

Aus der Universitätsklinik für
Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer

Einfluss von Laktat auf das Genexpressionsprofil von
adulten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Carl Christoph Schneider

aus

Mannheim

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Zieker

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

Meiner Freundin Barbara,
meinen Eltern Renate und Karl Georg,
meinen Brüdern Philipp und David

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
Abkürzungen.....	V
Tabellen.....	VII
Abbildungen.....	VII

1. EINLEITUNG

1.1. Laktat	1
1.1.1. Chemische Grundlagen	
1.1.2. Historische Bedeutung	
1.1.3. Laktat und die Warburg-Hypothese	
1.1.4. Laktat im 21. Jahrhundert	
1.1.5. Energieversorgung / Glukoneogenetischer Stoffwechsel	
1.1.6. Laktat als Signalmolekül	
1.2. Mesenchymale Stammzellen	5
1.2.1. Grundlagen	
1.2.2. Charakterisierung	
1.3. DNA Microarray	6
1.3.1. Grundlagen	
1.3.2. Auswertung	
1.4. Quantitative Real Time PCR (RTq-PCR)	9
1.4.1. Grundlagen	
1.4.2. Auswertung	
1.5. Zielsetzung der Arbeit	12

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien	13
2.1.1. Reagenzien, Geräte und Kits	
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	
2.2. Methoden	14
2.2.1. Adulte humane mesenchymale Stammzellen	14
2.2.1.1. Gewinnung der hMSCs	
2.2.1.2. Isolierung und Kultivierung der hMSCs	
2.2.1.3. Behandlung der hMSCs mit Laktat	
2.2.1.4. <i>in vitro</i> Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	
2.2.1.4.1. Adipogene Differenzierung	
2.2.1.4.2. Osteogene Differenzierung	
2.2.1.4.3. Chondrogene Differenzierung	
2.2.1.5. RNA-Isolierung mit DNase Digestion	
2.2.2. Microarray	20
2.2.2.1. Projektbeschreibung	
2.2.2.2. Qualitätskontrolle	
2.2.2.3. Ermittlung differentiell exprimierter Gene	
2.2.2.4. Gene Ontology	
2.2.2.5. KEGG Pathway Overrepresentation Analysis (ORA)	
2.2.2.6. Ingenuity Pathway Analysis.....	
2.2.3. Quantitative Real Time PCR (RTq-PCR)	23
2.2.3.1. cDNA Herstellung mit Reverser Transkription	
2.2.3.2. Vorversuch: MgCl 3 / 4 mM	
2.2.3.3. Herstellung Verdünnungsreihe – Effizienzberechnung	
2.2.3.4. Referenz-Gen	
2.2.3.5. Primer	
2.2.3.6. Ablauf RTq-PCR	
2.2.3.7. Auswertung	

3. ERGEBNISSE	30
3.1. Adulte humane mesenchymale Stammzellen	30
3.1.1. FACS Analyse	
3.1.2. Differenzierungsprotokolle	
3.2. DNA Microarray	37
3.2.1. Qualitätskontrolle	
3.2.1.1. Density Plots	
3.2.1.2. Verteilung der Perfect Match (PM) features (Proben)	
3.2.1.3. Relative logarithmische Expression (RLE)	
3.2.1.4. Receiver-Operator-Characteristics (ROC)	
3.2.1.5. Normalisierte Signalverteilung (RMA)	
3.2.1.6. Relative logarithmische Expression (RMA)	
3.2.1.7. Detection above background (DABG)	
3.2.1.8. Principal Component Analysis (PCA)	
3.2.2. Cluster Analyse	
3.2.3. Datentabelle DNA Microarray	
3.2.4. DNA Microarray - Differentielle Genexpression	
3.2.4.1. Microarray – Diff. Genexpression - Entzündung	
3.2.4.2. Microarray – Diff. Genexpression - Proliferation	
3.2.4.3. Microarray – Diff. Genexpression - Apoptose	
3.2.4.4. Microarray – Diff. Genexpression - Hypoxie	
3.2.4.5. Microarray – Diff. Genexpression - Glykolyse	
3.3. RTq-PCR	46
3.3.1. CT-Werte RTq-PCR	
3.3.2. REST©-Software Ergebnisse	
3.3.3. RTQ-PCR – Differentielle Genexpression mit REST©	
3.3.3.1. RTq-PCR – Diff. Genexpression - Entzündung	
3.3.3.2. RTq-PCR – Diff. Genexpression - Proliferation	
3.3.3.3. RTq-PCR – Diff. Genexpression - Apoptose	
3.3.3.4. RTq-PCR – Diff. Genexpression - Hypoxie	
3.3.3.5. RTq-PCR – Diff. Genexpression - Glykolyse	

4. DISKUSSION	56
4.1. Entzündung	58
4.2. Wachstum und Proliferation	60
4.3. Apoptose	63
4.4. Hypoxie	64
4.5. Glykolyse	64
4.6. Schlussfolgerung	64
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATURVERZEICHNIS	67
7. VERÖFFENTLICHUNGEN	75
8. DANKSAGUNG	76
10. LEBENS LAUF	77

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
BAX	BCL2-associated X protein
CASP3	caspase 3
CASP9	caspase 9
CD	cluster of differentiation
CDC2	cell division control protein 2
CDK1	cyclin dependent kinase 1
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CP-Wert	crossing point
CRP	c reactive protein
Cy3-dUTP	cyanine 3 deoxyuridine triphosphate
Cy5-dUTP	cyanine 5 deoxyuridine triphosphate
DABG	detection above background
E	efficiency
FACS	fluorescence activated cell sorting
FRET-Sonden	fluorescence resonance energy transfer Sonden
GAP43	growth associated protein 43
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	gene ontology
HIF1 α	hypoxie-induced-factor α
HMBS	hydroxymethyl-bilane-synthase
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
IL1 β	interleukin 1 beta
IL6	interleukin 6
IL8	interleukin 8
IL26	interleukin 26
La $^-$	Laktat-Anion
LUX	light upon eXtension
MCT	monocarboxylat-transporter
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter

MM	mis-match Sonden
mM	Millimol
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAD ⁺	nicotinamid-adenin-dinukleotid
NFκB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated b cells
ng	Nanogramm
NUSE	normalisierte und nicht normalisierte Standardfehler
P53	tumor protein p53
PBS	phosphate buffered saline
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
PGK1	phosphoglycerat kinase 1
PKM2	pyruvate kinase
PM	perfect-match Sonden
RLE	relative logarithmische Expression
ROC	receiver operator characteristics
TGFβ1	transforming growth factor beta 1
TSPAN2	tetraspanin 2
TSPAN13	tetraspanin 13
RTq-PCR	quantitative real time polymerase cain reaction
rpm	revolutions per minute
VEGF A	vascular endothelial growth factor A
VEGF B	vascular endothelial growth factor B
vHL	von Hippel Lindau tumor supressor
WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)

Tabellen

Tab. 1	NanoDrop Messung.....	20
Tab. 2	Zuordnung Array / Probe.....	21
Tab. 3	Primer / Sequence / Oligo Name (Sigma Aldrich).....	27
Tab. 4	FACS Analyse h68 MSC.....	30
Tab. 5	Differenzierungs-Protokoll nach 24 h.....	31
Tab. 6	Differenzierungs-Protokoll nach 72 h (3 d).....	33
Tab. 7	Differenzierungs-Protokoll nach 168 h (7 d).....	35
Tab. 8	Datentabelle Microarray.....	43
Tab. 9	RTq-PCR – CT Werte.....	47
Tab. 10	REST©-Software Daten 5 mM Laktat vs. 0 mM Laktat.....	48
Tab. 11	REST©-Software Daten 10 mM Laktat vs. 0 mM Laktat.....	48
Tab. 12	REST©-Software Daten 15 mM Laktat vs. 0 mM Laktat.....	49
Tab. 13	RTq-PCR – Entzündung – Daten.....	49
Tab. 14	RTq-PCR – Proliferation – Daten.....	51
Tab. 15	RTq-PCR – Apoptose – Daten.....	52
Tab. 16	RTq-PCR – Hypoxie – Daten.....	53
Tab. 17	RTq-PCR – Glykolyse – Daten.....	55

Abbildungen

Abb. 1	Adipogene Differenzierung nach 24 Stunden.....	32
Abb. 2	Osteogene Differenzierung nach 24 Stunden	32
Abb. 3	Chondrogene Differenzierung nach 24 Stunden.....	33
Abb. 4	Adipogene Differenzierung nach 72 Stunden.....	34
Abb. 5	Osteogene Differenzierung nach 72 Stunden.....	34
Abb. 6	Chondrogene Differenzierung nach 72 Stunden.....	35
Abb. 7	Adipogene Differenzierung nach 168 Stunden.....	36
Abb. 8	Osteogene Differenzierung nach 168 Stunden.....	36
Abb. 9	Chondrogene Differenzierung nach 168 Stunden.....	37
Abb. 10	Density Plots.....	37

Abb. 11	Verteilung der Perfect Match (PM) features (Proben).....	38
Abb. 12	Relative logarithmische Expression (RLE).....	38
Abb. 13	Receiver-Operator-Characteristics (ROC).....	39
Abb. 14	Normalisierte Signalverteilung (RMA).....	40
Abb. 15	Relative Logarithmische Expression – RMA.....	40
Abb. 16	Detection above background (DABG).....	41
Abb. 17	Principal Component Analysis (PCA).....	42
Abb. 18	Zellzyklus - „Euclidian Distance“.....	42
Abb. 19	Microarray – Differentielle Gene.xpression – Entzündung....	44
Abb. 20	Microarray – Differentielle Genexpression – Proliferation....	44
Abb. 21	Microarray – Differentielle Genexpression – Apoptose.....	45
Abb. 22	Microarray – Differentielle Genexpression – Hypoxie.....	45
Abb. 23	Microarray – Differentielle Genexpression – Glykolyse.....	46
Abb. 24	RTq-PCR – Entzündung 0 vs 5 mM Laktat.....	50
Abb. 25	RTq-PCR – Entzündung 0 vs 10 mM Laktat.....	50
Abb. 26	RTq-PCR – Entzündung 0 vs 15 mM Laktat.....	50
Abb. 27	RTq-PCR – Proliferation 0 vs 5 mM Laktat.....	51
Abb. 28	RTq-PCR – Proliferation 0 vs 10 mM Laktat.....	51
Abb. 29	RTq-PCR – Proliferation 0 vs 15 mM Laktat.....	52
Abb. 30	RTq-PCR – Apoptose 0 vs 5 mM Laktat.....	52
Abb. 31	RTq-PCR – Apoptose 0 vs 10 mM Laktat.....	53
Abb. 32	RTq-PCR – Apoptose 0 vs 15 mM Laktat.....	53
Abb. 33	RTq-PCR – Hypoxie 0 vs 5 mM Laktat.....	54
Abb. 34	RTq-PCR – Hypoxie 0 vs 10 mM Laktat.....	54
Abb. 35	RTq-PCR – Hypoxie 0 vs 15 mM Laktat.....	54
Abb. 36	RTq-PCR – Glykolyse 0 vs 5 mM Laktat.....	55
Abb. 37	RTq-PCR – Glykolyse 0 vs 10 mM Laktat.....	55
Abb. 38	RTq-PCR – Glykolyse 0 vs 15 mM Laktat.....	56

1. Einleitung

1.1. Laktat

1.1.1. Chemische Grundlagen

Milchsäure ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$) dissoziiert unter physiologischen Bedingungen in das Anion $\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$ und das Kation H^+ , wobei das Anion als Laktat bezeichnet wird. Das Laktat-Anion (La^-) kommt im menschlichen Körper ausschließlich in Form des L-Enantiomers vor (Fischer-Projektion) (Boutellier, 2006).

1.1.2. Historische Bedeutung

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde Laktat überwiegend als Abfallprodukt der anaeroben Glykolyse betrachtet. So wurde die Ermüdung der Muskulatur bei längerer Beanspruchung auf den zu geringen Sauerstoffgehalt im Muskel und der daraus resultierenden Umstellung auf die anaerobe Glykolyse (anaerob-laktatzyklischer Stoffwechsel) zurückgeführt, die durch einen Anstieg des Laktatgehalts gekennzeichnet ist (Hermansen, 1981; Wasserman, 1984).

1.1.3. Laktat und die Warburg Hypothese

Ebenfalls Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieb Otto Warburg erstmals seine Beobachtung, dass Tumorzellen auch unter normoxischen Bedingungen Laktat produzieren (Warburg, 1925). Er postulierte, dass schnell wachsende Tumorzellen zur Energiegewinnung die anaerobe Glykolyse bevorzugen, weil diese im Gegensatz zur aeroben Glykolyse resistenter gegenüber Schädigungen sei, und so das Tumorwachstum begünstige (Warburg, 1927). Diese Beobachtung wiederum wurde erstmals 1972 von Efraim Racker als Warburg-Effekt bezeichnet, ein Begriff der sich bis heute gehalten hat (Racker, 1972). Die Warburg-Hypothese konnte bisher jedoch weder bestätigt noch widerlegt werden. Allerdings konnten 2006 Schulz et al. an malignen Dickdarmzellen von Versuchstieren zeigen, dass eine erzwungene Umstellung

auf aerobe Glykolyse mittels Frataxin-Überexpression in der Lage ist Tumorwachstum zu hemmen (Schulz et al., 2006).

1.1.4. Laktat im 21. Jahrhundert

Heute weiß man, dass Laktat nicht ausschließlich das Produkt einer anaeroben Stoffwechsellage ist, sondern beispielsweise auch bei einem Überangebot an Pyruvat entstehen kann (Juel, 1997). Inzwischen werden dem Laktat im menschlichen Organismus drei Hauptfunktionen zugesprochen. Laktat dient zum einen der Energieversorgung des Organismus als Stoffwechselmetabolit und Vorläufer des glukoneogenetischen Stoffwechsels, zum anderen erfüllt Laktat auch die Funktion eines Signalmoleküls.

1.1.5. Energieversorgung / Glukoneogenetische Stoffwechsel

Neuere Studien zeigen, dass Laktat eben nicht nur ein Stoffwechselendprodukt ist, sondern auch als wichtiger Energieträger im Organismus Verwendung findet (Brooks, 2007). Grundsätzlich wird im Organismus fortlaufend Laktat produziert, unabhängig davon ob körperliche Aktivität oder Ruhezustand vorherrschen (Mazzeo et al., 1986). Das unter anderem während körperlicher Belastung im Muskel durch anaerobe Glykolyse produzierte Laktat kann über das Blut dem systemischen Kreislauf zugeführt (Bergman et al., 1999) und beispielsweise im Herz, mittels Oxidation zu Pyruvat zur Energieversorgung genutzt werden (Gertz et al., 1988). Des Weiteren kann Laktat, z.B. in der Leber, auch als Substrat für die Glukoneogenese verwendet werden, wobei heute von einer dominierenden Rolle des Laktats gegenüber anderen Substraten (wie z.B. Glycerin) ausgegangen wird. Diese Ergebnisse konnten auch unter geringer körperlicher Belastung bestätigt werden (Consoli et al., 1990; Trimmer et al., 2001). Um systemisch als oxidativer Energieträger verwendet werden zu können ist ein „Laktat Shuttle System“ notwendig, welches sich gegenüber der normalen, rein konzentrationsabhängigen Diffusion durch höhere Transportgeschwindigkeit und gewebeabhängige Aufnahme bzw. Abgabe auszeichnet. Diese Hypothese wurde 1986 erstmals von George Brooks formuliert (Brooks, 1986a, b). Heute ist bekannt, dass es sowohl einen „Zell-

Zell-Laktat Shuttle“, zum Beispiel zum Transport von Laktat aus der Muskulatur zum Herz über das Blut, und einen „intrazellulären Laktat Shuttle“, beispielsweise zur Laktataufnahme in Mitochondrien gibt (Brooks, 2002). Bis heute sind insgesamt 14 Isoformen dieser Monocarboxylat-Transporter (MCT) beschrieben (Halestrap and Meredith, 2004). Diese Shuttle-Mechanismen sind also essentiell, um Laktat seiner Funktion als wichtiges Energiesubstrat zuzuführen, zum einen für die Glukoneogenese (Brooks, 2007) und zum anderen als Energielieferant für Organe wie z.B. das Herz (Stanley, 1991). Im Gegensatz zur bisherigen Annahme der Glukose-Oxidation als wichtigster neuronaler Energielieferant, wurde außerdem ein Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle postuliert, diese Hypothese ist jedoch nicht unumstrittenen (Pellerin et al., 1998).

1.1.6. Laktat als Signalmolekül

Wie neuere Erkenntnisse zeigen, ist Laktat nicht nur einfach ein Stoffwechselmetabolit, sondern auch in der Lage steuernde und regulierende Funktionen zu triggern, so dass manche Autoren aufgrund der Hormon-ähnlichen Funktionsweise des Laktats bereits von „lacterome“ sprechen (Gladden, 2008; Hashimoto and Brooks, 2008). Dies zeigt sich zum Beispiel bei Wundheilungsprozessen und der damit einhergehenden Gefäßneubildung (Angiogenese) (Hunt et al., 2008). In Wunden finden sich sehr hohe Laktatkonzentrationen von bis zu 10 – 15 mM, als deren Ursache man früher die vorherrschende Gewebhypoxie ansah (Hunt, 1990; Hunt et al., 1978). Heute ist bekannt, dass das Sauerstoffangebot nur sehr geringe Auswirkungen auf die Laktatkonzentration in Wunden hat (Hunt et al., 1978; Sheikh et al., 2000). Bereits 1964 konnten Green und Goldberg zeigen, dass sich die Kollagensynthese nahezu verdoppelt, wenn man in kultivierten Fibroblasten die Laktatkonzentration auf 15 mM erhöht (Green and Goldberg, 1964). Die Gefäßneubildung wird physiologisch unter anderen durch Hypoxie und durch hypoxia-induced-factor 1 α (HIF1 α) -abhängige Wachstumsfaktoren stimuliert (Knighton et al., 1981). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Laktat auch unter vollständig aeroben Bedingungen gebildet wird (Ghani et al., 2004) und in

der Lage ist, HIF1 α zu stabilisieren, das heißt den sonst unter aeroben Bedingungen erfolgenden Abbau zu verhindern (Lu et al., 2005; Lu et al., 2002). Außerdem wird durch Laktat die vascular endothelial growth factor Konzentration (VEGF) in kultivierten Endothelzellen deutlich erhöht und somit die Gefäßneubildung aktiv gefördert (Constant et al., 2000). Dies zeigt, dass Laktat in der Lage ist metabolisch Angiogenese zu stimulieren, und dies selbst unter normoxischen Bedingungen. Sowohl die Kollagenneubildung als auch die Gefäßneubildung werden durch Laktat über eine Regulation der Adenosindiphosphat (ADP) -Ribosylierung gesteuert. Die ADP-Ribosylierung ist ein ubiquitärer Prozess der post-translationalen Modifizierung von Proteinen, bei dem ADP-Ribosylgruppen der oxidierten Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) mittels ADP-Ribosyltransferasen auf Proteine übertragen werden, um dann die Proteinstruktur und -aktivität zu beeinflussen (Ziegler, 2000). Im Zellkern können sogenannte Poly-ADP-Ribosyltransferasen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren verändern und so die Genexpression regulieren (D'Amours et al., 1999). Es wird vermutet, dass bei Wundheilungsprozessen durch Poly-ADPR die Kollagen-Gen-Transkription in Fibroblasten vermindert wird. Durch eine erhöhte Konzentration von Laktat kommt es allerdings zu einer Verschiebung von La⁻ und NAD⁺ hin zu Pyruvat und reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), was in der Folge eine verstärkte Kollagen-Gen-Transkription zur Folge hat, da NADH kein Substrat für Ribosyltransferasen darstellt. In ähnlicher Weise funktioniert auch die Regulation der Gefäßneubildung durch Verminderung des NAD⁺ Angebots und dadurch Enthemmung der Transkription und Synthese von VEGF (Ghani et al., 2003; Hunt TK, 1992).

Als weitere Auswirkung des Laktats auf die Angiogenese konnte außerdem gezeigt werden, dass Laktat in der Lage ist Migration von Endothelzellen zu stimulieren (Beckert et al., 2006) und die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen zu induzieren (Nareika et al., 2005). Zusätzlich zur Angiogenese, der Gefäßneubildung durch Aussprossung aus einem schon bestehenden Kapillarsystem, stimuliert Laktat darüber hinaus durch sogenanntes „homing“ von Stammzellen die Vaskulogenese, eine

Gefäßneubildung aus endothelialen Vorläuferzellen, und ihre Differenzierung durch unter anderem HIF1 α und VEGF (Milovanova et al., 2008). Neuste Ergebnisse der Arbeitsgruppe Zieker et al. zeigen, dass Laktat ebenfalls die Genexpression mesenchymaler Stammzellen beeinflusst (Zieker et al., 2008).

1.2. Mesenchymale Stammzellen

1.2.1. Grundlagen

Stammzellen sind noch nicht differenzierte Vorläuferzellen, die sich durch asymmetrische Teilung vermehren (Morrison et al., 1997). Pluripotente humane mesenchymale Stammzellen (hMSC), die unter anderem auch gut zugänglich im Knochenmark des Erwachsenen zu finden sind, zeichnen sich durch ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential aus, jedoch ist eine Differenzierung zu vollständigen Organsystemen oder Organismen im Gegensatz zu omnipotenten fetalen oder embryonalen Stammzellen nicht möglich (Pittenger et al., 1999). Mesenchymale Stammzellen sind in der Lage sich in unterschiedliche mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knorpel, Fett, Muskel, Stützgewebe, Sehnen und Bänder zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich hMSCs auch im Bereich von Wunden anreichern und hier womöglich zum Heilungsprozess beitragen (Cha and Falanga, 2007). Dieser Beitrag besteht offensichtlich nicht nur aus der Differenzierung der Stammzellen zu Gewebszellen, sondern auch in ihrer Fähigkeit bestimmte Cytokine und Chemokine zu produzieren (Togel et al., 2005).

1.2.2. Charakterisierung

Um nachzuweisen, dass es sich bei den verwendeten Zellen um pluripotente hMSCs handelt, ist nach Pittenger et al. eine osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung der Zellen aufzuzeigen (Pittenger et al., 1999). Ein 2006 von der „International Society for Cellular Therapy“ herausgegebenes Positionspapier fordert für die Definition von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen als Minimalkriterien eine nachzuweisende Plastik-Adhärenz, eine

> 95% Expression von CD105, CD73, CD90 und eine minimale Expression von CD45, CD34, CD14 sowie eine *in vitro* Differenzierung in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten (Dominici et al., 2006).

1.3. DNA Microarray

1.3.1. Grundlagen Microarray

Die Microarray-Technologie, erstmals beschrieben 1995 (Schna et al., 1995) ermöglicht die quantitative Analyse differentieller Genexpression von unzähligen Transkripten simultan in einem Experiment. Hierzu wird in cDNA umgeschriebene mRNA einer Zelllinie oder eines Gewebes markiert (target) und mit immobilisierter, in Form von „Spots“ auf sogenannten „Slides“ befindlicher cDNA (features) hybridisiert. Nach einem Waschvorgang, bei dem nicht gebundene cDNA entfernt wird, kann der Expressionsunterschied durch Fluoreszenzmessung bestimmt werden.

Des Weiteren kann die Microarray-Technologie auch beispielsweise zum Nachweis von DNA-Variationen (z.B. Deletionen) bei Erbkrankheiten eingesetzt werden oder zur Tumorcharakterisierung mittels Genexpressionsprofil-Erstellung.

Bei der Expressionsanalyse werden im Wesentlichen zwei Vorgehensweisen unterschieden, die „cDNA-Spotted-Microarrays“ und die „oligonucleotide Microarrays“ (Schulze and Downward, 2001).

Bei „Spotted-Microarrays“ wird durch PCR gewonnene cDNA aus sogenannten „cDNA libraries“ („Genexpressionsbibliotheken“) auf Slides, welche meist aus oberflächenbehandeltem Glas bestehen, an definierten Stellen aufgebracht (features). Dieser Vorgang wird von einem computergesteuerten Roboterarm (Arrayer) mit Drucknadeln (Pins) durchgeführt und nennt sich „spotten“. Die mRNA der zwei zu untersuchenden Zellenlinien bzw. Geweben, (meist behandelte Probe und unbehandelte Kontrolle) werden in cDNA umgeschrieben. Die jeweils verwendete cDNA ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Häufig verwendete markierte Nukleotide sind Cy3-dUTP und Cy5-dUTP, die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren (Shalon et al.,

1996). Cy3-dUTP fluoresziert bei einer Wellenlänge von ~ 570 nm, was dem grünen Bereich des Lichtspektrums entspricht. Cy5-dTUP fluoresziert bei einer Wellenlänge von ~ 670 nm, was dem roten Bereich des Lichtspektrums entspricht. Beide Proben werden dann mit einem Hybridisierungs-Puffer vermischt und auf denselben Array hybridisiert. Daraus resultiert eine kompetitive Bindung der beiden unterschiedlich markierten cDNAs an den entsprechenden features, also der gespotteten cDNA. Nach einem Waschvorgang wird der „Slide“ gescannt und die durch Laser angeregten korrespondierenden Fluoreszenzfarbstoff-Emissionen gemessen. So lässt sich anhand des aus den beiden Messwerten gebildeten Quotienten die relative Signalintensität (Ratio) bestimmen, also ob in der behandelten Probe im Vergleich zur Kontrolle mehr oder weniger mRNA eines auf dem Array repräsentierten Gens exprimiert wurde (Tang et al., 2007). Diese als „home-made“ oder „in-house“ produzierten Arrays sind zwar verhältnismäßig günstig und können in ihrem Umfang (Anzahl der zu untersuchenden Gene) der Fragestellung angepasst werden, zeichnen sich jedoch durch eine schlechtere Sensitivität und Vergleichbarkeit gegenüber kommerziell hergestellte Arrays aus (Bammler et al., 2005).

