, bis es eine breiartige Konsistenz aufweist. Währenddessen werden einzelne Tropfen des oben genannten Gemisches zugegeben.
5. Diese Masse wird nun in eine 10 ml Spritze aufgesaugt und die Petrischale mit dem restlichen Gemisch gespült, das ebenfalls in die Spritze aufgezogen wird.
6. Im Anschluss wird der Spritzeninhalt in eine T25 Flasche gegeben und in dieser 3-5 h inkubiert (Bedingungen 37°C, 5% CO₂).
7. Nach der Inkubation wird der Flascheninhalt in ein Falcontube überführt, das mit serumhaltigem Medium (DMEM-Medium + 10% FKS) bis zu einem Volumen von 30 ml aufgefüllt wird. Das Serum inhibiert nun die Kollagenase.
8. Es folgen zwei Waschschrte, bei denen jeweils 8 min bei 800 U/min zentrifugiert, das überschüssige Medium abgesaugt und die Zellen in neuem Medium resuspendiert werden.

9. Im letzten Schritt werden die Zellen in 5 ml serumhaltigem Medium mit Zusatz von Penicillin/Streptomycin gelöst und in einer T25 Zellkulturflasche für 2-3 Tage inkubiert.

2.2.2 Isolierung der mesenchymalen Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen wurden adultem Knochenaspirat beziehungsweise adulter Knochenspongiosa entnommen und in serumarmem Medium isoliert und angezüchtet.

Arbeitsprotokoll (Isolierung der Stammzellen aus Aspirat)

1. Aspirat wird in ein Falcontube gegeben und bis auf ein Volumen von 15 ml mit Medium aufgefüllt.
2. Vortexen.
3. Zentrifugation (10 min bei 1200 U/min) und Überstand abnehmen.
4. Zellsediment in 10 ml Medium resuspendieren und in eine T 75 Zellkulturflasche überführen.
5. Über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ und 20% O₂ kultivieren.
6. Nach 24 h muss der erste Mediumwechsel erfolgen.

Arbeitsprotokoll (Isolierung der Stammzellen aus Spongiosa)

1. Das Knochenmark wird in 5 ml Medium gegeben und kurz gevortext.
2. Mit einer Spritze wird das Medium aufgesaugt und das Knochenmark hiermit mehrmals gut durchspült.
3. Medium erneut in einer Spritze aufnehmen und in eine Falcontube überführen.
4. Die ersten drei Schritte werden so lange wiederholt, bis alle Blutbestandteile vom Knochen entfernt sind und dieser weiß erscheint.
5. Das Falcontube bei 1200 U/min zentrifugieren und den Überstand abnehmen.
6. Das Zellsediment in 10 ml Medium resuspendieren und in eine T75-Zellkulturflasche überführen.
7. Entsprechend dem vorangegangenen Protokoll kultivieren. Nach 24 h sollte der erste Mediumwechsel erfolgen.

2.2.3 Behandlung und Stimulation von Fibroblasten und Stammzellen

1. Herstellung des Stimulationsmediums



Abb.2.1: Stimulationsmedium

Zunächst erfolgte die Herstellung zehn verschiedener Stimulationsmedien, indem jeweils DMEM-Medium mit einer der Zelllinien (U266, IM9, RPMI8226, L428 und HDLM 2) für 24 h inkubiert wurde. Die gleichen Behandlungen wurden an serumarmem Stammzellmedium vorgenommen.

Nach 24-stündiger Inkubation folgte die Zentrifugation des Medium-Zellgemisches, die die Zellen vom Medium trennen sollte. Der Mediumüberstand wurde mit einer Spritze abgenommen und anschließend durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert, um restliche Zellen oder Zellbestandteile zu entfernen. Die Lagerung der Stimulationsmedien erfolgte bei -20 °C.

2. Vorbereitung der Zellen auf die Stimulation

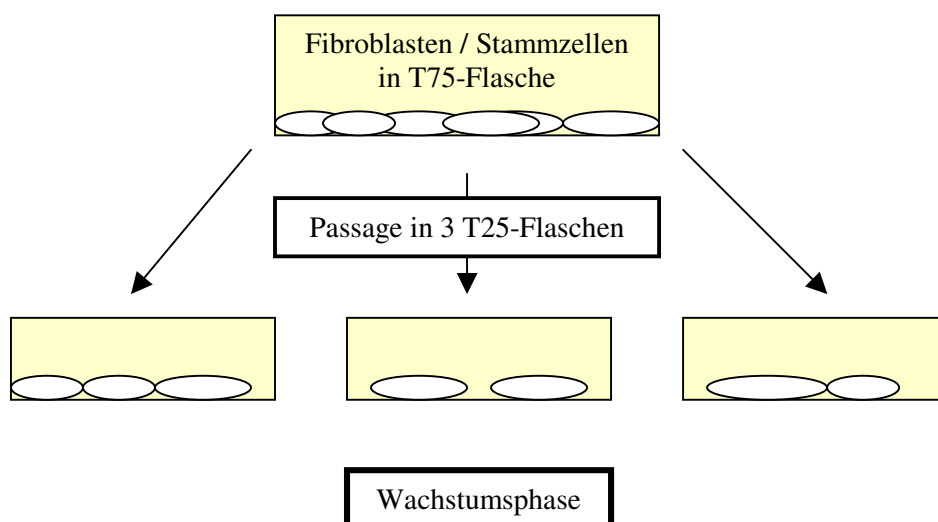


Abb.2.2: Zellvorbereitung

Nach der Anzüchtung der Fibroblasten / Stammzellen in einer T75 Zellkulturflasche, wurden diese in 3 T25 Zellkulturflaschen passagiert. Es folgte eine Kultivierung, bis die Zellen konfluent waren. Die Stimulation wurde eingeleitet, nachdem in jeder Flasche eine Zahl von ungefähr 10^6 Zellen (Fibroblastenversuche) beziehungsweise 10^4 (Stammzellversuche) mit Hilfe einer Neugebauer Zählkammer bestimmt worden war.

3. Stimulation der Zellen

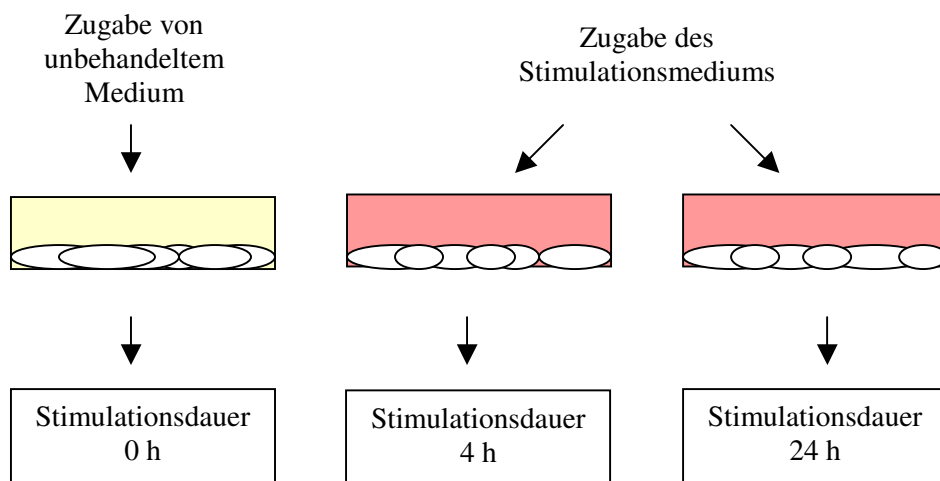


Abb.2.3: Stimulation

Nachdem die erforderliche Zellzahl vorhanden war, erfolgte zunächst ein Waschschrift mit PBS-Lösung, um Mediumrückstände an den Zellen zu beseitigen. Im nächsten Schritt wurden in zwei der drei T25 Zellkulturflaschen je 5 ml Stimulationsmedium gegeben. Die Zellen in der dritten Kulturflasche erhielten 5 ml unbehandeltes Medium.

Nach 4 h wurde die RNA-Extraktion der ersten, stimulierten Zellen durchgeführt, nach 24 h die der beiden übrigen Zellkulturen. Auf diesem Wege erhielt man die RNA unbehandelter Zellen sowie die RNA 4-stündig bzw. 24-stündig behandelter Zellen.

2.3 RNA – EXTRAKTION

2.3.1 Methodik

Bei jeder Extraktion werden maximal 3 konfluente T25 – Zellkulturflaschen extrahiert. Die Zellzahl pro Flasche beträgt ungefähr 10^6 Fibroblasten bzw. 10^4 mesenchymale Stammzellen. Die Extraktion der RNA erfolgt unter Nutzung des Rneasy Mini Kit 50 der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

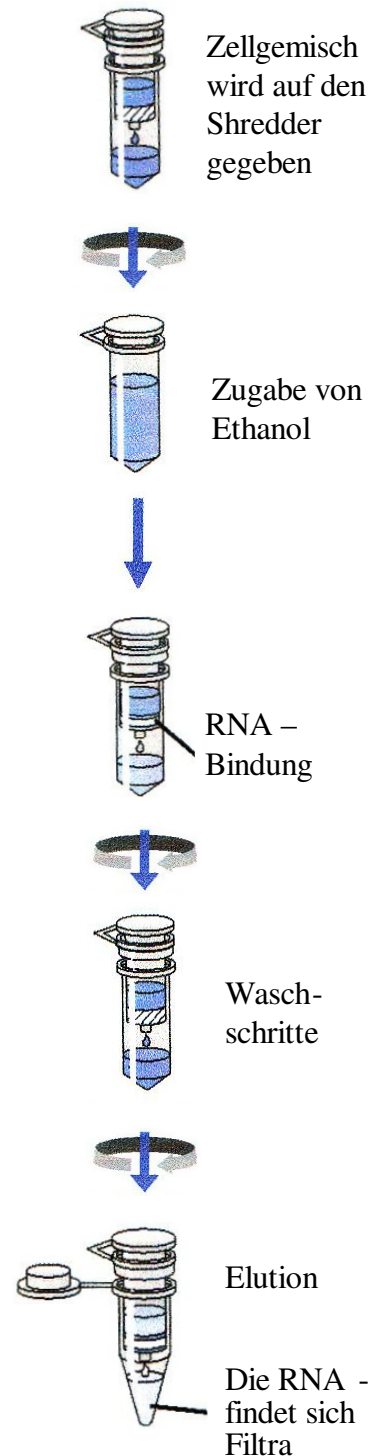
Zunächst wird das Medium aus den Zellkulturflaschen unter der Lamina abgesaugt. Das Zellmaterial wird im ersten Schritt durch einen Puffer lysiert. Dieser stark denaturierende, Guanidinisothiocyanat (GITC) enthaltende Puffer, inaktiviert die vorhandenen RNasen, so dass die Isolierung einer intakten RNA gewährleistet ist. Die Zentrifugation der Probe durch den Schredder lysiert die noch verbliebenen intakten Zellen. Durch Zugabe von Ethanol werden optimale Bindungseigenschaften hergestellt, bevor die Probe auf die Rneasy Mini-Säule aufgetragen wird. Die gesamte RNA bindet im nächsten Zentrifugationsvorgang an die Silicagel-Membran, die eine Bindung bis zu 100 µg RNA ermöglicht. Die übrigen Substanzen werden ausgewaschen. Im letzten Schritt wird die RNA mit 40 µl Rnase freiem Wasser aus der Silicagel-Membran ausgewaschen.

Mit Hilfe dieses Verfahrens werden RNA-Moleküle bis zu einer Länge von 200 Nukleotiden isoliert, wodurch es zu einer Anreicherung der mRNA kommt.

2.3.2 Arbeitsprotokoll

1. Vorbereitung: Pro Kulturflasche benötigt man 600 µl einer Mischung aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol; hierbei wird der vorgegebenen Menge RLT-Puffer 1 % β -Mercaptoethanol zugegeben.
2. Es werden 600 µl des Gemisches durch Schwenken der Kulturflasche über den Zellen verteilt, bis der ganze Boden bedeckt ist. Anschließend wird die Flasche schräg aufgestellt, wodurch sich die abgelösten Zellen im unteren Teil der Kulturflasche ansammeln.

3. Die Zellmasse wird mit Hilfe einer 1 ml Insulinspritze auf einen Shredder (Kit) gegeben.
4. Zentrifugieren des Shredders (2 min bei 14.000 U/min)
⇒ Die restlichen intakten Zellen werden lysiert und die RNA befindet sich im Auffanggefäß.
5. 600 µl Ethanol (70 %) zugeben und mischen.
6. 600 µl dieser Mischung auf die Säule (Kit) geben und diese 15 s bei 10.000 U/min zentrifugieren
⇒ Die RNA bindet an die Silicagel-Membran der Säule, so dass die Flüssigkeit im Auffanggefäß entsorgt werden kann.
Der 6. Schritt wird mit dem restlichen Material wiederholt. –
7. Auf die Säule werden anschließend 700 µl RW 1 Puffer (Kit) pipettiert und 15 s bei 10.000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen.
8. Im weiteren Verlauf werden 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben, 15 s bei 10.000 U/min zentrifugiert und das Filtrat erneut verworfen.
9. Wiederholung des 8. Schrittes.
10. Die Proben 2 min bei 16.000 U/min zentrifugieren.
11. Die Säulen werden nun in 2 x autoklavierte Eppendorfgefäße (1,5 ml) gestellt.
12. Mittig auf die Säule werden 40 µl H₂O (RNase frei, Kit) aufpipettiert und im Anschluss 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die RNA befindet sich jetzt im Filtrat.
13. Um eine höhere RNA-Ausbeute zu erhalten, gibt man das Filtrat erneut mittig auf die Säule und wiederholt die Zentrifugation.



2.3.3 DNase-Verdau

RNase free DNase (Roche)

In jedes Eppendorfgefäß werden 2 µl der oben genannten DNase gegeben.

Zum DNase-Verdau werden die Proben 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.4 **PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER RNA-KONZENTRATION**

2.4.1 Methodik

Nach Extraktion der RNA und anschließendem DNase Verdau wird eine Konzentrationsbestimmung am Spektrophotometer vorgenommen.

Über den Absorptionsmodus misst das Instrument die Transmission der Probe (bei 260 nm Wellenlänge) in Relation zur Transmission der Bezugsprobe. Hierbei dient der Nullwert bei reinem, RNase freiem Wasser als Bezugsprobe. Die Probe besteht aus 100 x verdünntem RNA-Extrakt.

Die Berechnung erfolgt unter Berücksichtigung des Logarithmus des Probenemissionsgrades (Transmittance) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Absorption $A = \log 100 / T$). Das Verhältnis zwischen Konzentration der Probe und ihrer Absorption ist hierbei linear.

Zur Kontrolle der ersten Messung wird eine erneute Messung mit einer 50 x Verdünnung des Extraktes durchgeführt. Verdoppelt sich die Absorption in dieser Verdünnung, kann man von einer sauberen Messung ausgehen. Mit Hilfe der unten angegebenen Formeln wird zusätzlich die Reinheit der Probe in Bezug auf Protein- und Salzverunreinigungen überprüft.

