

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin  
der Deutschen Sporthochschule Köln  
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin  
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

**Der Einfluss des  
Wachstumsfaktors bFGF auf die Signaltransduktion  
adulter humaner mesenchymaler Stammzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Ursula Köngeter  
geb. Klausmann  
aus Bergisch Gladbach

Promoviert am 06. Mai 2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. h. c. U. W. Mehlhorn

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und der Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Herrn Prof. Dr. med Bloch

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat Annette Schmidt

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Düsseldorf, den 31.12.2008

(Unterschrift)

Die Zellkultur der mesenchymalen Stammzellen wurde im Institut I für Anatomie unter der Leitung von Frau Priv.-Doz Dr. A. Schmidt etabliert und später in dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln fortgeführt. Die Qualitätskontrolle mittels FACS-Analyse wurde in der Klinik I für Innere Medizin von Herrn Dr. T. Schinköthe durchgeführt.

Die Immunhistochemischen Experimente wurden z.T. von mir gemeinsam mit, z.T. von Frau Priv.-Doz. Dr. A. Schmidt und der med.-technischen Assistentin Fr. Ghilav (Institut I für Anatomie) alleine durchgeführt.

Die densitometrische Messungen und anschließende statistische Auswertung der Ergebnisse wurde nach entsprechender Anleitung durch Frau Priv.-Doz. Dr. A. Schmidt von mir selber erhoben.

## **Danke**

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle für die unermüdlichen und postwendenden Korrekturen und Denkanstöße von Professor Dr. med. Wilhelm Bloch und Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Annette Schmidt, die mich seit dem Physikum treu begleitet haben.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts I für Anatomie der Universität zu Köln sowie des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln, welche direkt oder indirekt in das Gelingen meiner Arbeit involviert waren.

Für  
meine Eltern  
&  
Tobias

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Humane mesenchymale Stammzellen: Definition und Therapieoptionen	9
1.2 bFGF und sein Einfluss auf MSCs	11
1.3 Intrazelluläre Signaltransduktion	12
1.4 Ziel der Arbeit	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Liste verwendeter Materialien und Geräte	16
2.2 Stammzellkultur	19
2.3 Immunhistochemie	21
2.4 Densitometrische Auswertung	23
2.5 Statistik	23
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1 48 stündige bFGF-Inkubation	24
3.2 4 stündige bFGF-Inkubation	42
<b>4. Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	59
4.2 Interpretation der Ergebnisse	60
4.3 Ausblick	67
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>7. Erklärung zu Vorabveröffentlichung</b>	<b>82</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MEM	alpha-Modified Eagle Medium
AKT	Proteinkinase B
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCD	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	Colony Forming Unit-Fibroblasts
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
EDTA	Ethylene diamine-N,N,N'N' tetra acid
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FACS	Fluorescence associated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
h	Stunde
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
JUNK	c-Jun N-terminal Kinase
L-NAME	N-omega-Nitro-L-Arginin-Methyl Ester Hydrochlorid
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase

Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
μ	Mikrometer
mm	Millimeter
M	Mol
MSC	mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NiSO <sub>4</sub>	Nickelsulfat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
p	phosphoryliert
PBS	Phosphate buffered saline solution
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
U/ml	Units pro Milliliter
SDF-1	Stromal derived factor 1
Ser	Serin
Thr	Threonin
TBS	Tris-Buffered Saline
u. a.	unter anderem
u. ä.	und ähnliche
VFGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

# 1. Einleitung

## 1.1 Humane mesenchymale Stammzellen: Definition und Therapieoptionen

Moralische und gesetzliche Kontroversen, die sich um die Verwendung totipotenter embryonaler Stammzellen in Forschung und Therapie ergaben, führten zu einer intensiven Suche nach möglichen Reservoirs von undifferenzierten Primordialzellen im adulten Organismus. A. J. Friedenstein und S. Piatetzky beschrieben bereits 1966 als erste mesenchymale Stammzellen als knochenbildende Nachkommen von Stromazellen, die sie aus dem Knochenmark von Ratten gewonnen hatten [24]. Die Gruppe um Friedenstein war es auch, die 1987 zum ersten Mal Methoden zur Isolierung, Kultivierung sowie Differenzierung dieser Zellpopulation entwickelte und publizierte [23]. Seit einigen Jahren bereits stehen nun die adulten mesenchymalen Stammzellen im Mittelpunkt des internationalen Interesses von Forschern und Patienten, deren Hoffnungen sich auf die zahlreichen potentiellen Therapieoptionen richten, die mit dieser, während des gesamten Lebens präsenten, pluripotenten Zellart inzwischen verbunden sind.

Die am leichtesten zugängliche und ergiebigste Quelle für mesenchymale Stammzellen im erwachsenen Menschen stellt das Knochenmark dar. Darüber hinaus konnten MSCs allerdings auch aus anderen Geweben wie z. B. Fett [123,71], Haut [110] oder Knochen [105] isoliert werden.

Differenzieren können sich MSCs nach entsprechender Stimulierung außer in mesenchymale Zellen wie Knorpel-, Knochen-, Fett- und Skelettmuskelzellen [90] neueren Erkenntnissen zufolge auch in Gewebe anderen Ursprungs wie z. B. Neuronen, Astro- [51,61] und Kardiomyozyten [74]. Da diese Spezialisierungsmöglichkeiten zwar vielfältig, jedoch nicht unbegrenzt sind, gelten adulte mesenchymale Stammzellen im Gegensatz zu den embryonalen nur als pluripotent. Könnte man diese Einschränkung als negativ bewerten, so sind mittlerweile jedoch auch einige viel versprechende Vorzüge der MSCs bekannt: Sie sind ebenfalls, wenn auch nicht unendlich, zur „Selbsterneuerung“ bzw. „-ersetzung“ befähigt, lassen sich einfach gewinnen, unproblematisch und schnell vervielfältigen (500fache Zellzahl in nur 12 Tagen in vitro [97]) und inzwischen hilft das Wissen um

das Vorhandensein bzw. das Fehlen multipler Oberflächenmarker bei ihrer Identifizierung und Abgrenzung von anderen Zelllinien [90,28,102]. Zu diesem Zweck können darüber hinaus möglicherweise demnächst auch bestimmte von MSCs exprimierte Zytokine und Adhäsionsmoleküle verwendet werden [73,35].

Ohne die entsprechenden Stimuli verharren die mesenchymalen Stammzellen in ihrem undifferenzierten Zustand und bilden so ein dauerhaft bestehendes Reservoir nicht nur, wie bis vor kurzem noch gedacht, für Zellerneuerungen und Reparaturen in Geweben wie Herzmuskel und Nerven, deren Regenerationpotential als sehr eingeschränkt gilt, sondern gegebenenfalls auch als Therapeutika anderer, schwerwiegender Krankheitsbilder. Während MSCs in der Behandlungen des Myokardinfarktes schon seit einigen Jahren mit Erfolg versprechenden Resultaten der Herzmuskelregeneration eingesetzt werden [83,84,11,12,45,108,113,52,88,89], geben zwei relativ neu gewonnene Erkenntnisse über extraordinäre Eigenschaften dieser Zellen Anlass zur Hoffnung auf ausgedehntere Anwendung. Dies sind zum einen, nachdem die erstaunlich zielstrebige Wanderung der MSCs zu defektem Gewebe schon mehrmals beobachtet werden konnte [10,31], die nun nachgewiesene Fähigkeit zur transendothelialen Migration [94], die neben der lokalen auch eine systemische Verabreichung der Zellen sinnvoll ermöglicht [4] und zum anderen die Entdeckung immunsuppressiver Tendenzen auf mehreren Ebenen der zellulären Abwehr [69,16,62,78,118], welche außer der autogenen auch eine allogene Transplantation durchführbar erscheinen lässt [8,72,54]. Darüber hinaus führt letztgenannte Eigenschaft zu großen Erwartungen in der bislang aussichtslosen Therapie der steroidrefraktären Graft-versus-Host-Disease [70,91]. Auch soll die Behandlung mit hämatopoetischen Stammzellen in der simultanen Verabreichung mit MSCs durch Verminderung von Abstoßungsreaktionen vereinfacht werden, wovon sowohl Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, als auch nach aggressiven Chemotherapien profitieren würden [68,22,71,59]. Des Weiteren ist augenblicklich Gegenstand intensiver Forschung der Einsatz von MSCs bei neurologischen Erkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose und Infarkt [77,11,12], zur Vermeidung von Restenosen nach Stentimplantation bei Gefäßverschlüssen [109,3], sowie in der Therapie von Osteogenesis imperfecta [36,37,38] und komplizierten Knochenbrüchen [92], Peridontitis [aktuelle Studie des Translational Research Informatics Center in Japan] sowie von Hurler-Syndrom und metachromatischer Leukodystrophie [60].

## 1.2 bFGF und sein Einfluss auf MSC

Obwohl zahlreiche klinische Studien Therapieerfolge mit adulten mesenchymalen Stammzellen beschreiben, sind bis zum heutigen Tage viele Mechanismen auf zell- und molekularbiologischer Ebene, die zu diesen Ergebnissen führen, weitestgehend unbekannt. Da das bessere Verständnis von Proliferation, Differenzierung und Migration dieser Zellen zu der Entwicklung effektiverer Kulturbedingungen und schließlich auch zu gezielterem Einsatz von MSCs führen würde, stehen mögliche, diese Vorgänge beeinflussende Faktoren, im Mittelpunkt intensiver Forschung.

Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF oder auch FGF2) ist eines der insgesamt 22 Mitglieder der FGF-Familie von Vertebraten. Es ist ein körpereigenes Polypeptid, das während der embryonalen Entwicklung unter anderem die Zellproliferation, -migration und -differenzierung reguliert [86]. Während einige FGFs alleine während dieser Periode vorkommen, gehört FGF2 zu jenen, die auch im erwachsenen Organismus bei wichtigen Aufgaben mitwirken. Dazu zählen zum Beispiel die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, Reaktionen auf Verletzungen, Erneuerung von Gewebe sowie die Mitwirkung in der neuronalen Signaltransduktion. Falsch exprimiert können manche FGFs allerdings auch an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein. Anders als die meisten FGFs wird bFGF genauso wie FGF1 nicht sezerniert sondern befindet sich normalerweise sowohl auf der Zelloberfläche wie auch in der extrazellulären Matrix. Einige Formen von FGF2 mit hohem Molekulargewicht verfügen über extra Signalsequenzen, welche für diesen Wachstumsfaktor eine Lokalisation im Kern festlegen. Die Funktion dieser im Nucleus lokalisierten FGFs ist bislang jedoch unbekannt. Freigesetzt wird FGF2 entweder von beschädigten Zellen oder durch einen vom endoplasmatischen Retikulum-Golgi-Signalweg unabhängigen Exozytosemechanismus [86]. Therapeutischen Einsatz findet bFGF bereits in der Induktion von Angiogenese bei cardio- bzw. gefäßchirurgischen Patienten [66,93,115].

In Bezug auf die Forschung mit mesenchymalen Stammzellen ist bisher bekannt, dass bFGF die Proliferation unterstützt und die Differenzierung in Richtung der osteogenen Linie begünstigt, während die neurogene Entwicklung eher inhibiert wird [111,103,104]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich unter Einfluss von FGF2 die Lebensdauer von tierischen, aber auch von humanen MSCs in vitro verlängert

und ihr adipogenes wie auch osteogenes Potenzial über zahlreiche Mitosen hinweg erhalten bleibt [111]. Auf die immunosuppressiven Eigenschaften der MSCs scheint bFGF einen verstärkenden Einfluss zu haben [104]. Des Weiteren konnte neuerdings der Nachweis erbracht werden, dass nicht nur der stromal cell-derived factor (SDF)-1 und der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGF chemotaktisch auf Stamm- bzw. Progenitorzellen in vivo wirken [48,80] sondern auch FGF2 die Migrationsbereitschaft der MSCs steigert [95]. In diesem Zusammenhang erscheint auch die Beobachtung sinnvoll, dass Fibroblasten unter hypoxischem Stress bFGF sezernieren [64,107], da nun der Schluss nahe liegt, durch Sauerstoffmangel gefährdetes Gewebe könnte durch dieses Zytokin gewissermaßen die Hilfe der pluripotenten Stammzellen herbeiführen.

Wissend, dass sowohl die Proliferation und Differenzierung, als auch die Migration der mesenchymalen Stammzellen von bFGF beeinflusst wird, stellt sich nun die Frage, wie genau sich dieser Einfluss auf zellulärer Ebene beschreiben lässt. Welche Effekte erzielt der Wachstumsfaktor in der intrazellulären Signaltransduktion der MSCs? Wo greift er ein? Welche Änderungen sind zu beobachten?

### **1.3 Intrazelluläre Signaltransduktion**

Die Anforderungen an eine Zelle müssen ständig an die Erfordernisse der Zelle selbst oder des Gesamtorganismus angepasst werden [96]. Wenn ein Hormon oder ein Wachstumsfaktor an einen Rezeptor bindet, werden zahlreiche Prozesse initiiert, welche zu koordinierten Veränderungen der Enzymaktivität und Genexpression der Zelle führen. Die Schritte, welche in die intrazelluläre Signaltransduktion involviert sind, umfassen die Aktivierung von membranständigen oder intrazellulären Rezeptoren, die Mobilisierung von sekundären Botenstoffen wie cAMP und Calciumionen, sowie die Aktivierung und Inhibition von Proteinkinasen und Phosphatasen. Durch die geschätzte Anzahl von bis heute identifizierten 1000 Proteinkinasen und ca. 500 Phosphatasen wird die Komplexität des Signaltransduktions-Netzwerkes veranschaulicht [15]. In dieser Arbeit sind besonders der Ras/MAPK- sowie der PI-3Kinase/AKT-Pathway von Interesse. Diese werden vornehmlich über FRS2alpha und -beta angestoßen, zwei Mediatoren, welche durch FGF-Stimulierung und der daraus folgenden Phosphorylierung intrazelluläre

Signaltransduktionskaskaden zur Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung, sowie der Zellmigration, der Zellstruktur und des Überlebens der Zelle, auslösen [20].

Zu den mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) zählen die Jun N-terminus Kinase (JUNK), p38 und die extrazellulär regulierte Kinase (ERK). Gesichert ist, dass MAPKs wichtige Rollen in der Zellproliferation und -differenzierung, der Reaktion auf Entzündung und andere Arten von Stress sowie der Onkogenese übernehmen [49]. Zusätzlich beschrieben 2004 Huang und Mitarbeiter ihren begründeten Verdacht, dass diese Gruppe von Serin/Threonin spezifischen Proteinkinasen ebenfalls wesentlich an der Zellmigration, besonders von Fibroblasten, beteiligt ist [40].

Herauszufinden, ob auch in mesenchymale Stammzellen nach bFGF-Stimulation eine Aktivitätszunahme dieser drei Enzyme nachweisbar ist und sich damit ein Hinweis auf die ablaufenden Signalkaskaden unter dem Einfluss dieses Zytokins ergibt, war ein Ziel dieser Arbeit. Zu diesem Zweck untersuchten wir MSCs mit und ohne vorherige Wachstumsfaktor-Inkubation nach immunohistochemischer Behandlung mikroskopisch auf densitometrische Veränderungen.

Die AKT–Serin/Threonin-Kinase (AKT1) wurde 1991 zeitgleich zweimal in unterschiedlichem Zusammenhang entdeckt. Zwei Arbeitsgruppen waren auf der Suche nach weiteren, den bereits bekannten Proteinkinasen A und C verwandten zellulären Kinasen und gaben ihrer Neuentdeckung folglich den Namen PKB [50,13], während Bellacosa und Kollegen die ihre als ein Onkogen des Retrovirus AKT8 beschrieben und v-akt nannten [6]. AKT2 und AKT3 wurden später als homologe Isoformen kloniert. Alle drei Formen werden ubiquitär exprimiert, wobei es der Gruppe um Z.-Z. Yang und O.Tschopp in Versuchen mit Knock-out-Mäusen gelang, die unterschiedlichen Aufgaben von AKT1,2 und 3 zu spezifizieren. Ihren Ergebnissen zufolge sind AKT1 und 2 unverzichtbar für das Zellwachstum, wobei AKT2 zusätzlich entscheidend auf den Glucosestoffwechsel einwirkt. Mäuse ohne AKT3-Expression fielen durch besonders kleine Gehirne auf [116]. Des Weiteren reguliert AKT bekanntermaßen Zellproliferation und Apoptose, Angiogenese, Genomstabilität, Zellinvasion und auch die Zellmigration. [117,75]. Schon seit längerem wird vermutet, dass AKT als ein Hauptsubstrat der Phosphatidylinositol-3-kinase in entscheidender Weise an der Tumorgenese beteiligt ist, indem es z. B. das Tumorsuppressorgen PTEN durch Phosphorylierung inaktiviert und somit die Apoptose von entarteten Zellen verhindert [112,87].

Ob der Einfluss des Wachstumsfaktors bFGF auch Expressionsveränderungen dieser Proteinkinase bewirkt, welche im weiteren Verlauf des Signalwegs dann zu Veränderungen, bzw. Induktion bestimmter Regelkreise innerhalb der MSCs führen könnten, war ebenfalls ein Ziel unserer Untersuchungen.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein ubiquitär vorkommender sekundärer Botenstoff, der in verschiedenen Zellsystemen nachweislich bei der Regulation von Zellproliferation [29,122], -apoptose [17] und -migration [18,82], sowie der Angiogenese [81,121] beteiligt ist. Außerdem bewirkt NO eine Gefäßrelaxation [27] und erhöhte Gefäßpermeabilität, welche im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu Ödemen führt [32]. Bekannt sind drei NO-Synthasen: die neuronale NOS, die induzierbare NOS sowie die hier näher beleuchtete endotheliale NOS (eNOS). Alle drei bewirken eine Konversion von L-Arginin in Citrullin, eine Reaktion bei der als physiologischer Metabolit NO entsteht. Die Steuerung von eNOS wird unter anderem durch Phosphorylierung verschiedener Serin- oder Threonin-Seitenketten gesteuert. In Endothelzellen erfolgt eine Aktivierung und damit eine erhöhte NO-Produktion z. B. durch die Proteinkinase AKT, welche eine Phosphatgruppe auf die Seitenkette Ser1177 überträgt [26]. Forschern unter der Leitung von Koh Kawasaki gelang es zu beweisen, dass die durch NO induzierte Migration der Endothelzellen über diesen AKT/PI3-Pathway initiiert wird [53]. Eine Hemmung der eNOS wird hingegen durch die extrazellulär regulierte Kinase ERK und deren Phosphorylierung von Threonin495 verursacht [41].

Des Weiteren ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren und NO sich gegenseitig beeinflussen. Am Beispiel der trotz VEGF defekten Angiogenese bei eNOS-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Auslösung der Gefäßbildung via der endothelialen NO-Synthase erfolgt [25]. Im Falle von bFGF haben die Ergebnisse von Ziche M. und Mitarbeitern demonstriert, dass NO über die Induktion endogener bFGF-Anreicherung zu einer erhöhten Proliferationsrate von koronarvenösen endothelialen Zellen beiträgt [118].

Welche Rolle eNOS in mesenchymalen Stammzellen zukommt ist bislang noch wenig erforscht. Klinz und Kollegen postulierten 2004, dass an unterschiedlichen Seitengruppen phosphorylierte eNOS in bestimmten Zellkompartimenten zu finden seien und dort wichtige Rollen in dem Lebenszyklus von proliferierenden mesenchymalen Stammzellen übernehmen. Diese Schlussfolgerung zog die

Arbeitsgruppe aus der Beobachtung, dass im Zellkern besonders kurz vor der Mitose eine Anreicherung von peNOS<sup>Ser114</sup> nachzuweisen war, während die peNOS<sup>Ser1177</sup> überwiegend im Zytoplasma detektiert wurde [58].

In dieser Studie markierten wir pENOS<sup>Ser116, -1177</sup> und <sup>Thr495</sup> vor und nach bFGF-Inkubation um herauszufinden, ob die endotheliale NO-Synthase überhaupt und wenn in welchem Phosphorylierungszustand eine Rolle in der durch bFGF ausgelösten Signaltransduktionskaskade übernimmt.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Wie beschrieben sind trotz der mittlerweile bereits recht breit gefächerten Anwendungen von MSCs viele Aspekte ihres Wirkens noch unklar. Diese Untersuchungen begründen sich auf der Motivation, einen Beitrag zur Erforschung der molekularbiologischen Mechanismen von adulten, mesenchymalen Stammzellen zu leisten. Wir folgten der Vorstellung, dass ein genaueres Verständnis der intrazellulären Abläufe und Charakterisierung von den auf den Zellzyklus einwirkenden Faktoren, zu einer effektiveren Kultivierung und einem gezielteren therapeutischen Einsatz dieser viel versprechenden Zellen beitragen kann. Im Fokus unserer Untersuchungen stand speziell der Einfluss des Wachstumsfaktors bFGF auf die Signaltransduktion der Zelle. Besonderes Augenmerk richteten wir dabei auf die Wirkung dieses Zytokins auf die MAP-Kinasen p38, JUNK und ERK, die endothelialen NO-Synthasen sowie die AKT. Alle Versuche führten wir gesondert im Hinblick auf die phosphorylierten Formen dieser Proteinkinasen durch um auch eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch den Aktivitätszustand zu erfassen.

## 2. Material und Methoden

Um herauszufinden, wie sich bFGF auf die Signaltransduktion in mesenchymalen Stammzellen auswirkt, wurden in dieser Studie Zellen von insgesamt drei Patienten untersucht. Ebenfalls überprüft wurde hierbei eine eventuelle Zeitabhängigkeit, indem wir eine Inkubationszeit von 48 h einer Inkubationsdauer von nur 4 h gegenüberstellten. Zu jeder Versuchsreihe wurden Kontrollen ohne Zusatz durchgeführt. Acht bis elf Antikörper durchliefen die Testung. Insgesamt wurden 50 Zellen pro Antikörper (25 mit und 25 ohne bFGF) ausgemessen. Um herauszufinden welchen Einfluss der Wachstumsfaktor bFGF auf humane mesenchymale Stammzellen nimmt, verwendeten wir folgende Geräte und Materialien für unsere Versuche.

### 2.1 Liste verwendeter Materialien und Geräte

#### Geräte

- Mikroskop Eclipse E200 mit 40er Vergrößerungsoptik  
Firma Nikon, München
- Beckman Coulter Epics XL + Expo 32 software
- 70 µm Nylonsieb (Falcon®)  
Firma Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes; NJ; USA)
- Mikropipetten  
Firma Eppendorf, Hamburg

#### Zellkultur

- α-MEM (GIBCO®)  
Firma Invitrogen, Karlsruhe
- Fetal Calf Serum (FCS) (GIBCO®)  
Firma Invitrogen, Karlsruhe
- Penicillin/Streptomycin (GIBCO®)  
Firma Invitrogen, Karlsruhe
- L-Glutamin (GIBCO®)

Firma Invitrogen, Karlsruhe Accutase™

- PAA Laboratorien, Cölbe
- 100 mm Zellkulturschalen (Falcon®)

Firma Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes; NJ;USA

- Gewebekulturplatten (Nunc®)

Firma Invitrogen, Karlsruhe

- Ficoll-Paque™ Plus
- Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
- PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> (GIBCO®)

Firma Invitrogen, Karlsruhe

#### Grundchemikalien

- Paraformaldehyd
- Methanol
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Ammoniumchlorid
- NaCl
- HCL
- Aqua dest.
- Trishydroxymethylamminomethan
- NaOH

Alle Chemikalien stammen von der Firma Merck, Darmstadt

#### Additive

- Bovine-Serum-Albumin (BSA)  
Firma Sigma Chemical Company, St. Luis, MO; USA
- Triton X-100  
Firma Sigma Chemical Company, St. Luis, MO; USA

#### Marker

- Horse-Redish-Peroxidase (HRP-Komplex)  
Firma Amersham LIFE SCIENCE, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK

#### DAB-Entwicklung

- 0,1 M PBS (GIBCO®)

Firma Invitrogen, Karlsruhe

- DAB-Lösung

Firma Sigma Chemical Company St. Luis, MO; USA

- $\text{NH}_4\text{Cl}$
- $\text{NiSO}_4$
- Glucose 10%
- Glucose – Oxidase

Alle Chemikalien kommen von der Firma Merck, Darmstadt

Wachstumsfaktor

- Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Rind rekombinant, Lyophilisat  
Firma Boehringer, Mannheim

Primärantikörper

- Rabbit anti-JNK1 (C-17): sc-474, 1:50  
Santa Cruz Biotechnology, Inc.; USA
- Mouse anti-pJNK (G7):sc-6254, 1:400  
Santa Cruz Biotechnology, Inc.; USA
- Rabbit anti-p38 MAP-Kinase (Nr. 9212), 1:250  
Cell Signaling Technology, Inc.; USA
- Rabbit anti-AKT1/PKB (Nr. 17538), 1:1000  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; USA
- Rabbit anti-pAKT1/PKB (Nr.21161), 1:500  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; USA
- Rabbit anti-MAP-Kinase1/2 (Erk1/2-CT), (Nr. 19915), 1:400  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; USA
- Rabbit anti-p-MAP-Kinase1/2 (ERK1/2), 1:400  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; USA
- Rabbit anti-p-eNOS (Ser116), (Nr.22407), 1:500  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; USA
- Rabbit anti-p-eNOS (Ser1177), (Nr.24371), 1:500  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; USA
- Rabbit anti-p-eNOS (Thr495), (Nr.24245), 1:500  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY; USA

## Sekundärantikörper

- Biotinylierter goat anti-mouse-AK;  
Firma Dako, Hamburg
- Biotinylierter goat anti-rabbit-AK;  
Firma Dako, Hamburg

## 2.2 Stammzellkultur

In dieser Studie wurden humane mesenchymale Stammzellen von 3 Patienten verwendet. Gewonnen wurden die Zellen aus dem Knochenmark des Femurs und der Hüfte. Alle Untersuchungen wurden mit Einverständnis der Ethikkommission der Universität zu Köln durchgeführt. Die gesamten Daten wurde im Sinne der Deklaration von Helsinki erhoben.