Bei „oligonucleotide Microarrays“ werden kurze Oligonukleotid-Sequenzen zum Nachweis einzelner Gene *in situ* synthetisiert, z.B. durch Photolithography auf Silikonplättchen (high-density-oligonucleotide arrays der Firma Affymetrix) oder durch Ink-Jet-Technologie (Rosetta Inpharmatics / Agilent Technologies).

Die *in situ* synthetisierten Oligonukleotide ermöglichen bis zu 300.000 Elemente pro Array. Aus den zu untersuchenden Zellenlinien bzw. Geweben wird aus PolyA⁺ -RNA Doppel-Strang-cDNA synthetisiert. Während der *in vitro* Transkription der cDNA werden Biotin markierte Nukleotide in das synthetisierte cDNA-Molekül eingebaut. Im Anschluss wird jede Target-Probe mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert und auf den Array übertragen. Das Vergleichen der Signalintensität der verschiedenen Arrays erlaubt nun eine Aussage über die relative mRNA-Expression der auf dem Array befindlichen Gene. Diese „synthetischen“ Oligonukleotide ermöglichen den Nachweis einer großen Anzahl von Genen und sind direkt untereinander vergleichbar.

1.3.2. Auswertung Microarray

Die durch ein Microarray-Experiment erhobenen Daten bestehen typischerweise aus einer – je nach Umfang der untersuchten Gene – sehr umfangreichen Tabelle, in denen sämtliche Expressionsänderungen aufgelistet sind. Es wurden Schwankungen bei Microarray-Ergebnissen beschrieben, welche besonders bei niedrigen Expressionsänderungen auftreten (Mills et al., 2001). Zur Bestätigung der durch Microarray erhobenen Expressionsänderungen empfiehlt sich deshalb die Anwendung einer zweiten, unabhängigen Methode, wie zum Beispiel der quantitativen real time PCR (RTq-PCR) (Pfaffl, 2001).

Die eigentliche Herausforderung eines Microarray-Experiments ergibt sich durch die komplexe und extrem umfangreiche Menge an Daten. So ist es enorm schwierig relevante Genexpressions-Veränderungen herauszufiltern und sie in ihrer Bedeutung in den Kontext des Experiments einzuordnen. Eine Zuordnung der herausgefundenen Kandidatengene in die zugehörigen Pathways anhand ihrer Funktionen und deren Interpretation ist ebenfalls von hoher Komplexität. Gerade deshalb ist der Gebrauch von Datenanalyse-Software unumgänglich. Es sind verschiedene Analyse-Tools erhältlich, zum einen Software von kommerziellen Herstellern wie Ingenuity Systems®, Inc. USA (www.ingenuity.com) und GeneSpring von SiliconGenetics, USA (www.sigenetics.com), zum anderen öffentlich zugängliche Software, die zum Beispiel über die Stanford University (<http://smd.stanford.edu/resources/restech.shtml>) einzusehen ist.

Zum Aufbau eines Microarray-Experiments gibt es einerseits den „lokalen Ansatz“, bei dem die Veränderung der Genexpression auf einen bestimmten Stimulus oder eine experimentelle Manipulation in Form von hoch- und runter-regulierten Genen in einer Tabelle angestrebt wird. Andererseits gibt es auch den „globalen Ansatz“, bei dem Cluster-Analyse-Tools verwendet werden, die Gruppen von Genen mit ähnlicher Funktion oder ähnlichem Expressionsverhalten zusammenfassen. Cluster-Analyse-Tools wie z.B. das GeneCluster von Whitehead / MIT Center for Genome Research sind öffentlich

zugänglich. Dieser Ansatz kann beispielsweise zur Tumorklassifikation verwendet werden.

Die Microarray-Technologie ist jedoch nicht unumstritten, da sie auch mit bestimmten Problemen behaftet ist. Bei der Cluster-Analyse fasst man Gruppen von Genen mit ähnlicher Funktion zusammen, beispielsweise als Cluster „Entzündung“ (Inflammation). Hierbei besteht die Gefahr bestimmte Gene, die nicht in den Cluster aufgenommen wurden, zu übersehen, obwohl sie durchaus etwas mit Entzündungsreaktionen zu tun haben könnten.

Des Weiteren findet beispielsweise Regulation nicht nur auf Ebene der mRNA statt, sondern die Proteinproduktion wird auch von post-transkriptionalen Schritten mitbestimmt und die Protein-Aktivität durch post-translationalen Veränderungen reguliert.

Zur besseren und eindeutigen Vergleichbarkeit von Microarray-Ergebnissen wurde 2001 von der „Microarray Gene Expression Data (MGED) Society“ das Positionspaper „Minimum Information About Microarray Experiment“ mit bestimmten Mindestanforderungen formuliert. 2009 erschien eine nochmals überarbeitete Version (Brazma, 2009; Brazma et al., 2001).

1.4. Quantitative Real Time PCR (RTq-PCR)

1.4.1. Grundlagen RTq-PCR

Zur Bestätigung der durch Microarray-Analyse erhobenen Expressionsänderungen lässt sich das Verfahren der Quantitativen Echtzeit-PCR (RTq-PCR) anwenden (Pfaffl, 2001). Diese Verfahren ermöglicht es im Gegensatz zur normalen PCR, während der Amplifikation eine gleichzeitige Quantifizierung der PCR-Produkte durch Fluoreszenz-Messung durchzuführen (Higuchi et al., 1993). Das Risiko einer Verunreinigung der Proben ist geringer als bei der herkömmlichen PCR, da hier Amplifikation und Quantifizierung gleichzeitig in einem geschlossenen System ablaufen und somit auf eine End-Point-Gelelektrophorese verzichtet werden kann (Schmittgen et al., 2000).

Der Ablauf der RTq-PCR lässt sich in 4 Phasen unterteilen: Anfangs-Phase, frühe exponentielle Phase, Log-Linear-Phase und Plateau-Phase (Tichopad et

al., 2003). Die Messung der Fluoreszenz-Intensität findet in Echtzeit (real time) nur während der exponentielle Phase (Log-Linear-Phase) statt, da nur in dieser Phase von optimalen Reaktionsbedingungen bzw. einer hohen Wahrscheinlichkeit für das Aufeinandertreffen von Primer, Polymerase und cDNA ausgegangen werden kann. Die Fluoreszenzintensität verhält sich hierbei direkt proportional zur amplifizierten DNA-Menge (Wittwer et al., 1997). Der Beginn dieser Log-Linear Phase wird durch den sogenannten Crossing Point (CP-Wert) gekennzeichnet, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmals statistisch signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz tritt (Heid et al., 1996). Beim Überschreiten des definierten Crossing Point befindet sich in jeder Kapillare exakt dieselbe DNA-Menge. So können die unterschiedlichen Genexpressionen anhand ihrer unterschiedlichen CP-Werte quantitativ miteinander verglichen werden (Pfaffl, 2001).

Verschiedene Fluoreszenz-Technologien sind für die RTq-PCR beschrieben. Zum einen gibt es interkalierende Farbstoffe wie z.B. Sybr Green I, welches unspezifisch Doppelstrang-DNA bindet und im gebundenem Zustand wesentlich stärker fluoresziert als ungebunden (Ramos-Payan et al., 2003). Nachteil dieser Fluoreszenz-Technologie ist die geringe Spezifität, da nicht zwischen den amplifizierten Produkten unterschieden werden kann. Dies lässt sich jedoch durch Anwenden der Schmelzkurven-Analyse (Melting Curve), die direkt im Anschluss an die Amplifikation durchgeführt wird, wieder ausgleichen (Ririe et al., 1997). Eine andere Möglichkeit bietet die Verwendung von sogenannten FRET-Sonden (Fluorescence resonance energy transfer). Beschrieben wurden Hydrolyse-Sonden (TaqMan) (Heid et al., 1996), Hybridisierungs-Sonden (LightCycler) (Bernard and Wittwer, 2000), Molecular Beacons (Tyagi and Kramer, 1996), LUX (Light Upon eXtension) (Nazarenko et al., 2002) und Scorpions (Whitcombe et al., 1999).

1.4.2. Auswertung RTq-PCR

Zur exakten Quantifizierung der Ergebnisse sind die absolute Quantifizierung (Bustin, 2000) und die relative Quantifizierung (Pfaffl, 2001) beschrieben. Die absolute Quantifizierung ist sehr aufwendig und kann zudem auch sehr ungenau sein, weshalb die relative Quantifizierung heute überwiegend Verwendung findet.

Bei der relativen Quantifizierung werden Expressionänderungen anhand einer an Referenzgenen (früher Housekeeping-Gene) durchgeführten Normierung mit den Zielgenen verglichen. Ein Referenz-Gen sollte im optimalen Fall zelltyp-unspezifisch sein, also ubiquitär vorkommen, wenig reguliert werden und in seiner Expressionsaktivität kaum variieren. Häufig verwendete Referenz-Gene sind GAPDH, Ubiquitin und β -Aktin (Bustin, 2000).

Da unter experimentellen Bedingungen keine 100%ige Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus in der Log-Linear Phase zu erreichen ist (Effizienz zwischen 1,5 – 2,0), muss zudem eine Effizienzkorrektur erfolgen. Zur Bestimmung der RTq-PCR-Effizienz werden Standards in Form einer probenspezifischen cDNA-Verdünnungsreihe bestimmt. Durch logarithmisches Auftragen der Zykluszahl (CP) gegen die cDNA-Menge der Standards erhält man eine Gerade, mit deren Steigung man die Effizienz anhand folgender Formel berechnen kann:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Diese Vorgehensweise nennt sich „effizienz-korrigierte relative Quantifizierung“ nach Pfaffl (Pfaffl, 2001). Mit der bestimmten Effizienz lässt sich im Anschluss die Ratio (Expressionsunterschied) mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\text{CP}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}$$

Mit Hilfe der REST©-Software (Relative Expression Software Tool, Qiagen) nach Pfaffl (Pfaffl et al., 2002) werden Mittelwerte doppelt bestimmter Proben berechnet und daraus die normalisierten, mittleren Ratios

(Expressionsunterschiede) und die Varianz der einzelnen Expressionen angegeben (Pfaffl et al., 2002).

Da in bisherigen Publikationen sehr unterschiedliche Angabe zur Durchführung der RTq-PCR gemacht wurden und somit die RTq-PCR-Ergebnisse auch nicht ohne weiteres vergleichbar sind, wurden 2009 die „Minimum Information for Publications of Quantitative Real-Time PCR Experiments“ als Richtlinien veröffentlicht (Bustin et al., 2009).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der neuen Erkenntnisse über die Funktion des Laktats als Signalmolekül und die damit verbundenen regulatorischen Eigenschaften ist es das Ziel dieser Dissertation, die Auswirkungen von Laktat auf die Genexpression von adulten humanen mesenchymalen Stammzellen mittels Microarray und RTq-PCR aufzuzeigen und ihre Abhängigkeit von der Laktat-Konzentration zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Reagenzien, Geräte und Kits

Affymetrix Whole Transcript Sense Labeling Kit		Affymetrix, Germany
Affymetrix HuGene 1.0 ST Gene Chip		Affymetrix, Germany
C-Chip	Art.Nr. DHC-N01	Digital Bio, Korea
Dexamethason	Art.Nr. D-8893	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FACScan	Art.Nr. 343524	BD Biosciences, San Jose, USA
GeneAmp PCR System	Art.Nr. 9700	Applied Biosystems, USA
Glycerolphosphat	Art.Nr. 50020	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
hMSC Adipogenic BulletKit	Art.Nr. PT-3004	Lonza Walkersville Inc., USA
hMSC Chondro BulletKit	Art.Nr. PT-3003	Lonza Walkersville Inc., USA
Human TGF β 3	Art.Nr. 130-094-007	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Lactic acid	Art.Nr. L6402	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Art.Nr. A-8960	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit	Art.Nr. 86R	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
LightCycler 2.0	Art.Nr. 03531414001	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler Capillaries 20 μ l	Art.Nr. 04929292001	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler Software	Art.Nr. 3.5.3	Roche, Mannheim, Deutschland
Lymphoflot®	Art.Nr. 824012	Biotest, Dreieich, Deutschland
Magnesium Chloride 25mM	Art.Nr. M-8787	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MEM Alpha Eagle	Art.Nr. BE12-169F	Lonza Walkersville Inc., USA
NanoDrop Spectrophotometer	Art.Nr. ND-1000	PeqLAB Biotechnologies, Deutschland
Nuclease Free Water	Art.Nr. 1039498	Qiagen, Hilden, Deutschland
Oil Red O	Art.Nr. O-0625	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PBS	Art.Nr. BE17-516F	Lonza Walkersville Inc., USA
Primer	siehe Tab. 3	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
QIAshredder	Art.Nr. 79656	Qiagen, Hilden, Deutschland
REST® Software	Art.Nr. 6622	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Art.Nr. 74104	Qiagen, Hilden, Deutschland
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Art.Nr. 04379012001	Roche, Mannheim, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 22R	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Kimberly-Clark Professional (Koblenz, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Adulte humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

2.2.1.1. Gewinnung der hMSCs

Mit unterschriebener Einverständniserklärung einer 30-jährigen weiblichen Patientin wurde unter sterilen Bedingungen 10 ml Knochenmark in einer sterilen, heparinisierten Spritze entnommen. Das Einverständnis der Tübinger Ethikkommission wurde eingeholt.

2.2.1.2. Isolierung und Kultivierung der hMSCs

Die adulten humanen mesenchymalen Stammzellen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Schäfer R et al. (Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin IKET) isoliert und kultiviert. Die Isolierung der hMSCs aus dem Knochenmark wurde mit Lymphoflot der Firma Biotest (Art. Nr. 824012) nach Herstelleranleitung durchgeführt.

Das Knochenmark wurde aus dem Heparin-Röhrchen in ein 50 ml Falcon überführt, 1 : 1 mit Phosphate Buffered Saline (PBS) der Firma Lonza (Art. Nr. BE17-516F) verdünnt und auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. 200 µl wurden zur Zellzahlbestimmung am CellDyne entnommen. In ein neues 50 ml-Falcon wurden 20 ml Lymphoflot vorgelegt (aufgewärmt auf 20 – 24°C), anschließend wurden maximal 20 ml verdünntes Knochenmark über das Lymphoflot gegeben. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 1000 rpm und 20°C wurde die Interphase / Buffycoat großzügig abgenommen, in ein neues 50 ml Falcon überführt und mit Zellkulturmedium der Firma Lonza (MEM Alpha Eagle without L-glutamine, deoxyribonucleosides or ribonucleosides Art. Nr. BE12-169F)

aufgefüllt. Anschließend wurde erneut für 6 Minuten bei 350 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet aufgeratscht und in 20 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Es erfolgte erneut die Zentrifugation für 6 Minuten bei 350 rpm und Raumtemperatur, wieder wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet aufgeratscht, anschließend mit 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und davon 200 µl zur zweiten Zellzahlbestimmung mit CellDyne entnommen. Die Aussaat der Zellen erfolgte bei einer Aussaatdichte von 100.000 WBC/cm² in Kulturmedium. Zur Blutgruppenbestimmung wurde ein Erythrozyten-Pellet aus einem Ficollröhrchen entnommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37° Celsius, 95% O₂ und 5% CO₂ mit dem Medium „MEM Alpha Eagle without L-glutamine, deoxyribonucleosides or ribonucleosides“ der Firma Lonza. Der Medienwechsel erfolgte nach je 24 Stunden und nicht-adhärenente Zellen wurden mit PBS abgewaschen. Die Sortierung der Zellen erfolgte mit FACS (Fluorescence activated cell sorting) Analyse.

2.2.1.3. Behandlung der hMSCs mit Laktat

Die hMSCs wurden nun mit dem Medium MEM Alpha Eagle (12-169F) der Firma Lonza zusammen mit Laktat der Firma Sigma Aldrich (L6402 L-(+) Lactic acid) bei pH 7,4 inkubiert. Es wurden 4 Bedingungen zu 3 Zeitpunkten untersucht. Als Laktat-Konzentrationen wurden 0 mM, 5 mM, 10 mM und 15 mM gewählt, mit denen die Zellen jeweils über einen Zeitraum von 24 Stunden, 72 Stunden (3 Tage) und 168 Stunden (7 Tage) behandelt wurden. Die 0 mM Probe diente hierbei als unbehandelte Negativ-Kontrolle. Für jede Laktat-Konzentration (0 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM) wurde für jeden Zeitpunkt (24h, 3d, 7d) je 4 Flaschen à 185 cm², 4 Flaschen à 25 cm² und 1 Flasche à 75 cm² mit Zellen gezüchtet. Nach Erreichen einer adäquaten Zellenzahl wurden die Zellen der Flaschen wie folgt benutzt:

1) je 4 Flaschen à 185 cm² pro Konzentration und Zeitpunkt:

→ je 1,5 x 10⁶ Zellen für FACS Analyse

→ je 1,5 - 3 x 10⁶ Zellen in RLT Puffer für Gesamt-RNA (Microarray-Chip)

2) je 4 Flaschen à 25 cm² pro Konzentration und Zeitpunkt:

→ je 0,5 x 10⁶ Zellen für adipogene und osteogene Differenzierung mit jeweils einer Negativ-Kontrolle

3) je 1 Flasche à 75 cm² pro Konzentration und Zeitpunkt:

→ je 0,5 x 10⁶ Zellen für chondrogene Differenzierung

Die Auszählung der Zellen erfolgte mit dem C-Chip DHC-N01 – Disposable Hemocytometer System der Firma Digital Bio nach Herstelleranleitung. Nach Befüllen des C-Chips mit 10 µl je Probe wurden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Das Aufrechnen der Zellzahl pro ml erfolgte mit folgender Formel:

Zellen / ml = Zellzahl pro Quadrat x Verdünnungsfaktor x Volumenfaktor (10⁴)

Nicht-vitale Zellen wurden mit Tryptanblau-Färbung identifiziert.

Die Messung der Laktat-Konzentration und des pH-Werts erfolgte im Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF) des Universitätsklinikums Tübingen - Forschungslabor Wundheilung durch Dr. hum. biol. Jürgen Weinreich.

2.2.1.4. *In vitro*-Differenzierung der hMSCs

Die Differenzierung der hMSCs wurde mit den folgenden *in vitro*-Differenzierungs-Assays durchgeführt. Die Färbung erfolgte 4 Wochen nach der Differenzierung mit Alcianblau und Safranin O (Eigenherstellung Apotheke Universitätsklinikum Tübingen).

Es wurde zu jeder behandelten Probe eine Negativ-Kontrolle bestimmt. Die Probe und die Negativ-Kontrolle wurden nach der Färbung mikroskopisch beurteilt und fotografiert. Die Differenzierungsraten sind in den Tabellen 5 – 7 aufgelistet, die dazugehörigen mikroskopischen Bilder in 25facher und 100facher Vergrößerung finden sich in den Abbildungen 1 – 9.

2.2.1.4.1. Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung erfolgte mit hMSC Adipogenic BulletKit (PT-3004) der Firma Lonza in folgendem Medium:

1. Adipogenic-Induction-Medium	170ml	(PT-3102B)
inkl. folgender Single Quots		
rH-Insulin	2ml	(PT-4119B9)
L-Glutamine	4ml	(PT-4140B)
MSGS	20ml	(PT-4134B)
Dexamethasone	1ml	(PT-4142B)
Indomethacin	0,4ml	(PT-4117B)
IBMX	0,2ml	(PT-4118B)
GA-1000	0,2ml	(PT-4505B)
2. Maintenance-Medium	170 ml	(PT-3102A)
inkl. folgender Single Quots		
rH-Insulin	2ml	(PT-4119B9)
L-Glutamine	4ml	(PT-4140B)
MSGS	20ml	(PT-4134B)
GA-1000	0,2ml	(PT-4505B)

Nach Aussaat von Zellen mit einer Aussaatdichte von 1000 Zellen / cm² wurden pro Zyklus 3 – 4 Tage lang Adipogenic-Induction-Medium zu den Zellen gegeben und anschließend 3 – 4 Tage lang Maintenance-Medium. Nach 3 Zyklen (3 Wochen) erfolgte die Färbung mit Oil Red O der Firma Sigma (Art. Nr O-0625) nach Herstelleranleitung.

2.2.1.4.2. Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung erfolgte mit Hilfe des folgenden Mediums nach Eigenherstellung der AG Aicher et al., Zentrum für Regenerationsbiologie und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. W. K. Aicher:

Alpha-MEM	387 ml	(Lonza Walkersville Inc. USA)
FCS	100ml	
PenStrep	5ml	
Dexamethason (Stocklösung)	196µl	(Sigma, D-8893)
Glycerolphosphat (Stocklösung)	1µl	(Sigma, 50020)
L-Ascorbinsäure (Stocklösung)	7,24ml	(Sigma, A-8960)

Nach Aussaat von Zellen mit einer Aussaat-Dichte von 1000 Zellen / cm² und einem Medienwechsel alle 3 Tage erfolgte nach 3 Wochen im Anschluss an die Entfernung des Mediums und zweimaliges Auswaschen mit PBS die Färbung mit dem Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit der Firma Sigma (86R) nach Herstelleranleitung.

2.2.1.4.3. Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung erfolgte mit je 10 ml Lonza hMSC Chondro BulletKit (PT-3003) und 20 µl Human TGF β3 der Firma Miltenyi Biotec GmbH (130-094-007) in folgenden Medien.

1. hMSC Chondro BlulletKit

Diff. Basal Medium Chondrogenic	185ml	(PT-3925)
inkl. folgender Single Quots		
Dex	1ml	(PT-4130G)
Ascorbate	2ml	(PT-4131G)
IST + Supplement	2ml	(PT-4113G)
Pyruvate	2ml	(PT-4114G)
Proline	2ml	(PT-4115G)
Pen / Strep	2ml	(PT-4133G)
L-Glutamat	4ml	(PT-4140G)

2. Human TGF β3	25µl
Ampuwa	975µl

2.2.1.5. RNA Isolierung mit DNase Digestion

Zur Isolierung der RNA aus den mit Laktat behandelten hMSC-Proben und den Kontrollen wurde der RNeasy® Mini Kit (74104) der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden aufgetaut, lysiert und mit Buffer RLT (bei $< 5 \times 10^5$ Zellen mit $350 \mu\text{l}$ bzw. bei $< 1 \times 10^6$ Zellen mit $600 \mu\text{l}$ Buffer RLT) versetzt. Das Lysat wurde auf das Shredder-Column (QIAshredder der Firma Qiagen) gegeben und für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Shredder-Säule wurde verworfen und zum Unterstand wurde 1 Vol (bei $< 5 \times 10^5$ Zellen $350 \mu\text{l}$ bzw. bei $< 1 \times 10^6$ Zellen $600 \mu\text{l}$) 70% Ethanol pipettiert und gut gemischt. Hieraus wurden nun bis zu $700 \mu\text{l}$ auf das Mini-Spin-Column pipettiert und bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Rest wurde aufbewahrt. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde der aufbewahrte Rest ebenfalls auf die Mini-Spin-Column pipettiert und wieder bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Nun wurden $350 \mu\text{l}$ Buffer RW1 auf das Mini-Spin-Column pipettiert und bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Unterstand wurde wieder verworfen.

In einem neuen Tube wurden nun $10 \mu\text{l}$ DNase I Stock Solution mit $70 \mu\text{l}$ Buffer-RDD sanft mit der Pipettenspitze vermischt. Dieser DNase-Inkubationsmix ($80 \mu\text{l}$) wurde nun direkt auf die Column-Membran pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur ($20 - 30^{\circ}\text{C}$) inkubiert.

Nach den 15 min Inkubation erfolgten 3 weitere Schritte in beschriebener Reihenfolge:

1. Zugabe von $350 \mu\text{l}$ Buffer RW1, dann Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min, der Unterstand wurde verworfen.
2. Zugabe von $500 \mu\text{l}$ Buffer RPE, dann Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min, der Unterstand wurde verworfen.
3. Zugabe von $500 \mu\text{l}$ Buffer RPE, dann Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 min, der Unterstand wurde verworfen.