2.4.2 Arbeitsprotokoll

Die Konzentration und die Reinheit des RNA Extraktes werden über folgende Formeln errechnet:

$E_{260} \text{ OD} = 1$ entspricht 40 µg/ml ss RNA

$$\frac{E_{260}}{E_{230}} \geq 2,3 \Rightarrow \text{keine Salze}$$

$$\frac{E_{260}}{E_{280}} \geq 1,8 \Rightarrow \text{kein Protein}$$

Anhand der ersten Umrechnungen wird die Menge des RNA-Extraktes berechnet, in der sich 1 µg RNA befindet. Dieses Volumen wird in jede Reverse Transkriptase Reaktion eingesetzt.

2.5 REVERSE TRANSKRIPTASE

2.5.1 Methodik

Die Reverse Transkriptase mit anschließender PCR ist die sensitivste Methode, den Expressionsgrad eines Transkriptes zu bestimmen. Der Vorgang beinhaltet die Umschreibung von mRNA in cDNA und wird durch das Enzym der Reversen Transkriptase ermöglicht. In diesem Fall wurde die Erststrang-cDNA-Synthesereaktion mit der Reversen Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus (Goodmann + Mac Donald 1979), einem RNA enthaltenden Retrovirus durchgeführt. Über die Anlagerung von Random-Primern an die RNA wird unspezifische cDNA synthetisiert, die jedoch in ihrer Gesamtheit die Sequenzen der gesamten RNA widerspiegelt. Erst in der anschließenden PCR (siehe 2.6) erfolgt die Anlagerung, der für den gesuchten Genabschnitt spezifischen Primer an die einzelsträngige cDNA. Dieses System hat den Vorteil, die vorliegende cDNA mit entsprechenden Primern zum Nachweis verschiedener Gene verwenden zu können.

Die Reverse Transkription wurde 1 h bei einer Temperatur von 42 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 99 °C für 5 min inaktiviert.

2.5.2 Arbeitsprotokoll

Reagenz	Volumen/ Probe	End- konzentration
- 10 x Reaction Buffer	2 µl	1 x
- 25 mM MgCl ₂	4 µl	5 mM
- Deoxynukleotide Mix	2 µl	1 mM
- Random-Primer	2 µl	0,08 A ₂₆₀ units (3,2 µg)
- Rnase Inhibitor	1 µl	50 units
- AMV-Reverse Transkriptase	0,8 µl	≥ 20 units
- RNA-Probe	--	1 µg RNA
- Steriles H ₂ O	variabel	--
	20 µl	

Tab.2.1: Ansatz der Reversen Transkriptase

Die Proben werden kurz gevortext, herunterzentrifugiert und wie folgt inkubiert.

10 min bei 25 °C

60 min bei 42 °C

5 min bei 99 °C

5 min bei 4 °C

Die cDNA wurde bei einer Temperatur von –20 °C, die restliche RNA bei einer Temperatur von –80 °C gelagert.

2.6 REAL TIME PCR MIT DER LIGHT CYCLER-TECHNIK

2.6.1 Methodik

Die PCR ist eine enzymatische Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte. An diese DNA-Abschnitte lagern sich synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer an, deren Sequenzen zu den beiden Enden der DNA-Zielsequenz komplementär sind. Es folgt eine enzymatische Verlängerung durch eine Polymerase (Taq-Polymerase), bei der die DNA-Stränge als Matrize dienen. Die PCR durchläuft 40-50 Replikationszyklen, durch die die zunächst nur in geringsten Mengen vorhandene Zielsequenz exponentiell vermehrt wird.

Zunächst bewirkt eine Temperaturerhöhung auf über 90 °C die Denaturierung des DNA-Doppelstranges in seine Einzelstränge. Dieser Vorgang der Denaturierung beschreibt den ersten Schritt eines PCR-Zyklus. Im folgenden Schritt (Annealing) kommt es zu einer Abkühlung auf 50-55 °C, durch die erneut Primer an die Einzelstränge binden können. Hierbei weist jeder Primer eine optimale Annealingtemperatur auf, die zur Effizienzerhöhung der PCR gewählt werden sollte. Die Extension schließt jeden Zyklus ab. Hierbei repliziert die Taq-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72 °C liegt die Einzelstrang-DNA. Auf diese Weise resultiert aus jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung und somit eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz.

Im Unterschied zur herkömmlichen PCR, bei der erst nach Beendigung aller Zyklen über eine Gelelektrophorese das PCR-Produkt gemessen wird, misst der Light Cycler bei der Real-Time PCR nach jedem Zyklus den DNA-Gehalt der Proben. Die Light Cycler Technik erlaubt somit eine quantitative Messung während der PCR. Dieses System lässt einen Rückschluss auf die Ausgangskonzentrationen spezifischer Gene zu, wodurch eine Aussage über veränderte Expressionsstärken eines Gens nach verschiedenen Behandlungen getroffen werden kann. Zur Normierung der Werte dient hierbei ein Housekeeping-Gen, dass durch seinen konstanten Expressionsgrad eine Aussage über die tatsächlichen Expressionsveränderungen des untersuchten Gens zulässt. Es unterliegt somit keinen durch verschiedene Stimulationen ausgelösten Expressionsschwankungen.

Die Messung erfolgt mit Hilfe des Cyaninfluoreszenzstoffes SYBR-Green. Dieser hat die Eigenschaft, unspezifisch in die Doppelstrang-DNA zu interkalieren. Bei fortgeschrittener PCR-Reaktion steigt somit das Fluoreszenzsignal an. Die Fluoreszenzmessung erlaubt eine

graphische Darstellung der Zunahme des PCR-Produktes, die nach einem exponentiellen Wachstum in eine Plateauphase übergeht und so den Verlauf einer Sättigungskurve beschreibt.

Über eine Standardgerade, die zuvor über eine Verdünnungsreihe festgelegt wurde, kann nun eine Aussage über die Quantität des spezifischen Produktes gemacht werden. Ungenauigkeiten, die bei der Reversen Transkriptase oder der RNA-Extraktion aufgetreten sein könnten, werden ebenfalls durch die Normierung der Proben mit einem Housekeeping-Gen beseitigt. Bei dieser Arbeit wurde hierzu das Gen der Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Schmelzkurve

Da bei der Verwendung von SYBR-Green die Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates fehlt, verursachen auch Primer-Dimere oder Nebenprodukte, in die der Fluoreszenzstoff ebenfalls interkaliert, einen Fluoreszenzanstieg. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Nebenprodukten kann erst durch die Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR erfolgen. Hierbei werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie an ihrem spezifischen Schmelzpunkt denaturieren und somit nur noch als Einzelstrang vorliegen. Während der steten Temperaturerhöhung wird die Fluoreszenz der Proben gemessen, so dass die mit der Denaturierung verbundene Fluoreszenzabnahme aufgezeichnet wird. Durch die unterschiedlichen Schmelzpunkte der einzelnen Fragmente kann das spezifische Produkt von den übrigen unterschieden werden.

2.6.2 Arbeitsprotokoll

Die Vorbereitung der PCR geschah an einem separaten Arbeitsplatz, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Arbeitsmaterialien wurden 15 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt. Die Erstellung des Mastermixes erfolgte in einem sterilen Eppendorfgefäß mit Ausnahme der cDNA aus den angegebenen Komponenten (Tab.2 und 3). Von diesem wurden jeweils 18 µl mit 2 µl cDNA in jede Kapillare gegeben, so dass das Endvolumen jeder Probe 20 µl betrug. Sowohl der Mastermix als auch die Kapillaren standen während des Pipettierens in einem Kühlblock, um verfrühte Reaktionen zu unterbinden.

Nach Zentrifugation der Kapillaren (1 min bei 3000 U/min) wurden diese in den Light Cycler gestellt und das Programm (siehe Tab.4-7) gestartet.

PCR-Ansatz für den Nachweis von MMP 9

Reagenz	Volumen/Probe	Endkonzentration
Syber Green	2 µl	--
Magnesium (25 mM/ µl)	1,6 µl	3 mM
Primer Forward (1 pM/µl)	1 µl	0,5 µM
Primer Backward (1 pM/µl)	1 µl	0,5 µM
cDNA	2 µl	--
H ₂ O (steril)	variabel	--
	20 µl	

PCR-Ansatz für den Nachweis von OPG

Reagenz	Volumen/Probe	Endkonzentration
Syber Green	2 µl	--
Magnesium (25 mM/ µl)	2,4 µl	4 mM
Primer Forward (1 pM/µl)	1 µl	0,5 µM
Primer Backward (1 pM/µl)	1 µl	0,5 µM
cDNA	2 µl	--
H ₂ O (steril)	variabel	--
	20 µl	

Tab.2.2+3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zum Nachweis von MMP9 und OPG

2.6.2.1 Protokoll für die LC-Real-Time PCR zum Nachweis von MMP9

Denaturierung: der DNA für 10 min bei 90 °C

Amplifizierung:

Parameter	Wert			
Zyklen	50			
Typ	Quantifizierung			
Segmente	Denaturierung	Annealing	Elongation	Messung
Zieltemperatur (°C)	95	59	72	87
Inkubationszeit (s)	15	5	18	1
Temperatur-Transitions-rate (°C/s)	20	20	20	20
Acquisitionsmodus	None	None	None	Single

Schmelzkurvenanalyse:

Parameter	Wert		
Zyklus	1		
Typ	Schmelzkurve		
Segmente	Denaturierung	Annealing	Elongation
Zieltemperatur (°C)	95	59	72
Inkubationszeit (s)	15	5	18
Temperatur-Transitions-rate (°C/s)	20	20	20
Acquisitionsmodus	None	None	Cont.

Abkühlung: Nach der PCR erfolgte die Kühlung der Proben bei 40 °C für 2 Minuten.

2.6.2.2 Protokoll für die LC-Real-Time PCR zum Nachweis von OPG

Denaturierung : Die DNA wurde für 10 min bei 95 °C denaturiert.

Amplifizierung:

Parameter	Wert		
Zyklen	50		
Typ	Quantifizierung		
Segmente	Denaturierung	Annealing	Elongation
Zieltemperatur (°C)	95	58	72
Inkubationszeit (s)	5	5	16
Temperatur-Transitions-rate (°C/s)	20	20	20
Acquisitionsmodus	None	None	Single

Schmelzkurvenanalyse:

Parameter	Wert		
Zyklen	1		
Typ	Schmelzkurve		
Segmente	Denaturierung	Annealing	Elongation
Zieltemperatur (°C)	95	50	97
Inkubationszeit (s)	0	5	0
Temperatur-Transitions-rate (°C/s)	20	20	0.10
Acquisitionsmodus	None	None	Cont

Abkühlung: Die Proben wurden nach Beendigung der PCR für 3 min auf 40 °C abgekühlt.

Tab.2.6 und 7: Programme zur Amplifizierung und Schmelzpunktbestimmung beim OPG-Nachweis

2.7 AGAROSEGELELEKTROPHORESE DES PCR-PRODUKTES

2.7.1 Methodik

Die Spezifität des PCR-Produktes wurde nach der Schmelzkurvenanalyse nochmals mit Hilfe einer Gelelektrophorese in 2% Agarosegel geprüft.

Hierbei wird die DNA in einem erstarrten Agarosegel einem elektrischen Feld, das bezüglich Spannung und Richtung konstant ist, ausgesetzt. Die negativ geladene DNA trennt sich nach ihrer Fragmentgröße auf. Zur Darstellung der DNA im Gel wird dem Laufpuffer (1 x TBE) Ethidiumbromid zugesetzt, das sich der Doppelstrangstruktur der DNA anlagert. Aufgrund dieser Markierung fluoresziert die DNA im UV-Licht.

2.7.2 Arbeitsprotokoll

Die Agarose wird in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 60% werden 150 µl/l (0,15 µg/ml) Ethidiumbromid zugegeben.

Das Gel wird in einem Gelschlitten gegossen und nach Erhärtung in einer Elektrophoresekammer laufen gelassen. In der Kammer befindet sich 1 x TBE-Puffer mit 150 µl/l Ethidiumbromidstammlösung als Laufpuffer.

Es werden jeweils 2 µl des 6 x Loading-Puffers zu einer Probe gegeben (Volumen der Probe: 20 µl). In die Slots des Agarosegels wird jeweils eine Probe gegeben. Diese wird durch den Loading-Puffer beschwert und ihre ungefähre Laufstrecke kann abgeschätzt werden. Der Längenstandard besteht aus 2 µl Loading-Puffer und 2 µl der 100 bp-Leiter. An die Kammer wird eine Stunde lang eine Spannung von 70 V angelegt.

Die DNA wird mit Hilfe eines UV-Transilluminator (Wellenlänge = 254 nm) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgt durch digitale Fotografie und Speicherung der Bilder.

2.8 STATISTISCHE VERFAHREN

Zur Signifikanzanalyse der MMP9-Expressionsveränderungen wurde ein zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Mit Hilfe des t-Testes sollte geprüft werden, ob die Mittelwerte der Messungen aus beiden Behandlungsstufen signifikante Unterschiede aufwiesen. Es wurde zu einem Niveau von 5% getestet.

Die Messwerte der OPG-Expressionsveränderungen wiesen drei Behandlungsstufen auf und wurden daher mit einer Varianzanalyse getestet, wobei ein P-Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet wurde.

Ergab sich aus der Varianzanalyse ein signifikantes Ergebnis, wurde der Fischer-Test als Post-Hoc-Test angeschlossen, um zu lokalisieren, zwischen welchen Behandlungsstufen signifikante Unterschiede bestanden. Auch hier wurde ein Testniveau von 5% zugrunde gelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 ETABLIERUNGEN DER PCR

3.1.1 Etablierung der PCR zum Nachweis von MMP9

Die Primer zum Nachweis von MMP9 amplifizieren einen Abschnitt des MMP9-Genoms mit einer Länge von 179 bp. Sie wurden bezüglich ihrer Annealingtemperatur, der Magnesium- und Primerkonzentration optimiert.

Die Optimierung der Annealintemperatur erfolgte, um eine spezifischere Reaktion zu ermöglichen. Die Annealingtemperatur variierte in den einzelnen Versuchen (Programm siehe 2.6.2.1) zwischen 57 °C, 58 °C, 59 °C und 60 °C, wobei die Temperatur von 59 °C die effizientesten und spezifischsten Ergebnisse aufwies.

Im zweiten Optimierungsschritt folgte der Vergleich verschiedener Magnesiumkonzentrationen. Hierbei wurden jeweils Doppelbestimmungen mit Konzentrationen von 1 mM- bis 5 mM Magnesium/Probe und eine Negativprobe untersucht. Es zeigten sich sowohl im Light Cycler als auch bei der anschließenden Gelelektrophorese optimale Ergebnisse bei einer Konzentration von 3 mM Magnesium/Probe.

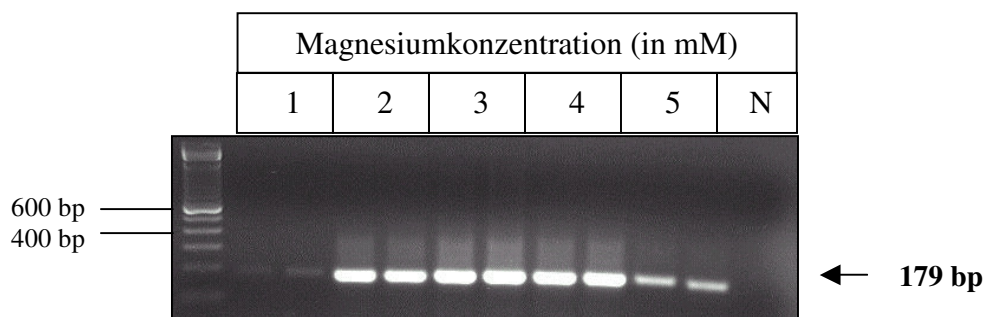


Abb.3.1: Gelelektrophorese zur Optimierung der Magnesiumkonzentration der MMP9-PCR. Es sind neben einer Basenpaarleiter 5 Konzentrationsstufen (jeweils in Doppelbestimmung) und eine Negativprobe (N) von links nach rechts aufgetragen.