Die Betreuung der Stammzellen wie auch das Ansetzen des Mediums und das Sterilisieren der Instrumente übernahmen die biologisch-technischen AssistentInnen des anatomischen Institutes bzw. der Deutschen Sporthochschule Köln. Der gesamte Arbeitsvorgang fand in der S1-Zellkultur unter sterilen Bedingungen statt.

Die Knochenmarkaspirate wurden durch ein 70 µm Nylonsieb (Cell Strainer, Falcon; Becton Dickinson) gefiltert, die so gewonnene Zellsuspension auf 15 ml Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gegeben und für 30 Minuten mit 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen der einkernigen Zellen mit Mg<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-freiem PBS-Puffer wurden die Zellen in 100 mm Zellkulturschalen bei 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Medium dienten 10 ml alpha- modified eagle medium (α-MEM, 20% (v/v) FCS, 200 µM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin). Der erste Wechsel des Mediums erfolgte am zweiten Tag nach der Kultivierung und wurde im weiteren Verlauf zwei mal wöchentlich durchgeführt.

Eine Passage erfolgte sobald die Stammzellen eine 80 bis 90 prozentige Konfluenz aufwiesen. Zum Ablösen der Zellen wurde Accutase™ verwendet, eine Lösung aus EDTA, Natrium und Phenol-Rot in PBS-Puffer. Bei diesem Vorgang, wie auch für alle anderen Experimente wurden die Stammzellen mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Bis zur dritten Passage fanden die Zellen Verwendung.

## Qualitätskontrolle

Die Qualität der kultivierten MSCs wurde durch mikroskopische Überprüfung der Zellmorphologie und –differenzierung, sowie durch FACS–Analyse und CFU-F-Assay kontrolliert.

Für die Durchflußzytometrie wurden die Zellen mit den Antikörpern CD106-FITC, CD105-PE (Ansell, Bayport USA), CD45-ECD, CD14-PC5 und CD34-PC5 (Beckman Coulter, Krefeld) inkubiert. Nach 20minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde zwei mal gewaschen und mit dem Beckman Coulter Epics XL und dessen Expo 32 software gemessen. Bereits publizierte Daten entsprechend wurden die mesenchymalen Stammzellen als CD14, CD34, CD45 negativ und CD105 sowie CD106 positiv eingestuft [89].

Um das Proliferationspotential der Zellen zu definieren wurde der CFU–assay wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen (Falcon, Bedford, MA) mit 20 ml Kulturmedium (Dulbecco´s Modified essential Medium mit 20% fetalen Käberserum (FCS)) kultiviert. Um eine Koloniebildung zu begünstigen, wurden die Zellen mit geringer Dichte ausplattiert ( $1,5 \times 10000$  Zellen/cm<sup>2</sup>). Unter diesen Bedingungen bildeten die Zellen mit fibroblastischem Wachstum Kolonien, deren Größe und Anzahl im Folgenden beurteilt wird, während die hämatopoetischen Zellen abstarben [101].

Ebenfalls wurde die Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen unter Bedingungen kultiviert die entweder eine osteogene oder eine adipogene Differenzierung begünstigten. Wie bereits von einer amerikanischen Arbeitsgruppe beschrieben, wurde die osteogene Spezialisierung durch eine Behandlung mit Dexamethason,  $\beta$ -Glycerolphosphat, Ascorbat und 10% v/v FBS induziert, während für die adipogene Differenzierung neben Dexamethason 1-methyl-3-isobutylxanthin, Insulin und Indomethazin Verwendung fanden [86]. Analysiert wurde die Differenzierung zu Fettzellen durch Red-oil-Färbung, die Entwicklung zu osteogenen Zellen durch von Kossa-Färbung.

## **Wachstumsfaktoren**

Um herauszufinden in wie weit der Wachstumsfaktor bFGF Einfluss auf die Signaltransduktionsabläufe innerhalb der MSC ausübt, wurden die Zellen vor der folgenden Immunhistochemie mit bFGF behandelt. Bei den untersuchten Stammzellen von zwei Patienten betrug die Inkubationszeit 48 h, bei denen eines Patienten nur 4 h. Parallel erfolgte eine Kontrolle mit Medium ohne Zusatz des Wachstumsfaktors.

## **2.3 Immunhistochemie**

Prinzip:

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zum Nachweis bestimmter Protein- und Gewebestrukturen durch Antikörper. Die hierbei eingesetzten Antikörper zählen zu den Gammaglobulinen, einer Gruppe von Eiweißen, die im menschlichen Körper eine wichtige Rolle bei der spezifischen Abwehr spielen. IgG-Antikörper werden in Plasmazellen, speziellen B-Lymphozyten gebildet und bestehen aus zwei Anteilen: dem Fc- und dem y-förmige Fab-Fragment. Während der Fc-Abschnitt spezifisch für die Antikörperklasse und das Wirtstier ist, erkennt das Fab-Fragment die Bindungsregion am Antigen (Epitop). Der bei der Untersuchung verwendete Primärantikörper bindet über das Fab-Fragment an das darzustellende Antigen, wohingegen der Sekundärantikörper gegen das Fc-Stück des Primärantikörpers gerichtet ist, welches er spezifisch markiert und sichtbar macht.

Durchführung:

Um den physiologischen pH von 7,4 konstant zu halten, fanden alle Arbeitsschritte in Pufferlösungen statt. Nach dem Auswaschen der Fixierlösung wurde die endogene Peroxidase des Gewebes durch Zugabe einer Lösung aus 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 60% Methanol gehemmt. Zur Permeabilisierung der Zellmembran, die zu einem leichteren Eindringen der Antikörper in das Zellinnere führen sollte, wurde ein Gemisch aus 0,25% TritonX-100 und 0,5 M Ammoniumchlorid in 0,05 M TBS hinzugefügt. Dabei sollte außerdem durch die Reaktion der freien Aldehydgruppen mit dem Ammoniumchlorid die Ausbildung unspezifischer Antikörperbindungen verhindert

werden. Zwecks Blockierung wurden die Zellen mit 5% BSA in TBS bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Durch die Kühlung verlangsamten sich die Reaktionsabläufe, wodurch wiederum unspezifische Bindungen verhindert werden sollten. Hiernach wurden ungebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit Pufferlösung entfernt und die MSCs für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem korrespondierenden, biotingegebenen Zweitantikörper (Verdünnung 1:400) inkubiert.

Zur Detektion fand ein aus Meerrettich gewonnener Peroxidase-Komplex in der Verdünnung 1:150 Verwendung, welcher für eine Stunde auf die Zellen einwirkte und dessen Markierungen schließlich durch DAB (3,3-diaminobenzidin)-Farbstoff visualisiert wurden. Die durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Entwicklung fand unter lichtmikroskopischer Kontrolle statt.

#### Standardprotokoll der Immunohistochemischen Untersuchung:

Material: aus Knochenmark gewonnene mesenchymale Stammzellen

Fixierung: 4% Paraformaldehyd

Puffer/Lösungsmittel: 0,05 M TBS

Lösungsmittel für Antikörper: 0.8% BSA +TBS

3 x 10 min TBS

20 min 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 60% Methanol

2 x 10 min TBS

10 min 0,25% TritonX + 0,5 M Ammoniumchlorid in TBS

2 x 10 min TBS

60 min 5% BSA in TBS

12 h bei 4°C Primärantikörperinkubation in 0,8% BSA + TBS

4 x 10 min TBS

60 min Sekundärantikörperinkubation in TBS (1:400)

4 x 10 min TBS

60 min Horse-Redish-Peroxidase-Komplex in TBS (1:150)

4 x 10 min TBS

Visualisierung des Antigens mittels 3,3- Diaminobenzidin (DAB) unter lichtmikroskopischer Kontrolle.

## **2.4 Densitometrische Auswertung**

Zur Auswertung wurde das Eclipse E200 Mikroskop der Firma Nikon genutzt, welches durch die Kopplung an eine 3-chip CCD-Kamera die Aufnahme von Fotos der Zellen ermöglichte.

Die Intensität der immunhistochemischen Markierung wurde durch die densitometrische Messung der Grauwerte unterschiedlicher Zellabschnitte (Zelle als Einheit, Zellkern und Zytoplasma) erfasst. Pro untersuchtem Antikörper wurden aus unterschiedlichen Arealen der Objektträger 50 Zellen analysiert.

Der Wert des Hintergrundes, welcher sich aus dem Mittelwert der Messungen von 3 zellfreien Arealen pro Gesichtsfeld ergab (erhoben mit Hilfe der Optimas-Software 6.0), wurde von den Ergebnissen der Zellkern- und Zytoplasmamessungen (erhoben mit dem computerbasierten Scion Image-Programm von Macintosh<sup>®</sup>) abgezogen, um die reine Farbintensität dieser Zellabschnitte unverfälscht beurteilen und vergleichen zu können

## **2.5 Statistik**

Die densitometrischen Ergebnisse wurden mit der Software Excel<sup>®</sup> statistisch analysiert und graphisch dargestellt. Im Mittelpunkt der Auswertung steht die Gegenüberstellung der Messungen mit und ohne Zusatz des Wachstumsfaktors bFGF, bzw. der immunhistochemische Markierung der Signalmoleküle in phosphorylierter und nicht aktivierter Form. Dargestellt werden Standardabweichung, Mittelwerte sowie zwecks Signifikanznachweis Ergebnisse des Student t-Tests für unabhängige Stichproben. Dabei wurden p-Werte < 0,05 als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

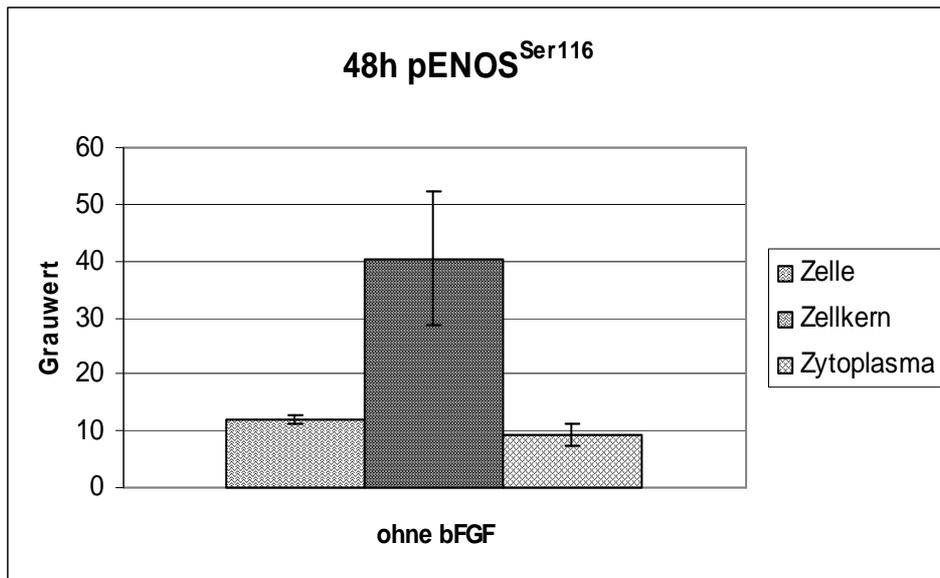
Der Einfluss von bFGF auf die bei der Signaltransduktion in mesenchymalen Stammzellen beteiligten Proteine wurde durch immunohistochemische Untersuchungen gezeigt und durch densitometrische Messungen ausgewertet.

#### 3.1. 48 stündige bFGF-Inkubation

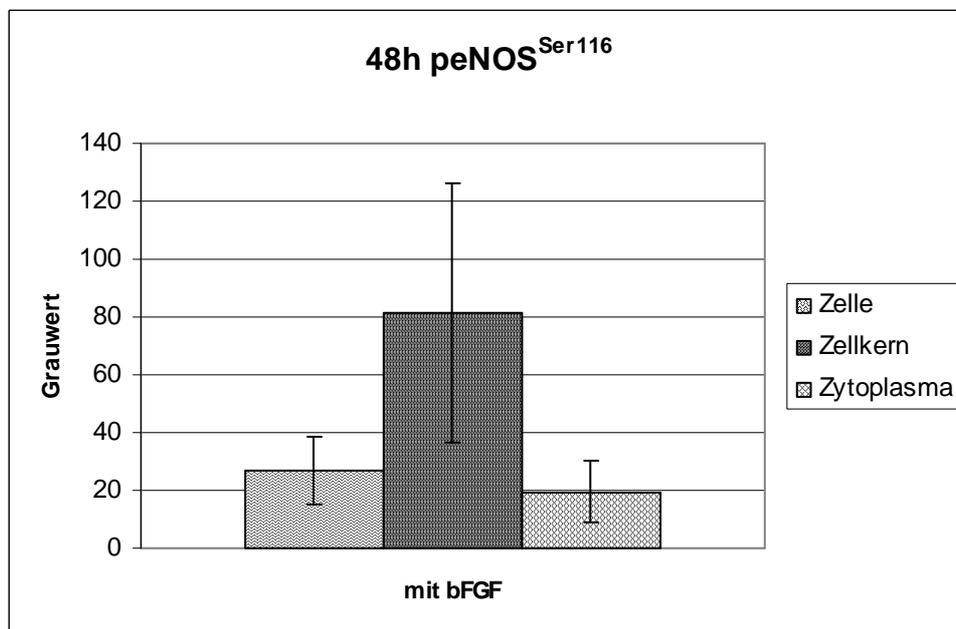
Folgende mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wurden in unseren Versuchen detektiert: die stressreagiblen Jun N-terminal- sowie die p38-Kinase, die extrazellulär aktivierte Kinase ERK sowohl insgesamt als auch separat in ihrem phosphorylierten Zustand, die Proteinkinase B oder AKT, ebenfalls gesamt und aktiviert sowie die endotheliale NO-Synthase (eNOS) sowohl generell als auch in ihren drei unterschiedlich phosphorylierten Formen (pENOS<sup>Ser116</sup>, pENOS<sup>Ser1177</sup>, pENOS<sup>Thr495</sup>).

Bei den Patienten, deren Zellen über 48 h mit bFGF inkubiert wurden, konnten nach erfolgter immunohistochemischen Färbung bei fast allen verwendeten Antikörpern densitometrisch höhere Grauwerte ermittelt werden als in der Kontrollgruppe. Der deutlichste prozentuale Anstieg der Messergebnisse war dabei meist im Zytoplasma der Zellen nachzuweisen, während die höchsten Absolutwerte im Zellkern gemessen wurden.

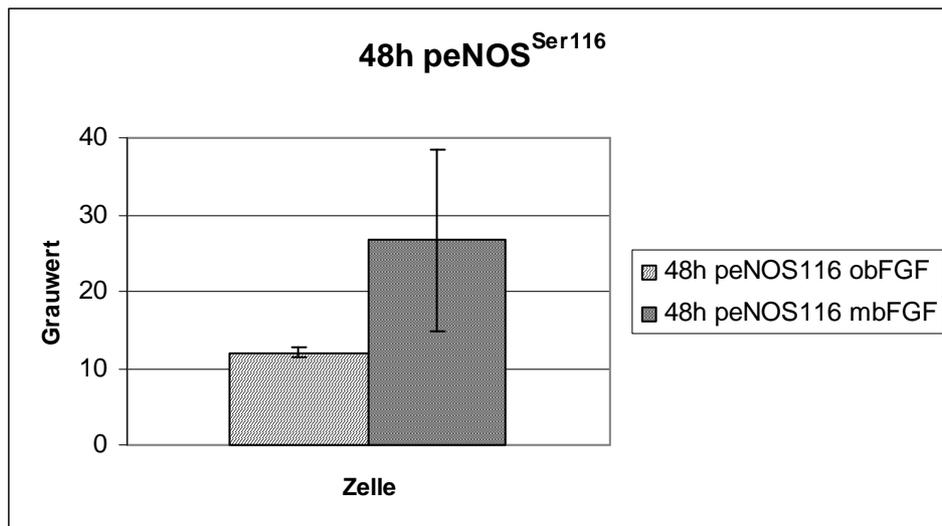
Mit einer Steigerung der Grauwerte um über 100% sowohl in der Zelle insgesamt als auch getrennt im Zellkern und im Zytoplasma zeigten die MSCs unter Einfluss von bFGF und dem Antikörper zum Nachweis der am Serin116 phosphorylierte peNOS den deutlichsten Messunterschied im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe. Wie die Diagramme 1a und b zeigen, betrug die Mittelwerte ohne bFGF hier für die gesamte Zelle  $12,01 \pm 0,61$ , für den Zellkern  $40,36 \pm 11,82$  und das Zytoplasma  $9,15 \pm 1,91$ , während mit bFGF in der Zelle  $26,68 \pm 11,82$ , im Zellkern  $81,61 \pm 44,79$  und im Zytoplasma  $19,63 \pm 10,97$  gemessen wurden. Diagramm Nr.1c stellt die densitometrischen Messergebnisse in der gesamten Zelle mit und ohne Wachstumsfaktor direkt gegenüber.



**Diagramm 1a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von peNOS<sup>Ser116</sup>

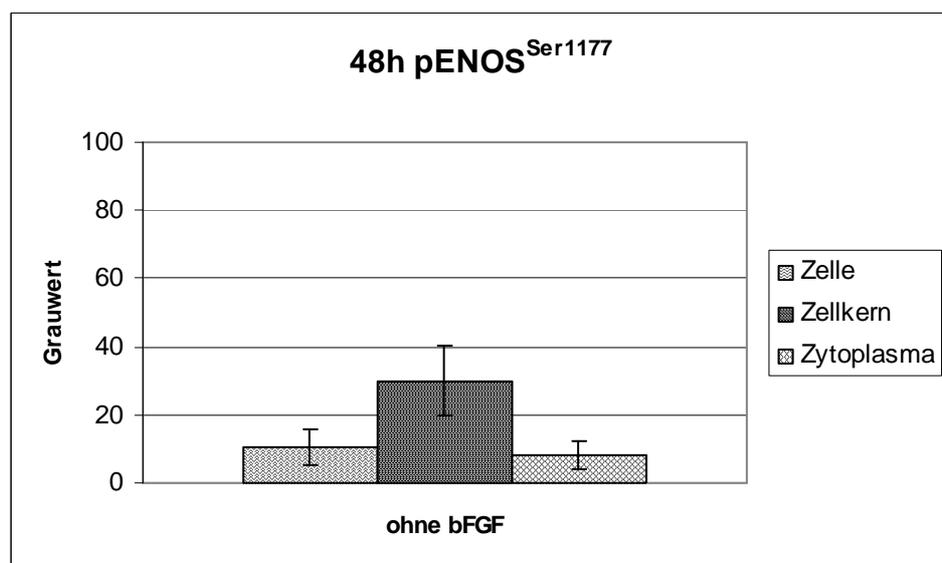


**Diagramm 1b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von peNOS<sup>Ser116</sup>

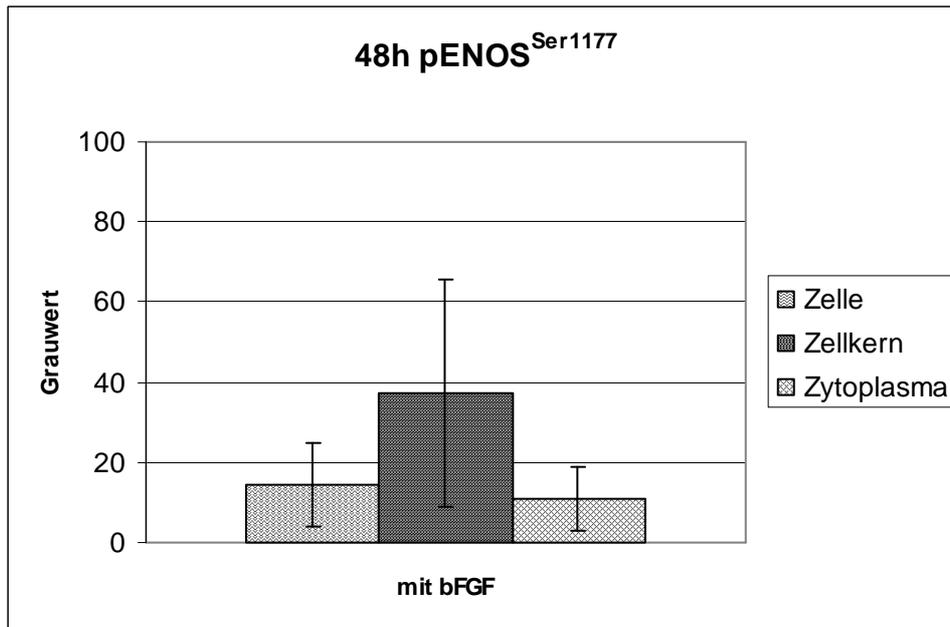


**Diagramm 1c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von peNOS<sup>Ser116</sup> (p=0,34)

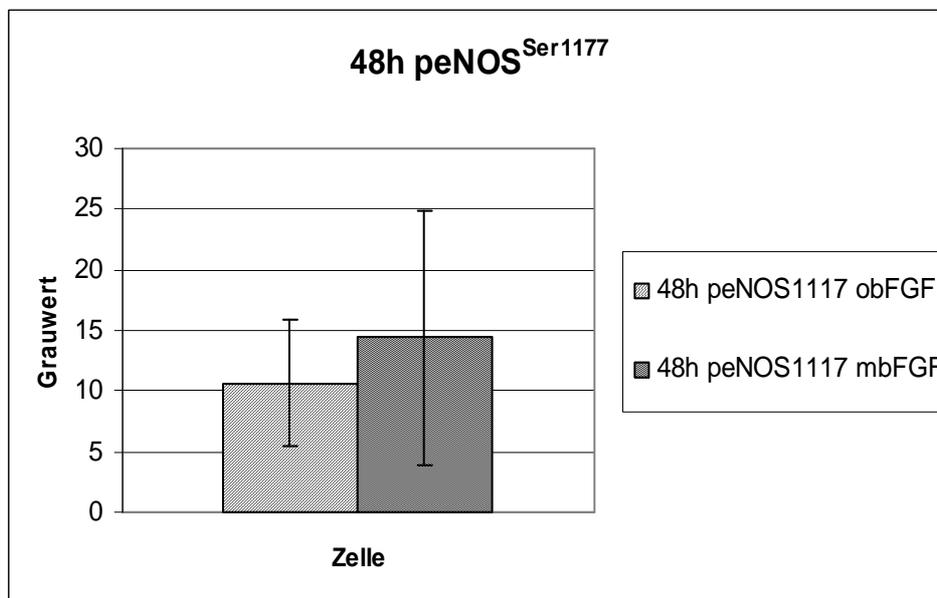
Die Diagramme 2a bis 3c veranschaulichen die zwar prozentual geringeren jedoch immer noch deutlichen Aktivitätsanstiege die eNOS auch in ihren anderen phosphorylierten Zuständen zeigte. Die Mittelwerte mit dem AK gegen peNOS<sup>Ser1177</sup> stiegen von  $10,67 \pm 5,25$  auf  $14,41 \pm 10,53$  in der gesamten Zelle, von  $30,02 \pm 10,14$  auf  $37,19 \pm 28,38$  im Zellkern und von  $8,16 \pm 4,23$  auf  $10,91 \pm 7,85$  im Zytoplasma.