Zum kurzen Trocknen der Silica-Membran wurde für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und anschließend die Mini-Column auf Elution-Eppi (1,5 ml) gesetzt, 25 µl RNase freies Wasser (Qiagen) direkt auf die Membran gegeben und wieder zentrifugiert bei 10.000 rpm für 1 min. Nach Verwerfen der Säule wurde eine NanoDrop-Messung (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, PeqLAB Biotechnologies GmbH) der RNA zum Konzentrationsnachweis durchgeführt, um später für die qRT-PCR immer dieselbe RNA-Konzentration pro Probe zu gewährleisten. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der NanoDrop-Messung und gibt an wie viel µl RNA verwendet wurden um auf eine Endkonzentration von 1000 ηg RNA pro Probe zu kommen. Nicht direkt weiterverarbeitete Tubes wurden bei – 80°C eingefroren.

Tab.1 NanoDrop Messung

Probe	ηg / µl	1000 ηg RNA	H ₂ O
Kontrolle	353,67	2,83 µl	8,17 µl
5 mM	426,91	2,34 µl	8,66 µl
10 mM	1114,81	0,90 µl	10,10 µl
15 mM	746,15	1,34 µl	9,66 µl

2.2.2. Microarray

2.2.2.1. Projektbeschreibung

In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Walter und der MFT Services (MicroArray Facility Tübingen unter Leitung von Dr. Michael Bonin, Microarray Facility Medizinische Genetik Calwerstr. 7 72076 Tübingen) wurden 12 RNA Proben über Affymetrix Whole Transcript Sense Target Labeling Kit amplifiziert und auf den Affymetrix HuGene 1.0 ST Gene Chip hybridisiert. Es wurden Zellen für 1, 3 und 7 Tage mit 0 mM, 5 mM, 10 mM und 15 mM Laktat (L6402 L-(+)-Lactic Acid, Sigma) inkubiert. Pro Bedingung wurde immer nur eine Probe generiert und jeweils nur ein Array hybridisiert. Eine Zuordnung der Arrays zu den Proben ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tab. 2 Zuordnung Array / Probe

Probe	Array
MSCh68_KO_1d	I9R_001a01_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_5mM Lak_1d	I9R_001a02_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_10mM Lak_1d	I9R_001a03_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_15mM Lak_1d	I9R_001a04_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_KO_3d	I9R_001b01_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_5mM Lak_3d	I9R_001b02_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_10mM Lak_3d	I9R_001b03_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_15mM Lak_3d	I9R_001b04_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_KO_7d	I9R_001c01_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_5mM Lak_7d	I9R_001c02_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_10mM Lak_7d	I9R_001c03_(HuGene-1_0-st-v1).CEL
MSCh68_15mM Lak_7d	I9R_001c04_(HuGene-1_0-st-v1).CEL

2.2.2.2. Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle der Daten erfolgte in R 2.8.1 über Bioconductor Pakete „affy“, „affyPLM“, „affyQCReport“ und „ROC“ (www.r-project.org, www.bioconductor.org). Zur Qualitätskontrolle wurde von den nicht normalisierten Arrays ein lineares Modell erstellt und die daraus resultierenden normalisierten, nicht skalierten Standardfehler (NUSE), die relative logarithmische Expression (RLE) sowie die Signalverteilung aller Sonden vor und aller summierten Signale nach Normalisierung in Boxplots dargestellt (Abb. 10 – 17).

Des Weiteren wurden aus dem linearen Modell Falschfarbenbilder der einzelnen Arrays erstellt, um Hybridisierungsartefakte sichtbar zu machen.

Als letztes Qualitätsmerkmal wurden für jeden Array aus positiv (exon-basiert) und negativ (intron-basiert) Kontrollsonden Receiver-Operator-Characteristics erstellt, die einen Aufschluss über die generelle Qualität der Arrays erlauben.

2.2.2.3. Ermittlung differentiell exprimierter Gene

Da pro Bedingung nur jeweils ein Array hybridisiert wurde, konnte keine Signifikanzanalyse auf Basis eines t-Tests oder Ranking-Tests durchgeführt werden. Die Affymetrix Exon und Gene Arrays verzichten auf Mismatch Sonden. Daher wurden auch keine Detection oder Change Calls ermittelt, die immer über den Vergleich von Perfect Match (PM) und Mismatch (MM) Sonden erfolgt.

Die Hintergrund-Fluoreszenz wurde über sogenannte Antigenomic-Background-Sonden gemessen. Diese haben Sequenzen, die nicht im humanen Genom vorkommen und im GC (Guanin und Cytosin) -Gehalt den jeweiligen Sonden entsprechen. Pro GC-Bin wurde 450 Sonden gemessen. Über den Vergleich der Signale aller Sonden pro Transkript mit den Intensitäten der Hintergrundsonden wurde die Detection Above Background (DABG, Abb. 16) p-Value berechnet, welche angibt, ob ein Transkript mit einer 5% Wahrscheinlichkeit exprimiert wurde oder nicht. Um Transkripte aus dem Datensatz zu entfernen, die nicht bzw. nur schwach exprimiert waren, wurden alle Probensets entfernt, die zu einem Zeitpunkt in allen 4 Proben als „absent (A)“ bezeichnet wurden.

Durch die fehlenden Replikate wurde zum Vergleich zweier Bedingungen nur die relative Änderung der Expressionsstärke (Fold Change) als Kriterium für differentielle Expression herangezogen. Es wurde eine mindestens zweifache (2-fold) Änderung als Schwellenwert gewählt, um Transkripte herauszufiltern, die durch unterschiedliche Laktat-Konzentrationen in ihrer Expression verändert wurden. Um die Ungenauigkeit des Fold Change als Maß für die differentielle Expression zu reduzieren, wurden die Daten noch in einer 2-way ANOVA analysiert, welche Änderungen über Konzentration und Zeit erfasst.

Da Microarrays massiv dem Problem des Multiplen Testens unterliegen, wurde die p-Values über Multiple-Testing-Korrekturen angeglichen um Fehler erster Ordnung zu kontrollieren. Dies wurde mit der Korrektur nach Benjamini und Hochberg durchgeführt (Benjamini et al., 2001). Um die Zahl an falsch-positiven möglichst gering zu halten, wurde ein p-Value von 0,01 ohne Multiple-Testing-Korrektur gewählt.

2.2.2.4. Gene Ontology

Es wurden die Gene Ontology GO Kategorien „molecular function“ und „biological process“ einem konditionalen Hypergeometrischem Test unterzogen. GO Kategorien mit einem p kleiner gleich 0,01 wurden als signifikant angereichert bezeichnet.

2.2.2.5. KEGG Pathway Overrepresentation Analysis (ORA)

Analog zu GO wurden die Listen auf Über-Repräsentation von bekannten Singaltransduktionswegen und Stoffwechselwegen der KEGG Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, www.genome.jp/KEGG) untersucht.

2.2.2.6. Ingenuity Pathway Analysis

Zur funktionellen Analyse der veränderten Transkripte wurden die Genlisten der differentiell exprimierten Transkripte mit Hilfe der Ingenuity Pathway Analysis Software auf Interaktionen zwischen regulierten Genen und auf mögliche Veränderungen bekannter Singal- und Transduktionswege hin untersucht. Der Analyse zugrunde liegt eine Literatur- und Interaktionsdatenbank, die nach automatischem Textmining von promovierten Wissenschaftlern kontrolliert wird, wodurch die Qualität der Informationen durchweg hoch ist.

2.2.3. Quantitative Real Time PCR (RTq-PCR)

2.2.3.1. cDNA Herstellung mit Reverser Transkription

Zur Reversen Transkription der zuvor isolierten RNA wurde der Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche nach Anleitung des Herstellers verwendet. Zu Beginn wurden allen notwendigen Reagenzien aufgetaut, vorsichtig zentrifugiert und auf Eis gelagert. Der Template-Primer-Mix wurde nach folgendem Schema in eine sterile, NuKlease-freie-PCR-Kapillare pipettiert:

RNA	variabel (siehe Tab.1)
Random Hexamer Primer	2 μ l
<u>Wasser, PCR grade</u>	<u>variabel, auffüllen auf 13 μl</u>
Gesamt Volumen	13 μ l

Anschließend wurde der Template-Primer-Mix bei 65°C für 10 min inkubiert und sofort danach wieder auf Eis gelegt. Dieser Schritt erfolgte zur sicheren

Zerstörung der RNA-Sekundärstruktur. Nun wurden die restlichen Komponenten des Reverse Transkriptase Mix nach folgendem Schema hinzugefügt:

1. Transcriptor Reverse Transcriptase 20 U/μl	0,5 μl
2. Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer 5x	4,0 μl
3. Protector RNase Inhibitor 40 U/μl	0,5 μl
4. <u>Desoxynucleotide Mix 10 mM</u>	<u>2,0 μl</u>
	Volumen 7,0 μl
	<u>Finales Volumen 20 μl</u>

Die Reagenzien wurden vorsichtig manuell gemischt und kurz zentrifugiert. Die anschließende Inkubation erfolgte mit Random Hexamer Primers (600 pmol/μl) im GeneAmp PCR System 9700 der Firma Applied Biosystems nach folgendem Schema.

10 min bei 25°C	Initial
60 min bei 50°C	Inkubation
5 min bei 85°C	Inaktivierung der Transcriptor Reverse Transcriptase

Das anschließende auf-Eis-Legen der Tubes stoppte die Reaktion. Die ss cDNA musste nicht aufgereinigt werden, sondern konnte direkt in die RTq-PCR eingesetzt. Der Tube kann zwischen 2°C und 8°C für 1 – 2 Stunden, bei – 15°C bis – 25°C über längere Zeit aufbewahrt werden.

Im Anschluss wurde eine 1 : 10 Verdünnung mit RNase freiem Wasser der Firma Qiagen durchgeführt.

Für die RTq-PCR wurden den 8 μl Master-Mix (siehe 2.2.6.4) 2 μl der 1 : 10 verdünnten cDNA hinzugefügt.

2.2.3.2. Vorversuch: MgCl 3 / 4 mM

Zur Bestimmung der optimalen MgCl-Konzentration wurden vor Beginn jeder eigentlichen Messung 2 Proben Master Mix mit 3 mM MgCl bzw. 4 mM MgCl (Magnesium Chloride 25 mM Solution PCR Reagent (M-8787), Sigma Aldrich) pro Primer bestimmt. Die optimale MgCl Konzentration wurde anhand folgender Kriterien ermittelt:

- optisch besseres Laufverhalten
- weniger Hintergrund-Fluoreszenz

Der **Master Mix** für die beiden Proben setzte sich wie folgt zusammen:

Master Mix (für je 1 Probe) mit	3 mM MgCl	4 mM MgCl
Sybr Green I	5 µl	5 µl
Primer	1 µl	1 µl
MgCl	0,8 µl	1,2 µl
H ₂ O	1,2 µl	0,8 µl

2.2.3.3. Herstellung der Verdünnungsreihe zur Effizienzberechnung

Für jeden Primer wurde eine eigene, probenspezifische cDNA Verdünnungsreihe aufgesetzt, mit der die Effizienz jeder RTq-PCR nach folgender Formel berechnet wurde:

$$E = 10^{(-1 / \text{Steigung})}$$

Als Ausgangsprodukt wurden 10 µl des PCR-Produkts aus dem jeweiligen Vorversuch (2.2.3.2) verwendet. Diese 10 µl Ausgangsprodukt wurden dann 6 mal 1 : 10 (je 10 µl Ausgangsprodukt mit 90 µl Nuklease-freiem H₂O) und anschließend 6 mal 1 : 5 (je 10 µl Ausgangsprodukt mit 40 µl Nuklease-freiem H₂O) verdünnt. Es wurde das Nuklease-freie Wasser „Nuclease Free Water“ der Firma Qiagen verwendet.

So ergaben sich für unsere Standards folgende Konzentrationen:

	1 : 1	1,0 E ⁺⁰
S1:	1 : 5	2,0 E ⁻¹
S2:	1 : 25	4,0 E ⁻²
S3:	1 : 125	8,0 E ⁻³
S4:	1 : 625	1,6 E ⁻³
S5	1 : 3125	3,2 E ⁻⁴

2.2.3.4. Referenz Gen

Referenz-Gene (früher Housekeeping-Gene) werden zur relativen Quantifizierung nach Pfaffl herangezogen und zeichnen sich im optimalen Fall dadurch aus, dass sie zelltyp-unspezifisch sind, also ubiquitär vorkommen, wenig reguliert werden und in ihrer Expressionsaktivität kaum variieren (Bustin, 2000). In unserem Versuchs-Setting wurde die humane Hydroxymethyl-bilane-Synthase (HMBS) als Referenz Gen verwendet.

2.2.3.5. Primer

Das Ansetzen der Primer erfolgte mit je 450 µl H₂O, 25 µl Forward - und 25 µl Reverse-Primer. Je nach Optimum des Primers verwendeten wir entweder den in 2.2.3.2 angegebenen Master Mix mit 3 mM oder mit 4 mM MgCl.

Tabelle 3 zeigt die verwendeten Primer mit dazugehöriger Sequenz, Schmelz- und Annealing-Temperatur, NM-Nummer und verwendeter MgCl-Konzentration. Alle Primer wurden über die Firma Sigma Aldrich bezogen.

Tab. 3 Primer / Sequence / Oligo Name (Sigma Aldrich)

Primer / SIGMA	Sequence	TM °C	Annealing °C	Oligo Name	MgCl mM
HIF 1a S	5-CAACCTTCAGTGTGGGTATAAG-3	63,4	62	NM_001530	3
HIF 1a AS	5-AAATTTTCATATCCAGGCTGTG-3	66,7	62	NM_001530	3
PGK1 S	5-CATACCTGCTGGCTGGATGG-3	67,7	62	NM_000291	3
PGK1 AS	5-CCCACAGGACCATTCCACAC-3	67,7	62	NM_000291	3
TGF β1 S	5-CAAGCCTCCCCTCCACCACT-3	72,2	62	NM_000660	3
TGF β1 AS	5-TGCCGAGAGCGCGAACAGG-3	74,4	62	NM_000660	3
VHL S	5-ACGGATGGGAGATTGAAGATTTCTGTGG-3	71,8	62	NM_000551	4
VHL AS	5-CTCTGAGAATGAGACACTTTGAAACTAAGG-3	66,8	62	NM_000551	4
VEGF A S	5-GCCTTCGCTTACTCTCAC-3	57,6	62	NM_001025366	3
VEGF A AS	5-GCTGCTTCTTCCAACAATG-3	61,0	62	NM_001025366	3
IL 1β S	5-TGGCCCTAAACAGATGAAGTG-3	67,1	62	NM_000576	3
IL 1β AS	5-GTAGTGGTGGTCCGAGATTCG-3	65,6	62	NM_000576	3
WEE1 S	5-CACACGCCCAAGAGTTTG-3	63,1	62	NM_003390	3
WEE1 AS	5-CCTGAGGAATGAAGCAACAA-3	62,8	62	NM_003390	3
VEGFβ S	5-CATCATCAAACAGGACAGAGT-3	59,2	62	NM_003377	3
VEGFβ AS	5-AAGAGCCAGTTGTAAGATGC-3	58,6	62	NM_003377	3
PKM2 S	5-GGACCTGAGATCCGAACT-3	59,2	62	NM_182417	3
PKM2 AS	5-TCCATGTAGGCGTTATCCA-3	61,5	62	NM_182417	3
PDK1 S	5-AGCATCAGAGCCATCATTG-3	61,5	62	NM_002610	4
PDK1 AS	5-GAGGTGGAAGGATTACTTGAG-3	59,2	62	NM_002610	4
CASP3 S	5-AAGCGAATCAATGGACTCTG-3	61,8	62	NM_004346	4
CASP3 AS	5-AGTTTCTGAATGTTCCCTGAG-3	61,1	62	NM_004346	4
CASP9 S	5-CCAGACCAGTGGACATTG-3	60,1	62	NM_001229	4
CASP9 AS	5-CCGCAACTTCTCACAGTC-3	59,6	62	NM_001229	4
HMBS S	5-CACGATCCCGAGACTCTG-3	62,12	62	NM_000190	4
HMBS AS	5-GTTGCCCATCCTTCATAGC-3	62,0	62	NM_000190	4
NFκB S	5-CACCGTGTAAACCAAGC-3	59,1	62	NM_003998	3
NFκB AS	5-TTATGAACCAAGAAAGGAAGC-3	59,7	62	NM_003998	3
TP53 S	5-GGGACGGAACAGCTTTGAGG-3	68,0	62	NM_000546	3
TP53 AS	5-TTCTTGCGGAGATTCTCTTCCT-3	68,7	62	NM_000546	3
IL 6 S	5-ACCTGAACCTTCCAAGATG-3	60,5	62	NM_000600.3	3
IL 6 AS	5-ACTCCAAAAGACCAGTGATG-3	59,1	62	NM_000600.3	3
IL 8 S	5-TCCATAAGGCACAACTTTCA-3	65,1	62	NM_000584.3	3
IL 8 AS	5-AATCAGGAAGGCTGCCAAGA-3	66,6	62	NM_000584.3	3
BAX S	5-AGGATCGAGCAGGGCGAATG-3	70,7	62	NM_004324	3
BAX AS	5-GACACTCGCTCAGCTTCTTGG-3	66,4	62	NM_004324	3
GAP 43 S	5-GCAATGTTCCGTTTCATCTGA-3	63,7	62	NM_001130064	3
GAP 43 AS	5-CCTTAGAGCCGCAAGTTTAC-3	60,5	62	NM_001130064	3
IL 26 S	5-AAGCAACGATTCCAGAAGAC-3	60,9	62	NM_018402	3
IL 26 AS	5-TATGAAAGTCCTCCACAAGC-3	60,7	62	NM_018402	3
TSPAN 2 S	5-CCTTGAGTGAATGCCTGTT-3	60,3	62	NM_005725	3
TSPAN 2 AS	5-CTGGGAGCGAAATAGGTT-3	61,2	62	NM_005725	3
TSPAN 13 S	5-ATCTTCTTGTTCCTGATTGCTT-3	60,7	62	NM_014399	3
TSPAN 13 AS	5-CACCTTGCCGTATTGTTCCA-3	62,2	62	NM_014399	3

2.2.3.6. Ablauf RTq-PCR

Für jeden RTq-PCR Lauf wurde der entsprechende Master Mix für 32 Proben angesetzt und pro Kapillare (Gesamtvolumen pro Kapillare 10 µl) 8 µl Master Mix mit 2 µl cDNA (1:10 verdünnt) pipettiert und vermischt. Die Standards und Proben wurden jeweils doppelt bestimmt. Bei jedem Lauf wurde neben den Standards und den Proben stets auch Wasser als Negativ-Kontrolle (10 µl H₂O) bestimmt.

Pipettierschema:

1	S1 0,2	11	Probe 1 - 0mM Laktat
2	S1 0,2	12	Probe 1 - 0 mM Laktat
3	S2 0,04	13	Probe 2 - 5 mM Laktat
4	S2 0,04	14	Probe 2 - 5 mM Laktat
5	S3 0,008	15	Probe 3 - 10mM Laktat
6	S3 0,008	16	Probe 3 - 10 mM Laktat
7	S4 0,0016	17	Probe 4 - 15 mM Laktat
8	S4 0,0016	18	Probe 4 - 15 mM Laktat
9	S5 0,00032	19	H ₂ O (Negativ-Kontrolle)
10	S5 0,00032		

Nach 30 Sekunden (s) zentrifugieren bei 1000 rpm wurden die Kapillaren gekühlt in den Light Cycler 2.0 der Firma Roche eingesetzt.

Vor jedem Lauf wurde der „Self Test“ des Geräts durchgeführt und anschließend das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte „Spezialprotokoll 60 Grad“ verwendet.

Das verwendete Spezialprotokoll für den LightCycler 2.0 von Roche ist wie folgt definiert:

Pre-Incubation:	300 s bei 95°C	20°C/s	
	1 Cycle		
<hr/>			
Amplifikation:	Denaturierung	10 s bei 95°C	20°C/s
	Annealing	5 s bei 60°C	20°C/s
	Extension	15 s bei 72°C	20°C/s
	42 Cycles		
<hr/>			
Melting Curve:	15 s bei 50°C	20°C/s	
	dann kontinuierlicher Anstieg von	0,1°C/s	
	auf 95 °C		
	1 Cycle		
<hr/>			
Cooling	30 s bei 40°C	20°C/s	
	1 Cycle		
<hr/>			

2.2.3.7. Auswertung

Zur Auswertung der Zielgen-Expression der RTq-PCR-Ergebnisse wurde die „effizienz-korrigierte relative Quantifizierung“ nach Pfaffl et al. angewandt (Pfaffl, 2001).

Bei der relativen Quantifizierung nach Pfaffl et al. wird die Zielgen-Expression in Bezug gesetzt zu einem Referenz Gen, also einem ubiquitär vorkommenden und möglichst wenig regulierten Gen. Diesen Vorgang nennt man Normalisierung der Expressionsergebnisse.

Die $\Delta\Delta CP$ Methode nach Pfaffl beschreibt:

1. $\Delta CP = CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen}$
2. $\Delta\Delta CP = \Delta CP \text{ Behandlung} - \Delta CP \text{ Kontrolle}$
3. $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CP}$

Da jedoch unter experimentellen Bedingungen keine 100%ige Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus zu erreichen ist (Effizienz zwischen 1,5 und 2,0), wurden zur Bestimmung der RTq-PCR-Effizienz probenspezifische cDNA-Verdünnungsreihen mit bekannten Konzentrationen angesetzt (siehe 2.2.3.4 S1 – S5). Durch logarithmisches Auftragen der Zykluszahl (CP) gegen die cDNA-Menge der Standards 1 – 5 erhält man die Steigung einer Geraden, die es nun ermöglicht mit folgender Formel die Effizienz zu berechnen:

$$E = 10^{(-1 / \text{Steigung})}$$

Mit Hilfe der Effizienz-Bestimmung kann nun die Ratio (Expressionsunterschied) bestimmt werden.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Sind die CP-Werte des Referenz-Gens sowohl in der Kontrolle als auch der behandelten Probe annähernd identisch, heben sich diese auf und der Nenner kann gleich 1 gesetzt werden.

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta \text{CP}} \cdot \text{Zielgen}^{(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}$$

Da im Versuchs-Setting jede Probe doppelt bestimmt wurde und somit eine Mittelung der Werte erforderlich war, wurde die REST©-Software (Relative Expression Software Tool) nach Pfaffl verwendet. Diese bestimmt die Mittelwerte der doppelten Proben und berechnet daraus die normalisierten, mittleren Ratios (Expressionsunterschiede) und die Varianz der einzelnen Expressionen.

3. Ergebnisse

3.1. Adulte humane mesenchymale Stammzellen

Zum Nachweis der pluripotenten hMSCs wurde zu allererst die Plastik-Adhärenz nachgewiesen.

3.1.1. FACS Analyse

Mittels FACS Analyse konnte eine > 95%ige Expression von CD105, CD73, CD90 und eine minimale Expression von CD45, CD34, CD14 bei den verwendeten Zellen nachgewiesen werden. In Tab. 4 sind die Ergebnisse der FACS Analyse aufgelistet.

Tab. 4 FACS Analyse h68 MSC

CD	%
4	32
8	< 5,0
14	< 5,0
29	100
34	< 5,0
43	< 5,0
44	98
45	6
56	8
59	99

71	22
73	96
90	100
105	98
106	95
117	13
135	< 5,0
146	79
166	87
271	30
GD2	83
HLA ABC	96
HLA RPQ	< 5,0

3.1.2. Differenzierungsprotokoll

Des Weiteren wurde eine *in vitro*-Differenzierung zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten durchgeführt. Die Tabellen 5-7 zeigen die Differenzierungsprotokolle der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung der Zellen mit Negativ-Kontrollen nach je 24, 72 (3 Tagen) und 168 Stunden (7 Tagen). Im Anschluss an die jeweilige Tabelle folgen in den Abbildungen 1-9 die dazugehörigen mikroskopischen Bilder in 25-facher und 100-facher Vergrößerung.