Zum Schluss folgte die Optimierung der Primerkonzentration, wobei die Primer in einer Ausgangskonzentration von 10 pM/μl vorlagen. Wiederum in Doppelbestimmungen mit einer Negativkontrolle wurde den Proben bei einer Magnesiumkonzentration von 3mM/Probe und einer Annealingtemperatur von 59°C 0,4 bis 1,2 μl Primer a 10 pM/μl zugegeben. Hierbei stellte sich das Primervolumen von 1 μl/Probe als optimal heraus.

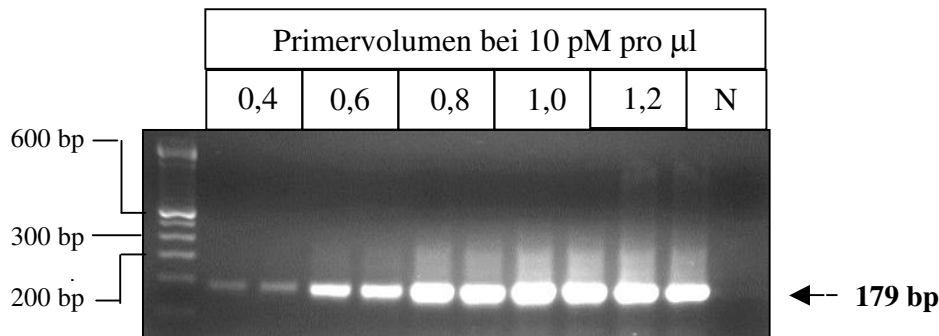


Abb.3.2: Gelelektrophorese zur Optimierung der Primerkonzentrationen des MMP9-Nachweises. Von links nach rechts sind eine Basenpaarleiter, die verschiedenen Primerkonzentrationen in Doppelbestimmungen und eine Negativprobe aufgetragen.

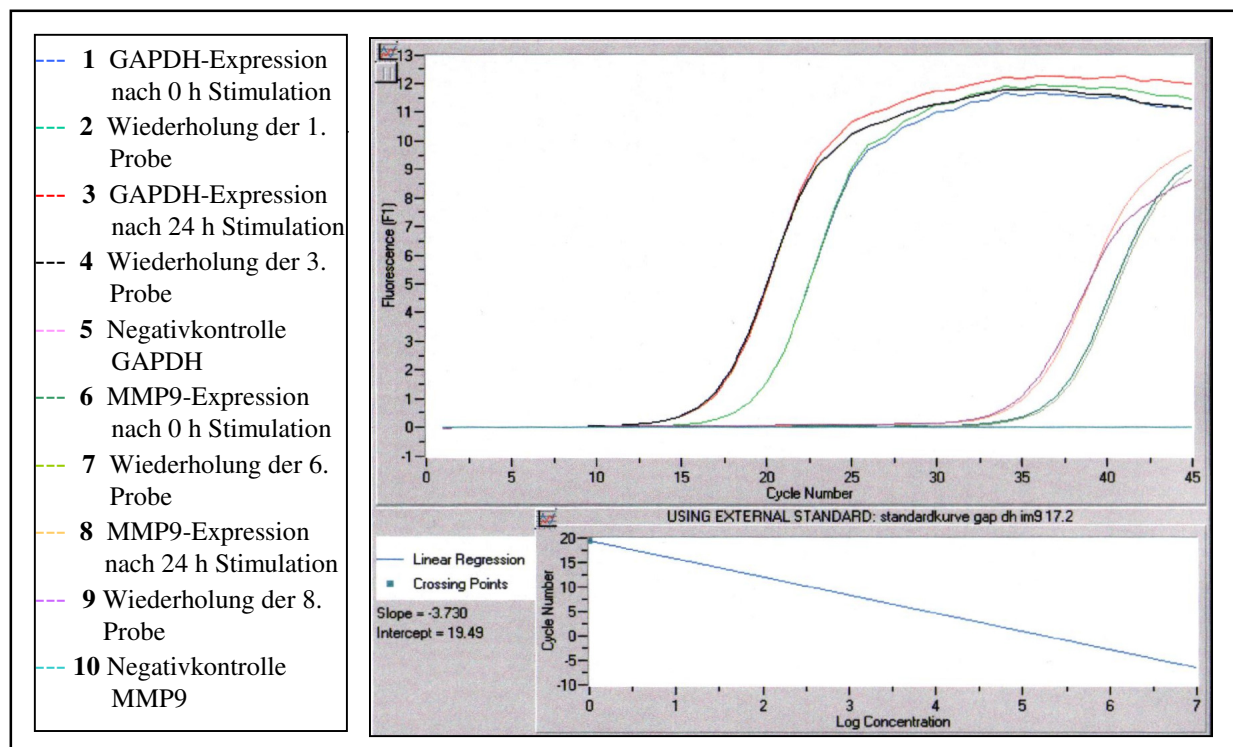


Abb.3.3 : Light Cycle-Messung zum Nachweis der MMP9-Expression durch Fibroblasten nach IM9-Stimulation.

Wie die Abbildung 3.3 zeigt, wurden im gleichen Versuch die GAPDH – und die MMP9-Expressionen 0- und 24-stündig behandelter Zellen parallel gemessen. Von jeder Behandlungs- und Expressionsform wurden hierbei Dreifachbestimmungen angelegt. Zwei der drei gemessenen Werte wurden später in die Auswertung aufgenommen, so dass für jede Messung eine Doppelbestimmung zugrunde lag.

Die hierbei verwendeten Primer zur Expressionsmessung von GAPDH amplifizieren ein Produkt mit einer Länge von 269 Basenpaaren (siehe Abb.3.9). Ihre Optimierung ergab Magnesiumkonzentrationen von 3 bzw. 4 mM/Probe und ein Primervolumen von 1 µl mit einer Konzentration von 10 pM/µl pro Probe. Sie können bei Annealingtemperaturen von 57-60 °C eingesetzt werden. Somit eignen sie sich hervorragend, um die Expressionsstärke des House-keeping-Gens GAPDH sowohl im Verhältnis zur MMP9- als auch im Verhältnis zur OPG-Expression zu messen.

3.1.2 Etablierung der PCR zum Nachweis von OPG

Die Optimierung der PCR zum Nachweis von OPG erfolgt unter den gleichen Bedingungen, wie die oben beschriebene Optimierung zum Nachweis von MMP9.

Die gewählten OPG-Primer amplifizieren ein Produkt, welches eine Länge von 324 Basenpaaren aufweist. Die optimale Annealingtemperatur konnte bei 58 °C festgelegt werden.

Wie aus den Abbildungen 3.4 und 3.5 zu ersehen ist, wurde eine optimale Magnesiumkonzentration bei 4 mM/Probe und eine optimale Primerkonzentration von 1 µl a 10 pM/µl pro Probe ermittelt. Diese Ergebnisse der Gelelektrophorese stimmten mit den Auswertungen im Light Cycler überein.

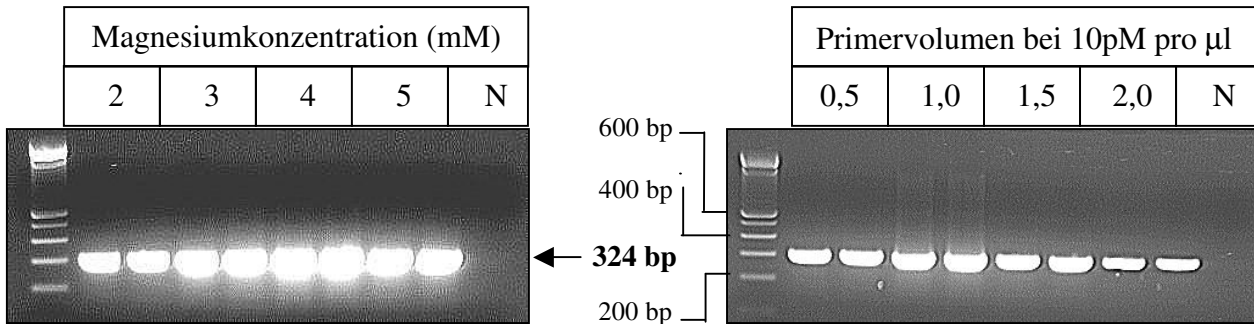


Abb.3.4: Gelelektrophorese zur Optimierung der Magnesiumkonzentration zum OPG-Nachweis. Es sind (von links nach rechts) eine Basenpaarleiter, 4 Magnesiumkonzentrationen in Doppelbestimmung und eine Negativprobe dargestellt.

Abb.3.5: Gelelektrophorese zur Primeroptimierung der OPG-PCR. Es wurden 4 verschiedene Konzentrationen, eine Basenpaarleiter und eine Negativprobe aufgetragen.

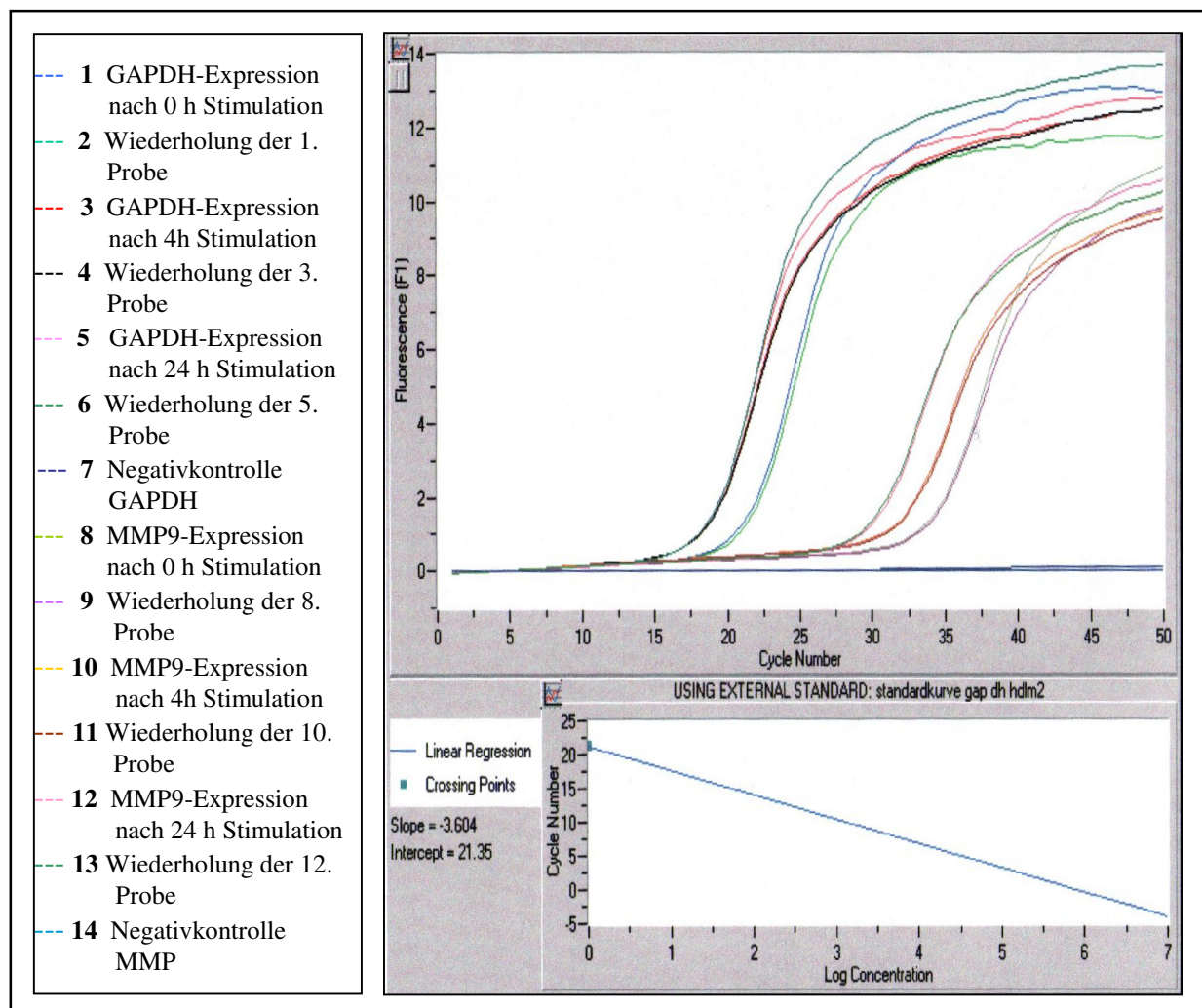


Abb.3.6 : Light Cycler-Messungen zum Nachweis der OPG-Expression durch Fibroblasten nach HDLM2-Stimulation

In der Abbildung 3.6 ist die Messung von GAPDH- und OPG-Expressionen nach unterschiedlicher Stimulationsdauer am Beispiel der Fibroblastenstimulation durch HDLM2-Zellen dargestellt. Auch in den Versuchen zur OPG-Expression wurde von jeder Behandlungs- und Expressionsform eine Dreifachbestimmung gemacht, von der zwei Werte in die Auswertung aufgenommen wurden.

3.1.3 Prüfung der Spezifität des PCR-Produktes

Die Spezifität des PCR-Produktes wurde durch drei verschiedene Methoden gesichert.

1. Bei jeder Light Cycler-PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt. Hierbei kann von einem spezifische Produkt ausgegangen werden, wenn dieses an seinem spezifischen Schmelzpunkt in seine Einzelstränge zerfällt und hierdurch ein messbarer Fluoreszenzabfall zustande kommt. Das spezifische Schmelzpunkt lag hierbei für das GAPDH-Produkt bei 90 °C, für das MMP9-Produkt bei 89 °C (Abb.3.7) und für das OPG-Produkt bei 85,5 °C (Abb.3.8).

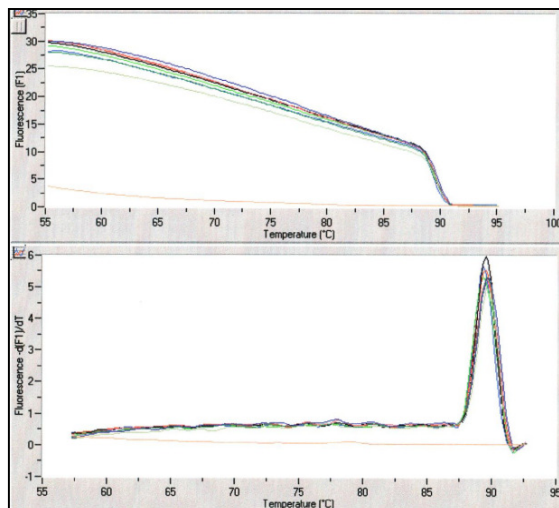


Abb.3.7: Schmelzkurvenanalyse der MMP9-Verdünnungsreihe (hierzu auch Abb.3.12).