**Diagramm 2a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von peNOS<sup>Ser1177</sup>

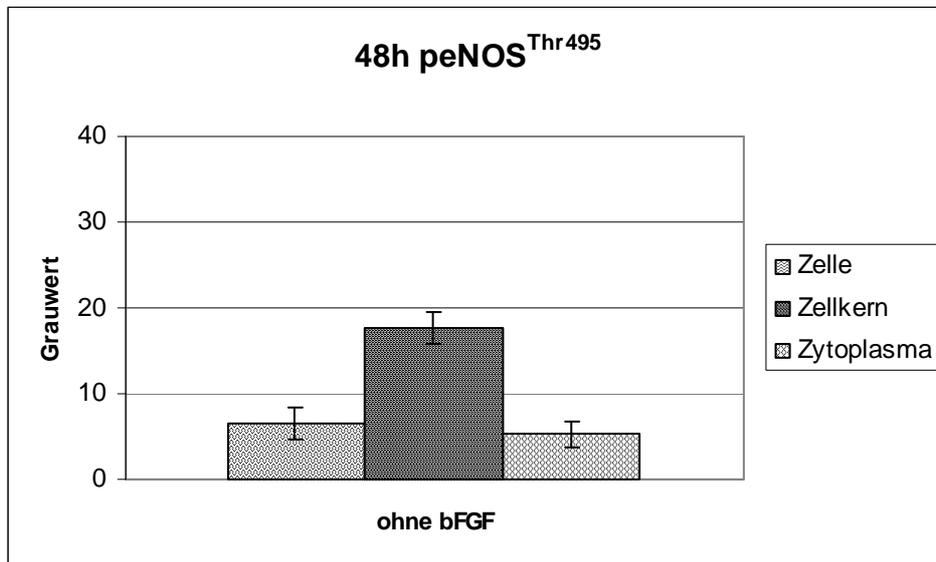


**Diagramm 2b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von peNOS<sup>Ser1177</sup>

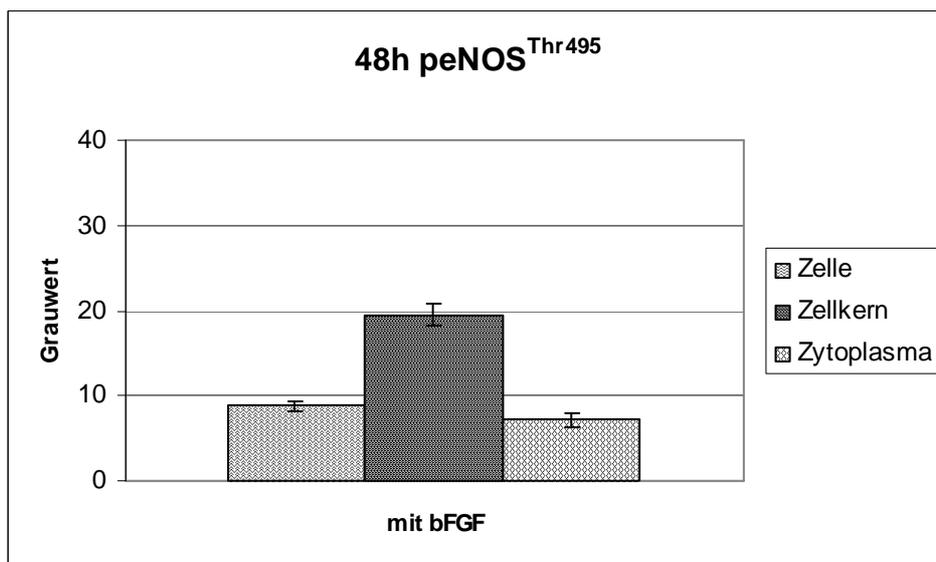


**Diagramm 2c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von peNOS<sup>Ser1177</sup> (p=0,71)

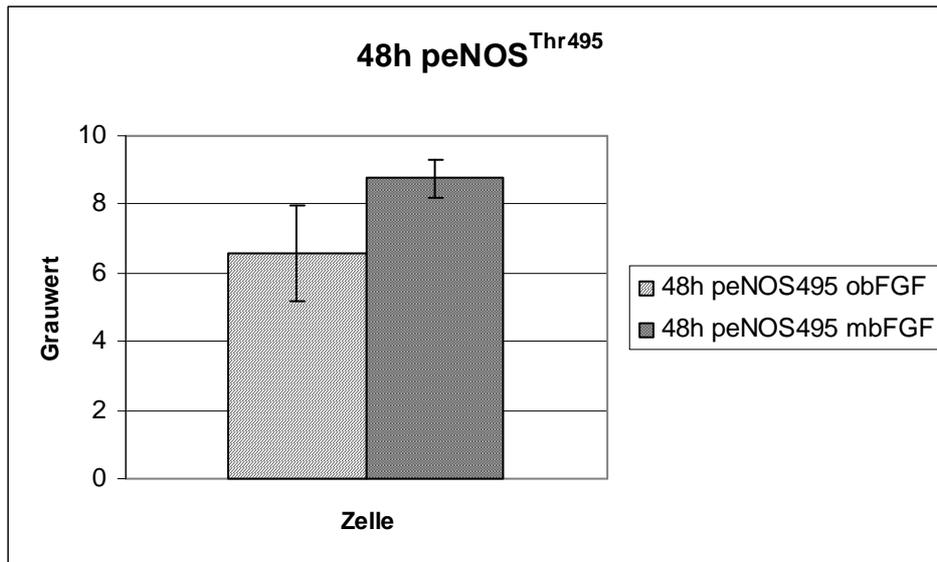
Für die peNOS<sup>Thr495</sup> ergaben sich Aktivitätsanstiege von  $6,59 \pm 1,4$  auf  $8,77 \pm 0,55$  in der Zelle, von  $17,6 \pm 1,84$  auf  $19,53 \pm 1,36$  im Zellkern und im Zytoplasma von  $5,27 \pm 1,46$  auf  $7,15 \pm 0,77$ .



**Diagramm 3a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von peNOSThr495

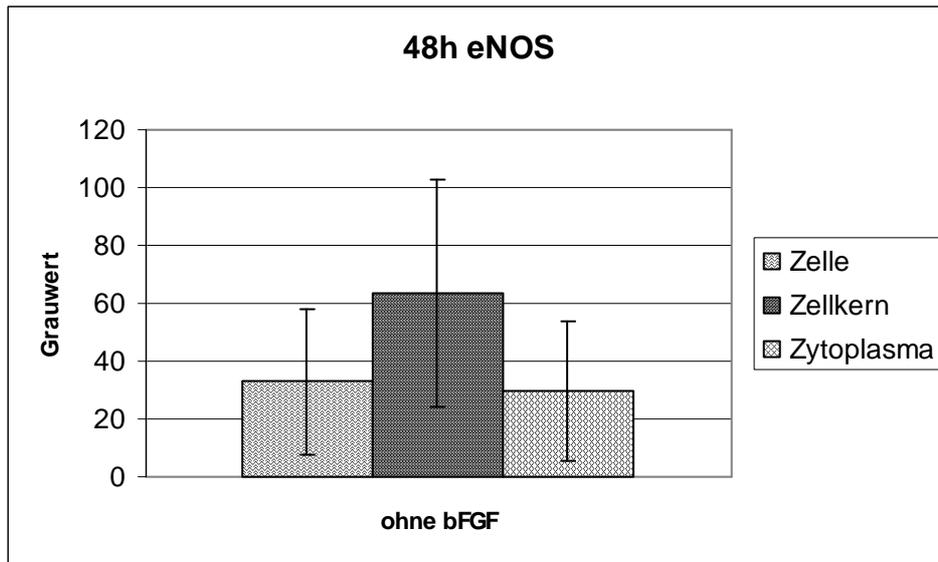


**Diagramm 3b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von peNOS<sup>Thr495</sup>

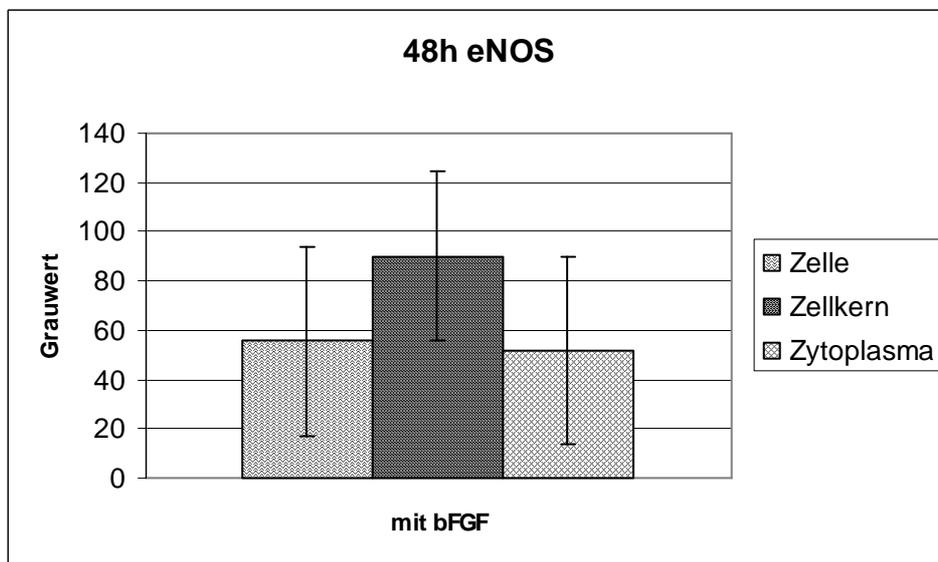


**Diagramm 3c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von peNOS<sup>Thr495</sup> ( $p=0,24$ )

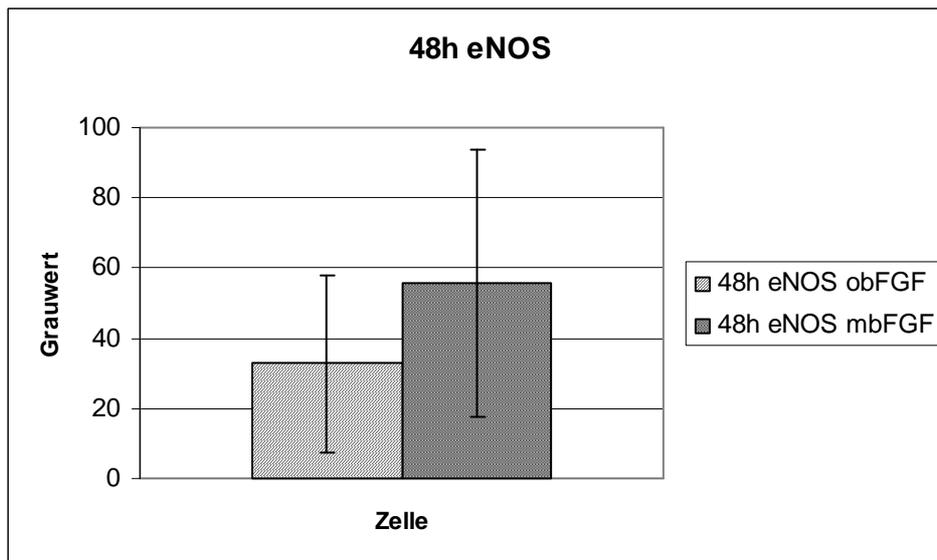
Bei der Detektion der endothelialen NO-Synthase konnten die höchsten Absolutwerte gemessen werden (siehe Diagramme 4a, b und c). Für die gesamte Zelle betragen diese ohne bFGF  $32,77 \pm 25,1$  bzw.  $55,58 \pm 38,2$  mit bFGF. Im Zellkern ergab sich ein Ergebnis von  $63,29 \pm 39,38$  ohne bFGF gegenüber  $90,12 \pm 34,46$  mit bFGF und im Zytoplasma  $29,55 \pm 24,33$  ohne im Unterschied zu  $51,84 \pm 38,38$  mit dem Wachstumsfaktor.



**Diagramm 4a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von eNOS



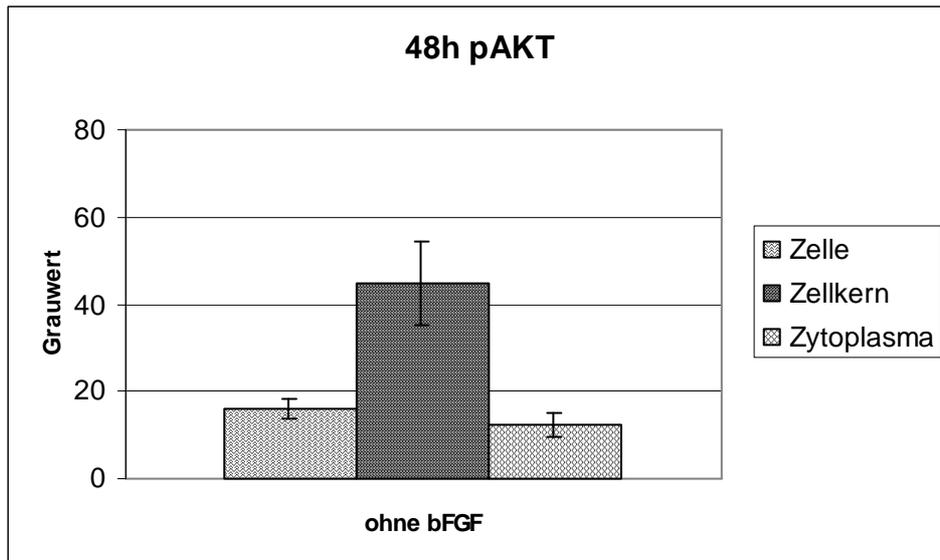
**Diagramm 4b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von eNOS



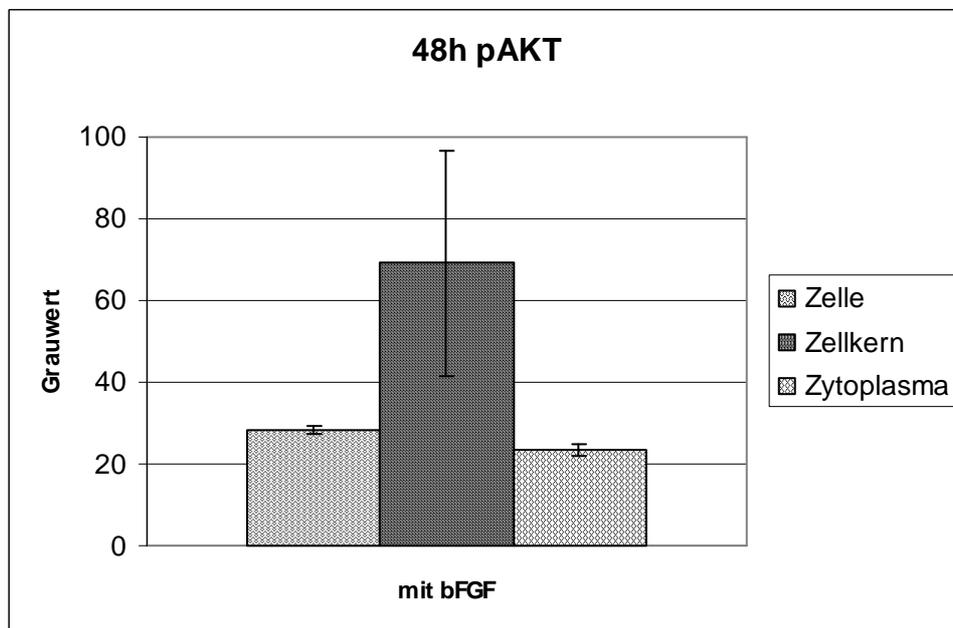
**Abbildung 4c:** exemplarische Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von eNOS ( $p=0,56$ )

Nach der  $peNOS^{Ser116}$  waren die zweithöchsten densitometrisch erfassbaren Intensitätsunterschiede bei der phosphorylierten AKT zu verzeichnen.

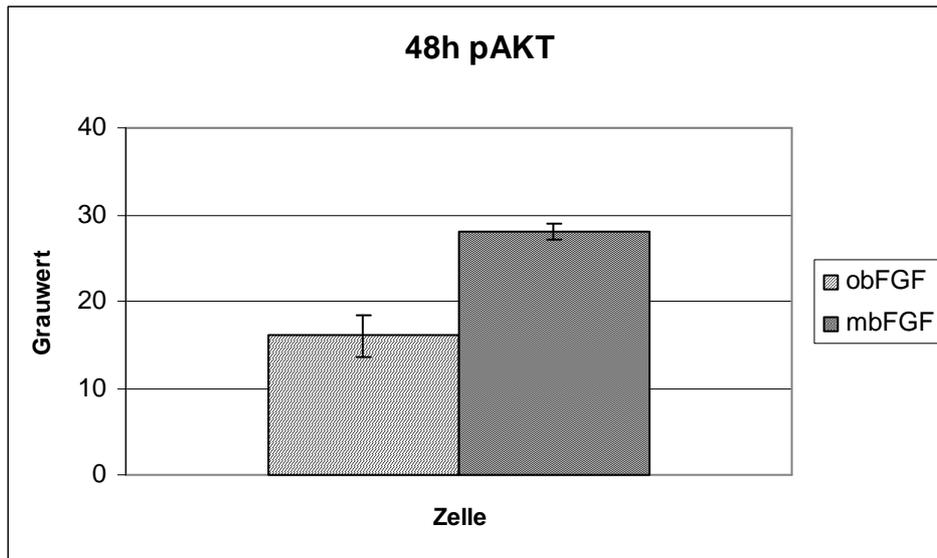
Die Graphiken Nr. 5a, b und c visualisieren diese Messergebnisse. Im Zellkern war mit bFGF ein Wert von  $69,09 \pm 27,7$  nachweisbar während ohne den Wachstumsfaktor nur  $44,8 \pm 9,67$  gemessen wurde. Im Zytoplasma standen  $23,5 \pm 1,57$  mit bFGF gegenüber  $12,29 \pm 2,87$  ohne bFGF und auch in der Zelle als Ganzes war mit  $28,08 \pm 0,96$  versus  $16,01 \pm 2,44$  ein Anstieg sichtbar.



**Diagramm 5a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von pAKT

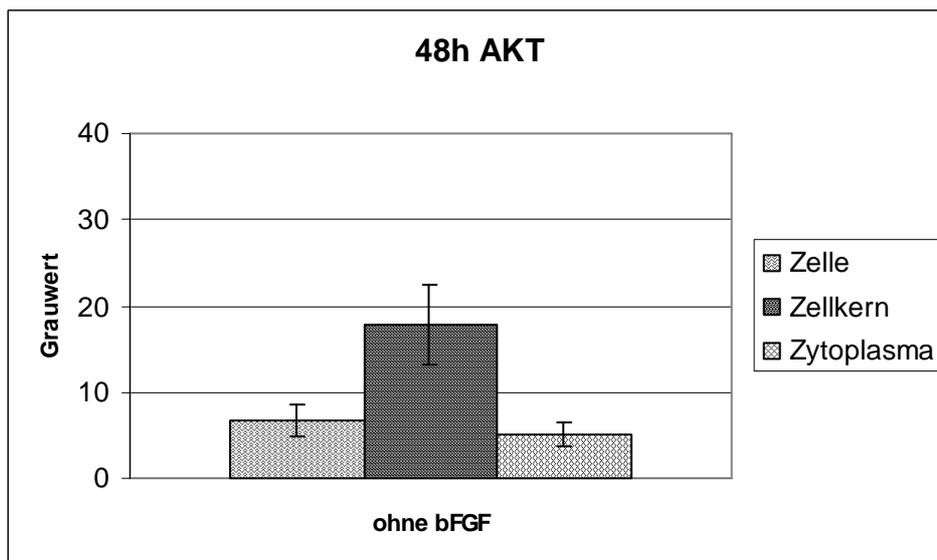


**Diagramm 5b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pAKT

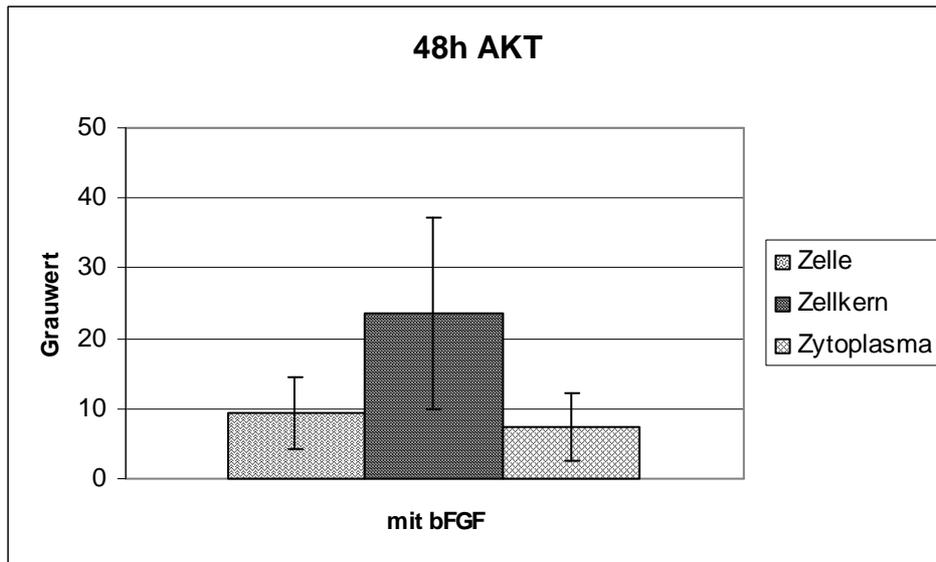


**Diagramm 5c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse mit und ohne bFGF in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pAKT ( $p=0,06$ )

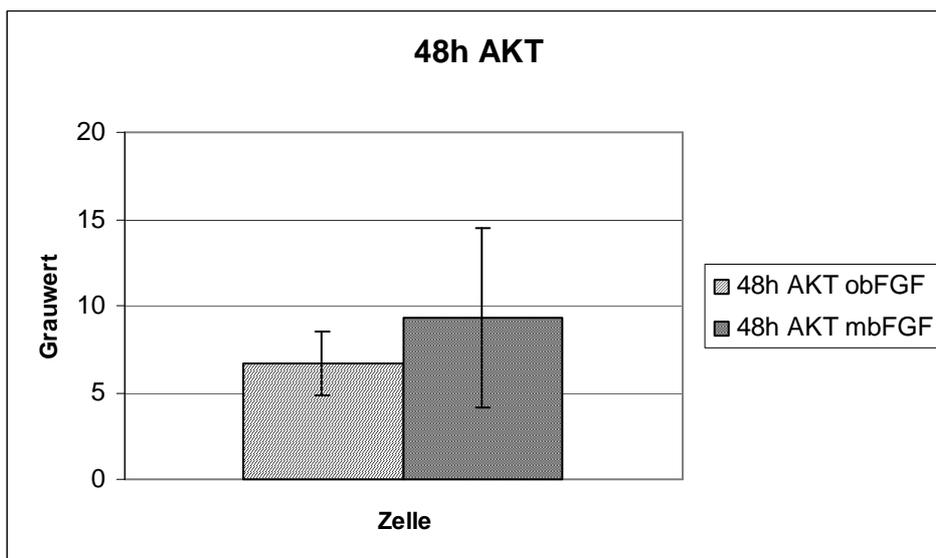
Wie die graphischen Darstellungen Nr. 6a, b und c verdeutlichen, führten auch die Antikörper zur Markierung der gesamten AKT nach Inkubation der Zellen mit bFGF zu höheren densitometrischen Werten. Im Zytoplasma stiegen sie von  $5,13 \pm 1,39$  auf  $7,46 \pm 4,8$ , im Zellkern von  $17,78 \pm 4,67$  auf  $23,6 \pm 13,75$  und in der gesamten Zelle von  $6,71 \pm 1,85$  auf  $9,29 \pm 5,14$ ).