Tab. 5 Differenzierungs-Protokoll nach **24 h**

	adipogen differenziert	osteogen differenziert	chondrogen differenziert
0 mM Lactat	30 %	40 – 50 %	kleines Pellet, Färbung kräftig, 50 %
0 mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	
5 mM Lactat	20 %	40 – 50 %	sehr kleines Pellet, Färbung mittel-kräftig 60 %
5mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	
10mM Lactat	10 – 20 %	40 – 50 %	sehr kleines rundes Pellet, Färbung kräftig 95 %
10mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	
15mM Lactat	20 %	70 – 80 %	relativ großes Pellet, Färbung mittel-kräftig 40 %
15mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	

Abb. 1 Adipogene Differenzierung nach 24 Stunden

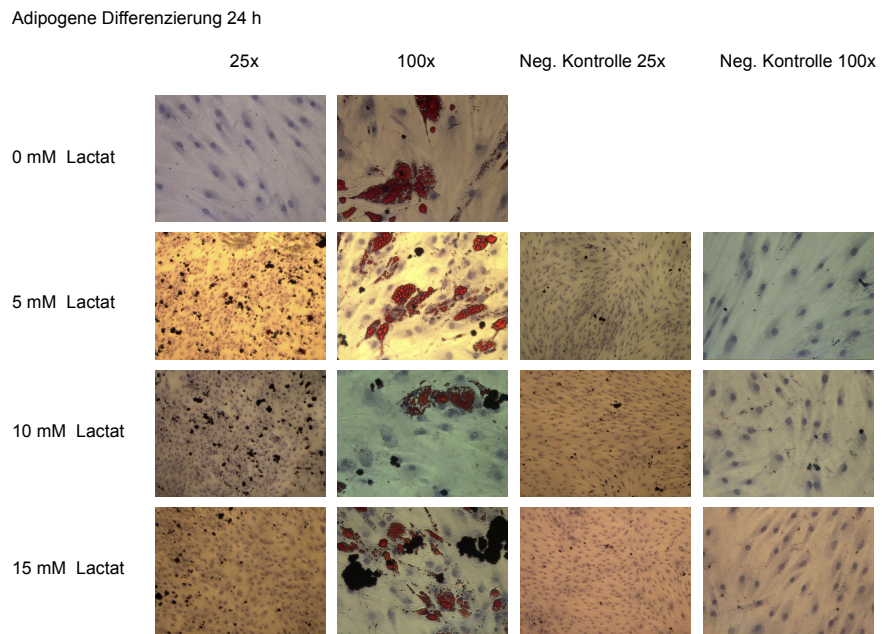


Abb. 2 Osteogene Differenzierung nach 24 Stunden

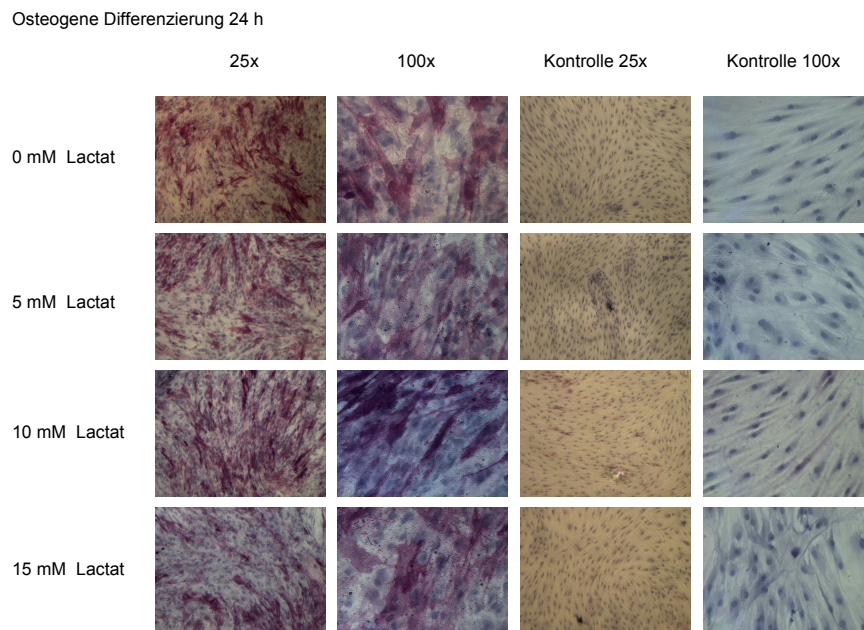
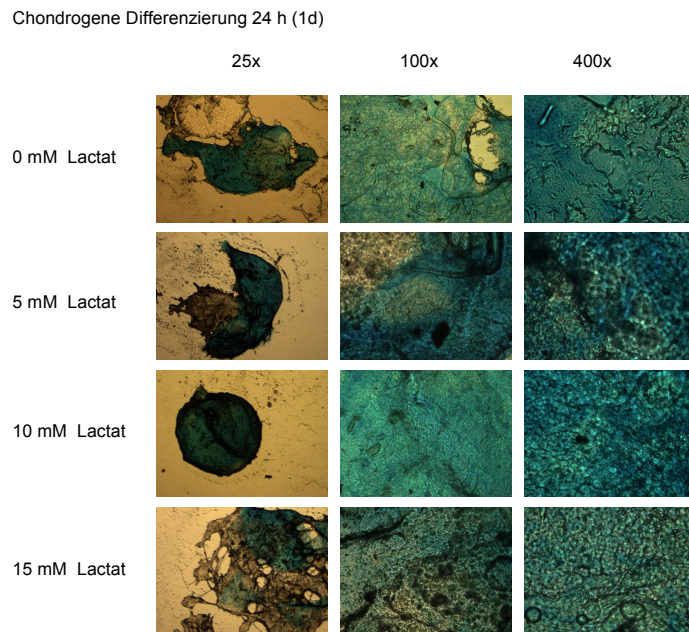


Abb. 3 Chondrogene Differenzierung nach 24 Stunden



Tab. 6 Differenzierungs-Protokoll nach 72 h (3 d)

	adipogen differenziert	osteogen differenziert	chondrogen differenziert
0 mM Lactat	0 %	40 %	kleines Pellet, Färbung mittel-kräftig, 50 %
0 mM Lactat Kontrolle	0 %	0 – 1 %	
5 mM Lactat	30 %	30 – 40 %	kleines Pellet, Färbung schwach 40 %
5mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	
10mM Lactat	10 %	40 %	Pellet in 2 Teile gerissen, Färbung kräftig 50 %
10mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	
15mM Lactat	10 %	40 %	sehr kleines Pellet, leicht gerissen, Färbung kräftig 60 %
15mM Lactat Kontrolle	0 %	0 – 1 %	

Abb. 4 Adipogene Differenzierung nach 72 Stunden

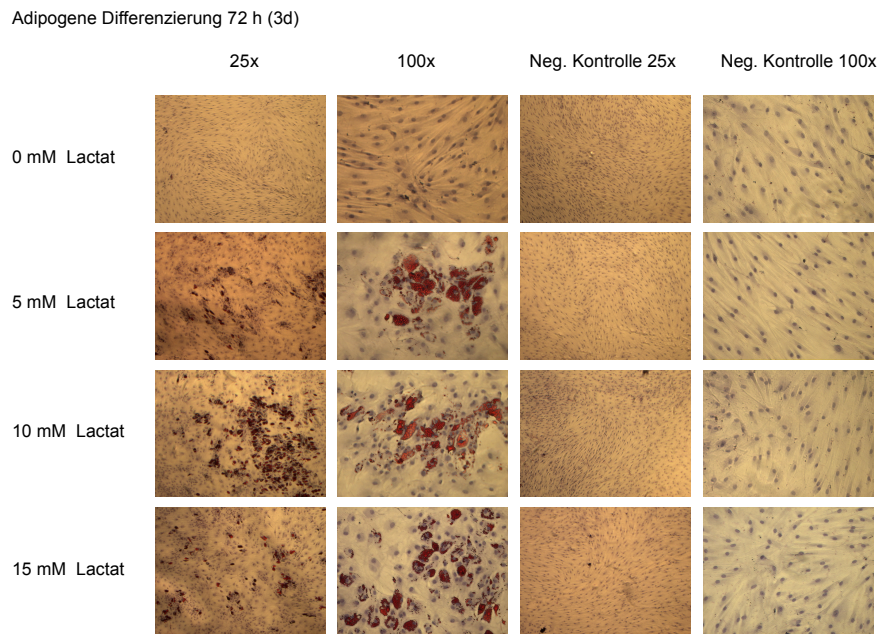


Abb. 5 Osteogene Differenzierung nach 72 Stunden

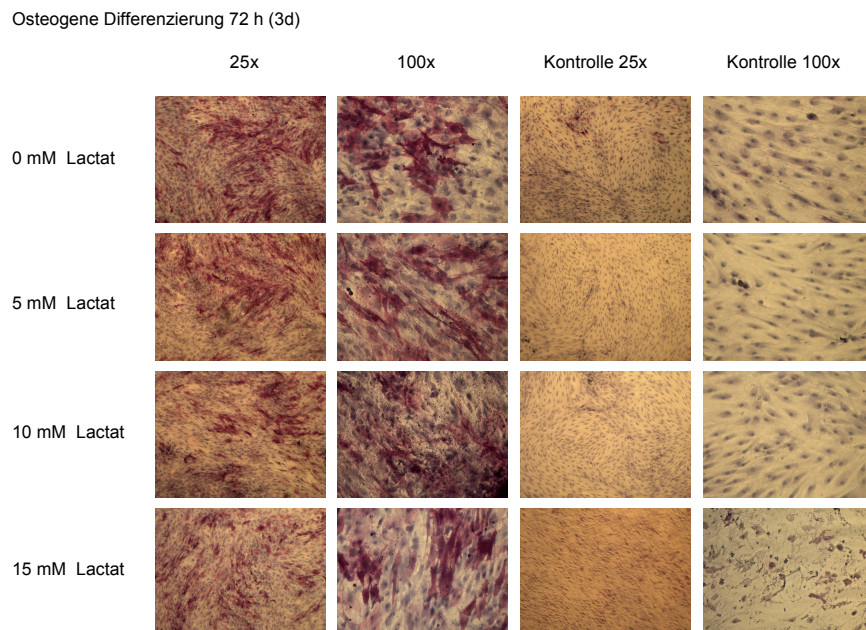
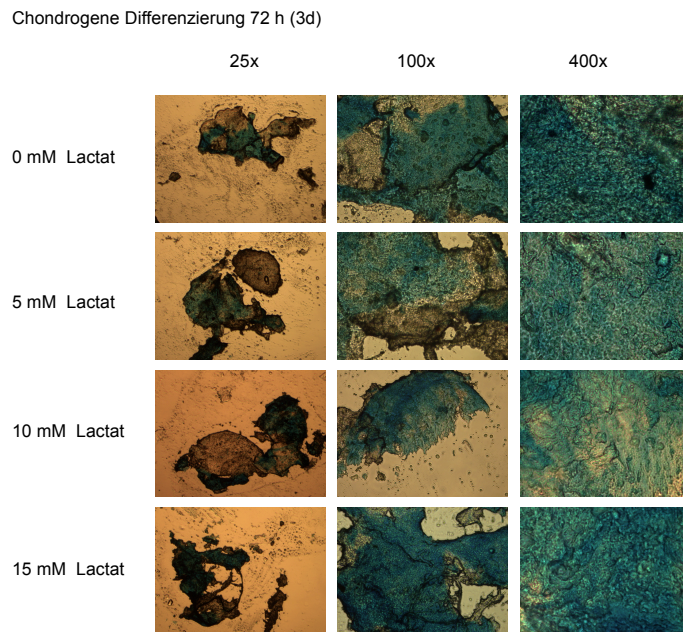


Abb. 6 Chondrogene Differenzierung nach 72 Stunden



Tab. 7 Differenzierungs-Protokoll nach **168 h (7 d)**

	adipogen differenziert	osteogen differenziert	chondrogen differenziert
0 mM Lactat	10 - 20 %	40 - 50 %	kleines dickes Pellet, Färbung kräftig, 90 %
0 mM Lactat Kontrolle	0 %	0 - 2 %	
5 mM Lactat	10 - 20 %	40 %	sehr kleines Pellet, leicht gerissen, Färbung kräftig 60 %
5mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	
10mM Lactat	10 %	30 - 40 %	kleines dickes Pellet, leicht gerissen, Färbung kräftig 60 - 70 %
10mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	
15mM Lactat	10 %	30 - 40 %	großes Pellet, Färbung kräftig 70 - 80 %
15mM Lactat Kontrolle	0 %	0 %	

Abb. 7 Adipogene Differenzierung nach 168 Stunden

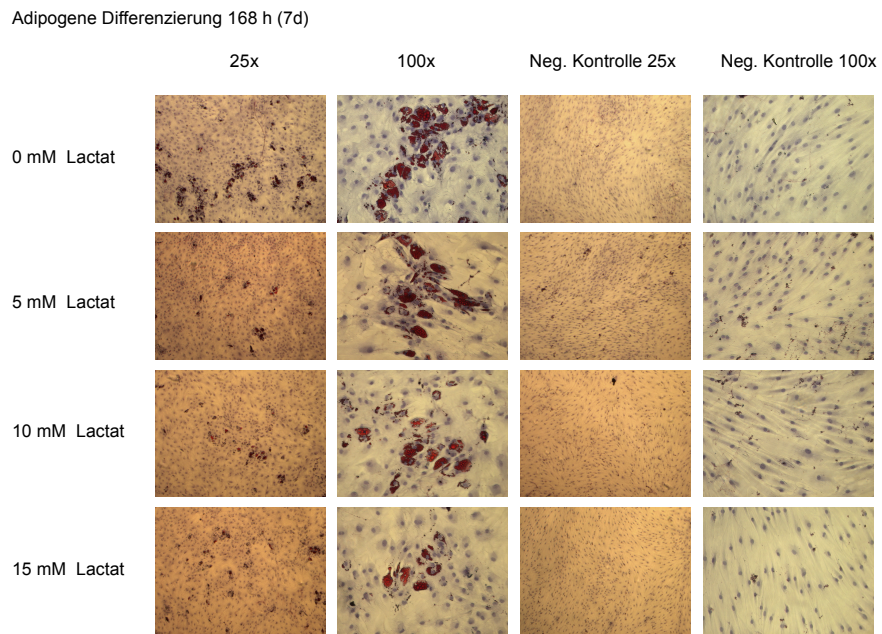


Abb. 8 Osteogene Differenzierung nach 168 Stunden

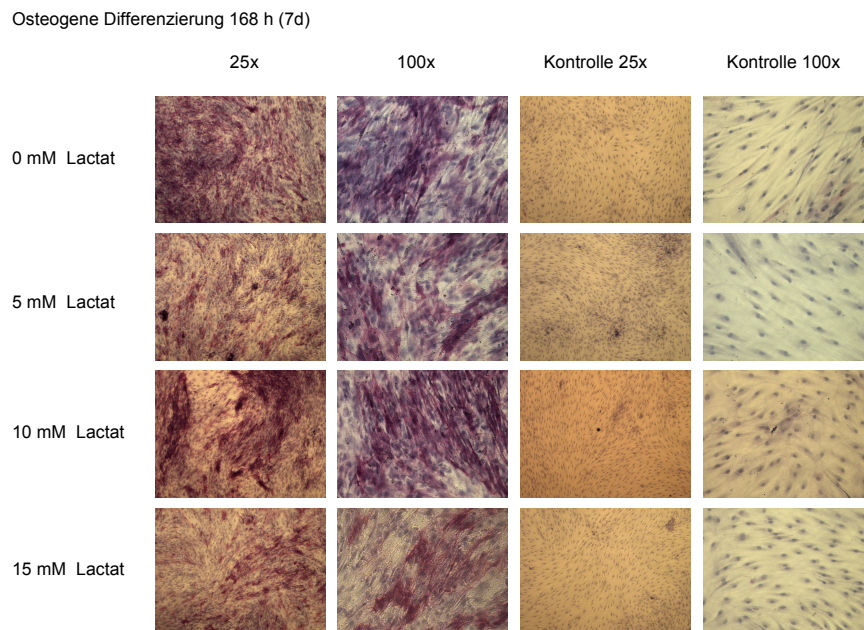
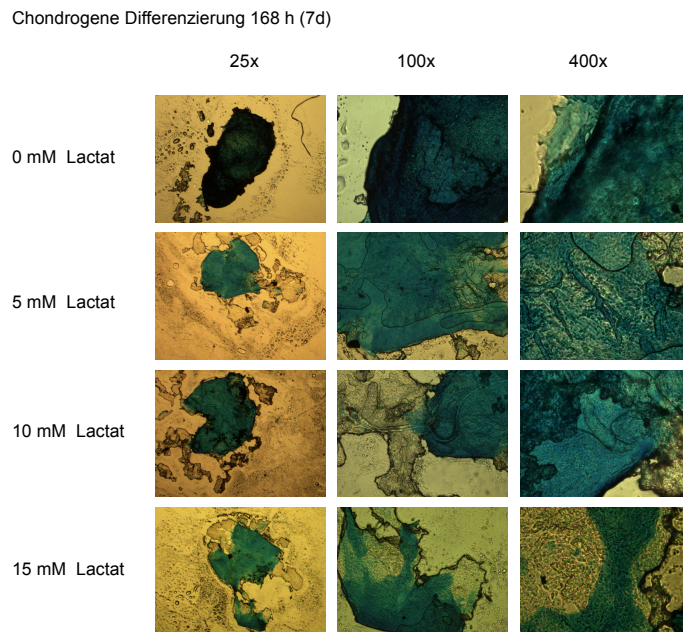


Abb. 9 Chondrogene Differenzierung nach 168 Stunden



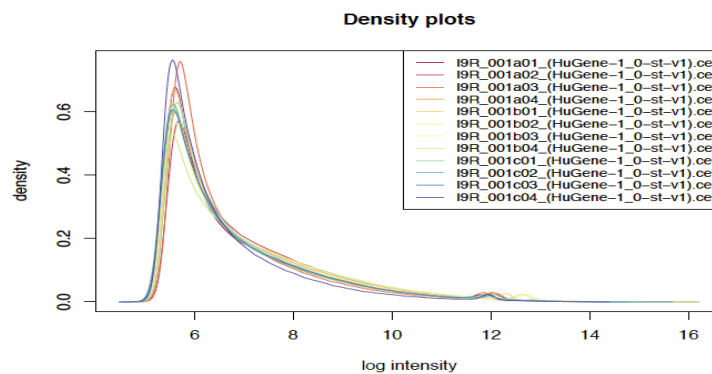
3.2. DNA Microarray

3.2.1. Qualitätskontrolle

3.2.1.1. Density Plots

Density Plots zeigen die nicht normalisierte Signalverteilung an. Die Signalverteilung aller Arrays sollte ungefähr denselben Verlauf haben.

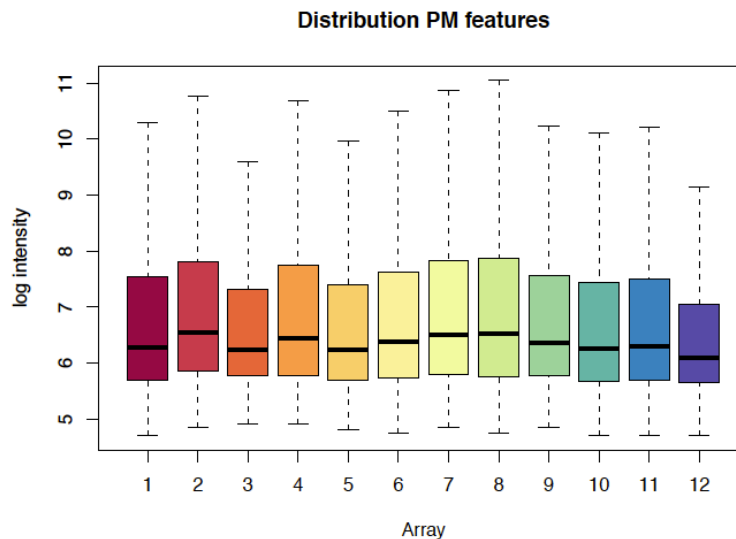
Abb. 10 Density Plots



3.2.1.2. Verteilung der Perfect Match (PM) features (Proben)

Die Signalverteilungen von nicht normalisierten PM features werden als Boxplots dargestellt. Der Interquartilsabstand und der Median sollten in allen Arrays ungefähr gleich sein.

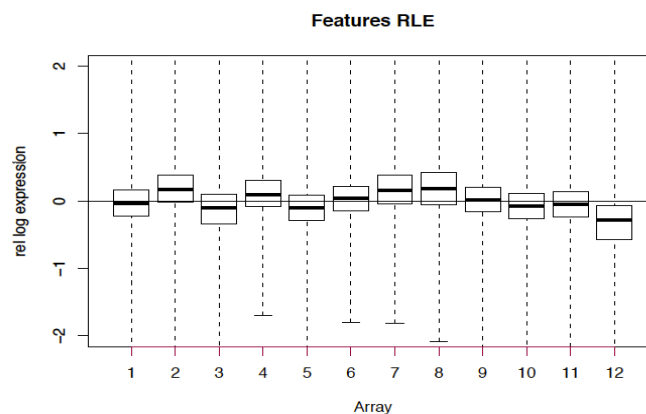
Abb. 11 Verteilung der Perfect Match (PM) features (Proben)



3.2.1.3. Relative logarithmische Expression (RLE)

Die relative logarithmische Expression beschreibt die Differenz zwischen den nicht normalisierten feature Intensitäten und dem Median des jeweiligen features. Der Median jedes features sollte ungefähr bei 0 liegen.

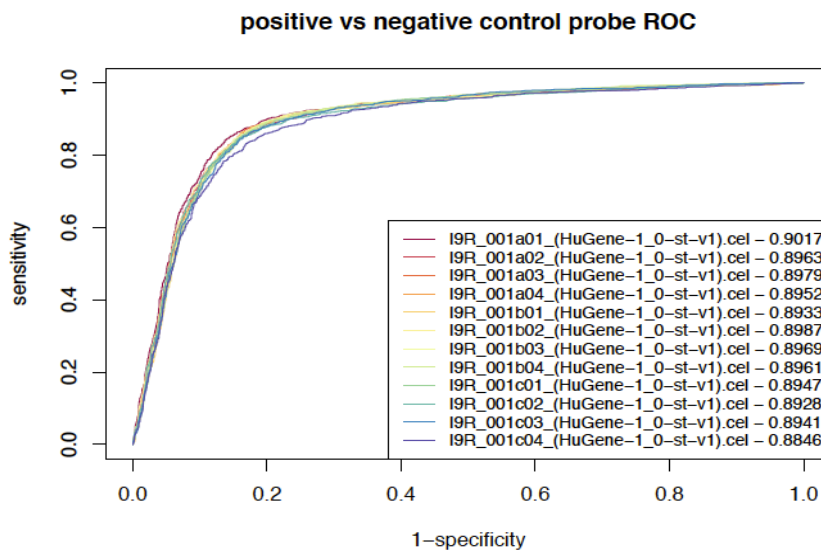
Abb. 12 Relative logarithmische Expression (RLE)



3.2.1.4. Receiver-Operator-Characteristics (ROC)

Dargestellt ist die „Area under the curve“ (AUC) für die Receiver-Operator-Characteristics, welche positive (exon-basierte) und negative (intron-basierte) Kontrollsonden für jeden Array vergleicht. Intron-Kontrollen werden als Maß für falsch-positive Messungen angesehen und Exon-Kontrollen als Maß für wirklich positive. Eine AUC von 1 würde einer perfekten Unterscheidung entsprechen, eine AUC von 0,5 hingegen würde keine Unterscheidung bedeuten. Qualitativ hochwertige Arrays sollten einen Wert von ungefähr 0,9 erreichen.

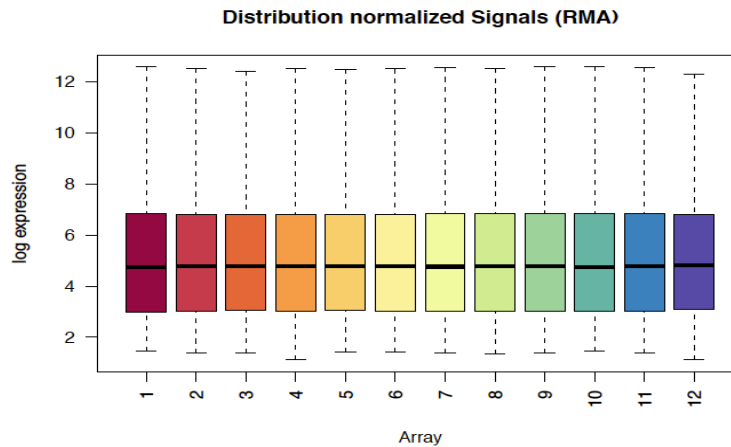
Abb. 13 Receiver-Operator-Characteristics (ROC)



3.2.1.5. Normalisierte Signalverteilung (RMA)

Der Interquartilsabstand und der Median sollten in allen Arrays ungefähr gleich sein.