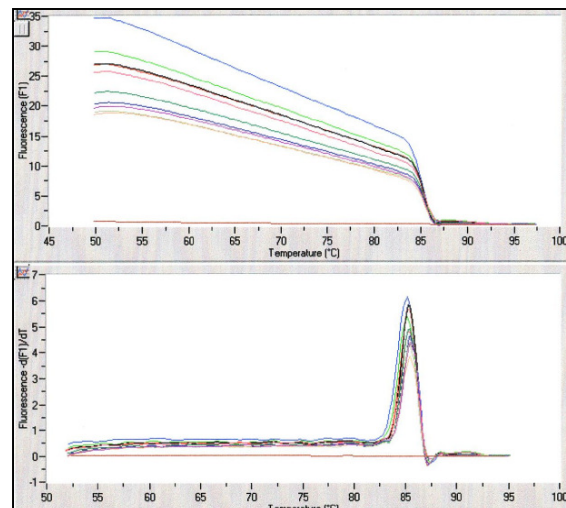


Abb.3.8: Schmelzkurvenanalyse der OPG-Verdünnungsreihe (hierzu auch Abb.3.14)

2. Zusätzlich zu der Spezifitätsüberprüfung der PCR-Produkte durch die Schmelzkurvenanalyse wurden im Anschluss an die PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. Den hierbei entstandenen Banden konnten mit Hilfe der Basenpaarleiter bestimmte Fragmentlängen zugeordnet werden, die mit den Fragmentlängen der spezifischen Produkte übereinstimmten (siehe Abb.3.9; 3.11 und 3.13).
3. Der abschließende Spezifitätsnachweis erfolgte über die Sequenzierung der PCR-Produkte.

3.1.4 Konzentrationsabschätzung mit Hilfe verschiedener Standardgeraden

Die Konzentrationsabschätzung bei der Light Cycler PCR erfolgt mit Hilfe der Fluoreszenzmessung jeder Probe während der PCR. An den exponentiell steigenden Kurvenabschnitt wird eine Ausgleichsgerade angelegt, deren Schnittpunkt mit der x-Achse jeder Probe eine bestimmte Zykluszahl zuordnet. Durch eine Standardgerade, welche über eine Verdünnungsreihe mit vorgegebenen Konzentrationen erstellt wird, kann nun diejenige Konzentration ermittelt werden, der ein exponentieller Anstieg zum Zeitpunkt der ermittelten Zyklusanzahl entspricht. Die Standardgeraden wurden hierfür unter Verwendung der gleichen PCR-Programme erstellt, die zum Nachweis des jeweiligen Proteins optimiert worden waren.

Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde für jede Stimulation eine zugehörige GAPDH-Standardgerade angefertigt, über die die Konzentrationen der GAPDH-Proben ermittelt wurde.

Die Standardgeraden wurden hierbei über vier Verdünnungsstufen festgelegt, wobei diese jeweils in Doppelbestimmungen vorlagen. Die Verdünnung 10^0 entsprach hierbei einem eingesetzten cDNA-Volumen von 2 µl pro Probe.

Über die Abweichungen der einzelnen Proben von der vorgegebenen Konzentration wurde die Fehlergröße der Standardgeraden ermittelt, die möglichst klein ($\text{Error} \leq 0,1$) gehalten wurde (Abb.3.10).

Standardgerade GAPDH

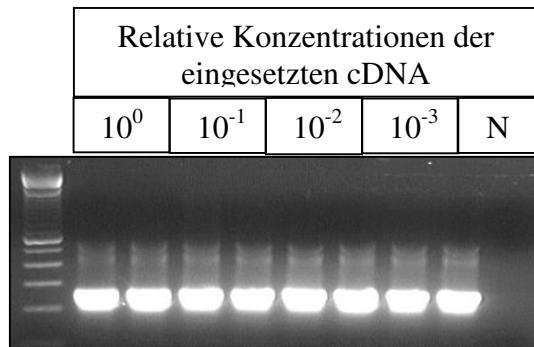


Abb.3.9: Gelelektrophorese der Verdünnungsreihe von GAPDH, wobei für jede Konzentration Doppelbestimmungen vorliegen. Das GAPDH-Produkt ist bei einer Länge von 269 bp zu sehen.

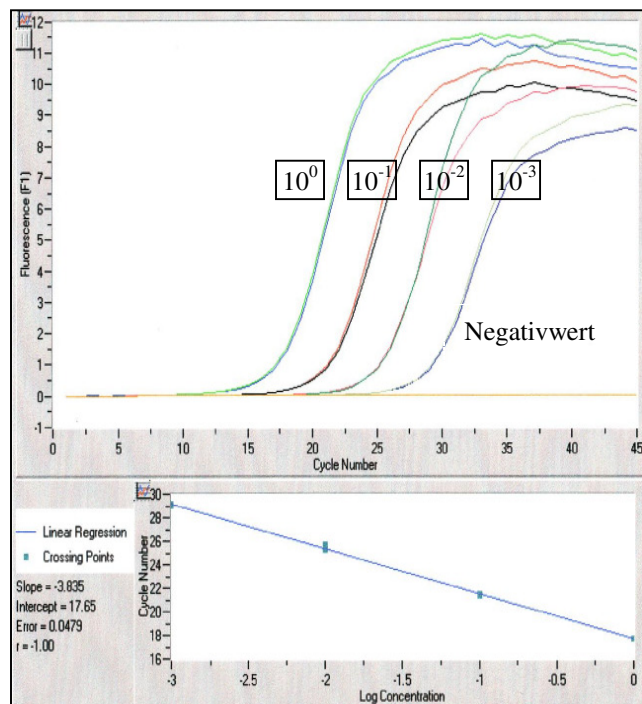


Abb.3.10: Verdünnungsreihe mit der daraus errechneten Standardgeraden von GAPDH (hier am Beispiel der U266-Behandlung von Stammzellen)

Die Steigung der Standardgeraden (Slope [S]) lässt eine Berechnung der Effizienz [E] der PCR über die Formel $E = 10^{-1/S}$ zu. Diese errechnete Effizienz kann jedoch nur für die bei der Erstellung der Standardgeraden zugrunde liegenden Bedingungen und den hierbei benutzten Primer vorausgesetzt werden. Aus diesem Grund sollten anhand einer Standardgeraden auch nur Konzentrationsbestimmungen für Proben erfolgen, bei denen die vorgegebenen Bedingungen (Primerart und -konzentration, Annealingtemperatur und Magnesiumkonzentration) denen der Standardgeraden entsprechen.

Daher wurden sowohl für MMP9 als auch für OPG eigene Standardgeraden angefertigt.

Da MMP9 und OPG in wesentlich geringerem Maße von Fibroblasten und Stammzellen exprimiert werden als GAPDH, waren die Konzentrationen im Bereich stärkerer Verdünnungen nicht mehr messbar. Aus diesem Grund wurden für die Standardkurven von MMP9 und OPG PCR-Produkte verwendet, welche zuvor mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt worden waren.

Standardgerade MMP9

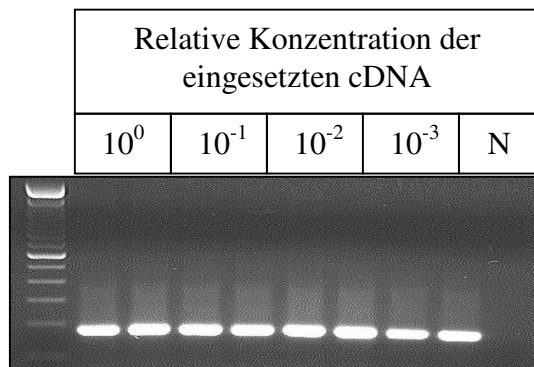


Abb.3.11: Gelelektrophorese der Verdünnungsreihe von MMP9, wobei für jede Konzentrationsstufe Doppelbestimmungen vorliegen. Das MMP9-Produkt stellt sich bei einer Länge von 179 bp dar.

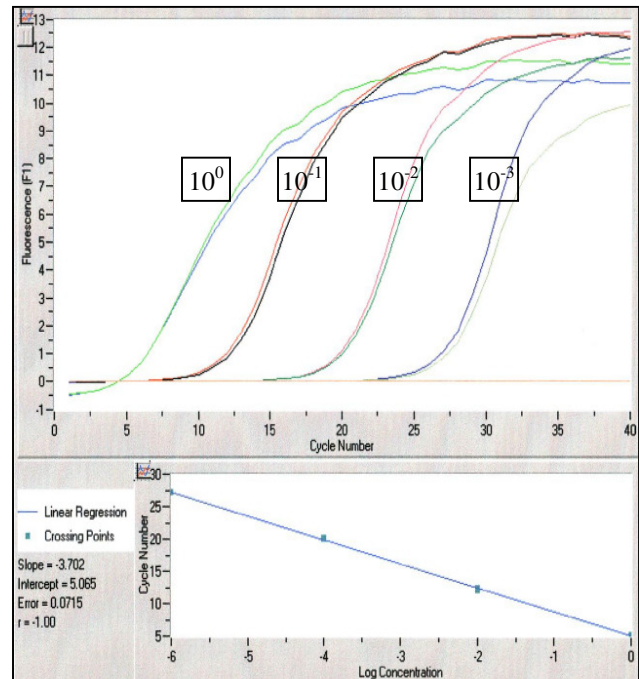


Abb.3.12: Verdünnungsreihe mit der daraus errechneten Standardgeraden von MMP9.

Standardgerade OPG

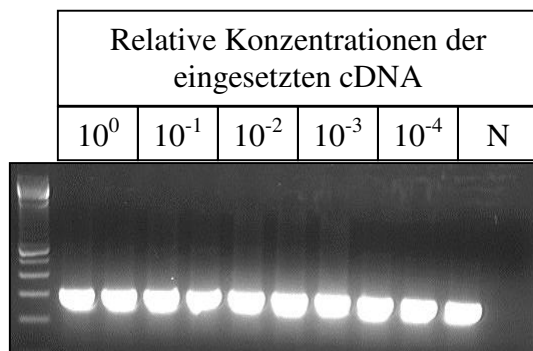


Abb.3.13: Gelelektrophorese der Verdünnungsreihe von OPG, wobei für jede Konzentrationsstufe Doppelbestimmungen vorliegen.

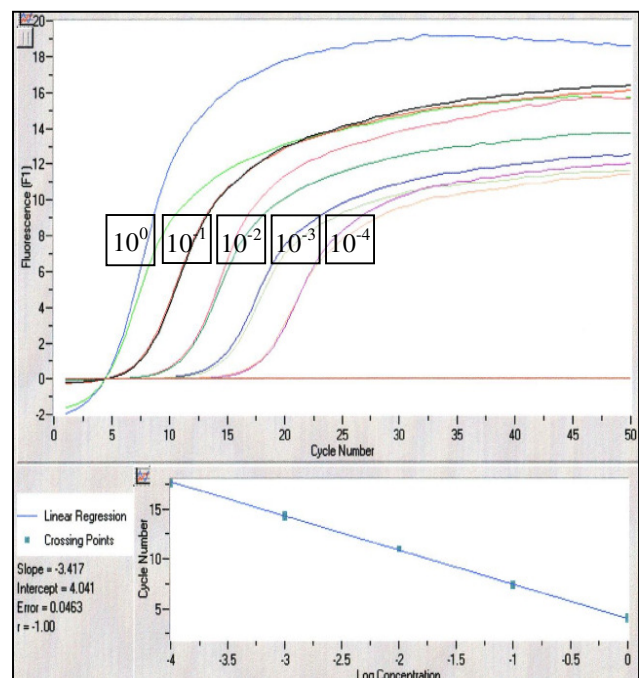


Abb.3.14: Verdünnungsreihe mit der daraus errechneten Standardgeraden von OPG.

Die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden somit immer an der entsprechenden Standardkurve abgelesen, um Ungenauigkeiten in der Konzentrationsbestimmung zu vermeiden.

3.2 MMP9-EXPRESSION VON FIBROBLASTEN UND MESENCHYMALEN STAMMZELLEN

3.2.1 MMP9-Expression nach Stimulation durch Myelom-Zelllinien

3.2.1.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der durch den Light Cycler gemessenen Konzentrationen wurde mit Hilfe eines zweiseitigen t-Testes unter der Annahme gleicher Varianzen für jede Stimulation durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf einen Wert von 5% festgelegt.

Die Normierung der einzelnen Konzentrationsmessungen erfolgte, indem die Konzentrationen der MMP9-Proben durch die der GAPDH-Proben dividiert wurden. Alle weiteren statistischen Auswertungen basieren somit auf den jeweiligen Relativkonzentrationen, wobei für jede Stimulationsdauer eine Doppelbestimmung zur Auswertung kam.

Protein	Stimulationsdauer [h]			
	0		24	
GAPDH	9,787E-01	9,816E-01	1,206E+00	1,230E+00
mmp9	1,316E-04	1,355E-04	1,012E-04	9,946E-05
Relativkonzentration	1,345E-04	1,380E-04	8,391E-05	8,086E-05

Tab.3.1: Beispielhafte Ermittlung der Relativkonzentrationen bei der Stimulation mesenchymaler Stammzellen durch die Zelllinie RPMI-8226

Die statistischen Auswertungen der MMP9-Expression führten bei den verschiedenen Myelom-Zelllinien zu folgenden Ergebnissen.