**Diagramm 6a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von AKT

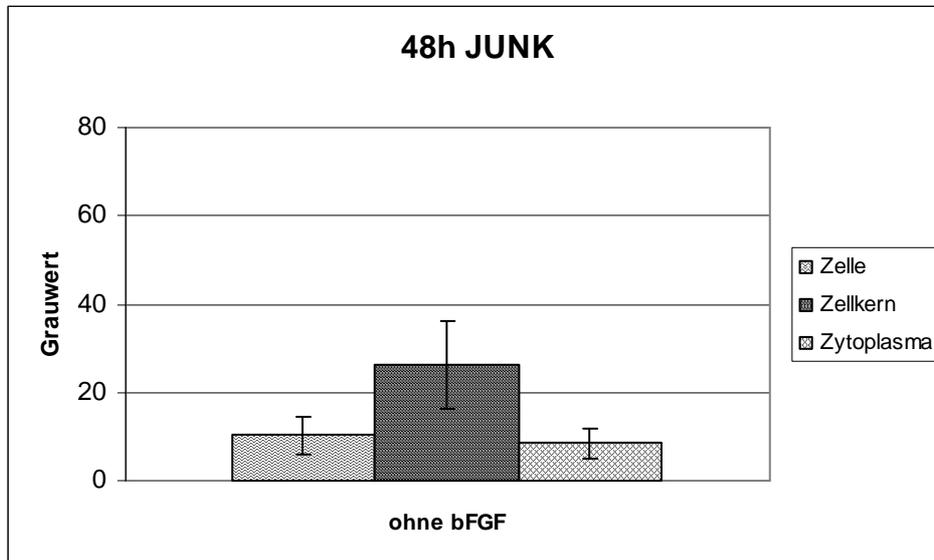


**Diagramm 6b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von AKT

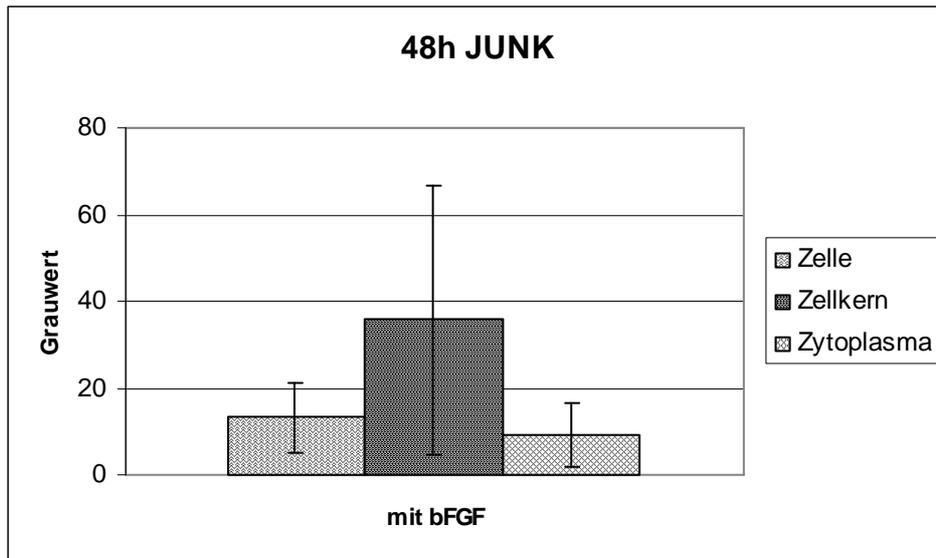


**Diagramm 6c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von AKT ( $p=0,61$ )

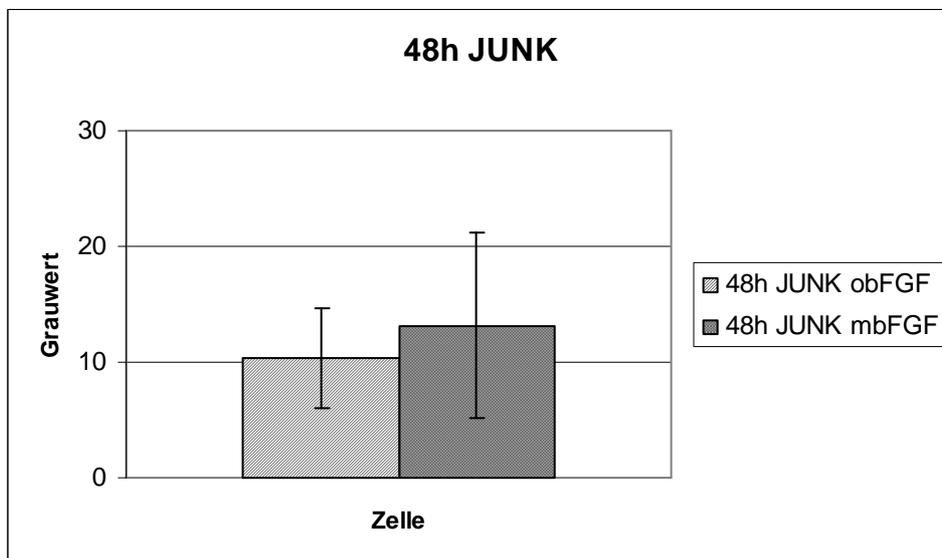
In den Diagrammen Nr.7 bis 10 erfolgte die optische Darstellung der Messergebnisse der MAP-Kinasen. Bei den beiden stressreagiblen Kinasen JUNK und p38 (siehe Graphiken Nr.7 und 8) wurde der deutlichste Messwertanstieg unter bFGF-Einfluss anstatt im Zytoplasma im Zellkern nachgewiesen:  $35,77 \pm 30,95$  gegenüber  $26,21 \pm 9,78$  für die JUNK und  $20,05 \pm 7,06$  gegenüber  $16,5 \pm 0,07$  bei der p38. Im Zytoplasma maß die JUNK mit Wachstumsfaktor  $9,29 \pm 7,38$  und ohne  $8,42 \pm 3,43$ , die p38 kam hier auf  $5,42 \pm 3,11$  mit bzw. auf  $4,59 \pm 1,37$  Grauwert-Punkte ohne bFGF. Mit bFGF wurde die gesamte Zelle nach JUNK-AK-Inkubation mit  $13,13 \pm 8,0$  ausgemessen, ohne Wachstumsfaktor nur mit  $10,29 \pm 4,3$ . Die p38 kam hier auf  $7,01 \pm 3,33$  mit bFGF während die Zellen der Kontrollgruppe nur einen Mittelwert von  $6,04 \pm 1,49$  erreichten.



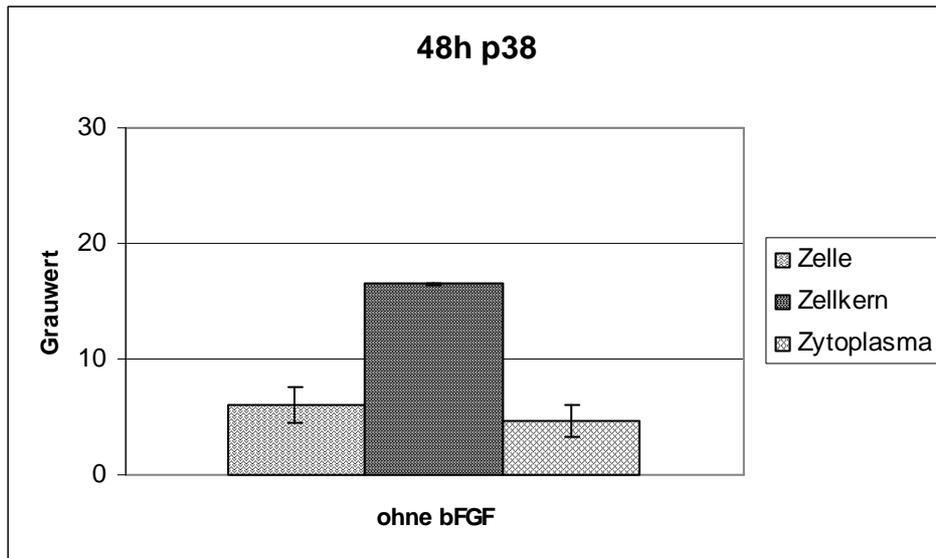
**Diagramm 7a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von JUNK



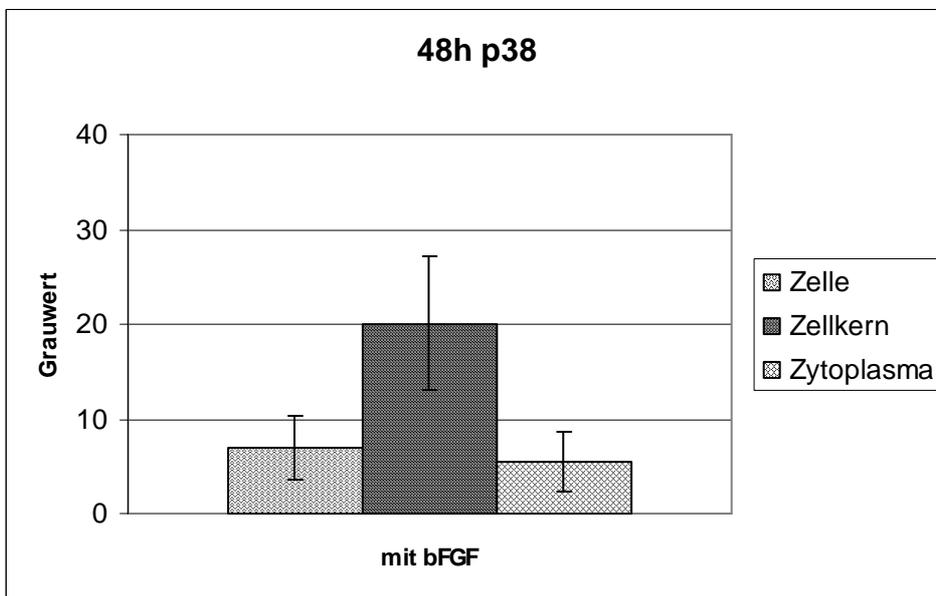
**Diagramm 7b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von JUNK



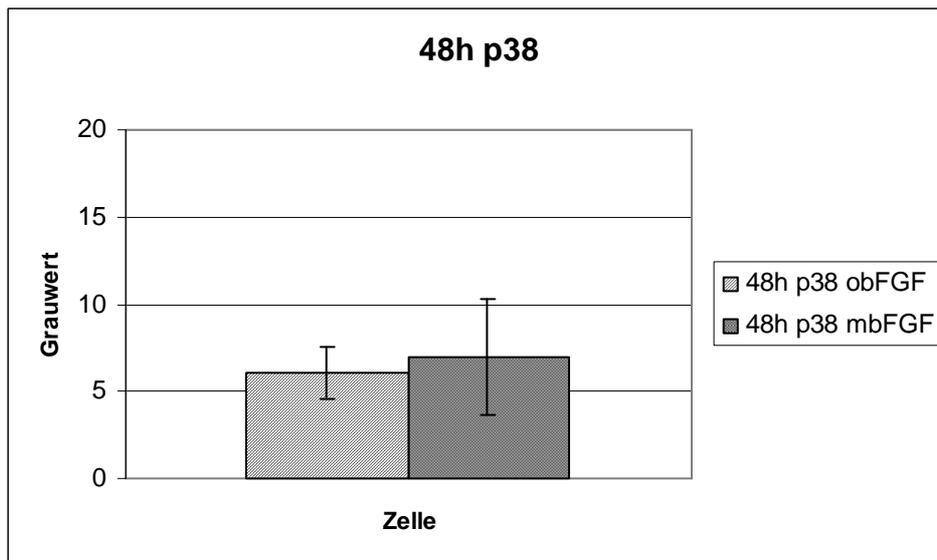
**Diagramm 7c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von JUNK (p=0,71)



**Diagramm 8a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von p38

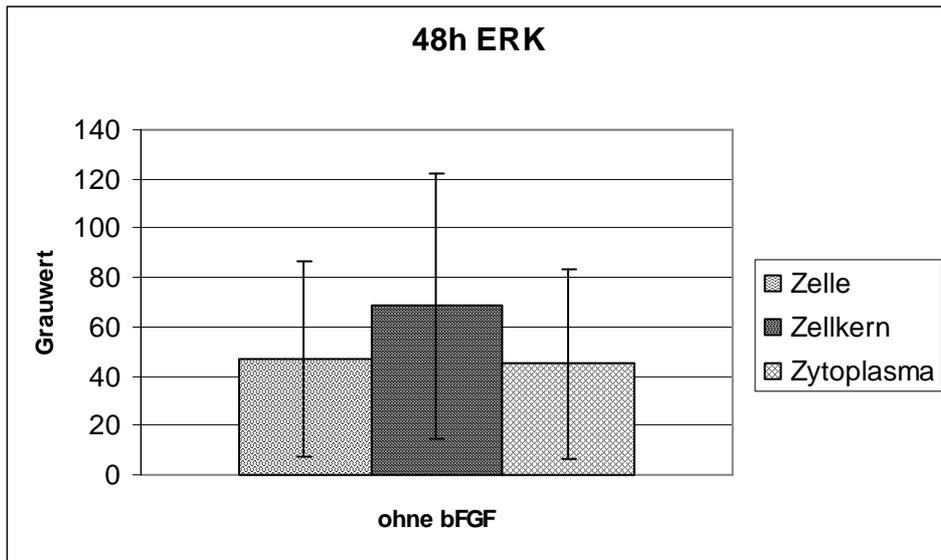


**Diagramm 8b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von p38

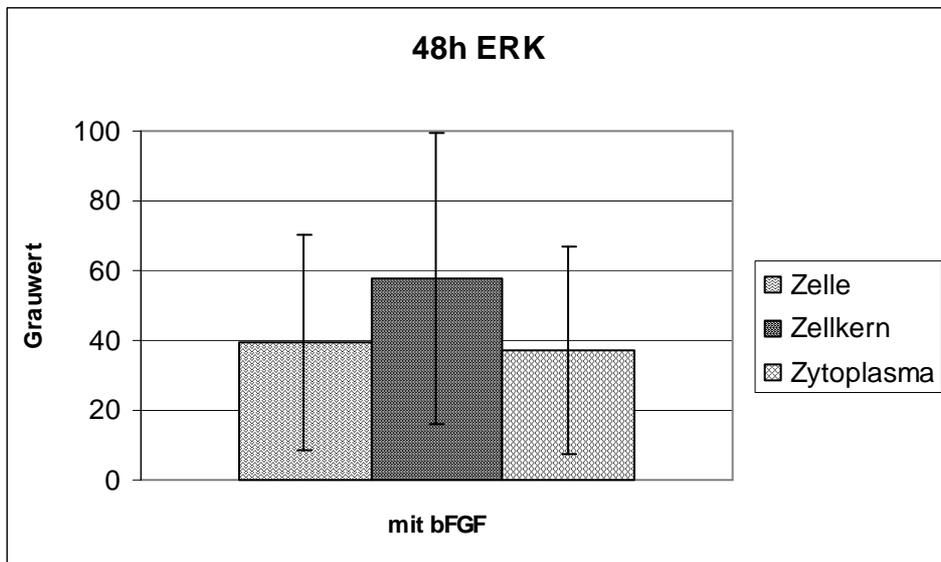


**Diagramm 8c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von p38 ( $p=0,76$ )

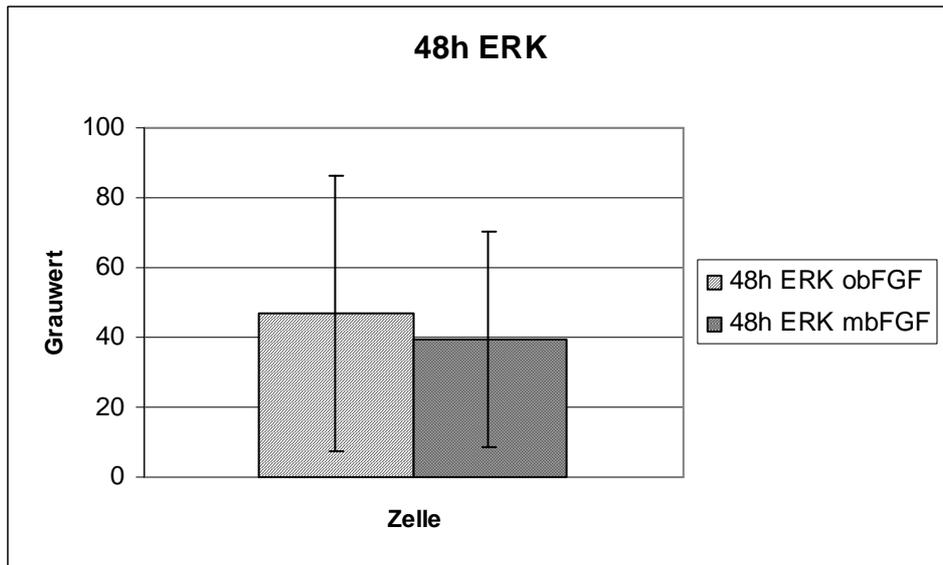
Allein die extrazellulär aktivierte Kinase ERK präsentierte unter bFGF-Bedingungen im Unterschied zu allen anderen untersuchten Proteinen abfallende Grauintensität in der Auswertung, wobei der deutlichste Abfall bei der ERK wie auch bei der pERK im Zytoplasma zu lokalisieren war (siehe Diagramme Nr. 9 und 10). In der gesamten Zelle wie auch isoliert im Zellkern sanken die Werte bei der Detektion der gesamten Kinase um ca. 15%: die Zelle gesamt maß  $46,87 \pm 39,6$  ohne bFGF und  $39,43 \pm 30,88$  mit dem Wachstumsfaktor. Im Zellkern stand ein Wert von  $68,39 \pm 53,99$  gegenüber  $57,95 \pm 41,69$ . Bei der pERK war ein geringerer Unterschied von  $16,32 \pm 9,22$  ohne auf  $15,27 \pm 11,16$  mit bFGF in der Zelle als Ganzes zu vermerken, ähnlich klein war der Abfall von  $27,0 \pm 10,46$  auf  $25,74 \pm 7,93$  im Zellkern. Im Zytoplasma wurde bei der ERK ein Intensitätswert von  $45,02 \pm 38,41$  ohne bFGF gemessen, mit hingegen nur  $37,08 \pm 29,54$ . Die durchschnittlichen Werte der pERK in diesem Zellkompartiment sanken von  $15,19 \pm 9,36$  auf  $13,93 \pm 11,07$ .



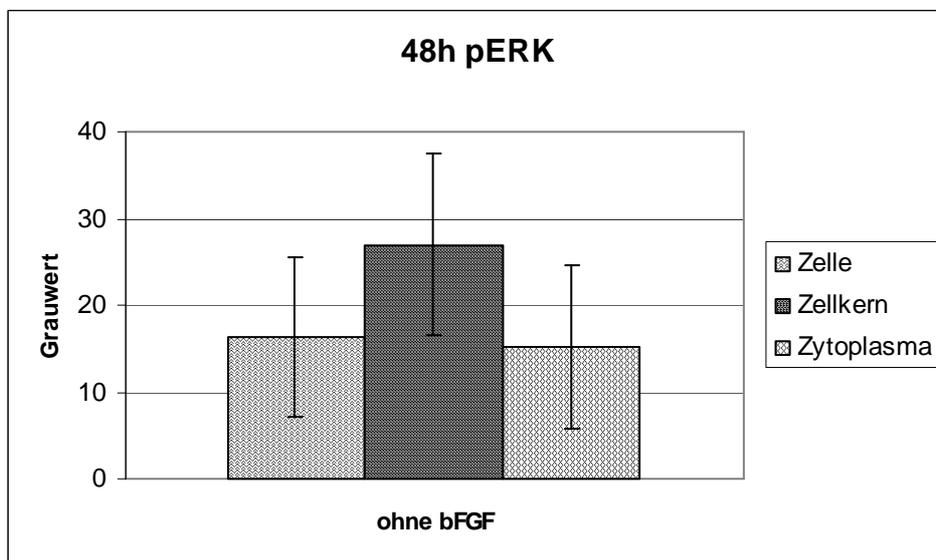
**Diagramm 9a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von ERK



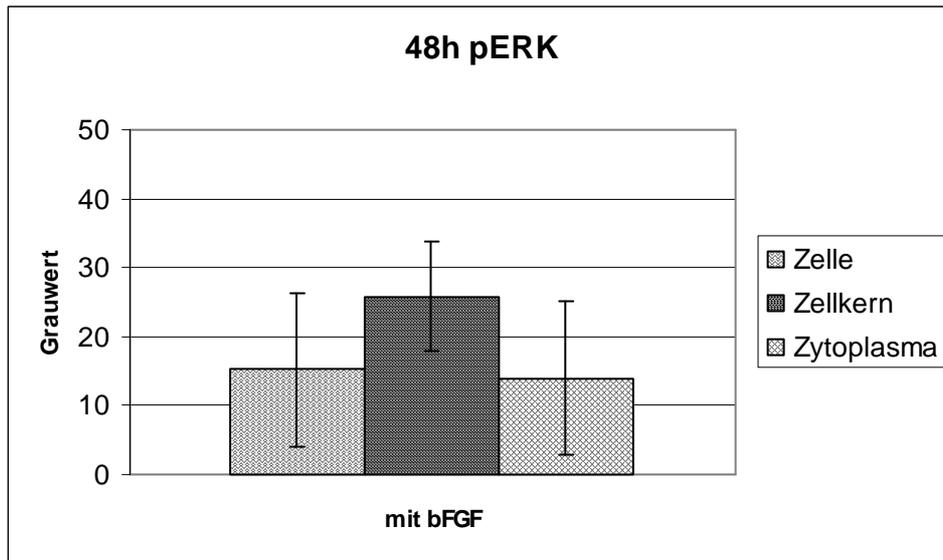
**Diagramm 9b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von ERK



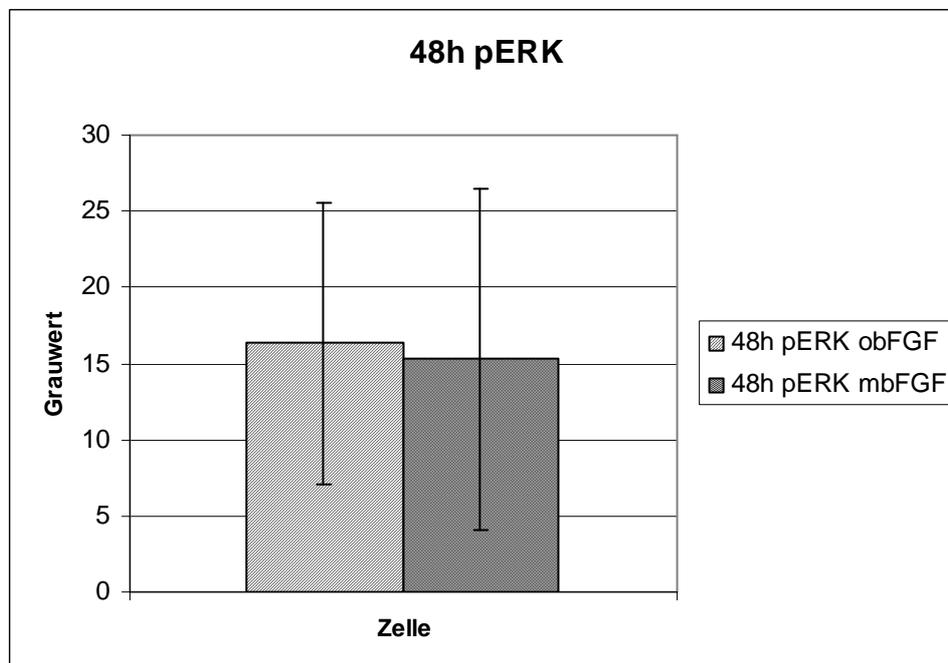
**Diagramm 9c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von ERK (p=0,85)



**Diagramm 10a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von pERK



**Diagramm 10b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pERK



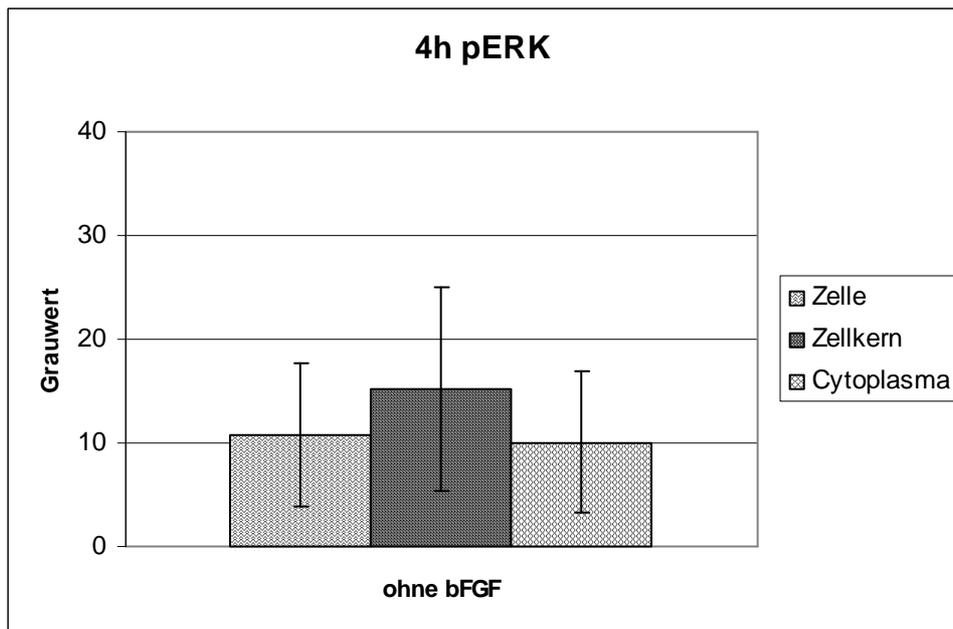
**Diagramm 10c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pERK (p=0,93)

### 3.2. 4 h bFGF

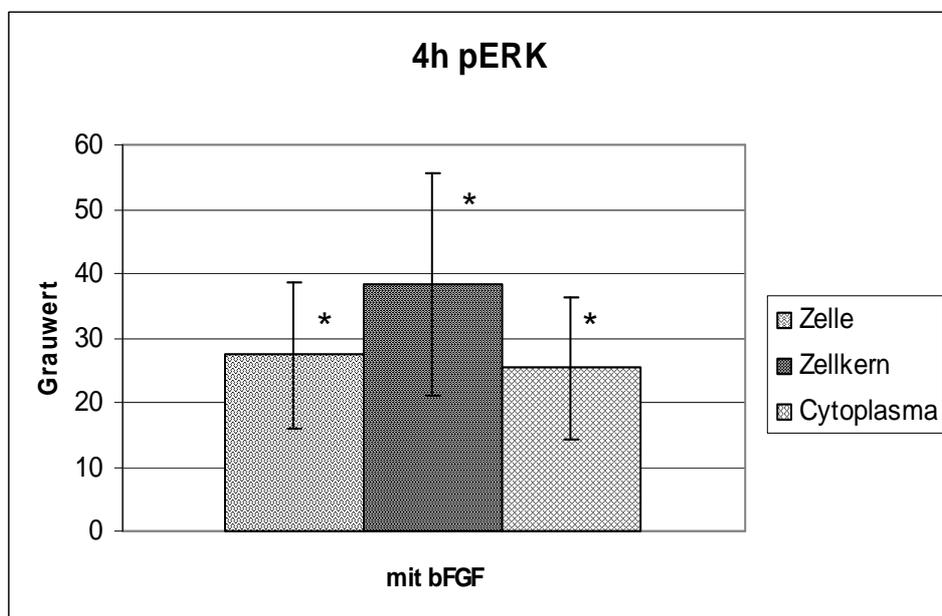
Um herauszufinden, in wieweit die Einwirkzeit des Wachstumsfaktors die densitometrischen Messergebnisse beeinflusst, inkubierten wir die Zellen eines Probanden für nur 4 h mit bFGF. Detektiert wurden außer der p38 sowie der peNOS<sup>Thr495</sup> die gleichen Proteinkinasen, welche wir auch bei den MSCs nach 48stündiger bFGF-Inkubation markierten: AKT und ERK jeweils insgesamt und gesondert mit Phosphatrest, eNOS und ihre diesmal nur zwei verschiedenen Phosphorylierungsformen am Ser1177, und am Ser116, sowie die stressreagible JUNK.