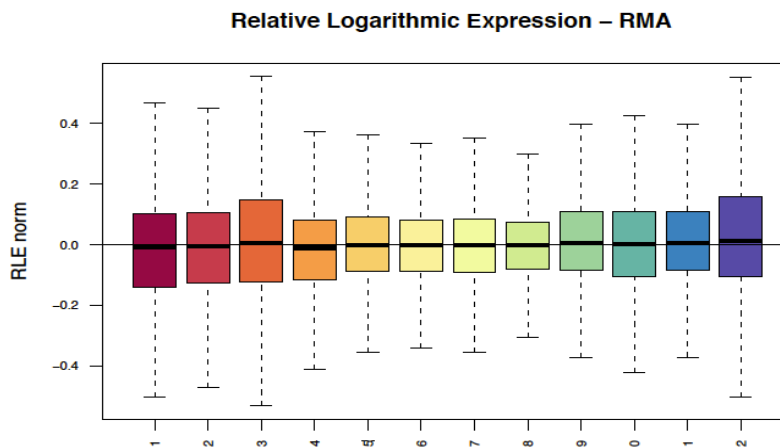
Abb. 14 Normalisierte Signalverteilung (RMA)



3.2.1.6. Relative logarithmische Expression – RMA

Die relative logarithmische Expression der normalisierten Signalintensitäten beschreibt die Differenz zwischen den normalisierten Signalintensitäten und der mittleren Expression jeder Probe. Die Boxen der Proben sollten ungefähr gleich groß sein und der Median sollte ungefähr bei 0 liegen.

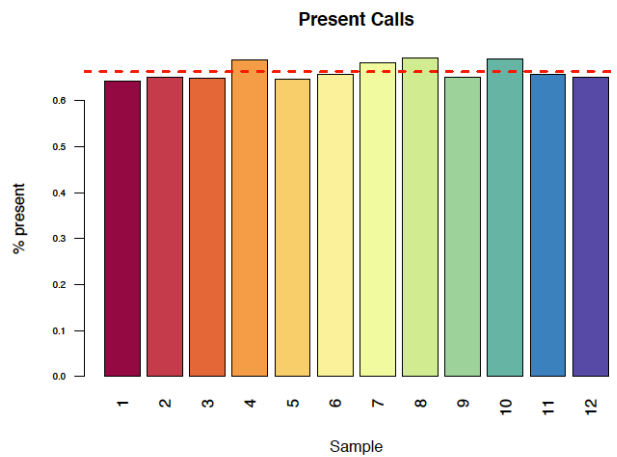
Abb. 15 Relative logarithmische Expression – RMA



3.2.1.7. Detection above background (DABG)

Die DABG zeigt eine prozentuale Angabe der präsenten Zellen auf den einzelnen Arrays. Die rot-gestrichelte Linie zeigt den Durchschnitt aller Arrays.

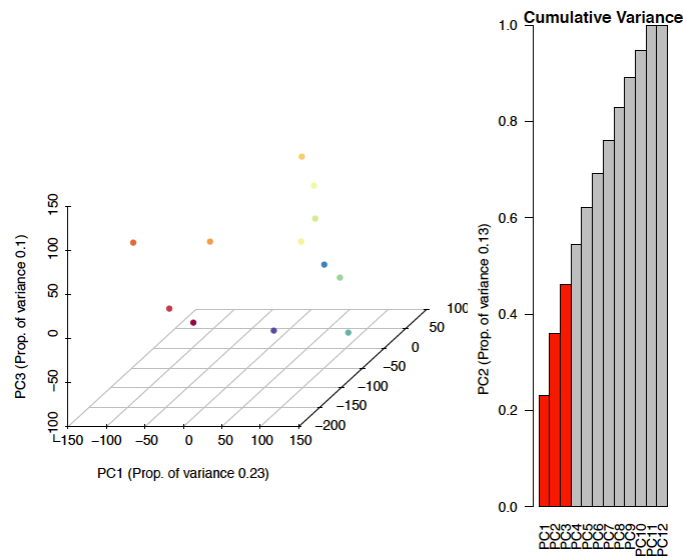
Abb. 16 Detection above background (DABG)



3.2.1.8. Principal Component Analysis (PCA)

Die PCA dient der Reduktion der Dimensionalität der Daten, während sie aber die meisten Variationen der Daten enthält. Anhand der PCA lässt sich zeigen dass in diesem Fall die Zellkultivierung den größten Effekt auf die Genexpression hat und demzufolge statistisch signifikante Ergebnisse nur für den ersten Versuchstag erhoben werden können. Somit mussten wir uns bei der weiteren Arbeit auf die Ergebnisse des ersten Behandlungstages nach 24 Stunden beschränken.

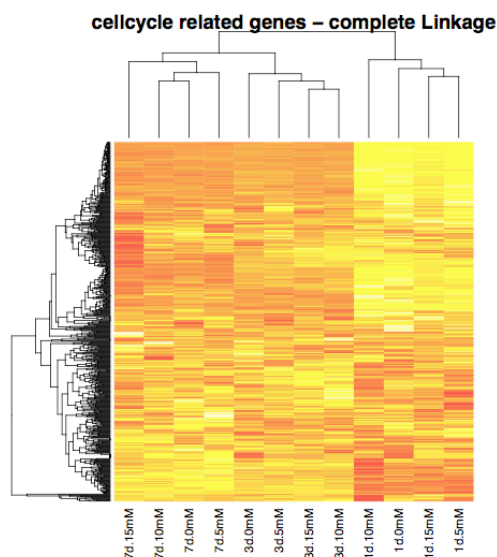
Abb. 17 Principal Component Analysis (PCA)



3.2.2. Cluster Analyse

3.2.2.1. Abbildung 18 zeigt exemplarisch eine in „Euclidian Distance“ dargestellte Cluster Analyse. Es wurde eine gesamte Cluster Analyse in „Euclidian Distance“ und „Manhattan Distance“ zu den Clustern „Cell Cycle“, „Cell Migration“, „Glycolysis“, „Growth Factor“, „Inflammation“ und „Redox“ durchgeführt.

Abb. 18 Cluster Analyse



3.2.3. Datentabelle DNA Microarray

In Tabelle 8 sind sämtliche in den folgenden Abb. 19 – 23 dargestellten Ergebnisse in tabellarische Form zusammengefasst.

Tab. 8 Datentabelle Microarray

ID	Symbol	Gene Title	1d.5mM vs0mM	1d.10mM vs0mM	1d.15mM vs0mM	Genbank	P-Value Time	P-Value Conc.
8030158	BAX	BCL2-associated X protein	1,142	1,038	1,136	NR_027882	0,286	0,956
8103922	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	-1,159	-1,18	-1,145	NM_004346	0,053	0,733
7912646	CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	1,146	-1,029	1,158	NM_001229	0,531	0,572
8081810	GAP43	growth associated protein 43	1,359	2,936	1,67	NM_001130064	0,009	0,042
7944401	HMBS	hydroxymethylbilane synthase	1,177	1,105	-1,047	NM_000190	0,003	0,317
7974851	HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	-1,102	1,161	1,078	NM_001530	0,005	0,072
8054722	IL1B	interleukin 1, beta	1,065	1,038	1,085	NM_000576	0,198	0,499
8131803	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	-1,023	1,075	1,484	NM_000600	8,29E-05	0,480
8095680	IL8	interleukin 8	1,724	1,23	1,76	NM_000584	4,26E-06	0,448
7964795	IL26	interleukin 26	-1,745	-2,339	-1,201	NM_018402	0,005	0,861
8046408	PK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	-1,06	1,074	-1,106	NM_002610	0,028	0,484
8168500	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	1,117	1,113	1,024	NM_000291	0,386	0,185
7990151	PKM2	pyruvate kinase, muscle	1,042	-1,011	-1,053	NM_182470	0,052	0,779
8012257	P53	tumor protein p53	1,102	-1,036	-1,027	NM_000546	0,061	0,107
8037005	TGFB1	transforming growth factor, beta 1	-1,176	1,45	-1,095	NM_000660	0,007	0,355
7918857	TSPAN2	tetraspanin 2	-1,198	3,782	1,118	NM_005725	0,143	0,157
8131600	TSPAN13	tetraspanin 13	-1,308	3,316	-1,217	NM_014399	0,089	0,207
8119898	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	1,044	1,188	1,206	NM_001025366	0,086	0,023
7940904	VEGFB	vascular endothelial growth factor B	1,034	1,105	1,089	NM_003377	0,003	0,967
8077781	VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor	1,105	1,054	-1,072	NM_000551	0,231	0,415
7938366	WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)	2,454	1,526	1,639	BX641032	0,209	0,736
8096635	NFKB1	nuclear factor of kappa 1	1,122	1,089	1,356	NM_003998	0,136	0,879

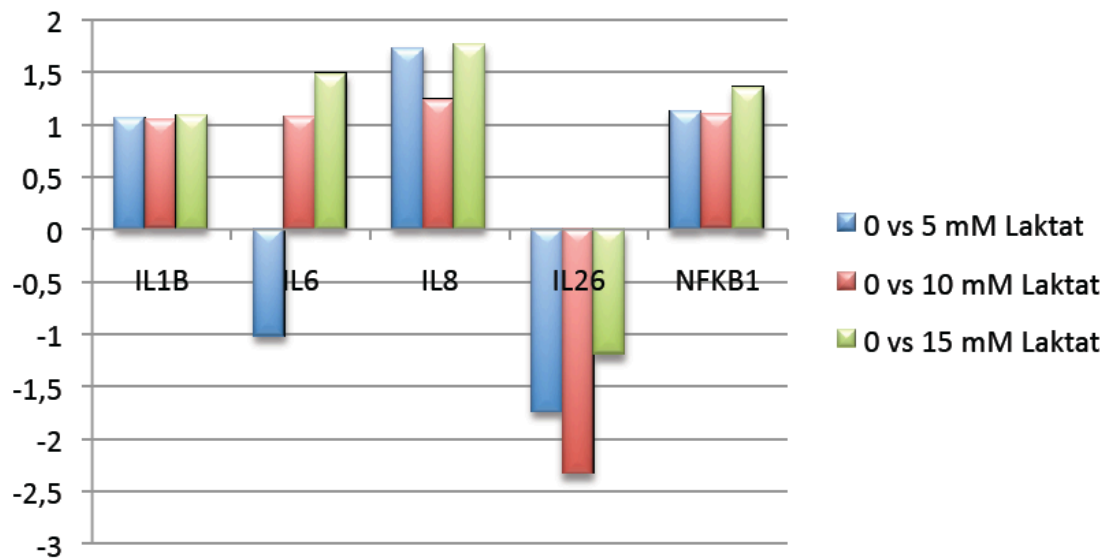
3.2.4. DNA Microarray – Differentielle Genexpression

Zur besseren Veranschaulichung sind die Ergebnisse der Differentiellen Genexpression mittels Microarray Analyse in Systeme bzw. Stoffwechselwege aufgeteilt. Auf der y-Achse sind die Fold-Change-Werte (log2) angegeben, immer im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle (0 mM Laktat).

3.2.4.1. DNA Microarray – Differentielle Genexpression – Entzündung

Abbildung 19 zeigt die veränderte Genexpression von an Entzündungsprozessen beteiligten Genen.

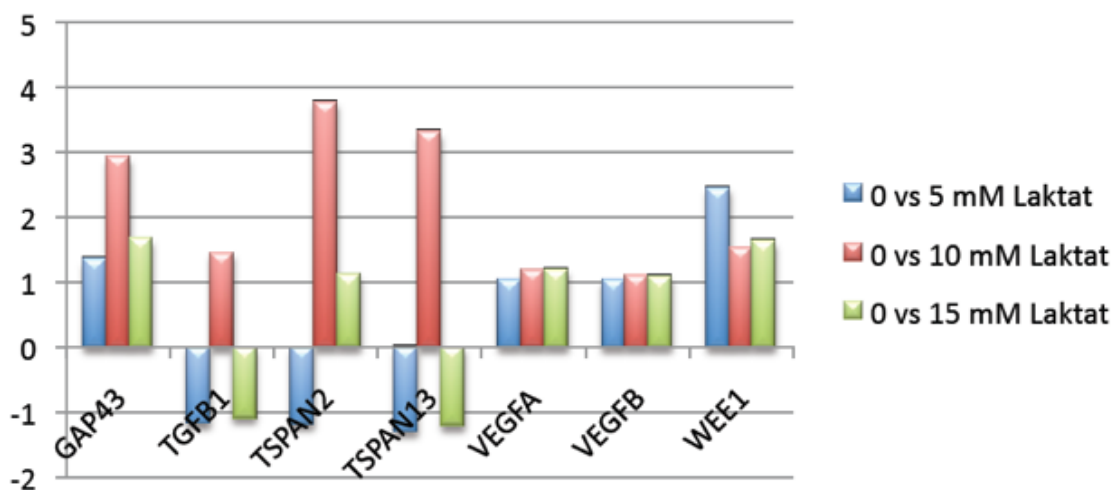
Abb. 19 Microarray - Entzündung



3.2.4.2. DNA Microarray – Differentielle Genexpression – Proliferation

Abbildung 20 zeigt die veränderte Genexpression von an Wachstum und Proliferation beteiligten Genen.

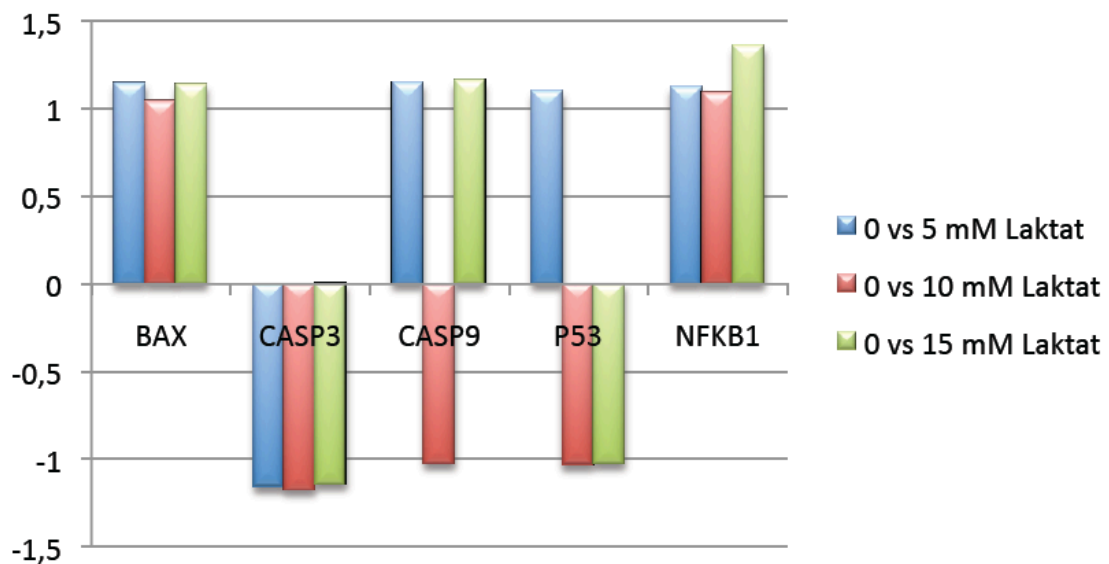
Abb. 20 Microarray – Proliferation



3.2.4.3. DNA Microarray – Differentielle Genexpression – Apoptose

Abbildung 21 zeigt die veränderte Genexpression von an der Apoptose beteiligten Genen.

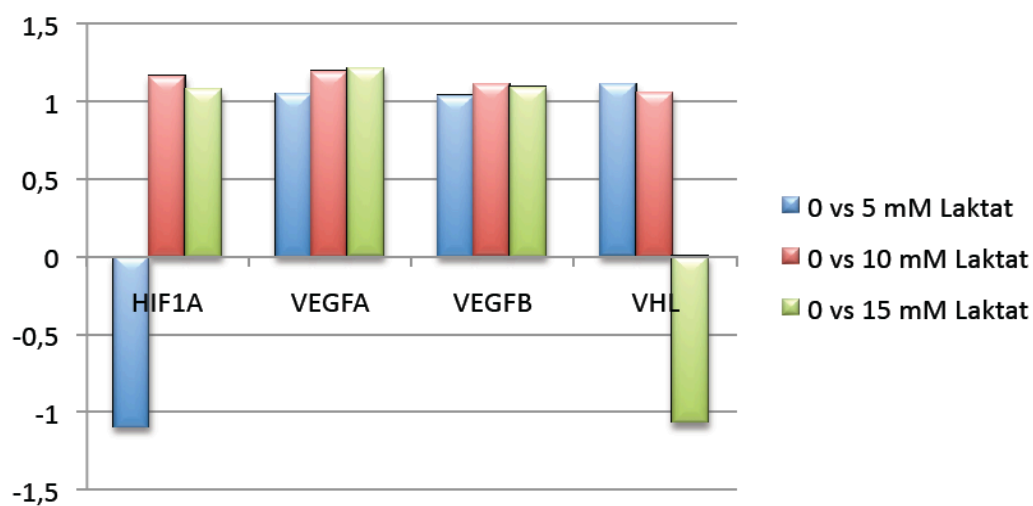
Abb. 21 Microarray – **Apoptose**



3.2.4.4. DNA Microarray – Differentielle Genexpression – Hypoxie

Abbildung 22 zeigt die veränderte Genexpression von an der Hypoxie-Reaktion beteiligten Genen.

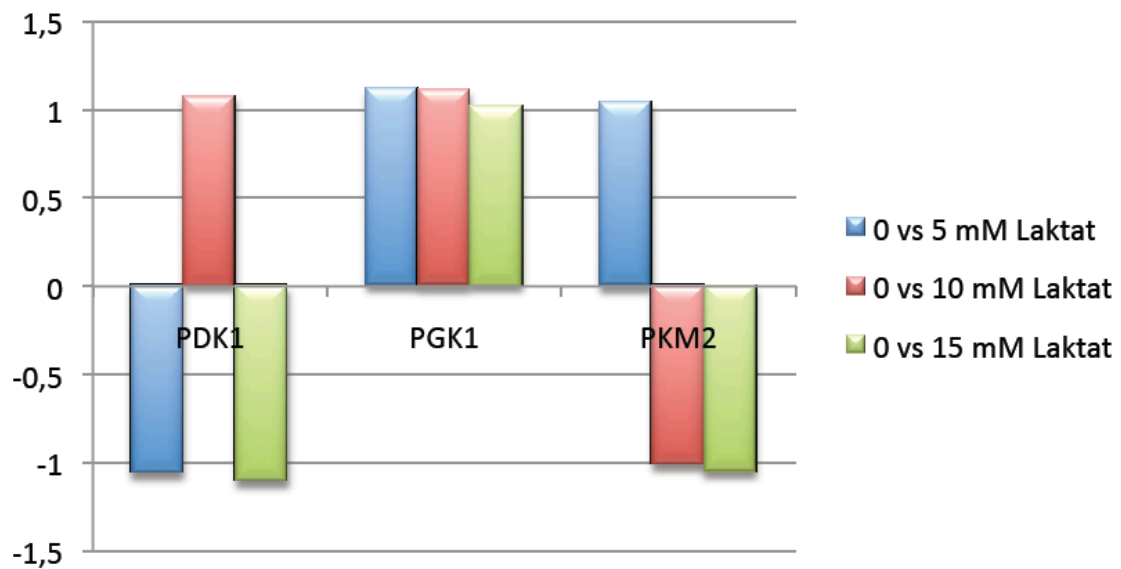
Abb. 22 Microarray – **Hypoxie**



3.2.4.5. DNA Microarray – Differentielle Genexpression – Glykolyse

Abbildung 23 zeigt die veränderte Genexpression von an der Glykolyse beteiligten Genen.

Abb. 23 Microarray – **Glykolyse**



3.3. RTq-PCR

3.3.1. CT-Werte RTq-PCR

Tabelle 9 zeigt die CT Werte der RTq-PCRs in Doppelbestimmung vor Auswertung mittels der REST©-Software (Relative Expression Software Tool, Qiagen) nach Pfaffl (Pfaffl et al., 2002).

Tab. 9 CT-Werte RTq-PCR

	BAX	CASP3	CASP9	GAP43	HMBS	HIF 1α	IL 1β	IL 6	IL 8	IL 26	PDK1
0 mM	25,2	22,83	28,24	27,24	26,62	20,77	31,03	20,36	24,96	26,38	27,08
	24,94	22,97	27,84	27,12	26,5	20,69	30,99	20,59	25,27	26,95	26,52
5 mM	23,89	22,22	26,9	25,83	25,57	20,29	29,33	19,68	23,28	26,01	25,85
	23,96	21,96	27,47	25,57	26,35	19,67	29,42	19,6	23,23	26,11	25,59
10 mM	23,95	22,59	26,94	24,85	26,03	19,42	30,24	19,27	23,83	26,32	26,19
	23,65	22,69	27,15	24,64	26,1	20,01	29,62	19,14	23,83	26,7	25,87
15 mM	24,34	24,09	28,87	26,84	27,81	21,85	30,08	19,6	23,8	26,39	28,12
	24,33	23,65	28,2	26,68	28,05	21,45	29,89	19,71	23,77	25,88	27,38
S1	19,37	19,49	21,13	19,6	20,28	19,51	19,72	19,49	19,9	20,03	19,82
	19,3	19,65	21,07	19,66	20,31	19,31	20,37	19,41	20,03	20,29	19,99
S2	21,75	22,03	23,76	22,04	22,98	21,76	22,37	22,18	22,61	22,69	22,18
	21,72	22,07	23,56	22,03	22,57	21,74	22,54	22,81	22,8	22,61	22,21
S3	23,86	24,26	25,96	24,47	25,15	24,56	25,26	25,21	25,08	25,2	24,84
	24,21	24,41	26,04	24,37	25,52	24,48	24,46	24,96	25,06	25,18	24,62
S4	26,37	26,71	28,61	27,37	27,59	26,93	27,17	27,71	26,92	27,33	26,86
	26,65	26,63	29,33	27,04	27,46	27	27,17	27,47	27,53	28,12	26,93
S5	29,13	29,3	30,62	29,79	30,46	29,8	28,9	30,8	29,26	29,23	29,73
	28,69	29,54	32,02	29,73	31,1	29,4	29,62	29,31	29,23	31,51	29,87
	PGK1	PKM2	P53	TGF β1	TSPAN2	TSPAN13	VEGFA	VEGFB	vHL	WEE1	NFKB
0 mM	21,06	20,17	23,17	24,75	29,34	27,13	23,36	23,39	24,12	24,28	26,37
	21,28	19,97	23,18	24,72	27,83	26,25	24,38	23,55	24,12	24,1	26,14
5 mM	20,05	19,31	22,61	24,08	27,96	27,1	23,73	23,17	23,16	22,46	25,54
	20,56	18,79	22,08	24,02	27,82	26,85	22,3	22,69	23,36	22,52	25,89
10 mM	20,48	19,38	22,77	23,52	25,17	24,11	22,88	22,58	23,36	23,07	25,11
	20,15	19,65	22,84	23,23	24,82	24,04	21,22	22,66	23,61	23,16	25,47
15 mM	21,88	21,03	23,06	25,58	27,47	26,95	23,17	24,04	25,16	24,25	27,26
	21,64	21,19	23,07	25,87	27,92	26,79	24	23,91	24,65	23,96	26,42
S1	19,03	20,77	19,5	20,32	21,47	21,47	21,37	19,98	19,88	21,89	22,95
	18,91	20,6	19,47	20,13	21,05	21,63	20,15	20,15	19,82	22	22,94
S2	26,34	23,3	22,04	22,88	24,46	23,92	22,93	22,56	22,2	24,25	26,26
	26,16	23,41	22,01	22,87	24,55	24,2	23,78	22,37	22,33	24,38	25,7
S3	28,71	26,04	24,04	25,51	26,17	26,5	25,86	24,71	24,86	27,64	29,33
	28,7	25,47	24,07	25,43	26,54	26,75	26,78	25,01	24,65	27,07	29,78
S4	30,11	28,51	25,74	28,14	30,59	28,6	28,95	27,63	27,55	27,76	30,46
	30,66	27,73	25,49	27,92	30,6	29,74	28,83	27,73	27,3	28,78	31,61
S5	32,78	30,16	27,17	30	33,24	32,18	31,15	29,86	29,95	27,46	33,92
	33,02	30,77	26,86	29,78	32,52	32,03	31,79	30,57	29,77	28,32	33,4

3.3.2. REST©-Software Ergebnisse

Die Tabellen 10 – 12 zeigen die Ergebnisse nach Auswertung mittels der REST©-Software (Relative Expression Software Tool, Qiagen) nach Pfaffl (Pfaffl et al., 2002) unter Angabe von Reaktionseffizienz, Expressionsänderung, Standardfehler, 95% Konfidenzintervall und p-Wert der Alternativhypothese (H1 = es besteht ein Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung).