U266**Fibroblastenstimulation****Stammzellstimulation**

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mittelwert	5,064E-05	6,576E-05	5,009E-06	1,640E-06
Varianz	4,055E-11	9,832E-14	3,949E-14	1,326E-15
Standardabweichung	6,368E-06	3,136E-07	1,987E-07	3,641E-08
Beobachtungen	2	2	2	2
Gepoolte Varianz	2,033E-11		2,041E-14	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0		0	
Freiheitsgrade (df)	2		2	
t-Statistik	-3,354		23,582	
P(T<=t) zweiseitig	0,0786		0,0018	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,303		4,303	

Tab.3.2: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von MMP9 nach Stimulation durch die Zelllinie U266

IM9**Fibroblastenstimulation****Stammzellstimulation**

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mittelwert	2,015E-05	1,247E-05	2,106E-04	1,474E-04
Varianz	3,238E-13	4,345E-12	2,108E-09	9,329E-11
Standardabweichung	5,690E-07	2,085E-06	4,591E-05	9,659E-06
Beobachtungen	2	2	2	2
Gepoolte Varianz	2,334E-12		1,100E-09	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0		0	
Freiheitsgrade (df)	2		2	
t-Statistik	5,028		1,904	
P(T<=t) zweiseitig	0,0373		0,1973	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,303		4,303	

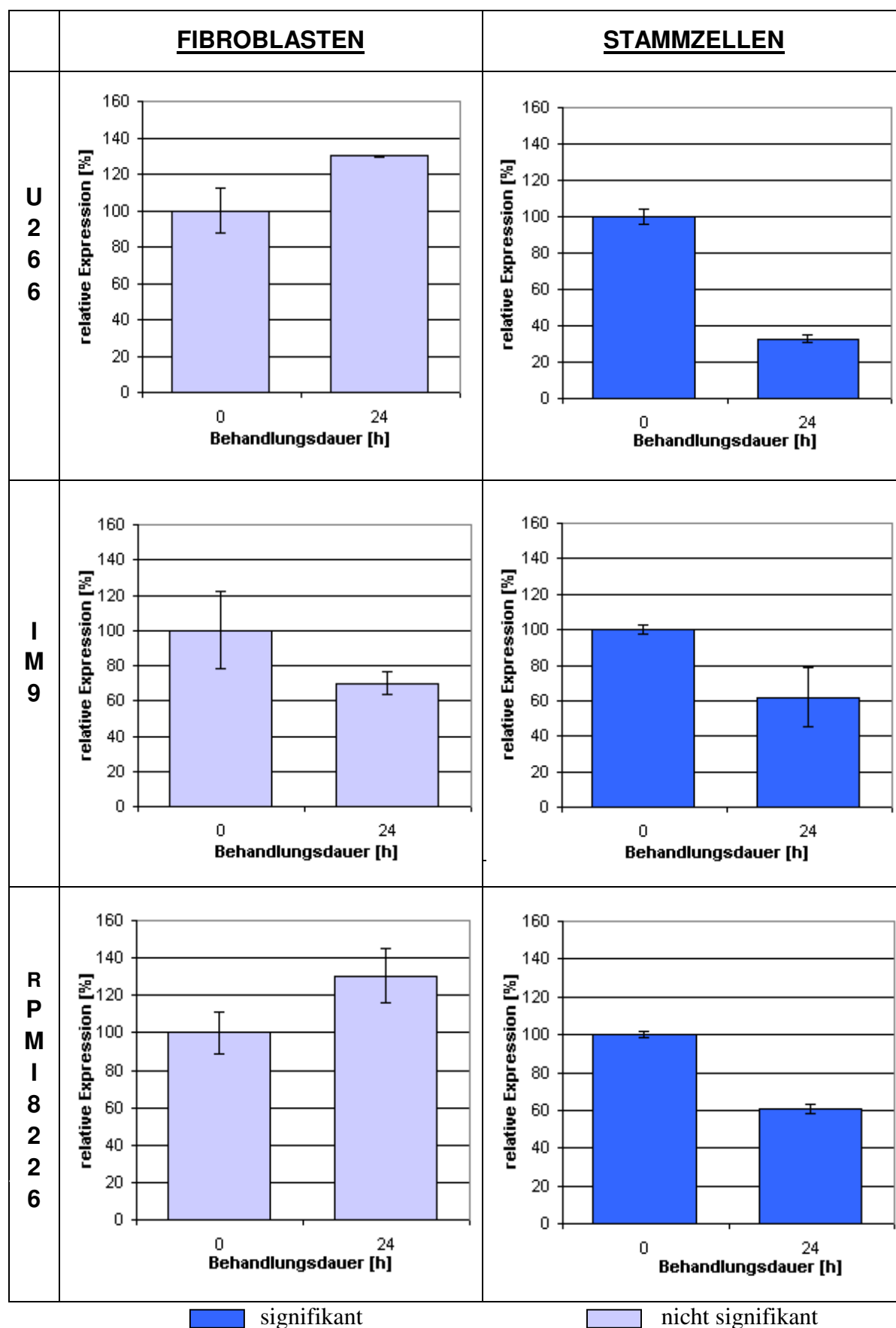
Tab.3.3: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von MMP9 nach Stimulation durch die Zelllinie IM9

RPMI8226**Fibroblastenstimulation****Stammzellstimulation**

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mittelwert	1,194E-03	1,557E-03	1,363E-04	8,239E-05
Varianz	1,852E-08	5,119E-08	6,393E-12	4,657E-12
Standardabweichung	1,361E-04	2,263E-04	2,529E-06	2,158E-06
Beobachtungen	2	2	2	2
Gepoolte Varianz	3,486E-08		5,525E-12	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0		0	
Freiheitsgrade (df)	2		2	
t-Statistik	-1,945		22,915	
P(T<=t) zweiseitig	0,1912		0,0019	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,303		4,303	

Tab.3.4: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von MMP9 nach Stimulation durch die Zelllinie RPMI8226

3.2.1.2 Grafische Darstellung der Ergebnisse



Die grafischen Auswertung stellt die prozentualen Veränderungen der Expression von MMP9 nach Stimulations- bzw. Behandlungszeiten von 0 h und 24 h dar. Hierbei wird die errechnete 0 h-Konzentration von MMP9 einer relativen Expressionsstärke von hundert Prozent zugeordnet. Über die Konzentrationen von MMP9 nach 24-stündiger Behandlung konnte die relative Veränderung der Expression von MMP9 prozentual dargestellt werden. Der Fehlerbalken zeigt die Höhe der jeweiligen Standardabweichung der Messwerte. Zur besseren Beurteilung der Messungen wurden die signifikanten Ergebnisse in einem dunkleren Farbton dargestellt als die nicht signifikanten Ergebnisse.

Die Auswertungen zeigen eine sehr unterschiedliche Reaktion von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen auf die Stimulation durch Medien verschiedener Myelomzelllinien. Die Fibroblasten reagieren zudem verschieden auf die jeweiligen Zelllinien. Dabei ist nur eine Reaktion als signifikant einzustufen, die sich in einer Abnahme der MMP9-Expression nach IM9-Stimulation zeigt. Die mesenchymalen Stammzellen reagieren hingegen sehr homogen mit einer Verminderung der MMP9-Expression auf die Stimulation durch die verschiedenen Myelom-Medien. Zwei von drei Stimulationsversuchen ergeben hierbei eine signifikante Abnahme (U266 und RPMI 8226), und auch nach der Stimulation durch IM9-Zellen vermindert sich die MMP9 Konzentration.

3.2.2 MMP9-Expression nach Stimulation durch Hodgkin-Zelllinien

3.2.2.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der MMP9-Expression nach Stimulation durch Hodgkin-Zelllinien gelten die gleichen Annahmen und Bedingungen wie unter 3.2.1.1 beschrieben.

Die statistische Auswertung der MMP9-Expression nach Stimulation durch verschiedene Hodgkin-Zelllinien führt hierbei zu folgenden Ergebnissen:

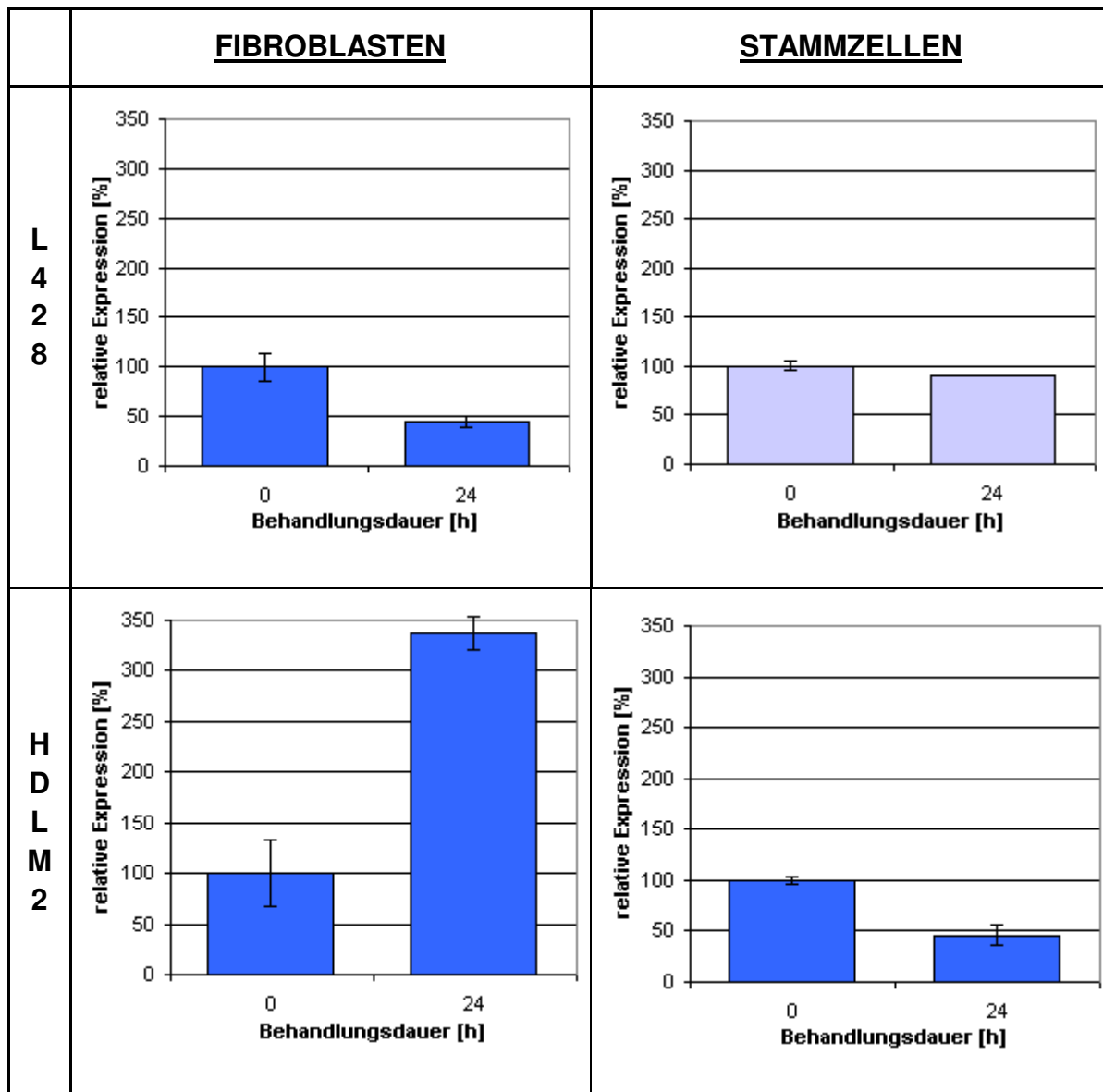
<u>L428</u>	<u>Fibroblastenstimulation</u>		<u>Stammzellstimulation</u>	
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mittelwert	3,219E-03	1,442E-03	1,015E-03	9,095E-04
Varianz	1,921E-07	4,933E-09	2,257E-09	6,753E-11
Standardabweichung	4,383E-04	7,024E-05	4,751E-05	8,218E-06
Beobachtungen	2	2	2	2
Gepoolte Varianz	9,853E-08		1,162E-09	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0		0	
Freiheitsgrade (df)	2		2	
t-Statistik	5,661		3,099	
P(T<=t) zweiseitig	0,0298		0,0902	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,303		4,303	

Tab.3.5: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von MMP9 nach Stimulation durch die Zelllinie L428

<u>HDLM2</u>	<u>Fibroblastenstimulation</u>		<u>Stammzellstimulation</u>	
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mittelwert	4,038E-04	1,362E-03	1,571E-03	7,218E-04
Varianz	1,792E-08	4,562E-08	2,704E-09	4,689E-09
Standardabweichung	1,339E-04	2,136E-04	5,200E-05	6,847E-05
Beobachtungen	2	2	2	2
Gepoolte Varianz	3,177E-08		3,696E-09	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0		0	
Freiheitsgrade (df)	2		2	
t-Statistik	-5,374		13,962	
P(T<=t) zweiseitig	0,0329		0,00509	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,303		4,303	

Tab.3.6: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von MMP9 nach Stimulation durch die Zelllinie HDLM2

3.2.2.2 Grafische Darstellung der Ergebnisse



Die Stimulation durch die Hodgkin-Zelllinien L428 und HDLM2 führt bei den behandelten Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen ebenfalls zu unterschiedlichen Reaktionen im Bezug auf die MMP9-Expression. Die Fibroblasten vermindern die MMP9-Expression nach L428-Stimulation, wohingegen sie nach HDLM2-Stimulation mit einem großen Expressionszuwachs von MMP9 reagieren. Die mesenchymalen Stammzellen zeigen nach Hodgkin-Stimulation keine großen MMP9-Expressionsschwankungen, weisen jedoch eher eine Reduktion von MMP9 auf. Dieser MMP9-Abfall ist signifikant im Fall der Stimulation durch die Zelllinie HDLM2.

Die Stammzellen reagierten somit sowohl auf die Stimulation durch Myelom-Zelllinien als auch auf die Stimulation durch Hodgkin-Zelllinien immer mit einer Reduktion ihrer MMP9-Expression.

3.3 OPG-EXPRESSION VON FIBROBLASTEN UND MESENCHYMALEN STAMMZELLEN

3.3.1 OPG-Expression nach Stimulation durch Myelom-Zelllinien

3.3.1.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse zur OPG-Expression wurde die Varianzanalyse zur Signifikanztestung herangezogen. Mit Hilfe der Varianzanalyse wurden die Ergebnisse bei einem P-Wert $< 0,05$ als signifikant eingestuft. Um im Signifikanzfall der Varianzanalyse herauszufinden, zwischen welchen Behandlungsstufen ein Unterschied zu finden ist, wurde als Post-Hoc-Test der Fischer Test angeschlossen. Dieser kann ebenfalls bei einem P-Wert $\leq 0,05$ als signifikant gewertet werden.

U266**Fibroblastenstimulation****Stammzellstimulation**

	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>
Mittelwert	2,125E-03	2,364E-04	3,150E-04	2,193E-03	4,299E-05	3,073E-03
Varianz	3,933E-08	2,874E-10	2,905E-10	6,682E-09	1,398E-11	2,697E-08
Standardabw.	1,983E-04	1,695E-05	1,704E-05	8,174E-05	3,739E-06	1,642E-04

Varianzanalyse: P-Wert = **0,0008**

P-Wert = **0,002**

Fischer-Test

	<i>0h zu 4 h</i>	<i>0h zu 24h</i>	<i>4h zu 24h</i>	<i>0h zu 4 h</i>	<i>0h zu 24h</i>	<i>4h zu 24h</i>
P-Wert	0,005	0,006	0,544	0,003	0,0036	0,0001

Tab.3.7: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von OPG nach Stimulation durch die Zelllinie U266

IM9**Fibroblastenstimulation****Stammzellstimulation**

	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>
Mittelwert	3,323E-05	1,717E-05	1,212E-05	4,476E-03	6,084E-03	4,363E-03
Varianz	2,054E-11	1,068E-12	2,432E-11	3,017E-07	1,921E-06	3,111E-08
Standardabw.	4,532E-06	1,034E-06	4,931E-06	5,493E-04	1,386E-03	1,764E-04

Varianzanalyse: P-Wert = **0,0253**

P-Wert = 0,232

Fischer-Test

	<i>0h zu 4 h</i>	<i>0h zu 24h</i>	<i>4h zu 24h</i>
P-Wert	0,0261	0,0125	0,286

Tab.3.8: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von OPG nach Stimulation durch die Zelllinie IM9

RPMI8226**Fibroblastenstimulation****Stammzellstimulation**

	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>
Mittelwert	5,149E-04	5,317E-04	2,443E-03	8,117E-03	8,055E-03	8,581E-03
Varianz	4,765E-09	1,165E-09	4,444E-07	4,436E-06	5,249E-07	1,436E-07
Standardabw.	6,903E-05	3,414E-05	6,666E-04	2,106E-03	7,245E-04	3,789E-04