Tatsächlich konnten in dieser Versuchsreihe mit dem Wachstumsfaktor deutlich steilere und im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikante Anstiege dokumentiert werden. Dies galt auch für Detektionen von Kinasen wie ERK und pERK, deren Messungen nach 48 h bFGF eher abfallende Differenzen aufwiesen.

Die höchsten Messwerte mit einem Zuwachs von circa 150% in allen drei Kompartimenten zeigte in diesem Fall die Markierung der pERK. Die Diagramme Nr.11a, b und c lassen erkennen, dass die signifikanteste Grauwertsteigerung hier in der Zelle als Einheit zu messen war: p-Wert <0,001 ( $10,8 \pm 6,94$  ohne und  $27,33 \pm 11,36$  mit bFGF). Im Zytoplasma wurde ein p-Wert von <0,001 erreicht: ohne bFGF  $10,07 \pm 6,82$  und mit  $25,25 \pm 11,04$ . Ebenfalls signifikant: der Anstieg im Zellkern: von  $15,16 \pm 9,84$  ohne Wachstumsfaktor auf  $38,18 \pm 17,24$  mit Zusatz. In der Testung ergab dies einen p-Wert <0,001.

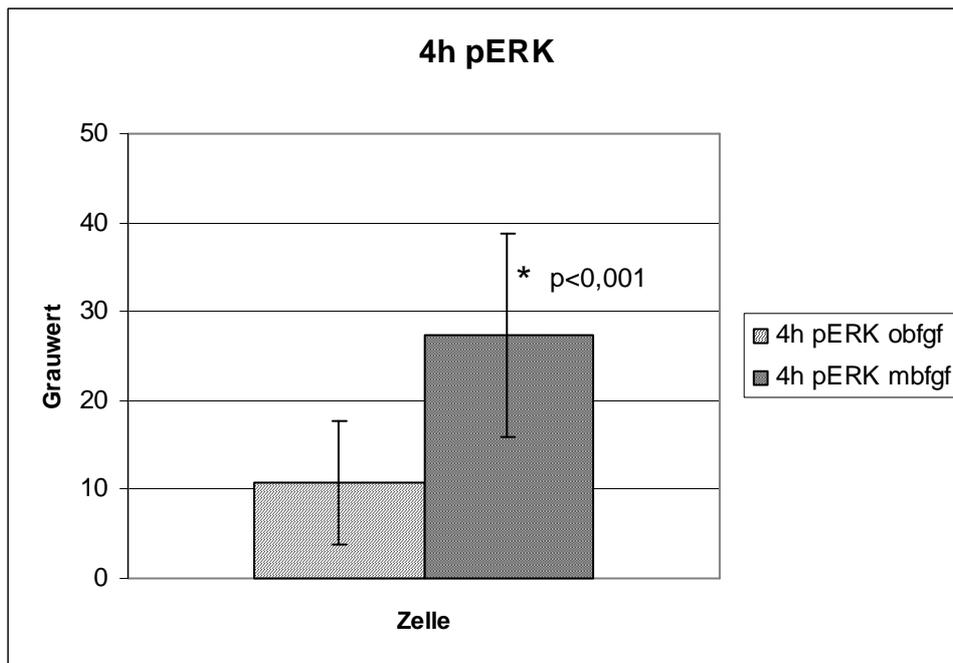


**Diagramm 11a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von pERK



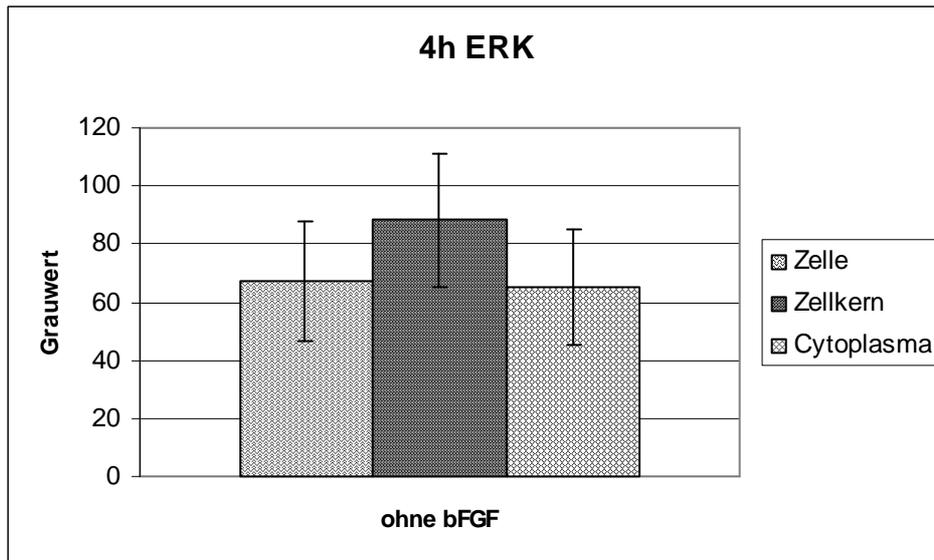
\* = im Vergleich zu „ohne bFGF“ signifikant ( $p < 0,001$ )

**Diagramm 11b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pERK

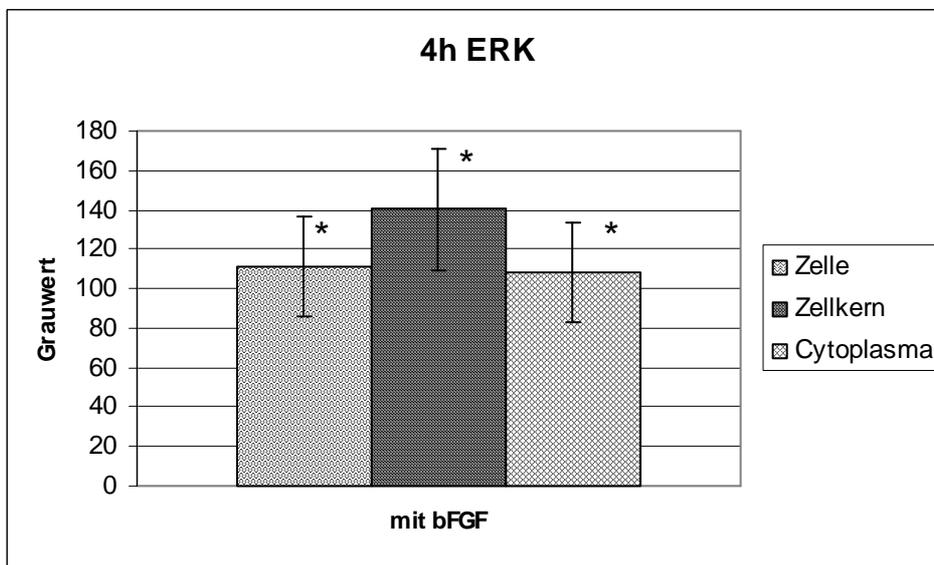


**Diagramm 11c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pERK

Die Messwertanstiege dieser Proteinkinase insgesamt zeigten sich zwar weniger herausragend, waren jedoch ebenfalls mit p-Werten von  $<0,001$  im Zytoplasma, im Zellkern und in der Zelle insgesamt signifikant. Im Zellkern konnten hier unter bFGF-Einfluss die höchsten Absolutwerte gemessen werden (siehe Diagramme 12a, b und c):  $140,15 \pm 30,88$  im Gegensatz zu  $88,19 \pm 22,85$  ohne Zusatz. Im Zytoplasma lagen die durchschnittlichen Ergebnisse bei  $108,06 \pm 25,21$  mit und  $65,24 \pm 20,13$  ohne bFGF und in der gesamten Zelle bei  $111,17 \pm 25,2$  mit und  $67,36 \pm 20,5$  ohne Wachstumsfaktor.

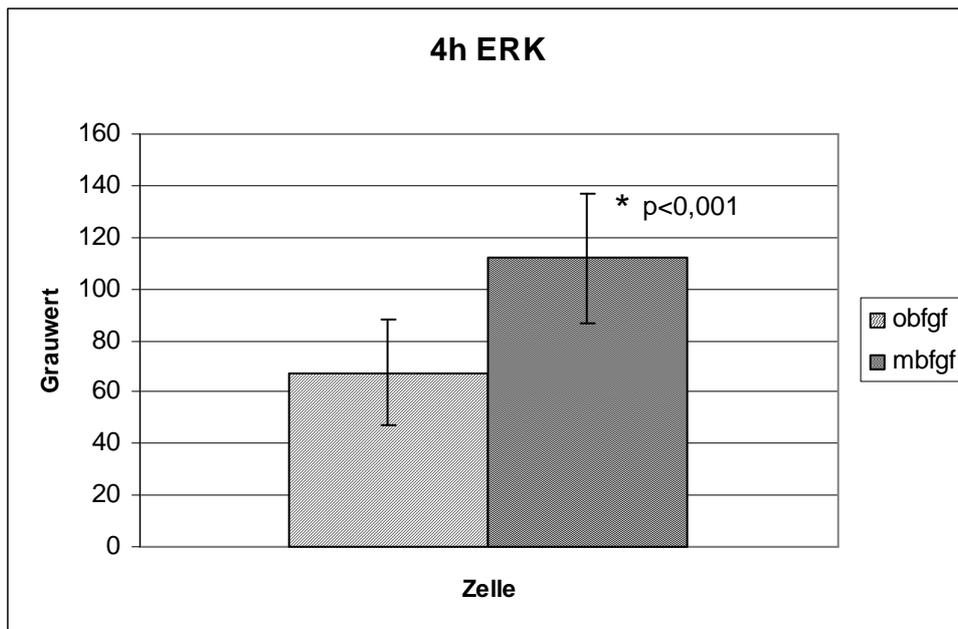


**Diagramm 12a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von ERK



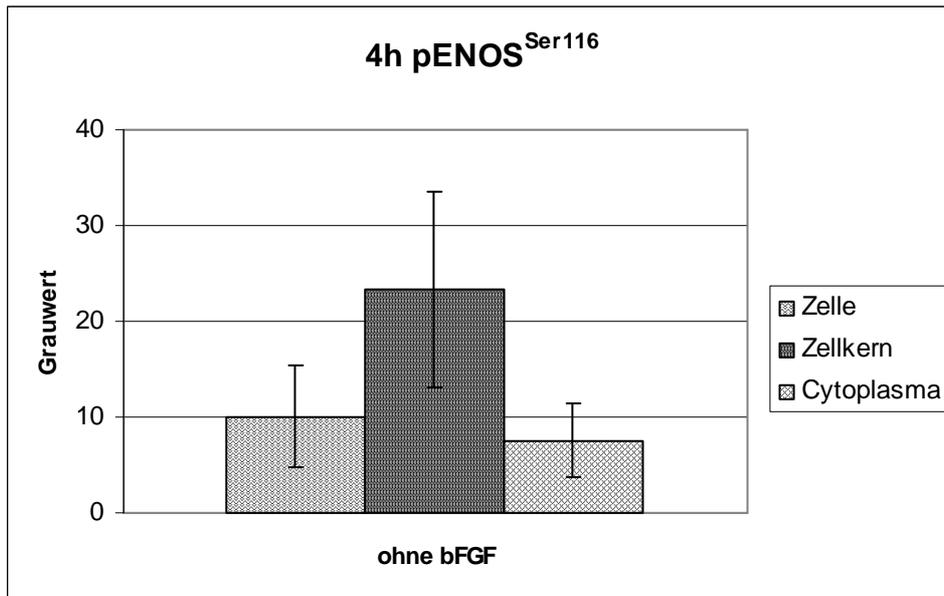
\* = im Vergleich zu „ohne bFGF“ signifikant ( $p < 0,001$ )

**Diagramm 12b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von ERK

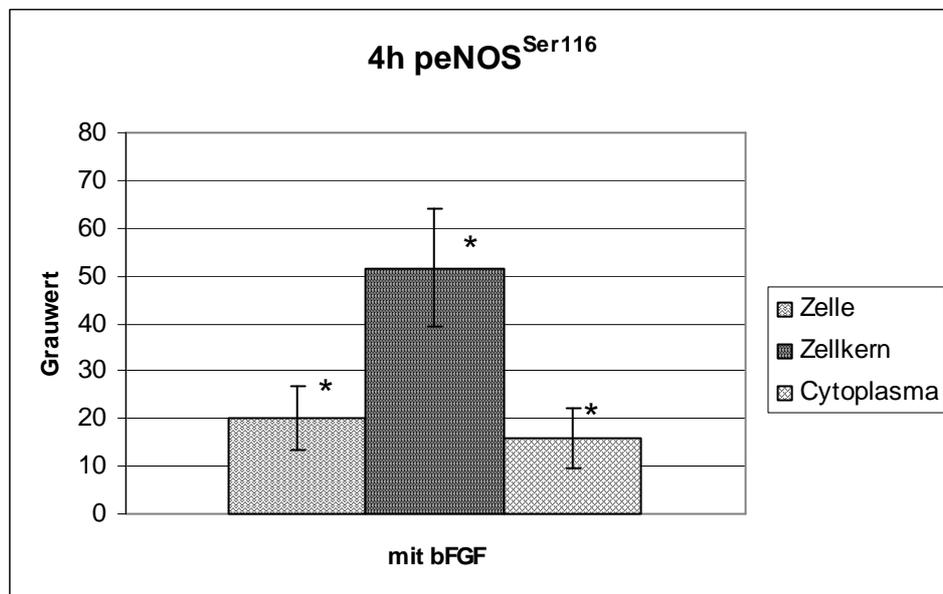


**Diagramm 12c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von ERK

Sehr markante Unterschiede wurden durch bFGF auch bei der am Ser116 phosphorylierten peNOS sichtbar. Der signifikanteste Anstieg lag hierbei im Zellkern (p-Wert <0,001) wo die Messungen ohne Zusatz  $23,34 \pm 10,16$  mit jedoch  $51,6 \pm 12,41$  ergaben. Im Zytoplasma zeigte sich ein Unterschied von  $7,53 \pm 3,86$  in der Kontrollgruppe zu  $15,93 \pm 6,43$  mit bFGF (p-Wert hier <0,001) und in der gesamten Zelle stiegen die Werte gleichsinnig von  $10,05 \pm 5,34$  auf  $20,03 \pm 6,62$ , resultierend p <0,001 (siehe Graphiken Nr.13a b und c).

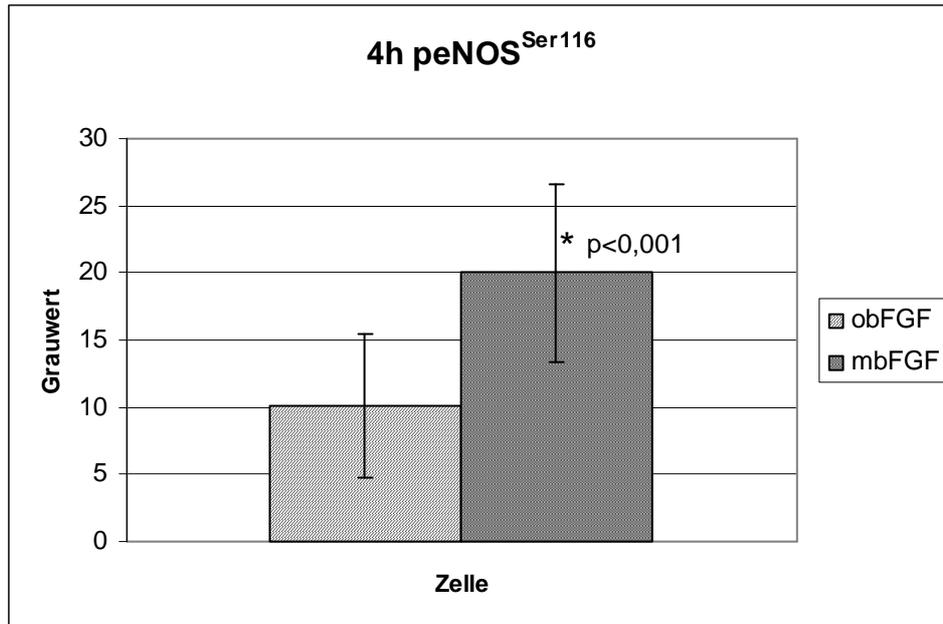


**Diagramm 13a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von pENOS<sup>Ser116</sup>



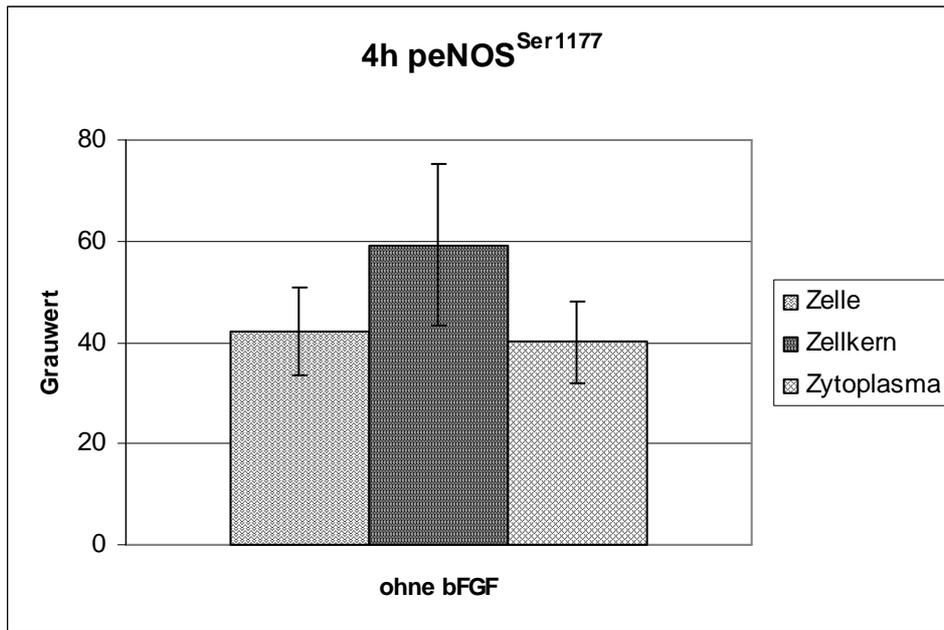
\* = im Vergleich zu „ohne bFGF“ signifikant ( $p < 0,001$ )

**Diagramm 13b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pENOS<sup>Ser116</sup>

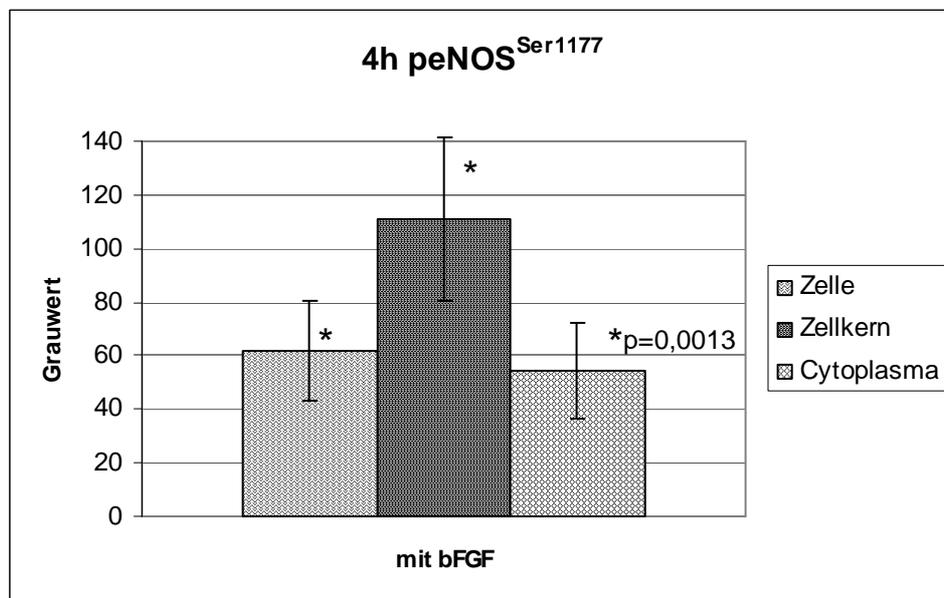


**Diagramm 13c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pENOS<sup>Ser116</sup>

Wie die Diagramme Nr. 14a b und c veranschaulichen, war auch bei der peNOS<sup>Ser1177</sup> die deutlichste Intensitätszunahme im Zellkern nachweisbar: ohne bFGF  $59,21 \pm 16,06$ , mit bFGF  $111,01 \pm 30,39$  ( $p < 0,001$ ). Mit Anstiegen von  $40,03 \pm 7,92$  auf  $54,22 \pm 18,05$  im Zytoplasma und  $42,09 \pm 8,57$  auf  $61,81 \pm 18,87$  in der gesamten Zelle, waren auch in den restlichen Kompartimenten unter Einfluss des Wachstumsfaktors signifikante Ergebnisse zu dokumentieren (p-Wert Zytoplasma:  $= 0,0013$ , Zelle  $< 0,001$ ).