Tab. 10 REST©-Software Daten 5 mM Laktat vs. 0 mM Laktat

Relative Expression Results		5 mM				
Gene	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
BAX	0,9595	1,484	1,189 - 1,857	1,141 - 1,931	0	UP
CASP3	0,9382	1,174	0,844 - 1,645	0,787 - 1,756	0,661	
CASP9	0,8683	1,172	1,073 - 1,286	1,016 - 1,354	0	UP
GAP43	0,883	1,753	1,265 - 2,429	1,264 - 2,430	0	UP
HMBS	0,8697	1				
HIF1a	0,8754	1,101	0,709 - 1,709	0,702 - 1,726	0,661	
IL1β	0,0045	0,692	0,542 - 0,885	0,525 - 0,912	0,169	
IL6	0,8438	1,145	0,876 - 1,514	0,800 - 1,644	0,661	
IL8	0,0084	0,698	0,546 - 0,893	0,529 - 0,921	0,339	
IL26	0,88	1,006	0,820 - 1,292	0,681 - 1,507	0,66	
PDK1	0,9293	1,397	1,009 - 1,976	0,890 - 2,206	0,511	
PGK1	0,6537	1,061	0,945 - 1,202	0,875 - 1,291	0,66	
PKM2	0,938	1,349	0,889 - 2,049	0,869 - 2,096	0,661	
P53	0,3702	0,892	0,642 - 1,241	0,622 - 1,280	0,83	
TGFβ1	0,9296	1,078	0,827 - 1,405	0,809 - 1,437	0,661	
TSPAN2	0,7311	1,006	0,709 - 1,544	0,550 - 1,882	0,661	
TSPAN13	0,8475	0,577	0,425 - 0,825	0,346 - 0,975	0,51	
VEGF-A	0,8168	1,145	0,610 - 2,407	0,446 - 3,035	0,661	
VEGF-B	0,8791	0,966	0,650 - 1,446	0,604 - 1,547	0,83	
vHL	0,8949	1,19	0,993 - 1,429	0,963 - 1,472	0,66	
WEE1	0,7614	1,798	1,432 - 2,258	1,417 - 2,283	0,339	
NFκB	0,8362	0,954	0,830 - 1,097	0,809 - 1,125	0,83	

Tab. 11 REST©-Software Daten 10 mM Laktat vs. 0 mM Laktat

Relative Expression Results		10 mM				
Gene	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
BAX	0,9595	1,724	1,523 - 1,956	1,462 - 2,034	0,169	
CASP3	0,9382	0,871	0,801 - 0,948	0,794 - 0,957	0	DOWN
CASP9	0,8683	1,366	1,251 - 1,496	1,207 - 1,548	0	UP
GAP43	0,883	3,426	3,136 - 3,742	3,135 - 3,744	0	UP
HMBS	0,8697	1				
HIF1a	0,8754	1,389	1,179 - 1,637	1,167 - 1,653	0,169	
IL1β	0,0045	0,737	0,710 - 0,766	0,696 - 0,781	0,339	
IL6	0,8438	1,596	1,431 - 1,786	1,360 - 1,874	0,169	
IL8	0,0084	0,742	0,713 - 0,772	0,700 - 0,785	0,17	
IL26	0,88	0,809	0,651 - 1,015	0,600 - 1,094	0,341	
PDK1	0,9293	1,217	1,053 - 1,428	0,946 - 1,573	0,341	
PGK1	0,6537	1,128	1,016 - 1,263	0,940 - 1,357	0,49	
PKM2	0,938	1,059	0,989 - 1,135	0,966 - 1,161	0,49	
P53	0,3702	0,824	0,792 - 0,858	0,785 - 0,865	0	DOWN
TGFβ1	0,9296	1,794	1,594 - 2,020	1,558 - 2,065	0,339	
TSPAN2	0,7311	5,26	3,615 - 7,762	3,272 - 8,491	0	UP
TSPAN13	0,8475	3,652	2,892 - 4,622	2,791 - 4,783	0	UP
VEGFa	0,8168	2,175	1,352 - 3,923	0,989 - 4,946	0,49	
VEGFβ	0,8791	1,254	1,148 - 1,370	1,145 - 1,373	0,169	
vHL	0,8949	1,101	1,038 - 1,169	1,006 - 1,205	0,169	
WEE1	0,7614	1,348	1,330 - 1,367	1,326 - 1,371	0,339	
NFκB	0,8362	1,319	1,207 - 1,442	1,176 - 1,480	0,169	

Tab. 12 REST©-Software Daten 15 mM Laktat vs. 0 mM Laktat

Relative Expression Results		15 mM				
Gene	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
BAX	0,9595	3,864	3,569 - 4,194	3,425 - 4,362	0	UP
CASP3	0,9382	1,24	0,994 - 1,558	0,927 - 1,662	0,321	
CASP9	0,8683	1,73	1,301 - 2,317	1,209 - 2,479	0	UP
GAP43	0,883	3,074	2,711 - 3,486	2,710 - 3,487	0	UP
HMBS	0,8697	1				
HIF1a	0,8754	1,322	1,081 - 1,617	1,070 - 1,633	0,169	
IL1 β	0,0045	2,368	2,193 - 2,560	2,127 - 2,636	0	UP
IL6	0,8438	3,892	3,490 - 4,348	3,374 - 4,492	0	UP
IL8	0,0084	2,383	2,208 - 2,576	2,139 - 2,656	0	UP
IL26	0,88	3,293	2,636 - 4,311	2,178 - 5,046	0	UP
PDK1	0,9293	1,262	0,922 - 1,766	0,813 - 1,971	0,341	
PGK1	0,6537	1,752	1,530 - 2,023	1,415 - 2,173	0	UP
PKM2	0,938	1,184	1,150 - 1,220	1,130 - 1,242	0	UP
P53	0,3702	2,44	2,265 - 2,633	2,193 - 2,715	0	UP
TGF β 1	0,9296	1,229	1,195 - 1,265	1,176 - 1,286	0	UP
TSPAN2	0,7311	3,841	2,632 - 5,617	2,530 - 5,835	0	UP
TSPAN13	0,8475	2,11	1,676 - 2,698	1,508 - 2,965	0,17	
VEGFa	0,8168	2,794	1,998 - 4,024	1,721 - 4,572	0	UP
VEGF β	0,8791	1,714	1,526 - 1,940	1,418 - 2,076	0	UP
vHL	0,8949	1,427	1,123 - 1,815	1,090 - 1,870	0,169	
WEE1	0,7614	2,473	2,112 - 2,896	2,089 - 2,927	0	UP
NFKB	0,8362	1,652	1,186 - 2,303	1,155 - 2,363	0	UP

3.3.3. RTq-PCR – Differentielle Genexpression mit REST©

Zur besseren Veranschaulichung sind die Ergebnisse der differentiellen Genexpression mittels REST©-Software in Systeme bzw. Stoffwechselwege aufgeteilt. Auf der y-Achse sind die Fold-Change-Werte angegeben, immer im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle (0 mM Laktat) und in Bezug auf das Referenz-Gen Hydroxymethyl-bilane-Synthase (HMBS).

3.3.3.1. RTq-PCR – Differentielle Genexpression – Entzündung

Die Abbildungen 24-26 zeigen die veränderte Genexpression von an der Entzündungsreaktion beteiligten Genen. Tabelle 13 fasst die Zahlenwerte zusammen.

Tab. 13 RTq-PCR – Entzündung – Daten

	0 vs 5 mM	0 vs 10 mM	0 vs 15 mM
IL 1 β	0,692	0,737	2,368
IL 6	1,145	1,596	3,892
IL 8	0,698	0,742	2,383
IL 26	1,006	0,809	3,293
NFKB	0,954	1,319	1,652

Abb. 24 RTq-PCR – Entzündung 0 vs 5 mM Laktat

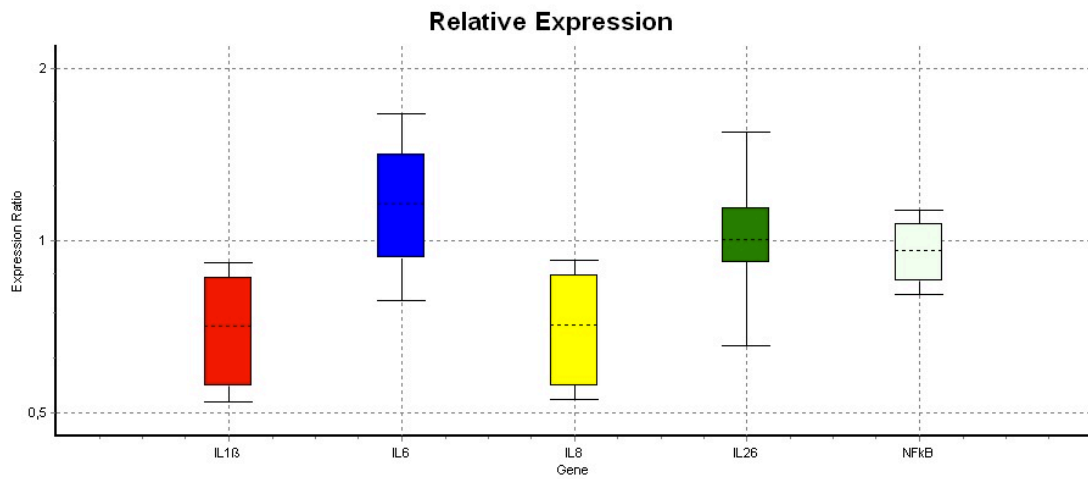


Abb. 25 RTq-PCR – Entzündung 0 vs 10 mM Laktat

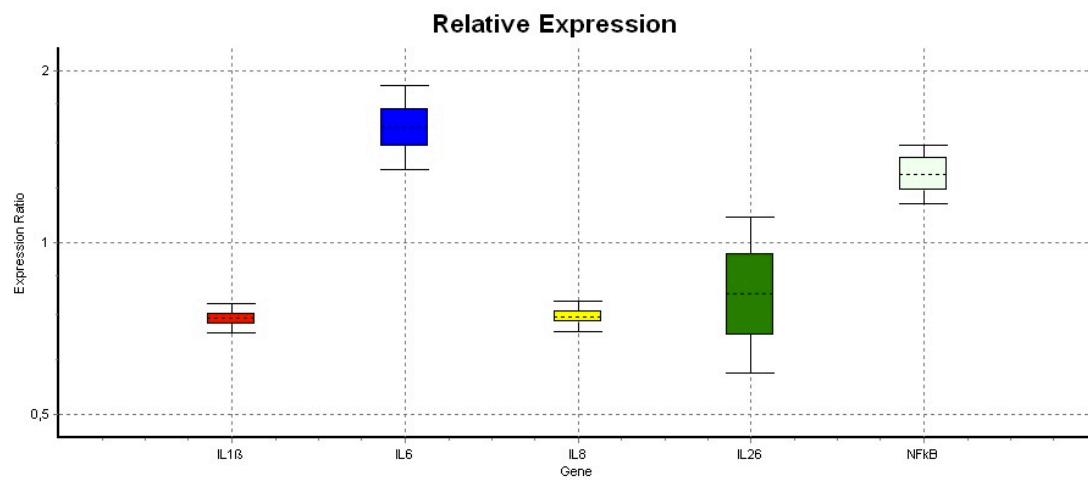
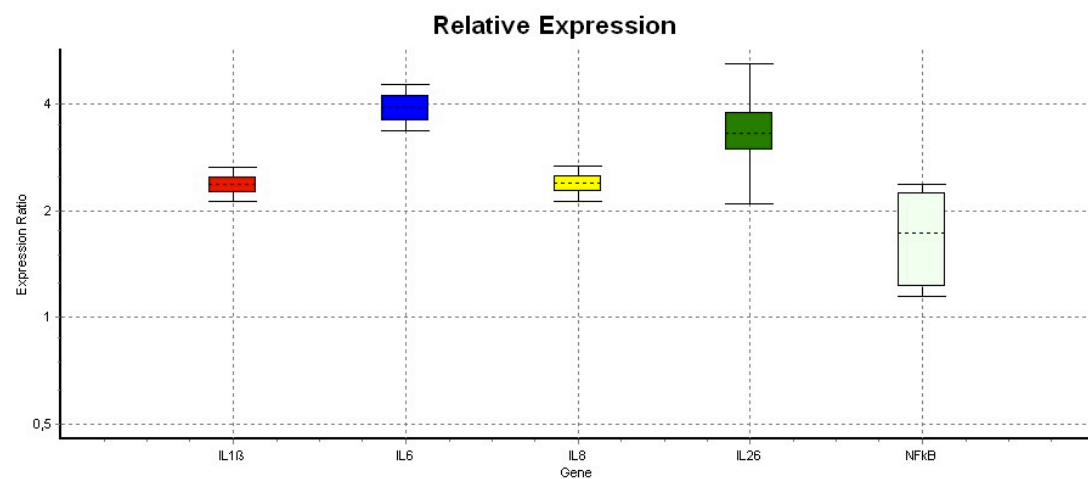


Abb. 26 RTq-PCR – Entzündung 0 vs 15 mM Laktat



3.3.3.2. RTq-PCR – Differentielle Genexpression – Proliferation

Die Abbildungen 27-29 zeigen die veränderte Genexpression von an Proliferation und Wachstum beteiligten Genen. Tabelle 14 fasst die Zahlenwerte zusammen.

Tab. 14 RTq-PCR – **Proliferation** – Daten

	0 vs 5 mM	0 vs 10 mM	0 vs 15 mM
GAP43	1,753	3,426	3,074
TGFβ1	1,078	1,794	1,229
TSPAN2	1,006	5,26	3,841
TSPAN13	0,577	3,652	2,11
VEGF-A	1,145	2,175	2,794
VEGF-B	0,966	1,254	1,714
WEE1	1,798	1,348	2,473

Abb. 27 RTq-PCR – **Proliferation** 0 vs 5 mM Laktat

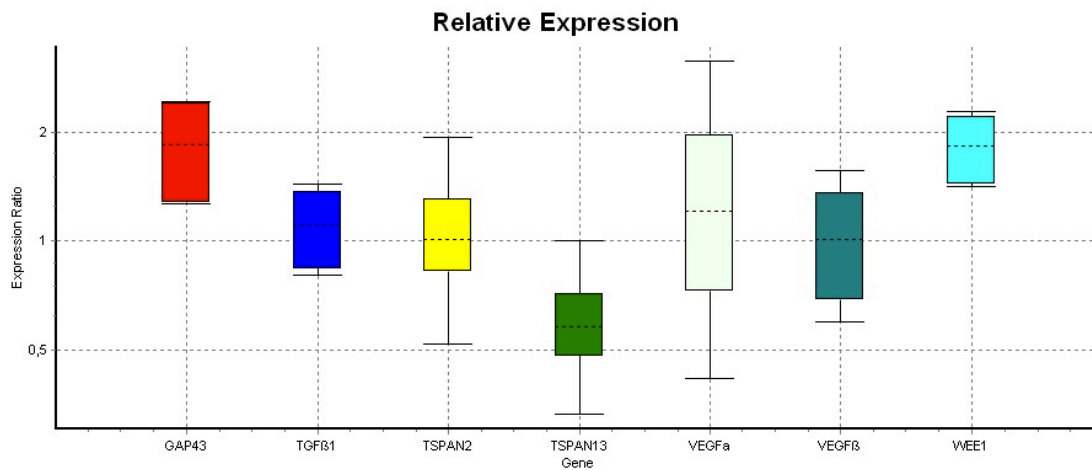


Abb. 28 RTq-PCR – **Proliferation** 0 vs 10 mM Laktat

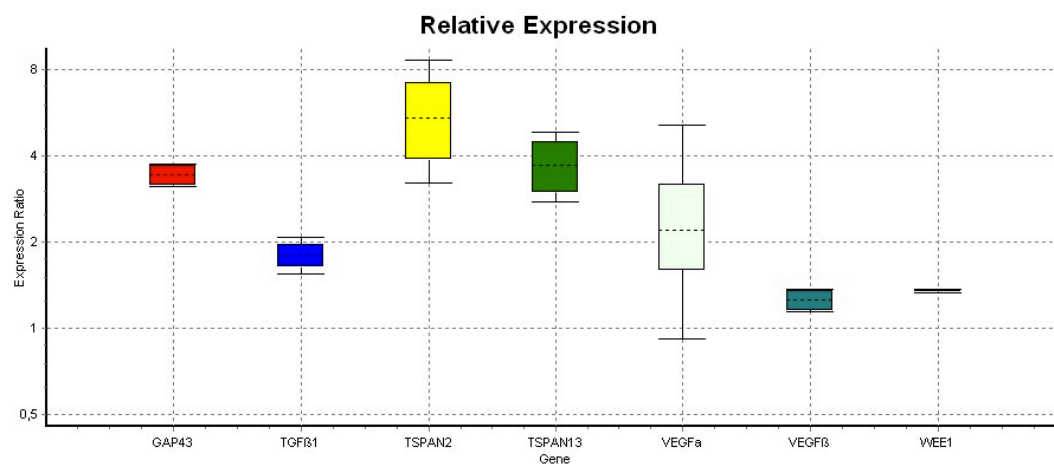
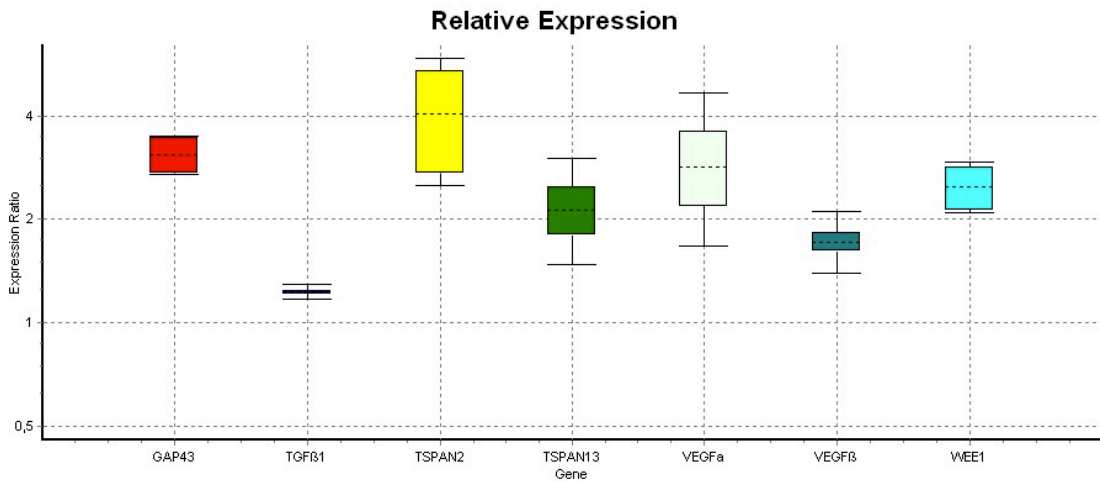


Abb. 29 RTq-PCR – **Proliferation** 0 vs 15 mM Laktat



3.3.3.3. RTq-PCR – Differentielle Genexpression – Apoptose

Die Abbildung 30-32 zeigen die veränderte Genexpression von an der Apoptose beteiligten Genen. Tabelle 15 fasst die Zahlenwerte zusammen.

Tab. 15 RTq-PCR – **Apoptose** – Daten

	0 vs 5 mM	0 vs 10 mM	0 vs 15 mM
BAX	1,484	1,724	3,864
CASP3	1,174	0,871	1,24
CASP9	1,172	1,366	1,73
P53	0,892	0,824	2,44
NFκB	0,954	1,319	1,652

Abb. 30 RTq-PCR – **Apoptose** 0 vs 5 mM Laktat

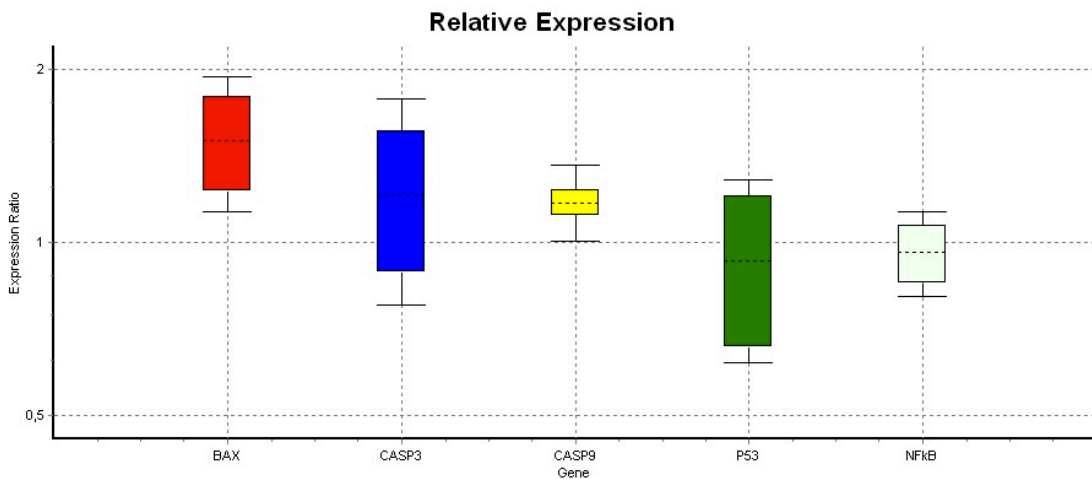


Abb. 31 RTq-PCR – **Apoptose** 0 vs 10 mM Laktat

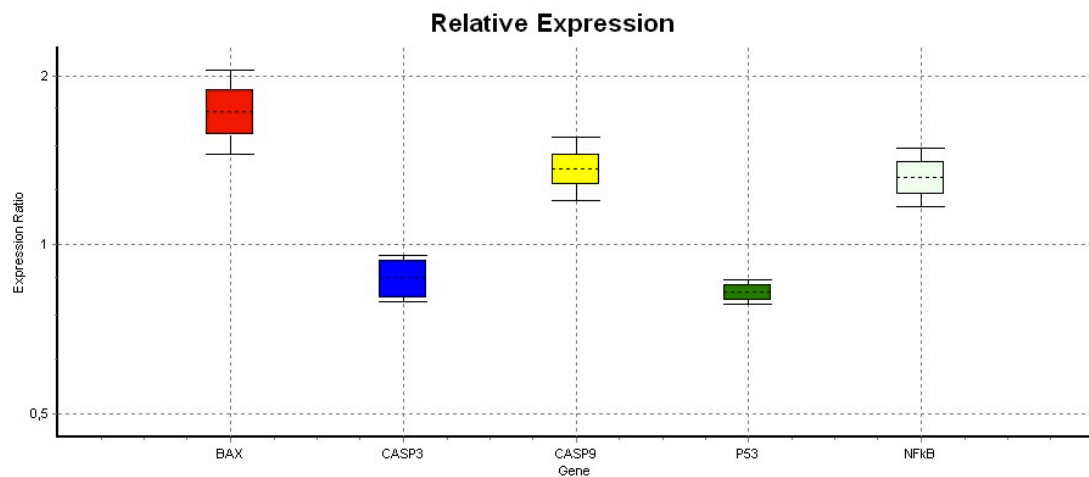
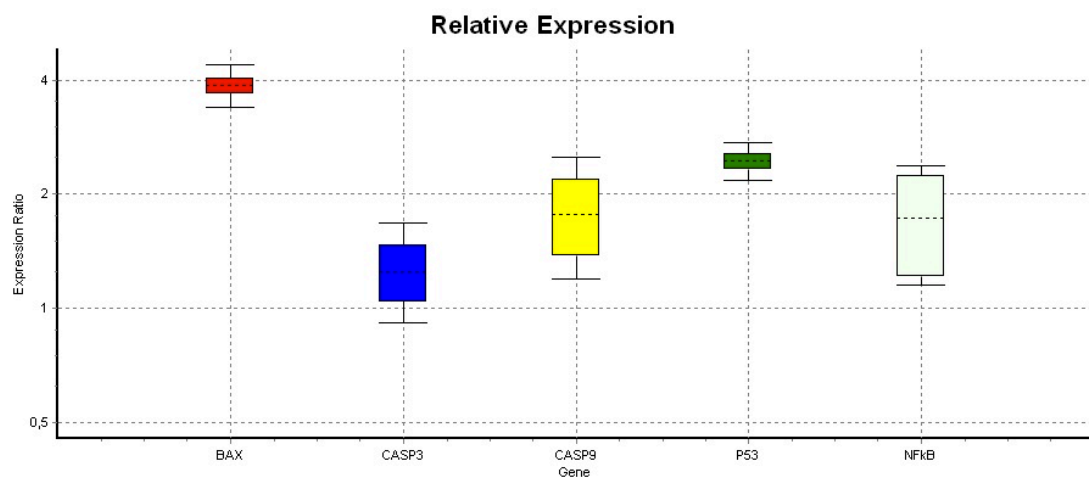


Abb. 32 RTq-PCR – **Apoptose** 0 vs 15 mM Laktat



3.3.3.4. RTq-PCR – Differentielle Genexpression – Hypoxie

Die Abbildungen 33-35 zeigen die veränderte Genexpression von an der Hypoxie-Reaktion beteiligten Genen. Tabelle 16 fasst die Zahlenwerte zusammen.