Varianzanalyse: P-Wert = **0,0244**

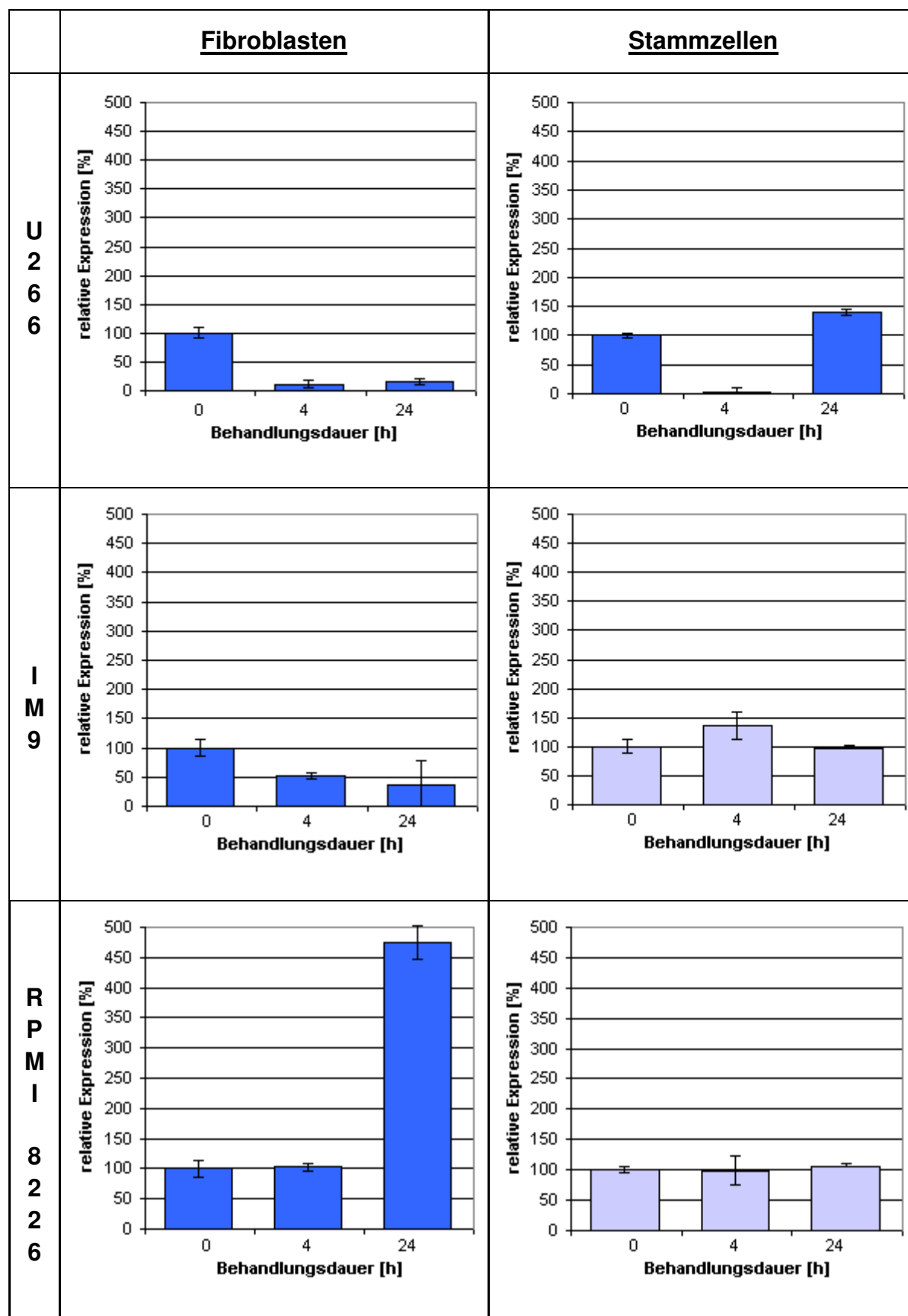
P-Wert = 0,9101

Fischer-Test

	<i>0h zu 4 h</i>	<i>0h zu 24h</i>	<i>4h zu 24h</i>
P-Wert	0,968	0,0156	0,016

Tab.3.9: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von OPG nach Stimulation durch die Zelllinie RPMI8226

3.3.1.2 Grafische Darstellung der Ergebnisse



Die OPG-Expression nach Myelom-Kontakt zeigt bei den Fibroblastenversuchen drei signifikante Ergebnisse. Nach Stimulation durch die Zelllinien U266 und IM9 reduzieren sich die OPG-Konzentrationen sowohl nach 4-stündiger, als auch nach 24-stündiger Behandlung im Verhältnis zur Expression nach 0-stündiger Stimulation. Die Zelllinie RPMI 8226 bewirkt im Gegensatz hierzu einen starken Anstieg der OPG-Konzentration nach 24 Stunden. Die OPG-Expression ist hierbei im Vergleich zur 0-stündigen Behandlung um mehr als das Vierfache gestiegen.

Die mesenchymalen Stammzellen reagieren ausschließlich nach U266-Kontakt mit signifikanten Veränderungen ihrer OPG-Expression. Es erfolgt nach 4-stündiger Behandlung ein Abfall, nach 24-stündiger Behandlung ein Anstieg, wobei hierbei eine höhere Konzentration als bei 0-stündiger Behandlung erreicht wird. Die anderen Myelom-Zelllinien (IM9 und RPMI 8226) rufen keine signifikanten Veränderungen in der OPG-Expressionsstärke der Stammzellen hervor.

3.3.2 OPG-Expression nach Stimulation durch Hodgkin-Zelllinien

3.3.2.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der OPG-Expression nach Stimulation durch Hodgkin-Zelllinien gelten die gleichen Annahmen und Bedingungen wie unter 3.3.1.1 beschrieben.

<u>L428</u>	<u>Fibroblastenstimulation</u>			<u>Stammzellstimulation</u>		
	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>
Mittelwert	2,084E-02	2,238E-03	3,773E-02	1,383E-04	7,553E-05	2,562E-04
Varianz	8,003E-06	1,216E-08	2,373E-06	1,687E-10	1,706E-11	8,008E-10
Standardabw.	2,829E-03	1,103E-04	1,541E-03	1,299E-05	4,131E-06	2,830E-05
<u>Varianzanalyse:</u>	P-Wert = 0,0007			P-Wert = 0,0048		
<u>Fischer-Test</u>						
	0h zu 4 h	0h zu 24h	4h zu 24h	0h zu 4 h	0h zu 24h	4h zu 24h
P-Wert	0,0021	0,0028	0,0003	0,0408	0,0074	0,0022

Tab.3.10: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von OPG nach Stimulation durch die Zelllinie L428

HDLM2

Fibroblastenstimulation

Stammzellstimulation

	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>	<i>0 Stunden</i>	<i>4 Stunden</i>	<i>24 Stunden</i>
Mittelwert	2,778E-04	1,889E-04	6,963E-04	1,783E-04	2,090E-04	6,803E-04
Varianz	1,416E-09	7,318E-18	1,147E-08	3,327E-11	7,960E-10	2,469E-09
Standardabw.	3,764E-05	2,705E-09	1,071E-04	5,768E-06	2,821E-05	4,969E-05

Varianzanalyse: P-Wert = **0,0086**

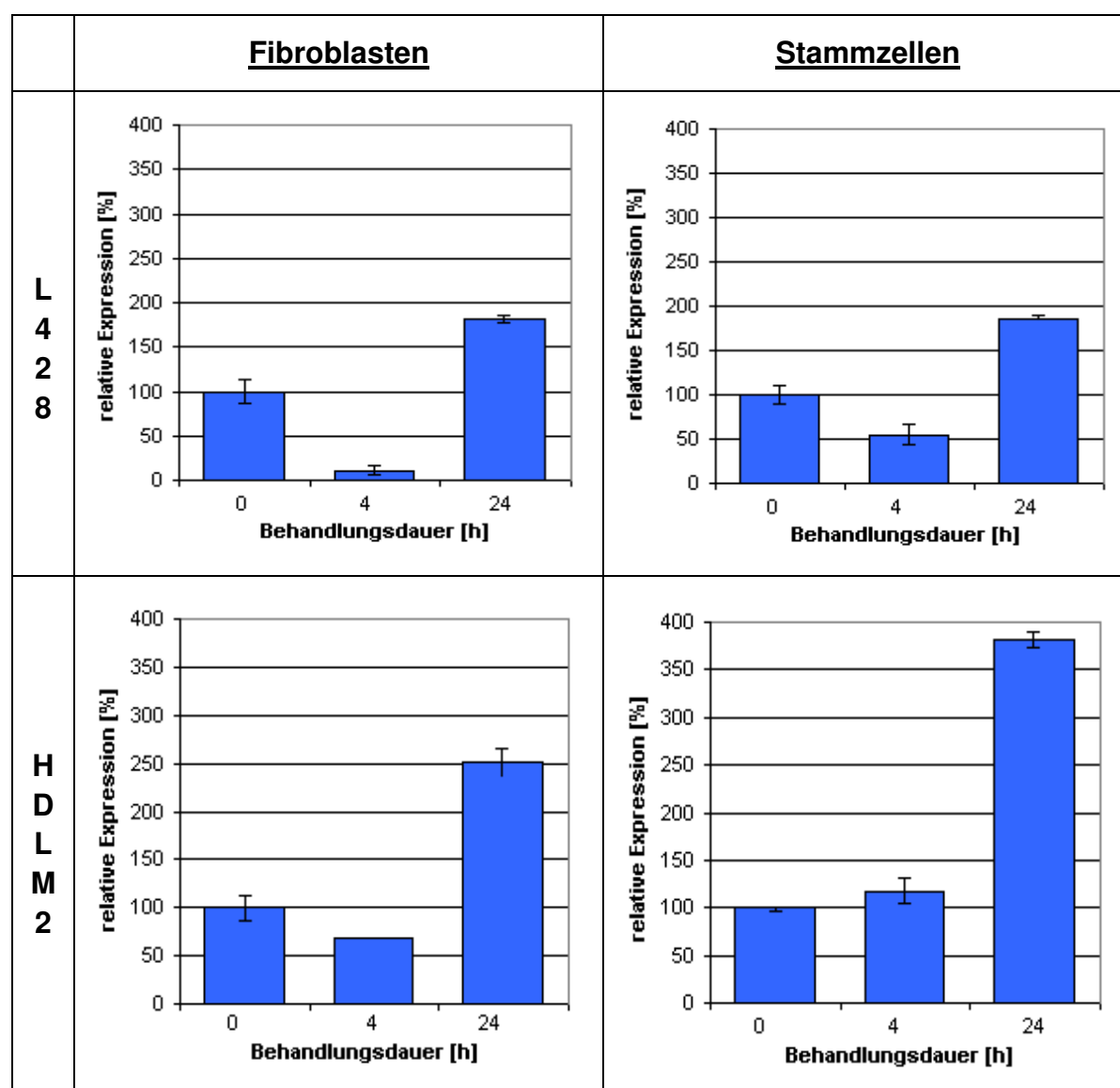
P-Wert = **0,0010**

Fischer-Test

	<i>0h zu 4 h</i>	<i>0h zu 24h</i>	<i>4h zu 24h</i>	<i>0h zu 4 h</i>	<i>0h zu 24h</i>	<i>4h zu 24h</i>
P-Wert	0,2684	0,0078	0,0045	0,4223	0,0006	0,0008

Tab.3.11: Statistische Auswertung der Fibroblasten- und Stammzellexpression von OPG nach Stimulation durch die Zelllinie HDLM2

3.3.2.2 Grafische Darstellung der Ergebnisse



Die OPG-Expression nach Hodgkin-Zellkontakt zeigt sowohl bei Fibroblasten als auch bei mesenchymalen Stammzellen sehr gleichförmige Reaktionen. In den Fibroblastenversuchen kommt es nach 4-stündiger Stimulation durch L428 und HDLM2 zu einer Abnahme der OPG-Expression. Nach 24-stündiger Stimulation folgt sowohl im Vergleich zur Expressionsstärke nach 0- als auch nach 4 Stunden ein deutlicher Anstieg der OPG-Konzentration.

Die Stammzellen reagieren nach U266-Stimulation im Bezug auf ihre OPG-Expression in gleicher Form wie die Fibroblasten. Die Stimulation durch die Hodgkin-Zelllinie HDLM2 bewirkt nach 4 Stunden einen leichten, nach 24 Stunden einen starken Anstieg der OPG-Expression durch die mesenchymalen Stammzellen.

In allen Stimulationsversuchen durch die Hodgkin-Zelllinien konnte sowohl bei Fibroblasten als auch bei Stammzellen ein signifikanter Anstieg der OPG-Expression nach 24-stündiger Behandlung nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

4.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE IM BEZUG AUF DIE OSTEOLYSEN BEIM MULTIPLN MYELOM

Die Ursache der Osteolysen beim Multiplen Myelom ist bereits in vielen Bereichen einer Erklärung näher gekommen. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob eine erhöhte OPG- bzw. MMP9-Expression durch die myelombefallenen Stromazellen des Knochenmarks die osteolytischen Vorgänge beschleunigt. Die Stromazellen wurden in den vorliegenden Versuchen durch dermale Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen repräsentiert. Es wurde kein direkter Zellkontakt zwischen den Myelom- bzw. Hodgkin-Zelllinien und den Stromazellen zugelassen. Interessant war hierbei die Überlegung, ob durch diese Medienstimulation die Expressionsraten der untersuchten Faktoren verändert werden.

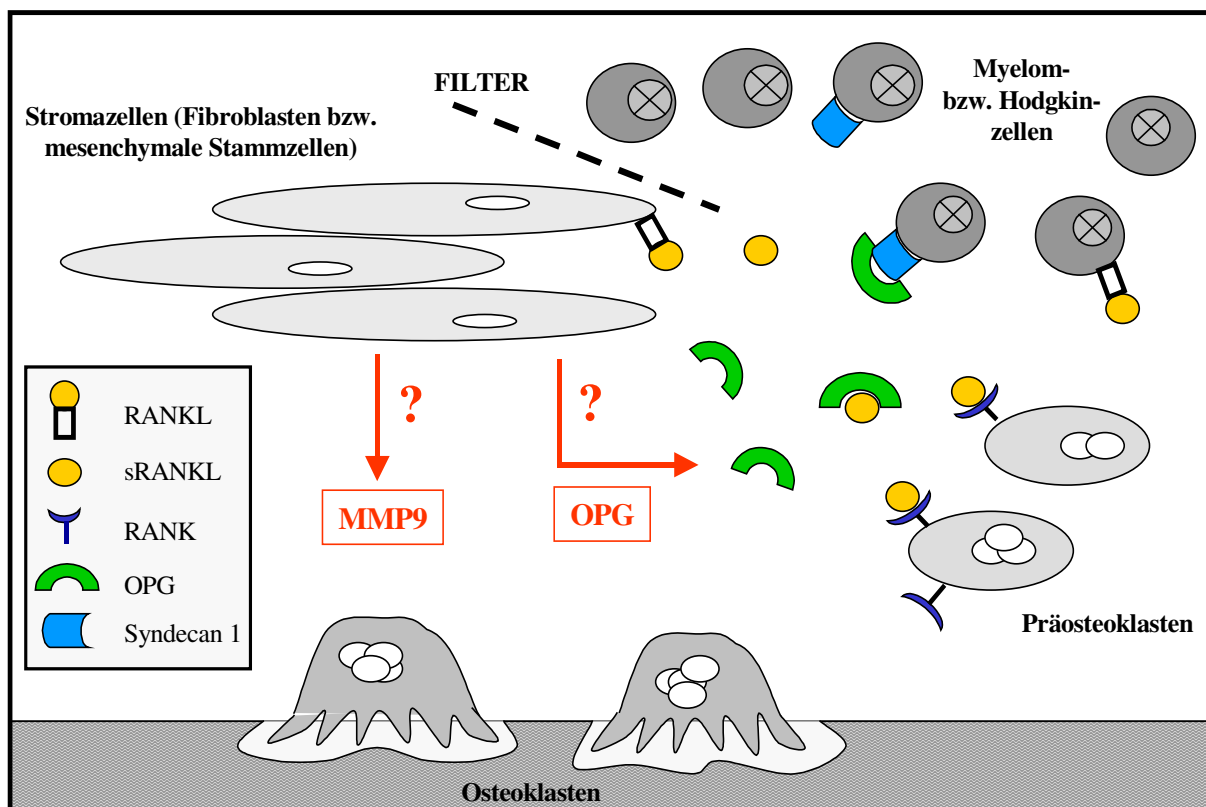


Abb.4.1: Abgeändertes Modell der Knochendestruktion beim Multiplen Myelom (siehe Abb.1.2). Es wurden die in der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Bedingungen und Fragestellungen eingebaut.