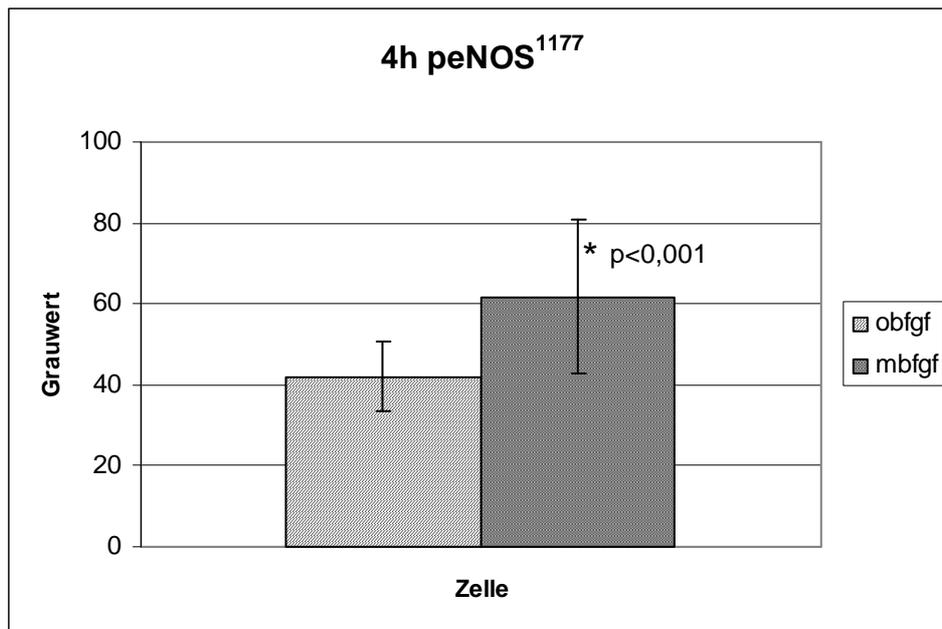


**Diagramm 14a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von pENOS<sup>Ser1177</sup>



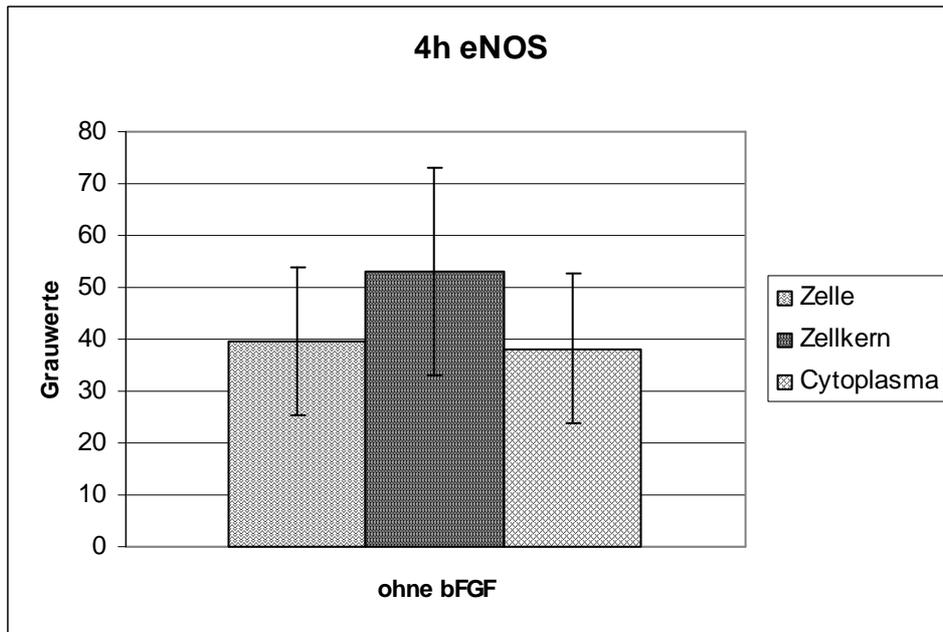
\* = im Vergleich zu „ohne bFGF“ signifikant (p<0,001)

**Diagramm 14b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pENOS<sup>Ser1177</sup>

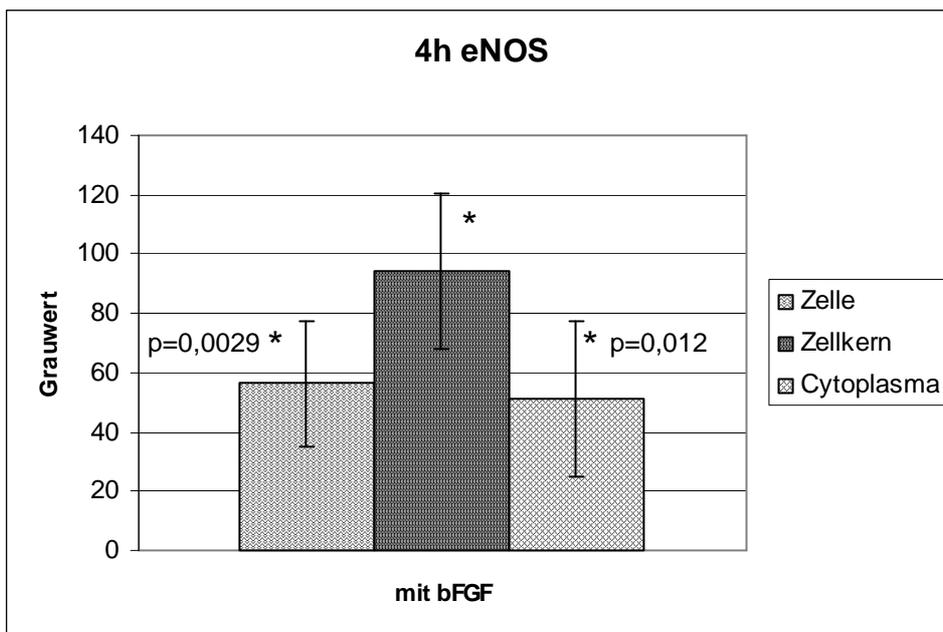


**Diagramm 14c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pENOS<sup>Ser1177</sup>

Im Falle der gesamten eNOS waren, wie in den Graphiken Nr. 15a, b und c dargestellt, ähnliche Messwertverläufe zu beschreiben wie bei ihren aktivierten Formen. Auch hier schnellte die Grauwertintensität am deutlichsten im Zellkern in die Höhe:  $53,03 \pm 19,91$  ohne,  $93,99 \pm 26,26$  mit bFGF. Der p-Wert lag bei  $<0,001$ . Im Zytoplasma der Zellen der Kontrollgruppe maß man durchschnittlich  $38,15 \pm 14,47$  Punkte auf der Grauwertskala, mit Wachstumsfaktor wurden  $51,16 \pm 19,67$  erreicht. (p-Wert= 0,012). Betrachtete man die Zelle als Einheit ergaben sich Mittelwertdifferenzen von  $39,66 \pm 14,33$  ohne und  $56,3 \pm 21,37$  mit bFGF, mit einem p-Wert von 0,0029.

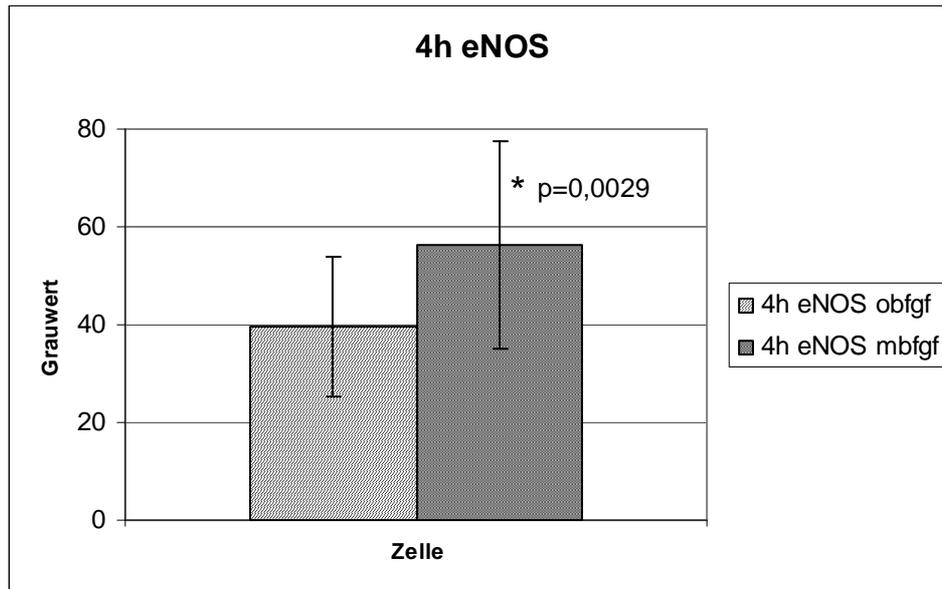


**Diagramm 15a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von eNOS



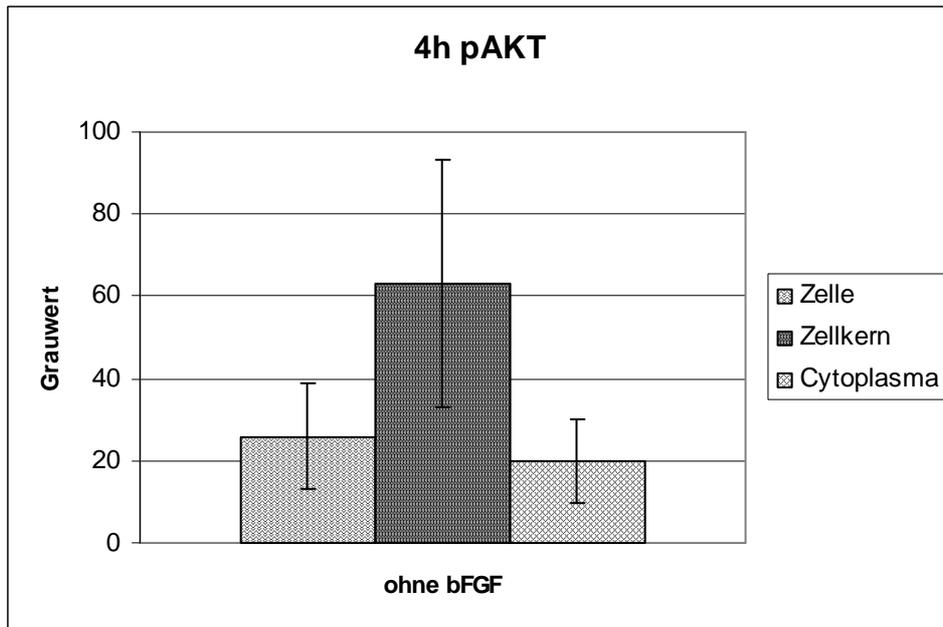
\* = im Vergleich zu „ohne bFGF“ signifikant (p<0,001)

**Diagramm 15b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von eNOS

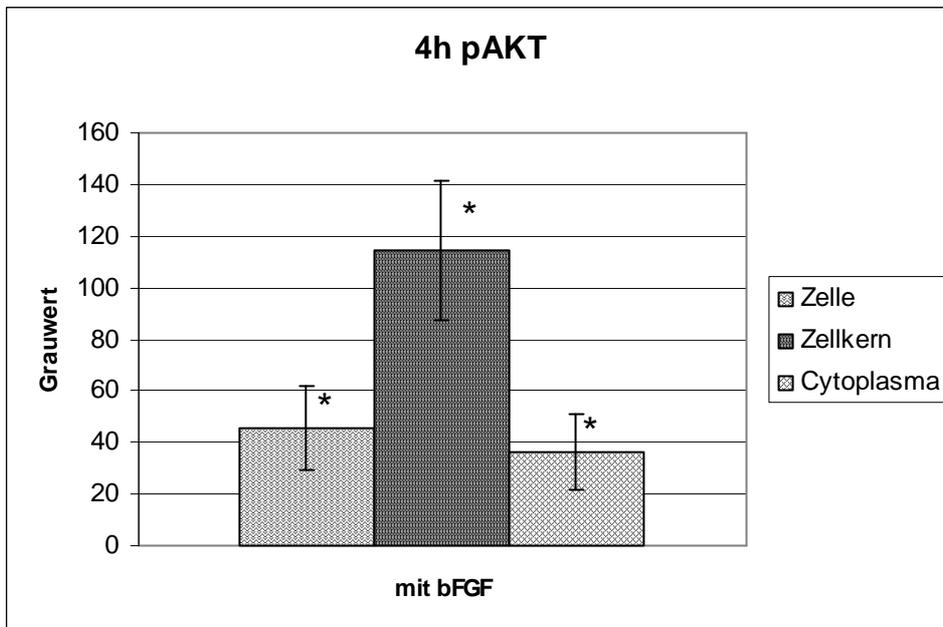


**Diagramm 15c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von eNOS

Die Proteinkinase B zeigte nach 4stündiger bFGF-Inkubation besonders in ihrer phosphorylierten Form Intensitätszunahmen. In allen drei gemessenen Arealen stiegen die Werte durchschnittlich um ca. 80%, resultierende p-Werte waren alle  $<0,001$ . Im Einzelnen waren in der Reihenfolge ohne und mit Zusatz des Wachstumsfaktors folgende Ergebnisse messbar (siehe Diagramme 16a, b und c): Zelle gesamt:  $25,82 \pm 12,85$ , gegenüber  $45,91 \pm 16,31$ ; Zellkern:  $62,94 \pm 30,04$  gegenüber  $114,37 \pm 27,05$  und im Zytoplasma:  $20,03 \pm 10,25$  verglichen mit  $36,32 \pm 14,38$ .

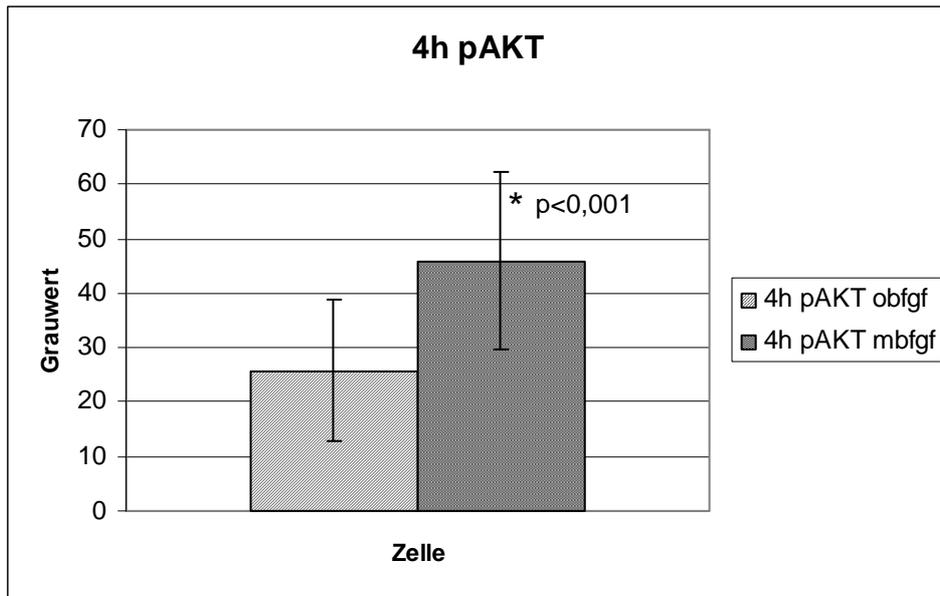


**Diagramm 16a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von pAKT



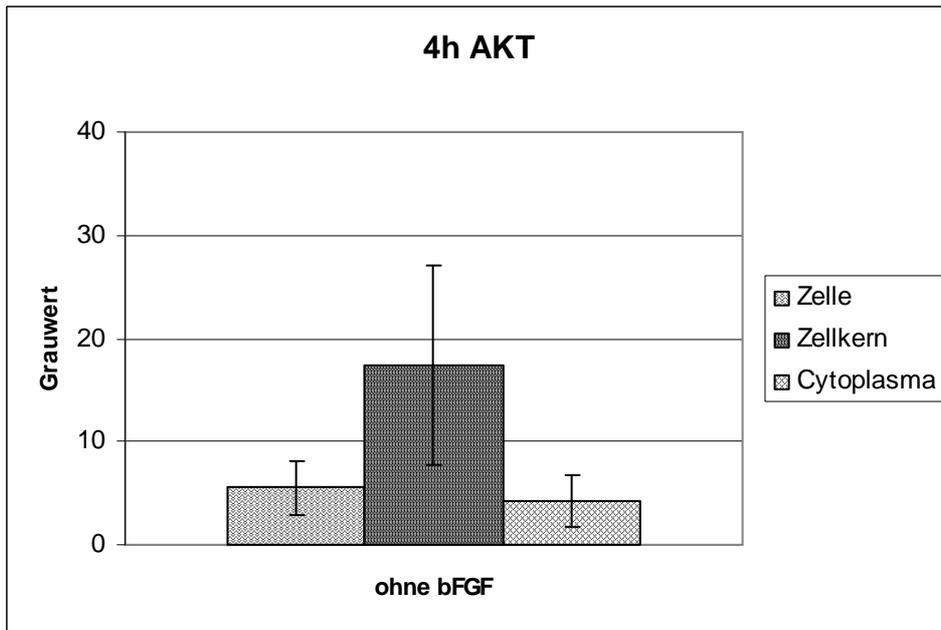
\* = im Vergleich zu „ohne bFGF“ signifikant ( $p < 0,001$ )

**Diagramm 16b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pAKT

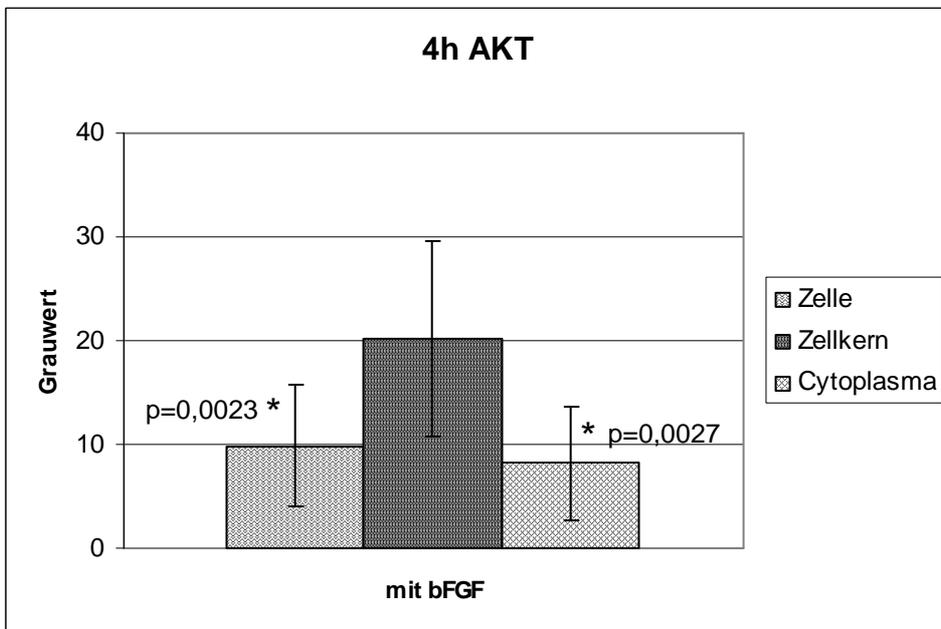


**Diagramm 16c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von pAKT

Die Abbildungen Nr.17 a, b und c zeigen, dass die gesamt-AKT allein in der Zelle insgesamt sowie im Zytoplasma signifikante Anstiege in der Densitometrie aufwies (p-Wert Zelle = 0,0023; p-Wert Zytoplasma = 0,0027). Im Falle des Zellkerns zeigt sich die Zunahme von 17,36 auf 20,25 mit einer Standardabweichung von >9,0 in beiden Fällen als nicht signifikant. Zelle gesamt ohne bFGF =  $5,53 \pm 2,61$ , mit =  $9,85 \pm 5,86$ ; Zytoplasma der Kontrollzellen =  $4,21 \pm 2,55$ , mit dem Wachstumsfaktor =  $8,18 \pm 5,44$ .

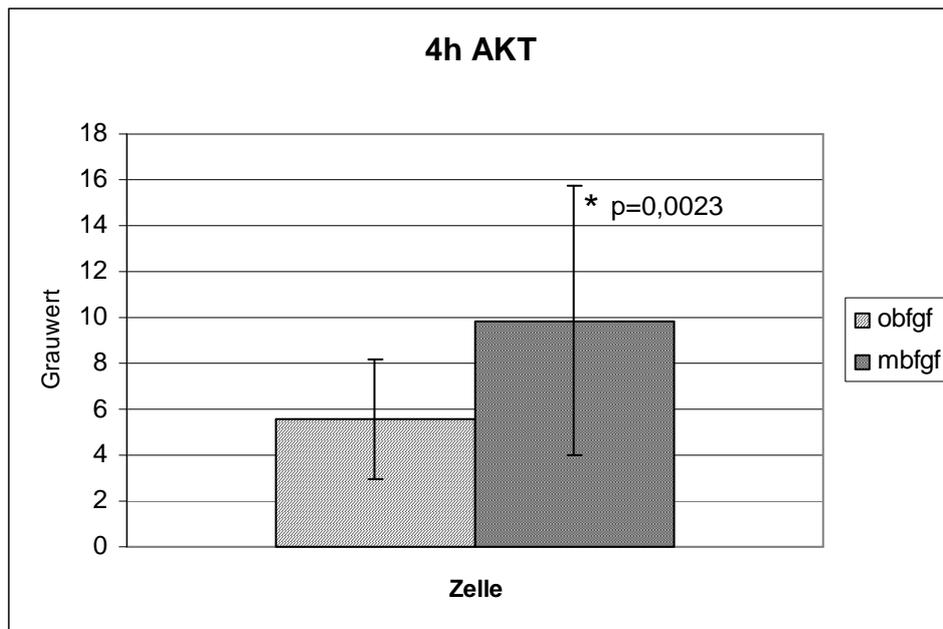


**Diagramm 17a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von AKT



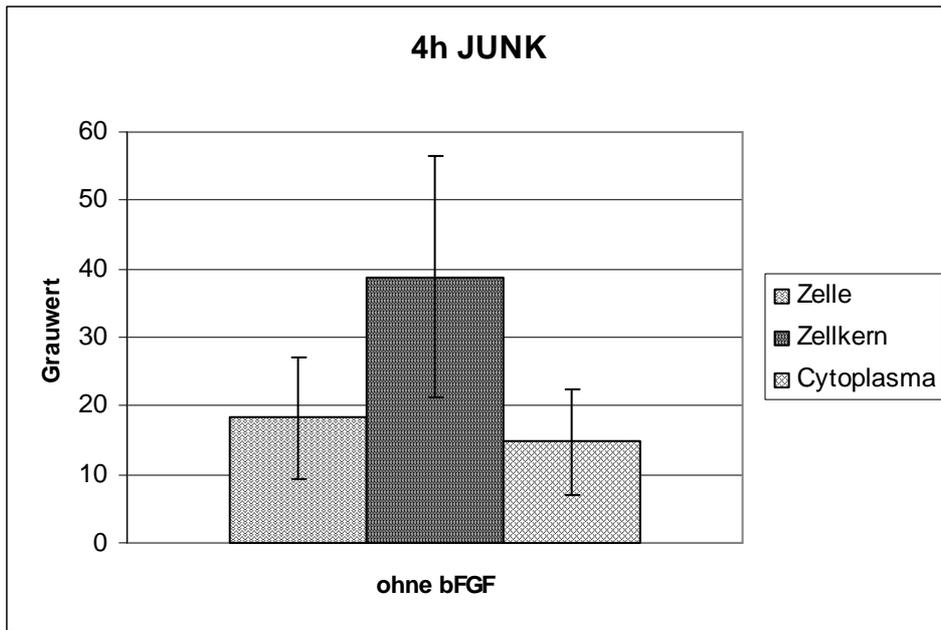
\* = im Vergleich zu „ohne bFGF“ signifikant (p<0,001)

**Diagramm 17b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von AKT

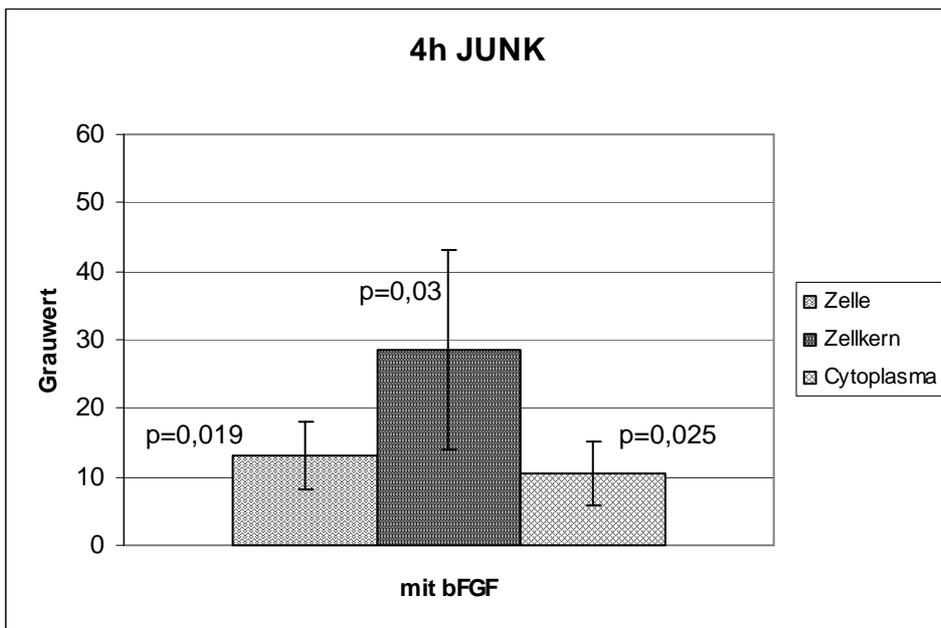


**Diagramm 17c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von AKT

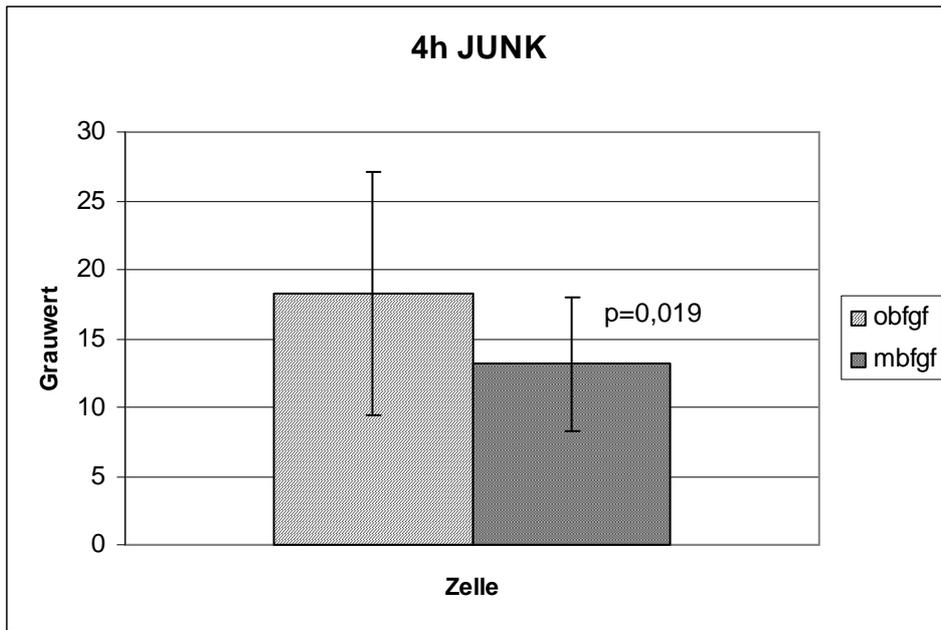
Eine Ausnahme zu der Regel bietet in dieser Versuchsreihe allein die JUNK. Zeigte sie nach einer 48stündigen Inkubation mit bFGF einen eindeutigen Aufwärtstrend in der densitometrischen Messung (siehe Graphik Nr.7a, b und c), fallen ihre Werte, wie in den Diagrammen Nr.18a, b und c dargestellt, nach nur 4stündiger Kontaktzeit mit dem Wachstumsfaktor hingegen in allen drei gemessenen Kompartimenten signifikant ab (p-Wert Zelle = 0,019; p-Wert Zellkern = 0,03; p-Wert Zytoplasma = 0,025). Mit 41% den deutlichsten Abfall wurde im Zytoplasma der Zellen dokumentiert. Hier ergab sich ohne bFGF ein Durchschnittswert von  $14,8 \pm 7,76$ , mit jedoch nur von  $10,5 \pm 4,59$ . Der Intensitätsabfall im Zellkern und in der Zelle als Ganzes war mit ca. 27% ungefähr gleich: Der Zellkern fiel von  $38,87 \pm 17,49$  auf der Grauwertskala um 10 Punkte auf bloß  $28,51 \pm 14,51$  unter Einfluss von bFGF und die Zelle insgesamt kam mit Wachstumsfaktor nur noch auf ein Ergebnis von  $13,17 \pm 4,87$ , wo sie ohne diesen doch  $18,25 \pm 8,9$  gemessen hatte.