Tab. 16 RTq-PCR – **Hypoxie** – Daten

	0 vs 5 mM	0 vs 10 mM	0 vs 15 mM
HIF1 α	1,101	1,389	1,322
VEGF-A	1,145	2,175	2,794
VEGF-B	0,966	1,254	1,714
vHL	1,19	1,101	1,427

Abb. 33 RTq-PCR – Hypoxie 0 vs 5 mM Laktat

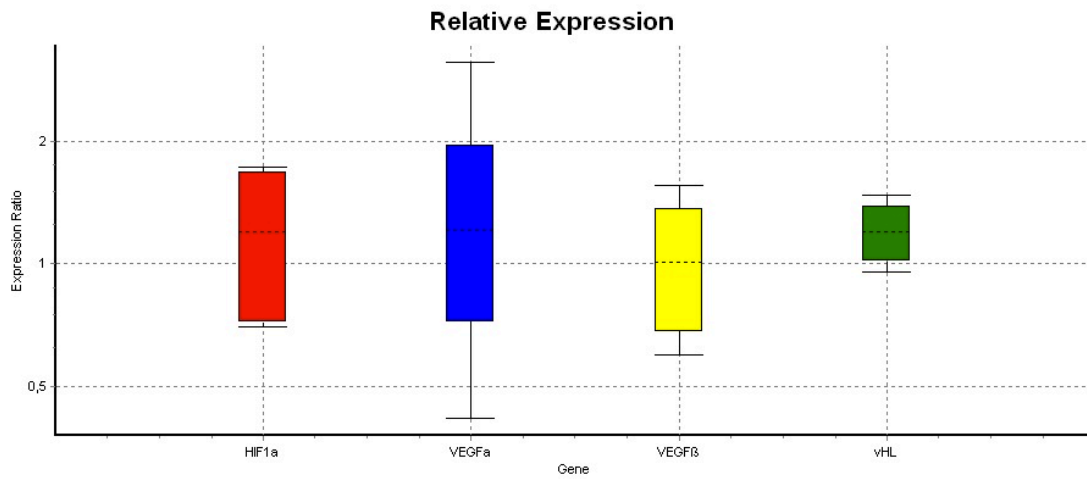


Abb. 34 RTq-PCR – Hypoxie 0 vs 10 mM Laktat

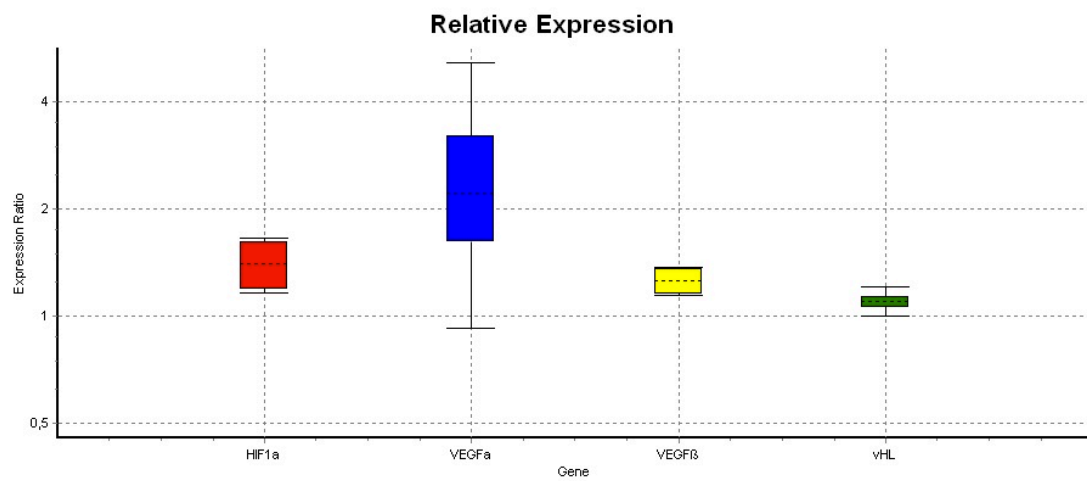
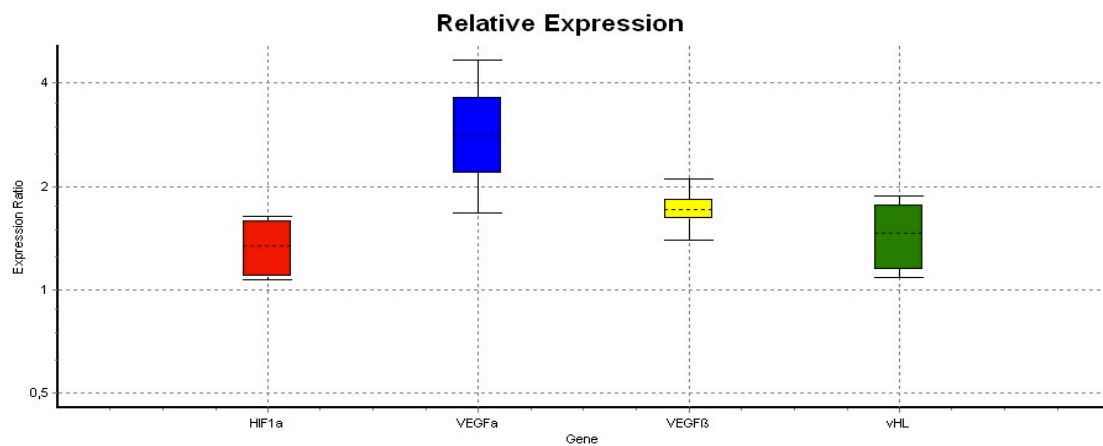


Abb. 35 RTq-PCR – Hypoxie 0 vs 15 mM Laktat



3.3.3.5. RTq-PCR – Differentielle Genexpression – Glykolyse

Die Abbildungen 36-38 zeigen die veränderte Genexpression von an der Glykolyse beteiligten Genen. Tabelle 17 fasst die Zahlenwerte zusammen.

Tab. 17 RTq-PCR – **Glykolyse** – Daten

	0 vs 5 mM	0 vs 10 mM	0 vs 15 mM
PDK1	1,397	1,217	1,262
PGK1	1,061	1,128	1,752
PKM2	1,349	1,059	1,184

Abb. 36 RTq-PCR – **Glykolyse** 0 vs 5 mM Laktat

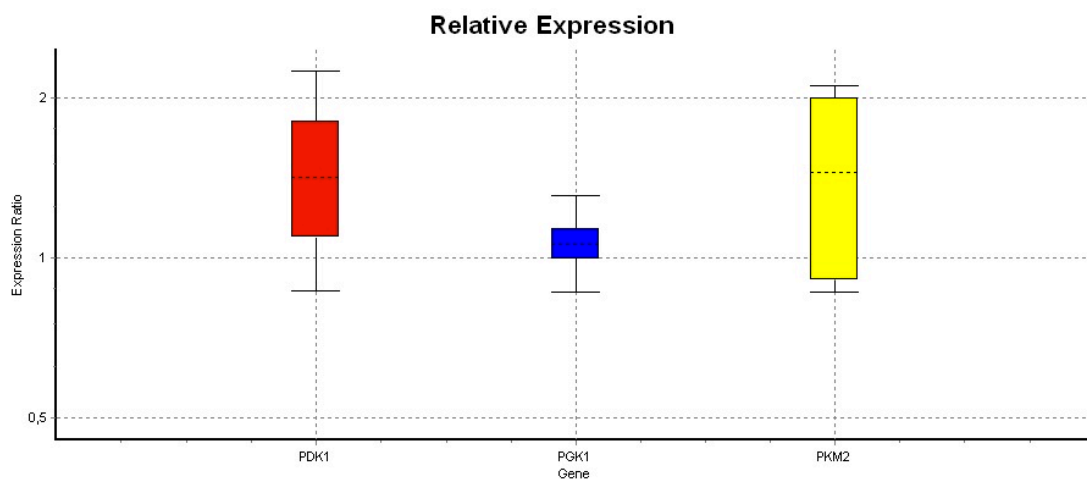


Abb. 37 RTq-PCR – **Glykolyse** 0 vs 10 mM Laktat

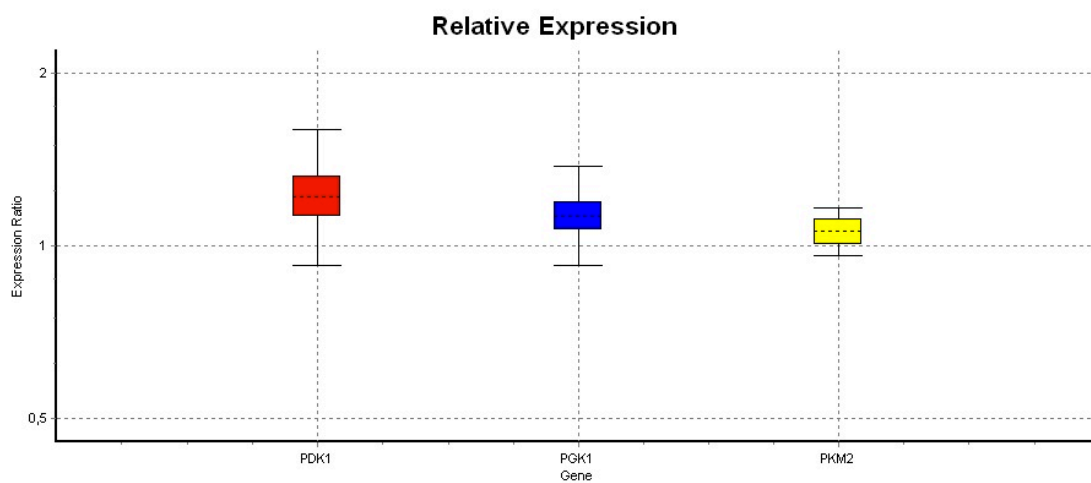
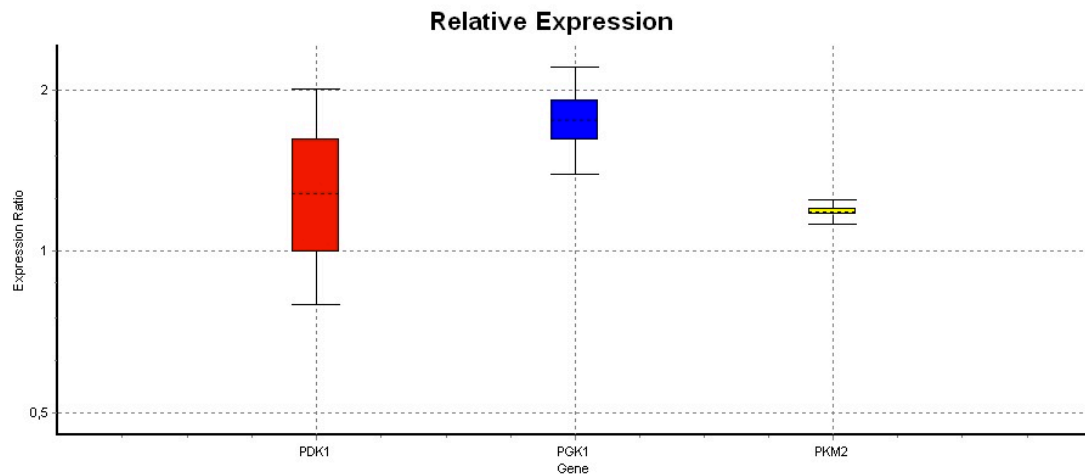


Abb. 38 RTq-PCR – **Glykolyse** 0 vs 15 mM Laktat



4. Diskussion

Die Bedeutung von Laktat und seine Funktion im menschlichen Organismus haben in den letzten Jahren durch neue Erkenntnisse einen deutlichen Schub erfahren und sind heute Gegenstand verschiedenster Forschungsansätze. Durch seine steuernden und regulierenden Funktionen erscheint Laktat unter anderem von besonderem Interesse im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen. Chronische, nicht heilende Wunden, insbesondere diabetische Ulzera, stellen klinisch nach wie vor eine große Herausforderung dar und bedürfen einer intensiven Therapie und Wundversorgung. Allein in den USA leiden derzeit etwa 6 Millionen Menschen an chronischen, nicht heilenden Wunden, weshalb die Verbesserung der Wundheilung nach wie vor das Ziel diverser Forschungsbestrebungen darstellt (Löffler et al., 2011; Sen et al., 2009). In heilenden Wunden finden sich teilweise erhöhte Laktat-Konzentrationen von bis zu 5 – 15 mM, als deren Ursache man früher die vorherrschende Gewebshypoxie ansah (Hunt, 1990; Hunt et al., 1978), wobei heute bekannt ist, dass das Sauerstoffangebot nur sehr geringe Auswirkungen auf die Laktat-Konzentrationen in Wunden hat (Hunt et al., 1978; Sheikh et al., 2000). Bei der meist vorübergehenden Entzündungsreaktion in heilenden Wunden und der damit einhergehenden Produktion von reaktiven

Sauerstoffspezies zur Bakterienbekämpfung durch Leukozyten entsteht unter anderem durch anaerobe Glykolyse auch Laktat. (Eming et al., 2007; Hunt TK, 1992). Des Weiteren kann Laktat auch durch sich im Wundmilieu befindliche Bakterien entstehen (Fuchs et al., 2007; Kohler et al., 2005). Somit kann die Laktat-Konzentration, wie von Löffler et al. gezeigt, möglicherweise als Marker für eine Wundinfektion Verwendung finden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in der Wundflüssigkeit vorherrschende Laktat-Konzentration mit darüber entscheidet, ob es zu einer normalen Wundheilung oder zur Ausbildung einer chronischen, nicht heilenden Wunde kommt (Löffler et al., 2011). Die bereits bekannte Auswirkung des Laktats auf die Angiogenese, nämlich eine Induktion der vascular endothelial growth factor (VEGF) Synthese, führt zu einer Migration von Endothelzellen auch in Abwesenheit von Hypoxie (Beckert et al., 2006). 2008 konnten Milovanova et al. zeigen, dass Laktat in der Lage ist die Rekrutierung und Differenzierung von Stammzellen über Thioredoxin (Trx) und hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) zu stimulieren und Stammzellen somit über die Metabolisierung von Laktat eine aktive Rolle in ihrer eigenen Rekrutierung und Differenzierung spielen, im Sinne einer autokrinen Stimulation (Milovanova et al., 2008). Diese autokrine Rekrutierung scheint für die Wundheilung von besonderer Bedeutung zu sein.

Der Wundheilungsprozess selbst lässt sich in die drei Phasen Entzündung, Proliferation und Gewebeumbau unterteilen (Werner and Grose, 2003). Im Zusammenhang mit Wundheilungsprozessen sind in letzter Zeit auch vermehrt mesenchymale Stammzellen in den Blickpunkt gerückt.

Pluripotente humane mesenchymale Stammzellen (hMSC), die unter anderem auch gut zugänglich im Knochenmark des Erwachsenen zu finden sind, zeichnen sich durch ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential aus. Mesenchymale Stammzellen sind in der Lage sich in unterschiedliche mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knorpel, Fett, Muskel, Stützgewebe, Sehnen und Bänder zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Ebenso scheinen sich hMSCs auch im Bereich von heilenden Wunden anzureichern und hier womöglich zum Heilungsprozess beizutragen (Cha and Falanga, 2007). Dieser Beitrag besteht offensichtlich nicht nur in der reinen Differenzierung der

Stammzellen zu Gewebezellen, sondern auch in ihrer Fähigkeit bestimmte Cytokine und Chemokine zu produzieren (Togel et al., 2005). Ebenso sind parakrine Mechanismen von hMSCs beschrieben, unter anderem im Bezug auf Kardioprotektion und Funktionsverbesserung nach Myokardinfarkt (Gnecchi et al., 2006).

Die schon beschriebene Rekrutierung und Differenzierung von Stammzellen durch Laktat lässt die Frage aufkommen, ob Laktat auch direkten Einfluss auf das Genexpressionsprofil von Stammzellen nehmen kann (Milovanova et al., 2008). Erste Ergebnisse von Zieker et al. scheinen dies zu bestätigen (Zieker et al., 2008).

Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression von hMSCs in Abhängigkeit von verschiedenen Laktat-Konzentrationen wurde zur hypothesenfreien Untersuchung eine Microarray-Analyse durchgeführt, um erste Anhaltspunkte zu bekommen auf welche Stoffwechselwege Laktat Einfluss nehmen kann. Im Anschluss diente die RTq-PCR der genaueren Betrachtung von Kandidaten-Genen, welche uns aufgrund ihrer Assoziation mit bereits bekannten Wundheilungsprozessen von besonderem Interesse erschienen.

Generell konnten wir zeigen, dass eine moderate Laktat-Konzentration von 5 – 10 mM prinzipiell eher die Genexpression von anti-apoptischen, anti-inflammatorischen und wachstumsfördernden Genen begünstigt, während eine sehr hohe Laktat-Konzentration von 15 mM eher gegensätzlich die Genexpression von pro-apoptischen und pro-inflammatorischen Genen fördert. Im Folgenden werden die mittels RTq-PCR und REST®-Software (Pfaffl et al., 2002) ermittelten, signifikanten Kandidaten beschrieben und im jeweiligen Kontext diskutiert.

4.1. Entzündung

Die erste Phase des Wundheilungsprozesses ist durch die Entzündungsreaktion charakterisiert. Während bei der physiologischen Wundheilung die inflammatorische Phase im Laufe der Regeneration abklingt, zeichnen sich chronische, nicht heilende Wunden durch eine persistierende

Entzündungsreaktion aus. Die in der frühen Wundheilungsphase beschriebenen Mediatoren und Cytokine sind unter anderem Interleukin 1 β (IL1 β), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (IL8) und Interleukin 12 (IL12) (Koh and DiPietro, 2011).

Interleukin 1 β ist ein hochwirksames Zytokin, welches in der Lage ist durch Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, Akute-Phase-Proteinen, IL6 und anderen eine hochgradige Entzündungsreaktion hervorzurufen. Aber auch in weiteren Prozessen wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose spielt Interleukin 1 β eine wichtige Rolle (Dinarello, 2005).

Interleukin 6, eine pleiotropes Glykoprotein, das unter anderem von diversen Zelltypen wie Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert wird, fungiert als hochpotentes Cytokin. Es führt sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungsreaktionen zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen (C-reactive protein (CRP), γ -Fibrinogen, Angiotensinogen und anderen). IL6 ist eines der am stärksten durch den „nuclear factor kappa light chain enhancer of activated b cells“ (NF κ B) induzierten Cytokine und wird klinisch als Marker für signifikante vaskuläre Entzündungen verwendet. (Brasier, 2010).

Interleukin 8 gilt ebenfalls als pro-inflammatorischer Entzündungsmediator, der zum einen wichtig für die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten ist, zum anderen aber auch die Proliferation von Endothelzellen fördert, die Apoptose von Epithelzellen unterdrückt, und regulativ in die Angiogenese eingreift (Li et al., 2003). Auch in der pathologischen Gefäßneubildung von Tumoren, dem Tumorwachstum und der Metastasenbildung scheint Interleukin 8 direkt regulatorisch aktiv zu sein (Li et al., 2003; Vlahopoulos et al., 1999).

Interleukin 26 (IL26) gehört zur Familie der IL-10-Cytokine, die durch ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften zur Förderung der Wundheilung beitragen können (Ouyang et al., 2011). Die Tumorgenese, ein Prozess des pathologischen Wachstums von diversen Geweben, ist klinisch und epidemiologisch in vielen Fällen mit der Entzündungsreaktion, insbesondere mit einer chronischen Entzündungsreaktion vergleichbar. Die tumorwachstumsfördernden Eigenschaften von IL6 in allen Stadien der

Tumorentwicklung, von der Entstehung, über die Förderung des Tumorwachstums bis zur Metastasenbildung, sind bereits bestens bekannt und beschrieben (Grivennikov and Karin, 2011). Bereits 1925 konnte Otto Warburg zeigen, dass in Tumorgewebe selbst unter normoxischen Bedingungen etwa zehnmal soviel Glukose anaerob verstoffwechselt und dadurch zu Laktat abgebaut wird, als in normalem, nicht entartetem Gewebe (Warburg, 1925). Diese Beobachtung wurde später als der Warburg-Effekt bekannt (Racker, 1972). Bei den von uns untersuchten Entzündungsmediatoren zeigte sich bei moderaten Laktat-Konzentrationen von 5 bzw. 10 mM eine eher anti-inflammatorisch wirkende Suppression von Interleukin 1 β um den Faktor 0,692 bzw. 0,737 und Interleukin 8 um den Faktor 0,698 bzw. 0,742.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer Laktat-Konzentration von 15 mM eine eher pro-inflammatorisch wirkende, deutliche Überexpression der Cytokine Interleukin 6 (3,892), Interleukin 26 (3,293), Interleukin 1 β (2,368), Interleukin 8 (2,383) sowie NF κ B (1,652) um die jeweils in Klammern angegebenen Faktoren. Des Weiteren konnten wir eine mit steigender Laktat-Konzentration (5, 10, 15 mM) kontinuierlich zunehmende Expression von IL6 um die Faktoren 1,145 bzw. 1,596 und 3,892 nachweisen. Bei NF κ B zeigte sich bei 10 und 15 mM Laktat ebenfalls eine ansteigende Expression um den Faktor 1,319 bzw. 1,652.

Unsere Daten zeigen demnach einen mit steigender Laktat-Konzentration zunehmende Expressionsrate von inflammatorischen und auch tumorwachstumsfördernden Cytokinen.

4.2. Wachstum und Proliferation

Die zweite Phase des Wundheilungsprozesses umfasst Proliferation und Wachstum. Die von uns ausgewählten Kandidaten umfassen den transforming growth factor β 1 (TGF β 1), der vielfältige Funktionen in Prozessen wie Zellwachstum, -proliferation, -differenzierung und Apoptose erfüllt (Li et al., 2006). Wir konnten eine moderate Überexpression von TGF1 β um den Faktor 1,794 bei 10 mM Laktat nachweisen, wohingegen sich bei 5 bzw. 15 mM Laktat keine relevanten Expressionsänderungen zeigten.

Des Weiteren untersuchten wir das Growth Associated Protein 43 (GAP43), das mit Wachstum und Plastizität von Neuronen in Verbindung gebracht wird. Es konnte in hohen Konzentrationen im Wachstumskegel (spezialisiertes Vorderende eines Axons) von Neuronen während deren Entwicklung sowie der axonalen Regeneration nachgewiesen werden (Mahalik et al., 1992; Meiri et al., 1998; Zhao et al., 2011). Im Laufe der Entwicklung wird GAP43 physiologischerweise herunterreguliert (Skene, 1989). So ist offenkundig bei einer Hochregulation von GAP43 von gesteigerter neuronaler Plastizität und Wachstum auszugehen, was nicht nur in Wundheilungsprozesse von besonderem Interesse erscheint. In der RTq-PCR zeigte sich eine laktatkonzentrationsabhängige (5, 10, 15 mM), deutliche Überexpression des Growth Associated Protein 43 (GAP43) um die Faktoren 1,753 bzw. 3,426 und 3,074, wobei wie bei TGF β 1 durch 10 mM Laktat die höchste Expressionsänderung erreicht wurde.

Tetraspanin 2 (TSPAN 2) und Tetraspanin 13 (TSPAN 13) gehören zur Familie der etwa 30 bekannten Tetraspanine. Es handelt sich dabei um hochkonservierte Transmembranproteine, die in beinahe allen multizellulären Eukaryoten vorkommen. Ihnen werden Schlüsselrollen in Prozessen wie Zell-Zell-Kommunikation, Gewebeorganisation und Zellmobilität zugeschrieben. Des Weiteren haben die verschiedenen Tetraspanine weitreichenden Einfluss auf das Nervensystem, das Immunsystem und die Tumorgenese (Hemler, 2003; Wright et al., 2004). Es konnte an TSPAN24/CD151-Knock-Out Mäusen gezeigt werden, dass es durch das Fehlen von TSPAN24 zu einer insuffizienten Wundheilung aufgrund von Beeinträchtigung der Re-Epithelialisierungsprozesse kommt. Dies könnte auf gestörte Membranformationen, Epithelzelladhäsion und -migration zurückgeführt werden (Cowin, 2006). Unsere Daten zeigten bei 10 mM Laktat eine deutliche Überexpression von TSPAN 2 um dem Faktor 5,26 und von TSPAN 13 um dem Faktor 3,652.