4.1.1 Die OPG-Expression nach Stimulation durch Myelomzelllinien

Die Untersuchungen der OPG-Expressionsveränderungen von Fibroblasten nach Stimulation durch Myelomzellmedien erbrachten signifikante aber teilweise uneinheitliche Ergebnisse. Es zeigte sich sowohl nach 4-stündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation durch U266 und IM9-Medien ein deutlicher Abfall der OPG-Expression durch die Fibroblasten. Diese deutliche Reduktion der OPG-Konzentration im Knochen begünstigt eine vermehrte Knochenresorption, da weniger RANKL durch OPG gebunden werden kann (Abb.4.1). In diesem Fall bewirken die Knochenstromazellen nicht nur über eine verstärkte RANKL-, sondern zusätzlich über eine erniedrigte OPG-Expression nach Myelomkontakt eine deutliche Steigerung der Osteoklastenaktivität. Diese Verminderung der OPG-Spiegel auch außerhalb des Knochens wiesen Seidel et al. in einer Studie nach, in der sie die OPG-Spiegel im Serum von gesunden Patienten mit denen von Myelom-Patienten verglichen. Der erniedrigte OPG-Spiegel korrelierte hierbei sowohl mit der radiologisch beurteilten Knochendestruktion als auch mit Markern der Knochenneubildung [45].

Auffällig waren die Ergebnisse der OPG-Expression durch Fibroblasten nach Stimulation durch Medien der Zelllinie RPMI8226. Hierbei zeigte sich nach 4-stündiger Behandlung keinerlei Veränderung, nach 24-stündiger Stimulation stieg die OPG-Expression jedoch auf mehr als 400% des Ausgangswertes an. Diese Reaktion der Fibroblasten hätte einen protektiven Einfluss auf die Knochensubstanz und entspricht somit nicht den zu erwartenden Reaktionen beim Multiplen Myelom. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass Osteolysen beim Myelom zwar meistens vorliegen, aber es durchaus Plasmazytome gibt, die keine osteolytischen Eigenschaften besitzen. Aus diesem Grund kann nicht bei jeder Zelllinie ein osteolytisches Potential vorausgesetzt werden. Die Reaktion der Fibroblasten auf die RPMI-Stimulation konnte in den Stammzellversuchen nach RPMI8226-Stimulation nicht gefunden werden. Die Stammzellen reagierten mit keinerlei Veränderungen in ihrer OPG-Expression auf die Stimulation. Nur die Stimulation durch die Zelllinie U266 zeigte bei den Stammzellen einen signifikanten Abfall nach 4-stündiger und einen Wiederanstieg der OPG-Expression nach 24-stündiger Behandlung.

Giuliani et al. konnten unter dem Einfluss konditionierter Medien keinen Einfluss der OPG-Expression feststellen [30]. Unsere Ergebnisse widersprechen diesen Untersuchungen, die jedoch mit anderen Zelllinien durchgeführt wurden. Lediglich die Zelllinie U266 wurde von Giuliani et al. ebenfalls verwendet, sie zeigte jedoch keine Expressionsveränderungen von

OPG in den Stromazellen des Knochens. Die signifikanten Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die OPG-Expressionsverminderung oder -Expressionssteigerung über, von den Myelomzellen in das Medium sezernierten, humorale Faktoren bedingt sein müssen. Dies muss der Fall sein, da kein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Myelomzellen und Stromazellen zustande kam. Eine stimulierende Wirkung auf die OPG-Expression konnten Hofbauer et al. für die Faktoren IL-1 α und -1 β , Vit. D3 und BMP-2 nachweisen [46]. Die gleiche Wirkung haben die Faktoren TGF- α und - β , Östrogen und IL-18 [47-49]. Als hemmende Faktoren der OPG-Expression sind lediglich Glukokortikoide, PGE₂ und Forskolin bekannt [50].

Die Möglichkeiten einer OPG-Expressionsveränderung durch Myelomzellen scheinen jedoch immer über die Stromazellen des Knochens zu verlaufen, da in Myelomzellen selbst keine OPG mRNA-Expression oder Protein-Sekretion nachweisbar ist [30]. Von Giuliani et al. und Pearce et al. konnte eine Inhibition der OPG-Expression durch Knochenstromazellen nach direktem Kontakt mit Myelomzellen nachgewiesen werden [30, 31]. In unseren Untersuchungen wurden diese OPG-Expressionserniedrigungen auch ohne direkten Zellkontakt nachgewiesen. Das Multiple Myelom schafft auf diese Weise ein Ungleichgewicht zwischen RANKL und OPG. Hierbei verstärkt es die RANKL-Konzentration durch eine erhöhte Stromazell- und Eigenexpression. Zeitgleich reduzierten die Myelomzellen die OPG-Konzentration durch eine Negativbeeinflussung der Stromazell-OPG-Expression und eine Inaktivierung von OPG über die Bindung an Sydecin1, welches die Myelomzellen selbst exprimieren [51].

4.1.2 Die OPG-Expression nach Stimulation durch Hodgkinzelllinien

Die Untersuchungen der OPG-Expression von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen nach Stimulation mit Hodgkinzellmedium zeigte sehr gleichförmige Ergebnisse. In allen Versuchen konnte ein deutlicher Anstieg der relativen OPG-Expression gemessen werden, der bei Fibroblasten und Stammzellen nach Stimulation mit HDLM2 konditioniertem Medium besonders hoch war. Dieser OPG-Expressionsanstieg bedingt einen verminderten Knochenabbau durch die Osteoklasten. Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, da beim M. Hodgkin keine osteolytischen Herde gefunden werden. Fiumara et al. konnten nachweisen, dass die H/RS-Zellen, die eigentlichen malignen Zellen des Morbus Hodgkin RANKL,

RANK und OPG exprimieren [52]. Sie untersuchten hierzu ebenfalls die Zelllinien HDLM2 und L428 und die möglichen Effekte der RANKL-Expression auf die Chemokin- und Zytokinexpression der H/RS-Zellen über einen autokrinen Mechanismus.

Die Expression von RANKL durch die Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen und die gleichzeitige Steigerung der OPG-Expression der Stromazellen nach Hodgkin-Stimulation scheinen widersprüchlich. Die autokrine Stimulation der H/RS-Zellen über den ebenfalls von ihnen exprimierten RANK-Rezeptor wird durch die erhöhte OPG-Sekretion der umgebenden Zellen und die dadurch vermehrte Bindung von RANKL vermindert.

Ein möglicher osteolytischer Effekt durch das von den H/RS-Zellen exprimierte RANKL würde somit durch die erhöhte OPG-Expression der Stromazellen verhindert.

4.1.3 Die MMP9-Expression

Es wurde bereits im Einleitungsteil darauf hingewiesen, dass MMP9 in der Osteolyse eine wichtige Rolle spielt. Es wird mit Kathepsin von aktivierten Osteoklasten sezerniert und lysiert als Gelatinase den zuvor durch Säure demineralisierten Knochen [53-55]. Zusätzlich wird MMP9 eine Funktion bei der Rekrutierung und Aktivierung der Osteoklasten zugesprochen [44, 56]. Im Falle eines Multiplen Myeloms konnte nachgewiesen werden, dass Myelomzellen eine erhöhte MMP9-Expression aufweisen und hierdurch die Knochenresorption ihrerseits zusätzlich erhöhen [57, 58]. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es durch eine Myelomzellstimulation von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen zu einer zusätzlichen MMP9-Expressionssteigerung dieser Zellen kommt. In diesem Fall würden die Myelomzellen die MMP9-Konzentration in ihrer Umgebung nicht nur über ihre eigene MMP9-Expressionssteigerung erhöhen, sondern auch die Stromazellen im Knochen zu diesem Zweck einsetzen. Die Ergebnisse lassen diese Schlussfolgerung bedingt bei den Fibroblastenstimulationsversuchen mit Myelomzelllinien zu. So zeigen die beiden repräsentativen Myelomzelllinien U266 und RPMI8226 eine MMP9-Expressionssteigerung nach Myelomzellstimulation, die jedoch nicht signifikant ist. Die lymphoblastoide B-Zelllinie IM9 hingegen weist einen signifikanten MMP9-Abfall auf. Vorangegangene Versuche, bei denen die Auswirkungen des direkten Zell-Zell-Kontaktes zwischen Myelomzellen der Zelllinie U266 und dermalen Fibroblasten untersucht wurden, ergaben jedoch eine stark erhöhte Expression von MMP9 in den behandelten Fibroblasten. Möglich ist, dass ein signifikanter Anstieg der MMP9-Expression in Fibroblasten nur nach direktem Kontakt zwischen diesen

und den Myelomzellen zustande kommt, der jedoch unter in vivo Bedingungen auch gegeben ist.

Betrachtet man die Reaktion der mesenchymalen Stammzellen auf die Stimulationen, zeigt sich nach U266- und RPMI8226-Stimulation eine Abnahme der MMP9-Expression, die als signifikant angesehen werden kann. Diese MMP9-Abnahme spricht gegen die Annahme eines osteolytischen Einflusses der mesenchymalen Stammzellen durch eine vermehrte MMP9-Sekretion.

4.1.4 Therapieoptionen der Osteolysen beim Multiplen Myelom

Die derzeit diskutierten Therapieansätze der Osteolysen beim Multiplen Myelom haben alle eine Wiederherstellung des OPG/RANKL-Gleichgewichts und eine daraus resultierende Ausgeglichenheit der Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten zum Ziel.

Honore et al. beschrieben die Möglichkeit einer OPG-Behandlung zur Minderung des Knochenabbaus [59]. Dieser Ansatz behauptete sich bei der OPG-Gabe an Mäuse mit Multiplem Myelom, wodurch die Knochendestruktionen deutlich zurückgingen [60]. Ein weiterer Schritt war die Entdeckung, dass die Bindung und Inaktivierung von OPG über Syndecan 1 an den Myelomzellen über eine andere Bindungsstelle erfolgte als die Bindung von OPG an RANKL [51]. Vielleicht wäre es über diesen Weg möglich, eine Reduktion der Osteolysen beim Multiplen Myelom mit Hilfe eines rekombinantes OPG-Molekül zu erreichen. Dieses müsste im Optimalfall eine Variation bzw. ein Fehlen der Heparin-bindenden Domäne aufweisen, wodurch eine Bindung an Syndecan 1 und damit ein Abbau durch die Myelomzellen verhindert werden könnte. Die positiven, komplexbildenden Eigenschaften von OPG zu RANKL würden jedoch erhalten bleiben und hätten bei einer erhöhten OPG-Konzentration einen osteoprotektiven Effekt.

4.2 **DIE BEDEUTUNG VON MMP9 IN DER PATHOLOGIE DES MORBUS HODGKIN**

4.2.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse nach Hodgkinstimulation

Die MMP9-Expression der Fibroblasten und der mesenchymalen Stammzellen reduziert sich nach der 24-stündigen Stimulation mit Medium der Zelllinie L428. Auch nach Stimulation durch Medium der Hodgkin-Zelllinie HDLM2 kommt es zu einem Expressionsrückgang von MMP9 in den mesenchymalen Stammzellen. Auffällig ist die Fibroblastenreaktion auf die 24-stündige HDLM2-Medium-Behandlung. Die Fibroblasten reagieren mit einer deutlichen MMP9-Expressionssteigerung, indem sie mehr als die dreifache Menge MMP9 gegenüber den unbehandelten Fibroblasten exprimieren. Diese Ergebnisse weisen Parallelen zu den Versuchen von Thorns et al. auf. Sie untersuchten die MMP9-Expression von 34 Hodgkin-Lymphomen immunhistochemisch und konnten in den „bystander-cells“ in über 30% der Fälle eine erhöhte MMP9-Expression nachweisen [61]. Die eigentlichen Tumorzellen des Morbus Hodgkin, die H-RS-Zellen, wiesen hingegen nur in 3% der Histologien eine gesteigerte MMP9-Expression auf. Diese Expressionsverteilung lässt den Schluss zu, dass die H-RS-Zellen in einigen Fällen eine vermehrte MMP9-Expression in ihren Nachbarzellen induzieren. Diese vermehrte MMP9-Expression hat in Bezug auf das Hodgkin-Lymphom wahrscheinlich keine osteolytischen Konsequenzen, da osteolytische Herde bei dieser Erkrankung keine Rolle spielen. Bei der Hodgkinschen Erkrankung ist das vermehrte Auftreten von MMP9 eher als unabdingbarer Faktor der Tumorangiogenese und Metastasierung von Bedeutung.

4.2.2 MMP9 als Angiogenesefaktor

Die Bedeutung von MMP9 in der Angiogenese wurde in vielen Versuchen, unter anderem an MMP9-knock-out-Mäusen, gezeigt. Die Tiere wiesen ein deutlich verringertes angiogenetisches Potential sowohl in der Embryogenese als auch im Tumorwachstum auf [62]. Der genaue Mechanismus der Angiogeneseinduktion durch MMP9 ist noch immer nicht genau bekannt. Es wurde mittlerweile herausgefunden, dass MMP9 nach seiner Aktivierung durch

MMP2 und MMP13 oftmals an Oberflächenrezeptoren wie CD44 und ICAM-1 gebunden wird [63]. Eine Bindung von MMP9 erlaubt auch Zellen ohne proteolytische Eigenschaften einen gezielten proteolytischen Einsatz in ihrem Kontaktbereich und der Extrazellulärmatrix (ECM). Einen weiteren Vorteil des gebundenen MMPs sah Nagase in der Aktivitätskontrolle der MMPs, da einige MMPs die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu aktivieren bzw. zu deaktivieren [64]. Letztendlich schützt der CD44-MMP9-Komplex die Matrixmetalloproteinasen vor einer Inhibition durch TIMPs.

Yu et al. erkannten einen möglichen Zusammenhang des CD44-MMP9-Komplexes und der Neovaskularisation maligner Tumoren. Sie wiesen eine Aktivierung von TGF β durch CD44-gebundene MMP9 nach [63]. Für aktiviertes TGF β wurde eine Stimulation der Angiogenese in vivo nachgewiesen [65-67], und es konnte eine verminderte Angiogenese nach TGF β -Antikörpergabe in vitro festgestellt werden [68]. Die Aktivierung von TGF β könnte somit der Mechanismus sein, über den MMP9 eine vermehrte Angiogenese induziert.