**Diagramm 18a:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs ohne bFGF nach Inkubation mit einem Antikörper zur Detektion von JUNK.



**Diagramm 18b:** graphische Darstellung der densitometrischen Messergebnisse verschiedener Kompartimente der MSCs mit bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von JUNK



**Diagramm 18c:** Gegenüberstellung der densitometrischen Messergebnisse in der Zelle als Einheit mit und ohne bFGF, nach Inkubation mit einem Antikörper zum Nachweis von JUNK (p=0,019)

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Auswirkungen der Wachstumsfaktor bFGF auf die intrazelluläre Signaltransduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen hat. Dabei standen insbesondere die Interaktionen des Zytokins mit den bekanntlich in die Abläufe intrazellulärer Signalübertragungen verwickelten MAP-Kinasen p38, JUNK und ERK, den endothelialen NO-Synthasen sowie der AKT im Mittelpunkt unserer Untersuchungen.

Beim Vergleich der densitometrischen Messwerte nach bFGF-Inkubation mit Resultaten der Kontrollgruppe konnten besonders nach dem 4 stündigen bFGF Kontakt signifikante Unterschiede beobachtet werden. Da sich die einzelnen Zellkompartimente zu diesem Zeitpunkt überwiegend in weitaus dunkleren Graustufen präsentierten, welche in geringerer aber meist weiterhin eindeutiger Ausprägung auch nach 48 stündiger Inkubation noch erkennbar war, sahen wir unsere Annahme, dass bFGF auch in hMSCs Einfluss auf intrazelluläre Signalwege nimmt, bestätigt. Im Folgenden sollen die wichtigsten Ergebnisse noch einmal zusammengefasst dargestellt werden.

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach 4 h zeigte die Proteinkinase AKT die eindeutigste Reaktion auf die bFGF-Inkubation mit augenfälligsten Ergebnisse in ihrem phosphorylierten Zustand. Durch eine Grauwertsteigerung von 80% war im Zellkern, dem Zytoplasma und somit in der Zelle insgesamt ein signifikantes Ergebnis nachzuweisen. Nach 48 h hingegen waren bei der pAKT keine signifikanten Graustufenintensivierungen mehr zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt stachen die Messwerte der endothelialen NO-Synthase ins Auge, mit den auffälligsten Ergebnissen bei der am Serin116 phosphorylierten eNOS (Intensitätssteigerungen von über 100% in allen Kompartimenten). Während sich die Messungen der unphosphorylierten AKT von denen der Kontrollgruppe weniger stark unterschieden, ergab die Detektion der eNOS in ihrer inaktiven Form im Zellkern die höchsten Absolutwerte der gesamten Versuchsreihe .

Abweichende Resultate zeigten die MAP-Kinasen. Während die p38-Kinase im Vergleich zu den oben beschriebenen Ergebnissen noch keine Ausnahme darstellte und nach zweitägiger Inkubation hier immerhin eine leichte Steigerung der Graustufe auffiel (von durchschnittlich ca. 18%), war bei der JUNK-Kinase nach 4 Stunden in allen drei Zellkompartimenten, besonders jedoch im Zellkern, ein signifikanter Abfall der densitometrischen Messungen zu verzeichnen. Überraschenderweise war dieser Einbruch nach 48 stündiger Inkubation jedoch nicht länger nachzuweisen, sondern kehrte sich nun in eine Zunahme der Grauwerte, jetzt mit dem höchsten Anstieg von 36% im Zellkern, unter bFGF um. Gegenläufig, jedoch nicht minder ungewöhnlich verhielt sich die aktive wie auch die inaktive ERK-Kinase. Während sie nach 4 Stunden noch mit im Vergleich zur Ausgangssituation fast verdoppelten Messwerten auffielen, war nach 48 stündiger Inkubation ein deutlicher Graustufenabfall, besonders im Zellkern, zu beobachten.

#### **4.2 Interpretation der Ergebnisse**

Da ansteigende Densitometriewerte auf eine erhöhte Antikörperreaktion hinweisen und hier auf diese Weise die Proteinkinasen detektiert wurden, lassen unsere Messergebnisse darauf schließen, dass eine Inkubation mit dem Wachstumsfaktor bFGF zumindest im Falle der AKT (besonders in ihrem phosphorylierten Zustand) sowie der eNOS (vor allem der am Serin 116 phosphorylierten Form), eindeutig zu einer Aktivitätserhöhung dieser Proteinkinasen führt.

Mit der von uns im Falle der AKT gewonnenen Erkenntnis, dass die Aktivität dieser Kinase durch die Gegenwart von bFGF gesteigert wird, verfügen wir nun über einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass der Wachstumsfaktor auf diesem Wege tatsächlich die intrazelluläre Signaltransduktionsabläufe beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bereits 2006 publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe unter der Leitung von Annette Schmidt, die belegen, dass bFGF über den AKT/PKB Signalweg die Migration von MSCs zu steigern vermag. Alle untersuchten Faktoren zeigten bei den MSCs migrationssteigernde Eigenschaften. Der höchste Effekt wurde in der Anwesenheit von bFGF beobachtet [95]. Es ist bekannt, dass die bFGF-induzierte Phosphorylierung von AKT PI3K abhängig ist. Diese Daten zeigen die Wichtigkeit des PI3K/AKT-Signalwegs für die bFGF-induzierte Migration auf. Des weiteren wurden diese Ergebnisse von der Entdeckung gestützt, dass die Menge der

phosphorylierten AKT in der Gegenwart von bFGF signifikant anstieg ( $p < 0,001$ ). Daraus schließen wir, dass die bFGF-induzierte Migration durch diesen FGF-Rezeptor-Signalweg gesteuert wird [95]. Auch die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche zur Zellausrichtung, welche eine wichtige Voraussetzung für die Zellmigration darstellt, demonstrierten eine offensichtliche Einflussnahme des Wachstumsfaktors auf diesen Vorgang. In der Gegenwart eines bFGF-Gradienten waren die meisten Aktinfilamente parallel orientiert. Ohne bFGF zeigten nur 59% der Zellen eine Ausrichtung, mit einem bFGF-Gradienten präsentierten 96% einen ausgerichteten Phänotyp ( $p < 0,001$ ) [95].

Die Proteinkinase spielt jedoch nicht allein bei der Fortbewegung der Zelle eine Rolle. In ausdifferenzierten Zellen sind bereits zahlreiche regulative Aufgaben, welche von der AKT auf zellulärer Ebene übernommen werden, bekannt. Neben dem Migrationsvorgang ist die AKT ebenfalls bei der Zellproliferation, der Apoptose und der Zellinvasion, sowie laut der Bostoner Arbeitsgruppe um BD Manning auch bei der Angiogenese, dem Wachstum und dem Metabolismus der Zelle involviert [75]. Neuere Erkenntnisse amerikanischer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass sich diese vielfältigen Funktionen verschiedenen Subtypen der AKT zuordnen lassen, die interessanter Weise unter Umständen sogar antagonistische Einflüsse ausüben können. Im Falle der Migration zum Beispiel, machten 2005 die Forscher um H.Y. Irie bei der Untersuchung von Signaltransduktionsabläufen in Brustepithelzellen die Beobachtung, dass die Herabregulation von AKT1 mit einer verstärkten Aktivierung der ERK-Kinase einhergeht, welche wiederum zu einer Migrationsinduktion führt. Interessanter Weise unterdrückt die Verringerung der AKT2 die Migration in EGF-stimulierten Zellen [43]. Auch M.Yoeli-Lerner und Mitarbeiter, deren Forschungen sich vor allem mit der Migration von Karzinomzellen befasste publizierten 2006 Ergebnisse, die belegen, dass AKT1 unerwarteter Weise ein Migrations- und Invasions-suppressor ist, während AKT2 diese Eigenschaften fördert [117]. Allerdings machte die Arbeitsgruppe von Guo-Lei Zhou im Rahmen Ihrer Forschung mit embryonalen Mausfibroblasten ebenfalls 2006 darauf aufmerksam, dass AKT1 hingegen in Fibroblasten wiederholt als Invasionspromotor beobachtet wurde [34,119,1] und im Gegensatz zu AKT2 über den NO-Signalweg auch wichtig für die endotheliale Zellmigration sei [1]. Zusammengefasst lässt sich somit sagen, dass während AKT2 die Mobilität in Epithelzellen fördert, AKT1 diese Aufgabe in Fibroblasten und Endothelzellen übernimmt. Bemerkenswert dabei ist, dass in Zellen,

in denen eine Isoform aktivierend wirkt, die andere diese Wirkung antagonisiert [120]. Ob sich diese Resultate im einzelnen auch auf Stammzellen übertragen lassen, und sich somit durch bFGF verschiedene Aspekte des Zellmetabolismus steuern ließen, bedarf weiteren Untersuchungen.

In der eNOS-Versuchsreihe lassen unsere Resultate ebenfalls auf eine erhöhte Aktivierung der Proteinkinase unter bFGF-Einfluss schließen. Dass Stickstoffmonoxid ebenso wie AKT eine wichtige Rolle in der Proliferation, der Apoptose sowie der Migration ausdifferenzierter menschlicher Zellen zukommt wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen in verschiedenen Zusammenhängen mit zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen beschrieben [17,18,19,67,82,29,121,122]. So beobachteten Murohara und Mitarbeiter in vitro unter Blockade der endothelialen NO-Synthase durch den NO-Inhibitor L-NAME einen Rückgang der Zellmigration, jedoch nicht der Proliferation von Endothelzellen, welche sie zur Erforschung der genauen Angiogenesemechanismen untersuchten [81]. Während die Arbeitsgruppen um Y.T. Lau und K.J. Gooch unabhängig voneinander zu dem Schluss kamen, dass exogenes NO die Migration von Endothelzellen zu hemmen scheint [67,29], folgert die italienische Forschergruppe von M. Ziche aus ihren Ergebnissen 1997, dass NO die Zellmigration von koronarvenösen Endothelzellen durch endogene bFGF-Induktion fördert [122]. Uns gelang es nun ebenfalls zu zeigen, dass in humanen adulten Stammzellen bFGF die Existenz zumindest einer der NO-produzierenden Kinasen, nämlich der endothelialen, fördert und somit auch auf diesem Wege in die Signaltransduktion dieser Zellen involviert zu sein scheint.

Diese Annahme setzt natürlich voraus, dass NO auf gleiche Weise wie bei den differenzierten Zellen auch in die Informationswege der Stammzellen verwickelt ist. In diesem Zusammenhang scheint es mir interessant zu erwähnen, dass die Forschergruppe um F.-J. Klinz bereits die Proliferation eben dieser Zellpopulation im Hinblick auf die endotheliale NO-Synthase untersuchte. 2006 publizierte diese Arbeitsgruppe erste Daten die belegen, dass proliferierende MSCs sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma verschiedene phosphorylierte Formen dieses Enzyms vermehrt exprimieren [58]. Anders als wir, setzten sie jedoch hierfür keinen Stimulus in Form eines Wachstumsfaktors o. ä. ein. Durch die Entdeckung, dass sowohl die Akkumulation von peNOS<sup>Ser116</sup> im Nukleus als auch der peNOS<sup>Ser1177</sup> im Zytosol von proliferierenden MSCs konstitutive Ereignisse sind, die ohne einen

akuten Stimulus eintreten, kamen sie zu dem Schluss, dass MSCs im Unterschied zu den meisten anderen Zellsystemen eNOS ohne besondere externe Induktion im Nukleus akkumulieren, wo sie gerade kurz vor der Mitose ein besonders hohes Vorkommen der peNOS<sup>Ser 116</sup> messen konnten. Es zeigte sich, dass pENOS<sup>Ser116</sup> in 96,3% der untersuchten Nuklei angereichert war [58]. Dieses Ergebnis wurde von der Arbeitsgruppe sowohl durch Immunfluorescence-Mikroskopie als auch durch Western-Blot-Analyse als einer unabhängigen Methode verifiziert. Interessanter Weise konnten wir in unseren Versuchen die nach 4 stündiger bFGF-Inkubation signifikant erhöhten Densitometriewerte im Falle der peNOS<sup>Ser116</sup>, aber auch der peNOS<sup>Ser1177</sup> anders als bei den übrigen Kinasen ebenfalls im Zellkern anstatt im Zytoplasma nachweisen. Rein spekulativ könnte man nun vermuten, dass die unter bFGF-Einfluss beobachtete Anreicherung der phosphorylierten eNOS im Zellkern z. B. über eine proliferationsfördernde Transkriptionssteigerung in mesenchymalen Stammzellen ebenso wie in ausdifferenzierten Zellen zu einer erhöhten Zellvermehrung beiträgt.

Im Anbetracht der Tatsache, dass AKT durch die Übertragung eines Phosphatrestes die endotheliale NO-Synthase aktiviert [26], lässt sich durch unsere Ergebnisse nun auch eine andere Überlegung anstellen. Könnte es zu dem erhöhten Nachweis der phosphorylierten eNOS nicht vielleicht allein durch den bFGF geförderte AKT-Anstieg kommen? Zumindest bezüglich der peNOS<sup>Ser1177</sup> scheint diese Erklärung durchaus plausibel. Die Phosphorylierung von eNOS am Serin1177 ist von AKT oder der Proteinkinase A stimuliert und resultiert in einer erhöhten Enzymaktivität, welche wiederum zu einer gesteigerten NO-Produktion führt [18]. Zur eindeutigen Beantwortung dieser Frage wären allerdings weitere Untersuchungen nötig, da sich aus unseren Resultaten die exakte Einflussnahme von bFGF leider nicht ableiten lässt.

Dass Signalprozesse mitunter transienter Steuerung unterliegen beschrieben die deutschen Forscher A. Deutsch, M. Falcke, J. Howard und W. Zimmermann 2004 in der Einführung zu dem die intrazelluläre Signaltransduktion betreffenden Teil 2 ihres Buches „Functions and Regulations of cellular Systems“. Die Autoren geben in ihrem Text zu bedenken, dass für diese Zeitabhängigkeit mancher Informationswege mehrere Faktoren wie z. B. die Geschwindigkeit der Signalweiterleitung und der daraus resultierenden Dauer, genauso wie die Amplitude der Signalverstärkung

verantwortlich sind, welche im Einzelnen z. Zt. noch genauer untersucht werden.[15] Die Resultate unserer Versuche bezüglich des bFGF-Einfluss auf die MAP-Kinasen lassen eine solch transiente Regulation dieses Signalweges vermuten. Der sich in unserer Arbeit zeigende, die ERK-Kinase betreffende, signifikante Aktivitätsanstieg nach 4 stündiger bFGF-Inkubation gefolgt von dem verringerten Phosphorylierungsnachweis nach 48 Stunden spricht genauso wie der niedrige Nachweis der Gesamt- JUNK nach 4h gefolgt von einer enormen Steigerung dieser Kinase nach 48h bFGF-Inkubationszeit für diese Annahme.

Neben der Migrationsinduktion, auf die ich unten näher eingehen werde, wurde die ERK auch bezüglich ihres Einflusses auf den zellulären Proliferations- und Differenzierungsvorgang untersucht. Die Forschergruppe um Rama und Neelam Jaiswal machten bereits 2000 die interessante Entdeckung, dass diese, sich eigentlich gegenseitig ausschließenden bzw. antagonistischen Prozesse der Proliferation und Differenzierung bei humanen mesenchymalen Stammzellen beiden über den ERK-Signalweg reguliert zu werden scheinen [46]. Interessanter Weise käme hier der oben beschriebenen transienten Steuerung eine entscheidende Rolle zu. Laut Jaiswals Untersuchungen gibt es Grund zu der Annahme, dass zur Zelldifferenzierung eine gleich bleibende Aktivierung der ERK benötigt wird, während eine transiente Aktivität der extrazellulär-regulierten Kinase in eine Zellvermehrung resultiert. [46] Dabei wurde ihren Angaben zur Folge über eine gesteigerte AP-Aktivität und nachweislich erhöhte Calciumeinlagerungen unter ERK-Einfluss speziell die osteogene Differenzierung gefördert. Die Forscher gehen sogar soweit zu postulieren, dass ERK eine wegweisende Schlüsselrolle bei der Entscheidung zwischen der adipogenen versus der osteogenen Weiterentwicklung der Zelle zukommt, womit sie ihrer Ansicht nach maßgebend an dem Verständnis der Osteoporose-Entstehung beteiligt sein könnte [46]. Diese Resultate stehen im Einklang mit einer 2006 publizierten Studie von Forschern um Kim und Choi aus Korea. Die Wissenschaftler untersuchten mesenchymale Stammzellen in einem 3D-Kultur-System. Ziel der Untersuchungen war die Identifizierung der zuständigen Signaltransduktionswege für die unter hydrostatischem Druck und Scherkräften beobachtbaren zellulären Veränderungen im Sinne einer osteogenen Differenzierung. Unter mechanischer Stimulation konnte eine Aktivierung der ERK1 und 2 nachgewiesen werden, was die Forscher ebenfalls zu der Annahme veranlasste, dass die osteogene Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen bei

adäquatem mechanischer Reizung durch den ERK-Signalweg gesteuert werden könnte [55]. Zeitlich betrachtet allerdings wurde bei diesen Versuchen anders als bei uns eine gleich bleibende, bzw. mit der Zeit zunehmende ERK-Aktivität dokumentiert.

Ungeachtet der fraglichen Transienz dieses Signalprozesses stützt der nach 4h signifikant erhöhte Nachweis der phosphorylierten ERK die These, dass die bereits bewiesene migrationssteigernde Wirkung von bFGF über diesen Signalweg erreicht werden könnte insofern, als dass Hinweise auf die Wichtigkeit der ERK im Hinblick auf die Zellmigration in verschiedenen adulten Zelltypen schon von mehreren Arbeitsgruppen durch Inhibitionsversuche, die z. T. zu einem Stillstand oder zumindest zu einer Verlangsamung der Zellmobilität führten, gesammelt wurden [2,56,101,63].

Andererseits erscheint die dokumentierte Verminderung der aktivierten ERK-Kinase einleuchtend wenn man die These favorisiert, dass der entscheidende Migrationsstimulus im Falle der humanen mesenchymalen Stammzellen über den eNOS- bzw. den AKT/PI3K-Signalweg gesteuert wird. Fleming und Kollegen haben 2001 erstmals die hemmenden Eigenschaften, welche die extrazellulär regulierte Kinase auf die endotheliale NO-Synthase verübt, beschrieben [21].

Unsere, die Gesamt-JUNK-Kinase betreffende Messwerte nach 48 h bFGF Kontakt deuten zu diesem Zeitpunkt auf ein erhöhtes Vorkommen dieser Kinase hin. Beteiligung der JUNK ist für die Entzündungsreaktion, die Apoptoseinduktion, die Differenzierung und Insulinresistenz bekannt [5,42]. Darüber hinaus gibt es aber auch Beweise die ihr eine regulative Aufgabe in der Zellmigration bestätigen [39,40,114]. So konnte z. B. in ausdifferenzierten Zellen eine mit JUNK-Aktivität assoziierte und wachstumsfaktorinduzierte, steigende Mobilität beobachtet werde, die nach JUNK-Inhibition signifikant rückläufig war [30,39,47,100]. Darüber hinaus sind einige Signalmoleküle die entweder mit zu der Phosphorylierung der JUNK beitragen oder zu ihren Substraten zählen und somit fester Bestandteil dieses Signaltransduktionsweges sind, bekanntermaßen ebenfalls in die Zellmigration involviert [39]. Obwohl mittlerweile Studien darauf hinweisen, dass JUNK-Aktivität in manchen Zelltypen auch im Zytoplasma beobachtet werden kann [106,14], so sind unsere Ergebnisse, welche auf eine, bFGF-induzierte besondere Steigerung der JUNK-Gehalts im Nukleus deuteten, leicht mit bereits existierenden Publikationen in Einklang zu bringen. Diese belegen nämlich, dass JUNK nach ihrer Aktivierung in

den Zellkern eintritt, um dort durch Phosphorylierung wesentlicher Faktoren die Transkription zu steigern [79]. Betrachtet man nun alle beschriebenen Eigenschaften der JUNK im Zusammenhang, so ist es durchaus wahrscheinlich, dass der als stressragibel bekannte MAP-Kinase JUNK auch bei mesenchymalen Stammzellen eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion zukommt, auch wenn zur genaueren Spezifizierung ihrer Aufgaben noch weitere Studien von Nöten sind.

Unsere niedrigen Messergebnisse nach einer nur 4 stündigen Wachstumsfaktorinkubation lassen auch bei dieser Kinase eine mögliche transiente Steuerung vermuten, wobei ein Messfehler unsererseits natürlich nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Die p38, welche wir in unserer Arbeit ausschließlich nach 48 stündiger bFGF-Inkubation detektierten zeigte zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Densitometrieanstieg um ca. 20% in allen gemessenen Zellkompartimenten. Hieraus lässt sich wiederum der Schluss einer tendenziellen Aktivitätszunahme ziehen. Neben ihrem Einfluss auf die Apoptose, die Entzündungsreaktion, Induktion einer Zellhypertrophie sowie der Zelldifferenzierung, welche nach Stimulation durch bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren (u. a. auch FGF) bereits 2000 von Ono und Han beschrieben wurde [83], deuten mittlerweile einige Studien auch auf eine Beteiligung von der Kinase p38 bei der Zellmigration hin [33,75,44,98]. In diesen Arbeiten wurde die Motilität ganz verschiedener, sowohl humaner als auch tierischer Zellreihen nach Induktionen mittels unterschiedlicher Zytokine untersucht. Menschliche mesenchymale Stammzellen waren bislang in diesem Zusammenhang jedoch noch kein Forschungsgegenstand. Unsere Ergebnisse lassen im Kontext mit den bereits bestehenden Studien vermuten, dass in hMSCs durch bFGF-Induktion die MAPK p38 einen noch näher zu definierenden Signaltransduktionsweg initiiert, welcher letztendlich in eine Steigerung der Migrationsbereitschaft resultiert. Im Falle von smooth muscle- und Endothelzellen fanden Hedges und Kollegen Hinweise auf eine wesentliche Beteiligung der MAPKAPK 2/3, welche durch p38 aktiviert wird um ihrerseits wiederum das Hitzeschockprotein 27 zu phosphorylieren. Die Forschungsgruppe konnte beobachten, dass sich Zellen, in denen das HSP 27 aus Mangel an aktivierter MAPKAPK 2/3 unphosphoryliert blieb, zwar schneller, jedoch ungerichtet fortbewegten [33]. Dies könnte darauf hin deuten, dass p38 indirekt auch auf die Richtung der Migration Auswirkung hat, was wiederum, falls sich diese

Beobachtung auch bei hMSCs machen ließe, interessante Ansatzpunkte für weitere Forschungen in der therapeutischen Migrationsinduktion liefern würde.

### **4.3 Ausblick**

Insgesamt betrachtet postulieren wir anhand unserer Ergebnisse nicht nur, dass der Wachstumsfaktor bFGF eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion adulter mesenchymaler Stammzellen übernimmt, sondern wagen die spezifischere Hypothese, dass er sich in Bezug auf die von uns untersuchten Proteinkinasen insbesondere auf die AKT und eNOS aktivierend auswirkt. Dass bFGF mesenchymale Stammzellmigration begünstigt, wurde bereits beschrieben [65]. Unsere Ergebnisse deuten nun darauf hin, dass diese Begünstigung möglicherweise durch eine oder einem Zusammenspiel mehrerer Proteinkinasen vermittelt wird. Zur Ergründung des genauen Ablaufes dieses anzunehmenden Synergismus sind jedoch noch viele intensivere Untersuchungen notwendig. Zum einen wäre es interessant zu wissen, ob, wenn eine 4 stündige bFGF-Inkubation schon zu signifikanten Ergebnissen führt, nach einer kürzeren Inkubationszeit vielleicht auch schon intrazellulären Veränderungen zu erkennen wären. Zum anderen ließe sich, wie für die AKT-Kinase von unserer Arbeitsgruppe schon durchgeführt [95], durch gezielte Inhibition einzelner Proteinkinasen und anschließender Durchführung eines Migrations-Assays vielleicht Aufschluss über den, für diesen Vorgang entscheidende Signaltransduktionsweg gewinnen. Neben der Zellmigration wären auch Untersuchungen bezüglich weiteren, den Lebenszyklus bestimmenden Signaltransduktionswege von Bedeutung für den effizienteren therapeutischen Einsatz von Stammzellen. So zum Beispiel im Hinblick auf die Proliferation. Die von uns beschriebene bFGF-stimulierte eNOS-Aktivierung im Zusammenhang mit der von Klinz und Mitarbeitern angenommenen proliferationsfördernden Wirkung dieser Kinase deutet auf einen Wachstumsfaktoreinfluss auch diesen Prozess betreffend hin. Ließe sich, wie anhand dieser Arbeit wahrscheinlich erscheinend, bFGF als Stimulans für Proliferation und Migration, gezielt einsetzen, so ergäben sich in der Behandlung chronischer und akuter Erkrankungen spezifischere Therapieoptionen. Ferner trüge das exakte Wissen um extrazelluläre Stimuli und ihren Einfluss auf intrazelluläre Abläufe, in deren Erforschung diese Arbeit einen Beitrag leisten will,

auch durch die mögliche Vermeidung unerwünschter Nebeneffekte der MSCs zum Wohle der Patienten bei.