Die Funktion der WEE1-Tyrosinkinase ist ein hochkonservierter Prozess, der den zeitlichen Eintritt in die mitotische Zellteilung steuert und somit eine Schlüsselrolle in der Zellzyklus-Progression spielt. Bereits 1978 konnte die

wichtige Funktion der WEE1-Tyrosinkinase als Checkpoint zur Koordination von Zellwachstum und Zellteilung am G2/M Übergang an Hefezellen gezeigt werden (Fantes and Nurse, 1978). Durch Phosphorylierung der Cyclin dependent Kinase 1 (CDK1) alias Cell division control protein 2 (CDC2) durch die WEE1-Tyrosinkinase kommt es zu einem verzögerten Mitose-Eintritt der Zellen und damit zu weiterem Zellwachstum. Während des Mitose-Eintritts selbst kommt es zu einer Suppression der WEE1-Tyrosinkinase und somit zu einer relativen Überaktivität von CDK1, die Hemmung des Mitose-Eintritts ist also aufgehoben. Jedoch ist die alleinige Suppression der WEE1-Tyrosinkinase offenbar nicht ausreichend um die Mitose einzuleiten, weitere Faktoren wie beispielsweise die Synthese von Cyclinen sind essentiell (Coleman and Dunphy, 1994). Ein Funktionsverlust der WEE1-Tyrosinkinase resultiert in einem verfrühten Mitose-Eintritt der Zellen und somit in einer gesteigerten Teilungsrates mit daraus resultierenden kleineren, hypotrophen Tochter-Zellen (Kellogg, 2003). In verschiedenen Tumoren, wie dem Glioblastom und dem Mamma-Karzinom konnte bereits eine WEE1-Tyrosinkinase-Überexpression nachgewiesen werden. WEE1-Tyrosinkinase-Inhibition im Tierversuch führte zu einem reduzierten Überleben von Krebszellen durch verfrühten Mitose-Eintritt mit irreparablen, letalen DNA Schäden. Daher scheint die WEE1-Tyrosinkinase ebenfalls eine wichtige Rolle für die Tumorgenese und zukünftige Therapieansätze zu spielen (De Witt Hamer et al., 2011).

Wir konnten bei 10 mM Laktat eine moderate Expressionänderung von WEE1 um Faktor 1,348, im Gegensatz zu einer deutlichen Expressionserhöhung bei 5 mM und 15 mM um die Faktoren 1,798 bzw. 2,473 nachweisen.

Kürzlich wurde von Hong et al. eine Induktion der WEE1-Tyrosinkinase durch Hypoxie beschrieben (Hong et al., 2011). In unseren Ergebnissen konnten wir eine Induktion der WEE1-Tyrosinkinase durch Laktat unter normoxischen Bedingungen nachweisen.

Wie bereits von Constant et al. in der Literatur beschrieben (Constant et al., 2000) konnten auch wir eine mit der Laktat-Konzentration bei 10 mM und 15 mM ansteigende Expression von VEGF-A um den Faktor 2,175 bzw. 2,794 und

VEGF-B um den Faktor 1,254 bzw. 1,714 nachweisen, was wir als Validierung im Bezug auf die anderen von uns erhobenen Daten werten.

Generell zeigte das Genexpressionsprofil der hMSCs bei einer moderaten Laktat-Konzentration von 10 mM bei den von uns untersuchten, mit Wachstum und Proliferation assoziierten Kandidatengen eine teils deutliche Überexpression.

4.3. Apoptose

Die Apoptose spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei Wundheilungsprozessen und kann bei Dysregulation zu pathologischen Formen der Wundheilung wie beispielsweise überschießender Narbenbildung führen (Greenhalgh, 1998).

Die Aktivierung des Bcl-2 associated X protein (BAX) durch das tumor protein 53 (p53) induziert die Einleitung der Apoptose und führt so zum programmierten Zelltod (Shabnam et al., 2004). Die Effektor-Caspase 3 (CASP3) stellt die gemeinsame Endstrecke der extrinsisch und intrinsisch aktivierten Apoptose dar und führt unter anderem zu einer DNA-Fragmentierung und dem Abbau des Zytoskeletts sowie nukleären Proteinen (Martinvalet et al., 2005).

Bei moderaten Laktat-Konzentrationen von 5 – 10 mM zeigte das Genexpressionsprofil der hMSCs prinzipiell eher anti-apoptotische Effekte. So zeigte sich bei dem p53 Co-Faktor BAX nur ein sehr moderater Anstieg bei 5 mM um den Faktor 1,484 und bei 10 mM Laktat um den Faktor 1,724. Ähnlich verhielt es sich bei p53, wo sich bei 10 mM Laktat sogar eine geringe Suppression um den Faktor 0,824 zeigte. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass auch die Effektor-Caspase 3 bei 10 mM Laktat um den Faktor 0,871 leicht supprimiert wurde. Im Gegensatz dazu konnten wir bei einer hohen Laktat-Konzentration von 15 mM eher pro-apoptotische Effekte nachweisen. So ergab sich bei 15 mM Laktat eine teilweise deutliche Überexpression von pro-apoptotischen Faktoren: BAX zeigte eine erhöhte Expression um den Faktor 3,864, p53 um den Faktor 2,44, Caspase 9 um den Faktor 1,73 und NFκB um den Faktor 1,652.

4.4. Hypoxie

Wider Erwarten zeigte sich trotz der durch Laktat simulierten hypoxischen Situation keine signifikante Regulation der von uns untersuchten, mit Hypoxie assoziierten Faktoren hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) und von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (vHL) (Haase, 2009). Lediglich der in 4.2 beschriebene, laktatkonzentrationsabhängige Anstieg von VEGF-A und VEGF-B konnte von uns nachweisen werden.

4.5. Glykolyse

Ebenso unerwartet zeigten sich die von uns untersuchten, mit der Glykolyse assoziierten Kandidaten pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) und pyruvate kinase isoenzyme M2 (PKM2) trotz hoher Laktat-Konzentrationen nicht signifikant verändert, obwohl Laktat bekanntlich das Stoffwechselendprodukt der anaeroben Glykolyse ist. Lediglich eine moderate Überexpression der phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) bei 15 mM Laktat um den Faktor 1,752 konnte nachgewiesen werden.

4.6. Schlussfolgerung

Die von uns erhobenen Daten zeigen eine deutliche, von der Laktat-Konzentration abhängige Genexpressionänderung der hMSCs von Genen, die mit Wundheilung, pathologischer Proliferation, und Tumorwachstum in Verbindung stehen, und bieten so neue Ansätze, unter anderem für die Therapie von chronischen, nicht heilenden Wunden.

Eine grundlegende Phänotyp-Änderung der hMSCs konnte von uns allerdings nicht nachgewiesen werden.

Uns ist bewusst, dass dies Expressions-Ergebnisse sind und der Nachweis auf Protein-Ebene noch aussteht.

5. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Laktat in verschiedenen Konzentrationen (5, 10 und 15 mM Laktat) auf das Genexpressionsprofil von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. Zur Bedeutung von Laktat und seiner Funktion im menschlichen Organismus konnten in den letzten Jahren neue Erkenntnisse gewonnen werden, weshalb Laktat zunehmend Gegenstand intensiver Forschung ist. Insbesondere im Zusammenhang mit Wundheilungsprozesse scheint Laktat sowohl in heilenden als auch in chronischen, nicht heilenden Wunden von besonderem Interesse zu sein. Es wurden humane mesenchymale Stammzellen mit 0, 5, 10 und 15 mM Laktat behandelt und über 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine hypothesenfreie Untersuchung mittels der Microarray-Analyse durchgeführt, um erste Anhaltspunkte für Genexpressionänderung zu erlangen. Mit Hilfe dieser ersten Ergebnisse der Microarray-Analyse wurden dann im Hinblick auf die Wundheilung besonders interessante Kandidaten ausgewählt und mit der Methode der quantitativen Real Time PCR nachgewiesen. Diese Kandidatengene spielen wichtige Rollen in Prozesse wie Entzündungsreaktion, Wachstum und Proliferation, Apoptose, Hypoxie und Glykolyse. Wir konnten zeigen, dass Laktat direkt Einfluss auf das Genexpressionsprofil der humanen mesenchymalen Stammzellen nimmt, wobei eine grundlegende Phänotyp-Änderung der hMSCs jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Es zeigten sich bei moderaten, in heilenden Wunden vorkommenden Laktat-Konzentrationen von 5 und 10 mM generell eher wundheilungsfördernde Expressionänderungen. So konnten wir bei diesen moderaten Laktat-Konzentrationen eine potenziell entzündungshemmende Konstellation durch Suppression von Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1 β und Interleukin 8 nachweisen. Im Bezug auf die Prozesse Wachstum und Proliferation konnten wir bei den moderaten Laktatkonzentrationen ebenfalls wundheilungsfördernde Genexpressionänderungen nachweisen. So fanden wir eine deutliche Überexpression von TGF β 1, GAP43, TPSAN 2, TSPAN 13 sowie WEE1. Der bereits in der Literatur beschriebene Einfluss von Laktat auf die Expression von VEGF-A und VEGF-B konnte von uns ebenfalls bestätigt werden, was wir als

gewisse Validierung der von uns erhobenen Daten werten. Für mit dem programmiertem Zelltod (Apoptose) assoziierten Kandidaten zeigte das Genexpressionsprofil bei moderaten Laktat-Konzentrationen ebenfalls eher wundheilungsfördernde Regulationen. So konnten wir bei p53 eine geringe Suppression bei 10 mM Laktat nachweisen, bei dem p53 Co-Faktor BAX ergab sich nur ein sehr moderater Anstieg.

Bei einer sehr hohen Laktat-Konzentration von 15 mM, wie man sie auch in chronischen, nicht heilenden Wunden finden kann, zeigten sich pro-inflammatorische Expressionänderungen. So fanden sich die Entzündungsmediatoren IL1 β , IL6, IL8, IL26 und NF κ B deutlich überexprimiert. Ebenso konnten wir pro-apoptische Expressionveränderungen durch Hochregulation von BAX und p53 nachweisen.

Wider Erwarten zeigte sich trotz der durch Laktat simulierten hypoxischen Situation keine signifikante Regulation der mit Hypoxie assoziierten Kandidaten HIF1 α und vHL. Ebenso konnten wir keine signifikante Regulation der mit der Glykolyse assoziierten Kandidaten nachweisen, obwohl Laktat das Stoffwechselendprodukt der anaeroben Glykolyse ist. Lediglich eine moderate Überexpression von PGK1 bei 15 mM Laktat konnte nachgewiesen werden.

Die von uns erhobenen Daten zeigen eine deutliche, von der Laktat-Konzentration abhängige Genexpressionänderung von Genen, die sowohl mit der Wundheilung, als auch mit pathologischer Proliferation in Verbindung stehen und bieten so neue Ansätze, unter anderem für die Therapie von chronischen, nicht heilenden Wunden.

Uns ist bewusst, dass dies Expression-Ergebnisse sind und der Nachweis auf Protein-Ebene noch aussteht.

6. Literaturverzeichnis

Bammler, T., Beyer, R.P., Bhattacharya, S., Boorman, G.A., Boyles, A., Bradford, B.U., Bumgarner, R.E., Bushel, P.R., Chaturvedi, K., Choi, D., *et al.* (2005). Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods* 2, 351-356.

Beckert, S., Farrahi, F., Aslam, R.S., Scheuenstuhl, H., Konigsrainer, A., Hussain, M.Z., and Hunt, T.K. (2006). Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound Repair Regen* 14, 321-324.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125, 279-284.

Bergman, B.C., Wolfel, E.E., Butterfield, G.E., Lopaschuk, G.D., Casazza, G.A., Horning, M.A., and Brooks, G.A. (1999). Active muscle and whole body lactate kinetics after endurance training in men. *J Appl Physiol* 87, 1684-1696.

Bernard, P.S., and Wittwer, C.T. (2000). Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem* 46, 147-148.

Boutellier, U. (2006). Die Milchsäure. *Zschr Sportmed Sporttraum* 54, 109-109.

Brasier, A.R. (2010). The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 86, 211-218.

Brazma, A. (2009). Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)--successes, failures, challenges. *ScientificWorldJournal* 9, 420-423.

Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., *et al.* (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29, 365-371.

Brooks, G.A. (1986a). Lactate production under fully aerobic conditions: the lactate shuttle during rest and exercise. *Fed Proc* 45, 2924-2929.

Brooks, G.A. (1986b). The lactate shuttle during exercise and recovery. *Med Sci Sports Exerc* 18, 360-368.

Brooks, G.A. (2002). Lactate shuttle -- between but not within cells? *J Physiol* 541, 333-334.

Brooks, G.A. (2007). Lactate: link between glycolytic and oxidative metabolism. *Sports Med* 37, 341-343.

Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622.

Cha, J., and Falanga, V. (2007). Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 25, 73-78.

Coleman, T.R., and Dunphy, W.G. (1994). Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol* 6, 877-882.

Consoli, A., Nurjhan, N., Reilly, J.J., Jr., Bier, D.M., and Gerich, J.E. (1990). Contribution of liver and skeletal muscle to alanine and lactate metabolism in humans. *Am J Physiol* 259, E677-684.

Constant, J.S., Feng, J.J., Zabel, D.D., Yuan, H., Suh, D.Y., Scheuenstuhl, H., Hunt, T.K., and Hussain, M.Z. (2000). Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair Regen* 8, 353-360.

Cowin, A. (2006). Wound healing is defective in mice lacking tetraspanin CD151. *J Invest Dermatol* 126, 680-689.

D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 (Pt 2), 249-268.

De Witt Hamer, P.C., Mir, S.E., Noske, D., Van Noorden, C.J., and Wurdinger, T. (2011). WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clin Cancer Res* 17, 4200-4207.

Dinarello, C.A. (2005). Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 201, 1355-1359.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127, 514-525.

Fantes, P.A., and Nurse, P. (1978). Control of the timing of cell division in fission yeast. Cell size mutants reveal a second control pathway. *Exp Cell Res* 115, 317-329.

Fuchs, S., Pane-Farre, J., Kohler, C., Hecker, M., and Engelmann, S. (2007). Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189, 4275-4289.

Gertz, E.W., Wisneski, J.A., Stanley, W.C., and Neese, R.A. (1988). Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* 82, 2017-2025.

Ghani, Q.P., Wagner, S., Becker, H.D., Hunt, T.K., and Hussain, M.Z. (2004). Regulatory role of lactate in wound repair. *Methods Enzymol* 381, 565-575.

Ghani, Q.P., Wagner, S., and Hussain, M.Z. (2003). Role of ADP-ribosylation in wound repair. The contributions of Thomas K. Hunt, MD. *Wound Repair Regen* 11, 439-444.

Gladden, L.B. (2008). Current trends in lactate metabolism: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 40, 475-476.

Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O.D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L.G., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., *et al.* (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 20, 661-669.

Green, H., and Goldberg, B. (1964). Collagen and Cell Protein Synthesis by an Established Mammalian Fibroblast Line. *Nature* 204, 347-349.

Greenhalgh, D.G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1019-1030.

Grivennikov, S.I., and Karin, M. (2011). Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis* 70 *Suppl* 1, i104-108.

Haase, V.H. (2009). The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF. *Curr Pharm Des* 15, 3895-3903.

Halestrap, A.P., and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447, 619-628.

Hashimoto, T., and Brooks, G.A. (2008). Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med Sci Sports Exerc* 40, 486-494.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994.

Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 397-422.

Hermansen, L. (1981). Effect of metabolic changes on force generation in skeletal muscle during maximal exercise. *Ciba Found Symp* 82, 75-88.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030.

Hong, K.S., Kim, H.S., Kim, S.H., Lim, D.J., Park, J.Y., and Kim, S.D. (2011). Hypoxia induces wee1 expression and attenuates hydrogen peroxide-induced endothelial damage in MS1 cells. *Exp Mol Med*.

Hunt, T.K. (1990). Basic principles of wound healing. *J Trauma* 30, S122-128.

Hunt, T.K., Aslam, R., Hussain, Z., and Beckert, S. (2008). Lactate, with oxygen, incites angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 614, 73-80.

Hunt, T.K., Conolly, W.B., Aronson, S.B., and Goldstein, P. (1978). Anaerobic metabolism and wound healing: an hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds. *Am J Surg* 135, 328-332.

Hunt TK, H.M. (1992). *Wound Healing: Biochemical & Clinical Aspects* (Philadelphia, W B Saunders Co).

Juel, C. (1997). Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev* 77, 321-358.

Kellogg, D.R. (2003). Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci* 116, 4883-4890.

Knighton, D.R., Silver, I.A., and Hunt, T.K. (1981). Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 90, 262-270.

Koh, T.J., and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 13, e23.

Kohler, C., Wolff, S., Albrecht, D., Fuchs, S., Becher, D., Buttner, K., Engelmann, S., and Hecker, M. (2005). Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* in growing and non-growing cells: a physiological approach. *Int J Med Microbiol* 295, 547-565.

Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., and Singh, R.K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170, 3369-3376.

Li, A.G., Lu, S.L., Han, G., Hoot, K.E., and Wang, X.J. (2006). Role of TGFbeta in skin inflammation and carcinogenesis. *Mol Carcinog* 45, 389-396.

Löffler, M., Zieker, D., Weinreich, J., Lob, S., Konigsrainer, I., Symons, S., Buhler, S., Konigsrainer, A., Northoff, H., and Beckert, S. (2011). Wound fluid lactate concentration: a helpful marker for diagnosing soft-tissue infection in diabetic foot ulcers? Preliminary findings. *Diabet Med* 28, 175-178.

Lu, H., Dalgard, C.L., Mohyeldin, A., McFate, T., Tait, A.S., and Verma, A. (2005). Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 280, 41928-41939.

Lu, H., Forbes, R.A., and Verma, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277, 23111-23115.

Mahalik, T.J., Carrier, A., Owens, G.P., and Clayton, G. (1992). The expression of GAP43 mRNA during the late embryonic and early postnatal development of the CNS of the rat: an in situ hybridization study. *Brain Res Dev Brain Res* 67, 75-83.

Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22, 355-370.

Mazzeo, R.S., Brooks, G.A., Schoeller, D.A., and Budinger, T.F. (1986). Disposal of blood [1-13C]lactate in humans during rest and exercise. *J Appl Physiol* 60, 232-241.

Meiri, K.F., Saffell, J.L., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1998). Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci* 18, 10429-10437.

Mills, J.C., Roth, K.A., Cagan, R.L., and Gordon, J.I. (2001). DNA microarrays and beyond: completing the journey from tissue to cell. *Nat Cell Biol* 3, E175-178.

Milovanova, T.N., Bhopale, V.M., Sorokina, E.M., Moore, J.S., Hunt, T.K., Hauer-Jensen, M., Velazquez, O.C., and Thom, S.R. (2008). Lactate stimulates vasculogenic stem cells via the thioredoxin system and engages an autocrine activation loop involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 28, 6248-6261.

Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.

Nareika, A., He, L., Game, B.A., Slate, E.H., Sanders, J.J., London, S.D., Lopes-Virella, M.F., and Huang, Y. (2005). Sodium lactate increases LPS-

stimulated MMP and cytokine expression in U937 histiocytes by enhancing AP-1 and NF-kappaB transcriptional activities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E534-542.

Nazarenko, I., Lowe, B., Darfler, M., Ikonomi, P., Schuster, D., and Rashtchian, A. (2002). Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res* 30, e37.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 29, 71-109.

Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.L., Stella, N., and Magistretti, P.J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20, 291-299.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Racker, E. (1972). Bioenergetics and the problem of tumor growth. *Am Sci* 60, 56-63.

Ramos-Payan, R., Aguilar-Medina, M., Estrada-Parra, S., Gonzalez, Y.M.J.A., Favila-Castillo, L., Monroy-Ostria, A., and Estrada-Garcia, I.C. (2003). Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR Green I. *Scand J Immunol* 57, 439-445.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154-160.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.

Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., and Reed, M.W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to

study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285, 194-204.

Schulz, T.J., Thierbach, R., Voigt, A., Drewes, G., Mietzner, B., Steinberg, P., Pfeiffer, A.F., and Ristow, M. (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 281, 977-981.

Schulze, A., and Downward, J. (2001). Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol* 3, E190-195.

Sen, C.K., Gordillo, G.M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T.K., Gottrup, F., Gurtner, G.C., and Longaker, M.T. (2009). Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen* 17, 763-771.

Shabnam, M.S., Srinivasan, R., Wali, A., Majumdar, S., Joshi, K., and Behera, D. (2004). Expression of p53 protein and the apoptotic regulatory molecules Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in locally advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 45, 181-188.

Shalon, D., Smith, S.J., and Brown, P.O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6, 639-645.

Sheikh, A.Y., Gibson, J.J., Rollins, M.D., Hopf, H.W., Hussain, Z., and Hunt, T.K. (2000). Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg* 135, 1293-1297.

Skene, J.H. (1989). Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 12, 127-156.

Stanley, W.C. (1991). Myocardial lactate metabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 23, 920-924.

Tang, T., Francois, N., Glatigny, A., Agier, N., Mucchielli, M.H., Aggerbeck, L., and Delacroix, H. (2007). Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment. *Bioinformatics* 23, 2686-2691.

Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., and Pfaffl, M.W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* 31, e122.

Togel, F., Hu, Z., Weiss, K., Isaac, J., Lange, C., and Westenfelder, C. (2005). Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F31-42.

Trimmer, J.K., Casazza, G.A., Horning, M.A., and Brooks, G.A. (2001). Autoregulation of glucose production in men with a glycerol load during rest and exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E657-668.

Tyagi, S., and Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14, 303-308.

Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A., and Brasier, A.R. (1999). Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 94, 1878-1889.

Warburg, O. (1925). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin Wochenschr* 4, 534-536.

Warburg, O. (1927). Über den heutigen Stand des Carcinomproblems. *Naturwiss* 15, 1-4.

Wasserman, K. (1984). The anaerobic threshold measurement to evaluate exercise performance. *Am Rev Respir Dis* 129, S35-40.

Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83, 835-870.

Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., and Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 17, 804-807.

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., and Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130-131, 134-138.

Wright, M.D., Moseley, G.W., and van Spruiel, A.B. (2004). Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens* 64, 533-542.

Zhao, J.C., Zhang, L.X., Zhang, Y., and Shen, Y.F. (2011). The differential regulation of Gap43 gene in the neuronal differentiation of P19 cells. *J Cell Physiol*.

Ziegler, M. (2000). New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem* 267, 1550-1564.

Zieker, D., Schafer, R., Glatzle, J., Nieselt, K., Coerper, S., Kluba, T., Northoff, H., Konigsrainer, A., Hunt, T.K., and Beckert, S. (2008). Lactate modulates gene expression in human mesenchymal stem cells. *Langenbecks Arch Surg* 393, 297-301.

7. Veröffentlichungen

Schneider, CC et al. (2012). Lactate influences the gene expression profil of human mesenchymal stem cells (hMSC) in a dose dependent manner. not yet published

8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Derek Zieker für die Überlassung des Themas bedanken. Die Zusammenarbeit war für mich sowohl akademisch als auch persönlich eine große Bereicherung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Zieker, insbesondere bei Sarah Bühler. Ihre kompetente und freundliche Hilfestellung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke auch der Arbeitsgruppe Schäfer am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) und Dr. Michael Walter von der Microarray Facility Tübingen (MFT Services).

Von Herzen danke ich auch meiner Familie. Meinen Eltern Renate und Karl-Georg für die liebevolle Unterstützung und Förderung. Meinen Brüdern Philipp und David für Rat und Tat.

Ganz besonderen Dank auch an meine Freundin, und womöglich bald Frau!

9. Lebenslauf

Carl Christoph Schneider



Profil

Geburtsdatum 20. Mai 1983
Geburtsort Mannheim, Deutschland
Eltern Dr. med. Karl Georg Schneider, Internist
Dr. med. Renate Füssinger-Schneider, Internistin
Geschwister Dr. med Philipp R. A. Schneider
cand. med. David V. M. Schneider

Ausbildung

1989 - 1993 Blankenstein Grundschule, Steinheim
1993 - 1999 Herzog Christoph Gymnasium, Beilstein
1999 - 2000 Ashville College, Harrogate, Großbritannien
2000 - 2002 Albrecht-Leo-Merz Gymnasium, Stuttgart
06/21/ 2002 Abitur am Albrecht-Leo-Merz Gymnasium, Stuttgart
2003 - 2004 Zivildienst am Katharinen Hospital, Stuttgart
2004 - 2005 Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz, Berlin
2006 - 2008 Studium Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen
09/09/ 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Göttingen
2008 - 2012 Studium Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
23/10/ 2012 Staatsexamen Humanmedizin Universität Tübingen

Famulaturen

4/2009 Dres. med. Schneider, Steinheim
8/2009 Prof. Dr. G. Kieninger - Chirurgie, Cedars JAIH, Dubai, UAE
3/2010 Prof. Dr. P. Neuhaus - Chirurgie, Charité - Campus Virchow, Berlin
3/2011 Prof. Dr. A. Königsrainer - Chirurgie, UKT, Tübingen

Praktisches Jahr

8/2011 Prof. J.F. Bergmann - Innere Medizin, Hôpital Laribosière, Paris
10/2011 Prof. Dr. Dr. h.c. H.U. Häring, Innere Medizin, UKT
12/2011 Prof. Dr. A. Königsrainer - Visceral Chirurgie, UKT
3/2012 Prof. Dr. C. Schlensak - THG, UKT
5/2012 Prof. Dr. H.E. Schaller, Plastische Chirurgie, BGU

Sonstiges

6/2011 Gründung der DCP SCHNEIDER Patentverwaltungsgesellschaft

CURRICULUM VITAE