Die deutliche Steigerung der MMP9-Expression durch Fibroblasten nach der HDLM2-Stimulation könnte somit eine gesteigerte Neovaskularisation des Tumors mit sich bringen. Dass nur die Fibroblasten, nicht aber die mesenchymalen Stammzellen mit einer MMP9-Expressionssteigerung reagierten, kann seine Begründung in der extraossären Manifestation des M. Hodgkin finden. Die den Tumor umgebenden Gewebe mit ihren verschiedenen Zelltypen lassen sich in diesem Fall eher mit dermalen Fibroblasten vergleichen als mit mesenchymalen Stammzellen, die aus humanem Knochenmark gewonnen werden.

Die Stimulationen durch die Zelllinie L428 riefen bei Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen eher einen Abfall der MMP9-Expression hervor. Um diesen Unterschied zwischen den beiden Hodgkinzelllinien zu erklären, müsste man genauere Informationen über die Tumorphistologie der beiden Patienten haben, aus deren Pleuraexudat die Zelllinien gewonnen wurden. Eine mögliche Erklärung wäre eine unterschiedliche Größe und Vaskularisationsstärke des Primärtumors.

4.3 DAS KNOCHENMARKMODELL

4.3.1 Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen

Die hier verwendeten dermalen Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen sollen insbesondere in den Stimulationsversuchen mit Myelomzelllinien die Stromazellen des Knochenmarks simulieren. Es ist jedoch zu bedenken, dass in der Knochenmarksumgebung des Multiplen Myeloms noch viele andere Zellen vorzufinden sind, deren Einflüsse, sowohl in stimulierender als auch in hemmender Weise, auf die untersuchten Zellen ausgeblendet wurden. In Bezug auf die Stimulation der Stromazellen im Knochenmark sind die mesenchymalen Stammzellen sicherlich ein geeigneteres Modell als die dermalen Fibroblasten, da diese nicht aus Knochen sondern aus menschlicher Haut gewonnen wurden. An beide Zellarten können jedoch exemplarisch die Auswirkungen der Myelomzellen auf die Stromazellen des Knochens dargestellt werden. Um ein vollständiges Bild des Zusammenspiels zwischen Myelomzellen und ihrer Umgebung im Knochen zu erhalten, sollte das Modell in weiteren Versuchen noch um andere Stromazellen des Knochens erweitert werden.

In Bezug auf die Erkrankung des Morbus Hodgkin werden die den Tumor umgebenden Zellen sicherlich besser durch die dermalen Fibroblasten als durch die mesenchymalen Stammzellen dargestellt. Da die Hodgkinsche Erkrankung sich nur äußerst selten im Knochen manifestiert, stellen die knochenspezifischen mesenchymalen Stammzellen hier nur ein unzureichendes Modell dar. Die dermalen Fibroblasten können hierbei jedoch durchaus als eine Zellart betrachtet werden, die die umgebenden Zellen des Morbus Hodgkin im Modell veranschaulicht.

4.3.2 Der Ausschluss der direkten Zell-Zell-Interaktion durch den Gebrauch konditionierter Medien

Der Ausschluß der direkten Zell-Zell-Interaktion zwischen den Zellen des M. Hodgkin bzw. des Plasmazytoms und den Fibroblasten bzw. den mesenchymalen Stammzellen wurde durch den Gebrauch konditionierter Medien erreicht. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen somit den Schluss zu, dass die gemessenen Expressionsveränderungen von MMP9 und OPG durch humorale Faktoren, nicht jedoch durch eine Stimulation mittels Zell-Zell-Kontakt hervorgerufen werden. Das Modell lässt jedoch die Tatsache unberücksichtigt, dass unter in vivo

Bedingungen sehr wohl ein Zell-Zell-Kontakt zwischen den malignen Zellen und den Stromazellen zustande kommt. Im weiteren Verlauf der Untersuchung könnte die Expressionsveränderung von MMP9 und OPG in Stromazellen nach direktem Zell-Zell-Kontakt zu Tumorzellen betrachtet werden.

Ein zusätzlicher Punkt wäre der Nachweis der humoralen Faktoren im konditionierten Medium, die einen stimulierenden oder hemmenden Effekt auf die MMP9- bzw. OPG-Expression haben. Über diese Wege könnten die Modelle der molekularen Mechanismen beim M. Hodgkin und beim Multiplen Myelom erweitert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Für das Verständnis der Pathogenese des Multiplen Myeloms spielt der Vorgang der Osteolyse eine entscheidende Rolle. In der vorliegenden Arbeit sollte die Möglichkeit der humoralen Stimulation von mesenchymalen Zellen durch verschiedene Myelomzelllinien (U266, IM9 und RPMI8226) untersucht werden, um ein Verständnis für die Funktion mesenchymaler Zellen in der Entstehung der osteolytischen Herde beim Multiplen Myelom zu bekommen.

Die Vermutung einer verminderten Expression des osteoprotektiven Faktors OPG durch Fibroblasten konnte nach einer Stimulation mit konditionierten Medien durch die Zelllinien U266 und IM9 nachgewiesen werden. Durch diese Veränderung des Expressionsverhaltens stärken die mesenchymalen Zellen (in diesem Fall die Fibroblasten) die osteolytischen Eigenschaften der Myelomzellen. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei einer Stimulation der mesenchymalen Zellen durch Hodgkinzelllinien eine verstärkte Expression des Proteins OPG, womit ein protektiver Effekt vor Osteolysen durch die Stromazellen hervorgerufen wird. Dieses Ergebnis entspricht den klinischen Befunden, da sich beim M. Hodgkin keine charakteristischen Osteolysen finden lassen. Der osteolytische Faktor MMP9, welcher seinerseits in hohem Maße von Myelomzellen sezerniert wird, wurde durch die Stromazellen nach Stimulation durch Myelomzelllinien eher vermindert exprimiert und scheint somit zumindest in der humoralen Stimulation der Stromazellen und ihrer daraus resultierenden osteolytischen Eigenschaften keine entscheidende Rolle zu spielen.

Eine große Bedeutung wird einigen Matrix Metalloproteinasen und hier insbesondere MMP9 auch im Bereich der Angiogenese von Tumoren zugesprochen. Hier sollte die Arbeit untersuchen, ob es beim M. Hodgkin durch eine vermehrte Expression von MMP9 durch die Stromazellen zu einer verstärkten Neovaskularisation des Tumors kommt. Es wurden hierfür Kulturmedien durch die Hodgkinzelllinien L428 und HDLM2 konditioniert und im Anschluss Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen mit diesen Medien stimuliert. Bei der Fibroblastenstimulation durch die Hodgkinzelllinie HDLM2 zeigte sich hierbei eine deutliche MMP9-Expressionssteigerung. Auch dieses Ergebnis deutet auf eine humorale Stimulierung der Stromazellen durch die Tumorzellen hin.

In beiden Untersuchungen scheinen die mesenchymalen Zellen und somit das tumorumgebende Gewebe einen wichtigen Beitrag zur Tumorphagenese zu leisten. Dies gilt sowohl für die osteolytischen Eigenschaften des Multiplen Myeloms als auch für die möglicherweise durch MMP9 unterstützte Neovaskularisation beim M. Hodgkin.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hodgkin, T., *On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen*. Med Chir Trans, 1832. **17**: p. 68-114.
2. Wilks, S., *Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen, (or, Hodgkin's disease), with remarks*. Guys Hosp Rep, 1865. **11**: p. 56-67.
3. Wolf, J.D., V., *Hämatologie. Internistische Onkologie*. In: Thieme's Innere Medizin, 1999. **16**: p. 932-937.
4. Sternberg, C., *Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates*. Ztschr Heilk., 1898. **19**: p. 21-90.
5. Chan, W.C. and J. Delabie, *Hodgkin's disease. Lineage and clonality*. Am J Clin Pathol, 1995. **104**(4): p. 368-70.
6. Jox, A.W., J.; Diehl, V., *Hodgkin's disease: Recent advances*. Haematol Oncol, 1998. **15**: p. 165-171.
7. Diehl, V., *Therapie des Morbus Hodgkin*. Deutsches Ärzteblatt, 2002. **25**: p. 1760-1768.
8. Küppers, R.R., K.; Hansmann, M., *Hodgkin's disease: Hodgkin and Reed Sternberg cells picked from histological sections show clonal gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**: p. 10962.
9. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
10. Diehl, V., et al., *Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lines*. J Cancer Res Clin Oncol, 1981. **101**(1): p. 111-24.
11. Drexler, H.G., *Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines*. Leuk Lymphoma, 1993. **9**(1-2): p. 1-25.
12. Schaadt, M., et al., *Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease*. Int J Cancer, 1980. **26**(6): p. 723-31.
13. Diehl, V., et al., *Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications*. Cancer Surv, 1985. **4**(2): p. 399-419.
14. Drexler, H.G. and J. Minowada, *Hodgkin's disease derived cell lines: a review*. Hum Cell, 1992. **5**(1): p. 42-53.

15. Drexler, H.G. and Y. Matsuo, *Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia*. Leuk Res, 2000. **24**(8): p. 681-703.
16. Bence Jones, H.I., *On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium*. Philos Trans R Soc, 1848. **138**: p. 55-62.
17. Durie, B., *Multiples Myelom Eine kurze Übersicht über Krankheit und Behandlungsmöglichkeiten*. International Myeloma Foundation, 2001.
18. Peest, D., *Multiples Myelom*. Thiemes Innere Medizin, 2001: p. 925-931.
19. Riedel, D.A. and L.M. Pottern, *The epidemiology of multiple myeloma*. Hematol Oncol Clin North Am, 1992. **6**(2): p. 225-47.
20. Suda, T., et al., *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 345-57.
21. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
22. Barille-Nion, S. and R. Bataille, *New insights in myeloma-induced osteolysis*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(9): p. 1463-7.
23. Abe, M., et al., *Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2195-202.
24. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
25. Tsuda, E., et al., *Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(1): p. 137-42.
26. Yasuda, H., et al., *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro*. Endocrinology, 1998. **139**(3): p. 1329-37.
27. Bucay, N., et al., *osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification*. Genes Dev, 1998. **12**(9): p. 1260-8.
28. Yamaguchi, K., et al., *Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5117-23.
29. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.

30. Giuliani, N., et al., *Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3527-33.
31. Pearce, R.N., et al., *Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11581-6.
32. Gross, J. and C.M. Lapiere, *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1014-22.
33. Matrisian, L.M., *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling*. Trends Genet, 1990. **6**(4): p. 121-5.
34. John, A. and G. Tuszynski, *The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis*. Pathol Oncol Res, 2001. **7**(1): p. 14-23.
35. Librach, C.L., et al., *92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts*. J Cell Biol, 1991. **113**(2): p. 437-49.
36. Moll, U.M., et al., *Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells*. Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6162-70.
37. Basset, P., et al., *Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications*. Matrix Biol, 1997. **15**(8-9): p. 535-41.
38. Heppner, K.J., et al., *Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response*. Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 273-82.
39. Saito, K., et al., *Clinicopathologic significance of urokinase receptor- and MMP-9-positive stromal cells in human colorectal cancer: functional multiplicity of matrix degradation on hematogenous metastasis*. Int J Cancer, 2000. **86**(1): p. 24-9.
40. Liotta, S.-S., *Principles of molecular cell biology of cancer*. Principles&Practice of Oncology, 1993(134-149).
41. Vacca, A., et al., *Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3064-73.
42. Kroon, M.E., et al., *Collagen type 1 retards tube formation by human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix*. Angiogenesis, 2002. **5**(4): p. 257-65.

43. Karsdal, M.A., et al., *Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44975-87.
44. Sato, T., N.T. Foged, and J.M. Delaisse, *The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(1): p. 59-66.
45. Seidel, C., et al., *Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2269-71.
46. Hofbauer, L.C., et al., *Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **250**(3): p. 776-81.
47. Brandstrom, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and -beta upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(3): p. 454-7.
48. Hofbauer, L.C., et al., *Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells*. Endocrinology, 1999. **140**(9): p. 4367-70.
49. Makiishi-Shimobayashi, C., et al., *Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(2): p. 361-6.
50. Brandstrom, H., T. Bjorkman, and O. Ljunggren, *Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 831-5.
51. Standal, T., et al., *Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells*. Blood, 2002. **100**(8): p. 3002-7.
52. Fiumara, P., et al., *Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2784-90.
53. Everts, V., et al., *Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(9): p. 1420-30.
54. Holliday, L.S., et al., *Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22053-8.
55. Witty, J.P., et al., *Parathyroid hormone-induced resorption in fetal rat limb bones is associated with production of the metalloproteinases collagenase and gelatinase B*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(1): p. 72-8.

56. Blavier, L. and J.M. Delaisse, *Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones.* J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 12)**: p. 3649-59.
57. Kelly, T., et al., *Matrix metalloproteinases in multiple myeloma.* Leuk Lymphoma, 2000. **37**(3-4): p. 273-81.
58. Barille, S., et al., *Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells.* Blood, 1997. **90**(4): p. 1649-55.
59. Honore, P., et al., *Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord.* Nat Med, 2000. **6**(5): p. 521-8.
60. Croucher, P.I., et al., *Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma.* Blood, 2001. **98**(13): p. 3534-40.
61. Thorns, C., et al., *Matrix-metalloproteinases in Hodgkin lymphoma.* Anticancer Res, 2003. **23**(2B): p. 1555-8.
62. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-44.
63. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.* Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
64. Nagase, H., *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.* Biol Chem, 1997. **378**(3-4): p. 151-60.
65. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4167-71.
66. Moses, H.L., E.Y. Yang, and J.A. Pietenpol, *TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights.* Cell, 1990. **63**(2): p. 245-7.
67. Pepper, M.S., *Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity.* Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(1): p. 21-43.
68. Ueki, N., et al., *Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth.* Biochim Biophys Acta, 1992. **1137**(2): p. 189-96.

Danksagung

Angeregt wurde diese Arbeit durch Herrn Universitätsprofessor Dr. med. J. Lorenzen, dem ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine tatkräftige Unterstützung und eine freundliche, motivierende Arbeitsatmosphäre danken möchte.

Mein Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. med. R. Knüchel-Clarke und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Mittermayer, die mir die Durchführung meiner Arbeit in ihrer Klinik ermöglichten und mich durch optimale Rahmenbedingungen unterstützten.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jahn-Dechent danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. M. Pilartz für die Betreuung und Hilfestellung während der gesamten Arbeit.

Ich danke Frau Dipl.-Biol. S. Neuß-Stein für die Einführung in die Zellkultur und die Bereitstellung der mesenchymalen Stammzellen.

Für die hervorragende Betreuung, wertvolle Hilfestellungen und eine schöne Atmosphäre bei der Durchführung meiner Arbeit im Labor möchte ich mich bei Frau S. Reuschenberg bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Christoph Oberdörster bedanken, die mir während des ganzen Studiums moralisch und geistig zur Seite standen.

Curriculum vitae

Name: Jana Christina Kloos
Geburtsdatum: 15.08.1980
Geburtsort: Mönchengladbach
Eltern: Horst Kloos, Oberstudienrat
Lieselotte Hedtstück-Kloos, Oberstudienrätin
Familienstand: ledig

Schulbesuch

1986-1990 Kath. Grundschule Zeppelinstraße, Mönchengladbach
1990-1999 Bischöfliche Marienschule Mönchengladbach
Juni 1999 Abitur

Studium

seit 1999 Medizinstudium an der RWTH Aachen
2001 Ärztliche Vorprüfung
2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005-2006 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Aachen
Fachgebiete: Chirurgie, Anästhesie und Innere Medizin
05.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.2006 Promotion
seit 08.2006 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie am
Universitätsklinikum Aachen