## 5. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren stehen adulte mesenchymale Stammzellen im Mittelpunkt des internationalen Interesses von Forschern und Patienten, deren Hoffnungen sich auf die zahlreichen potentiellen Therapieoptionen richten, die mit dieser, während des gesamten Lebens präsenten, pluripotenten Zellart verbunden sind. Da das bessere Verständnis von Proliferation, Differenzierung und Migration dieser Zellen zu der Entwicklung effektiverer Kulturbedingungen und gezielterem Einsatz von MSCs führen würde, stehen mögliche, diese Vorgänge beeinflussende Faktoren, im Mittelpunkt intensiver Forschung.

Im Fokus dieser Arbeit stand speziell der Einfluss des Wachstumsfaktors bFGF auf die Signaltransduktion bei MSCs, wobei wir besonderes Augenmerk auf die Interaktionen zwischen diesem Zytokin und der Proteinkinase AKT, den endothelialen NO-Synthasen, sowie den MAP-Kinasen p38, JUNK und ERK richteten. Untersucht wurden adulte Stammzellen des Knochenmarkes von insgesamt 3 Patienten, welche nach entsprechender Aufbereitung, 4 bzw. 48 h mit bFGF inkubiert und einer Kontrollgruppe ohne Zusatz des Wachstumsfaktors gegenübergestellt wurden. Nach der sich anschließenden immunhistochemischen Behandlung der Zellen mit Antikörpern zur Detektion der o. g. Proteinkinasen in jeweils phosphorylierter und unphosphorylierter Form, erfolgte die Intensitätsbestimmung dieser Markierung durch densitometrische Messung der Grauwerte unterschiedlicher Zellabschnitte. Pro Antikörper und Patient wurden 50 Zellen analysiert (25 mit und 25 ohne bFGF).

Nach 4 h bFGF-Inkubation ergaben die Messungen fast aller Proteinkinasen eine signifikante Grauwertsteigerung. Die phosphorylierte AKT-Kinase, welche zu beiden Messzeitpunkten klare Intensitätssteigerungen zeigte, präsentierte die eindeutigste Reaktion, mit einer Farbintensitätszunahme von etwa 80%, bereits nach 4 h. Auch nach 48 h deutete die Densitometrie überwiegend auf eine erhöhte Aktivierung dieser Kinasen hin (den höchsten Wertanstieg mit über 100% verzeichnete hier die pENOS<sup>Ser116</sup>), als statistisch signifikant konnten diese Messwerterhöhungen allerdings nicht gelten. Im Falle der MAP-Kinasen JUNK, ERK und pERK deutet der nach 4 bzw. nach 48 h dokumentierte Abfall der densitometrischen Messergebnisse auf eine transiente Steuerung dieses Signalweges hin.

Insgesamt lassen unsere Resultate auf eine wesentliche Involvierung des Wachstumsfaktors bFGF in die Signaltransduktion adulter MSCs schließen. Insbesondere auf die u. a. an Zellmigration und –proliferation beteiligten Kinasen AKT und eNOS scheint sich bFGF nach unseren Beobachtungen aktivierend auszuwirken, womit ein kleiner Beitrag in der Erforschung des Einflusses extrazellulärer Stimuli auf intrazelluläre Abläufe in MSCs geleistet wurde, was Ziel dieser Arbeit war.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Ackah E**, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouch N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, Sessa WC (2005) „AKT1/protein kinase B alpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis”  
J Clin Investig 115, 2119-2127
2. **Anand-Apte B**, Zetter BR, Viswanathan A, Qiu RG, Chen J, Ruggieri R, Symons M (1997) „Platelet-derived growth factor and fibronectin stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathway”  
J Biol Chem 272, 30688-30692
3. **Aoki J**, Serruys PW, van Beusekorn H, Ong AT, Mc Fadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, Regar E, De Feyter PJ, Davis HR, Rowland S, Kutryk MJ (2005) „Endothelial progenitor cells capture by stents coated with antibody against CD34: The HEALING-FIM ( Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry“.  
J Am Coll Cardiol 45, 1574-1579
4. **Barbash IM**, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RH, Leor J (2003) „Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration and antibody distribution.“  
Circulation 108, 863-868
5. **Barr RK**, Bogoyevitch MA (2001) „The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs)”.  
Int J Biochem Cell Biol 33, 1047-1063
6. **Bellacosa A**, Testa JR, Staal SP, Tschlis PN (1991) „A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region”.  
Science 254, 274-277
7. **Bogoyevitch MA**, Barr RK (2001) „The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs)”.  
Int J Biochem Cell Biol 33, 1047-1063
8. **Caplan AI** (2007) „ Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine”. J Cell Physiol 213, 341-347
9. **Chang LF**, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LSB, Karin M (2003) „JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins”. Dev Cell 4, 521-533
10. **Chapel A**, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D (2003) „Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome”.  
J Gene Med 5, 1028-38

11. **Chen SL**, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Suss JP (2004) „Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction”. *Am J Cardiol* 94, 92-95
12. **Chen SL**, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M (2001) „Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats”. *Stroke* 32, 1005-1011
13. **Coffer PJ**, Woodgett JR (1991) „Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families”. *Eur J Biochem* 201, 475-481
14. **Coffey ET**, Hongisto V, Dickens M, Davis RJ, Courtney MJ (2000) „Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule neurones”. *J Neurosci* 20, 7602-7613
15. **Deutsch A**, Howard J, Falcke M, Zimmermann W (2004) „Function and regulation of cellular systems” S.62 Birkhäuser Verlag ISBN 3-7643-6925-6
16. **Di Nicola M**, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002) „Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific stimuli”. *Blood* 99, 3838-3843
17. **Dimmeler S**, Haendler J, Nehls M, Zeiher AM (1997) „Nitric oxide- an endothelial cell survival factor”. *Cell Death Differ* 6, 964-968
18. **Dimmeler S**, Dernbach E, Zeiher AM (2000) „Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration”. *FEBS Lett* 477, 258-262
19. **Dimmeler S**, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) „Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by AKT-dependent phosphorylation”. *Nature* 399, 601-605
20. **Eswarakumar VP**, Lax I, Schlessinger J (2005) „Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors”. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149
21. **Fleming I**, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R (2001) „Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity”. *Circ Res* 88, E68-75
22. **Fouillard L**, Bensidhoun M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC (2003) „Engraftment of allogenic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anaemia improves stroma”. *Leukemia* 17, 474-476

23. **Friedenstein AJ**, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987) „Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in different chambers“. *Cell Tissue Kinet*, 20, 263-272
24. **Friedenstein AJ**, Piatetzky S 2<sup>nd</sup>, Petrakova KV (1966) „Osteogenesis in transplants of bone marrow cells“. *Embryol Exp Morphol* 16, 381-390
25. **Fukurama DT**, Gohongi A, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Burek DG, Huang PL, Jain RK (2001) „Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability“. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2604-2609
26. **Fulton D, Gratton JP**, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) „Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt“. *Nature* 399, 597-601
27. **Furchgott RF**, Vanhoutte PM (1989) „Endothelium-derived relaxing and contracting factors“ *FASEB J* 3, 2007-2018
28. **Gang EJ**, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC (2007) „SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow“. *Blood* 109, 1743-1751
29. **Gooch KJ**, Dangler CA, Frangos JA (1997) „Exogenous, basal and flow induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation“. *J Cell Physiol* 171, 252-258
30. **Hauck CR**, Sieg DJ, Hsia DA, Loftus JC, Gaarde WA, Monia BP, Schlaepfer DD (2001) „Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signalin promoting the migration of invasive human carcinoma cells“. *Cancer Res* 61,7079-7090
31. **Hauger O**, Frost EE, van Heerswijk R, Deminiere C, Xue R, Delmas Y, Combe C, Moonen CT, Grenier N, Bulte JW (2006) „MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy“. *Radiology* 238, 200-210
32. **He P**, Liu B, Curry F (1997) „Effect of nitric oxide synthase inhibitors on endothelial Ca<sup>2+</sup>i and microvessel permeability“. *Am J Physiol* 272, H176-185
33. **Hedges JC**, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA, Gerthoffer WT (1999) „A role for p38 (MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration“. *J Biol Chem* 274, 24211-24219
34. **Higuchi M**, Masuyama N, Fukui Y, Suzuki A, Gotoh Y (2001) „Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells“. *Curr Biol* 11,1958-62.

35. **Honczarenko M**, Le Y, Swierkovski M, Ghiran I, Glodeck AM, Silberstein LE (2006) „Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors“. *Stem Cells* 24, 1030-1041
36. **Horwitz EM**, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussmann M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK (1999) „Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta“. *Nature Medicine* 5, 309-313
37. **Horwitz EM**, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarvell ME, Orchard P, Pyeritz RE, Brenner MK (2001) „Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta“. *Blood* 97, 1227-1231
38. **Horwitz EM**, Gordon PL, Koo WW, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T (2002) „Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implication for cell therapy of bone“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 8932-8937
39. **Huang C**, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K (2003) „JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration“. *Nature* 242, 219-242
40. **Huang C**, Jacobson K, Schaller MD (2004) „MAP kinases and cell migration“ *Journal of Cell Science* 117, 4619-4628
41. **Ignarro LJ**, Cirino G, Casini A, Napoli C (1999) „Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview“. *J Cardiovasc Pharmacol* 34, 879-886
42. **Ip YT**, Davis RJ (1998) „Signal transduction by the c-Jun-N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development“. *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-219
43. **Irie HY**, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Bruegge JS (2005) „Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition“. *J Cell Biol* 171, 1023-1034
44. **Ishizuka T**, Okajima F, Ishiwara M, Iizuka K, Ichimonji I, Kawata T, Tsukagoshi H, Dobashi K, Nakazawa T, Mori M (2001) „Sensitized mast cells migrate towards the antigen: a response regulated by the p38 mitogen-activated protein kinase and Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase“. *J Immunol* 167, 2298-2304
45. **Jackson KA**, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001) „Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells“. *J Clin Invest* 107, 1395-1402

46. **Jaiswal RK**, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak D, Pittinger MF (2000) „Adult human mesenchymal stem cells Differentiation to osteogenic or Adipogenic Lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase” J of Bio Chem 275, 9645-9652
47. **Javelaud D**, Laboureau J, Gabison E, Verrecchia F, Mauviel A (2003) „Disruption of basal JNK activity differentially affects key fibroblast functions important for wound healing”. J Biol Chem 278, 24624-24628
48. **Ji JF**, He BP, Dheen ST, Tay SS (2004) „Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury”. Stem Cells 22, 415-427
49. **Johnson GL**, Lapdat R (2002) „Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK JNK, and p38 protein kinases“. Science 298, 1911-1912
50. **Jones PF**, Jakubowicz T, Hemmings BA (1991) „Molecular cloning of a second form of rac protein kinase“. Cell Regul 2, 1001-1009
51. **Jori FP**, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, Peluso G, Giordano A, Galderisi U (2005) „Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells“. J Cell Biochem 94, 645-655
52. **Katrisis DG**, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Voriadis EM, Papamichail M (2005) „Transcoronar transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium“. Catheter Cardiovasc Interv 65. 321-329
53. **Kawasaki K**, Smith RS Jr., Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK (2003) „Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis“. Mol Cell Biol 23, 5726-5737
54. **Keyser KA**, Beagles KE, Kiem HP (2007) „Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation“. Cell Transplant 16, 555-562
55. **Kim SH**, Choi YR, Park MS, Shin JW, Park KD, Kim SJ, Lee JW (2006) „ERK1/2 activation in enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells in poly(lactic-glycolic acid) by cyclic hydrostatic pressure”. Journal of Biomedical Materials Research Part A
56. **Kinnaird T**, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE (2004) „Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine Mechanisms“. Circulation 109, 1543-1549
57. **Klemke RL**, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, deLanerolle P, Cheresch DA (1997) „Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase“. J Cell Biol 137, 481-492

58. **Klinz FJ**, Schmidt A, Schinköthe T, Arnold S, Desai B, Popken F, Brixius K, Schwinger R, Mehlhorn U, Staib P, Addicks K, Bloch W (2005) „Phospho-eNOS<sup>Ser114</sup> in human mesenchymal stem cells: Constitutive phosphorylation, nuclear localization and upregulation during mitosis“. *Europ J Cell Biol* 84, 809-818
59. **Koc ON**, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM (2000) „Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy“. *Clin Oncol* 18, 307-316
60. **Koc ON**, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002) „Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurlersyndrome (MPS-IH)“. *Bone Marrow Transplant* 30, 215-222
61. **Kopen GC**, Prockop DJ, Phinney DG (1999) „Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains“. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 96, 10711-10716
62. **Krampera M**, Glennie S, Dyson J, Scott D, Layor R, Simpson E, Dazzi F (2003) „Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T-cells to their cognate peptide“. *Blood* 101, 3722-3729
63. **Krueger JS**, Keshamouni VG, Atanaskova N Reddy KB (2001) „Temporal and quantitative regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) modulates cell mobility and invasion“. *Oncogene* 20, 4209-4218
64. **Kuwabara K**, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, Lyn P, Leavy J, Witte L, Joseph-Silverstein J (1995) „Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells“. *Proc Natl Acad Sci USA* 92,4606.4610
65. **Ladage D**, Brixius K, Steingen C, Mehlhorn U, Schwinger R, Bloch W, Schmidt A (2007) „Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms“. *Endothelium* 14, 53-63
66. **Laham RJ**, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL, Gold JP, Simons M (1999) „Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, doubleblind, placebo-controlled trial“. *Circulation* 100 1865-1871
67. **Lau YT**, Ma WC (1996) „Nitric oxide inhibits migration of cultured endothelial cells“. *Biochem Biophys Commun* 22, 670-674

68. **Lazarus HM**, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, Mc Carthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR Jr., Moseley AB, Bacigalupo A (2000) „Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematopoietic malignancy patients“ *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 557-564
69. **Le Blanc K**, Pittinger M (2005) „ Mesenchymal stem cells: progress towards promise“. *Cytotherapy* 7, 36-45
70. **Le Blanc K**, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O (2004) „ Treatment of severe acute graft-versus-host-disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells“. *Lancet* 363, 1439-1441
71. **Lee RH**, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS (2004) „Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue“. *Cellular Physiology and Biochemistry* 14, 311-324
72. **Maitra B**, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koc ON (2004) „Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation“. *Bone Marrow Transplant* 33, 597-604
73. **Majumdar MK**, Keane-Moore M, Buyasser D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD (2003) „Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells“. *Journal of Biomedical sciences* 10, 228-241
74. **Makino S**, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takabashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (1999) „Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal stem cells in vitro“. *Journal of clinical investigation* 103, 697-705
75. **Manning BD**, Cantley LC (2007) „AKT/PKB signaling: navigating downstream“. *Cell* 129, 1261-1274
76. **Matsumoto T**, Yokote K, Tamura K, Takemoto M, Ueno S, Saito Y, Mori S (1999) „Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependant pathway that is important for actin reorganization and cell migration“. *J Biol Chem* 274, 13954-13960
77. **Mazzini L**, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Oliveri C, Pastore I, Marano R, Madon E (2003) „Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: A methodological approach in humans“. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4, 158-161
78. **Meisel R**, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubner W, Dillo D (2004) „Human bone marrow stromal cells inhibit allogenic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation“. *Blood* 103, 4619-4621

79. **Minden A**, Lin AN, Claret FX, Abo A, Karin M (1995) „Selective activation of the Jnk signaling cascade and C-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42hs“ *Cell* 81, 1147-1157
80. **Moore MA**, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S (2001) „Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1“. *Ann NY Acad Sci* 938, 36-45
81. **Murohara T**, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symers JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM (1998) „Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia“. *J Clin Invest* 101, 2567-2578
82. **Murohara T**, Witzensbilcher B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM (1999) „Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration“. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 19, 1156-1161
83. **Ono K**, Han JH, (2000) „The p38 signal transduction pathway – activation and function“. *Cell Signal* 12, 1-13
84. **Orlic D**, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) „Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival“. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10344-10349
85. **Orlic D**, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) „Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium“. *Nature* 410, 701-705
86. **Ornitz DM**, Itoh N (2001) „Fibroblast growth factors –Protein family review“. *Genom Biology* 2: reviews 3005.1-3005.12
87. **Osaki M**, Oshimura M, Ito H (2004) „PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer“. *Apoptosis* 9, 667-676
88. **Perin EC**, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatta R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT (2003) „Transendocardial, autologous bone marrow stem cells transplantation for severe, chronic, ischemic heart failure“. *Circulation* 107, 2294-2302
89. **Perin EC**, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, Mesquita CT, Belem L, Vaughn WK, Rangel FO, Assad JA, Carvalho AC, Branco RV, Rossi MI, Dohmann HJ, Willerson JT (2004) „Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 month after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy“. *Circulation* 110, 11213-11218

90. **Pittenger MF**, McKay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) „Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells“. *Science* 284, 143-147
91. **Ringden O**, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marshall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K (2006) „Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host-disease“ *Transplantation* 81, 1390-1397
92. **Quarto R**, Mastrogiacomo M,ancedda R, Kutepov, SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Maracci M (2001) „Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells“. *N Engl J Med* 344, 385-386
93. **Sakakibara Y**, Tambara K, Sakaguchi G, Lu F, Yamamoto M, Nishimura K, Tabata Y, Komeda M (2003) „Towards surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast growth factor“. *Eur J Cardiothorac Surg* 24, 105-111
94. **Schmidt A**, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinköthe T, Klinz FJ, Schwinger RHG, Mehlhorn U, Bloch W (2006) „Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier“. *Europ J Cell Biol* 85, 1179-1188
95. **Schmidt A**, Ladage D, Schinköthe T, Klausmann U, Ulrichs C, Klinz FJ, Brixius K, Arnold S, Desai B, Mehlhorn U, Schwinger RHG, Staib P, Addicks K, Bloch W (2006) „Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells“. *Stem Cells* 24, 1750-1758
96. **Schmidt RF**, Lang F, Thews G „Physiologie des Menschen“ Springer Medizin Verlag 2005 Aufl. 29, S.26-37 ISBN 3-540-21882-3
97. **Sekiya I**, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ (2002) „Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality“. *Stem Cells* 20, 530-541
98. **Sharma GD**, He JC, Bazan HEP (2003) „p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing – evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades“. *J Biol Chem* 278, 21989-21997
99. **Shin EY**, Kim SY, Kim EG (2001) „c-Jun N-terminal kinase is involved in motility of endothelial cell“. *Exp Mol Med* 33, 276-283
100. **Shono T**, Kanetake H, Kanada S (2001) „The role of mitogen-activated protein kinase activation within focal adhesions in chemotaxis toward FGF-2 by murine brain capillary endothelial cell“. *Exp Cell Res* 264, 275-283
101. **Shur I**, Reish O, Ezra E, Benayahu D (2004) „Analysis of mesenchymal cells derived from an chondrodysplasia punctuate patient and donor“ *J Cell Biochem* 93, 112-119

102. **Simmons PJ**, Torok-Storb B (1991) „Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1“. *Blood* 78, 55-62
103. **Solchaga LA**, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2005) „FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells“. *J Cell Physiol* 203, 398-409
104. **Sotiropoulou PA**, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M (2006) „Characterization of optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells“. *Stem Cells* 24, 462-471
105. **Sottile V**, Halleux V, Bassilana F, Keller H, Seuwen K (2002) „Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells“. *Bone* 30, 699-704
106. **Stappenbeck TS**, Gordon JI (2001) „Extranuclear sequestration of phospho-jun N-terminal kinase and distorted villi produced by activated Rac1 in the intestinal epithelium of chimeric mice“. *Development* 128, 2603-2614
107. **Stavri GT**, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD (1995) „Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interactions with hypoxia“. *Circulation* 92, 11-14
108. **Strauer BE**, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2002) „Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantations in humans. *Circulation* 106, 1913-1918
109. **Tanaka K**, Sata M, Hirata Y, Nagai R (2003) „Diverse contributions of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries“. *Circ Res* 93, 783-790
110. **Toma JG**, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001) „Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin“. *Nature Cell Biol* 3, 778-784
111. **Tsutsumi S**, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y (2001) „Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal stem cells during proliferation in response to FGF“. *Biochemical and Biophysical Research Community* 288, 413-419
112. **Vivanco I**, Sawyers CL (2002) „The phosphatidylinositol 3 kinase Akt pathway in human cancer“ *Nat Rev Cancer* 2, 489-501
113. **Wollert KC**, Meyer GP, Lotz J, Ringes- Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004) „ Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomised controlled clinical trial“ *Lancet* 364, 141-148

114. **Xia Y**, Karin M (2004) „The control of cell motility and epithelial morphogenesis by JUN kinases“. *Trends Cell Biol* 14, 94-101
115. **Yanagisawa-Miwa A**, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamijo T, Sugimoto T, Kaji K, Utsuyama M, Kurashima C (1992) „Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor“. *Science* 257, 1401-1403
116. **Yang ZZ**, Tschopp O, Baudry A, Dümmler B, Hynx D, Hemmings BA „Physical functions of protein kinase B/Akt“. *Biochem Soc Trans* (2004) 32, 350-534
117. **Yoeli-Lerner M**, Toker A (2006) „Akt/PKB signaling in cancer. A function in cell motility and invasion“. *Cell Cycle* 5, 603-605
118. **Zhang W**, Ge W, Li C, You S, Liaol L, Han Q, Deng W, Zhao RC (2004) „Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells“  
*Stem Cells Dev* 13, 263-271
119. **Zhou GL**, Zhuo Y, King CC, Fryer BH, Bokoch GM, Field J (2003) „Akt phosphorylation of Ser21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration“. *Mol Cell Biol* 23, 8058-8069
120. **Zhou GL**, Tucker DF, Bae SS, Bhatheja K, Birnbaum MJ, Field Jeffrey (2006) „Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration“ *J Biol Chem* 281, 36443-36453
121. **Ziche M**, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Gepetti P, Ledda F (1994) „Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P“. *J Clin Investig* 94, 2036-2044
122. **Ziche M**, Parenti A, Ledda F, Dell’Era P, Granger HJ, Maggi CA, Preska M (1997) „Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF“. *Circ Res* 80, 845-852
123. **Zuk PA**, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) „Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells“. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295

## **7. Erklärung zu Vorabveröffentlichung**

Schmidt A, Ladage D, Schinköthe T, Klausmann U, Ulrichs C, Klinz FJ, Brixius K, Arnold S, Desai B, Mehlhorn U, Schwinger RHG, Staib P, Addicks K, Bloch W (2006) „Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells“. Stem Cells 24, 1750-1758

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum	14.01.80
Geburtsort	Bergisch Gladbach
Eltern	Werner und Christine Klausmann
Familienstand	verheiratet
Konfession	evangelisch

### Ausbildung

1990 - 1999	Gymnasium Herkenrath (Abiturnote: 1,5)
1996 - 1997	Whitmer High School, Toledo, Ohio, USA
10/1998 - 08/1999	Ausbildung zur Rettungssanitäterin (DRK Landesschule Düsseldorf)
09/1999 - 09/2000	Ausbildung zur Rettungsassistentin (DRK Landesschule Düsseldorf)
10/2000 – 04/2007	Medizinstudium an der Universität Köln
Herbst 2002	Physikum
Herbst 2003	1. Staatsexamen
Herbst 2005	2. Staatsexamen
04/2006 - 04/2007	praktisches Jahr (Wahlfach: Anästhesie) (Städt. Klinikum Solingen)
April 2007	3. Staatsexamen

### Berufliche Tätigkeit

Seit April 2008	Assistenzärztin in der Allgemein-, Gefäß-, und Viszeralchirurgie CA Prof. Dr. med Ch. Töns; Marien Hospital Düsseldorf akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf
-----------------	--

### Auslandserfahrung

05/2004	Studentenaustausch mit Rostov am Don; Russland
08/2004	Famulatur in der Neurologie (Hope Hospital, Manchester; U.K.)
11/2005 – 03/2006	Mitarbeit in dem Public Health Projekt „Vivir en Amor“ Yalanhuitz, Guatemala
10/ 2007 – 12/2007	Mitarbeit in der englischen Hilfsorganisation für Lepra- und Tuberculose-Patienten LEPRA Bangladesh Sirajgonj, Banglades